重组人Ⅱ型线粒体动力蛋白样GTP酶基因序列及其应用

技术领域

本发明涉及生物制剂领域，尤其涉及重组人Ⅱ型线粒体动力蛋白样GTP酶基因序列及其应用。

背景技术

常染色体显性视神经萎缩 ADOA(autosomal dominant optic atrophy)是原发性遗传性视神经病变的最常见形式，发病比例约为1:12 000至1:50 000，并在幼年时期隐匿发病。其临床特征表现为轻度至中度逐渐丧失视力，色觉缺陷，中心视野缺损和颞视盘苍白。起初是乳头状血管束的损伤，其次是视神经的上升萎缩和视神经髓鞘的丧失。

ADOA 由编码内线粒体膜蛋白和基因座的基因突变引起，国外学者已确定这类基因主要为OPA1-OPA8，其中已初步确认75％左右的 ADOA 患者与OPA1携带的杂合与显性突变有关，其中外显子740、2794位点突变最常见。OPA1蛋白定位于线粒体内膜，控制能量代谢和凋亡，维持嵴和mtDNA完整性，具有GTP酶活。ADOA的发病机制是：突变的OPA1编码形成多种截短形式蛋白，这些蛋白通常缺乏完整的GTP酶结构域，等同于缺失一个等位基因，将使OPA1的量大幅下降，出现所谓的单倍体不足，从而使线粒体功能出现障碍。碎片化的线粒体的无法为视神经细胞正常供应ATP，RGC细胞逐渐凋亡，从而导致患者发生ADOA。

ADOA 目前尚无方法治疗，是世界公认的遗传性视神经病变之一。随着基因治疗的发展，ADOA的基因治疗成为可能，其中的难点在于OPA1外显子剪接的多种形式以及其突变的多种形式，这就造成多样的致病蛋白类型及突变形式，无法用某一种基因药物治疗所有患者。

国外的研究中已有人对OPA1突变导致ADOA的发病机制进行过研究，分析了OPA1转录和基因产物的多种形式，探索了用于重组OPA1蛋白的更优良纯化方式，并通过家族病史的调查分析寻求如何筛选、鉴定及诊断是否携带缺陷性OPA1，同时还展望了OPA1突变导致的ADOA的预前基因诊断及治疗。但目前尚未出现任何类型的人线粒体动力蛋白样GTP酶基因的重组应用腺相关病毒载体的报道及生产应用。

因此，本领域亟需开发一种治疗效果好的人线粒体动力蛋白样GTP酶的表达体系及制备方法。

发明内容

本发明的目的是提供一种治疗效果好的人线粒体动力蛋白样 GTP 酶的表达体系及制备方法。

本发明的目的是提供一种编码人线粒体动力蛋白样GTP酶的优化核酸序列、载体及制备方法。

本发明的第一方面，提供了一种所述核苷酸序列编码人Ⅱ型线粒体动力蛋白样 GTP 酶，且所述核苷酸序列选自下组：

(a) 所述核苷酸序列如 SEQ ID NO.: 1 所示；和

(b) 所述核苷酸序列与 SEQ ID NO.: 1 所示的核苷酸序列有≥95%相同性，优选地≥98%，更优选地≥99%。

在另一优选例中，所述核苷酸序列包括 DNA 序列、cDNA 序列、或 mRNA 序列。

在另一优选例中，所述核苷酸序列包括单链序列和双链序列。

在另一优选例中，所述核苷酸序列包括与 SEQ ID NO.: 1 完全互补的核苷酸序列。

在另一优选例中，所述核苷酸序列如 SEQ ID NO.: 1 所示，其中

第 1-288 位为 MIS 的编码序列；

第 289-2772 位为 GTP 酶结构域、中枢动力蛋白结构域和 GTPase 效应结构域的编码序列；

第 2773-2775 位为终止密码子。

在另一优选例中，SEQ ID NO.: 1 的序列包括：MIS 编码序列，如 SEQ ID NO.:1 中第 1-288 位所示；以及 GTP 酶结构域、中枢动力蛋白结构域和 GTPase 效应结构域的编码序列，如 SEQ ID NO.:1 中第 289-2772 位所示。

在另一优选例中，SEQ ID NO.: 2 的序列包括：MIS 编码序列，如 SEQ ID NO.:2 中第 1-288 位所示；以及 GTP 酶结构域、中枢动力蛋白结构域和 GTPase 效应结构域的编码序列，如 SEQ ID NO.:2 中第 289-2772 位所示。本发明还提供单独编码所述 MIS 的核苷酸序列(SEQ ID No.: 1 或 2 中第 1-288 位)、以及单独编码 GTP 酶结构域、中枢动力蛋白结构域和 GTPase 效应结构域的核苷酸序列(SEQ ID No.: 1 或 2 中第 289-2772 或 289-2775 位)。

本发明的第二方面，提供了一种融合核酸，所述融合核酸包含如本发明第一方面所述的核苷酸序列。

在另一优选例中，所述融合核酸还包含选自下组的序列：UTR 序列、启动子序列、或其组合。

在另一优选例中，所述 UTR 序列包括 3'-UTR 和/或 5'-UTR。

在另一优选例中，所述 UTR 序列中含有稳定结构的 ployA 序列。

在另一优选例中，所述融合核酸从 5'端-3'端具有式 I 结构：

Z1-Z2-Z3 (I)

式中，

各“-”独立地为键或核苷酸连接序列；

Z1 为无、或 5'-UTR 序列；

Z2 为如本发明第一方面所述的核苷酸序列；和

Z3 为 3'-UTR 序列。

在另一优选例中，所述的 Z1 为 5'-UTR 序列。

在另一优选例中，各个核苷酸连接序列的长度为 1-30nt，较佳地 1-15nt，更佳地 3-6nt。

在另一优选例中，所述的核苷酸连接序列来源于限制性内切酶酶切形成的核苷酸接头序列。

本发明的第三方面，提供了一种载体，所述载体含有如本发明第一方面所述的核苷酸序列或本发明第二方面所述的融合核酸。

在另一优选例中，所述载体包含一个或多个启动子，所述启动子可操作地与所述核酸序列、增强子、转录终止信号、多腺苷酸化序列、复制起点、选择性标记、核酸限制性位点、和/或同源重组位点连接。

在另一优选例中，所述的载体选自下组：质粒、病毒载体。

在另一优选例中，所述的载体选自下组：慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、或其组合。较佳地，所述载体为 AAV 载体。

在另一优选例中，所述 AAV 载体的血清型选自：AAV2、AAV5、AAV7、AAV8、或其组合。

在另一优选例中，所述的载体包括 DNA 病毒、逆转录病毒载体。

在另一优选例中，所述载体为含有或插入有如本发明第一方面所述的核苷酸序列或本发明第二方面所述的融合核酸的 AAV 载体；较佳地为 AAV 载体质粒 pSNaV。

在另一优选例中，所述载体用于表达重组人 II 型线粒体动力蛋白样 GTP 酶。

本发明的第四方面，提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞含有本发明第三方面所述的载体，或其染色体中整合有外源的如本发明第一方面所述的核苷酸序列或本发明第二方面所述的融合核酸。

在另一优选例中，所述宿主细胞为哺乳动物细胞，所述哺乳动物包括人和非人哺乳动物。

在另一优选例中，所述宿主细胞选自下组：293T 细胞、感光细胞(包括锥状细胞和/或杆状细胞)、其他视觉细胞(如双节细胞)、(视)神经细胞、或其组合。

在另一优选例中，所述宿主细胞选自下组：视杆细胞、视锥细胞、给光双极细胞、撤光双极细胞、水平细胞、神经节细胞、无长突细胞、或其组合。较佳地，所述宿主细胞为(视网膜)神经节细胞。

本发明的第五方面，提供了如本发明第三方面所述的载体的用途，用于制备一制剂或组合物，所述制剂或组合物用于恢复受试者视力和/或治疗眼部疾病。

在另一优选例中，所述眼部疾病为视网膜病变。

在另一优选例中，所述制剂或组合物用于治疗遗传性视神经病变，较佳地为常染色体显性视神经萎缩(ADOA)。

在另一优选例中，所述制剂或组合物用于治疗视网膜神经节细胞凋亡。

本发明的第六方面，提供了一种药物制剂，所述的制剂含有(a)本发明第三方面所述的载体，以及(b)药学上可接受的载体或赋形剂。

在另一优选例中，所述药物制剂的剂型选自下组：冻干制剂、液体制剂、或其组合。

在另一优选例中，所述的载体选自下组：慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、或其组合。较佳地，所述载体为 AAV 载体。

在另一优选例中，所述药物制剂中载体的含量为 1×10^{9}-1×10^{16}，较佳地 1×10^{1}-1×10^{13}个病毒/毫升，更佳地 2×10^{11}-1×10^{12}个病毒/毫升。

在另一优选例中，所述药物制剂用于治疗眼部疾病，较佳地治疗视网膜神经节细胞凋亡。

在另一优选例中，所述药物制剂用于治疗遗传性视神经病变，较佳地常染色体显性视神经萎缩(ADOA)。

在另一优选例中，所述药物制剂能显著提高眼球线粒体动力蛋白样 GTP 酶的表达和/或活性。

本发明的第七方面，提供了一种长期提高线粒体动力蛋白样 GTP 酶的表达和/或活性的方法，所述方法包括导入本发明第三方面所述的载体，和/或施用本发明第六方面所述的药物制剂。

在另一优选例中，所述方法能有效增加细胞产生的 ATP 含量，和/或抑制线粒体凋亡。

在另一优选例中，所述方法能持续上调 GTP 酶的表达和/或活性。

本发明的第八方面，提供了一种治疗方法，所述方法包括将本发明第三方面所述的载体施用于需要的对象。

在另一优选例中，所述的载体选自下组：慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、或其组合。较佳地，所述载体为 AAV 载体。

在另一优选例中，将所述载体引入到需要的对象的眼睛内。

在另一优选例中，所述需要的对象包括人和非人哺乳动物。

在另一优选例中，所述治疗方法为治疗眼部疾病的方法。

在另一优选例中，所述眼部疾病为遗传性视神经病变，较佳地为常染色体显性视神经萎缩(ADOA)。

所述治疗方法能有效提高眼球线粒体动力蛋白样 GTP 酶的表达和/或活性。

所述治疗方法能有效提高眼球线粒体动力蛋白样 GTP 酶的表达和/或活性长达 6 个月，优选地长达 3 个月。

所述治疗方法能有效增加视网膜 ATP 含量，和/或抑制线粒体凋亡。

本发明的第九方面，提供了一种重组人II型线粒体动力蛋白样 GTP 酶的制备方法，包括步骤：培养本发明第四方面所述的宿主细胞，从而得到重组人II型线粒体动力蛋白样 GTP 酶。

本发明的第十方面，提供了一种 ADOA 显性遗传视神经病细胞模型，所述细胞中 OPA1 基因表达或活力下降。

在另一优选例中，所述细胞包括视网膜神经节细胞(Retinal ganglion cell，RGC)。

在另一优选例中，所述 OPA1 基因完全不表达或无活性。

本发明第十一方面，提供了一种 ADOA 显性遗传视神经病细胞模型的制备方法，该方法包括步骤：提供一种细胞，对所述细胞中的 OPA1 基因进行点突变，从而得到 OPA1 基因点突变的细胞；通过筛选获得点突变阳性单克隆细胞。

在另一优选例中，所述 OPA1 基因点突变指 Q(谷氨酰胺)285Stop 点突变。

在另一优选例中，所述细胞包括 RGC 细胞。

本发明的第十二方面，提供了一种 ADOA 显性遗传视神经病非人哺乳动物模型，所述动物模型中 GRC 细胞中的 OPA1 基因表达和/或活力降低。

在另一优选例中，所述 OPA1 基因存在点突变，具体地，存在 Q(谷氨酰胺)285Stop 点突变。

本发明的第十三方面，提供了一种 ADOA 显性遗传视神经病非人哺乳动物模型的制备方法，包括以下步骤：

(a) 提供非人哺乳动物的细胞，对所述细胞中的 OPA1 基因进行点突变，从而得到 OPA1 基因点突变的细胞；

(b) 利用步骤(a)中得到的 OPA1 基因点突变的细胞，制备具有 OPA1 基因点突变的动物模型。

在另一优选例中，所述的 OPA1 基因点突变是杂合型或纯合型。

在另一优选例中，将 OPA1 蛋白的第 285 位的谷氨酰胺位点突变为转录停止。

在另一优选例中，所述非人哺乳动物为啮齿动物或灵长目动物，较佳地包括小鼠、大鼠、兔、猴。

在另一优选例中，在步骤(b)中，包括步骤：

(b1)制备获得嵌合的 OPA1 基因点突变的动物模型，然后通过杂交，获得纯合型或杂合型 *OPA1* 基因点突变动物模型；

在另一优选例中，所述方法包括：

(1)利用 CRISPR-CAS9 技术，构建 OPA1 的第 285 位 Q(谷氨酰胺)突变为终止(即 Q285Stop)点突变的重组质粒，并用筛选标记的同源突变 DNA 序列替换，得到 OPA1 的 Q285Stop 点突变阳性单克隆胚胎干细胞；

(2) 利用步骤(1)中得到的 OPA1 点突变的小鼠胚胎干细胞克隆株，制备得到嵌合小鼠；

(3) 将步骤(2)中得到的嵌合小鼠和正常野生型小鼠交配繁育，在后代中筛选获得 OPA1 点突变的杂合子小鼠，即为 OPA1 的 Q285Stop 点突变小鼠模型。

在另一优选例中，将所述杂合子小鼠进行交配繁育，从而在其后代中筛选获得 OPA1 点突变的纯合子小鼠。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

图 1 显示了优化核苷酸序列与原人 II 型线粒体动力蛋白样 GTP 酶基因序列的开放阅读框序列比较。两者的同源性为 72.25%(2005/2775)，其中一致的用“|”表示，上行为优化开放阅读框核苷酸序列，下行为原人 II 型线粒体动力蛋白样 GTP 酶基因序列(未优化的野生编码序列)。

图 2 显示了 OPA1 isforms 2 转录本的蛋白结构示意图。

图 3 显示了从重组克隆中筛选出目的条带为 3000 bp 左右的正确克隆，M:蛋白 marker；泳道 1：正确的 rAAV2/2-hOPA1 isoform 2 重组克隆；泳道 2：阳性对照；泳道 3：阴性对照。

图 4 显示了重组腺相关病毒质粒 pSNaV/rAAV2/2-hOPA1 的结构示意图。

图 5 显示了 SDS-PAGE 电泳检测 rAAV2/2-hOPA1 isoform 2 纯度的考马斯亮蓝染色结果。其中，泳道 1:蛋白 marker；泳道 2：rAAV2/2-hOPA1 isoform 2。

图 6 显示了兔眼玻切镜下眼底拍照，其中 A 为注射 rAAV2/2-ZsGreen 组(对照组)，B 为注射 rAAV2/2-优化 hOPA1 isoform 2 组(实验组 A)。

图 7 显示了兔眼球切片免疫荧光检测，实验组 A 为注射 rAAV2/2-优化 hOPA1 isoform 2 组，实验 B 组为注射 rAAV2/2-原 hOPA1 isoform 2 组。

图 8 显示了兔眼玻切镜下 OCT 拍照。其中 A 为注射 rAAV2/2-ZsGreen 组(对照组)，B 为注射 rAAV2/2-优化 hOPA1 isoform 2 组(实验组 A)。

图 9 显示了显微镜下观察到的兔眼球 HE 切片内的视网膜。其中 A 为注射 rAAV2/2-ZsGreen 组(对照组)，B 为注射 rAAV2/2-优化 hOPA1 isoform 2 组(实验组 A)。

图 10 显示了注射不同质粒的家兔眼球视网膜的 hOPA1 蛋白的实时荧光 PCR 相对表达量的检测结果，实验组 A 为注射 rAAV2/2-优化 hOPA1 isoform 2 组，实验 B 组为注射

rAAV2/2-原 hOPA1 isoform 2 组，对照组为注射 rAAV2/2-ZsGreen 组。

图11显示了注射不同质粒的家兔眼球视网膜的hOPA1蛋白的western blot检测结果，实验组 A 为注射 rAAV2/2-优化 hOPA1 isoform 2 组，实验 B 组为注射 rAAV2/2-原 hOPA1 isoform 2 组，对照组为注射 rAAV2/2-ZsGreen 组。

图12显示了ADOA显性遗传视神经病模型小鼠构建。

图13 显示了ADOA显性遗传视神经病点突变模型小鼠基因型鉴定。

图14 显示了高效液相HPLC检测给药后小鼠视网膜ATP含量变化。

图15 显示了透射电镜TEM观察线粒体形貌。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，对重组人Ⅱ型线粒体动力蛋白样 GTP 酶(OPA1)基因编码序列进行了针对性优化设计，从而获得了一种特别适合在哺乳动物(如人)细胞中高效转录和高效表达 OPA1 蛋白的核苷酸序列(SEQ ID NO.：1)，并构建了重组人Ⅱ型线粒体动力蛋白样 GTP 酶的重组表达载体。实验结果表明，相对于未优化的编码序列，经过特殊优化后的 OPA1 编码序列(SEQ ID NO.：1)转录效率略有提高，并且表达量显著提高了 5 倍以上，非常适合在哺乳动物(尤其是人)细胞内表达，能有效治疗 ADOA 等眼部疾病。在此基础上，发明人完成了本发明。

术语

为了可以更容易地理解本公开，首先定义某些术语。如本申请中所使用的，除非本文另有明确规定，否则以下术语中的每一个应具有下面给出的含义。在整个申请中阐述了其它定义。

术语“约”可以是指在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成，其将部分地取决于如何测量或测定值或组成。例如，如本文所用，表述“约100”包括 99 和 101 和之间的全部值(例如，99.1、99.2、99.3、99.4 等)。

如本文所用，术语“含有”或“包括(包含)”可以是开放式、半封闭式和封闭式的。换言之，所述术语也包括“基本上由…构成”、或“由…构成”。

序列同一性通过沿着预定的比较窗(其可以是参考核苷酸序列或蛋白的长度的 50%、60%、70%、80%、90%、95%或 100%)比较两个对齐的序列，并且确定出现相同的残基的位置的数目来确定。通常地，这表示为百分比。核苷酸序列的序列同一性的测量是本领域技术人员熟知的方法。

如本文使用的，术语“受试者”、“需要的对象”指任何哺乳动物或非哺乳动物。哺乳动物包括但不限于人类、脊椎动物诸如啮齿类、非人类灵长类、牛、马、狗、猫、猪、绵羊、山羊。

OPA1(optic atrophy 1)

如本文所用，术语“(重组)人II型线粒体动力蛋白样GTP酶”、“视神经萎缩症蛋白1”、“OPA1(蛋白)”、“hOPA1(蛋白)”、“多肽”、“本发明多肽”和“本发明蛋白”具有相同的意义，在本文可互换使用。OPA1是位于线粒体内膜具有GTPase活性的跨膜蛋白，该蛋白包括N-末端跨膜区具有线粒体膜插入序列(mitochondrial import sequence, MIS)、跨膜区域(TR)和疏水区域(HR)，GTPase结构域，中枢动力蛋白结构域和C-末端具有GTPase效应结构域(GTPase effector domain, GED)。OPA1的MIS多肽的功能是引导GTP蛋白进入到线粒体中。

ADOA由编码内线粒体膜蛋白和基因座的基因突变引起，国外学者已确定这类基因主要为OPA1-OPA8，其中已初步确认75％左右的ADOA患者与OPA1携带的杂合与显性突变有关，其中外显子740、2794位点突变最常见。OPA1蛋白定位于线粒体内膜，控制能量代谢和凋亡，维持嵴和mtDNA完整性，具有GTP酶活。ADOA的发病机制是：突变的OPA1编码形成多种截短形式蛋白，这些蛋白通常缺乏完整的GTP酶结构域，等同于缺失一个等位基因，将使OPA1的量大幅下降，出现所谓的单倍体不足，从而使线粒体功能出现障碍。碎片化的线粒体的无法为视神经细胞正常供应ATP，RGC细胞逐渐凋亡，从而导致患者发生ADOA。

腺相关病毒

腺相关病毒(adeno-associated virus，AAV),也称腺伴随病毒,属于微小病毒科依赖病毒属,是目前发现的一类结构最简单的单链DNA缺陷型病毒,需要辅助病毒(通常为腺病毒)参与复制。它编码两个末端的反向重复序列(ITR)中的cap和rep基因。ITRs对于病毒的复制和包装具有决定性作用。cap基因编码病毒衣壳蛋白，rep基因参与病毒的复制和整合。AAV能感染多种细胞。

重组腺相关病毒载体(rAAV)源于非致病的野生型腺相关病毒，由于其安全性好、宿主细胞范围广(分裂和非分裂细胞)、免疫源性低，在体内表达外源基因时间长等特点，被视为最有前途的基因转移载体之一，在世界范围内的基因治疗和疫苗研究中得到广泛应用。经过10余年的研究，重组腺相关病毒的生物学特性已被深入了解，尤其是其在各种细胞、组织和体内实验中的应用效果方面已经积累了许多资料。在医学研究中，rAAV被用于多种疾病的基因治疗的研究(包括体内、体外实验)；同时作为一种有特点的基因转移载体，还广泛用于基因功能研究、构建疾病模型、制备基因敲除鼠等方面。

在本发明一个优选的实施例中，载体为重组AAV载体。AAV是相对较小的DNA病毒，其可以稳定和位点特异性方式整合到它们所感染的细胞的基因组中。它们能够感染一大系列的细胞而不对细胞生长、形态或分化产生任何影响，并且它们似乎并不涉及人体病理学。AAV基因组已被克隆、测序及表征。AAV含有大约4700碱基并在每个末端包含约145个碱基的反向末端重复序列(ITR)区域，其作为病毒的复制起点。该基因组的其余被分成两个带有衣壳化功能的重要区域：包含涉及病毒复制和病毒基因表达的rep基因的基因组左边部分；以及包含编码病毒衣壳蛋白的cap基因的基因组右边部分。

AAV 载体可采用本领域的标准方法制备。任何血清型的腺相关病毒均是合适的。用于纯化载体的方法可见于例如美国专利No.6566118、6989264和6995006，它们的公开内容整体以引用方式并入本文。杂合载体的制备在例如PCT申请No.PCT/US2005/027091中有所描述，该申请的公开内容整体以引用方式并入本文。用于体外和体内转运基因的衍生自AAV的载体的使用已有描述(参见例如国际专利申请公布No.WO91/18088和WO93/09239;美国专利No.4,797,368、6,596,535和5,139,941，以及欧洲专利No.0488528，它们均整体以引用方式并入本文)。这些专利公布描述了其中rep和/或cap基因缺失并被所关注的基因替换的各种来源于AAV的构建体，以及这些构建体在体外(进入培养的细胞中)或体内(直接进入生物体)转运所关注的基因的用途。复制缺陷重组AAV可通过将以下质粒共转染进被人类辅助病毒(例如腺病毒)感染的细胞系而制备：所含的所关注核酸序列的侧翼为两个AAV反向末端重复序列(ITR)区域的质粒，和携带AAV衣壳化基因(rep和cap基因)的质粒。然后通过标准技术纯化所产生的AAV重组体。

在一些实施方案中，重组载体被衣壳化到病毒粒子(例如包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15和AAV16的AAV病毒粒子)中。因此，本公开包括含有本文所述的任何载体的重组病毒粒子(因其包含重组多核苷酸而为重组的)。产生这样的粒子的方法是本领域已知的，并在美国专利No.6,596,535中有所描述。

核酸编码序列

本发明的要解决的技术问题是克服现有技术中重组人II型线粒体动力蛋白样GTP酶表达量不高、治疗效果不佳的技术缺陷。本发明的目的是提供一种重组人II型线粒体动力蛋白样GTP酶优化基因序列。重组人II型线粒体动力蛋白样GTP酶基因，其优化CDS核苷酸序列SEQ ID NO：1所示，其大小为2775 bp，起始于密码子ATG，编码924个氨基酸，其中1到288 bp是OPA1-MIS的编码序列，编码96个氨基酸的肽链，其功能是引导GTP蛋白进入到线粒体中，发挥其生理功能；289到2772bp，编码828个氨基酸的肽链，是GTP功能蛋白，最后3bp为终止密码子。经研究发现，本发明优化的OPA1基因序列(SEQ ID NO.：1)，使OPA1蛋白表达效率更高，有更多的OPA1蛋白在患者视神经节细胞发挥生理作用。

本发明所述的编码人II型线粒体动力蛋白样GTP酶的核酸，其核苷酸序列如SEQ ID NO.：1所示。在另一优选例中，所述核苷酸序列与SEQ ID NO.：1所示的核苷酸序列有≥95%相同性，优选地≥98%，更优选地≥99%。在本发明中，所述编码人II型线粒体动力蛋白样GTP酶的核酸又称作OPA1优化基因或OPA1优化核酸。

本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。在另一优选例中，所述核苷酸为DNA。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。本发明所述的核苷酸序列编码SEQ ID NO.：3所示的氨基酸序列。OPA1-MIS信号肽，定向引导该蛋白进入线粒体，被蛋白酶水解后，成熟的OPA1 isoform

2蛋白进入线粒体发挥作用。

MWRLRRAAVACEVCQSLVKHSSGIKGSLPLQKLHLVSRSIYHSHHPTLKLQRPQLRTSFQQFSSLTNLPLRKL
KFSPIKYGYQPRRNFWPARLATRLLKLRYLILGSAVGGGYTAKKTFDQWKDMIPDLSEYKWIVPDIVWEIDEYIDFG
SPEETAFRATDRGSESDKHFRKVSDKEKIDQLQEELLHTQLKYQRILERLEKENKELRKLVLQKDDKGIHHRKLKKS
LIDMYSEVLDVLSDYDASYNTQDHLPRVVVVGDQSAGKTSVLEMIAQARIFPRGSGEMMTRSPVKVTLSEGPHHVAL
FKDSSREFDLTKEEDLAALRHEIELRMRKNVKEGCTVSPETISLNVKGPGLQRMVLVDLPGVINTVTSGMAPDTKET
IFSISKAYMQNPNAIILCIQDGSVDAERSIVTDLVSQMDPHGRRTIFVLTKVDLAEKNVASPSRIQQIIEGKLFPMK
ALGYFAVVTGKGNSSESIEAIREYEEEFFQNSKLLKTSMLKAHQVTTRNLSLAVSDCFWKMVRESVEQQADSFKATR
FNLETEWKNNYPRLRELDRNELFEKAKNEILDEVISLSQVTPKHWEEILQQSLWERVSTHVIENIYLPAAQTMNSGT
FNTTVDIKLKQWTDKQLPNKAVEVAWETLQEEFSRFMTEPKGKEHDDIFDKLKEAVKEESIKRHKWNDFAEDSLRVI
QHNALEDRSISDKQQWDAAIYFMEEALQARLKDTENAIENMVGPDWKKRWLYWKNRTQEQCVHNETKNELEKMLKCN
EEHPAYLASDEITTVRKNLESRGVEVDPSLIKDTWHQVYRRHFLKTALNHCNLCRRGFYYYQRHFVDSELECNDVVL
FWRIQRMLAITANTLRQQLTNTEVRRLEKNVKEVLEDFAEDGEKKIKLLTGKRVQLAEDLKKVREIQEKLDAFIEAL
HQEK (SEQ ID NO.: 3)

核酸序列可以是DNA、RNA、cDNA或PNA。核酸序列可以是基因组的、重组的或合成的。核酸序列可以是分离的或纯化的。核酸序列可以是单链或双链的。优选地，核酸序列将编码如本文描述的光敏蛋白。核酸序列可以通过克隆衍生，例如使用包括限制性酶切、连接、凝胶电泳的标准的分子克隆技术，例如在Sambrook等Molecular Cloning:A laboratory manual ,Cold Spring Harbour Laboratory Press)中描述的。核酸序列可是分离的，例如使用PCR技术分离的。分离意指从任何杂质和从被自然地发现与其来源中的核酸序列缔合的其他核酸序列和/或蛋白中分离核酸序列。优选地，其还将不含细胞材料、培养基或来自纯化/生产过程的其他化学物质。核酸序列可以是合成的，例如通过直接的化学合成产生。核酸序列可以作为裸露的核酸被提供，或可与蛋白或脂质复合提供。

本发明的核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法，可根据已公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次PCR扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明多肽(或其片段，或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。

本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体，以及用本发明的载体或多肽编码序列经基因工程产生的宿主细胞。上述多核苷酸、载体或宿主细胞可以是分离的。

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

在本发明较佳的实施方式中，所述核苷酸序列如SEQ ID NO.: 1所示。

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

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

应用 PCR 技术扩增 DNA/RNA 的方法被优选用于获得本发明的基因。用于 PCR 的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择，并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的 DNA/RNA 片段。

本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体，以及用本发明的载体或蛋白编码序列经基因工程产生的宿主细胞，以及经重组技术利用所述宿主细胞表达 OPA1 蛋白的方法。

通过常规的重组 DNA 技术，可利用本发明的多核苷酸序列获得表达本发明 OPA1 蛋白的宿主细胞(如哺乳动物细胞)。一般来说包括步骤：将本发明第一方面所述的多核苷酸或本发明第三方面所述的载体转导入宿主细胞内。

本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含本发明多肽的编码 DNA 序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等。所述的 DNA 序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上，以指导 mRNA 合成。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

此外，表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白(GFP)，或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体，可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达多肽。

宿主细胞可以是原核细胞，或是低等真核细胞，或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞(包括人和非人哺乳动物)。代表性例子有：CHO、NS0、COS7、或 293 细胞的动物细胞等。在本发明的一个优选实施方式中，选择 293T 细胞、感光细胞(包括锥状细胞和/或杆状细胞)、其他视觉细胞(如双节细胞)、神经细胞为宿主细胞。在另一优选例中，所述宿主细胞选自下组：视杆细胞、视锥细胞、给光双极细胞、撤光双极细胞、水平细胞、神经节细胞、无长突细胞、或其组合。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 $CaCl_2$ 法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 $MgCl_2$。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

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

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

序列优化

在本发明中，提供了优化的、特别适合在哺乳动物细胞中表达的重组人II型线粒体动力蛋白样GTP酶的编码序列，所述编码序列如SEQ ID NO.：1所示。

如本文所用，所述“优化的OPA1编码序列”、“优化OPA1编码基因”均指一种用于编码重组人II型线粒体动力蛋白样GTP酶的核苷酸序列，所述的核苷酸序列编码SEQ ID NO.：3所示的氨基酸序列。

在本发明中，所述重组人II型线粒体动力蛋白样GTP酶的野生DNA编码序列(未优化的DNA编码序列)如SEQ ID NO.：2所示。所述未优化的野生DNA编码序列的表达量很低。

野生Homo sapiens :OPA1 isoform2 CDS 2775bp

ATGTGGCGACTACGTCGGGCCGCTGTGGCCTGTGAGGTCTGCCAGTCTTTAGTGAAACACAGCTCTGGAATAAAAGGAAGTTTACC
ACTACAAAAACTACATCTGGTTTCACGAAGCATTTATCATTCACATCATCCTACCTTAAAGCTTCAACGACCCCAATTAAGGACATCCTTTC
AGCAGTTCTCTTCTCTGACAAACCTTCCTTTACGTAAACTGAAATTCTCTCCAATTAAATATGGCTACCAGCCTCGCAGGAATTTTTGGCCA
GCAAGATTAGCTACGAGACTCTTAAAACTTCGCTATCTCATACTAGGATCGGCTGTTGGGGGTGGCTACACAGCCAAAAAGACTTTTGATCA
GTGGAAAGATATGATACCGGACCTTAGTGAATATAAATGGATTGTGCCTGACATTGTGTGGGAAATTGATGAGTATATCGATTTTGGTTCTC
CGGAAGAAACGGCGTTTAGAGCAACAGATCGTGGATCTGAAAGTGACAAGCATTTTAGAAAGGTGTCAGACAAAGAGAAAATTGACCAACTT
CAGGAAGAACTTCTGCACACTCAGTTGAAGTATCAGAGAATCTTGGAACGATTAGAAAAGGAGAACAAAGAATTGAGAAAATTAGTATTGCA
GAAAGATGACAAAGGCATTCATCATAGAAAGCTTAAGAAATCTTTGATTGACATGTATTCTGAAGTTCTTGATGTTCTCTCTGATTATGATG
CCAGTTATAATACGCAAGATCATCTGCCACGGGTTGTTGTGGTTGGAGATCAGAGTGCTGGAAAGACTAGTGTGTTGGAAATGATTGCCCAA
GCTCGAATATTCCCAAGAGGATCTGGGGAGATGATGACACGTTCTCCAGTTAAGGTGACTCTGAGTGAAGGTCCTCACCATGTGGCCCTATT
TAAAGATAGTTCTCGGGAGTTTGATCTTACCAAAGAAGAAGATCTTGCAGCATTAAGACATGAAATAGAACTTCGAATGAGGAAAAATGTGA
AAGAAGGCTGTACCGTTAGCCCTGAGACCATATCCTTAAATGTAAAAGGCCCTGGACTACAGAGGATGGTGCTTGTTGACTTACCAGGTGTG
ATTAATACTGTGACATCAGGCATGGCTCCTGACACAAAGGAAACTATTTTCAGTATCAGCAAAGCTTACATGCAGAATCCTAATGCCATCAT
ACTGTGTATTCAAGATGGATCTGTGGATGCTGAACGCAGTATTGTTACAGACTTGGTCAGTCAAATGGACCCTCATGGAAGGAGAACCATAT
TCGTTTTGACCAAAGTAGACCTGGCAGAGAAAAATGTAGCCAGTCCAAGCAGGATTCAGCAGATAATTGAAGGAAAGCTCTTCCCAATGAAA
GCTTTAGGTTATTTTGCTGTTGTAACAGGAAAAGGGAACAGCTCTGAAAGCATTGAAGCTATAAGAGAATATGAAGAAGAGTTTTTTCAGAA
TTCAAAGCTCCTAAAGACAAGCATGCTAAAGGCACACCAAGTGACTACAAGAAATTTAAGCCTTGCAGTATCAGACTGCTTTTGGAAAATGG
TACGAGAGTCTGTTGAACAACAGGCTGATAGTTTCAAAGCAACACGTTTTAACCTTGAAACTGAATGGAAGAATAACTATCCTCGCCTGCGG
GAACTTGACCGGAATGAACTATTTGAAAAAGCTAAAAATGAAATCCTTGATGAAGTTATCAGTCTGAGCCAGGTTACACCAAAACATTGGGA
GGAAATCCTTCAACAATCTTTGTGGGAAAGAGTATCAACTCATGTGATTGAAAACATCTACCTTCCAGCTGCGCAGACCATGAATTCAGGAA
CTTTTAACACCACAGTGGATATCAAGCTTAAACAGTGGACTGATAAACAACTTCCTAATAAAGCAGTAGAGGTTGCTTGGGAGACCCTACAA
GAAGAATTTTCCCGCTTTATGACAGAACCGAAAGGGAAAGAGCATGATGACATATTTGATAAACTTAAAGAGGCTGTTAAGGAAGAAAGTAT
TAAACGACACAAGTGGAATGACTTTGCGGAGGACAGCTTGAGGGTTATTCAACACAATGCTTTGGAAGACCGATCCATATCTGATAAACAGC
AATGGGATGCAGCTATTTATTTTATGGAAGAGGCTCTGCAGGCTCGTCTCAAGGATACTGAAAATGCAATTGAAAACATGGTGGGTCCAGAC
TGGAAAAAGAGGTGGTTATACTGGAAGAATCGGACCCAAGAACAGTGTGTTCACAATGAAACCAAGAATGAATTGGAGAAGATGTTGAAATG
TAATGAGGAGCACCCAGCTTATCTTGCAAGTGATGAAATAACCACAGTCCGGAAGAACCTTGAATCCCGAGGAGTAGAAGTAGATCCAAGCT
TGATTAAGGATACTTGGCATCAAGTTTATAGAAGACATTTTTTAAAAACAGCTCTAAACCATTGTAACCTTTGTCGAAGAGGTTTTTATTAC
TACCAAAGGCATTTTGTAGATTCTGAGTTGGAATGCAATGATGTGGTCTTGTTTTGGCGTATACAGCGCATGCTTGCTATCACCGCAAATAC
TTTAAGGCAACAACTTACAAATACTGAAGTTAGGCGATTAGAGAAAAATGTTAAAGAGGTATTGGAAGATTTTGCTGAAGATGGTGAGAAGA
AGATTAAATTGCTTACTGGTAAACGCGTTCAACTGGCGGAAGACCTCAAGAAAGTTAGAGAAATTCAAGAAAAACTTGATGCTTTCATTGAA

GCTCTTCATCAGGAGAAATAA (SEQ ID NO.: 2)

本发明优化了影响基因表达和蛋白定位的序列片段，这些序列片段包括但不限于，密码子使用偏好性，消除不利于表达的二级结构(如发夹结构)，改变 GC 含量，CpG 二核苷酸含量，mRNA 的二级结构，隐蔽剪接位点，早期多聚腺苷化位点，内部核糖体进入位点和结合位点，负 CpG 岛，RNA 不稳定区，重复序列(直接重复、反向重复等)和可能影响克隆的限制性位点。通过分析和试验筛选，最终得到如 SEQ ID NO.: 1 所示的特别优化的 DNA 编码序列。此序列是经过特殊优化，转录水平略有提高，表达量显著提高。特别优化后的 SEQ ID NO.: 1 所示的编码序列与 SEQ ID NO.: 2 所示的野生编码序列相似度为 72.25%(2005/2775)，如图 1 所示。

优化 Homo sapiens :OPA1 isoform2 CDS 2775bp

ATGTGGCGCCTGCGCCGCGCCGCCGTGGCCTGCGAGGTGTGCCAGAGCCTGGTGAAGCACAGCAGCGGCATCAAGGGCAGCCTGCCC
CTGCAGAAGCTGCACCTGGTGAGCCGCAGCATCTACCACAGCCACCACCCCACCCTGAAGCTGCAGCGCCCCCAGCTGCGCACCAGCTTCCA
GCAGTTCAGCAGCCTGACCAACCTGCCCCTGCGCAAGCTGAAGTTCAGCCCCATCAAGTACGGCTACCAGCCCCGCCGCAACTTCTGGCCCG
CCCGCCTGGCCACCCGCCTGCTGAAGCTGCGCTACCTGATCCTGGGCAGCGCCGTGGGCGGCGGCTACACCGCCAAGAAGACCTTCGACCAG
TGGAAGGACATGATCCCCGACCTGAGCGAGTACAAGTGGATCGTGCCCGACATCGTGTGGGAGATCGACGAGTACATCGACTTCGGCAGCCC
CGAGGAGACCGCCTTCCGCGCCACCGACCGCGGCAGCGAGAGCGACAAGCACTTCCGCAAGGTGAGCGACAAGGAGAAGATCGACCAGCTGC
AGGAGGAGCTGCTGCACACCCAGCTGAAGTACCAGCGCATCCTGGAGCGCCTGGAGAAGGAGAACAAGGAGCTGCGCAAGCTGGTGCTGCAG
AAGGACGACAAGGGCATCCACCACCGCAAGCTGAAGAAGAGCCTGATCGACATGTACAGCGAGGTGCTGGACGTGCTGAGCGACTACGACGC
CAGCTACAACACCCAGGACCACCTGCCCCGCGTGGTGGTGGTGGGCGACCAGAGCGCCGGCAAGACCAGCGTGCTGGAGATGATCGCCCAGG
CCCGCATCTTCCCCCGCGGCAGCGGCGAGATGATGACCCGCAGCCCCGTGAAGGTGACCCTGAGCGAGGGCCCCCACCACGTGGCCCTGTTC
AAGGACAGCAGCCGCGAGTTCGACCTGACCAAGGAGGAGGACCTGGCCGCCCTGCGCCACGAGATCGAGCTGCGCATGCGCAAGAACGTGAA
GGAGGGCTGCACCGTGAGCCCCGAGACCATCAGCCTGAACGTGAAGGGCCCCGGCCTGCAGCGCATGGTGCTGGTGGACCTGCCCGGCGTGA
TCAACACCGTGACCAGCGGCATGGCCCCCGACACCAAGGAGACCATCTTCAGCATCAGCAAGGCCTACATGCAGAACCCCAACGCCATCATC
CTGTGCATCCAGGACGGCAGCGTGGACGCCGAGCGCAGCATCGTGACCGACCTGGTGAGCCAGATGGACCCCCACGGCCGCCGCACCATCTT
CGTGCTGACCAAGGTGGACCTGGCCGAGAAGAACGTGGCCAGCCCCAGCCGCATCCAGCAGATCATCGAGGGCAAGCTGTTCCCCATGAAGG
CCCTGGGCTACTTCGCCGTGGTGACCGGCAAGGGCAACAGCAGCGAGAGCATCGAGGCCATCCGCGAGTACGAGGAGGAGTTCTTCCAGAAC
AGCAAGCTGCTGAAGACCAGCATGCTGAAGGCCCACCAGGTGACCACCCGCAACCTGAGCCTGGCCGTGAGCGACTGCTTCTGGAAGATGGT
GCGCGAGAGCGTGGAGCAGCAGGCCGACAGCTTCAAGGCCACCCGCTTCAACCTGGAGACCGAGTGGAAGAACAACTACCCCCGCCTGCGCG
AGCTGGACCGCAACGAGCTGTTCGAGAAGGCCAAGAACGAGATCCTGGACGAGGTGATCAGCCTGAGCCAGGTGACCCCCAAGCACTGGGAG
GAGATCCTGCAGCAGAGCCTGTGGGAGCGCGTGAGCACCCACGTGATCGAGAACATCTACCTGCCCGCCGCCCAGACCATGAACAGCGGCAC
CTTCAACACCACCGTGGACATCAAGCTGAAGCAGTGGACCGACAAGCAGCTGCCCAACAAGGCCGTGGAGGTGGCCTGGGAGACCCTGCAGG
AGGAGTTCAGCCGCTTCATGACCGAGCCCAAGGGCAAGGAGCACGACGACATCTTCGACAAGCTGAAGGAGGCCGTGAAGGAGGAGAGCATC
AAGCGCCACAAGTGGAACGACTTCGCCGAGGACAGCCTGCGCGTGATCCAGCACAACGCCCTGGAGGACCGCAGCATCAGCGACAAGCAGCA
GTGGGACGCCGCCATCTACTTCATGGAGGAGGCCCTGCAGGCCCGCCTGAAGGACACCGAGAACGCCATCGAGAACATGGTGGGCCCCGACT
GGAAGAAGCGCTGGCTGTACTGGAAGAACCGCACCCAGGAGCAGTGCGTGCACAACGAGACCAAGAACGAGCTGGAGAAGATGCTGAAGTGC
AACGAGGAGCACCCCGCCTACCTGGCCAGCGACGAGATCACCACCGTGCGCAAGAACCTGGAGAGCCGCGGCGTGGAGGTGGACCCCAGCCT
GATCAAGGACACCTGGCACCAGGTGTACCGCCGCCACTTCCTGAAGACCGCCCTGAACCACTGCAACCTGTGCCGCCGCGGCTTCTACTACT
ACCAGCGCCACTTCGTGGACAGCGAGCTGGAGTGCAACGACGTGGTGCTGTTCTGGCGCATCCAGCGCATGCTGGCCATCACCGCCAACACC
CTGCGCCAGCAGCTGACCAACACCGAGGTGCGCCGCCTGGAGAAGAACGTGAAGGAGGTGCTGGAGGACTTCGCCGAGGACGGCGAGAAGAA
GATCAAGCTGCTGACCGGCAAGCGCGTGCAGCTGGCCGAGGACCTGAAGAAGGTGCGCGAGATCCAGGAGAAGCTGGACGCCTTCATCGAGG
CCCTGCACCAGGAGAAGTAA (SEQ ID NO.: 1)

融合核酸

本发明还提供了一种融合核酸，其包含本发明第一方面所述的编码人Ⅱ型线粒体动力蛋白样 GTP 酶的核酸序列。

如本文所用，“融合核酸”指由两个或两个以上不同来源的核苷酸序列连接而成的核酸，或者由同一来源但其天然位置并不互相连接的两个或两个以上核苷酸序列连接而成的核酸。

另一优选例中，所述融合核酸还包含选自下组的序列：UTR 序列、启动子序列、或其组合。

优选地，所述融合核酸在所述的编码人Ⅱ型线粒体动力蛋白样 GTP 酶的核酸可操作性地连接有 UTR 序列。

在另一优选例中，所述 UTR 序列包括 3’-UTR 和/或 5’-UTR。

在另一优选例中，所述 UTR 序列中含有稳定结构的 ployA 序列。

在另一优选例中，所述融合核酸从 5’端-3’端具有式 I 结构：

Z1-Z2-Z3 (I)

式中，

各“-”独立地为键或核苷酸连接序列；

Z1 为 5’-UTR 序列；

Z2 为如本发明第一方面所述的核苷酸序列；和

Z3 为 3’-UTR 序列。

表达载体和宿主细胞

本发明还提供了一种用于OPA1蛋白的表达载体，它含有本发明的优化OPA1编码序列。

通过提供的序列信息，熟练的技术人员可以使用可用的克隆技术以产生适于转导进入细胞的核酸序列或载体。

优选地，编码 OPA1 蛋白的核酸序列作为载体，优选地表达载体被提供。优选地，其可作为优选地适用于在视网膜靶细胞中转导和表达的基因治疗载体被提供。载体可以是病毒的或非病毒的(例如质粒)。病毒载体包括源自以下的那些病毒载体:腺病毒、包括突变的形式的腺相关病毒(AAV)、逆转录病毒、慢病毒、疱疹病毒、牛痘病毒、MMLV、GaLV、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、HIV、痘病毒和 SV40。优选地，病毒载体是复制缺陷的(replication defective)，尽管设想其可以是复制缺乏的(replication deficient)、能够复制或条件性复制的。病毒载体通常可以保持染色体外状态而不整合进入靶视网膜细胞的基因组。用于向视网膜靶细胞引入编码 OPA1 蛋白的核酸序列的优选的病毒载体是 AAV 载体，例如自身互补的腺相关病毒(scAAV)。使用特定的 AAV 血清型(AAV 血清型 2 到 AAV 血清型 12)或这些血清型中的任何一个的修饰的版本(包括 AAV 4YF 和 AAV 7m8 载体)可以实现选择性靶向。

病毒载体可被修饰以缺失任何非必需的序列。例如，AAV 中，病毒可被修饰以缺失全部或部分的 IX 基因、E1a 和/或 E1b 基因。对于野生型 AAV，没有辅助病毒诸如腺病毒的存在，复制是非常低效率的。对于重组的腺相关病毒，优选地，复制基因和衣壳基因以反

式被提供(在 pRep/Cap 质粒中)，并且仅 AAV 基因组的 2ITR 被保留并且包装进入病毒体，同时需要的腺病毒基因被被腺病毒或另一个质粒提供。也可对慢病毒载体做出类似的修饰。

病毒载体具有进入细胞的能力。然而，非病毒载体诸如质粒可与剂复合以有利于病毒载体被靶细胞的摄取。此类剂包括聚阳离子剂。可选地，递送系统诸如基于脂质体的递送系统可被使用。用于在本发明中使用的载体优选地适于在体内或体外使用，并且优选地适于在人类中使用。

载体将优选地包含一个或多个调节序列以指导核酸序列在视网膜靶细胞中的表达。调节序列可以包括与核酸序列可操作地连接的启动子、增强子、转录终止信号、多腺苷酸化序列、复制起点、核酸限制性位点、和同源重组位点。载体还可包括选择性标记，例如来确定载体在生长系统(例如细菌细胞)中或在视网膜靶细胞中的表达。

“可操作地连接”意指，核酸序列在功能上与其可操作地连接的序列相关，以使得它们以使得它们影响彼此的表达或功能的方式连接。例如，与启动子可操作地连接的核酸序列将具有被启动子影响的表达模式。

启动子介导与其连接的核酸序列的表达。启动子可以是组成型的或可以是诱导型的。启动子可以指导在内视网膜细胞中遍在的表达，或神经元特异的表达。在后一种情况中，启动子可以指导细胞类型特异的表达，例如对给视神经节细胞。合适的启动子将是本领域技术人员已知的。例如，合适的启动子可以选自由以下组成的组:L7、thy-1、恢复蛋白、钙结合蛋白、人类 CMV、GAD-67、鸡β肌动蛋白、hSyn、Grm6、Grm6 增强子 SV40 融合蛋白。使用细胞特异的启动子可以实现靶向，例如 Grm6-SV40 用于选择性靶向给视神经细胞。Grm6 启动子是 Grm6 基因的 200 碱基对增强子序列和 SV40 真核启动子的融合体，Grm6 基因编码给视神经细胞特异的代谢型谷氨酸受体 mGluR6。Grm6 基因的优选的来源是小鼠和人类。使用泛-神经元的启动子可以实现遍在的表达，其实例在本领域是已知的并且可得的。一个此类实例是 CAG。CAG 启动于是 CMV 早期增强子和鸡β肌动蛋白启动子的融合体。

合适的启动子的一个例子为即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列为能够驱动可操作地连接至其上的任何多核苷酸序列高水平表达的强组成型启动子序列。合适的启动子的另一个例子为延伸生长因子-1α(EF-1α)。然而，也可使用其他组成型启动子序列，包括但不限于类人猿病毒 40(SV40)早期启动子、小鼠乳癌病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV 启动子、鸟类白血病病毒启动子、艾伯斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒即时早期启动子、鲁斯氏肉瘤病毒启动子、以及人基因启动子，诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红素启动子和肌酸激酶启动子。进一步地，本发明不应被限于组成型启动子的应用。诱导型启动子也被考虑为本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关，其能够当这样的表达是期望的时，打开可操作地连接诱导型启动子的多核苷酸序列的表达，或当表达是不期望的时关闭表达。诱导型启动子的例子包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素

启动子。

许多表达载体可应用 OPA1 蛋白在哺乳动物细胞(较佳地为人,更佳地为人视神经细胞或感光细胞)表达。本发明优选用腺相关病毒作为表达载体。

本发明还提供一种重组人Ⅱ型线粒体动力蛋白样 GTP 酶基因的重组应用腺相关病毒载体的构建方法,该方法能快速,简便地构建携带重组人Ⅱ型线粒体动力蛋白样 GTP 酶基因的重组腺相关病毒载体,并包装获得复杂缺陷腺相关病毒载体。

本发明还提供了一种宿主细胞,用于表达 OPA1 蛋白。优选地,所述宿主细胞为哺乳动物细胞(较佳地为人,更佳地为人视神经细胞或感光细胞),提高 OPA1 蛋白的表达量。

制剂和组合物

本发明提供一种制剂或组合物,所述制剂或组合物含有(a) 本发明第三方面所述的载体,以及(b)药学上可接受的载体或赋形剂。

在另一优选例中,所述药物制剂用于治疗眼部疾病。

在另一优选例中,所述药物制剂用于治疗遗传性视神经病变,较佳地为常染色体显性视神经萎缩(ADOA)。

本发明所述药物组合物中的“活性成分”是指本发明所述的载体(vector),例如病毒载体(包括腺相关病毒载体)。本发明所述的“活性成分”、制剂和/或组合物可用于治疗眼部疾病。“安全有效量”指的是:活性成分的量足以明显改善病情或症状,而不至于产生严重的副作用。“药学上可接受的载体或赋形剂(excipient)”指的是:一种或多种相容性固体或液体填料或凝胶物质,它们适合于人使用,而且必须有足够的纯度和足够低的毒性。“相容性”在此指的是组合物中各组份能和本发明的活性成分以及它们之间相互掺和,而不明显降低活性成分的药效。

组合物可以是液体或固体,例如粉末、凝胶或糊剂。优选地,组合物是液体,优选地可注射液体。合适的赋形剂将是本领域技术人员已知的。

在本发明中,所述载体可通过视网膜下或玻璃体内施用向眼睛施用。在任一种施用模式中,优选地,载体作为可注射液体被提供。优选地,可注射液体作为胶囊或注射器被提供。

药学上可以接受的载体部分例子有纤维素及其衍生物(如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素钠、纤维素乙酸酯等)、明胶、滑石、固体润滑剂(如硬脂酸、硬脂酸镁)、硫酸钙、植物油(如豆油、芝麻油、花生油、橄榄油等)、多元醇(如丙二醇、甘油、甘露醇、山梨醇等)、乳化剂(如吐温®)、润湿剂(如十二烷基硫酸钠)、着色剂、调味剂、稳定剂、抗氧化剂、防腐剂、无热原水等。

组合物可包含生理上可接受的无菌含水或无水溶液、分散液、悬浮液或乳液,和用于重新溶解成无菌的可注射溶液或分散液的无菌粉末。适宜的含水和非水载体、稀释剂、溶剂或赋形剂包括水、乙醇、多元醇及其适宜的混合物。

本发明提供的编码 OPA1 的核酸或融合核酸，可以体外或体内生产 OPA1 蛋白或 OPA1 融合蛋白，所述融合蛋白或者含所述融合蛋白的制剂可应用于制备治疗常染色体显性视神经萎缩(ADOA)的药物。

经优化的编码人Ⅱ型线粒体动力蛋白样 GTP 酶的核酸表达量更高，从而翻译出更多的 OPA1 蛋白，而优化后的 OPA1 蛋白中的 MIS 序列可以准确地将 GTP 功能蛋白进入到线粒体内，因此有更多的 GTP 酶转染到在线粒体中。将含有本发明核酸的药剂注入兔眼玻璃体腔中，该药剂在玻璃体腔内保持活力，并转染到视神经细胞。优化 OPA1 核酸编码比现有技术表达更多的 OPA1 蛋白，能较好地治疗常染色体显性视神经萎缩(ADOA)。

与现有技术相比，本发明主要具有以下优点：

1. 本发明重组人Ⅱ型线粒体动力蛋白样 GTP 酶(OPA1)编码基因序列进行了特殊优化，包括对 OPA1 中的 MIS 编码序列和 GTP 酶结构域编码序列的优化。与 OPA1 的未优化的 DNA 编码序列相比，表达量显著提高，更多的 OPA1 蛋白转染到在线粒体中。优化后的序列 OPA1 蛋白表达量显著提高、生物活性高。

2. 本发明优化的 OPA1 编码基因(SEQ ID NO.：1)或融合核酸能够非常有效地治疗常染色体显性视神经萎缩(ADOA)，并且安全性好。

3. 本发明提供了一种基于Ⅱ型线粒体动力蛋白样 GTP 酶基因失活的 ADOA 非人哺乳动物模型，所述模型表现出类似于常染色体显性视神经萎缩(ADOA)的病理表现，包括视网膜 ATP 含量降低和线粒体凋亡变化，可以用于常染色体显性视神经萎缩(ADOA)的实验研究、评估或筛药用途。

4. 本发明提供的 rAAV2-hOPA1 重组腺相关病毒对 ADOA 显性遗传视神经病点突变模型小鼠病理情况有明显而高效的改善效果，且能够提供持续的改善效果，单次给药 3 个月后能完全有效逆转模型小鼠中疾病的影响。

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

实施例 1 重组人Ⅱ型线粒体动力蛋白样 GTP 酶基因的重组腺相关病毒载体构建及其病毒包装纯化方法

1. 含有人Ⅱ型线粒体动力蛋白样 GTP 酶基因重组腺相关病毒载体的构建

1)载体构建

将特殊优化后的重组人Ⅱ型线粒体动力蛋白样 GTP 酶基因(SEQ ID NO：1)加 Kpn I

和 Sal I 两个酶切位点或者将以该新基因设计引物用 PCR 扩增的产物与 pSNaV 质粒载体，分别进行 Kpn I 和 Sal I 双酶切，回收酶切产物，T4 DNA Ligase 连接过夜，连接产物转化感受态细胞得到重组 pSNaV/ rAAV2/2-hOPA1 isoform 2(图 2)。

2)重组子的筛选和鉴定

取 37℃培养后的 LB 平板，出现蓝斑和白斑，其中白色为重组克隆。挑取白色的菌落加入到含有 Amp 100 mg/L 的 LB 液体培养基中，37℃，200rpm 培养 8h。培养好后取菌液，提取质粒，质粒提取步骤参照 Biomiga 说明书。取 1uL 质粒作为模板，所述特异性引物为：

1F: 5'-ATGTGGCGACTACGTCG-3'(SEQ ID NO.: 4)；

1R: 5'-TTATTTCTCCTGATGAAGAG-3'(SEQ ID NO.: 5)；

PCR 扩增程序

程序	1		2	
	温度	时间	温度	时间
预变性	95℃	3min	95℃	3min
变性	94℃	30s	94℃	30s
退火	60℃	30s	58℃	35s
延伸	72℃	60S	72℃	60S
修复延伸	72℃	8min	72℃	8min
循环数	25C		25C	

对 PCR 产物电泳检测，结果如图 3 所示，得到一个大小约 3000bp 左右的目的条带。鉴定结果表明该克隆中含有目的基因。

3)菌液保存及 PCR 扩增及其片段测序

吸取 1mL 经过鉴定的菌液与灭菌后的的甘油 1:3 比例混匀,于-80℃保存,进行菌液测序，将测序得到的序列与重组人Ⅱ型线粒体动力蛋白样 GTP 酶基因比对分析，成功得到序列正确的重组腺相关病毒质粒 pSNaV/rAAV2/2-hOPA1(图 4)。

2.rAAV2/2-hOPA1 isoform 2 重组腺相关病毒包被

1)转染前一天，将 293T 细胞接种于 225cm^2细胞培养瓶中，接种密度 3.0×10^7个/mL 细胞,培养基为 DMEM+10%牛血清，置 37℃含 5% CO_2的培养箱中培养过夜。

2)转染当天换液,用新鲜的含 10%牛血清的 DMEM 培养基继续培养。待细胞生长至 80～90%时，弃去培养基，用 PlasmidTrans II(VGTC)转染试剂盒进行转染。具体步骤为：

(a)每个转染瓶取 pAdHelper、pAAV-r2c5、pSNaV-hOPA1 质粒按要求比例与 DMEM+PlasmidTrans II(VGTC)(转染试剂)在 1.5mL 无菌 Ep 管中混匀，编号为 A 试剂，室温静止 10～15min；

(b)将 A 试剂同 30mL DMEM+10%牛血清混合均匀，编号 B 试剂；

(c)将 B 试剂均匀加入细胞培养瓶中，37℃含 5% CO_2的培养箱中继续培养；

(d)转染 16h 后，换完全培养基(DMEM+10%牛血清)。

3)转染 48h 后，收取细胞。

4)将收取细胞用 PBS 重悬，并反复冻融 3 次。

3.rAAV2/2-hOPA1 isoform 2 病毒的纯化与浓缩

采用氯仿处理-PEG/NaCl 沉淀-氯仿抽提三步来分离、浓缩和纯化 rAAV2/2-hOPA1 病毒。总回收率=终产物的病毒颗粒数/起始物的病毒颗粒数。

4.病毒纯度和滴度验证

灌制 SDS-PAGE 分离胶和积层胶,分离胶浓度为 10%。分别按每个加样孔加样 15μg。电泳完毕后用考马斯亮蓝染色，用相应的脱色液脱色直到显出低背景的、清晰的条带(图 5)。

结果如图 5 所示，VP1/VP2/VP3=1:1:10，条带清晰，比例正常，无可见杂带，纯度在 99%以上。

rAAV2/2-hOPA1 isoform 2 的滴度测定采用荧光定量 PCR 方法检测 rAAV2/2-hOPA1 isoform 2 的物理滴度。

实验材料:SYBRⅡ(takara)；目的片段引物(20uM)；包装病毒用目的质粒(已知浓度)；待测病毒；PCR 八联管(Bio-red)。

实验方法：模板 1ul，SYBRⅡ 7ul 引物 1 0.25ul，引物 2 0.25ul，加 nuclease-free 水到 14ul。

PCR 反应条件：预变性：95℃ 10min；循环：95℃ 15sec，60℃ 1min。

最终确定其基因组滴度为 1×10^{12}vg/mL。

实施例 2：rAAV2/2-hOPA1 重组腺相关病毒对 ADOA 显性遗传视神经病变的效果实验

1.兔眼玻璃体腔注射

取 24 只兔子分为 3 组,分为实验组 A、实验组 B 和对照组,分别吸取 50ul 1×10^{12}vg/mL 的 rAAV2/2-优化 hOPA1 isoform 2、rAAV2/2-原 hOPA1 isoform 2 和 rAAV-ZsGreen 在距角膜缘外 3mm 处穿刺睫状体平坦部进入玻璃体腔内，进行玻璃体腔注射。

2.裂隙灯、眼压、眼底照相检查

两组兔子分别于术后 1、3、7、30 天进行裂隙灯，眼压的检查。所有兔子均无明显异常，无结膜充血、分泌物，无眼内炎，眼压均无升高。术后一个月的眼底照相显示。

结果如图 6 所示，所有兔子的视网膜血管和视神经均无明显并发症或损害，表明正规标准的玻璃体腔注射不会发生明显的炎症反应或其他并发症。

3.视网膜的荧光照相

玻璃体腔注射 30 天后，ZsGreen 组(对照组)视网膜的荧光照相显示，GFP 成功在视网膜上表达，表明以 rAAV 为载体，携带 GFP 转染兔眼玻璃体内，证明 rAAV2/2-hOPA1 isoform 2 重组基因可以在视网膜上表达。

4.hOPA1 的免疫荧光检测

玻璃体腔注射 30 天后，剥离实验组 A、B 和对照组眼球，制成石蜡切片。石蜡切片置于 65℃烘箱中烘片 2h，脱蜡至水，用 PBS 冲洗三次，每次 5min。切片置于 EDTA 缓冲液中微波修复，中火至沸后断电，间隔 10min 低火至沸。自然冷却后 PBS 洗 3 次，每次 5min。切片放入 3%过氧化氢溶液，室温下孵育 10 min。PBS 洗 3 次，每次 5min，甩干后 5% BSA 封闭 20 min。去除 BSA 液，每张切片加入 50μl 稀释的一抗覆盖组织，4℃过夜。PBS 洗三次，每次 5min。去除 PBS 液，每张切片加 50μl-100μl 相应种属的荧光二抗，避光室温下孵育 50min-1h。避光 PBS 洗 3 次，每次 5min。去除 PBS 液。每张切片加 50-100μl DAPI 避光染核 5 min。PBS 洗 3 次，每次 5min。切片稍干后用抗荧光淬灭封片剂封片，4℃避光保存待拍照。

视网膜抗 hOPA1 的免疫荧光结果如图 7 所示，实验组 A 的荧光强度显著高于实验组 B 的，存在显著差异，提高了一倍以上。表明实验组 A 视网膜上的 hOPA1 表达量明显高于对照组和实验组 B。

5.OCT 检测

结果显示实验组 A 和实验组 B 的视网膜神经纤维层厚度分别为 67.55 μm 和 66.00 μm，无明显差别(P＞0.05，图 8)。

6.HE 检测

HE 结果显示实验组和对照组的视网膜神经节细胞数量基本一样，且结构完整，表明 rAAV-hOPA1 重组基因是安全的，没有对视网膜造成损伤(图 9)。

7.Real-Time PCR 检测 hOPA1 的表达

首先用 NCBI 的保守结构域分析软件分析 hOPA1 的保守结构，确保所设计引物的扩增片段位于非保守区；然后根据荧光定量 PCR 的引物设计原则，用 primer premier 5 设计引物：

兔-actin-F：CCTTCTACAACGAGCTGCGC (SEQ ID NO.: 6)

兔-actin-R：TACAGGGACAGCACGGCC (SEQ ID NO.: 7)

原 hOPA1-F：TTAGGTTATTTTGCTGTTGT (SEQ ID NO.: 8)

原 hOPA1-R：TTGTAGTCACTTGGTGTGCC (SEQ ID NO.: 9)

优化 hOPA1-F：CTGGGCTACTTCGCCGTGGT (SEQ ID NO.: 10)

优化 hOPA1-R：GGGTGGTCACCTGGTGGGCC (SEQ ID NO.: 11)

1)提取 RNA、反转录

利用 TRIZOL 试剂盒提取不同实验组兔子视网膜的总 RNA 并反转录合成 cDNA 模板。

2)荧光定量 PCR 的反应体系和反应程序

在 Real-time PCR Detection System 仪器上进行荧光定量 PCR。在 0.2mL 的 PCR 反应管中加入 SYBR Green mix 12.5μL、ddH2O 8μL，一对引物各 1μL，cDNA 样品 2.5μL，总体系 25μL。每个样品既要用于扩增目的基因又要扩增内参基因兔-actin，各个基因的扩增都做三个重复。实际加样时，为减小误差，各 PCR 反应管中共有的试剂可加在一起然后分装。加样完毕，进行荧光定量 PCR。

按照 95℃预变性 1s，94℃变性 15s，55℃退火 15s，72℃延伸 45s，共 40 个循环的反应程序进行扩增，并于每个循环的延伸阶段采集荧 光信号。反应结束后做 94℃～55℃的融解曲线分析。

采用 2-△△CT 相对定量方法(Livak 等，2001)研究基因表达量的差异，该方法无需制作标准曲线，以看家基因兔-actin 为内参基因，仪器自带的分析软件即可自动生成表达数值。

结果如图 10 所示，实验组 A、实验组 B 的 hOPA1 基因 mRNA 的相对表达量均比对照组的 hOPA1 基因相对表达量高，实验组 A 的 mRNA 的水平相对表达水平比实验组 B 略高。

8.Western blot 检测 hOPA1 蛋白的表达

分离不同实验组的家兔眼球的视网膜，按 100μL/50mg 组织加入对应体积的 RIPA 裂解液，匀浆器匀浆后离心收取上清。BCA 法测定蛋白浓度后，按总蛋白 50μg 计算实验组和对照组上样体积，进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western blot。抗体孵育后进行 ECL 显影。

结果如图 11 所示，蛋白质印迹的实验组 A 的 hOPA1 相对表达水平明(1.13)明显高于实验组 B(0.19)和对照组(0.05)，有显著差异 P＞0.05，表明，实验组 A 视网膜上 hOPA1 的表达水平明显提高，相对于实验组 B 和对照组分别提高了约 5 倍和 22 倍。

实施例 3：rAAV2-hOPA1 重组腺相关病毒对 ADOA 显性遗传视神经病变的长期效果实验

1.小鼠眼玻璃体腔注射

野生型C57BL/6J小鼠玻璃体腔给药，小鼠随机分组，2只/笼，给药rAAV2/2-OPA1浓度2E11vg/ml体积1μL，玻璃体下注射。分为给药后7天组、15天组、20天组、30天组、45天组、60天组、90天组。到期后处死不同组别的小鼠，获取眼球样本，进行相关的检测分析。

2.Real-Time PCR检测hOPA1的表达

如实施例2中所述的方法和步骤，进行总RNA的提取、RNA浓度测定及电泳鉴定、反转录和Real-Time PCR鉴定。

其中，所用引物序列为：

Primer F：CTTTAGGTTATTTTGCTGTTGT(SEQ ID NO.:12)

Primer R：TTGTAGTCACTTGGTGTGCC(SEQ ID NO.:13)

所用反应条件为：按照95℃预变性3min，95℃变性10s，60℃退火15s，72℃延伸25s，共40个循环的反应程序进行扩增，并于每个循环的延伸阶段采集荧光信号。反应结束后做95℃～60℃的融解曲线分析。

采用2-△△CT相对定量方法(Livak等，2001)研究基因表达量的差异，该方法无需制作标准曲线，以看家基因actin为内参基因，仪器自带的分析软件即可自动生成表达数值。

结果如图11所示，使用rAAV2-OPA1病毒玻璃体腔注射小鼠眼球，RT-PCR检测到目的基因在7天、15天、20天、30天、45天、60天、90天均高于给药前水平，且第20-30天前后表达量最高。

实施例4 ：ADOA显性遗传视神经病模型小鼠的构建与鉴定

1.利用CRISPR/Cas9技术进行小鼠OPA1 Q285Stop点突变，突变外显子为exon8(高度保守的GTPase区(外显子 8—16))。在突变位点设计以NGG结尾的靶点，在CRISPR/Cas9作用下进行切割，体外构建约120bp的donor，外源donor以同源重组方式插入到切割位点。设计guideRNA，OPA1结构和设计策略如图12所示。

其中：编码区(大写)，非编码区(**黑体**)，内含子区(小写)；

ttgcactgcagccttcccagttcttaggctgcgtaagctctcttgcttgaacactgaccctgaccacttctctactc
tgttccaggctctcacacgcccgtgctcccagcctgctcttacacgcatgcgctccctgcctaatactccttcccct
tcttctctgttctcacagagcctagtcttggcagagtgtgatttctctgttagttggtcacctgacagtgtatttga
ctcttatggtgttaatggttaactcattaatgttataggctttctcttttactgtctaactagattatgaaatcct
aaattaataaataaactgaagaagtagcattaattcttatactagttttactatgaaaacatatagtaagaaaaaaa
caatgcaaatttgaatgtatctacattttctcttcatgtatctgtggtctttgttttattttcactgacttttgcta
attttaatttttttgcagAAATCTTTGATTGATATGTATTCTGAAGTTCTTGATGTTCTTTCTGATTATGATGCCA
GTTACAATACA***C****AA*GATCACCTACCACGGgtaaggggaaaatagaccaggacctgctgtcagcaggaaagttcttt
ccttgtgtcatagtaatttctgtatttcccatgatacctcagatacaaagcattgcttcgttccttattttggagac
cataaaagcaaatatatatgttttggaagaaaaatgtcagatatttgccattatacattcattatagtgttaaaata
cctaggcaaaaactgtaaacgtttggatgaaatttagtctaacagaatccaaaagtatgtttgtaaaatgtaaactg
gttatggaaaatatttgtggaaagttaatgatctggttttagaaataactttcaattggcatagttttcaaaacaaa
aatttgaatgtaaatagtggagccaattaattcttttgctatatgtatctccagagtacctacatgcatcaaacttc
attctttcaaaaaaaaaagaaaacaaacaaacaaacactttttttggctctaaatatcttaaaatatgttttaaatg
ataacattcaaaccctacatacatttaatttggtatcagaagagaactaatgtatgctccttgtcttgtgatag(SE
Q ID NO.: 14)

OPA1(Q285*)-sgRNA1：ATACA***C****AA*GATCACCTACCACGG(SEQ ID NO.:15)

OPA1(Q285*)-sgRNA2：CCAGTTACAATACACAAGATCAC(SEQ ID NO.:16)

OPA1(Q285*)-120bp oligo:

TTGATATGTATTCTGAAGTTCTTGATGTTCTTTCTGATTATGATGCCAGTTACAATACA*TAA*GATCACCT ACCACGGgtaaggggaaaatagaccaggacctgctgtcagcaggaaagtt(SEQ ID NO.: 17)

2.ADOA显性遗传视神经病模型小鼠的构建

(1)利用 CRISPR-CAS9 技术，构建 OPA1 Q285Stop 点突变重组质粒，并用筛选标记的同源突变 DNA 序列替换，得到 OPA1 Q285Stop 点突变阳性单克隆胚胎干细胞；

(2) 利用步骤(1)中得到的 OPA1 点突变小鼠胚胎干细胞克隆株，制备得到嵌合小鼠；

(3) 将步骤(2)中得到的嵌合小鼠和正常野生型小鼠交配繁育，在后代中筛选获得 OPA1 点突变的杂合子小鼠；

(4) 通过将步骤(3)中得到的杂合子小鼠相互交配获得OPA1 Q(谷氨酰胺)285Stop点突变的纯合子小鼠，从而得到OPA1 Q(谷氨酰胺)285Stop点突变小鼠模型。

3.ADOA显性遗传视神经病点突变模型小鼠的鉴定

3.1 基因组DNA提取

(1)消化：小鼠出生约一周内，剪取0.5cm小鼠脚趾，放入1.5ml EP管中，稍离心后加入500ul裂解液(配方：100mM Tris pH8.0，5mM EDTA pH8.0，0.5% SDS，NaCl 1.17g/100ml)、0.5ul蛋白酶K(浓度：20mg/ml，溶解在pH7.4，20mM Tris和1mM $CaCl_2$中，50%甘油缓冲液，-20℃保存)，混匀55℃水浴消化过夜；

(2)异丙醇沉淀抽提DNA：

1) 从水浴锅中取出离心管，在室温静置10-15min，使样品温度降至室温，将离心管颠倒混匀。13000rpm，室温离心15min。

2) 吸取400μl上清至另一个新的离心管中。加入等体积的异丙醇，立即温和地上下翻转，充分混匀，此时会出现白色絮状沉淀，室温下12000rpm离心10min，弃上清。

3) 往离心管中加入700μl冰冷的75%乙醇漂洗，温和地上下翻转混匀。12000rpm，室温离心5min，将上清液全部吸除。

4) 将离心管倒置在吸水纸上，以吸干乙醇。风干后用无菌ddH2O，50ul溶解DNA，55℃溶解2h(如不立即使用，-20℃保存)。

5) 检测DNA的浓度，取100-200 ng的DNA用做PCR模板。

3.2 引物与PCR反应

合成一引物对，从而通过PCR扩增获得包含Q285位点的核酸扩增产物(长度为530bp)。

3.3 鉴定结果

提取小鼠的总DNA，对PCR产物进行测序。

结果如图13所示，显示285位的碱基C变成T，点突变小鼠制备成功。

实施例 5：rAAV2-hOPA1 重组腺相关病毒对 ADOA 显性遗传视神经病点突变模型小鼠

的改善实验

1.方法

取OPA1突变鼠2只/笼，分为3组，rAAV-OPA1浓度为2E11vg/ml给药体积1μL，玻璃体下注射。1月和3月后处死不同组别的小鼠，获取眼球样本，OPA突变组，玻璃体下注射1μL PBS，取野生鼠2只/笼，玻璃体下注射1μL PBS作为对照组，进行ATP含量变化和线粒体形貌观察的检测分析。

2.高效液相HPLC检测给药后小鼠视网膜ATP含量变化

2.1 取野生型和给药后OPA1突变鼠取视网膜，预冷PBS洗一遍，置于液氮中

2.2 ATP提取

(1)液氮研磨

(2)加入1 ml冰的酚-TE(含DTT)，加入200 μl氯仿，150μl超纯水，震荡混匀，20s，4℃，10000g离心10min

(3)取200μl水相，0.22μm滤膜过滤，HPLC上机检测ATP

(4)BCA法测定蛋白浓度

2.3 色谱分析方法

色谱柱：Sepax GP-C18, (4.6mm×250mm, 5μm)

流动相A：15mM KH2PO4、15mM KCL，使用0.1M的KOH调PH为6.0

流动相B：85%的流动相A与15%的乙腈混合

上样体积：20μl

检测波长：254nm

梯度洗脱条件：

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	流速
0	100	0	0.54 ml/min
0.28	97	3	0.54 ml/min
9.72	91	9	0.54 ml/min
13.89	0	100	0.54 ml/min
19.44	0	100	0.54 ml/min
33	100	0	0.54 ml/min
40	100	0	0.54 ml/min

结果如图14所示，HPLC检测发现对照组OPA1突变鼠中ATP含量降低，而使用rAAV2-OPA1病毒玻璃体腔注射小鼠眼球的实验组，给药后含量升高至正常水平，说明OPA1给药后可以恢复ATP含量。

由图14中可以看出，给药1个月和给药3个月，小鼠眼球ATP含量随时间而升高，直至给药后3个月OPA1突变鼠的眼球ATP含量与野生型小鼠眼球ATP含量相当，提示使用

rAAV2-OPA1病毒有效逆转了疾病的发生。

3.透射电镜TEM观察线粒体形貌

小鼠眼球取材后分别浸入2.5% 的戊二醛中,固定过夜,0.1 mol/ L 磷酸缓冲液清洗3次, 每次 15min, 锇酸固定 2h, 0. 1 mol/ L 磷酸缓冲液清洗 3 次, 每次 15 min, 用乙醇(50%、70%、80%、90%、100%)梯度脱水，然后过度到纯丙酮，纯丙酮脱水2 次。每步15分钟。812 树脂：丙酮 按3:1、3：2、3：3 梯度渗透每步40分钟,然后纯包埋剂 45°C包埋过夜，60°C 聚合, 切片, 染色, 透射电子显微镜观察。

结果如图15所示，TEM电镜观察到OPA1突变鼠中线粒体嵴消失，提示凋亡发生。而在给药1个月后观察到OPA1突变鼠中线粒体嵴的恢复，3个月有显著恢复，提示使用rAAV2-OPA1病毒有效逆转了疾病的发生。

讨论

随着基因治疗在眼部疾病治疗上的快速发展，治愈ADOA也将不是难事。因为人眼与兔眼的解剖和体积相似，本发明以兔子眼睛为模型进行rAAV2/2-hOPA1 isoform 2的玻璃体腔注射。本实验研究注射剂量，安全水平，术后并发症，为未来的临床试验提供重要的参考。所有兔子的裂隙灯，眼压的检查，均无明显异常，无结膜充血、分泌物，无眼内炎，眼压均无升高。术后一个月的眼底照相显示，所有兔子的视网膜血管和视神经均无明显并发症或损害。表明本实验是安全的。

免疫荧光、实时定量PCR和Western blot的结果可以证明hOPA1能稳定地表达于兔子的视网膜上。因为 ADOA 的病变会引起视盘周围的的视网膜神经节细胞凋亡，rAAV-ZsGreen 组的视网膜切片能够检测到视盘周围的视网膜有稳定的荧光表达。hOPA1的荧光染色结果可以说明其能够到达视网膜神经节细胞中，表明 rAAV2/2-hOPA1 isoform 2能到达病人眼中病变的区域。眼底照相、OCT的结果显示单次玻璃体腔注射 5×10^{10} vg/mL rAAV2/2-hOPA1 isoform 2是安全的，并且没有视网膜毒性，能被应用在未来的临床试验。

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

权 利 要 求

1. 一种核苷酸序列，其特征在于，所述核苷酸序列编码人II型线粒体动力蛋白样GTP酶，且所述核苷酸序列包括一种或多种选自下组的核苷酸序列：

(a) 所述核苷酸序列如SEQ ID NO.：1所示；

(b) 所述核苷酸序列与SEQ ID NO.：1所示的核苷酸序列有≥95%相同性，优选地≥98%，更优选地≥99%；

(c) 所述核苷酸序列如SEQ ID NO.：2所示；和

(d) 所述核苷酸序列与SEQ ID NO.：2所示的核苷酸序列有≥95%相同性，优选地≥98%，更优选地≥99%。

2. 如权利要求1所述的核苷酸序列，其特征在于，所述的核苷酸序列如SEQ ID No.：1所示。

3. 一种融合核酸，其特征在于，所述融合核酸包含如权利要求1所述的核苷酸序列。

4. 如权利要求3所述的融合核酸，其特征在于，所述融合核酸从5'端-3'端具有式I结构：

Z1-Z2-Z3 (I)

式中，

各“-”独立地为键或核苷酸连接序列；

Z1为无、或5'-UTR序列；

Z2为如权利要求1所述的核苷酸序列；和

Z3为3'-UTR序列。

5. 一种载体，其特征在于，所述载体含有如权利要求1所述的核苷酸序列或权利要求3所述的融合核酸。

6. 如权利要求4所述的载体，其特征在于，所述载体选自质粒或病毒载体，较佳地选自慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体或其组合。

7. 如权利要求6所述的载体，其特征在于，所述载体为AAV载体，血清型选自AAV2、AAV5、AAV7、AAV8、或其组合。

8. 如权利要求7所述的载体，其特征在于，所述载体为插入所述的核苷酸序列或所述的融合核酸的AAV载体。

9. 如权利要求5所述的载体，其特征在于，所述载体选自DNA病毒载体或逆转录病毒载体。

10. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞含有权利要求5所述的载体，或其染色体中整合有外源的如权利要求1所述的核苷酸序列或权利要求3所述的融合核酸。

11. 如权利要求10所述的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞选自下组：293T细胞、感光细胞(包括锥状细胞和/或杆状细胞)、其他视觉细胞(如双节细胞)、(视)神经

细胞、或其组合。

12. 如权利要求 5-9 中任一所述的载体的用途，其特征在于，用于制备一制剂或组合物，所述制剂或组合物用于恢复受试者视力和/或治疗眼部疾病。

13. 一种药物制剂，其特征在于，所述的制剂含有(a)权利要求 5-9 中任一所述的载体，以及(b)药学上可接受的载体或赋形剂。

14. 如权利要求 13 所述的药物制剂，其特征在于，所述药物制剂的剂型选自下组：冻干制剂、液体制剂或其组合。

15. 如权利要求 13 所述的药物制剂，其特征在于，药物制剂中，(a)载体的含量为 1×10^{9}-1×10^{16} 个病毒/毫升，较佳地 1×10^{11}-1×10^{13} 个病毒/毫升，更佳地 2×10^{11}-1×10^{12} 个病毒/毫升。

16. 如权利要求 13 所述的药物制剂的用途，其特征在于，用于治疗眼部疾病，较佳地治疗视网膜神经节细胞凋亡。

17. 如权利要求 13 所述的药物制剂的用途，其特征在于，用于治疗遗传性视神经病变，较佳地常染色体显性视神经萎缩(ADOA)。

18. 一种长期提高线粒体动力蛋白样 GTP 酶的表达和/或活性的方法，所述方法：包括导入权利要求 5-9 所述的载体，和/或施用权利要求 13-15 所述的药物制剂。

19. 一种治疗方法，其特征在于，所述方法包括将权利要求 5-9 中任一所述的载体施用于需要的对象。

20. 一种重组人Ⅱ型线粒体动力蛋白样 GTP 酶的制备方法，其特征在于，包括步骤：培养权利要求 10 所述的宿主细胞，从而得到重组人Ⅱ型线粒体动力蛋白样 GTP 酶。