



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2023.05.25

(21) Номер заявки

201491643

(22) Дата подачи заявки

2013.03.05

(51) Int. Cl. **C07K 14/705** (2006.01)

(54) ИДЕНТИФИКАЦИЯ МУТАЦИЙ КАНАЛ-ОПСИНА-2 (Chop2) И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **61/606,663**

(32) **2012.03.05**

(33) **US**

(43) **2015.02.27**

(86) **PCT/US2013/029171**

(87) **WO 2013/134295 2013.09.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
УЭЙН СТЕЙТ ЮНИВЕРСИТИ (US)

(72) Изобретатель:
Пань Чжо-Хуа (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) SONJA KLEINLOGEL ET AL.: "Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca²⁺-permeable channelrhodopsin CatCh", NATURE NEUROSCIENCE, vol. 14, № 4, 13 March 2011 (2011-03-13), p. 513-518, XP055009508, ISSN: 1097-6256, DOI: 10.1038/nn.2776, abstract, p. 513, 517, fig. 3

MARTIN L. REIN ET AL.: "The optogenetic (r)evolution", MOLECULAR GENETICS AND GENOMICS, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 287, № 2, 20 December 2011 (2011-12-20), p. 95-109, XP035008231, ISSN: 1617-4623, DOI: 10.1007/S00438-011-0663-7, abstract, table 1, p. 96, 106

WO-A1-2011140279

A. BERNDT ET AL.: "High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low

light levels", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 108, № 18, 3 May 2011 (2011-05-03), p. 7595-7600, XP055066271, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1017210108, abstract

WO-A1-2012032103

ULLRICH SYBILLE ET AL.: "Degradation of channelopsin-2 in the absence of retinal and degradation resistance in certain mutants", BIOLOGICAL CHEMISTRY, WALTER DE GRUYTER GMBH & CO, BERLIN, DE, vol. 394, № 2, 1 February 2013 (2013-02-01), p. 271-280, XP009170311, ISSN: 1431-6730, abstract

M. PRIGGE ET AL.: "Color-tuned Channelrhodopsins for Multiwavelength Optogenetics", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 287, № 38, 27 July 2012 (2012-07-27), p. 31804-31812, XP055075027, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M112.391185, fig. 2-4, p. 31809-31812

E. IVANOVA ET AL.: "Evaluation of AAV-Mediated Expression of Chop2-GFP in the Marmoset Retina", INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE, vol. 51, № 10, 1 October 2010 (2010-10-01), p. 5288-5296, XP055066268, ISSN: 0146-0404, DOI: 10.1167/iovs.10-5389, abstract

WO-A2-2007131180

FENG ZHANG ET AL.: "The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools", CELL, vol. 147, № 7, 23 November 2011 (2011-11-23), p. 1446-1457, XP028348924, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2011.12.004 [retrieved on 2011-12-08]

(57) В изобретении предлагаются композиции и наборы реагентов, включающие по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты или полипептидную молекулу, кодирующую мутантный белок ChR2. Способы по изобретению включают введение объекту композиции, включающей мутантный ChR2, для сохранения, улучшения или восстановления фотопреобразования. Предпочтительно композиции и способы по изобретению предлагаются объекту с нарушенным зрением, восстанавливая таким образом зрение до нормального уровня.

Родственные заявки

Для данной заявки испрашивается приоритет по предварительной заявке № 61/606663, поданной 5 марта 2012 г., содержание которой включено в данный документ путем ссылки в полном объеме.

Государственная поддержка

Изобретение было осуществлено с помощью поддержки государства в виде гранта NIH EY 17130 Национального Института Здравоохранения/Национального Глазного Института. Государство обладает определенными правами на изобретение.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится в основном к области молекулярной биологии. Идентифицированы мутации в гене канал-опсина-2 (Channelopsin-2) (Chop2). Композиции, включающие мутантный ген Chop2, используются в терапевтических способах для улучшения и восстановления потери зрения.

Предшествующий уровень техники

Сетчатка состоит из фоторецепторов (или фоторецепторных клеток, палочковидных и конусных). Фоторецепторы представляют собой высокоспециализированные нейроны, которые отвечают за фото-преобразование или превращение света (в форме электромагнитного излучения) в электрические и химические сигналы, которые стимулируют каскад событий внутри зрительной системы, генерируя в конечном счете представление нашего мира.

Утрата или дегенерация фоторецепторов подвергает существенному риску, если не ингибирует полностью, фотообразование визуальной информации внутри сетчатки. Утрата фоторецепторных клеток и/или утрата функционирования фоторецепторных клеток представляет собой первичную причину ослабленной зрительной активности, ослабленной светочувствительности и слепоты. В данной области назрела необходимость в получении композиций и способа, которые восстанавливают фоточувствительность сетчатки объекта, который испытал потерю зрения.

Сущность изобретения

В изобретении предлагается решение назревшей необходимости получения способа для восстановления и/или повышения светочувствительности фоторецепторных клеток путем экспрессии предпочтительных мутаций и/или их комбинации, гена канал-опсина-2 (Chop2), и затем предлагаются способы генной терапии на основе гена канал-опсина-2 (Chop2).

Генная терапия на основе гена канал-опсина-2 (Chop2) предлагает превосходную стратегию для восстановления фоточувствительности сетчатки после дегенерации фоторецепторов. Белковый продукт гена Chop2, когда он связывается с изомеризуемыми под действием света хромофорами, все транс-ретинали, образует функциональный светорегулируемый канал, называемый канал-родопсин-2 (ChR2). Нативный ChR2 демонстрирует низкую светочувствительность. Недавно сообщалось, что два мутанта ChR2, L132C и T159C, значительно повышают их светочувствительность (Kleinlogel et al. (2011), Nat. Neurosci., 14:513-8; Berndt et al. (2011), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 108:7595-600; Prigge et al. (2012), J. Biol. Chem., 287(38)3104:12, содержание каждой из которых включено в данный документ ссылкой в полном объеме). Свойства этих двух мутантов ChR2 (т.е. L132C и T159C) исследовали и сравнивали с рядом двойных мутантов в этих двух сайтах для идентификации подходящих кандидатов для терапевтических способов. Композиции, включающие одну или несколько из этих мутаций, предлагаются нуждающемуся в этом объекту с целью восстановления зрения. Конкретно, целевые мутации в гене Chop2 вводятся в клетку и/или интегрируются в геномную ДНК клетки для улучшения или восстановления зрения. Целевые мутации в гене Chop2, которые вводятся в клетку для улучшения или восстановления зрения, также могут оставаться эпизодическими, не интегрируясь в геномную ДНК.

Мутации в аминокислотных положениях L132 или T159 Chop2 (и, таким образом, полученный в результате ChR2) значительно снижают пороговую светочувствительность, которая требуется для того, чтобы вызвать ChR2-опосредованный фототок. Двойные мутанты в аминокислотных положениях L132 и T159 дополнительно повышают фототок при низких интенсивностях света, превышая значения, соответствующие одиночным мутациям. Ганглиозные клетки сетчатки, экспрессирующие двойные мутанты в положениях L132 и T159, могут отвечать на интенсивности света, которые попадают в интервал условий естественного дневного освещения, но все равно поддерживают адекватное и высокое временное разрешение, которое подходит для восстановления эффективного зрения. Таким образом, мутантный белок Chop2 по настоящему изобретению, который образует мутантные ChR2, обладающие улучшенной чувствительностью, используется индивидуально или в комбинации для восстановления зрения.

Конкретно, в изобретении предлагается полипептидная молекула, включающая или состоящая из SEQ ID NO: 26, в которой аминокислота в положении 132 SEQ ID NO: 26 не является лейцином (L). В некоторых воплощениях выделенной полипептидной молекулы аминокислота в положении 132 представляет собой цистеин (C) или аланин (A). Когда аминокислота в положении 132 представляет собой цистеин (C), полипептидная молекула может включать или состоять из SEQ ID NO: 13. Когда аминокислота в положении 132 представляет собой аланин (A), то полипептидная молекула может включать или состоять из SEQ ID NO: 20.

В изобретении предлагается полипептидная молекула, включающая или состоящая из SEQ ID NO: 26, в которой аминокислота в положении 159 SEQ ID NO: 26 не является треонином (T). В некоторых во-

ChR2, который вызывает ток в ответ на пороговую интенсивность света, которая ниже, чем пороговое значение белка ChR2 дикого типа. Кроме того, ток проводят катионы. Типичные катионы включают в частности, ионы H^+ , Na^+ , K^+ и Ca^{2+} . ChR2 дикого типа и мутантные белки, описанные в данном документе, неспецифично проводят катионы. Следовательно, ток проводит один или несколько из следующих ионов: H^+ , Na^+ , K^+ и Ca^{2+} .

В изобретении предлагается любая из выделенных полипептидных молекул, описанных в данном документе, дополнительно включающая фармацевтически приемлемый носитель. В изобретении также предлагается композиция, включающая по меньшей мере одну выделенную полипептидную молекулу, описанную в данном документе. Композиция может дополнительно включать фармацевтически приемлемый носитель.

В изобретении предлагается выделенная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует любой из выделенных полипептидов, описанных в данном документе. Кроме того, выделенная молекула нуклеиновой кислоты может дополнительно включать фармацевтически приемлемый носитель. В изобретении также предлагается композиция, включающая по меньшей мере одну выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе. Композиция может дополнительно включать фармацевтически приемлемый носитель.

В изобретении предлагается клетка, где клетка включает выделенную полипептидную молекулу по изобретению или контактирует с ней. Кроме того, в изобретении предлагается клетка, которая включает выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует выделенную полипептидную молекулу по изобретению, или контактирует с ней. В изобретении предлагается композиция, включающая, по существу состоящая из или состоящая из, клетки, которая включает выделенную полипептидную молекулу по изобретению или молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует выделенную полипептидную молекулу по изобретению. Клетка по изобретению может контактировать с выделенным полипептидом *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* или *in situ*. В некоторых воплощениях изобретения клетка представляет собой фоторецептор; горизонтальную клетку; биполярную клетку; амакриновую клетку и особенно АП-амакриновую клетку; или ганглиозную клетку сетчатки, включая фоточувствительную ганглиозную клетку сетчатки. Предпочтительно клетка представляет собой ганглиозную клетку сетчатки, фоточувствительную ганглиозную клетку сетчатки, биполярную клетку, биполярную клетку ON-типа, палочковидную биполярную клетку или АП амакриновую клетку. В некоторых аспектах изобретения клетка представляет собой фоторецептор, биполярную клетку, палочковидную биполярную клетку, коническую биполярную клетку ON-типа, ганглиозную клетку сетчатки, фоточувствительную ганглиозную клетку сетчатки, горизонтальную клетку, амакриновую клетку или АП-амакриновую клетку.

В изобретении предлагается способ улучшения или восстановления зрения, включающий введение объекту любой из композиций, описанных в данном документе. В изобретении дополнительно предлагается профилактический способ сохранения зрения, включающий введение объекту любой из композиций, описанных в данном документе.

Способы, описанные в данном документе, также могут применяться к тем объектам, которые являются здоровыми, слепыми (частично или полностью), и/или к объектам с дегенерацией сетчатки (отличающейся потерей палочковидных и/или конусных фоторецепторных клеток), но могут зависеть от активности фоточувствительных ганглиозных клеток сетчатки для определения уровня освещенности окружающей среды. Например, способы, описанные в данном документе, могут использоваться для сохранения, улучшения или восстановления активности фоточувствительных ганглиозных клеток сетчатки, которые опосредуют преобразование световой информации для синхронизации суточных ритмов с 24-часовым циклом свет/темнота, пупиллярного контроля и рефлексов и для световой регуляции высвобождения мелатонина.

В некоторых воплощениях способов изобретения объект может иметь нормальное зрение или нарушенное зрение. Альтернативно или дополнительно объект может подвергаться риску развития глазного заболевания, которое приводит к нарушению зрения. Например, объект может иметь наследственную историю глазных заболеваний, включающих макулярную дегенерацию и пигментный ретинит. Объект может иметь риск быть подвергнутым поражению глаз, которое вызывает повреждение фоточувствительных клеток в сетчатке. Объект может иметь генетический маркер или генетическое/врожденное заболевание, которое приводит в результате к нарушенному зрению, слабому зрению, к частичной слепоте, или к полной слепоте. Объект может иметь рефракционный дефект, который приводит в результате к миопии (близорукость) или к гипертрофии (дальнозоркость).

Композиции или способы по изобретению могут вводиться объекту или системно или местно. Предпочтительным путем местного введения является интравитреальная инъекция.

Другие признаки и преимущества изобретения будут понятны на основе следующего подробного описания и формулы изобретения и охвачены ими.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены репрезентативные регистрации токов, вызванных светом, из (WT) ChR2 дикого типа, мутантов L132C, L132C/T159C и L132C/159S в клетках НЕК для сравнения их светочувствительности (А). Световые стимулы (фотоны/см²/с при 460 нм) генерировали с помощью ксеноновой дуго-

вой лампы и ослабляли с помощью нейтрально-серого светофильтра: ND4.0 ($2,8 \times 10^{14}$), ND3.0 ($1,4 \times 10^{15}$), ND2.5 ($4,8 \times 10^{15}$); ND2.0 ($1,6 \times 10^{16}$), ND1.0 ($1,3 \times 10^{17}$), ND0 ($1,2 \times 10^{18}$). (B) Те же следы тока представлены при различных шкалах тока. Следы, указанные стрелками, вызваны одной и той же интенсивностью света (ND2.5).

На фиг. 2 представлены репрезентативные регистрации токов, вызванных светом, из (WT) ChR2 дикого типа, мутантов L132C, L132C/T159C и L132C/159S, на 10 мс светового пульса ($1,2 \times 10^{18}$ фотонов/см²/с при 460 нм) в клетках НЕК для сравнения временной зависимости их дезактивации (время затухания после выключения света).

На фиг. 3 представлены репрезентативные регистрации мультиканального чипа опосредованных WT ChR2, L132C, L132C/T159C и L132C/T159S спайковых активностей из ганглиозных клеток сетчатки в тотальном препарате сетчатки для сравнения их световой чувствительности. Световые стимулы (фотоны/см²/с) генерировали с помощью 473 нм лазера голубой области спектра и ослабляли с помощью нейтрально-серого светофильтра: ND0 ($6,3 \times 10^{16}$), ND1.0 ($7,4 \times 10^{15}$), ND1.5 ($2,7 \times 10^{15}$), ND2.0 ($7,3 \times 10^{14}$), ND2.5 ($3,2 \times 10^{14}$), ND3.0 ($8,5 \times 10^{13}$), ND3.5 ($3,8 \times 10^{13}$) и ND4.0 ($9,5 \times 10^{12}$).

На фиг. 4 представлены репрезентативные регистрации мультиканального чипа опосредованных WT ChR2, L132C, L132C/T159C и L132C/T159S спайковых активностей из ганглиозных клеток сетчатки в тотальном препарате сетчатки для сравнения их временной динамики. В каждой панели представлен двумерный массив точек 10 последовательных вызванных светом спайков, происходящих от одного нейрона (верх) и гистограммы средней степени импульсов (низ). Световые импульсы с различной частотой генерировали с помощью лазерного источника 473 нм в голубой области спектра с интенсивностями примерно на одну логарифмическую единицу выше пороговой интенсивности каждого мутанта. Регистрации WT ChR2 и L132C представлены в (A), и регистрации L132C/T159C и L132C/T159S представлены в (B).

Подробное описание

Зрительная система.

Центральная нервная система опосредует зрение (также обозначается в данном документе как визуальный образ) посредством специализированных клеток и уникальных способов сигнальной трансдукции, присутствующей в зрительной системе. Принципиальная ответственность зрительной системы заключается в преобразовании света в форме электромагнитного излучения в образ или изображение окружающей среды. Дополнительно к "зрительной" функции системы зрительная система также регулирует зрачковый световой рефлекс (PLR), подгонку суточного ритма к периодическим циклам свет/темнота и высвобождение гормона мелатонина.

Клетки сетчатки являются первыми клетками зрительной или нервной системы, которые встречаются со светом (электромагнитное излучение различной длины волны и интенсивности). Фотоны проходят через роговую оболочку глаз, зрачок и хрусталик перед достижением сетчатки. Сетчатка имеет уникальную структуру, так как фоторецепторные клетки, которые непосредственно поглощают фотоны, локализованы на внешнем слое сетчатки. Фотоны, которые проходят к хрусталику, сначала встречаются с внутренним слоем ганглиозных клеток сетчатки (небольшая часть которых является фоточувствительной посредством экспрессии опсина, меланопсина) и промежуточным слоем биполярных клеток перед достижением внешнего слоя фоторецепторных клеток (также известных палочковидные и конусные клетки). Палочковидные фоторецепторы действуют в условиях уменьшения освещения (скотопическое зрение), в то время как фоторецепторы действуют в условиях яркого освещения (фотопическое зрение) и отвечают за цветовое зрение. Конические фоторецепторы непосредственно соединяются посредством синапса с коническими биполярными клетками ON- и OFF-типа, которые, в свою очередь, непосредственно соединяются посредством синапса с ганглиозными клетками сетчатки ON- и OFF-типа. Палочковидные фоторецепторы соединяются посредством синапса с палочковидными биполярными клетками (уникальный тип клеток, которые относятся к ON-типу), которые соединяются посредством синапса с АП-амакриновыми клетками. АП-амакриновые клетки затем передают зрительные сигналы на конические биполярные клетки ON-типа посредством щелевидного соединения и на конические биполярные клетки OFF-типа, а также на ганглиозные клетки OFF-типа посредством ингибирующих глицинергических синапсов. Ганглиозные клетки сетчатки отвечают за связывание зрительной информации с нейронами мозга.

Фотообразование.

Внутри сетчатки фоторецепторные клетки поглощают фотоновые частицы и трансформируют исходные данные частоты и длины волны света в химические и затем в электрические сигналы, которые передают эту исходную информацию посредством зрительной и нервной систем. Конкретно, белок опсин, локализованный на поверхности фоторецептора (палочковидная, коническая и/или фоточувствительная ганглиозная клетка сетчатки) поглощает фотон и инициирует внутриклеточный сигнальный каскад, который приводит к гиперполяризации фоторецептора. В темноте белок опсин не поглощает фотоны, фоторецепторы деполяризованы. Зрительные сигналы фоторецепторов затем передаются через биполярные клетки, амакриновые клетки и ганглиозные клетки в высшие зрительные центры в мозге. Кон-

кретно, когда палочковидные и конические фоторецепторы деполяризованы (в темноте), они вызывают деполяризацию палочковидных биполярных клеток конических биполярных клеток ON-типа, но вызывают гиперполяризацию конических биполярных клеток OFF-типа, которые, в свою очередь, вызывают деполяризацию АП-амакриновых клеток и повышают спайки ганглиозных клеток сетчатки ON-типа и уменьшают спайки ганглиозных клеток сетчатки OFF-типа. Противоположный эффект наблюдается (для палочковидных, ON- и OFF-биполярных клеток, АП-амакриновых клеток и ON- и OFF-ганглиозных клеток), когда палочковидные и конические фоторецепторы гиперполяризованы (в ответ на свет).

Световая информация обрабатывается и уточняется значительным образом путем функционирования фоторецепторов, биполярных клеток, горизонтальных клеток, амакриновых клеток и ганглиозных клеток сетчатки. Для усложнения данной системы фоторецепторы обнаружены в трех основных вариациях, включающих палочки, конусы (из которых три типа отвечают особенно существенно за различие длин волн света) и фоточувствительные ганглиозные клетки сетчатки. Таким образом, первый слой обработки информации происходит на уровне фоторецепторов, которые дифференциально отвечают на определенные длины волн и интенсивности света. Биполярные клетки сетчатки получают информацию от обоих типов клеток, фоторецепторных и горизонтальных. Горизонтальные клетки сетчатки получают информацию от множества фоторецепторных клеток и, таким образом, интегрируют информацию между типами клеток и через расстояния в сетчатке. Биполярные клетки дополнительно интегрируют информацию непосредственно из фоторецепторных клеток и горизонтальных клеток путем получения в основном ступенчатых потенциалов к ганглиозным клеткам сетчатки, хотя некоторые недавние исследования указывают на то, что некоторые биполярные клетки могут генерировать потенциалы действия. Конические биполярные клетки образуют соединения посредством синапса с ганглиозными клетками сетчатки и амакриновыми клетками, в то время как палочковидные биполярные клетки образуют соединение посредством синапса с АП-амакриновыми клетками. Аналогично горизонтальным клеткам большинство амакриновых клеток интегрирует информацию латерально внутри сетчатки. В отличие от горизонтальных клеток, большинство амакриновых клеток представляют собой ингибирующие (GABA-эргические) интернейроны. Амакриновые клетки также более специализированы, чем горизонтальные клетки, так как каждая амакриновая клетка образует специфичное соединение посредством синапса с конкретным типом биполярной клетки (одна из десяти разновидностей биполярной клетки). Конкретно, АП-амакриновая клетка представляет собой критический вставочный нейрон в скотопическом сигнальном пути (при скотопическом зрении, когда конические фоторецепторы не реагируют). АП-амакриновые клетки получают синаптический вход из палочковидных биполярных клеток и затем передают на себе сигналы сигнальному пути конических клеток посредством ON- и OFF-конических биполярных клеток к ON-и OFF-ганглиозным клеткам, как описано выше. Таким образом, экспрессия *Chor2*, и образование в результате *ChR2*, в палочковидных биполярных клетках или в АП-амакриновых клетках может создавать как ON-, так и OFF-ответы в ганглиозных клетках сетчатки. Кроме того, ганглиозные клетки сетчатки интегрируют информацию из биполярных клеток и из амакриновых клеток. Хотя ганглиозные клетки сетчатки значительно варьируют по размеру, проводимости и ответу на зрительное стимулирование (например, поле зрения), все ганглиозные клетки сетчатки распространяют длинный аксон в мозг. За исключением минимальной части ганглиозных клеток сетчатки, которые передают не зрительную информацию, касающуюся зрачкового светового рефлекса и "навязывание" суточного ритма, вся совокупность аксонов, распространяющаяся от ганглиозных клеток сетчатки, образует второй черепной нерв, зрительный перекрест и зрительный тракт центральной нервной системы. Следовательно, значительное количество обработки информации происходит в самой сетчатке.

Фоторецепторные клетки экспрессируют эндогенные белки опсины, такие как родопсин. Мутантные белки *Chor2* по изобретению могут экспрессироваться в любом типе клеток и образуют функциональные *ChR2*-каналы. Предпочтительно клетка представляет собой клетку сетчатки. Типичные клетки включают в частности фоторецепторные клетки (например, палочки, конусы и фоточувствительные ганглиозные клетки сетчатки), горизонтальные клетки, биполярные клетки, амакриновые клетки и ганглиозные клетки сетчатки.

Канал-опсин-2 (*Chor2*).

Канал-опсин-2 (*Chor2*) был впервые выделен из зеленых водорослей *Chlamydomonas reinhardtii*. Канал-опсин-2 представляет собой белок, содержащий семь трансмембранных доменов, который становится светорегулируемым (светочувствительным), когда связывается с хромофором полностью-транс-ретиналь. *Chor2*, будучи связанным с молекулой ретиналя посредством связи с основанием Шиффа, образует светорегулируемый, неспецифичный, выпрямляемый внутри катионный канал, называемый канал-родопсином-2 (*Chor2* ретинальден, сокращенно *ChR2*).

При обозначении в данном документе "канал-опсин-2" или "*Chor2*" относится к гену, который кодирует канал-опсин-2, который затем образует канал-родопсин-2 (*ChR2*), связанный с ретиналем. Генные конструкторы по настоящему изобретению относятся главным образом к канал-опсину-2 (т.е. без ретиналя), и все варианты *Chor2*, раскрытые в данном документе, образуют функциональные варианты канал-родопсина-2. Способы, раскрытые в данном документе, могут включать доставку *Chor2* к клеткам без экзогенного ретиналя. Понятно, что при экспрессии *Chor2* в клетках (т.е. в нейронах сетчатки), эндоген-

но доступный ретиналь связывается с Chp2 дикого типа или с мутантными Chp2 по настоящему изобретению с образованием функциональных светорегулируемых каналов, WT ChR2 или мутантных ChR2. Как таковые, белки Chp2, при обозначении в данном документе, также могут быть синонимами с ChR2.

При использовании в данном документе, "канал-родопсин-2" или "ChR2" относятся к ретиналь-связанному функциональному светочувствительному каналу. В одном воплощении, связанный ретиналь может обеспечиваться экзогенно. В предпочтительном воплощении связанный ретиналь обеспечивается на эндогенном уровне, доступном в клетке. Настоящее изобретение также охватывает функциональные каналы канал-родопсина-2, образованные с помощью полипептидов и полинуклеотидов, кодирующих мутанты Chp2, описанные в данном документе.

При освещении предпочтительной дозой светового излучения, ChR2 открывает пору канала, через который ионы H^+ , Na^+ , K^+ , и/или Ca^{2+} перетекают в клетку из внеклеточного пространства. Активация канала ChR2, как правило, вызывает деполяризацию клетки, экспрессирующей канал. Деполяризованная клетка продуцирует ступенчатые потенциалы и/или потенциалы действия для переноса информации от Chp2/ChR2-экспрессирующей клетки к другим клеткам сетчатки или мозга.

Форма ChR2 дикого типа или мутантного ChR2 с высокой временной разрешающей способностью находятся в центральном фокусе нейробиологических исследований. При экспрессии в нейроне млекопитающего, ChR2 опосредует светоконтролируемую деполяризацию *in vitro* или *ex vivo* культур. ChR2 дикого типа или мутантные ChR2 с высокой временной разрешающей способностью (последние обычно демонстрируют низкую светочувствительность) представляют несколько проблем, которые должны быть разрешены для возможности их применения с целью восстановления зрения. Для цели восстановления зрения ChR2 с высокой светочувствительностью является более целесообразным, чем ChR2 с высокой временной разрешающей способностью.

Белки ChR2 дикого типа требуют для полной активации освещения высокой интенсивности голубой области спектра (т.е. 10^{18} - 10^{19} фотонов $s^{-1} cm^{-2}$ при длине волны 480 нм). Продолжительное освещение данного типа может разрушить клетки.

Кинетика белка ChR2 дикого типа является недостаточно оптимальной для максимальной эффективности канала.

Эффективность может повышаться путем модификации одной или нескольких аминокислот белка ChR2 дикого типа или для удлинения продолжительности открытого состояния канала, или для повышения единиц проводимости канала, или и то и другое. Одноканальная проводимость ChR2 дикого типа небольшая. Таким образом, нейронная активация *in vivo* будет требовать или высокой экспрессии канала дикого типа, или очень интенсивной активации с использованием предпочтительной длины волны голубой области спектра. Более простое решение может быть найдено путем изменения проводимости канала или удлинения продолжительности времени открытия канала. Каждый из этих механизмов и, конкретно, комбинация этих механизмов, дает возможность использования более низкой и безопасной интенсивности света для достижения одинакового уровня клеточной деполяризации.

Например, мутантные белки ChR2 по изобретению достигают более высокой светочувствительности посредством удлинения продолжительности открытого состояния канала. Следовательно, каждый мутантный канал ChR2 проводит более высокий фототок, чем канал ChR2 дикого типа при активации одинаковых интенсивностей света. Таким образом, мутантные каналы активируются с помощью интенсивностей света, которые ниже, чем те, что требуются для активации каналов ChR2 дикого типа. Количество, детектируемая активность спайка ганглиозных клеток сетчатки, экспрессирующих мутантные белки ChR2, могут вызываться световой интенсивностью, которая на 1,5-2 log единиц ниже, чем световая интенсивность, требуемая, чтобы вызвать активность спайка из ганглиозных клеток сетчатки, экспрессирующих ChR2 дикого типа. Таким образом, световые интенсивности, требуемые для активации мутантных белков ChR2, близки к интервалу нормального дневного освещения или попадают в него.

Следующие последовательности обеспечивают частные примеры мутантных и белков Chp2 дикого типа и полинуклеотиды, кодирующие указанные WT и мутантные белки Chp2 по изобретению, и образующие WT и мутантные ChR2 по изобретению.

Chp2 (WT) дикого типа по изобретению могут кодироваться следующей мРНК-последовательностью светорегулируемого ионного канала хламиопсина 4 *Chlamydomonas reinhardtii* (COP4) (GenBank № XM_001701673 и SEQ ID NO: 1.

```

1 gcagcaccat acttgacatc tgtcgccaag caagcattaa acatggatta tggaggcgcc
61 ctgagtgcgg ttggggcgga gctgctatct gtaacgaacc cagtagtctg caatggctct
121 gtacttgtgc ctgaggacca gtgttactgc gcgggctgga ttgagtccgg tggcacaaac
181 ggtgcccaca cggcgtcgaa cgtgctgcaa tggcttgctg ctggcttctc catcctactg
241 cttatgtttt acgcctacca aacatggaag tcaacctgcg gctgggagga gatctatgtg
301 tgcgctatcg agatggtcaa ggtgattctc gagtcttctc tcgagtttaa gaaccctcc
361 atgctgtatc tagccacagg ccaccgcgtc cagtggttgc gttacgccga gtggcttctc
421 acctgcccgg tcattctcat tcacctgta aacctgacgg gcttgtccaa cgactacagc
481 aggcgcacca tgggtctgct tgtgtctgat attggcaca ttgtgtgggg cgccacttcc
541 gccatggcca cgggatacgt caaggtcac ttcttctgcc tgggtctgtg ttatggtgct
601 aacacgttct ttacacgtgc caaggcctac atcgaggggt accacaccgt gccgaagggc
661 cgggtgctgcc aggtggtgac tggcatggct tggctcttct tcgtatcatg gggatgttc
721 cccatcctgt tcactctcgg ccccgagggc ttcgcgctcc tgagcgtgta cggctccacc
781 gtcggccaca ccatcattga cctgatgtcg aagaactgct ggggtctgct cggccaactac
841 ctgcgctgct tgatccacga gcatactctc atccacggcg acattcgcaa gaccacaaa
901 ttgaacattg gtggcaactg gattgaggtc gagacgctgg tggaggacga ggcgagggct
961 ggcgcgggca acaagggcac cggcaagtac gcctcccggc agtcttctc ggtcatgccc
1021 gacaagatga aggagaaggg cattgacgtg cgcgcctctc tggacaacag caaggaggtg
1081 gagcaggaag aggcggccag ggctgccaat atgatgatga acggcaatgg catgggtatg
1141 ggaatgggaa tgaacggcat gaacggaatg ggcggtatga acgggatggc tggcggcgcc
1201 aagcccggcc tggagctcac tccgcagcta cagcccggcc ggcctatctc ggcggtgccg
1261 gacatcagca tgggtgactt ctccgcgag cagtttgctc agctatcggg gacgtacgag
1321 ctgggtgccc cctggggcgc tgacaacaca ctggcgctgg ttacgcaggc gcagaacctg
1381 gtcggcgtgg actttgtggt gattcaccoc gagtctctgc gcgaccgctc tagcaccagc
1441 atcctgagcc gctctgcgcg cgcgggcccag cgtgtggctg cgttcggctg ggcgcagctg
1501 gggcccctgc gtgacctgat cgagctccga aacctggacg gctggctgga gggcccctcg
1561 ttcgacaggg gcatcctgcc ggcccacatc gttgcctggt tggccaagat gcagcagatg
1621 cgcaagatgc agcagatgca gcagattggc atgatgaccg gcgccatgaa cggcatgggc
1681 ggcggctatg ggcggcgcat gaacggcatg ggcggcgcca acggcatgaa caacatgggc
1741 aacggcatgg ggcggcgcat gggcaacgyc atggcgggca atggcatgaa cggaatgggt
1801 ggcggcaacg gcatgaacaa catggggcgc aacggaatgg ccggcaacgg aatggcgggc
1861 ggcattggcg gcaacgggat ggggtggctcc atgaacggca tgagctccgg cgtggtggcc
1921 aacgtgacgc cctccgcccgc cggcggcgat ggcggcatga tgaacggcgg catggtgctg
1981 cccagctcgc cggcgatgaa cggcgcccgc ctgggtacca acccgctctt caacgcccgg
2041 cctcaccgcy tcagctcgca gctcgggtgc gaggcaggca tgggcagcat gggaggcatg
2101 ggcggaatga ggcggaatgg aggcattgggt ggaatggggg gcatggggcg ccgccggcgc
2161 gccacgaagc aggtcgcggg cggcaacgcy gaggcggaga tgctgcagaa tctcatgaac
2221 gagatcaatc gcctgaagcg cgagcttggc gaggtaaaag ctggaggccg gtaactgcat

2281 acctgogagc tgcgcgccct gactcgtcgt acacacggct caggagcacg cgcgctgga
2341 cttctoaacc tgtgtgcaac gtatctagag cggcctgtgc gcgaccgtcc gtgagcattc
2401 cgtgtcgatc ttcccgcctt cgcaccgcaa gttcccttcc tggccctgct gcgcctgacg
2461 catcgtccga acggaagggc ggcttgatca gtaaagcatt gaagactgaa gtcgtgcgac
2521 cgtagtgcta tggctctgca cgtaaagtgg cgtgcctctg cttactacgc atggcccag
2581 actgcttctt tttgggtggc gaggccctgg tcccacatca ttcatttgca taacgtactg
2641 tttagttaca tacgcttgcg ttaacctcga caattgcaac atgggctgag agtccgtacg
2701 gcgctatagg acgaaggtgt tatcggtatg gattaggaat ctcggttgaa aggcttccag
2761 aaagtgagct tcactctgtg ctctgttgg ggtcatcaag aagaacgacg gtaaggcaaa
2821 cgaaggtaaaa gtggcacgtc tttgtgcaca acgggcccgt ggagagtggg ggaagtcatg
2881 tgtgcggtcc taacacgcca gtgcaaacgc ggcttttctg gagctgggtt acggctctggc
2941 tcggcaactg ctctgtgttt taaccacagc ttcggaagtc tgggtatggt ttggtggcag
3001 aaacatttgg gtaacttgag ggtgattcgt ctggagtcgg acaacatggc tgccctccgt
3061 gtgcagggac ggtaatcaat gagctggagc tgtgatgctc accacacggt gcatacccct
3121 gcttacaata acactttgat gtcgtggcca aactatcgtg gagcaagag tttaaagggc
3181 atgagtgcac ggttgcggac gtgocgcaaca attgcatcaa gtatttgacg ccttcaagcc
3241 aacaagtgcg cgcgcggcaa cttgattaac acgcccagcg cagtgggtgg ggcgtgtaca
3301 gtgtttatga gctgccatc tcgatccgt agtgttagggt tcgctgtgac gccgcggcgc
3361 tgtgggcccct tacatggaga gttgggtgct tcaccacagc gttggcgccc ctgaaggggtg
3421 tgctatggtt tggtaagccc gggcccctga agaccgcaac cgtagaaccg tactgaaagg
3481 gtgtcagccc ggggtaactg gatgccctgg gacatagcta ttaatgttga agtgaagccg
3541 tcaagccgag tgccgtgccc cgctgtatca ccaagcccgc tcta

```

Chr2 (WT) дикого типа по изобретению может кодироваться следующей аминокислотной последовательностью светорегулируемого ионного канала хламиопсина 4 (COP4) (GenBank № XP 001701725 и SEQ ID NO: 2).

```

1 mdyggalsav grellfvtnp vvnngsvlvp edqcyagwi esrgtngaqt asnvlqwlaa
61 gfsilllmfy ayqtwkstcg weeiyvcaie mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr
121 yaewlltcpv ilihlsnltg lndysrrtm gllvsdigti vwgatsamat gyvkviffcl
181 glycyantff haakayiegy htvpkgrcrq vvtgmawlff vswgmfpilf ilgpegfgvl
241 svygstvght iidlmskncw gllghylrvl ihehilihgd irkttklmig gteievettlv
301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskeveqeq aaraammmmn
361 gngmgmgmgn ngmngmggmn gmaggakpgl eltpqlqpgr vilavpdism vdfreqfaq
421 lsvtyelvpa lgadntlalv tqaqnlggvd fvlhpeflr drsstilsr lrgagqrva
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfgqg ilpahivalv akmqqmrkmq qmqqigmntg
541 gmnmgggmgg ggmngmgggn gmnmgngmgg ggmngmgggn gmnmgggngg mnmnggngma
601 gngmgggmgg ngmggsmngm ssgvvanvtp saaggmggmm nggmaapqsp gmnnggrlgt
661 plfnaapspl ssqlgaeagm gsmggmggms gmgmgmgmgg mggagaattq aaggnaeae
721 lqnlmneinr lkrelge

```

Chop2 (WT) дикого типа по изобретению могут кодироваться следующей последовательностью гена белка, связывающего ретиналь, *Chlamydomonas reinhardtii* (cop4) (GenBank № AF461397 и SEQ ID NO: 3).

```

1 gcatctgtcg ccaagcaagc attaaacatg gattattggag gcgcccctgag tgcccggtggg
61 cgcgagctgc tatttghtaac gaaccagta gtcgtcaatg gctctgtact tgtgacctgag
121 gaccagtgtt actgocgogg ctggattgag tcgocgtggca caaacgggtg ccaaacggcg
181 tcgaacgtgc tgcaatggct tgcgtctggc ttctccatcc tactgcttat gttttacgcc
241 taccoaacat ggaagtcaac ctgocgctgg gaggagatct atgtgtgocg tatcgagatg
301 gtcagggtga ttctcgagtt ctctctcgag tttagaagcc cgtccatgct gtatctagcc
361 acagggccacc gcgtccagtg gttgocgttac gccgagtgcc ttctcacctg cccggctcatt
421 ctcatctacc tgtcaaacct gacgggcttg tccaacgact acagcaggcg caccatgggt
481 ctgcttgtgt ctgatattgg cacaaattgt tggggcgcca cttccgcoat ggccaccgga
541 tacgtcaagg toatcttctt ctgcctgggt ctgtgttatg gtgctaacac gttctttcac
601 gctgccaagg cctacatcga gggttaccac accgtgcccga agggcccggtg tcgccagggtg
661 ctgactggca tggccttggct ctctctcgta tcatgggta tgttcccac cctgttcatc
721 ctgggccccg agggcttcgg cgtcctgagc gtgtacggct ccaccgtcg ccacaccatc
781 attgacctga tgtcgaagaa ctgctgggggt ctgctcgccc actacctgcg cgtgctgatc

```

```

841 cacgagcata tctcatcca cggcgacatt cgcaagacca ccaaattgaa catttggtggc
901 actgagattg agtgcgagac gctggtggag gacgaggccg aggtgggocg ggtcaacaag
961 ggcaccggca agtacgctc ccgagagtc ttctgtgca tgcgagaca gatgaaggag
1021 aagggcattg acgtgocgoc ctctctggac aacagcaagg aggtggagca ggagcaggcc
1081 gccagggtcg ccatgatgat gatgaacggc aatggcatgg gtatgggaat gggaatgaac
1141 ggcataagac gaatgggocg tatgaacggg atggctggcg gcgccaagcc cggcctggag
1201 ctcaactocg agctacagcc cggcogcgtc atoctggcg tgcgggacat cagcatgggt
1261 gacttcttcc gcgagcagtt tgcctcagta tcggtgacgt acgagctggt gccggccctg
1321 ggcgctgaca acacactggc gctggttacg caggcgcaga acctgggocg cgtggacttt
1381 gtggtgattc accccgagtt cctgocgocg cgtctagca ccagcatcct gagccgctg
1441 cgcggocgoc gcoagcgtgt ggctgocgtt ggctgggocg agctggggcc catgocgtgac
1501 ctgatcgagt ccgcaaacct ggacggctgg ctggaggccc cctcgttcgg acagggcatc
1561 ctgcccggcc acatcgttgc cctggtggcc aagatgcagc agatgocgca gatgcagcag
1621 atgcagcaga ttggcatgat gaccggcggc atgaacggca tgggocggcg tatggcggc
1681 ggcataagac gcatgggocg cggcaacggc atgaacaaca tggcaacggc catgggocggc
1741 atgggagggc acggcatggg cggcaatggc atgaacggaa tgggtggocg caacggcatg
1801 aacaacatgg cggcaacggc aatggcggc aacggaaatgg cggcgggcat gggcggcaac
1861 ggtatgggtg gctccatgaa cggcatgagc tccggcgtgg tggcaacgt gacgccctcc
1921 gccgocggcg gcatgggocg catgatgaac ggocggcatg ctgcccoca gtcgcccggc
1981 atgaacggcg gccgocggg taccaaccg ctcttcaacg ccgcccctc accgctcagc
2041 tgcagctcg gtgocgagc aggcattggc agcatgggag gcatgggocg aatgagcga
2101 atgggagggc tgggtggaat gggggcagc gggocgocg cgcocggccac gacgcaggct
2161 gggggcggca acgocggagc ggagatgct cagaatctca tgaacgagat caatcgocg
2221 aagcgcgagc ttggcgagta a

```

Chop2 дикого типа по изобретению может кодироваться следующей аминокислотной последовательностью белка, связывающего ретиналь, *Chlamydomonas reinhardtii* (cop4) (GenBank № AAM15777 и SEQ ID NO: 4).

```

1 mdyggalsav grellfvtnp vvnngsvlvp edqcyagwi esrgtngaqt asnvlqwlaa
61 gfsilllmfy ayqtwkstcg weeiyvcaie mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr
121 yaewlltcpv ilihlsnltg lndysrrtm gllvsdigti vwgatsamat gyvkviffcl
181 glycyantff haakayiegy htvpkgrcrq vvtgmawlff vswgmfpilf ilgpegfgvl
241 svygstvght iidlmskncw gllghylrvl ihehilihgd irkttklmig gteievettlv
301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskeveqeq aaraammmmn
361 gngmgmgmgn ngmngmggmn gmaggakpgl eltpqlqpgr vilavpdism vdfreqfaq
421 lsvtyelvpa lgadntlalv tqaqnlggvd fvlhpeflr drsstilsr lrgagqrva
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfgqg ilpahivalv akmqqmrkmq qmqqigmntg
541 gmnmgggmgg ggmngmgggn gmnmgngmgg ggmngmgggn gmnmgggngg mnmnggngma
601 gngmgggmgg ngmggsmngm ssgvvanvtp saaggmggmm nggmaapqsp gmnnggrlgt
661 plfnaapspl ssqlgaeagm gsmggmggms gmgmgmgmgg mggagaattq aaggnaeae
721 lqnlmneinr lkrelge

```

Chop2 дикого типа по изобретению может кодироваться следующей МРНК-последовательностью

сенсорного опсина В *Chlamydomonas reinhardtii* (CSOB) (GenBank № AF508966 и SEQ ID NO: 5).

```

1  ttgacatctg tgcgcaagca agcattaaac atggattatg gaggcgccct gagtgcgctt
61  gggcgcgagc tgctatattgt aacgaaccca gtagtctgca atggctctgt acttgtgcct
121 gaggaccagt gttactgcgc gggctggatt gagtcgcgctg gcacaaacgg tgcccaaacg
181 gcgtgcaacg tgctgcaatg gcttgcctgt ggcttctcca tctactgct tatgttttac
241 gcctaccaaa catggaagtc aacctgcggc tgggaggaga tctatgtgtg cgtatcagag
301 atgggtcaagg tgattctcga gttcttcttc gagtttaaga acccgtccat gctgtatcta
361 gccacagggc accgctcca gtggttgctg tacgccgagt ggcttctcac ctgcccggctc
421 attctcattc acctgtcaaa cctgacgggc ttgtccaacg actacagcag gcgcaccatg
481 ggtctgcttg tgtctgatat tggcacaatt gtgtggggcg ccaactccgc catggccacc
541 ggatacgtca aggtcatctt cttctgcctg ggtctgtggt atgggtgctaa cacgttcttt

```

```

601 cacgctgcc aaggcctacat cgagggttac cacaccgctgc cgaagggccg gtgtcgccag
661 gtggtgactg gcatggcttg gctcttcttc gtatcatggg gtatggtccc catcctgttc
721 atcctcggcc ccgagggctt cggcgtcctg agcgtgtacg gctccaccgt cggccacacc
781 atcattgacc tgatgtcgaa gaactgctgg ggtctgctcg gccactactc gcgcgtgctg
841 atccacgagc atatcctcat ccacggcgac attcgcgaaga ccaccaaatt gaacattggt
901 ggcactgaga ttgaggtcga gacgctgggt gaggacgagg ccgaggctgg cgcggtcaac
961 aagggcaccg gcaagtacgc ctcccgcgag tccttctctg tcatgcgcca caagatgaag
1021 gagaagggca ttgacgtgcg cgcctctctg gacaacagca aggaggtgga gcaggagcag
1081 gccgccaggg ctgccatgat gatgatgaac ggcaatggca tgggtatggg aatgggaatg
1141 aacggcatga acggaatggg cggatgaac gggatggctg gcggcgccaa gcccgccctg
1201 gagctcactc cgcagctaca gcccgccgc gtcactctgg cggtgccgga catcagcatg
1261 gttgacttct tccgcgagca gtttgcctcag ctatcggatga cgtacgagct ggtgccggcc
1321 ctggcgctg acaacacact ggcgctgggt acgcaggcgc agaactggg cggcgtggac
1381 tttgtgttga tcaacccgga gttcctgcgc gaccgctcta gcaccagcat cctgagccgc
1441 ctgcgcggcg cgggccagcg tgtggctgcg ttcggctggg cgcagctggg gcccatgctg
1501 gacctgatcg agtcccga cctggacggc tggctggagg gccctcgtt cggacagggc
1561 atcctgcccg cccacatcgt tgcctgggtg gccaaagtgc agcagatgcg caagatgcag
1621 cagatgcagc agattggcat gatgaccggc ggcatgaacg gcatgggccc cggtatgggc
1681 ggcggcatga acggcatggg cggcggcaac ggcatgaaca acatgggcaa cggcgtgggc
1741 ggcggcatgg gcaacggcat gggcggcaat ggcatgaacg gaatgggtgg cggcaacggc
1801 atgaacaaca tgggcgca cggaatggcc ggcaacggaa tgggcgccgg catggcgcc
1861 aacggtatgg gtggctccat gaacggcatg agctccggcg tggtgggcaa cgtgacgcc
1921 tccgcccggc gcggcatggg cggcatgatg aacggcgcca ttgctgcgcc ccagtccc
1981 ggcgcaacg cggcccgcct gggtaacca acgctcttca acgcccgcct ctaaccgctc
2041 agctcgcagc tcgggtgccg ggcaggcatg ggcagcatgg gaggcattgg cggaatgagc
2101 ggaatgggag gcatgggtgg aatggggggc atgggcccgc ccggcgccgc cacgacgcag
2161 gctgcggggc gcaacgcgga ggcggagatg ctgcagaatc tcatgaacga gatcaatcgc
2221 ctgaagcgcg agcttggcga gtaaaaggct ggaggccggt actgcgatac ctgcgagctc
2281 ggcgcccctg acctctgtac acaaggctca ggagcagcg cgcgtggact tctcaacctg
2341 tgtgcaacgt atctagagcg gcctgtgcgc gaccgtccgt gagcattccg gtgcatctt
2401 cccgcttccg caccgcaagt tccttctctg gccctgctgc gctgacgca tcgtccgaac
2461 ggaagggcgg cttgatcagt aaagcattga agactgaagt cgtgagaccg tagtgctatg
2521 gctctgcacg taagtggcg ctgcccctgt tactacgcat tgcccaagc tgcttcttt
2581 tgggtggcga ggccttgct ccacatcatt catttgcata acgtaactgt tagttacata
2641 cgctttgctt aacctcgaca attgcaacat gggctgagag tccgtacggc ggctatggac
2701 gaaggtgtta tcggatgtga ttaggaatct cggttgaaa gcttcgagaa agtgagcttc
2761 ttcgtggctt tctgttggg tcatcaagaa gaacgacggt aaggcaaacg aggtaaaagt
2821 gfsiillmfy ayqtwkstcg weeiyvcaie mvkvilefff efknpmslyl atghrvqwlr
2881 acacgcgagc gcaaacggg ctttctgga gctgggttac ggtctggctc ggcaactgct
2941 ctggttttta accacagctt cggaaagtct ggtatgttt gtggcagaa acatttgggt
3001 aacttgaggg tgattcgtct ggagtggac aacatggctg ccgtccgtgt gcagggacgg
3061 taatcaatga agctgaagct gtgatgctca ccacacgtt catacccctg cttacaaaaa
3121 cactttgatg tcgtggccaa actatgcgtg agcaaaagat taaagagca tgagtgcgat
3181 gttgcggagc tgcgcaaca ttgcatcaag tatttgacgc cttcaagcca acaagtgcgc
3241 ggcgcaaac ttgattaaca cgcggacgc agtgggtggg gcgtgtacag tgttatgag
3301 ctgccattct gcgatccgta gtgttaggt gcgtgtgac cgcgcccgt gtggccctt
3361 acatggagag ttgggtgctt caccacagc ttggcgcgc tgaaggtgt gctatgttt
3421 ggtaaagccg gggccctgaa gaccgcaacc gtagaaccgt actgaaagg tgctagccc
3481 gggtaactgg atgccctggg acatagctat taatgttga gtgaagccgt caagccgag
3541 gccgtgcgcc gctgtatcac caagcccct ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

Шор2 дикого типа по изобретению может кодироваться следующей аминокислотной последовательностью сенсорного опсина В *Chlamydomonas reinhardtii* (CSOB) (GenBank № AAM44040 и SEQ ID NO: 6).

```

1  mdyggalsav grellfvtnp vvnngsvlvp edqcyagwi esrgtngaqt asnvlqwlaa
61  gfsiillmfy ayqtwkstcg weeiyvcaie mvkvilefff efknpmslyl atghrvqwlr
121 yaewlltcpv ilihlsnltg lndysrrtm gllvsdigti vwqatsamat gyvkviffcl
181 glycgantff haakayiegy htpvkgrcrq vvtgmawllf vswgmfpilf ilgpegfgvl

```

```

241 svygstvght iidlmskncw gllghylrvl ihehilihgd irkttklng gteievettlv
301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskeveqeq aaraammnmn
361 gngmgmgmgm ngmngmggmn gmaggakpgl eltpqlppgr vilavpdism vdfreqfafaq
421 lsvtyelvpa lgadntlalv tqaqnlggvd fvlhpeflr drsstsilsr lrgagqrvaav
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfqqg ilpahivalv akmqqmrkmq qmqqigmmtg
541 gmngmgggmg gmngmggggn gmnmngngmg gmgngmgggn gmngmgggng mnmngngma
601 gngmgggmg ngmngsmngm ssgvvanvtp saagmgggmm nggmaapqsp gmnggrlgtm
661 plfnaapspl ssqgaeagm gsmggmggms gmgmgggmgg mggagaattq aaggnaeaeem
721 lqnlmneinr lkrelge

```

Chop2 дикого типа по изобретению может кодироваться следующей мРНК-последовательностью опсина-2 простейшего типа *Chlamydomonas reinhardtii* asop2 (GenBank № AB058891 и SEQ ID NO: 7).

```

1 catctgtcgc caagcaagca ttaaacatgg attatggagg cgccctgagt gccgttgggc
61 gcgagctgct atttgtaacg aaccagtag tcgtcaatgg ctctgtactt gtgctgagg
121 accagtggtta ctgctgaggc tggattgagt cgcgtggcac aaacgggtgcc caaacggcgt
181 cgaacgtgct gcaatggctt gctgctggct tctccatcct actgcttatg ttttacgct
241 accaaacatg gaagtcaacc tgcggctggg aggagatcta tgtgtgctct atcgagatgg
301 tcaaggtgat tctcgagttc ttcttcgagt ttaagaacct gtccatgctg tatctagcca
361 caggccaccg cgtccagtgg ttgctgttac ccgagtggct tctcacctgc ccggtcattc
421 cattcacct gtcaaacctg acgggcttgt ccaacgacta cagcaggcgc accatgggtc
481 tgcttgtgct tgatattggc acaattgtgt ggggctggcc ttccgcatg gccaccggat
541 acgtcaaggt catcttcttc tgctgggtc tgtgttatgg tgctaacacg ttcttccacg
601 ctgccaaagg ctacatcgag ggttaccaca cgtgcccga gggcgggtgt cgccaggtgg
661 tgactggcat ggcttggctc ttcttcgtat catggggtat gtccccatc ctgttcatcc
721 tcggccccga gggcttcggc gtctgagcgt tgtacggctc caccgtcggc cacaccatca
781 ttgacctgat gtgaaagaa tgctggggtc tgctcggcca ctacctgctg gtgctgatcc
841 acgagcatat cctcatccac ggcgacattc gcaagaccac caaattgaac attggtggca
901 ctgagattga ggtcgagacg ctggtggagg acgaggccga ggctggcggc gtcaacaagg
961 gcaccggcaa gtacgcctcc cgcgagctct tcctggctat gcgcgacaag atgaaggaga
1021 agggcattga cgtgctggcc tctctggaca acagcaagga ggtggagcag gagcaggccg
1081 ccagggtctc catgatgatg atgaacggca atggcatggg tatgggaatg ggaatgaacg
1141 gcatgaacgg aatggcgggt atgaacggga tggctggcgg cgccaagccc ggcctggagc
1201 tcaactccga gctacagccc ggccgcgtca tcctggcggg gccggacatc agcatgggtg
1261 acttcttccg cgagcagttt gctcagctat cggtgacgta cgagctggtg ccggcctgg
1321 gcgctgacaa cacactggcg ctggttacgc aggcgcagaa cctgggctgg gtggactttg
1381 tgttgattca ccccgagttc ctgctgagcc gctctagcac cagcatcctg agccgcctgc
1441 gcggcgcggg ccagcgtgtg gctgcttccg gctgggcca gctggggccc atgctgacc
1501 tgatcgagtc cgcaaacctg gacggctggc tggagggccc ctgcttcgga caggcatcc
1561 tgccggccca catcgttgc ctggtggcca agatgcagca gatgcgcaag atgcagcaga
1621 tcagcgagat tggcatgatg accggcggca tgaaccggcat gggcggcggc atgggcggcg
1681 gcatgaacgg catgggcccg ggcaacggca tgaacaacat gggcaacggc atgggcggcg
1741 gcatgggcaa cggcatgggc ggcaatggca tgaacggaat gggtgggcgc aacggcatga
1801 acaacatggg cggcaacgga atggcggca acggaatggg cggcggcatg ggcggcaacg
1861 gtatgggtgg ctccatgaac ggcatgagct ccggcgtggt ggccaactg acgcctccg
1921 ccgcccggcg catggcggcg atgatgaacg gcggcatggc tgcgccccag tcgcccggca
1981 tgaacggcgg ccgctgggtt accaaccgct tcttcaacgc cgcgcccctc ccgctcagct
2041 cgagctcgg tgccgagcca ggcattggca gcatgggagg catgggcgga atgagcggaa
2101 tgggaggcat ggggtggaatg gggggcatgg gcggcggcgg cgccgccaac acgagggctg
2161 cgggcggcaa cgcggagggc gagatgctgc agaattctcat gaacgagatc aatcgctga
2221 agcgcgagct tggcagtaaa aaggctggag gccggtactg cgataacctg gagctcggc
2281 gcctgactcg tcgtacacac ggctcaggag cacgcgcggc tggacttctc aacctgtgtg
2341 caacgtatct agagcggcct gtgcgcgacc gtccgtgagc atccgggtgc gatcttccc
2401 ccttcgacc gcaagtccc ttctggccc tgctgcgct gacgcatc

```

Chop2 дикого типа по изобретению может кодироваться следующей мРНК-последовательностью опсина-2 простейшего типа *Chlamydomonas reinhardtii*, кодирующей аминокислотную последовательность опсина-2 простейшего типа (GenBank № BAB68567 и SEQ ID NO: 8).

```

1 mdyggalsav grellfvtnp vvvngsvlvp edqycagwi esrgtngaqt asnvlqwlaa
61 gfsilllmfy ayqtwkstcg weeiyvcaie mvkvilefff efknpsmlyl atghrvqwlr
121 yaewlltcpv ilihlsnltg lsndysrrtm gllvsdigi vwgatsamat gyvkviffcl
181 glycgantff haakayiegy htvpkgrcrq vvtgmawlff vswgmfpilf ilgpegfgvl
241 svygstvght iidlmskncw gllghylrvl ihehilihgd irkttklng gteievettlv
301 edeaeagavn kgtgkyasre sflvmrdkmk ekgidvrasl dnskeveqeq aaraammnmn
361 gngmgmgmgm ngmngmggmn gmaggakpgl eltpqlppgr vilavpdism vdfreqfafaq
421 lsvtyelvpa lgadntlalv tqaqnlggvd fvlhpeflr drsstsilsr lrgagqrvaav
481 fgwaqlgpmr dliesanldg wlegpsfqqg ilpahivalv akmqqmrkmq qmqqigmmtg
541 gmngmgggmg gmngmggggn gmnmngngmg gmgngmgggn gmngmgggng mnmngngma
601 gngmgggmg ngmngsmngm ssgvvanvtp saagmgggmm nggmaapqsp gmnggrlgtm
661 plfnaapspl ssqgaeagm gsmggmggms gmgmgggmgg mggagaattq aaggnaeaeem
721 lqnlmneinr lkrelge

```

Chr2-мутанты.

В настоящем изобретении предлагаются Chop2-мутанты, где одна или несколько аминокислот под-

вергнуты мутации. В некоторых воплощениях Chop2 представляет собой полноразмерный полипептид, такой как SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8, содержащие по меньшей мере одну аминокислотную мутацию. В некоторых воплощениях, мутация располагается в аминокислоте 132 и/или аминокислоте 159. В некоторых предпочтительных воплощениях, аминокислота в положении 132 подвергается мутации с лейцина на цистеин или аланин. В некоторых предпочтительных воплощениях, аминокислота в положении 159 подвергается мутации с треонина на аланин, цистеин или серин. Во всех воплощениях, Chop2-мутанты образуют функциональный канал ChR2.

Настоящее изобретение также охватывает белки Chop2 и нуклеиновые кислоты, которые кодируют биологически активный фрагмент или консервативную аминокислотную замену или другой мутантный вариант Chop2. Частные примеры применяемых фрагментов включают полипептиды, кодирующие аминокислоты 1-315 дикого типа Chop2, т.е. SEQ ID NO: 26, где по меньшей мере одна аминокислота подвергнута мутации или консервативной замене, например, в аминокислотных положениях 132 и/или 159. Более короткие фрагменты Chop2 дикого типа, где по меньшей мере одна аминокислота подвергнута мутации или консервативной замене (т.е. в аминокислотных положениях 132 и/или 159), также могут использоваться в настоящем изобретении. Соответственно, полипептиды Chop2 и нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению дополнительно включают в частности биологически активные фрагменты, кодирующие аминокислоты 1-315, 1-310, 1-300, 1-275, 1-250, 1-225, 1-200, 1-175, или 1-160 Chop2 дикого типа, где по меньшей мере одна аминокислота подвергнута мутации или консервативной замене, например в аминокислотных положениях 132 и/или 159. В других воплощениях, полипептиды Chop2 и нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут составлять по длине примерно или до 315 аминокислот, 310 аминокислот, 300 аминокислот, 275 аминокислот, 250 аминокислот, 225 аминокислот, 200 аминокислот, 175 аминокислот или 160 аминокислот.

Одиночный мутант Chop2 по изобретению может кодироваться следующим синтетическим конструктором геной последовательности hVChR1-mKate-betaChR2 (L132C) (GenBank № JN836746 и SEQ ID NO: 9), содержащим следующие аннотации, GFP последовательность обозначена жирным, последовательность L132C Chop2 подчеркнута.

```

1 atggattacc ctgtggcccg gtccctgatt gtaagatacc ccaccgatct gggcaatgga
61 accgtgtgca tgcccagagg acaatgctac tgcgaggggt ggctgaggag ccggggcact
121 agtatcgaaa aaaccatcgc tatcaccctc cagtgggtag tgttcgtct 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 caatgggact gctggtgagt gacgtggggg gtattgtgtg gggagccacc
481 tccgcatgtg gcaactggatg gaccaagatc ctcttttcc tgatttccct ctccatggg
541 atgtatacat acttccacgc cgctaagggtg tatattgagg ccttccacac tgtacctaaa
601 ggcatctgta gggagctcgt gcgggtgatg gcatggacct tctttgtggc ctgggggatg
661 ttccccgtgc tgttccctct cggcactgag ggatttggcc acattagtcc ttaccgggtc
721 gcaattggac actccatcct ggaatctgatt gccaagaata tgtggggggg gctgggaaat
781 tatctgctgg taaagatcca cgagcatatc ctgctgtatg gcgatatcag aaagaagcag
841 aaaatcacca ttgctggaca ggaaatggag gtggagacac tggtagcaga ggaggaggac
901 gggaccgctg tcgccacat ggtgtctaag ggcgaagagc tgattaagga gaacatgcac
961 atgaagctgt acatggaggg caccgtgaac aaccaccact tcaagtgcac atccgagggc
1021 gaagcacaagc cctacgaggg caccagacc atgagaatca aggtggctca gggcccacct
1081 ctccccctcg ccttcgacat cctggctacc agcttcatgt acggcagcaa aaccttcac
1141 aaccacacc aggcatccc cgacttctt aagcagtcct tcctgaggg cttcacatgg
1201 gagagagtca ccacatacga agacgggggc gtgctgaccg ctaccagga caccagctc
1261 caggacggct gcctcatcta caacgtcaag atcagagggg tgaacttccc atccaacggc
1321 cctgtgatgc agaagaaaac actcggtgg gaggcctcca ccgagatgct gtaccccgt
1381 gacggcggcc tggaaaggcag agccgacatg gccctgaagc tcgtgggctg gggcccactg
1441 atctgcaact tgaagaccac atacagatcc aagaaacccg ctaagaacct caagatgccc
1501 ggcgtctact atgtggacag aagactggaa agaatcaagg aggccgacaa agagacctac
1561 gtcagagcagc acgaggtggc tgtggccaga tactgcgacc tcctagcaa actggggcac
1621 aaacttaatt gcctgcagga gaagaagtca tgagccagc gcatggcca attccggcaa
1681 tactgttggg accgggacac tgggcagatg ctgggcccga ccccagccc gtgggtgtgg
1741 atcagcctgt actatgcagc tttctacgtg gtcatgactg ggctctttgc cttgtgcatc
1801 tatgtgctga tgagaccat tgatccctac acccccgact accagacca gttaaagtca
1861 ccgggggtaa ccttgagacc ggatgtgat gggaaagag ggctgcagat ttcctacaac
1921 atctctgaaa acagctctag acagggccag atcaccggac gtccggagac tgagacattg
1981 ccaccgggtg actacggggg ggccctgagc gctgtgggca gagaactcct gttcgtgaca
2041 aatccagctg tgtgaaacgg ctccgtactc gtacccgagg atcagtgcta ttgcccagga
2101 tggatcgaga gcagaggcac aaacggcgca cagactgcat ccaactgtct ccagtggttg
2161 gccgcaggct tttccattct cctgctcatg ttttacgcct accagacttg gaagtccaca
2221 tgtggctggg aggaaatcta cgtgtgtgca atcgaaatgg tgaaggtgat cctggagttt
2281 ttcttcgaat ttaaaaaccc aagcatgctg tacctggcta ctggccacag agtgacgtgg
2341 ctgcccgtatg ccgaatggct gctgacttgc ccagtgattt gcatccacct gtccaacctg
2401 actgggctgt ctaacgatta cagtaggaga acaatgggac tgctcgtatc cgacatcggc
2461 actatcgtat ggggcgcaac tagtgccatg gccactggat acgtgaaagt gatctttctc

```

2521 tgcttgggac tctgctacgg agcaaacaca tttttcatg ccgcaaaagc atataatcgag
 2581 gggtatcata ccgtcccaaa ggccgggtgt agacaagtgg tgactggcat ggcttggctg
 2641 ttcttcgtgt cctgggggat gtttcccatc ctctttatcc tgggccccaga aggcttcggg
 2701 gtgctgagtg tgatggcag taccgtagga cacactatca ttgacctgat gagcaaaaac
 2761 tgctgggggc tgctcggcca ctacctgaga gtactcatcc acgagcatat cctgattcat
 2821 ggcgatatcc ggaaaactac caagctcaat atcgggggca ccgagattga agtggagaca
 2881 ctcgtggagg acgaggccga ggccggagca gtgaacaaag gactggcaa gtatgcctcc
 2941 agagaatcct ttctggtgat gcgggacaaa atgaaggaga aaggcattga tgtacggtgc
 3001 agtaatgcc aagccgtcga gactgatgtg tag

Одиночный мутант ChR2 по изобретению может кодироваться следующим синтетическим конструктором аминокислотной последовательности hVChR1-mKate-betaChR2 (L132C) (GenBank № AER29839 и SEQ ID NO: 10), содержащим следующие аннотации, GFP-последовательность обозначена жирным шрифтом, последовательность L132C Chор2 подчеркнута.

1 mdypvarsli vryptdlng tvcmprgqcy cegwlrstrgt siektiaitl qwwvfalsva
 61 clgwyayqaw ratcgweevy valiemmxsi ieafhefdsp atlwllssng vwwmrygewl
 121 ltepvllihl snltglkddy skrtmgllvs dvgciwvqat samctgwtki lffflislsyg
 181 mytyfhaakv yieafhtvpk gicrelvrvm awtffvawgm fpvlflllgte gfgghispygs
 241 aighsildli aknmwgvlg ylrvkihehi llygdirkkq kitiaggeme vetlvaeeed
 301 gtavatmvsk geelikenmh **mklymegtvn** **nhhfktseg** **egkpyegtqt** **mrikvveggp**
 361 **lpfafdil** **at** **sfm** **ysk** **tifi** **nhtqgipdff** **qksfpegftw** **ervttyedgg** **vltatqdtsl**
 421 **qdgcliynvk** **irgvnfpnsng** **pvmqkktlgw** **eastemlypa** **dgglegradm** **alklvggghl**
 481 **icnllktyrs** **kkpaknlkmp** **gvyyvdrle** **rikeadkety** **veqhevavar** **ycdlpcklgh**
 541 klncleqekks csqrmaefrq ycwnpdtgqm lgrtparvw islyyaafyv vmtglfalci
 601 yvlmqtidpy tpdyqdqlks pgvtlrpdvy gerglqisyn isenssrqag itgrpetetl
 661 ppvdyggals avgrellfvt npvvvngsvl vpedqcyag wiesrgtnga qtasnlqwl
 721 aagfsilllm fyaygtwkst cgweeiycva iemvkvilef ffefknpsml ylatghrvqw
 781 lryaewlltc pvicihlsnl tglsndysrr tmgllvsdig tivwgatsam atgyvkviff
 841 clglcygant ffhaakayie gyhtvpkgrc rqvvtgmawl ffvswgmfpi lfilgpegfg
 901 vlsvygstvg htiidlmskn cwgllghylr vlihehilih gdirkttkln iggteiev
 961 lvedeaeaga vnkgtgkyas resflvmrdk mkekgidvrc snakavetdv

Одиночный мутант Chор2 по изобретению может кодироваться следующей генной последовательностью синтетического конструктора hVChR1-mKate-betaChR2 (L132C) (GenBank № JN836745 и SEQ ID NO: 11), содержащего следующие аннотации, GFP-последовательность обозначена жирным шрифтом, последовательность L132C Chор2 подчеркнута.

1 atggattacc ctgtggcccc gtccctgatt gtaagatacc ccaccgatct gggcaatgga
 61 accgtgtgca tgcccagagg acaatgctac tgcgaggggt ggctgaggag ccggggcact
 121 agtatcgaaa aaaccatcgc tatcaccctc cagtgggtag tgctcgctct gtccgtagcc
 181 tgtctcgct ggtatgcata ccaagcctgg agggctacct gtgggtggga ggaagtatac
 241 gtggccctga tcgagatgat gaagtccatc atcgaggctt tccatgagt cgactcccc
 301 gccacactct ggctcagcag tgggaatggc gtagtgtgga tgagatatgg agagtggctg
 361 ctgacctgtc cgctcctgct cattcatctg tccaatctga ccgggctgaa agatgactac
 421 tccaagagaa caatgggact gctggtgagt gacgtggggg gtattgtgtg gggagccacc
 481 tccgccatgt gcaactggatg gaccaagatc ctctttttcc tgatttccct ctcctatggg
 541 atgtatacat acttccacgc cgctaagggtg tatattgagg ccttccacac tgtacctaaa
 601 ggcatctgta gggagctcgt gctgggtgatg gcatggacct tctttgtggc ctgggggatg
 661 ttccccgtgc tgctcctcct cggcactgag ggatttgccc acattagtcc ttacgggtcc
 721 gcaattggac actccatcct ggatctgatt gccaagaata tgtggggggg gctgggaaat
 781 tatctcgggg taaagatcca cgagcatatc ctgctgtatg gcgatatcag aaagaagcag
 841 aaaatcacca ttgctggaca ggaaatggag gtggagacac tggtagcaga ggaggaggac
 901 gggaccgcgg tcgccaccat ggtgtctaag ggcgaagagc **tgattaagga** **gaacatgcac**

961 atgaagctgt acatggaggg caccgtgaac aaccaccact tcaagtgcac atccgagggc
 1021 gaaggcaagc cctacgaggg caccagacc atgagaatca aggtggtcga gggcgccct
 1081 ctccccctcg ccttcgacat cctggtacc agcttcatgt acggcagcaa aaccttcac
 1141 aaccacacc agggcatccc cgacttctt aagcagtctt tcctgaggg cttcacatgg
 1201 gagagagtca ccacatacga agacgggggc gtgctgaccg ctaccagga caccagctc
 1261 caggacggct gcctcatcta caacgtcaag atcagagggg tgaacttccc atccaacggc
 1321 cctgtgatgc agaagaaaac actcggtgg gaggcctcca ccgagatgct gtaccccgct
 1381 gacggcggcc tggaggcag agccgacatg gccctgaagc tctgtggcgg gggccacctg
 1441 atctgcaact tgaagaccac atacagatcc aagaaacccg ctaagaacct caagatgccc
 1501 ggcgtctact atgtggacag aagactggaa agaatcaagg aggccgacaa agagacctac
 1561 gtcagcagc acgaggtggc tgtggccaga tactgcgacc tcctagcaa actggggcac
 1621 aaacttaatt gcctgcagga gaagaagtca tgcagccagc gcatggcca attccggcaa
 1681 tactgttga acccgacac tgggcagatg ctgggcccga cccagcccc gtgggtgtgg
 1741 atcagcctgt actatgcagc tttctactgt gtcagtactg ggtcttttg cttgtgcatc
 1801 tatgtgctga tgcagaccat tgatccctac acccccact accaggacca gttaaagtc
 1861 ccgggggtaa cctgagacc ggatgtgat ggggaaagag ggctgcagat ttcctacaac
 1921 atctctgaaa acagctctag acaggcccag atcaccggac gtcgggagac tgagacattg
 1981 ccaccggtgg actacggggg ggccctgagc gctgtgggca gagaactcct gttcgtgaca
 2041 aatccagtcg tggtaacgg ctccgtactc gtaccgagc atcagtgcta ttgcccagga
 2101 tggatcgaga gcagaggcac aaacggcgca cagactgcat ccaacgtgct ccagtgttg
 2161 gccgcaggct tttccattct cctgctcatg ttttaccgct accagacttg gaagtccaca
 2221 tgtggctggg aggaatcta cgtgtgtgca atcgaaatgg tgaaggtgat cctggagttt
 2281 ttcttcgaat ttaaaaccc aagcatgctg tacctggcta ctggccacag agtgcagtgg
 2341 ctggcgtatg ccgaatggct gctgacttg ccagtattc tgatccacct gtcacactg
 2401 actggcgtgt ctaacgatta cagtaggaga acaatgggac tgctcgatc cgacatcggc
 2461 actatcgat gggcgcaac tagtgccatg gccactggat acgtgaaagt gatctcttc
 2521 tgcctgggac tctgctacgg agcaaacaca ttttttcatg ccgcaaaagc atatatcgag
 2581 gggtatcata ccgtcccaa gggccggtgt agacaagtgg tgactggcat ggcttgctg
 2641 ttcttcggtgt cctgggggat gtttccatc ctctttatcc tgggccaga aggctcggg
 2701 gtgctgagtg tgtatggcag taccgtagga cacactatca ttgacctgat gagcaaaac
 2761 tgctgggggc tgctcgcca ctacctgaga gtactcatcc acgagcatal cctgattcat
 2821 ggcgatatcc ggaaaactac caagctcaat atcgggggca ccgagattga agtggagaca
 2881 ctcgtggagg acgagccga ggccggagca gtgaacaaa gcaactggca gtatgcctcc
 2941 agagaatcct ttctggtgat gcggacaaa atgaaggaga aaggcattga tgtacggctg
 3001 agtaatgcca aagccgtcga gactgatgtg tag

Одиночный мутант Chор2 по изобретению может кодироваться следующей аминокислотной последовательностью синтетического конструкта hVChR1-mKate-betaChR2 (L132C) (GenBank № AER29838 и SEQ ID NO: 12), содержащего следующие аннотации, GFP-последовательность обозначена жирным шрифтом, последовательность L132C Chор2 подчеркнута.

1 mdypvarsli vryptdlng tvcmprgqcy cegwlrsgt siektiaitl qwvfvfalsva
 61 clgwyayqaw ratcgweevy valiemkksi ieafhefdsp atlwslssng vvwmyrgewl
 121 ltcpvllihl snltgkddy skrtmgllvs dvgciwvgt samctgwtki lfflislsyg
 181 mytyfhaakv yieafhtvpk gicrelvrvm awtffvawgm fpvllflgte gfghispygs
 241 aighsildli aknmwgvlgv ylrvkihehi llygdirkkq kitiagqeme vetlvaeeed
 301 gtavatmvsq **geelikenmh mklymegtvn nhhfktseg egkpyegtqt mrikvveggp**
 361 **lpfafdilata sfmysktfi nhtqgipdff kqsfpegftw ervttyedgg vltatqdtsl**
 421 **qdgcliynvk irgvnfpnsq pvmqkktlgw eastemlypa dgglegradm alklvggghl**
 481 **icnlkttysr kkpaknlkmp gvyvdrle rikeadkety veqhevavar ycdlpsklgh**
 541 klnclqekks csqrmaefrq ycwnpdtgqm lgrtparvwv islyyaafyv vmtglfalc
 601 yvlmqtidpy tpdyqdlks pgvtrlpdvy gerglqisyn isenssrqag itgrpetetl
 661 ppvdyggals avgrellfvt npvvngsvl vpedqcyag wiesrgtnga qtasnlqwl
 721 aagfsilllm fyaygtwkst cgweeiycvca iemkvilef ffefkpsml ylatghrvqw
 781 lryaewlltc pvlihlsnl tglndysrr tmgllyvsdig tivwgatsam atgyvkviff
 841 clglcygant ffhaakayie gyhtvpkgrc rqvvtgmawlf ffvswgmfpil flilgpegf
 901 vlsvygstvg htiidlmskn cwgllyghylr vlihehilih gdirkttkln iggteiev
 961 lvedeaeaga vnkgtgkyas resflvmrdk mkekgidvrc snakavetdv

Одиночный мутант L132C Chор2 по изобретению может кодироваться следующей аминокислотной последовательностью (положение 132 подчеркнуто и выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 13).

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
 61 GFSILLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVIIEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
 121 YAEWLLTCPV **IC**IHLNSLTG LSNDSYRRTM GLLVSDIGTI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
 181 GLCYGANIFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMALFFF VSWGMPILF ILGPEGFVGL
 241 SVYGSTVGHY IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL IHEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
 301 EDEAEAGAVN KGTGK

Одиночный мутант T159C Chop2 по изобретению может кодироваться следующей аминокислотной последовательностью (положение 159 подчеркнуто и выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 14).

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ILIHLSNLTG LSN DYSRRTM GLLVSDIGCI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL INEHILIHGD IRKTKLNI GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

Двойной мутант L132C/T159C Chop2 по изобретению может кодироваться следующей нуклеотидной последовательностью (SEQ ID NO: 15).

```

1 atggactacg ggggggctct gtctgtctgtc gggagggaac tgctgtttgt gactaacct
61 gtcgctgtga acgggagtg gctggccctc gaggaccagt gctactgtgc cggctggatc
121 gaatcacgcg gaaccaacgg ggcccagaca gctagcaatg tgctgcagtg gctggccgct
181 ggggttagta tcctgtctgt gatgttctac gcctatcaga cttggaagtc aacctgccc
241 tgggagggaaa tctacgtgtg cgctattgag atggtgaaag tgatcctgga gttcttctc
301 gagttcaaga acccaagcat gctgtacctg gctactggac accgagtgca gtggctgaga
361 tatgcagaat ggctgtgtgac atgccccgtc atctgcattc acctgtccaa cctgacaggc
421 ctgagcaatg actactccag gagaactatg ggactgtctg tgtccgacat cggctgcatt
481 gtctggggag caacttctgc tatggcaacc ggatactgga aggtcatctt tttctgctg
541 gggctgtgct atggcgcaaa tacctttttc cacgcagcca aggcctacat tgaggggat
601 cataccgtgc caaaagggcg gtgcccagag gtggtcacag gaatggcttg gctgtttttc
661 gtctcttggg gaatgtttcc catcctgttc attctggggc ctgaagggtt cggcgtgctg
721 tctgtctacg gaagtacagt ggggcatact atcattgacc tgatgtccaa aaactgttg
781 ggctgtctgg gacactatct gagagtgtct atccacgagc atatcctgat tcatggcgat
841 attcgggaaga ccacaaaact gaatatcggc ggaaccgaga ttgaagtgga aacctggtg
901 gaagacgagg ctgaggctgg ggctgtgaac aaggggactg gcaaa

```

Двойной мутант L132C/T159C Chop2 по изобретению может кодироваться следующей аминокислотной последовательностью (положения 132 и 159 подчеркнуты и выделены жирным шрифтом, SEQ ID NO: 16).

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ICILHLSNLTG LSN DYSRRTM GLLVSDIGCI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL INEHILIHGD IRKTKLNI GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

Одиночный мутант T159C Chop2 по изобретению может кодироваться следующей аминокислотной последовательностью (положение 159 подчеркнуто и выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 17).

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ILIHLSNLTG LSN DYSRRTM GLLVSDIGSI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL INEHILIHGD IRKTKLNI GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

Двойной мутант L132C/T159S Chop2 по изобретению может кодироваться следующей нуклеотидной последовательностью (SEQ ID NO: 18).

```

1 atggactacg ggggggctct gtctgtctgtc gggagggaac tgctgtttgt gactaacct
61 gtcgctgtga acgggagtg gctggccctc gaggaccagt gctactgtgc cggctggatc
121 gaatcacgcg gaaccaacgg ggcccagaca gctagcaatg tgctgcagtg gctggccgct
181 ggggttagta tcctgtctgt gatgttctac gcctatcaga cttggaagtc aacctgccc
241 tgggagggaaa tctacgtgtg cgctattgag atggtgaaag tgatcctgga gttcttctc
301 gagttcaaga acccaagcat gctgtacctg gctactggac accgagtgca gtggctgaga
361 tatgcagaat ggctgtgtgac atgccccgtc atctgcattc acctgtccaa cctgacaggc
421 ctgagcaatg actactccag gagaactatg ggactgtctg tgtccgacat cggcagcatt
481 gtctggggag caacttctgc tatggcaacc ggatactgga aggtcatctt tttctgctg
541 gggctgtgct atggcgcaaa tacctttttc cacgcagcca aggcctacat tgaggggat
601 cataccgtgc caaaagggcg gtgcccagag gtggtcacag gaatggcttg gctgtttttc
661 gtctcttggg gaatgtttcc catcctgttc attctggggc ctgaagggtt cggcgtgctg
721 tctgtctacg gaagtacagt ggggcatact atcattgacc tgatgtccaa aaactgttg
781 ggctgtctgg gacactatct gagagtgtct atccacgagc atatcctgat tcatggcgat
841 attcgggaaga ccacaaaact gaatatcggc ggaaccgaga ttgaagtgga aacctggtg
901 gaagacgagg ctgaggctgg ggctgtgaac aaggggactg gcaaa

```

Двойной мутант L132C/T159S Chop2 по изобретению может кодироваться следующей аминокислотной последовательностью (положения 132 и 159 подчеркнуты и выделены жирным шрифтом, SEQ ID NO: 19).

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ICILHLSNLTG LSN DYSRRTM GLLVSDIGSI VWGATSAMAT GYVKVIFFL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL INEHILIHGD IRKTKLNI GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

Одиночный мутант L132A Chop2 по изобретению может кодироваться следующей аминокислотной последовательностью (положение 132 подчеркнуто и выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 20).

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV IAIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGTI VWGATSAMAT GYVKVIFFFCL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPFILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL INEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

Двойной мутант L132A/T159C Chop2 по изобретению может кодироваться следующей нуклеотидной последовательностью (SEQ ID NO: 21).

```

1 ATGGACTACG GGGGGGCTCT GTCGTCTGTC GGGAGGGAAC TGCTGTTTGT GACTAACCCCT
61 GTCGTCGTGA ACGGGAGTGT GCTGGTCCCT GAGGACCAGT GCTACTGTGC CCGCTGGATC
121 GAATCACGCG GAACCAACGG GGCCCAGACA GCTAGCAATG TGCTGCAGTG GCTGGCCGCT
181 GGGTTTAGTA TCCTGCTGCT GATGTTCTAC GCCTATCAGA CTTGGAAGTC AACCTGCGGC
241 TGGGAGGAAA TCTACGTGTG CGTATTGAG ATGGTAAAG TGATCCTGGA GTTCTTCTTC
301 GAGTTCAAGA ACCCAAGCAT GCTGTACCTG GCTACTGGAC ACCGAGTGCA GTGGCTGAGA
361 TATGCAGAAAT GGCTGCTGAC ATGCCCCGTC ATCGCCATTC ACCTGTCCAA CCTGACAGGC
421 CTGAGCAATG ACTACTCCAG GAGAACTATG GGACTGCTGG TGTCGGACAT CGGCTGCATT
481 GTCTGGGGAG CAACTTCTGC TATGGCAACC GGATACGTGA AGGTCATCTT TTTCTGCCTG
541 GGGCTGTGCT ATGGCGCAA TACCTTTTTT CACGCAGCCA AGGCCTACAT TGAGGGGTAT
601 CATACCGTGC CAAAAGGCCG GTGCCGACAG GTGGTCACAG GAATGGCTTG GCTGTTTTTC
661 GTCTCTTGGG GAATGTTTCC CATCCTGTTC ATTCTGGGGC CTGAAGGGTT CGGCGTGCTG
721 TCTGTACAG GAAGTACAGT GGGGCATACT ATCATTGACC TGATGTCCAA AAACCTGTGG
781 GGCCTGCTGG GACACTATCT GAGAGTCTG ATCCACGAGC ATATCCTGAT TCATGGCGAT
841 ATTGGAAGA CCACAAAAC GAATATCGGC GGAACCGAGA TTGAAGTGA AACACTGGTG
901 GAAGACGAGG CTGAGGCTGG GGCTGTGAAC AAGGGGACTG GCAAA

```

Двойной мутант L132A/T159C Chop2 по изобретению может кодироваться следующей аминокислотной последовательностью (положения 132 и 159 подчеркнуты и выделены жирным шрифтом, SEQ ID NO: 22).

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV IAIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGCI VWGATSAMAT GYVKVIFFFCL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPFILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL INEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

Одиночный мутант T159A Chop2 по изобретению может кодироваться следующей аминокислотной последовательностью (положение 159 подчеркнуто и выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 23).

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ILIHLSNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGAI VWGATSAMAT GYVKVIFFFCL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPFILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL INEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

Двойной мутант L132C/T159A Chop2 по изобретению может кодироваться следующей нуклеотидной последовательностью (SEQ ID NO: 24).

```

1 atggactacg ggggggctct gtcgtctgtc gggagggaac tgctgtttgt gactaacccct
61 gtcgtcgtga acgggagtgt gctggtcctt gaggaccagt gctactgtgc cggctggatc
121 gaatcacgcg gaaccaacgg ggcccagaca gctagcaatg tgctgcagtg gctggccgct
181 gggtttagta tcctgctgct gatgtttctac gcctatcaga cttggaagtc aacctgcggc
241 tgggaggaaa tctacgtgtg cgctattgag atggtgaaag tgatcctgga gttcttcttc
301 gagttcaaga acccaagcat gctgtacctg gctactggac accgagtgca gtagctgaga
361 tatgcagaat ggctgctgac atgccccgtc atctgcatc acctgtccaa cctgacaggc
421 ctgagcaatg actactccag gagaactatg ggactgctgg tgtccgacat cggcgccatt
481 gtctggggag caacttctgc tatggcaacc ggatacgtga aggtcatctt tttctgctg
541 gggctgtgct atggcgcaaa tacctttttt cacgcagcca aggcctacat tgaggggtat
601 cataccgtgc caaaaggccg gtgccgacag gtggtcacag gaatggctg gctgtttttc
661 gtctcttggg gaatgtttcc catcctgttc attctggggc ctgaagggtt cggcgtgctg
721 tctgtctacg gaagtacagt ggggcatact atcattgacc tgatgtccaa aaactgttgg
781 ggcctgctgg gacactatct gagagtgtg atccacgagc atatcctgat tcatggcgat
841 attcgaaga ccacaaaact gaatatcggc ggaaccgaga ttgaagtgga aacctgggtg
901 gaagacgagg ctgaggctgg ggctgtgaac aaggggactg gcaaa

```

Двойной мутант L132C/T159A Chop2 по изобретению может кодироваться следующей аминокислотной последовательностью (положения 132 и 159 подчеркнуты и выделены жирным шрифтом, SEQ ID NO: 25).

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLLMFY AYQTKWSTCG WEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ICIHLNLTG LSNDYSRRTM GLLVSDIGAI VWGATSAMAT GYVKVIFFFCL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPKGRCRQ VVTGMAWLFF VSWGMPFILF ILGPEGFGVL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL INEHILIHGD IRKTTKLNIG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

Chor2 дикого типа по изобретению может кодироваться следующей аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 26).

```

1 MDYGGALSAV GRELLFVTNP VVNGSVLVP EDQCYCAGWI ESRGTNGAQT ASNVLQWLAA
61 GFSILLMLFY AYQTKWSTCG WEEIYVCAIE MVKVILEFFF EFKNPSMLYL ATGHRVQWLR
121 YAEWLLTCPV ILIHLSNLTG LSNDYSRRIM GLLVSDIGTI VWGATSAMAT GYVKVIFFFCL
181 GLCYGANTFF HAAKAYIEGY HTVPGRCRQ VVTGMALFF VSWGMPILF ILGPEFGVFL
241 SVYGSTVGHT IIDLMSKNCW GLLGHYLRVL INEHILHGD IRKTKLNLG GTEIEVETLV
301 EDEAEAGAVN KGTGK

```

Мутантные белки ChR2 по изобретению также демонстрируют более медленную кинетику каналов. Было обнаружено, что более высокая светочувствительность коррелирует с каналами с более медленной кинетикой, выявляя соотношение между светочувствительностью и кинетикой каналов. Белки Chor2, которые образуют белки ChR2 по настоящему изобретению, также могут включать дополнительные мутации или модификации, которые могут улучшать кинетику каналов, или повышать степень дезактивации ChR2. Особенно предпочтительные мутанты ChR2 уравнивают порог светочувствительности с кинетикой каналов.

Композиции и наборы реагентов.

Композиции и наборы реагентов по изобретению включают по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты или полипептидную молекулу, которая кодирует мутантный белок Chor2, и полученный в результате ChR2, по изобретению. По меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты или полипептидная молекула, которая кодирует мутантный белок Chor2 по изобретению, может дополнительно включать фармацевтически приемлемый носитель. Наборы реагентов по изобретению дополнительно включают инструкции по введению объекту композиции по изобретению.

Терапевтические применения.

Мутации осуществляли на кодон-оптимизированном шитом белке Chor2-GFP для создания одиночных и двойных мутаций в сайтах L132 (Лейцин 132) и T159 (треонин 159). Функциональные свойства каждого мутанта ChR2 или их комбинации сначала исследовали в клетках НЕК. Получали AAV2-вирусные векторы, несущие конструкции мутантного Chor2-GFP, управляемые CAG-промотором, и инъецировали интравитреально в глаза взрослой мыши. Опосредованный мутантным Chor2 ответ на свет исследовали с помощью регистрации мультиэлектродных чипов из тотального препарата сетчатки.

Одиночный мутант ChR2, т.е. L132 и T159C, значительно снижал пороговую светочувствительность, которая требуется для того, чтобы вызвать ChR2-опосредованный фототок. Кроме того, было обнаружено, что несколько вариантов двойных мутантов ChR2, включающих L132C/T159C, L132A/T159C, и L132C/T159S дополнительно повышают фототок выше результатов любого одиночного мутанта ChR2 при низкой интенсивности света. Двойные мутанты демонстрировали более медленное выключение, которое, вероятно, способствует повышенному фототоку при низкой интенсивности света. Спайковую активность ганглиозных клеток сетчатки, опосредованную двойным мутантом L132C/T159C, наблюдали при интенсивности света 10^{13} фотонов/см²/с и при длине волны 473 нм. Данный уровень света составляет примерно на 1,5-2 log единиц ниже, чем уровень света, который требуется для того, чтобы вызвать спайковую активность с помощью ChR2 дикого типа. Запуск спайковой активности ганглиозных клеток сетчатки, экспрессирующих L132C/T159C, может следовать за частотой мерцания света до 15 Гц. Продолжающиеся исследования представляют собой оценку продолжительной экспрессии и безопасность мутантных ChR2 по изобретению в нейронах сетчатки.

Кроме того, было обнаружено, что экспрессия мутантных белков Chor2 и полученных в результате белков ChR2 по настоящему изобретению не вызывает нейротоксичности до двух месяцев после вирусной инфекции мышей, демонстрируя безопасность настоящего изобретения для терапевтического применения.

Векторы для применения в настоящем изобретении, могут включать различные вирусные векторы, такие как плазмиды и рекомбинантные вирусы, т.е. рекомбинантный адено-ассоциированный вирус (rAAV), рекомбинантные аденовирусы, рекомбинантные ретровирусы, рекомбинантные лентивирусы и другие вирусы, известные в данной области.

В некоторых воплощениях, экспрессия белков Chor2 по настоящему изобретению управляется конститутивным промотором, т.е. CAG-промотором, CMV-промотором, LTR. В других воплощениях промотор является индуцируемым или клеточноспецифичным. Клеточноспецифичные промоторы, которые дают возможность экспрессии белка Chor2 в специфических субпопуляциях клеток, т.е. в нейронных клетках сетчатки или в деградирующих клетках может быть предпочтительным. Эти клетки могут включать, в частности ганглиозные клетки сетчатки, фоторецепторные клетки, биполярные клетки, палочковидные биполярные клетки, конические биполярные клетки ON-типа, фоточувствительные ганглиозные клетки сетчатки, горизонтальные клетки, амакриновые клетки или АII-амакриновые клетки. Клеточноспецифичные промоторы известны в данной области. Особенно предпочтительные клеточноспецифичные промоторы включают в частности mGluR6, NK-3 и Pcp2 (L7).

В некоторых воплощениях использование различных генов опсина дополнительно к мутантным белкам Chor2 по настоящему изобретению и направленная генная экспрессия могут дополнительно по-

вышать светочувствительность или улучшать зрение. Зрительная информация обрабатывается посредством сетчатки двумя путями: ON-путь, который передает сигнал включения света ON, и OFF-путь, который передает сигнал выключения света OFF. Существование ON- и OFF-пути важно для усиления контрастной чувствительности. Зрительный сигнал в ON-пути является переключателем из ON-конусных биполярных клеток на ON-ганглиозные клетки. И ON-конусные биполярные клетки, и ON-ганглиозные клетки деполяризуются в ответ на свет. С другой стороны, зрительный сигнал в OFF-пути переносится от OFF-конусных биполярных клеток к OFF-ганглиозным клеткам. И OFF-конусные биполярные клетки, и OFF-ганглиозные клетки гиперполяризуются в ответ на свет. Палочковидные биполярные клетки, которые отвечают за способность видеть при слабом свете (скотопическое зрение), представляют собой ON биполярные клетки (деполяризованные в ответ на свет). Палочковидные биполярные клетки передают зрительный сигнал через АП-амакриновые клетки (клетки сетчатки ON-типа) к ON- и OFF-конусным биполярным клеткам.

Соответственно, дуалистическая родопсиновая система может использоваться для суммирования ON- и OFF-путей в целом с зрительной обработкой и остротой зрения. Вкратце, белок Chp2 по настоящему изобретению может специфично направляться к нейронам сетчатки ON-типа (т.е. ганглиозные клетки ON-типа и/или биполярные клетки ON-типа), в то время как сенсор гипополяризации света (т.е. галогенродопсин или другой хлоридный насос, известный в данной области) может направляться к нейронам сетчатки OFF-типа (т.е. ганглиозные клетки OFF-типа и/или биполярные клетки OFF-типа) для создания ON- и OFF-пути. Специфическая направленность к предпочтительным субпопуляциям может достигаться посредством использования различных клеточноспецифичных промоторов. Например, экспрессия Chp2 может управляться mGluR6-промотором для направленной экспрессии в нейронах сетчатки ON-типа (т.е. ганглиозные клетки ON-типа и/или биполярные клетки ON-типа), в то время как экспрессия канала гиперполяризации, такого как галогенродопсин, управляется NK-3-промотором для направленной экспрессии в нейронах сетчатки OFF-типа (т.е. ганглиозные клетки OFF-типа и/или биполярные клетки OFF-типа).

Альтернативный способ для восстановления ON- и OFF-путей в сетчатке достигается с помощью экспрессии сенсора деполяризации света, такого как ChR2, в палочковидных биполярных клетках или в АП-амакриновых клетках. В данном способе деполяризация палочковидных биполярных клеток или АП-амакриновых клеток может приводить к ON- и OFF-ответу на уровень конусных биполярных клеток и ниже по сигнальным путям ганглиозных клеток сетчатки. Таким образом, поддерживаются ON- и OFF-пути, которые свойственны сетчатке.

Настоящее изобретение может относиться к фармацевтической композиции или к лекарственному средству, подходящему для введения объекту или пациенту. Подходящие пути введения включают, например, интравитреальную, внутриглазную или субретинальную инъекцию.

Такие составы включают фармацевтически и/или физиологически приемлемый переносчик, разбавитель, носитель или эксципиент, такой как буферная соль или другие буферы, например, HEPES, для поддержания физиологического pH. Для обсуждения таких компонентов и их состава; см. в основном Gennaro, A.E., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2003 или последнее издание). См. также WO 00/15822. Если препарат должен храниться в течение продолжительного времени, то он может быть заморожен, например, в присутствии глицерина.

Фармацевтическая композиция, описанная выше, вводится объекту, имеющему зрительное заболевание или слепоту, с помощью подходящего пути, предпочтительно интравитреальной или субретинальной инъекцией в зависимости от слоя сетчатки, который является мишенью.

Описание Bennett и сотрудников (протитировано в данном документе) касается направленного воздействия на пигментный эпителий сетчатки - наиболее дистальный слой от витреального пространства. Согласно настоящему изобретению, конструктор Chp2 или полипептид направленно воздействует на клетки сетчатки, т.е. ганглиозные клетки сетчатки или биполярные клетки. Такие клетки, как известно, в достаточной степени хорошо доступны для интравитреальной инъекции, как раскрыто в данном документе. Интравитреальная и/или субретинальная инъекция может обеспечивать необходимый доступ к биполярным клеткам, особенно в обстоятельствах, в которых слой фоторецепторных клеток отсутствует, благодаря дегенерации, что происходит в некоторых формах дегенерации, которые предназначено преодолеть с помощью настоящего изобретения.

Для тестирования способности вектора экспрессировать Chp2-мутанты по настоящему изобретению, специфически в нейронах сетчатки млекопитающего, с помощью AAV-опосредованной доставки, комбинация предпочтительной промоторной последовательности, связанной с репортерным геном, таким как LacZ или GFP, связанным с SV40 поли A-последовательностью, может быть вставлена в плазмиду и упакована в gAAV вирусные частицы, сконцентрирована, протестирована на аденовирусную контаминацию и определен титр gAAV с использованием анализа инфекции. В правые глаза ряда протестированных объектов, предпочтительно инбредных мышей, может инъекционно вводиться субретинально примерно 1 мкл препарата gAAV (например, выше, чем примерно 10^{10} инфекционных единиц на 1 мл). Две недели спустя правые (тестируемые) и левые (контроли) глаза половины животных можно удалить, фиксировать и окрасить с помощью подходящего субстрата или антитела или другого вещества для обнаружения присут-

ствия репортерного гена. Большинство тестируемых сетчаток в инъецированных глазах демонстрируют фокально окрашенный участок, например, синий для LacZ/Xgal, или зеленый для GFP согласно субретинальной полости инъецированного вируса, создавая локализованное отслоение сетчатки. Все контрольные глаза могут быть негативными по отношению к продукту репортерного гена. Экспрессию репортерного гена, исследованную на мышах, умерщвленных в латеральные периоды, детектировали в течение по меньшей мере 10 недель после инъекции, что предполагает стабильную экспрессию репортерного трансгена.

В одном воплощении конструкторы Chop2 упаковываются в аденовирусные векторы для трансгенной доставки. Эффективное количество гAAV-вирионов, несущих последовательность, кодирующую Chop2-ДНК под контролем выбранного промотора, предпочтительно конститутивного CMV-промотора или клеточноспецифичного промотора, такого как mGluR6, предпочтительно находится в интервале примерно от 10^{10} примерно до 10^{13} гAAV-инфекционных единиц в объеме примерно от 150 примерно до 800 мкл на инъекцию. гAAV-инфекционные единицы могут измеряться согласно McLaughlin, S.K. et al., 1988, J. Virol., 62:1963. Более предпочтительно эффективное количество составляет примерно от 10^{10} примерно до 10^{12} гAAV-инфекционных единиц, и объем инъекции предпочтительно составляет примерно от 250 примерно до 500 мкл. Другие дозировки и объемы, предпочтительно внутри этих интервалов, но возможно и вне их, могут быть выбраны врачом-практиком, принимая во внимание физическое состояние объекта (предпочтительно человека), который подвергается лечению, включая возраст, вес, состояние здоровья и характер и тяжесть конкретного зрительного расстройства.

Также может быть целесообразно введение дополнительных доз ("бустеров") нуклеиновой кислоты или гAAV-композиций. Например, в зависимости от продолжительности трансгенной экспрессии в глазной клетке-мишени может вводиться второй курс лечения через 6 месяцев или ежегодно и может повторяться аналогичным образом. Нейтрализующие антитела к AAV, как ожидается, не будут генерироваться благодаря используемым дозам и путям введения, позволяя таким образом повторные раунды лечения.

Необходимость таких дополнительных доз может отслеживаться врачами-практиками с использованием, например, хорошо известных электрофизиологических и других тестов функции сетчатки и зрения и тестов зрительного поведения. Профессиональный врач будет способен выбрать подходящие тесты, применяя стандартные навыки, известные в данной области. Может быть целесообразным инъецировать больший объем композиции или в однократной дозе или в многократных дозах для дальнейшего улучшения соответствующих конечных параметров.

Глазные заболевания.

Глазные расстройства, для которых предназначены настоящие белки Chop2, и полученные в результате белки ChR2, которые могут использоваться для улучшения одного или нескольких параметров зрения, включают в частности аномалии развития, которые влияют как на ранние, так и на поздние сегменты глаза. Расстройства передних сегментов включает глаукому, катаракту, дистрофию роговицы кератоконус. Расстройства задних сегментов включают расстройства со слепотой, вызванные некорректным функционированием и/или гибелью фоторецепторов, что вызвано дистрофией и деградацией сетчатки. Расстройства сетчатки включают врожденную постоянную ночную слепоту, возрастную макулярную дегенерацию, врожденные конические дистрофии и большую группу расстройств, связанных с пигментным ретинитом (RP). Эти расстройства включают генетически предрасположенную гибель фоторецепторных клеток, палочек и конусов в сетчатке, наблюдаемую в разном возрасте. Среди них встречаются тяжелые ретинопатии, такие как подтипы RP, которые прогрессируют с возрастом и вызывают слепоту в детстве и в ранней молодости, и RP-ассоциированные заболевания, такие как генетические подтипы LCA, которые часто приводят в результате к потере зрения в детстве уже на первом году жизни. Более поздние расстройства, как правило, характеризуются существенным уменьшением и часто полной потерей фоторецепторных клеток, палочек и конусов (Trabulsi, E.I., ed., Genetic Diseases of the Eye, Oxford University Press, NY, 1998).

Конкретно, белки Chop2 и ChR2 по настоящему изобретению, применяемые для лечения и/или восстановления, по меньшей мере, частичного зрения у объектов, которые потеряли зрение благодаря глазным расстройствам, таким как RPE-ассоциированные ретинопатии, которые характеризуются продолжительным сохранением структуры глазной ткани, несмотря на потерю функции, и ассоциацией между функциональной потерей и дефектом или отсутствием нормального гена в глазных клетках объекта. Известно множество таких глазных расстройств, таких как детский приступ онхоцеркоза, пигментный ретинит, макулярная дегенерация и диабетическая ретинопатия, а также глазные заболевания со слепотой, известные в данной области. Понятно, что эти и другие расстройства, а также расстройства со слепотой по неизвестной в настоящее время причине, которые позже характеризуются с помощью такого же описания, как приведено выше, также могут подвергаться успешному лечению с помощью белков Chop2 и ChR2 по настоящему изобретению. Таким образом, конкретное глазное расстройство, подвергаемое лечению с помощью настоящего изобретения, может включать вышеупомянутые расстройства и ряд заболеваний, которые еще не охарактеризованы должным образом.

Оптогенетика.

Перспективная область оптогенетики включает комбинацию генетических и оптических методов

для контроля специфических событий в клетках-мишенях живой ткани. Оптогенетика может использоваться для диких млекопитающих и других животных. Кроме того, временная точность (временная шкала - миллисекунды) оптогенетических методов достаточна для функционирования в интактных биологических системах.

В настоящем изобретении предлагается Chor2-генная терапия для сохранения тканей сетчатки глаза путем введения в клетки сетчатки нуклеиновой кислоты или полипептида, кодирующего по меньшей мере одну мутантную форму Chor2. Мутантные белки Chor2/ChR2 по изобретению конкретно адаптированы для активации светом при более низкой интенсивности света, чем соответствующие белки дикого типа. Соответственно, мутантные белки Chor2/ChR2 по изобретению могут использоваться для активации клеток сетчатки и зрительной системы с использованием менее разрушительных источников освещения. Мутантные белки Chor2/ChR2 также проводят больше фототока при активации, приводя в результате к более стойкому или эффективному ответу клеток, экспрессирующих мутантные Chor2/ChR2.

Например, мутантные белки Chor2 по изобретению вводят объекту посредством местной интравитреальной или субретинальной, инъекции молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидную молекулу мутантного Chor2, мутантного Chor2, или клетки, экспрессирующей Chor2/ChR2. Клетки сетчатки объекта экспрессируют мутантные белки Chor2 в плазматической мембране. Когда трансфицированные или трансформированные клетки сетчатки встречаются со световым излучением, то трансфицированные или трансформированные клетки сетчатки передают улучшенный или восстановленный сигнал.

Эти способы могут использоваться у объектов с нормальным и/или нарушенным зрением. Мутанты Chor2/ChR2 по изобретению могут сохранять, улучшать или восстанавливать зрение. Кроме того, мутанты Chor2/ChR2 по изобретению используются для сохранения, улучшения или восстановления передачи не зрительной информации от фоточувствительных ганглиозных клеток сетчатки в мозг.

Термин "зрение" при использовании в данном документе определяется как способность организма эффективно детектировать свет в виде стимула для дифференцировки или функционирования. Подразумевается, что зрение охватывает следующее.

1. Детектирование или восприятие света - способность заметить присутствие или отсутствие света.
2. Светопроекция - способность заметить направление, от которого исходит световой стимул.
3. Разрешение - способность детектировать различные уровни яркости (т.е. контраст) на дифракционной или буквенной мишени.
4. Распознавание - способность распознать форму зрительной мишени путем отнесения к различным уровням контраста на мишени.

Таким образом, "зрение" включает способность облегчать детектирование присутствия или отсутствия света. Полипептиды и полинуклеотиды, кодирующие мутантный Chor2 по настоящему изобретению, могут использоваться для улучшения или восстановления зрения, где улучшение или восстановление зрения включает, например, повышение детектирования и восприятия света, повышение светочувствительности или фоточувствительности в ответ на световой стимул, повышение способности замечать направление, от которого исходит источник света, повышение способности детектирования различных уровней яркости, повышение способности распознавать форму зрительной мишени, и повышение индуцированного зрительного потенциала или передачи от сетчатки в кору головного мозга. Как таковое, улучшение или восстановление зрения может или не может включать полное восстановление зрения, т.е. где зрение пациента, подвергнутого лечению с помощью настоящего изобретения, восстанавливается до степени зрения здорового индивидуума. Зрительное восстановление, описанное в исследованиях на животных ниже, может по отношению к людям помещать индивидуума на нижний предел зрительной функции путем повышения одного аспекта зрения (т.е. светочувствительности или индуцированного зрительного потенциала) без восстановления полноты зрения. Тем не менее помещение на такой уровень имело бы существенную пользу, так как данные индивидуумы могли бы тренироваться двигаться и потенциально могли бы решать задачи низкого порядка, которые обеспечили бы им гораздо более высокий уровень зрительной независимости по сравнению с полной слепотой. Даже общее распознавание света может использоваться индивидуумами с нарушением зрения, которое улучшается с использованием композиций и способов по настоящему изобретению, для выполнения конкретных ежедневных задач и улучшает общую мобильность, возможности и качество жизни.

Степень восстановления зрения может определяться посредством измерения зрения перед и предпочтительно после введения вектора, включающего, например, ДНК, кодирующую Chor2. Зрение может измеряться с использованием любого из ряда методов, хорошо известных в данной области, и способов, которые еще не разработаны. Зрение, улучшенное или восстановленное с помощью настоящего изобретения, может измеряться с помощью любого из следующих зрительных ответов.

1. Ответ в виде детектирования света объектом после экспонирования со световым стимулом, в котором искомые данные надежного ответа представляют собой проявления или движения в общем направлении света объектом при включении света.
2. Ответ в виде проецирования света объектом после экспонирования со световым стимулом, где искомые данные представляют собой надежный ответ проявления или движения индивидуума в конкретном направлении света при включении света.

3. Разрешение объектом светового по сравнению с темным зрительным стимулом, что измеряют по способности объекта разрешать световой по сравнению с темным зрительным стимулом, которую выявляют с помощью:

а) присутствия демонстрируемого надежного оптокинетически полученного нистагмоидного движения взгляда и/или связанных с этим движений головы или тела, что демонстрирует слежение за целью (см. выше); и/или

б) присутствия надежной способности различать зрительный стимул и проявлять такое различие вербальными или не вербальными способами, включающими, например, указание или нажатие на ручку или кнопку.

4. Электрической регистрации ответа зрительной коры головного мозга на стимул в виде вспышки света или на эталонный зрительный стимул, этот ответ представляет собой конечную точку электрической передачи от восстановленной сетчатки к зрительной коре, также обозначается как индуцированный зрительный потенциал (VEP). Измерение может быть представлено с помощью электрической регистрации на поверхности кожи головы в участке зрительной коры головного мозга, на кортикальной поверхности и/или регистрации внутри клеток зрительной коры головного мозга.

Таким образом, улучшение или восстановление зрения согласно настоящему изобретению может включать, в частности, повышение амплитуды или кинетики фототоков или электрического ответа на световые стимулы в клетках сетчатки, повышение светочувствительности (т.е. снижение порога интенсивности света, требуемого для инициации фототока или электрического ответа на световой стимул, требуя таким образом, свет меньше или слабее, чтобы вызвать фототок) клеток сетчатки, повышение количества или амплитуды вызванного светом спайка или возбуждений спайка, повышение ответа на свет зрительной коры головного мозга, который включает повышение индуцированного зрительного потенциала, передаваемого из сетчатки или клеток сетчатки в зрительную кору головного мозга или в мозг.

Могут использоваться как *in vitro*, так и *in vivo* исследования для оценки различных параметров настоящего изобретения, включая известные животные модели человеческих глазных расстройств со слепотой. Используются многочисленные животные модели человеческой ретинопатии, например детской слепоты. Примеры, предлагаемые в данном документе, позволяют специалисту в данной области легко определить, что данный метод может аналогично использоваться при лечении ряда расстройств сетчатки.

В то время как более ранние чужие исследования демонстрировали, что дегенерация сетчатки может быть замедлена с помощью методов генной терапии, настоящее изобретение демонстрирует определенное физиологическое восстановление функции, которое, как ожидается, генерирует или улучшает различные параметры зрения, включая поведенческие параметры.

Измерение поведения может быть получено с использованием известных животных моделей и тестов, например, действия в водном лабиринте, где объект, которому проводят сохранение или восстановление зрения до различной степени, плывет на свет (Hayes, J.M. et al., 1993, *Behav. Genet.*, 23:395-403).

В моделях, в которых слепота индуцируется во взрослом возрасте, или наследственная слепота развивается достаточно медленно, так что индивидуум видел до потери зрения, может проводиться тренировка объекта на различных тестах. В этом случае, когда эти тесты вводят повторно после потери зрения для тестирования эффективности настоящих композиций и способов на предмет их восстанавливающих зрение эффектов, животным не нужно разучивать задачи *de novo*, как в слепом состоянии. Другие поведенческие тесты не требуют обучения и основаны на инстинктивности некоторых поведенческих черт. Примером является тест оптокинетический нистагм (Balkema G.W. et al., 1984, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 25:795-800; Mitchiner J.C. et al., 1976, *Vision Res.*, 16:1169-71).

Настоящее изобретение также может использоваться в комбинации с другими формами терапии зрения, известными в данной области, для улучшения или восстановления зрения.

Например, использование зрительных протезов, которые включают имплантаты сетчатки, кортикальные имплантаты, имплантаты бокового коленчатого ядра или имплантаты зрительного нерва. Таким образом, дополнительно к генетической модификации живых нейронов сетчатки с использованием настоящих способов, объект, который подвергается лечению, может обеспечиваться зрительным протезом до, во время или после применения молекулярного метода. Эффективность зрительного протезирования может быть улучшена путем тренировки индивидуума, усиливая таким образом потенциальный вклад трансформации *Chor2* клеток пациента, как предполагается в данном документе. Методы тренировки, такие как обучающая тренировка, характеризующаяся тренировкой объекта для распознавания (i) различных уровней светового и/или эталонного стимулирования, и/или (ii) стимулы окружающей среды от обычного источника света или объекта, как понятно специалисту в данной области; и тренировки ориентации и мобильности, характеризующиеся тренировкой объекта для зрительного детектирования локальных субъектов и более эффективного движения среди указанных субъектов, чем без тренировки. Фактически, здесь применимы любые методы зрительного стимулирования, которые обычно используются в области реабилитации слабого зрения.

Примеры

Пример 1. Генерирование конструкторов меченного мутантного Chop2.

Мутации осуществляли на кодон-оптимизированном шитом белке Chop2-GFP для создания одиночных и двойных мутаций в сайтах L132 (Лейцин 132) и T159 (Треонин 159). Несколько мутантов генерировали, например, одиночные мутанты, такие как L132A, L132C, T159A, T159C и T159S, и двойные мутанты, такие как L132C/T159C, L132C/T159S, L132A/T159C и L132C/T159A. Трансгены Chop2-GFP клонировали в вектор gAAV под контролем промотора CAG с использованием методов, известных в данной области.

Пример 2. In vitro анализ конструкторов мутантных Chop2.

Функциональные свойства каждого мутанта Chop2 или их комбинации сначала исследовали в клетках НЕК. Конструкторы Chop2 доставляли к клеткам НЕК с помощью, например, аденовирусной инфекции. При экспрессии WT или мутантного Chop2 образуются функциональные каналы WT и мутантный ChR2. Измерения светочувствительности и другие свойства каналов ChR2 оценивали, как описано в данном документе. Световые стимулы (фотоны/см²/с при 460 нм) генерировали с помощью ксенонной дуговой лампы и ослабляли с помощью нейтрально-серого светофильтра: ND4.0 ($2,8 \times 10^{14}$), ND3.0 ($1,4 \times 10^{15}$), ND2.5 ($4,8 \times 10^{15}$), ND2.0 ($1,6 \times 10^{16}$), ND1.0 ($1,3 \times 10^{17}$), ND0 ($1,2 \times 10^{18}$). Ток, вызванный светом, измеряли из ChR2 дикого типа, T159C, L132C, L132C/T159C и L132C/T159S. Пэтч-клемп регистрацию осуществляли с использованием методов, известных в данной области.

Репрезентативные регистрации из этого эксперимента, сравнивающего светочувствительность между конструкторами Chop2, показывали, что мутации только в L132 или в комбинации с мутацией в T159 демонстрируют повышенный фототок по сравнению с WT (фиг. 1A и 1B). На фиг. 1B представлены одинаковые следы тока в различном масштабе для более ясной иллюстрации различия в амплитуде фототока между WT ChR2 и мутантными ChR2. Фиг. 1B специфично сравнивает следы тока, полученные в результате светостимулирования с использованием нейтрально-серого светофильтра (ND 2.5), что эквивалентно $4,8 \times 10^{15}$ фотонов/см²/с; следы обозначали стрелками. Амплитуда фототока мутанта L132C выше, чем WT; амплитуда фототока двойного мутанта L132C/T159C выше, чем L132C; и амплитуда фототока мутанта L132C/T159S выше, чем L132/T159C. Следы тока мутантов ChR2, особенно двойных мутантов L132C/T159C и L132C/T159S, также демонстрируют более медленную дезактивацию по сравнению с WT и L132C.

На фиг. 2 представлены репрезентативные регистрации вызванных светом токов из WT ChR2, L132C, L132C/T159C и L132C/T159S после стимулирования с помощью 10 мс светового импульса ($1,2 \times 10^{18}$ фотонов/см²/с при длине волны 460 нм) для сравнения временной зависимости дезактивации после выключения света. Мутант ChR2 демонстрирует динамику дезактивации, причем двойной мутант L132C/T159S имеет самую продолжительную дезактивацию. Более высокая светочувствительность, как продемонстрировано с помощью L132C/T159C и L132C/T159S, может коррелировать с каналом с более медленной кинетикой.

Пример 3. In vivo глазное введение и анализ конструкторов мутантных Chop2.

Получали AAV2-вирусные векторы, несущие конструкторы мутантного Chop2-GFP, управляемые CAG-промотором, и инъецировали интравитреально в глаза взрослой мыши C57BL/6J. Взрослую мышь анестезировали с помощью IP-инъекции кетамина (100 мг/кг) и ксилазина (10 мг/кг). Под препаральной лупой делали разрез с помощью ножниц через веко для экспонирования склеры. Делали небольшое отверстие в участке склеры позади зрачка с помощью иглы и инъецировали суспензию вирусного вектора 0,8-1,5 мкл в концентрации приблизительно 10^{11} геномных частиц/мл в интравитреальное пространство через отверстие с использованием шприца Hamilton с тупоконечной иглой калибра 32-gauge. Для каждого животного обычно инъецировали только в один глаз с использованием вирусного вектора, несущего конструктор Chop2, а в другой глаз не инъецировали или инъецировали с использованием контрольных вирусных векторов, несущих только GFP. При экспрессии WT или мутантного Chop2 по настоящему изобретению образуются функциональные WT или мутантные ChR2 каналы, применяющие эндогенный ретиналь, и свойства этих белков ChR2 оценивали, как описано в данном документе.

ChR2-опосредованные ответы на свет исследовали с помощью регистрации мультиэлектродного чипа из цельных препаратов сетчатки. Световые стимулы (фотоны/см²/с) генерировали с помощью лазера голубой области света 473 нм и ослабляли с помощью нейтрально-серых светофильтров: NDO ($6,3 \times 10^{16}$), ND1.0 ($7,4 \times 10^{15}$), ND1.5 ($2,7 \times 10^{15}$), ND2.0 ($7,3 \times 10^{14}$), ND2.5 ($3,2 \times 10^{14}$), ND3.0 ($8,5 \times 10^{13}$), ND3.5 ($3,8 \times 10^{13}$) и ND4.0 ($9,5 \times 10^{12}$).

Регистрации мультиэлектродного чипа основаны на процедурах, опубликованных Tian and Copenhagen (2003). Вкратце, сетчатку иссекали и помещали фоторецепторами вниз на нитроцеллюлозную фильтровальную бумагу (Millipore Corp., Bedford, MA). Закрепленную сетчатку помещали в регистрирующую камеру MEA-60 мультиэлектродного чипа с диаметром камеры 30 мкм, с электродами, разделенными на 200 мкм (Multi Channel System MCS GmbH, Reutlingen, Germany), вместе со слоем ганглиозных клеток, обращенным к регистрирующим электродам. Сетчатку продолжительно перфузировали в кислородосодержащем внеклеточном растворе при 34°C во время всех экспериментов. Внеклеточный

раствор содержал (в мМ): NaCl, 124; KCl, 2,5; CaCl₂, 2; MgCl₂, 2; NaH₂PO₄, 1,25; NaHCO₃, 26; и глюкозу, 22

(рН 7,35 с 95% O₂ и 5% CO₂). Регистрации обычно начинали через 60 мин после помещения сетчатки в регистрационную камеру. Интервал между началом каждого светового стимула составлял 10-15 с. Сигналы фильтровали в интервале 200 Гц (низкий порог) и 20 кГц (высокий порог). Ответы от индивидуальных нейронов анализировали с использованием пакета программ Offline Sorter (Plexon, Inc., Dallas, TX).

Одиночные мутанты Chop2/ChR2, т.е. L132 и T159C, значительно снижали пороговую интенсивность света, чем требовалось для того, чтобы вызвать ChR2-опосредованный фототок. Кроме того, несколько двойных мутантов, включающих L132C/T159C, L132A/T159C и L132C/T159S, как было обнаружено, дополнительно повышают фототок при низких интенсивностях света. Различные нейтрально-серые светофильтры использовали для ослабления световых стимулов для дифференцировки вызванных светом ответов конструкторов Chop2 при слабом свете. Спайковую активность ганглиозных клеток сетчатки, опосредованную мутантами по настоящему изобретению, наблюдали при интенсивностях света примерно на 1,5-2 log единицы ниже, чем уровень света, который требуется для того, чтобы вызвать спайковую активность с помощью ChR2 дикого типа (фиг. 3). Конкретно, WT ChR2 не демонстрировал никакой спайковой активности в ответ на световые стимулы с нейтрально-серыми светофильтрами 2,5 (3,2×10¹⁴ фотонов/см²/с), в то время как мутанты ChR2 (L132C, L132C/T159C и L132C/T159S) демонстрируют спайковую активность. Фактически мутанты ChR2 еще демонстрировали спайковую активность в ответ на свет с нейтрально-серыми светофильтрами 3,0 и 3,5. Таким образом, мутанты ChR2 по настоящему изобретению обладают более высокой светочувствительностью и, таким образом, требуется значительно более низкая интенсивность света, чтобы вызывать ChR2-опосредованный фототок. Кроме того, двойные мутанты ChR2 обладают более высокой светочувствительностью, чем одиночные мутанты, т.е. L132C. Кроме того, возбуждение спайка ганглиозных клеток сетчатки, экспрессирующих L132C/T159C и L132/T159S, может следовать за частотой мерцания света до 15 и 5 Гц соответственно (фиг. 4).

Мутант L132C/T159A демонстрирует высокую светочувствительность, вероятно, он наиболее светочувствительный среди этих мутантов, но он также демонстрирует исключительно медленное выключение (канал продолжает быть открытым в течение многих секунд после выключения света). Интересно, что он может быть выключен быстрее с использованием света длинной длины волны, такого как свет желтой области спектра. Мутант L132C/T159A (кодируемый SEQ ID NO: 24 и 25) демонстрирует значительный потенциал.

С учетом соотношения между светочувствительностью и кинетикой канала мутанты Chop2/ChR2, которые демонстрируют баланс между светочувствительностью и кинетикой канала, такие как L132C/T159C или L132C/T159S, могут подходить для применения в восстановлении зрения.

Пример 4. Анализ конструкторов мутантов Chop2 в мышинных моделях заболевания.

Мышиные модели дегенеративных глазных заболеваний известны в данной области. Например, гомозиготные rd1 (rd1/rd1) мыши широко применяются для модели фоторецепторной дегенерации. Мыши Rd1 несут нуль-мутацию в фосфодиэстеразе циклического GMP, PDE6, аналогично некоторым формам пигментного ретинита у людей. Другие хорошо изученные мышинные модели глазного заболевания, которые могут представлять конкретный интерес для демонстрации безопасности и эффективности мутанта ChR2, включают rds (также известные как Prph^{Rd2}), rd3, rd4, rd5, rd6, rd7, rd8, rd9, Pde6b^{rd10} или cpl11.

Конструкторы Chop2-GFP по настоящему изобретению могут быть инъецированы интравитреально в глаза новорожденных (P1) или взрослых мышей в возрасте 2-12 месяцев. Сигнал GFP может наблюдаться в Chop2-6EP-инъецированной сетчатке для определения уровня экспрессии ChR2 или экспрессии в конкретной популяции клеток, таких как ганглиозные клетки сетчатки. Экспрессию мутантного Chop2-GFP можно отслеживать в течение определенного времени, т.е. 3-6 месяцев или 1 год после вирусной инфекции. Регистрации патч-клемп и мультисканального чипа можно осуществлять с использованием методов, известных в данной области и описанных в данном документе для измерения вызванных светом ответов мутантный Chop2-6EP-экспрессирующих клеток *in vivo*.

Дополнительные методы и тесты для тестирования восстановления светочувствительности зрения хорошо изучены в данной области. Индуцированные зрительные потенциалы от Chop2-GFP-экспрессирующих клеток или зрительной коры головного мозга можно исследовать, как описано в PCT-публикации WO 2007/131180. Другие тесты включают поведенческую оценку остроты зрения у мышей, т.е. виртуальный оптомоторный тест и визуальный водный лабиринт.

Пример 5. Анализ продолжительной экспрессии и безопасности введения конструкторов мутантных Chop2 в нейроны сетчатки.

Нейротоксичность оценивали на C57BL/6J взрослых мышах, инъецированных конструкторами Chop2 по настоящему изобретению. Безопасность экспрессии мутантов Chop2 в сетчатке оценивали с помощью иммуноокрашивания и подсчета клеток после экспонирования с жестким ультрафиолетом в течение двух недель. Было обнаружено, что ни одна из мышей не проявила симптомов нейротоксичности в течение периода до двух месяцев после инъекции.

Дополнительные продолжающиеся исследования представляют собой оценку продолжительной экспрессии и безопасности мутантов Chop2/ChR2 по изобретению в нейронах сетчатки.

Другие воплощения

Хотя изобретение дано вместе с подробным описанием, представленное выше описание предназначено для иллюстрации и не ограничивает объем притязаний изобретения, который определен объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в пределах представленной ниже формулы изобретения.

Патентная и научная литература, на которую делались ссылки в данном документе, представляет собой знания, доступные специалистам в данной области. Все патенты США и опубликованные и не опубликованные патентные заявки США, процитированные в данном документе, включены ссылкой. Все опубликованные иностранные патенты и патентные заявки, процитированные в данном документе, включены ссылкой. Все опубликованные ссылки, документы, рукописи и научная литература, процитированная в данном документе, включены в данный документ ссылкой.

Хотя настоящее изобретение было конкретно показано и описано со ссылкой на его предпочтительные воплощения, специалистам в данной области будет понятно, что различные изменения в форме и деталях могут быть внесены без отхода от объема изобретения, определяемого прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, в которой аминокислота в положении 132 SEQ ID NO: 26 представляет собой цистеин (C) и аминокислота в положении 159 SEQ ID NO: 26 представляет собой цистеин (C) или серин (S).

2. Вектор экспрессии по п.1, где вектор экспрессии представляет собой вектор на основании адено-ассоциированного вируса (AAV).

3. Вектор экспрессии по п.2, где вектор AAV представляет собой вектор AAV2.

4. Вектор экспрессии по пп.1, 2 или 3, где полипептид содержит цистеин (C) в положениях 132 и 159 SEQ ID NO: 26.

5. Вектор экспрессии по п.4, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 и полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 15.

6. Вектор экспрессии по пп.1, 2 или 3, где полипептид содержит цистеин (C) в положении 132 и серин (S) в положении 159 SEQ ID NO: 26.

7. Вектор экспрессии по п.6, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 и полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 18.

8. Способ улучшения или восстановления зрения у субъекта, включающий введение субъекту вектора экспрессии по любому из пп.1-7.

9. Способ по п.8, где субъект имеет нормальное зрение.

10. Способ по п.8, где субъект страдает глазным заболеванием.

11. Способ по п.10, где глазное заболевание представляет собой макулярную дегенерацию или пигментный ретинит.

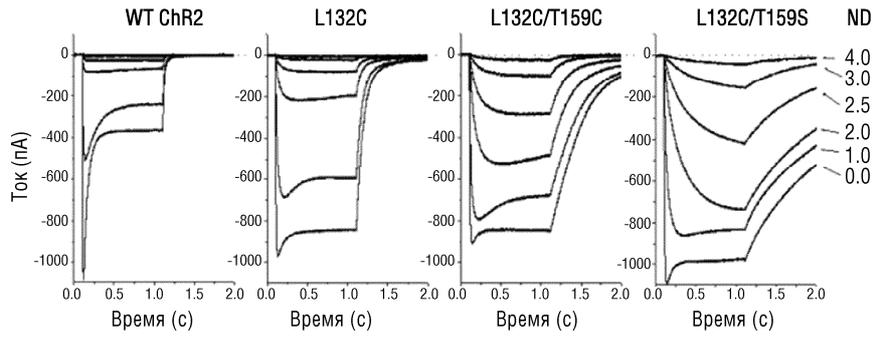
12. Способ по любому из пп.8-11, где указанное улучшение или восстановление зрения включает любое из следующего: повышение светочувствительности, снижение порога интенсивности света, требуемого для вызова фототока, и повышение индуцированного зрительного потенциала в зрительной коре головного мозга.

13. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, в которой аминокислота в положении 132 SEQ ID NO: 26 представляет собой аланин (A) и аминокислота в положении 159 SEQ ID NO: 26 представляет собой цистеин (C).

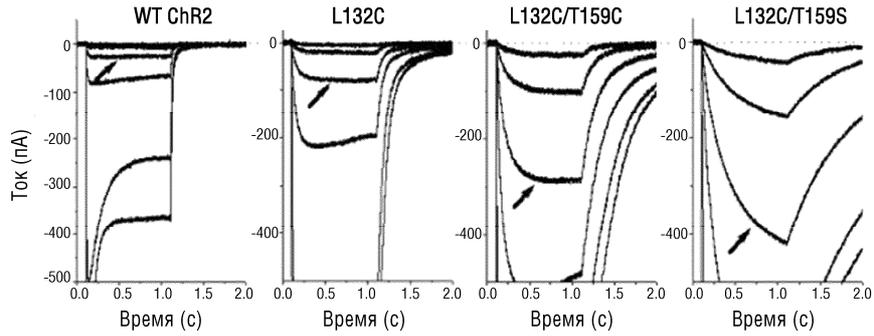
14. Вектор экспрессии по п.13, где вектор экспрессии представляет собой вектор на основании адено-ассоциированного вируса (AAV).

15. Вектор экспрессии по п.14, где вектор AAV представляет собой вектор AAV2.

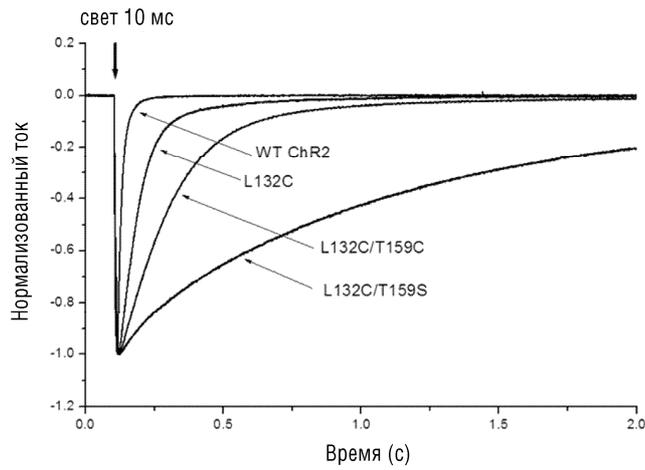
16. Вектор экспрессии по пп.13, 14 или 15, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 и где полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 21.



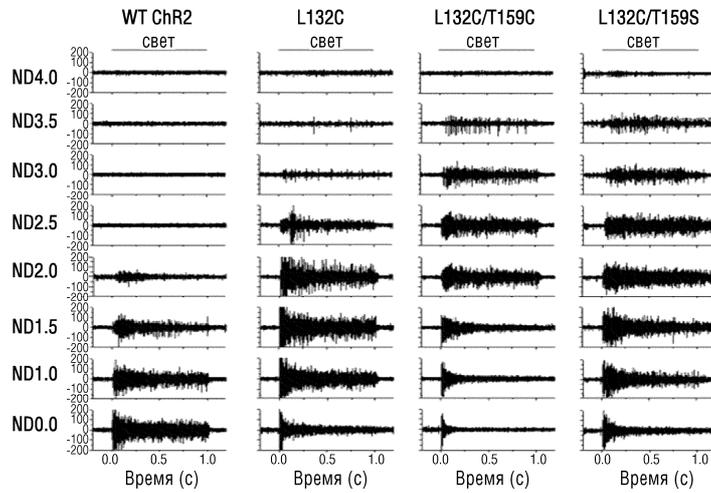
Фиг. 1А



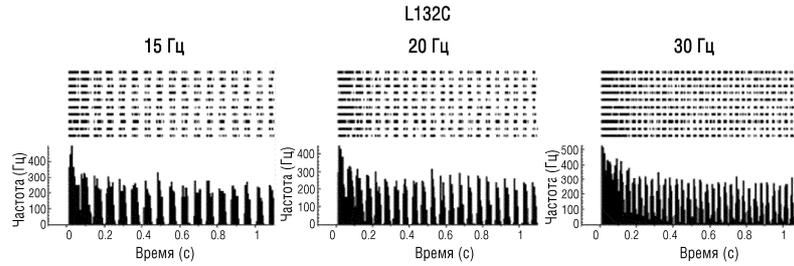
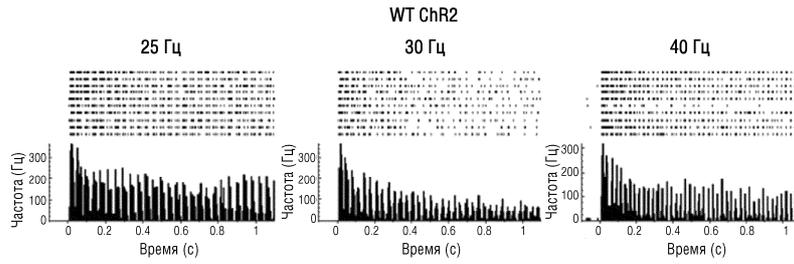
Фиг. 1В



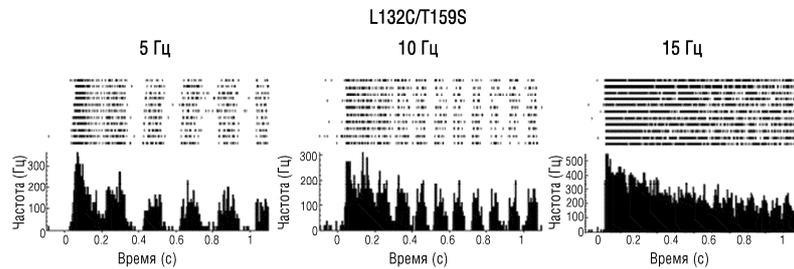
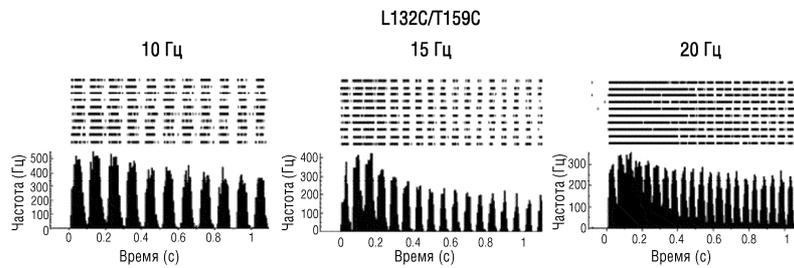
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4А



Фиг. 4В

