

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-509909

(P2018-509909A)

(43) 公表日 平成30年4月12日 (2018. 4. 12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 5/10 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 4
<b>C 1 2 N 1/21 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 6
<b>C 1 2 N 1/19 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 7
<b>C 1 2 N 5/0793 (2010. 01)</b>	C 1 2 N 5/0793	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 68 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-548954 (P2017-548954)	(71) 出願人	500039463
(86) (22) 出願日	平成28年3月18日 (2016. 3. 18)		ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバ
(85) 翻訳文提出日	平成29年10月18日 (2017. 10. 18)		ーシテイ・オブ・テキサス・システム
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/023095		アメリカ合衆国 テキサス 78701,
(87) 国際公開番号	W02016/149599		オースティン, ウェスト 7ティーエイチ
(87) 国際公開日	平成28年9月22日 (2016. 9. 22)		ストリート 210
(31) 優先権主張番号	62/261, 821	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成27年12月1日 (2015. 12. 1)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	62/135, 470		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成27年3月19日 (2015. 3. 19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/149, 812		
(32) 優先日	平成27年4月20日 (2015. 4. 20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 陰イオンチャネルロドプシンの組成物及び使用方法

## (57) 【要約】

高感受性で高効率の陰イオン伝導チャネルロドプシンである、藻類由来の新クラスのロドプシンの特定及び特徴決定に用いられる方法及び組成物。これらの陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインは、クローン化され、哺乳類系で発現しており、したがってとりわけ光遺伝学的用途に、及び電気的活性のある細胞が媒介する障害の治療剤として、使用することができる。本明細書で説明するのは、光開閉型の塩素イオン伝導により、高感受性で高効率の膜過分極及び神経細胞のサイレンシングを提供する、光開閉型陰イオンチャネルの新ファミリー、陰イオンチャネルロドプシン (ACR) である。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

異種プロモーター配列に機能的に連結された組換え核酸であって

(a) 配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 85% の同一性を有するペプチドをコードする配列；または

(b) 配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 から選択される連続する 225 アミノ酸を含むペプチドをコードする配列；または

(c) 配列番号 2、配列番号 4 またはその相補のヌクレオチド配列にハイブリダイズする配列

を含んでいる、前記組換え核酸。

10

**【請求項 2】**

発現ベクターを含んでいる、請求項 1 に記載の組換え核酸。

**【請求項 3】**

請求項 1 に記載の組換え核酸を含んでいる、組換え宿主細胞。

**【請求項 4】**

前記宿主細胞は単離されたヒト細胞である、請求項 3 に記載の組換え宿主細胞。

**【請求項 5】**

前記宿主細胞は非ヒト哺乳類細胞である、請求項 3 に記載の組換え宿主細胞。

**【請求項 6】**

前記宿主細胞は細菌細胞である、請求項 3 に記載の組換え宿主細胞。

20

**【請求項 7】**

前記宿主細胞は酵母細胞である、請求項 3 に記載の組換え宿主細胞。

**【請求項 8】**

前記宿主細胞は昆虫細胞である、請求項 3 に記載の組換え宿主細胞。

**【請求項 9】**

前記宿主細胞は植物細胞である、請求項 3 に記載の組換え宿主細胞。

**【請求項 10】**

前記宿主細胞は単離された神経細胞である、請求項 3 に記載の組換え宿主細胞。

**【請求項 11】**

前記宿主細胞は単離された電気的活性のある細胞である、請求項 3 に記載の組換え宿主細胞。

30

**【請求項 12】**

神経細胞が媒介する障害に罹患している対象の細胞の膜過分極の方法であって、

(a) 前記対象の前記細胞に、前記細胞内で発現可能な、陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする配列番号 1、配列番号 3、及び配列番号 13 からなる群より選択される配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを送達すること；及び

(b) 前記ベクターを前記細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシン発現によって前記神経細胞からのシグナルがサイレンシングされる、前記方法。

**【請求項 13】**

40

神経細胞が媒介する障害に罹患している対象の神経細胞サイレンシングの方法であって、

(a) 前記対象の標的神経細胞に、前記標的神経細胞内で発現可能な、陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする配列番号 1、配列番号 3、及び配列番号 13 からなる群より選択される配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを送達すること；及び

(b) 前記ベクターを前記標的神経細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシン発現の結果として前記標的神経細胞からのシグナルのサイレンシングが生じる、前記方法。

**【請求項 14】**

失明または盲目に罹患している対象の網膜の感光性を回復させる方法であって、

50

(a) 前記対象の網膜に、網膜神経細胞内で発現可能な、陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする配列番号 1、配列番号 3、及び配列番号 13 からなる群より選択される配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを送達すること；及び

(b) 前記ベクターを前記網膜神経細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシン発現により前記網膜神経細胞で高レベルの膜電位が得られる、前記方法。

【請求項 15】

(a) 前記対象の細胞にロドプシンドメインをコードする発現ベクターを送達することであって、前記ベクターは、配列番号 1、配列番号 3 及び配列番号 13 から選択される陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードしプロモーター配列に機能的に連結されたオープン読み枠を含む、前記送達すること；及び

(b) 前記ベクターを前記細胞で発現させることが含まれ、ロドプシン発現により前記細胞で高レベルの膜電位が得られる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 16】

ステップ c) で、配列番号 2 またはその相補のヌクレオチド配列にハイブリダイズした前記配列は、さらに、フィルター結合 DNA への 0.5 M NaHPO<sub>4</sub>、7% ドデシル硫酸ナトリウム、1 mM EDTA 中 65 °C でのハイブリダイゼーション、及び 0.2 × SSC / 0.1% SDS 中 42 °C での洗浄を含む、請求項 1 に記載の組換え核酸。

【請求項 17】

前記対象は哺乳類である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 18】

前記対象はヒトである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 19】

前記送達することには、製薬上許容される担体が含まれる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 20】

配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 を含むアミノ酸配列をコードする核酸配列を含んでいる、cDNA 由来核酸。

【請求項 21】

配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 14 ~ 15 の核酸配列を含んでいる、請求項 19 に記載の cDNA 由来核酸。

【請求項 22】

請求項 19 に記載の cDNA 由来核酸を含んでいる、発現ベクター。

【請求項 23】

電気的活性のある細胞が関与する障害に罹患している対象の電気的活性のある細胞の障害を治療する方法であって、

(a) 前記対象の前記細胞に、前記細胞内で発現可能な、配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 13 からなる群より選択される配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを送達すること；及び

(b) 前記ベクターを前記電気的活性のある細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシン発現によって前記電気的活性のある細胞からのシグナルがサイレンシングされる、前記方法。

【請求項 24】

電気的活性のある細胞が関与する障害に罹患している対象の電気的活性のある細胞の障害を治療する方法であって、

(a) 前記対象に、遺伝子導入細胞内で発現可能な、配列番号 1、配列番号 3、及び配列番号 13 からなる群より選択される配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む前記遺伝子導入細胞を送達すること；及び

(b) 前記ベクターを前記遺伝子導入細胞内で発現させることが含まれ、発現によって電気的活性のある細胞からのシグナルがサイレンシングされる、前記方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 25】

電氣的活性のある細胞が媒介する障害に罹患している対象の電氣的活性のある細胞のサイレンシングの方法であって、

(a) 前記対象の標的神経細胞に、前記標的神経細胞で発現可能な陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする配列番号1、配列番号3及び配列番号13からなる群より選択される配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを送達すること；及び

(b) 前記ベクターを前記標的電氣的活性のある細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシン発現の結果として前記電氣的活性のある細胞からのシグナルのサイレンシングが生じる、前記方法。

10

## 【請求項 26】

配列番号15～24の配列と少なくとも約90%同一である配列を有する陰イオン伝導チャネルロドプシンをコードする配列を含んでいる、単離された核酸分子。

## 【請求項 27】

配列番号15～24の配列と少なくとも約95%同一である配列を有する配列を含んでいる、請求項26に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 28】

前記核酸はDNAである、請求項26に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 29】

前記核酸はRNAである、請求項26に記載の単離された核酸分子。

20

## 【請求項 30】

前記核酸はmRNAである、請求項29に記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 31】

請求項26に記載の核酸分子を含んでいる、発現ベクター。

## 【請求項 32】

請求項26に記載の核酸を含んでいる、組換え宿主細胞。

## 【請求項 33】

前記宿主細胞は単離されたヒト細胞である、請求項32に記載の組換え宿主細胞。

## 【請求項 34】

前記宿主細胞は非ヒト哺乳類細胞である、請求項32に記載の組換え宿主細胞。

30

## 【請求項 35】

前記宿主細胞は細菌細胞である、請求項32に記載の組換え宿主細胞。

## 【請求項 36】

前記宿主細胞は酵母細胞である、請求項32に記載の組換え宿主細胞。

## 【請求項 37】

前記宿主細胞は昆虫細胞である、請求項32に記載の組換え宿主細胞。

## 【請求項 38】

前記宿主細胞は植物細胞である、請求項32に記載の組換え宿主細胞。

## 【請求項 39】

前記宿主細胞は単離された神経細胞である、請求項32に記載の組換え宿主細胞。

40

## 【請求項 40】

前記宿主細胞は単離された電氣的活性のある細胞である、請求項32に記載の組換え宿主細胞。

## 【請求項 41】

電氣的活性のある細胞が関与する障害に罹患している対象を治療する方法であって、前記対象の前記電氣的活性のある細胞の部位で有効量の陰イオン伝導チャネルロドプシンを発現させることが含まれる、前記方法。

## 【請求項 42】

前記対象は神経因性疼痛を抱えており、前記対象の前記疼痛の部位で有効量の陰イオン伝導チャネルロドプシンを発現させることが含まれる、請求項41に記載の方法。

50

**【請求項 4 3】**

前記発現させることには、陰イオン伝導チャネルロドプシンを前記対象に投与することが含まれる、請求項 4 1 に記載の方法。

**【請求項 4 4】**

前記陰イオン伝導チャネルロドプシンは、さらに、細胞透過性ペプチド (C P P) 配列または細胞受容体結合配列を含んでいる、請求項 4 3 に記載の方法。

**【請求項 4 5】**

前記発現させることには、陰イオン伝導チャネルロドプシンをコードするベクターを前記対象に投与することが含まれる、請求項 4 1 に記載の方法。

**【請求項 4 6】**

前記ベクターは R N A ベクターである、請求項 4 5 に記載の方法。

**【請求項 4 7】**

前記ベクターは D N A ベクターである、請求項 4 5 に記載の方法。

**【請求項 4 8】**

前記陰イオン伝導チャネルロドプシンをコードしている前記配列は、異種プロモーターに機能的に連結されている、請求項 4 7 に記載の方法。

**【請求項 4 9】**

前記プロモーターは、誘導性または抑制性プロモーターである、請求項 4 8 に記載の方法。

**【請求項 5 0】**

前記プロモーターは、組織または細胞型に特異的なプロモーターである、請求項 4 8 に記載の方法。

**【請求項 5 1】**

前記プロモーターは、神経細胞に特異的なプロモーターである、請求項 5 0 に記載の方法。

**【請求項 5 2】**

前記ベクターは、プラスミド、ウイルスベクターまたはエピソームベクターである、請求項 4 7 に記載の方法。

**【請求項 5 3】**

前記ベクターは、さらに、自殺遺伝子の誘導性発現カセットを含んでいる、請求項 4 7 に記載の方法。

**【請求項 5 4】**

前記対象は、四肢のどれかが切断されているか、糖尿病もしくは多発性硬化症があるか、または手術を受けたことがある、請求項 4 1 に記載の方法。

**【請求項 5 5】**

前記陰イオン伝導チャネルロドプシンは、配列番号 1、3 または 1 3 の配列と少なくとも約 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含んでいる、請求項 4 1 に記載の方法。

**【請求項 5 6】**

前記陰イオン伝導チャネルロドプシンは、配列番号 2、4 または 1 4 ~ 1 7 の配列と約 9 0 % 同一である配列によってコードされている、請求項 4 5 に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】**

本出願は、2 0 1 5 年 3 月 1 9 日に出願された米国特許仮出願第 6 2 / 1 3 5 , 4 7 0 号、2 0 1 5 年 4 月 2 0 日に出願された同第 6 2 / 1 4 9 , 8 1 2 号、及び 2 0 1 5 年 1 2 月 1 日に出願された同第 6 2 / 2 6 1 , 8 2 1 号の優先権を主張するものであり、それらの内容を参照により本明細書に援用する。

**【0 0 0 2】**

本発明は、国立衛生研究所の交付番号 R 3 7 G M 0 2 7 7 5 0、R 2 1 M H 0 9 8 2 8 8、S 1 0 R R 0 2 2 5 3 1 として米国政府の助成を受けてなされた。米国政府は本発明

10

20

30

40

50

に対し一定の権利を有する。

【0003】

本開示は、広くは、藻類由来のチャネルロドプシンを用いる方法及び組成物に関し、詳細には、光遺伝学的用途にまたは治療剤として使用される新規の特徴を有する陰イオン伝導チャネルロドプシンに関する。

【背景技術】

【0004】

光遺伝学 (Deisseroth, Nat Methods 8 (1): 26-9, 2011) は、光学的方法を利用して、インタクトな神経回路内で遺伝子標的である神経細胞を調査し制御することに関する。光遺伝学には光活性化チャネル及び酵素の導入が含まれ、特異的標的化メカニズムを用いることで細胞型の解像度を維持しながらミリ秒の高精度で神経活動の操作が可能になる。脳は高速系なので、ミリ秒スケールの時間精度は光遺伝学的の中心概念であり、そのおかげで所与の細胞における特定の活動電位パターンの原因的役割の調査が可能になっている。

【0005】

緑鞭毛藻の運動挙動の光制御 (走光性及び羞明応答) は、原核生物の走光性受容体や光開閉型イオン輸送体に相同である感覚性ロドプシンが媒介している。走光性過程では、藻類の感覚性ロドプシンが興奮すると、膜貫通光受容体電流が発生する。動物細胞で発現すると、藻類の走光性受容体は、光開閉型陽イオンチャネルとして機能する。これは「チャネルロドプシン」と命名されている。チャネルロドプシンは、細胞活性を光制御するための有用な分子ツールとなっている。

【0006】

これらの光活性化チャネル及び酵素のそもそもの供給源は、数種の微生物オプシンであり、これには藻類由来のチャネルロドプシン-2 (ChR2) 単成分光活性化陽イオンチャネルも含まれ、これは哺乳類におけるミリ秒スケールの時間的制御を可能にし、1つの遺伝子を発現させるだけで作用し、哺乳類脳組織からChR2に補給される既存の発色団 (レチナール) により可視スペクトル光にも応答した。ChR2の実験的な活用性は、挙動する哺乳類から、ハエ、ミミズ、ゼブラフィッシュといった古典的なモデル生物まで、あらゆる動物モデルにおいてたちまち証明され、数百のグループがChR2及び近縁微生物タンパク質を使って神経回路を研究している。現在、このファミリーのいくつかのメンバーが光遺伝学の分子ツールとして、すなわち細胞活性の光調節に使用されている。緑 (緑藻植物) 鞭毛藻類 (6) の走光性受容体は、チャネルロドプシン (ChR) として最もよく知られており、光開閉型陽イオンチャネルとしての機能のおかげで、遺伝子的標的の興奮性細胞集団の脱分極に広く用いられている。

【0007】

過分極ロドプシンイオンポンプは、神経細胞発火を抑制するのに用いられているが、捕捉光子当たり1つしか電荷を輸送しないので、能力に限界がある。最近、ChRは遺伝子操作によりCl<sup>-</sup>を伝導するようになったが、これらの光遺伝学的ツールには多少の陽イオン伝導性が残存しているので、さらに変異を加えて高い光感度を得られたとしても、チャネルの動態 (kinetics) はかなり減速されよう (J. Wietek et al., Science 344, 409 (2014) 及び A. Berndt, S. Y. Lee, C. Ramakrishnan, K. Deisseroth, Science 344, 420 (2014))。光遺伝学的過分極の理想は、高い伝導性を有し陰イオン選択性となるような進化により最適化された天然の光開閉型陰イオンチャネルである。

本明細書で説明するのは、新たに特定されたクラスのチャネルロドプシン、陰イオンチャネルロドプシン (ACR) 由来の修飾され最適化されたロドプシンドメイン、光開閉型陰イオンチャネルであり、光開閉型の塩素イオン伝導により、高感受性で高効率の膜過分極及び神経細胞サイレンシングを提供するものである。

【先行技術文献】

10

20

30

40

50

## 【非特許文献】

## 【0008】

【非特許文献1】Deisseroth, Nat Methods 8 (1): 26-9, 2011

【非特許文献2】J. Wietek et al., Science 344, 409 (2014)

【非特許文献3】A. Berndt, S. Y. Lee, C. Ramakrishnan, K. Deisseroth, Science 344, 420 (2014)

## 【発明の概要】

10

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本開示の方法及び組成物は、新クラスのチャネルロドプシン、陰イオンチャネルロドプシン (ACR) の発見と特定に一部基づいている。緑藻植物の藻類の光開閉型ロドプシン陽イオンチャネルは、標的神経細胞発火の光活性化のための膜脱分極の光遺伝学的ツールとして使用されて、神経科学研究を一変させた。神経細胞活動電位の光抑制は、同等に高効率の膜過分極ツールの不足により制限されてきた。本明細書で説明するのは、光開閉型の塩素イオン伝導により、高感受性で高効率の膜過分極及び神経細胞のサイレンシングを提供する、光開閉型陰イオンチャネルの新ファミリー、陰イオンチャネルロドプシン (ACR) である。ACRは、厳密に陰イオンを伝導し、プロトンやより大きい陽イオンは完全に除外し、現在利用可能なほとんどの高効率の光遺伝学的タンパク質よりも3000倍低い光強度で100倍速い動態で膜を過分極する。GtAcr1の7TMDメインをコードする配列 (JGIタンパク質モデル111593、146828、161302にそれぞれ対応する、295、291、288aa) が、ヒトコドン用に最適化され合成された。機能的コンストラクト111593 (GtACR1: 配列番号1) 及び146828 (GtACR2: 配列番号3) をコードする配列情報は、GenBankに表示されよう (それぞれ受託番号KP171708、KP171709)。GtACR2を発現している神経細胞に照射すると、その活動電位スパイクが完全に阻害された。これらのACRは、とりわけ神経細胞または神経障害、たとえば限定ではないがパーキンソン病や癲癇、ならびに心機能障害で、興奮状態にある神経細胞のサイレンシングの光遺伝学的ツール用途で高レベルの膜電位を確立するための新規の膜過分極ツールを提供する。したがって、本明細書で提供するACRは、癲癇や心機能障害の治療で使用する新規の膜過分極ツールとして役立つことができる。

20

30

## 【0010】

本明細書のいくつかの実施形態では、異種プロモーター配列に機能的に連結された組換え核酸が開示され、該組換え核酸は、配列番号1、配列番号3または配列番号13からなる群より選択される配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるペプチドをコードする配列；または配列番号1、配列番号3、または配列番号13から選択される連続する225アミノ酸を含むペプチドをコードする配列；または配列番号2、配列番号4、配列番号14~15またはその相補のヌクレオチド配列にハイブリダイズする配列を含む。別の実施形態では、組換え核酸には発現ベクターが含まれる。組換え核酸の別の実施形態では、配列番号2、配列番号4、配列番号14~15またはその相補のヌクレオチド配列にハイブリダイズした配列は、さらに、0.5M NaHPO<sub>4</sub>、7%ドデシル硫酸ナトリウム、1mM EDTA中65でのフィルター結合DNA (filter-bound DNA) へのハイブリダイゼーション、及び0.2xSSC/0.1%SDS中42での洗浄を含む。さらなる実施形態では、異種プロモーター配列に機能的に連結された組換え核酸を含む組換え宿主細胞が開示され、該組換え核酸は、配列番号1、配列番号3または配列番号13から選択されるアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性を有するペプチドをコードする配列；または配列番号1、配列番号3または配列番号13から選択される連続する225ア

40

50

ミノ酸を含むペプチドをコードする配列；または配列番号 2、配列番号 4、配列番号 14 ~ 15 またはその相補のヌクレオチド配列にハイブリダイズする配列を含む。

【0011】

さらなる実施形態では、ACR は、神経細胞または心筋細胞のコンパートメントで活動電位を誘導するかまたは誘導しない膜脱分極ツールとして用いることができる。したがって、いくつかの態様では、諸実施形態の ACR コード配列には、さらに、宿主細胞のコンパートメントコード mRNA またはポリペプチドを標的とするシグナル配列が含まれる。

【0012】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、単離されたヒト細胞；非ヒト哺乳類細胞；細菌細胞；酵母細胞；昆虫細胞；または植物細胞である。

【0013】

代替実施形態では、本明細書で説明する核酸配列は、ゲノム編集及びゲノム標的化のための CRISPR 関連タンパク質 - 9 ヌクレアーゼ (Cas9) の系を用いて細胞のゲノムを標的とすることができる。いくつかの実施形態では、一部の細胞への送達は、限定ではないがレンチウイルス (LV)、アデノウイルス (AdV) 及びアデノ随伴ウイルス (AAV) などに基づく送達系を要することもある。

【0014】

いくつかの実施形態では、失明または盲目に罹患している対象の網膜の感光性を回復させる方法が開示され、該方法には、該対象の網膜の OFF 双極神経細胞に、網膜神経細胞内で発現可能な ACR のロドプシンドメインをコードする配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 からなる群より選択される配列と少なくとも約 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一であるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを送達すること；及び該ベクターを該網膜神経細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシン発現によって、該網膜神経細胞が感光性になり、それによって感光性が回復して、該網膜またはその一部分のそのような神経細胞の光誘導型サイレンシングが可能になる。さらなる実施形態では、対象は哺乳類であり、さらなる実施形態では、対象はヒトである。失明または盲目に罹患している対象の網膜の感光性を回復させる方法のある実施形態では、が開示され、該方法には、該対象の網膜に発現ベクターを送達することが含まれ、この送達することには、製薬上許容される担体が含まれる。

【0015】

いくつかのさらなる実施形態では、配列番号 15 ~ 24 の配列と少なくとも約 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一である配列を有する陰イオン伝導チャネルロドプシンをコードする配列を含む単離された核酸分子が提供される。特定の態様では、この単離された核酸分子は、厳密な条件下で配列番号 15 ~ 24 のうちの 1 つのヌクレオチド配列にハイブリダイズした配列を含み、該配列はフィルター結合 DNA に 0.5 M NaHPO<sub>4</sub>、7% ドデシル硫酸ナトリウム、1 mM EDTA 中 65 °C でのハイブリダイゼーション、及び 0.2 x SSC / 0.1 % SDS 中 42 °C での洗浄を含み、陰イオン伝導チャネルロドプシンをコードする。いくつかの態様では、核酸は DNA である。他の態様では、核酸は RNA (たとえば、mRNA) である。さらなる実施形態では、配列番号 15 ~ 24 の配列と少なくとも約 90% 同一である配列などの本明細書で提供する核酸分子を含む発現ベクターが提供される。

【0016】

さらなる実施形態では、本明細書で提供する核酸 (たとえば、配列番号 15 ~ 24 の配列と少なくとも約 90% 同一の配列) を含む組換え宿主細胞が提供される。いくつかの態様では、宿主細胞は単離されたヒト細胞である。他の態様では、宿主細胞は非ヒト哺乳類細胞である。いくつかの態様では、宿主細胞は細菌細胞である。特定の態様では、宿主細胞は酵母細胞である。他の態様では、宿主細胞は昆虫細胞である。いくつかの態様では、宿主細胞は植物細胞である。特定の態様では、宿主細胞は単離された神経細胞である。具

10

20

30

40

50



【 0 0 1 7 】

【 0 0 1 8 】

【 0 0 1 9 】

【 0 0 2 0 】

【 0 0 2 1 】

【 0 0 2 2 】

本明細書では、「a」や「an」は、1以上を意味することができる。本明細書の請求項（複数可）では、「～を含む（comprising）」という単語に関して使用する場合、「a」や「an」は、1、あるいは2以上を意味することができる。

## 【0023】

本開示では、「or」という用語について、代わりの選択肢という定義と「及び/または」という定義とを採用しているが、請求項中の「or」の用法は、明確に代わりの選択肢を示す場合のみ、あるいは択一である場合を除いて、「及び/または」を意味するものとする。本明細書では、「another」は、少なくとも2つ目以上を意味することができる。

## 【0024】

本明細書全体で、「約」という用語は、ある値が、デバイス特有の誤差、値の測定方法による誤差、または被験者間の偏差を含むことを示すのに用いられる。

## 【0025】

本発明のその他の目的、特徴、及び利点は、以下の詳細な説明から明らかになる。なお、詳細な説明及び具体的な実施例では本発明の好ましい実施形態を示しているが、それらは例示のみを目的とするものと理解すべきである。当業者にとっては、本発明の精神及び範囲における様々な変更や改変が詳細な説明から明らかになるからである。

## 【0026】

以下の図面は、本明細書の一部であり、本発明のさらなる態様を示すために含まれるものである。本明細書で示す具体的な実施形態の詳細な説明と併せてこれらの図面の1つ以上を参照することによって、本発明をよりよく理解することができる。本特許または特許出願は、カラー図面を少なくとも1つは含んでいる。米国特許庁に申請し、必要な手数料を支払えば、本特許または特許出願公開のカラー図面（複数可）を含む複製が入手できる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0027】

【図1A】G. theta ACRの系統及び光活性。図1Aは、陽イオンチャネルロドプシン（CCR）と陰イオン伝導チャネルロドプシン（ACR）の系統樹の図である。図1Bは膜貫通ヘリックス2の、図1Cは膜貫通ヘリックス3の、それぞれClustal Wアラインメントの図である。生物の略称は、GtはGuillardia theta；CrはChlamydomonas reinhardtii；CaはChlamydomonas augustae；MvはMesostigma viride；HsはHalobacterium salinarum；NmはNonlabens marinusである。最後の残基の番号を右側に示す。螺旋体2の保存Glu残基を黄色でハイライトし、バクテリオロドプシンAsp85の位置のGlu残基を赤色でハイライトしている。図1Dの大きい図は、-60mVで飽和光パルスに応答したHEK293細胞内GtACR1、GtACR2、及びCrChR2の光電流の図であり、図1Dの差込図は、ピーク電流の平均振幅（ベタ塗りのバー）と定常電流の平均振幅（あや目模様のバー）の図である（n=18~20細胞）。ノイズ分析によると、GtACR2の単一伝導性は、最も広く使用されている陽イオン伝導チャネルロドプシンCrChR2について報告されているものよりも25倍大きかった。図1Eは、ピーク電流振幅、定常電流振幅、及び上昇率の刺激強度への依存性を示す図である。図1Fは、光電流の作用スペクトルの図である。

【図1B】同上

【図1C】同上

【図1D】同上

【図1E】同上

【図1F】同上

【図2A】ACRは陽イオンを伝導しない。-60mVから20mV刻みで変化させたE<sub>h</sub>で、HEK293細胞内GtACR1（図2A）及びGtACR2（図2B）が発生した光電流（下から上の方向；液間電位差（LJP）値は（表1））。ピペット溶液は標準だったが、バス溶液は記載のとおりであった。図2Cは、バスの異なるpHで電流と電圧の関係を測定した図である。データ（平均値±SEM、n=4~6細胞）はLJPについ

て補正し、 $-60\text{ mV}$ 、 $\text{pH } 7.4$ の測定値を基準として正規化した。 $\text{CrChR2}$ の代表データを比較のために示す。図2Dは、バスの様々な陽イオン組成で測定した $E_{rev}$ シフトの図である。データは、 $\text{平均値} \pm \text{SEM}$  ( $n = 3 \sim 6$ 細胞)である。

【図2B】同上

【図2C】同上

【図2D】同上

【図3A】ACRの陰イオン選択性。 $-60\text{ mV}$ から $20\text{ mV}$ 刻みで変化させた $E_h$ で、HEK293細胞内GtACR1(図3A)及びGtACR2(図3B)が発生した光電流(下から上の方向;液間電位差(LJP)値は(表1))。ピペット溶液は標準だったが、バス溶液は記載のとおりであった。図3Cはバス内の異なる $\text{Cl}^-$ 濃度で電流と電圧の関係を測定した図である。データ(平均値 $\pm$ SEM、 $n = 4 \sim 6$ 細胞)はLJPについて補正し、 $-60\text{ mV}$ 、 $156\text{ mM}$   $\text{Cl}^-$ の測定値を基準として正規化した。縦破線は、用いたバス濃度の $\text{Cl}^-$ のNernst平衡電位を示す。図3Dは、バスの様々な陰イオン組成で測定した $E_{rev}$ シフトの図である。データは、 $\text{平均値} \pm \text{SEM}$  ( $n = 3 \sim 6$ 細胞)である。

10

【図3B】同上

【図3C】同上

【図3D】同上

【図4A】過分極ツールとしてのGtACR2。(図4A及び図4Cは)ピペットでは低 $\text{Cl}^-$ 濃度、バスでは高 $\text{Cl}^-$ 濃度で、 $-80\text{ mV}$ から $20\text{ mV}$ 刻みで変化させた $E_h$ で、HEK293細胞内GtACR2が発生した光電流(図4A)及び培養錐体神経細胞内GtACR2が発生した光電流(図4C)(下から上の方向;液間電位差(LJP)値は(表1及び表2))。図4Bは、 $20\text{ mV}$ でHEK293細胞内GtACR2及びarchaerhodopsin-3(Arch)が発生した光電流の光強度依存性の図である。低速 $\text{Cl}^-$ 伝導ChR変異体のデータは前掲のJ. Wietek et al., (2014)及びA. Berndt, et al., (2014)のものである。矢印は光感受性の差を示す。図4Dは、図4Cで示す神経細胞で測定された電流と電圧の関係を示す図である。データ(平均値 $\pm$ SEM、 $n = 5$ 細胞)はLJPについて補正した(表2)。縦破線は静止電位( $E_{rest}$ )を示す。 $\text{Cl}^-$ 伝導ChR変異体のデータは前掲のJ. Wietek et al., (2014)及びA. Berndt, et al., (2014)のものである。図4Eは、GtACR2を発現している神経細胞にパルス( $10\text{ ms}$ 、 $10\text{ kHz}$ )電流注入して誘発した、スパイクの光抑制の図である。光強度は $8.5 \times 10^{-3}\text{ mW/mm}^2$ であった。図4Fは、電気的に誘発したスパイクの光強度依存性の図である。暗時と明時の電気誘発シグナル間の振幅の差は図示のように計算した。

20

30

【図4B】同上

【図4C】同上

【図4D】同上

【図4E】同上

【図4F】同上

40

【図5-1】Gtetaタンパク質モデルの系統樹。微生物ロドプシンと相同のモデルをJoint Genome Institute(JGI)シーケンシング・プロジェクト(以下のワールドワイドウェブを参照のこと: genome.jgi.doe.gov/Guith1/Guith1.home.html)で予測されたなかから選択し、ClustalWを用いてアラインメントした。この系統樹は近隣結合法により作製した。GtR1、GtR2及びGtR3は、以前特定されたタンパク質である。8つのモデルには、既知のロドプシンでレチナルと共有結合する7番目の膜貫通螺旋体の保存Lys残基が存在せず、したがってオブシン近縁タンパク質とみなすべきである。

【図5-2】同上

【図6A】バス内で異なる $\text{Cl}^-$ 濃度で測定したGtACR1の電流と電圧の関係。図6

50

Aでは、データ（平均値 $\pm$ SEM、 $n = 4 \sim 6$ 細胞）は、液間電位差のデータであり、 $-60\text{ mV}$ 、 $156\text{ mM Cl}^-$ で測定された値を基準として正規化した。縦破線は、用いたバス濃度の $\text{Cl}^-$ のNernst平衡電位を示す。図6Bは、ピペットでは低 $\text{Cl}^-$ 濃度、バスでは高 $\text{Cl}^-$ 濃度で、HEK293細胞内GtACR1が発生した光電流の図である。膜電位は増幅器出力で $-80\text{ mV}$ から $20\text{ mV}$ 刻みで変化させた。

【図6B】同上

【図7A】増幅器出力で $-60\text{ mV}$ から $20\text{ mV}$ 刻みで変化させた膜電位で（下から上の方向）、 $1\text{-s}$ 光パルス（ $520\text{ nm}$ ）に応答してHEK293細胞内PsuACR1が発生した光電流の図である。ピペットとバスの溶液の $\text{Cl}^-$ 濃度は記載のとおりであった。図7Dは、凡例内に示す溶液で測定したピーク電流の電圧依存性（IE曲線）の図である。データ（平均値 $\pm$ SEM、 $n = 4 \sim 9$ 細胞）は、 $-60\text{ mV}$ 、標準溶液で測定した値を基準として正規化し、液間電位差について補正した。

10

【図7B】同上

【図7C】同上

【図7D】同上

【図8】（陰イオンでは）不透過 $\text{Asp}^-$ または（陽イオンでは）不透過 $\text{NMG}^+$ を用いて得られた値からの、バスの様々な陰イオン組成（左）または陽イオン組成（右）で測定したPsuACR1光電流の $E_{rev}$ のシフトの図である。データは平均値 $\pm$ SEM（ $n = 3 \sim 9$ 細胞）である。

20

【図9】PsuACR1光電流の作用スペクトルの図である。

【図10A】図10aは、増幅器出力で記載の電圧値で、レーザー光励起（ $6\text{ ns}$ 、 $532\text{ nm}$ ）に応答してPsuACR1が発生した典型的な光電流（黒実線）の図である。電流減衰に3つの指数関数を当てはめ（破線）、そこからプロット上に示した時定数を求めた。図10bは、ピーク振幅が50%まで減少するのに必要な時間の逆として計算された3種の既知のACRのチャネル閉速度の図である。図10cは、電流減衰成分の振幅の電圧依存性の図である。図10dは、5ミリ秒の光パルスを用いたダブルフラッシュ実験でそれぞれ飽和強度 $520\text{ nm}$ 、 $515\text{ nm}$ 、 $470\text{ nm}$ で測定したPsuACR1、GtACR1及びGtACR2のピーク電流の暗回復の図である。プロット上の数字は、各タンパク質の50%ピーク回復に要する暗期（dark interval）を示す。図10b～dのパネルのデータポイントは平均値 $\pm$ SEM（ $n = 3 \sim 8$ 細胞）である。

30

【図10B】同上

【図10C】同上

【図10D】同上

【図11A】図11aは、チャネル電流の反転電位でPsuACR1から記録された高速負電流（実線、左側の軸）、及びその上昇と減衰の指数関数当てはめ（点線）、及び増幅器出力で $-60\text{ mV}$ で同じ細胞から記録されたチャネル電流（破線、右側の軸）の図である。図11bは、PsuACR1を発現している典型的な細胞における高速負電流（四角マークと実線、左側の軸）及びチャネル電流（丸マークと破線、右側の軸）の電圧依存性の図である。図11cは、高速負電流のバスpHへの依存性の図である。データポイントは平均値 $\pm$ SEM（ $n = 3 \sim 5$ 細胞）である。

40

【図11B】同上

【図11C】同上

【図12】ACRとC. reinhardtii CCRのロドブシンドメインのClustalWアラインメント。左側の数字は各配列断片の最後の残基の番号を示す。CCRの螺旋体2と3で保存されているカルボン酸残基を赤色でハイライトし、ACRの対応する極性及び非極性残基をそれぞれ緑色と黄色でハイライトする。

【図13】PsuACR1電流減衰成分の時定数の電圧依存性。データポイントは平均値 $\pm$ SEM（ $n = 8$ 細胞）である。

【発明を実施するための形態】

【0028】

50

## 配列表の説明

配列表は、G . t h e t a オプシンの7 T M ドメインをコードする配列に由来する ( J G I タンパク質モデル 1 1 1 5 9 3、1 4 6 8 2 8、1 6 1 3 0 2 にそれぞれ対応する、2 9 5、2 9 1、2 8 8 a a )、ヒトコドン用に最適化され合成された、陰イオンチャネルロドプシンドメインのアミノ酸配列と核酸配列を示している。

【 0 0 2 9 】

配列番号 1 は、G t A C R 1 のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 0 】

配列番号 2 は、G t A C R 1 をコードする核酸配列である。

【 0 0 3 1 】

配列番号 3 は、G t A C R 2 のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 2 】

配列番号 4 は、G t A C R 2 をコードする核酸配列である。

【 0 0 3 3 】

配列番号 5 は、G t 1 6 1 3 0 2 のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 4 】

配列番号 6 は、G t 1 6 1 3 0 2 をコードする核酸配列である。

【 0 0 3 5 】

配列番号 7 は、C r C h R 1 ( C h l a m y d o m o n a s r e i n h a r d t i i チャンネルロドプシン 1、別名 C h l a m y d o m o n a s 感覚ロドプシン A : G e n B a n k 受託番号 A F 5 0 8 9 6 5 ) のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 6 】

配列番号 8 は C r C h R 2 ( C h l a m y d o m o n a s r e i n h a r d t i i チャンネルロドプシン 2、別名 C h l a m y d o m o n a s 感覚ロドプシン B : G e n B a n k 受託番号 A F 5 0 8 9 6 6 ) のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 7 】

配列番号 9 は、C a C h R 1 ( C h l a m y d o m o n a s ( C h l o r o m o n a s ) a u g u s t a e チャンネルロドプシン 1 : G e n B a n k 受託番号 J N 5 9 6 9 5 1 ) のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 8 】

配列番号 1 0 は、M v C h R 1 ( M e s o s t i g m a v i r i d e チャンネルロドプシン 1 : G e n B a n k 受託番号 J F 9 2 2 2 9 3 ) のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 9 】

配列番号 1 1 は、H s H R ( H a l o b a c t e r i u m s a l i n a r u m ハロロドプシン : G e n B a n k 受託番号 W P \_ 0 1 0 9 0 2 0 9 0 . 1 ) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 0 】

配列番号 1 2 は、N m H R ( N o n l a b e n s m a r i n u s 塩素イオンポンプロドプシン : G e n B a n k 受託番号 B A O 5 5 2 7 6 . 1 ) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 1 】

配列番号 1 3 は、P s u A C R 1 のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 2 】

配列番号 1 4 は、P s u A C R 1 をコードする合成核酸配列である。

【 0 0 4 3 】

配列番号 1 5 は、P s u A C R 1 をコードする合成核酸配列である。

【 0 0 4 4 】

配列番号 1 6 は、G t A C R 1 をコードする合成核酸配列である。

【 0 0 4 5 】

配列番号 1 7 は、G t A C R 2 をコードする合成核酸配列である。

【 0 0 4 6 】

10

20

30

40

50

配列番号 18 は、G t 1 6 1 3 0 2 をコードする合成核酸配列である。

【0047】

配列番号 19 は、C r C h R 1 をコードする合成核酸配列である。

【0048】

配列番号 20 は、C r C h R 2 をコードする合成核酸配列である。

【0049】

配列番号 21 は、C a C h R 1 をコードする合成核酸配列である。

【0050】

配列番号 22 は、M C h R 1 をコードする合成核酸配列である。

【0051】

配列番号 23 は、H s H R をコードする合成核酸配列である。

【0052】

配列番号 24 は、N m H R をコードする合成核酸配列である。

【0053】

例示的な実施形態の説明

最近まで、チャンネルロドプシンは、動物細胞に形質移入されると神経細胞発火の光活性化に使用される、光開閉型陽イオンチャンネルとして機能する走光性受容体であった。本明細書で説明するのは、光開閉型の塩素イオン伝導によって、高感受性で高効率の膜過分極及び神経細胞サイレンシングをもたらす、新クラスの光開閉型チャンネル、陰イオンチャンネルロドプシン (A C R) である。A C R は陰イオンを厳密に伝導し、プロトンや高分子量の陽イオンは除外する。また、現在利用されている最も高効率の光遺伝学的タンパク質と比べて 3 0 0 0 倍低い光強度で 1 0 0 倍速い動態で膜過分極をもたらす。

【0054】

数種の藻類から走光性受容体電流をスクリーニングすることによって、高速動態の高効率な A C R を特定し特徴を決定した。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、特に有用な藻類のチャンネルロドプシンを特定し特徴を決定するのを容易にする技術を提供する。

【0055】

I . 定義

本開示では、単数形には複数形も含まれるものとし、特に断らない限り、「a」や「an」という単語は「少なくとも1」を意味し、「or」を使う場合は「及び/または」を意味するものとする。さらに、「including (含む)」という用語ならびに「includes」や「included」などの変化形を使う場合、それは限定する用法ではない。また、「要素」や「成分」などの用語は、特に断らない限り、1 単位の要素や成分を含む場合も、2 単位以上の要素や成分を含む場合も包含している。

【0056】

本明細書では、「約」という用語を百分率やその他の数量に関して使う場合、その百分率やその他の数量の  $\pm 10\%$  を意味する。たとえば「約 80%」という用語は、 $80\% \pm 8\%$  を含むことになる。

【0057】

本明細書で使用する見出しは、単なる構成上のものであり、本明細書で説明する主題を何ら限定するものではない。本出願で引用するあらゆる文書、またはその一部、たとえば限定ではないが、特許文献、特許出願、記事、書籍、論文などは、あらゆる目的でその内容を参照により本明細書に明確に援用する。援用する文献または類似の資料の 1 つ以上において用語の定義が本出願のものと異なる場合は、本出願の定義が優先される。

【0058】

本明細書では、特に断らない限り、電気的活性のある細胞が関与する障害、たとえば限定ではないが、本発明の方法及び組成物を用いることができる神経細胞機能障害、神経細胞が媒介する障害、視覚障害または心機能障害という用語には、限定ではないが、神経細胞の機能不全、脳、中枢神経系、末梢神経系の障害、神経の異常、記憶障害や曲げ (leaning) 障害、不整脈、パーキンソン病、癲癇、視覚障害、脊髄損傷、限定ではない

10

20

30

40

50

が自己免疫疾患（たとえば、多発性硬化症、ギランバレー症候群、重症筋無力症、狼瘡、及び炎症性腸疾患）関連の神経痛；癌及びその治療に使われる化学療法や放射線；圧迫／トラウマ（たとえば、首の神経の圧迫、挫滅傷、及び手根管症候群）；糖尿病性神経障害；薬の副作用；及び毒性物質；運動神経疾患（たとえば筋委縮性側索硬化症、進行性球麻痺、進行性筋委縮症、及び原発性側索硬化症）；栄養障害（たとえばビタミン B 6 やビタミン B 12）；炎症性疾患；限定ではないが湿疹、アトピー性皮膚炎、乾燥肌関連の掻痒、ならびにアレルギー性の掻痒；迷走神経の活性を変える疾患や障害などが含まれる。

【0059】

本明細書では、特に断らない限り、本発明の方法及び組成物を用いて1種以上の視覚パラメーターを向上させることができる「視覚障害」という用語には、限定ではないが、眼の前側セグメントと後側セグメントの両方に影響を及ぼす発達障害も含まれる。前側セグメントの障害としては、限定ではないが、緑内障、白内障、角膜ジストロフィー、円錐角膜が挙げられる。後側セグメントの障害としては、限定ではないが、網膜ジストロフィーや退化による光受容体の機能不全及び／または死滅を原因とする盲目障害が挙げられる。網膜障害としては、先天性停止性夜盲症、加齢による黄斑退化、及び先天性錐体ジストロフィー、ならびに網膜色素変性症（RP）関連の多くの障害が挙げられる。

【0060】

本明細書では、特に断らない限り、「treat（治療する）」「treating」「treatment」及び「therapy」という用語は、患者が、電気的活性のある細胞が関与する障害、たとえば限定ではないが神経細胞の機能障害、神経細胞が媒介する障害、視覚障害または心機能障害に罹患している場合の、そのような障害の1つ以上の症状または影響の重症度を軽減する行為を意図している。また文脈が許せば、「treat」「treating」及び「treatment」という用語は、電気的活性のある細胞が関与する障害、たとえば限定ではないが神経細胞の機能障害、神経細胞が媒介する障害、視覚障害または心機能障害のリスクが高い個人が、電気的活性のある細胞が関与する障害、たとえば限定ではないが神経細胞の機能障害、神経細胞が媒介する障害、視覚障害または心機能障害が発症する前に、重症度を軽減するような、適切な手術及び／または他の医療介入が確実に受けられるようにする行為も指す。本明細書では、特に断らない限り、「prevent（予防する）」「preventing」及び「prevention」という用語は、患者が電気的活性のある細胞が関与する障害、たとえば限定ではないが神経細胞の機能障害、神経細胞が媒介する障害、視覚障害または心機能障害に罹患する前にとられる、電気的活性のある細胞が関与する障害、たとえば限定ではないが神経細胞の機能障害、神経細胞が媒介する障害、視覚障害または心機能障害の発症を遅らせ、かつ／または阻害するかもしくは重症度を軽減する行為を意図している。

【0061】

本明細書では、特に断らない限り、「manage（管理する）」「managing」及び「management」という用語には、電気的活性のある細胞が関与する障害、たとえば限定ではないが神経細胞の機能障害、神経細胞が媒介する障害、視覚障害または心機能障害に罹患したことがある患者がそのような疾患、障害または状態を再発することを予防し、遅延させ、または重症度を軽減することが含まれる。これらの用語には、電気的活性のある細胞が関与する障害の閾、発症、及び／または持続期間を調節すること、電気的活性のある細胞が関与する障害に対する患者の反応を変化させること、あるいは細胞膜前後の所望の膜電位を維持及び／または確立することが含まれる。

【0062】

本明細書では、特に断らない限り、化合物の「治療有効量」は、電気的活性のある細胞が関与する障害、たとえば限定ではないが神経細胞の機能障害、神経細胞が媒介する障害、視覚障害または心機能障害の治療または管理において治療効果をもたらす、または電気的活性のある細胞が関与する障害、たとえば限定ではないが神経細胞の機能障害、神経細胞が媒介する障害、視覚障害または心機能障害に関連する1つ以上の症状を遅延させるか最小限化するのに十分な量である。化合物の治療有効量は、化合物の単剤としての量、ま

10

20

30

40

50

たは電気的活性のある細胞が関与する障害、たとえば限定ではないが神経細胞の機能障害、神経細胞が媒介する障害、視覚障害または心機能障害の治療または管理において治療効果をもたらす１種以上の療法及び／または治療剤と併用での量を意味する。

【００６３】

「治療有効量」という用語には、電気的活性のある細胞が関与する障害、たとえば限定ではないが神経細胞の機能障害、神経細胞が媒介する障害、視覚障害または心機能障害を緩和する量、電気的活性のある細胞が関与する障害を改善もしくは軽減する量、または治療全体を改善する量、または別の治療剤の治療効果を増強する量が含まれることもある。

【００６４】

本明細書では、特に断らない限り、化合物の「予防有効量」は、電気的活性のある細胞が関与する障害、たとえば限定ではないが神経細胞の機能障害、神経細胞が媒介する障害、視覚障害または心機能障害、あるいは電気的活性のある細胞が関与する障害に関連する１つ以上の症状の発症を予防または遅延させる、あるいはその再発を予防または遅延させるのに十分な量である。予防有効量の化合物は、化合物の単剤としての量、または電気的活性のある細胞が関与する障害、たとえば限定ではないが神経細胞の機能障害、神経細胞が媒介する障害、視覚障害または心機能障害の予防に効果のある１種以上の他の治療及び／または予防剤と併用での量を意味する。「予防有効量」という用語には、電気的活性のある細胞が関与する障害、たとえば限定ではないが神経細胞の機能障害、神経細胞が媒介する障害、視覚障害または心機能障害を予防する量、予防全体を改善する量、または別の予防剤の予防効果を増強する量が含まれ得る。「予防有効量」は、たとえば、電気的活性のある細胞が関与する障害、たとえば限定ではないが神経細胞の機能障害、神経細胞が媒介する障害、視覚障害または心機能障害が発症する前に処方することができる。

【００６５】

本明細書では、「患者」または「対象」には、本明細書で説明するような電気的活性のある細胞が関与する障害、たとえば限定ではないが神経細胞の機能障害、神経細胞が媒介する障害、視覚障害または心機能障害に罹患し得る哺乳類生物、たとえばヒト及び非ヒト哺乳類、たとえば限定ではないが、齧歯目動物、マウス、ラット、非ヒト霊長目動物、イヌやネコなどのペット動物、ならびにたとえばヒツジ、ウシ、ウマなどの家畜が含まれる。

【００６６】

本明細書では、「保存的置換」という用語は、タンパク質またはポリペプチドの構造及び機能的特性を保存するアミノ酸置換を広く指す。そのような機能的に等価な（保存的置換）ペプチドアミノ酸配列としては、限定ではないが、結果としてサイレント変化が得られるような、ヌクレオチド配列でコードされるアミノ酸配列内のアミノ酸残基の付加または置換が挙げられ、したがって機能的に等価な遺伝子産物が得られる。保存的アミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、及び／または両親媒性といった性質の類似性に基づいて行うことができる。たとえば、非極性（疎水性）アミノ酸にはアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、及びメチオニンがあり、極性が中性のアミノ酸にはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンがあり、正電荷の（塩基性）アミノ酸にはアルギニン、リジン、及びヒスチジンがあり、負電荷の（酸性）アミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸がある。

【００６７】

本明細書では、「レッドシフト」は、長波長へのシフトである。これに対し、「ブルーシフト」は短波長へのシフトになる。これらの用語は光を照射する物質と光を吸収する物質の両方に当てはまる。

【００６８】

本明細書では、「ロドプシンドメイン」という語句は、ロドプシンの特徴的な７回膜貫通螺旋体（７ＴＭ）構造「ロドプシンフォールド」を指す。本明細書では、チャネルオプシンはアポタンパク質であり、チャネルロドプシンはタンパク質とレチナールである。本

10

20

30

40

50



明細書では、「チャンネルロドプシン」という用語は、光開閉型イオンチャネルとして機能するレチニリデンタンパク質（ロドプシン）を指す。

【0069】

同一性または相同性のパーセントは、関連するアミノ酸配列の長さに関して決定される。したがって、本発明のあるポリペプチドがそれよりも長いポリペプチドに含まれる場合、相同性%は、この長い方のポリペプチドが本発明のポリペプチドに対応している部分にだけに関して決定されるのであって、この長い方のポリペプチドの全長の相同性%ではない。核酸配列に対する相対的な「同一性パーセント」すなわち「同一性%」は、Basic Local Alignment Search ツール (BLAST) エンジンによりアライメントした少なくとも2つのポリヌクレオチド配列同士のヌクレオチド同一性%を指す。Tatusova et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250を参照されたい。このBLASTエンジンは、米国メリーランド州ベセスダにある国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) によって公開されている。2つのポリヌクレオチド配列をアラインメントするには、「blastn」プログラムが入ったBLASTを使用する。

10

【0070】

ポリペプチド配列に対する「同一性パーセント」すなわち「同一性%」は、Basic Local Alignment Search ツール (BLAST) エンジンによりアラインメントした少なくとも2つのポリペプチド配列同士のアミノ酸同一性%を指す。前述のTatusova et al. (1999)を参照されたい。このBLASTエンジンは、米国メリーランド州ベセスダにある国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) によって公開されている。2つのポリペプチド配列をアラインメントするには、「blastp」プログラムが入ったBLASTを使用する。

20

【0071】

II. チャンネルロドプシン

G. theta オブシンの7 TMDメインをコードする配列 (Joint Genome Institute (JGI) シーケンシング・プロジェクト (<http://genome.jgi.doe.gov/Guith1/Guith1.home.html>) のタンパク質モデル 111593、146828、161302 にそれぞれ対応する 295、291 及び 288 aa) をヒトコドン用に最適化し合成し、高速動態を有する高効率の ACR として2種を特定し特徴決定した。本明細書で提供するいくつかの実施形態は、やはり機能的特徴が決定されている新規 ACR の機能的ドメインのアミノ酸配列及び核酸配列である。いくつかのそのような ACR はチャンネルロドプシンの高感受性かつ高効率の ACR ドメインを有すると判定されており、それらをクローン化し、GtACR1 (配列番号1及び2)、GtACR2 (配列番号3及び4) または Gt161302 (配列番号5及び6) として特定した。これらは *Guillardia theta* の陰イオン伝導チャンネルロドプシンに由来した。111593の機能的コンストラクトを GtACR1 (配列番号1及び2) と特定し、146828の機能的コンストラクトを GtACR2 (配列番号3及び4) と特定し、GenBank に寄託した (受託番号 KP171708 及び KP171709)。また、いくつかの実施形態では、GtACR1、GtACR2 または Gt161302 (配列番号1、配列番号3または配列番号5) と特定されたこれらの新規 ACR ドメインの用法と組成物も提供される。

30

40

【0072】

いくつかの実施形態では、GtACR の保存バリエーション (たとえば、GtACR1 または GtACR2) またはそのペプチド断片が提供される。「保存的」アミノ酸置換は、ポリペプチド中のアミノ酸をサイズや電荷など同様の特性をもつ別のアミノ酸で置換することを指す。特定の実施形態では、保存的アミノ酸置換を含むポリペプチドは、未置換のポリペプチドの活性を少なくとも1つは維持している。保存的アミノ酸置換には、生体系での合成ではなく典型的には化学的ペプチド合成によって組み込まれる、非天然アミノ酸残基が含まれ得る。これらには、限定ではないが、ペプチド模倣体、及びその他の逆向形態

50

もしくは反転形態のアミノ酸部分が含まれる。

【0073】

いくつかの実施形態では、は本開示の方法のいずれかであり、配列番号1または3の全部または一部のアミノ酸配列を有している高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメイン、または高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのコードされたロドプシンドメインの生物学的活性を保持しているその生物学的活性断片、または配列番号1または3のまたは該断片の生物学的活性のある保存アミノ酸置換バリエーション。

【0074】

A. チャネルロドプシンのポリペプチド

いくつかの実施形態では、高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする単離されたポリペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、配列番号1、配列番号3または配列番号13のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドは、配列番号1、配列番号3または配列番号13のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドは、配列番号1、配列番号3または配列番号13のアミノ酸配列と85%~95%~100%の同一性を有する。

10

【0075】

いくつかの実施形態では、は、タンパク質組成物は、配列番号1、配列番号3または配列番号13のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

20

【0076】

本明細書で説明する陰イオン伝導チャネルロドプシンのアミノ酸配列（配列番号1または3）、ならびにそのアナログ及び誘導体、及び機能的断片たとえば限定ではないがロドプシン/7TMDメインを含む、様々な実施形態で 사용할 ことができるペプチドアミノ酸配列。実際に、いくつかの実施形態では、特定のヌクレオチド配列によってコードされる任意の所望のペプチドアミノ酸配列を用いることができ、所望のペプチドアミノ酸配列の全部または任意の部分をコードする任意のポリヌクレオチド配列を用いることができる。遺伝コードの変性については周知であり、したがって、各陰イオン伝導チャネルロドプシンのペプチドのアミノ酸をコードするヌクレオチド配列は、アミノ酸をコードすることができる周知の核酸「3塩基」コドン（たいていは単に「コドン」）の包括的代表的である。したがって、本明細書で意図されるように、本明細書で説明する陰イオン伝導チャネルロドプシンのペプチドアミノ酸配列は、遺伝コード（たとえば、“Molecular Cell Biology”，109ページの表4-1（Darnell et al., eds., W. H. Freeman & Company, New York, NY, 1986）を参照のこと）と合わせて、そのようなアミノ酸配列をコードできる核酸配列のあらゆる様々な並べ替え及び組合せの包括的代表的である。

30

【0077】

そのような機能的に等価なペプチドアミノ酸配列（保存的置換）には、限定ではないが、ヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列内のアミノ酸残基の付加または置換（ただしサイレント変化をもたらすもの）が含まれ、それによって機能的に等価な遺伝子産物が生産される。アミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、及び/または両親媒性といった性質の類似性に基づいて行うことができる。たとえば、非極性（疎水性）アミノ酸にはアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、及びメチオニンがあり、極性が中性のアミノ酸にはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンがあり、正電荷の（塩基性）アミノ酸にはアルギニン、リジン、及びヒスチジンがあり、負電荷の（酸性）アミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸がある。

40

【0078】

天然の残基は、共通する側鎖の特性に基づき分類することができる：疎水性（Met、Ala、Val、Leu、Ile）；中性親水性（Cys、Ser、Thr、Asn、G

50

ln) ; 酸性 ( Asp、Glu ) ; 塩基性 ( His、Lys、Arg ) ; 鎖の向きに影響する残基 ( Gly、Pro ) ; 及び芳香族 ( Trp、Tyr、Phe ) 。たとえば、非保存的置換では、これらのクラスのメンバーの1つと別のクラスのメンバーを交換することもある。

#### 【0079】

特定の実施形態においては、置換の際に、アミノ酸の疎水性親水性指標が考慮されることもある。各アミノ酸には、疎水性と電荷を基に疎水性親水性指標が割り当てられている。それらは、イソロイシン (+ 4 . 5 ) ; バリン (+ 4 . 2 ) ; ロイシン (+ 3 . 8 ) ; フェニルアラニン (+ 2 . 8 ) ; システイン / シスチン (+ 2 . 5 ) ; メチオニン (+ 1 . 9 ) ; アラニン (+ 1 . 8 ) ; グリシン ( - 0 . 4 ) ; スレオニン ( - 0 . 7 ) ; セリン ( - 0 . 8 ) ; トリプトファン ( - 0 . 9 ) ; チロシン ( - 1 . 3 ) ; プロリン ( - 1 . 6 ) ; ヒスチジン ( - 3 . 2 ) ; グルタミン酸 ( - 3 . 5 ) ; グルタミン ( - 3 . 5 ) ; アスパラギン酸 ( - 3 . 5 ) ; アスパラギン ( - 3 . 5 ) ; リジン ( - 3 . 9 ) ; 及びアルギニン ( - 4 . 5 ) である。

10

#### 【0080】

相互作用性の生物学的機能をタンパク質に与えるのに、特定の事例では、アミノ酸の疎水性親水性指標が重要であることは、当業界でも理解されている ( Kyte et al . , J . Mol . Biol . , 157 : 105 - 131 ( 1982 ) ) 。特定の事例では、特定のアミノ酸を同様の疎水性親水性指標またはスコアを有する他のアミノ酸と置換して、同様の生物学的活性が保持できることがわかっている。疎水性親水性指標に基づいて変更を行う場合、特定の実施形態では、疎水性親水性指標が ± 2 以内のアミノ酸の置換が含まれる。特定の実施形態では、± 1 以内のアミノ酸の置換が含まれ、特定の実施形態では、± 0 . 5 以内のアミノ酸の置換が含まれる。

20

#### 【0081】

類似のアミノ酸同士の置換は、親水性に基づいて効果的に行うことができ、この実施形態のようにそうして生成した生物学的機能タンパク質またはペプチドを免疫学的実施形態で使用する場合は特に効果的である。特定の実施形態では、隣接するアミノ酸の親水性に支配されるタンパク質の最大局在平均親水性は、このタンパク質の免疫原性及び抗原性と相関があり、すなわちこのタンパク質の生物学的特性と相関がある。

#### 【0082】

アミノ酸残基に割り当てられた親水性の値は、アルギニン (+ 3 . 0 ) ; リジン (+ 3 . 0 ) ; アスパラギン酸 (+ 3 . 0 ± 1 ) ; グルタミン酸 (+ 3 . 0 ± 1 ) ; セリン (+ 0 . 3 ) ; アスパラギン (+ 0 . 2 ) ; グルタミン (+ 0 . 2 ) ; グリシン ( 0 ) ; スレオニン ( - 0 . 4 ) ; プロリン ( - 0 . 5 ± 1 ) ; アラニン ( - 0 . 5 ) ; ヒスチジン ( - 0 . 5 ) ; システイン ( - 1 . 0 ) ; メチオニン ( - 1 . 3 ) ; バリン ( - 1 . 5 ) ; ロイシン ( - 1 . 8 ) ; イソロイシン ( - 1 . 8 ) ; チロシン ( - 2 . 3 ) ; フェニルアラニン ( - 2 . 5 ) 及びトリプトファン ( - 3 . 4 ) である。類似の親水性値に基づいて変更する場合、特定の実施形態では、親水性値が ± 2 以内のアミノ酸の置換が含まれる。特定の実施形態では、± 1 以内のアミノ酸の置換が含まれ、特定の実施形態では、± 0 . 5 以内のアミノ酸の置換が含まれる。

30

40

#### 【0083】

当業者であれば、周知の技法により、本明細書に記載のポリペプチドの好適なバリエーションを決定できよう。特定の実施形態では、当業者は、活性に関して重要ではないと考えられる領域を標的とすることによって、活性を壊すことなく変更できる分子の好適な領域を特定することができる。特定の実施形態では、当業者は、類似の複数のポリペプチドで保存されている残基及び分子の部分を特定することができる。

#### 【0084】

特定の実施形態では、生物学的活性または構造にとって重要であり得る領域でも、生物学的活性を壊すことなく、またはポリペプチド構造に有害な影響を及ぼすことなく、保存的アミノ酸置換の対象とすることができる。

50

## 【0085】

さらに、特定の実施形態では、当業者は、活性または構造にとって重要な類似のポリペプチドの残基を特定した構造機能研究の諸文献を当てることができる。そのような比較に鑑み、特定の実施形態では、当業者は、類似のタンパク質の活性または構造にとって重要なアミノ酸残基に相当する、あるタンパク質中のアミノ酸残基の重要度を予測することができる。特定の実施形態では、当業者は、そうして予測した重要なアミノ酸残基に対して、化学的に類似するアミノ酸置換を選択することができる。

## 【0086】

特定の実施形態では、当業者はまた、アミノ酸配列及び三次元構造を、類似のポリペプチドの三次元構造に関連して分析することができる。特定の実施形態では、そのような情報に鑑み、当業者はポリペプチドのアミノ酸残基のアラインメントを、その三次元構造を参照して予測できる。特定の実施形態では、当業者は、タンパク質表面に存在すると予測されるアミノ酸残基が他の分子との重要な相互作用に関与する可能性があるため極端に変更しない、と選択することもできる。

10

## 【0087】

さらに、特定の実施形態では、当業者は、所望のアミノ酸残基それぞれに1つのアミノ酸置換を含む試験バリエーションを作ることができる。特定の実施形態では、次に、このバリエーションを当業者には既知の活性アッセイでスクリーニングすることができる。特定の実施形態では、そのようなバリエーションを、好適なバリエーションについての情報を収集するのに用いることができる。たとえば、特定の実施形態では、ある特定のアミノ酸残基を変更した結果、壊れた、必要以上に低下した、または不適切な活性となることを発見した場合は、そのような変更を有するバリエーションを回避することができる。換言すると、特定の実施形態では、そのようなルーチンの実験から収集した情報に基づき、当業者は、単独でも他の変異との組合せでも、さらなる置換を回避すべきアミノ酸を容易に決定することができる。

20

## 【0088】

二次構造の予測を研究した科学文献はいくつもある。たとえば、Moult J., Curr. Op. in Biotech., 7(4):422-427 (1996), Chou et al., Biochemistry, 13(2):222-245 (1974); Chou et al., Biochemistry, 113(2):211-222 (1974); Chou et al., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148 (1978); Chou et al., Ann. Rev. Biochem., 47:251-276及びChou et al., Biophys. J., 26:367-384 (1979)を参照されたい。さらに、現在は、二次構造を予測するのに役立つコンピューター・プログラムも利用できる。二次構造を予測するひとつの方法は、相同性モデリングに基づくものである。たとえば、30%よりも高い配列同一性をもつ、あるいは40%よりも高い類似性をもつ2種のポリペプチドまたはタンパク質は、類似の構造トポロジーをもつことが多い。タンパク質構造データベース(PDB)の発展により、ポリペプチド構造におけるフォールド数の推測を含め、二次構造の予測可能性が増大している。たとえば、Holm et al., Nucl. Acid Res., 27(1):244-247 (1999)を参照されたい。所与のポリペプチドまたはタンパク質のフォールド数には限りがあって、構造の重要な数が解明すれば、格段に正確な予測が可能になる、とする研究もある(Brenner et al., Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376 (1997))。

30

40

## 【0089】

二次構造を予測するさらなる方法としては、「スレディング」(たとえば、Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87 (1997); Sippl et al., Structure, 4(

50

1) : 15 - 19 (1996) を参照のこと)、 「プロファイル分析」 (たとえば、Bowie et al., Science, 253 : 164 - 170 (1991) ; Gribskov et al., Meth. Enzym., 183 : 146 - 159 (1990) ; Gribskov et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 84 (13) : 4355 - 4358 (1987) を参照のこと)、 及び「進化的連結 (evolutionary linkage)」 (たとえば、Holm et al., Nucl. Acid. Res., 27 (1) : 244 - 247 (1999) 及び Brenner et al., Curr. Op. Struct. Biol., 7 (3) : 369 - 376 (1997) を参照のこと) が挙げられる。

10

#### 【0090】

特定の実施形態では、基準チャネルロドプシンまたはロドプシンドメイン (G t A C R) のバリエーションにはグリコシル化バリエーションが含まれ、グリコシル化部位の数及び/または種類は、基準の陰イオン伝導チャネルロドプシンまたはロドプシンドメイン (G t A C R) のアミノ酸配列に対して改変されている。特定の実施形態では、ポリペプチドのバリエーションは、天然のポリペプチドよりも多数または少数の N 連結グリコシル化部位を含む。N 連結グリコシル化部位は、配列 : A s n - X - S e r または A s n - X - T h r で特徴付けられ、X とされるアミノ酸残基は、プロリンを除くどのアミノ酸残基でもよい。アミノ酸残基を置換してこの配列を作ると、N 連結糖鎖の付加が可能な新たな部位ができる。あるいは、この配列を排する置換によって、既存の N 連結糖鎖が除去される。特定の実施形態では、N 連結糖鎖の再配置がなされ、1 つ以上の N 連結グリコシル化部位 (一般的には天然のもの) が除去され、1 つ以上の新しい N 連結部位が作られる。例示的バリエーションとしては、システインバリエーションが挙げられ、基準チャネルロドプシンまたはロドプシンドメイン (G t A C R) のアミノ酸配列に対し、1 つ以上のシステイン残基が欠失しているか、別のアミノ酸 (たとえば、セリン) で置換されている。特定の実施形態では、システインバリエーションは、不溶性封入体の単離後などにポリペプチドやタンパク質を生物学的に活性のあるコンフォメーションへと再度折り畳まなければならないときに便利であり得る。特定の実施形態では、システインバリエーションは、天然ポリペプチドよりもシステイン残基の数が少ない。特定の実施形態では、システインバリエーションは、対を形成しなかったシステインによる相互作用を最小限化するために、偶数のシステイン残基を有する。

20

30

#### 【0091】

特定の実施形態においては、アミノ酸置換は、次のようなものである : (1) タンパク質分解されにくくする、(2) 酸化しにくくする (3) タンパク質複合体を形成する結合親和性を改変する、(4) 結合親和性を改変する、かつ/または (4) そのようなポリペプチドに他の物理化学的または機能的特性を付与したまたは修飾する。特定の実施形態においては、1 つまたは複数のアミノ酸置換 (特定の実施形態では、保存アミノ酸置換) を、天然配列中 (特定の実施形態では、分子間接触を形成しているドメイン (複数可) 外のポリペプチドの一部) に設けることができる。特定の実施形態では、保存アミノ酸置換は、一般に、基準配列の構造特徴を大幅に変えてはならない (たとえば、特定の実施形態では、置換アミノ酸は、基準配列に生じる螺旋体を壊すようなものや、この基準配列を特徴付ける他の種類の二次構造を中断させるものであってはならない)。

40

#### 【0092】

当業界で認識されているポリペプチドの二次構造及び三次構造の諸例が、たとえば Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)) ; Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)) ; 及び Thornton et al., Nature 354 : 105 (1991) などで説明されている。

50

## 【0093】

他の実施形態では、改良された特性及び特徴を有するACRを提供する方法及び組成物が提供され、そのような特性及び特徴により、とりわけ光遺伝学的技法において該組成物の利用性が拡大する。改良された特性としては、限定ではないが、ヒトコドンに使用でき、合成できるようにすることが挙げられる。これらの実施形態は、光開閉型の塩素イオン伝導により、高い感受性及び高効率の膜過分極、及び神経細胞サイレンシングを提供する。

## 【0094】

## B．融合タンパク質

ポリペプチドもしくはペプチドまたはペプチドの切断型もしくは変異体バージョンが、無関係のまたは相同性のタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドと融合されており、本明細書で説明する所望のペプチドをコードする核酸及び/またはアミノ酸配列に基づき設計することができる、融合タンパク質の使用。そのような融合タンパク質としては、限定ではないが、タンパク質またはペプチドを安定させ、インビボの半減期を延長するIgFc融合；融合タンパク質を細胞膜に固定できるような任意のアミノ酸配列との融合；またはマーカー機能を提供する酵素、蛍光タンパク質、もしくは発光タンパク質との融合が挙げられる。相同タンパク質への融合タンパク質としては、限定ではないが、関連機能をもつ陰イオン伝導チャネルロドプシンの相同（オルソログまたはパラログ）タンパク質の一部分と融合させる陰イオン伝導チャネルロドプシンの一部分をコードするように操作された遺伝子から生産されるものが挙げられる。たとえば、異種のチャネルロドプシ同士のキメラを、それぞれに固有の有益な特性を組み合わせるように、作製することができる。いくつかの態様では、この実施形態のキメラチャネルロドプシンは、第1のチャネルロドプシン由来の配列の約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%を含み、残りの配列は第2のチャネルロドプシンに由来する。いくつかの態様では、キメラチャネルロドプシンは、第1のチャネルロドプシンのロドプシンドメインを含み、残りの配列は第2のチャネルロドプシンに由来する。さらなる態様では、キメラチャネルロドプシンは、第1のチャネルロドプシンの膜貫通ドメインを1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ含むことができ、残りの膜貫通ドメインは第2のチャネルロドプシンに由来する。

## 【0095】

特定の実施形態では、融合タンパク質は、発現している該融合タンパク質に選択的に結合する抗体を使って容易に精製することができる。代替の実施形態では、融合タンパク質の精製は、ペプチドをコードする核酸配列を組換えプラスミドまたはその一部分にサブクローニングし、アミノ末端（N末端）またはカルボキシ末端（C末端）のヒスチジン6残基からなるタグ（「Hisタグ」；たとえば、Janknecht et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-8976, 1991を参照のこと）に翻訳により融合させることで実施できる。そのようなコンストラクトを発現している細胞からの抽出物を、Ni<sup>2+</sup>ニトリロ酢酸-アガロースカラムにロードし、ヒスチジntagがついたタンパク質をイミダゾールを含有する緩衝液を用いて選択的に溶出させる。

## 【0096】

## C．チャネルロドプシンをコードする核酸

いくつかの実施形態では、異種プロモーター配列に機能的に連結された組換え核酸が提供され、この組換え核酸は、配列番号1、配列番号3または配列番号13から選択されるアミノ酸配列と少なくとも85%の相同性を有するペプチドをコードする配列；または、配列番号1、配列番号3または配列番号13から選択される連続する225アミノ酸で構成されるペプチドをコードする配列；または、配列番号2、配列番号4またはその相補のヌクレオチド配列にハイブリダイズする配列を含んでいる。

## 【0097】

いくつかの実施形態では、藻類由来の高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプ

シンをコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子が提供される。いくつかの実施形態では、ロドプシンドメインは、その配列が配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 で説明されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、配列番号 1 または配列番号 3 で示すアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子が提供される。いくつかの実施形態では、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む発現ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、配列番号 1 もしくは配列番号 3 のアミノ酸配列をコードする核酸配列、または配列番号 2 もしくは配列番号 4 の核酸配列の核酸配列またはその一部分の断片を含む発現ベクターを含む宿主細胞が提供される。

#### 【0098】

いくつかの実施形態では、cDNA に由来しかつ ACR のロドプシンドメインをコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子が提供される。いくつかの実施形態では、ロドプシンドメインは、その配列が配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 で説明されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、配列番号 1 または配列番号 3 で示すアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む cDNA に由来する、単離された核酸分子が提供される。いくつかの実施形態では、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む発現ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、cDNA に由来し、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む組換え発現ベクターを含む宿主細胞が提供される。

#### 【0099】

いくつかの実施形態では、高効率で高感受性の ACR の 7TM またはロドプシンドメインをコードする cDNA 由来核酸配列の少なくとも一部分によってコードされるアミノ酸配列を含む単離されたペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、配列番号 1 または配列番号 3 のアミノ酸配列をコードする cDNA 由来核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含む単離されたペプチドが提供される。

#### 【0100】

いくつかの実施形態では、高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンに由来する陰イオンロドプシンドメインをコードする核酸配列によってコードされる連続配列を含む、単離されたペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、配列番号 1、配列番号 3 またはその断片のアミノ酸配列を含む単離されたペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 からなる群の核酸配列の少なくとも一部分によってコードされ陰イオンロドプシンまたは陰イオン伝導チャネルロドプシンとして機能するアミノ酸配列を含む、単離されたペプチドが提供される。

#### 【0101】

いくつかの実施形態では、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 のアミノ酸配列、または、配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 の cDNA 由来核酸配列によってコードされ陰イオン伝導チャネルロドプシンとして機能する 7TM ドメイン/ロドプシンドメインのアミノ酸配列を含む、単離されたペプチドが提供される。

#### 【0102】

いくつかの実施形態では、高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子が提供される。いくつかの実施形態では、ロドプシンは、その配列が配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 で示されるペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 で示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子が提供される。いくつかの実施形態では、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む発現ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む発現ベクターを含む宿主細胞が提供される。いくつかの実施形態では、高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードす

10

20

30

40

50

る配列を含むペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 のアミノ酸配列を含む単離されたペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、単離されたペプチドには、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 のアミノ酸配列、またはその断片が含まれる。

#### 【0103】

いくつかの実施形態では、単離された核酸分子が提供され、該核酸分子は、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 14 ~ 15 の配列を有する。他の実施形態では、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 14 ~ 15 で示されるなかから選択される核酸配列、及び配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 で示されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む発現ベクターが提供される。いくつかの実施形態では、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 14 ~ 15 で示す核酸配列、及び配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む発現ベクターを含む宿主細胞が提供される。いくつかの実施形態では、単離された核酸は、高効率で高感受性の陰イオン伝導チャンネルロドプシンのロドプシンドメインをコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 の連続する少なくとも 16 アミノ酸をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 の連続する少なくとも 20 アミノ酸をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号 1 または配列番号 3 の連続する少なくとも 35 アミノ酸をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号 1 または配列番号 3 の連続する少なくとも 50 アミノ酸をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 の連続する少なくとも 75 アミノ酸をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 の連続する少なくとも 33 アミノ酸をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 の任意の連続する部分を含むペプチドをコードする。

#### 【0104】

いくつかの実施形態では、Guillardia theta 由来の新規の陰イオン伝導チャンネルロドプシンのロドプシンドメインをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸が提供される。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 の連続する少なくとも 16 アミノ酸をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 の連続する少なくとも 20 アミノ酸をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 の連続する少なくとも 35 アミノ酸をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 の連続する少なくとも 50 アミノ酸をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 の連続する少なくとも 75 アミノ酸をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 の連続する少なくとも 33 アミノ酸をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 を含むペプチドをコードする。

#### 【0105】

いくつかの実施形態では、Guillardia theta の陰イオン伝導チャンネルロドプシンの機能的ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸。いくつかの実施形態では、配列番号 1、配列番号 3 もしくは配列番号 13 またはその断片のアミノ酸の少なくとも 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、75、100、125、150、175、200、205、210、215、220、225、228、229、230、235、240、250、255、260、265、270、275、280、285、290、



295、296またはそれ以上の連続するアミノ酸をコードする単離された核酸。さらに、いくつかの実施形態では、これらの整数間の任意の範囲。

【0106】

他の実施形態では、本発明は、配列番号1、配列番号3もしくは配列番号13またはその断片のアミノ酸と、いくつかの実施形態では約70%~約75%、さらなる実施形態では約75%~約80%、さらなる実施形態では約80%~90%、またはさらなる実施形態では約90%~約99%(たとえば95%)同一(または相同)であるアミノ酸を有する、単離されたポリペプチドまたはポリペプチドをコードする単離された核酸を提供する。

【0107】

他の実施形態では、本発明は、配列番号1、配列番号3もしくは配列番号13またはその断片のアミノ酸と、約70%~約75%;またはより好ましくは約75%~約80%;またはより好ましくは約80%~90%;またはさらに好ましくは約90%~約99%同一であるアミノ酸を有するポリペプチドをコードする単離された核酸を提供する。

【0108】

いくつかの実施形態では、コード配列そのものの長さに関わらず、核酸セグメントを、他のDNA配列と、たとえばプロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、さらなる制限酵素部位、複数のクローン化部位、他のコードセグメントなどと、組み合わせることができる。いくつかの実施形態では、たとえば、異種プロモーターに機能的に連結された、配列番号1もしくは配列番号3またはその断片のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を含む組換え核酸が提供される。

【0109】

特定の実施形態では、本発明は、配列番号2または配列番号4と一緒に使用することができる適切なプライマーから選択されるプライマーを用いて、テンプレート核酸からの増幅によって得られる、単離された核酸を提供する。

【0110】

いくつかの実施形態では、は本開示の方法のいずれかであり、発現ベクターとしては、限定ではないがAAVウイルスベクターが挙げられる。いくつかの実施形態では、は本開示の方法のいずれかであり、プロモーターは構成(constitutive)プロモーターである。いくつかの実施形態では、は本開示の方法のいずれかであり、構成プロモーターとしては、限定ではないが、CMVプロモーターまたはハイブリッドCMVエンハンサー/ニワトリ-アクチン(CAG)プロモーターが挙げられる。いくつかの実施形態では、は本開示の方法のいずれかであり、プロモーターとしては、限定ではないが、誘導性の及び/または細胞型に特異的なプロモーターが挙げられる。

【0111】

いくつかの実施形態では、配列番号1、配列番号3または配列番号13から選択されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含むcDNA由来核酸が提供される。いくつかの実施形態では、配列番号1、配列番号3または配列番号13から選択されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含むcDNA由来核酸が提供され、該cDNA由来核酸は、配列番号2、配列番号4、または配列番号14~15の核酸配列を含む。他の実施形態では、配列番号1、配列番号3または配列番号13から選択されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含むcDNA由来核酸を含む発現ベクターが提供される。

【0112】

本開示の方法及び組成物で使用されるチャネルロドプシン核酸配列としては、限定ではないが、本開示の藻類に由来する陰イオン伝導チャネルロドプシンの活性部分GtACR1(アミノ酸配列番号1、及び核酸配列の配列番号2)、GtACR2(アミノ酸配列番号3、及び核酸配列の配列番号4)が挙げられ、これらには、限定ではないが本明細書で説明するもの、たとえば限定ではないがロドプシンドメイン、限定ではないが本開示のロドプシンドメイン(配列番号1)などの本開示の藻類に由来する陰イオン伝導チャネルロドプシンの活性部分をコードする核酸配列が含まれる。

## 【0113】

いくつかの実施形態では、本開示の陰イオン伝導チャンネルロドプシンの限定ではないがロドプシンドメインなどの活性部分の使用には、本明細書で説明する配列（その発現ベクターも含む）の全部または一部分が含まれ、それに加えて使用が意図されるのが、本開示の陰イオン伝導チャンネルロドプシンの限定ではないがロドプシンドメインなどの活性部分をコードする任意のヌクレオチド配列、連続的なオープン読み枠（ORF）であり、該ORFは、本明細書で説明する陰イオン伝導チャンネルロドプシンまたはチャンネルオブシン配列の相補配列に厳密な条件下でハイブリダイズし（たとえば0.5MのNaHPO<sub>4</sub>、7%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、1mMのEDTA中65℃でのフィルター結合DNAへのハイブリダイゼーション、次いで0.1xSSC/0.1%SDS中68℃での洗浄（“Current Protocols in Molecular Biology”, Vol. 1 and 2 (Ausubel et al., eds., Green Publishing Associates, Incorporated, and John Wiley & Sons, Incorporated, New York, NY, 1989)））、機能的に等価な陰イオン伝導チャンネルロドプシン（または限定ではないがロドプシンドメインなどのその活性部分）遺伝子産物またはその活性部分をコードするものである。さらに使用が意図されるのは、陰イオン伝導チャンネルロドプシンのアミノ酸配列をコードするDNA配列の相補配列に、中程度に厳密な条件でハイブリダイズする（たとえば、0.2xSSC/0.1%SDS中42℃での洗浄（前掲の“Current Protocols in Molecular Biology”））が、なおも機能的に等価な陰イオン伝導チャンネルロドプシン産物をコードする任意のヌクレオチド配列である。陰イオン伝導チャンネルロドプシンの機能的等価物としては、限定ではないが、異種または同種（オルソログ、パラログ及びより広いホモログ）に存在する天然バージョンの陰イオン伝導チャンネルロドプシン、及び天然もしくは遺伝子操作（部位を指定した変異誘発、遺伝子シャッフル、または進化の誘導、たとえば米国特許第5,837,458号で説明しているもの）の変異体バージョンの陰イオン伝導チャンネルロドプシン、または限定ではないがロドプシンドメインなどのその活性部分が挙げられる。本開示には、特定されたチャンネルロドプシンのポリヌクレオチド配列の（遺伝コードの重複による）変性核酸バリエーションの使用も含まれる。

## 【0114】

さらに使用が意図されるのは、本明細書で説明する陰イオン伝導チャンネルロドプシン配列の対応領域と約99%、95%、90%、または約85%の類似率（たとえばウィスコンシン大学のGCG配列分析パッケージ（SEQUENCHER3.0、Gene Codes Corporation社、ミシガン州アナーバー）でデフォルトのパラメーターを用いるBLAST配列比較分析による測定）のポリヌクレオチド配列によってコードされる、陰イオン伝導チャンネルロドプシンORFまたはそれらの機能的等価物をコードするポリヌクレオチドである。

## 【0115】

特定の実施形態では、本発明は、アミノ酸配列中に、チャンネルロドプシンまたはその機能的部分もしくはバリエーション、たとえば特定されクローン化されているGtACR1及びGtACR2（配列番号1及び3）及びPsuACR1（配列番号13）のアミノ酸配列を含むタンパク質またはペプチドをコードする単離された核酸セグメント及び組換えベクターに関する。いくつかの実施形態では、チャンネルロドプシンの一部分及びは、全長チャンネルロドプシンのアミノ酸と同一ではないかまたは生物学的機能が等価である比較的少数のアミノ酸を有する。「機能的に等価」という用語は、当業界ではよく理解されている。したがって、特定されクローン化されたGtACR1（配列番号1）、GtACR2（配列番号3）またはPsuACR1（配列番号13）のアミノ酸と約70%～約80%；またはより好ましくは約85%～約90%；またはさらに好ましくは約90%～95%及び約99%同一のまたは機能的に等価なアミノ酸を有する配列。

## 【0116】

本発明の核酸セグメントは、コード配列そのものの長さに関わらず、他の配列と、たとえばプロモーター、ポリアデニル化シグナル、さらなる制限酵素部位、複数のクローン化部位、他のコードセグメントなどと組み合わせることができ、したがって全体の長さが互いにかなり異なり得る。したがって、ほとんどのような長さの核酸断片でも使用できるものと意図され、トータルの長さは、好ましくは、調製しやすさ及び所期の組換えDNAプロトコルでの使いやすさに応じて決められる。たとえば、配列番号1及び3のポリペプチドをコードする核酸に相補的な約10～15または20、30、または40ほどのヌクレオチドの、最大2000ほどの塩基対長さの断片を含む核酸断片を調製することができる。トータルの長さが約8000、7000、6000、5000、4000、3000、2000、1000、500、200、100及び約50塩基対のDNAセグメントも有用であると意図される。

10

#### 【0117】

いくつかの実施形態では、チャンネルロドプシンまたはその断片をコードする単離された核酸、及びチャンネルロドプシントタンパク質またはペプチドをコードしそのアミノ酸配列中に配列番号1及び3によるアミノ酸配列を含む核酸配列が組み込まれた組換えベクター。いくつかの実施形態では、チャンネルロドプシンまたはその断片をコードするタンパク質をコードする精製された核酸セグメント、組換えベクターは、さらに、該チャンネルロドプシンをコードする核酸セグメントに機能的に連結されたプロモーターを含む発現ベクターと定義することができる。

20

#### 【0118】

さらなる実施形態では、チャンネルロドプシンをコードする核酸セグメントを含む組換えベクターにより組み換えられた宿主細胞が提供される。組換え宿主細胞は、原核生物細胞でも真核生物細胞でもよい。本明細書では、「(遺伝子)操作された(engineered)」または「組換え」細胞という用語は、チャンネルロドプシンをコードする遺伝子などの組換え遺伝子が導入されている細胞を指すものとする。したがって、遺伝子操作された細胞は、組換え導入遺伝子を含まない天然細胞と区別される。したがって遺伝子操作された細胞は、人工的に導入された遺伝子(複数可)を有する細胞である。組換え導入遺伝子は、ゲノム遺伝子のコピーまたはcDNA遺伝子のコピーのいずれかになり、あるいはこの導入遺伝子と自然界では結合しないプロモーターに隣接して配置される遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、チャンネルロドプシンをコードする核酸配列と同一または相補的な、連続する約14、15～20、30、40、50、またはさらに約100～約200ほどのヌクレオチド区間からなる配列領域を有する核酸分子。

30

#### 【0119】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明するチャンネルロドプシンをコードする核酸配列は、クラスター化されて規則的に配置された短い回文配列のリピート(CRISPR)及びCRISPR関連(Cas)タンパク質を用いて宿主細胞ゲノムを標的とすることができる。Sander and Joung, Nature Biotechnology, 32(4): 347-355を参照されたい(参照により本明細書に援用する)。いくつかの実施形態では、CRISPR/CasヌクレアーゼまたはCRISPR/Casヌクレアーゼ系には、配列特異的にDNAに結合する非コードRNA分子(ガイド)RNA、及びヌクレアーゼ機能(たとえば2つのヌクレアーゼドメイン)を有するCasタンパク質(たとえばCas9)が含まれる。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼ及びgRNA(標的配列に対し特異的なcrRNAと固定tracrRNAの融合も含む)が細胞に導入される。一般には、gRNAの5'末端の標的部位は、相補性塩基対形成により、Casヌクレアーゼを遺伝子などの標的部位に向ける。いくつかの実施形態では、標的部位は、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列の、典型的にはNGGまたはNAGなどの5'側の位置に基づいて選択される。この点において、標的DNA配列に対応するようにガイドRNAの最初の20ヌクレオチドを修飾することによって、所望の配列をgRNAの標的とする。

40

#### 【0120】

50

いくつかの実施形態では、本明細書で説明するように、C R I S P R系は標的部位でD S Bを誘導し、続いて切断が生じる。他の実施形態では、「ニッカーゼ」とされるC a s 9バリエーションが用いられて、標的部位で単一鎖に切れ目（ニック）を入れる。いくつかの態様では、たとえば特異性を強化するため対のニッカーゼを用い、それぞれが1対の異なるg R N Aによって配向されて配列を標的とし、したがってニックが同時に導入されると5'オーバーハングが導入される。

#### 【0121】

いくつかの態様では、1つ以上のガイドR N A（リボ核酸）が、細胞で発現させたヌクレアーゼ活性をもつ酵素、たとえばヌクレアーゼ活性をもつD N A結合タンパク質を、D N A（デオキシリボ核酸）上の標的位置に配向し、この酵素はD N Aを切断し、本明細書で説明する外生ドナー核酸が、たとえば相同組換えによって、このD N Aに挿入される。例示的方法が、たとえば米国特許公開第20140357530号及び国際公開W O 2015006290で説明されており、両方を参照により本明細書に援用する。

10

#### 【0122】

したがって、本開示の特定の実施形態は、外生D N A（たとえば、チャネルロドプシンをコードする核酸配列）、及び、D N Aに共存し消化または切断し、そのD N Aに相同組換えなどによって該外生D N Aを挿入する、D N A結合タンパク質などのヌクレアーゼ酵素とガイドR N Aの使用に基づいている。当業者であれば、様々な目的でD N Aに結合させるためのそのようなD N A結合タンパク質は簡単にわかる。そのようなD N A結合タンパク質は、天然のものでもよい。本開示の範囲に含まれるD N A結合タンパク質としては、本明細書ではガイドR N Aと呼ばれるR N Aにガイドされることができるものが挙げられる。この態様によると、ガイドR N AとR N AによってガイドされるD N A結合タンパク質とは、D N Aに共存する複合体を形成する。そのようなヌクレアーゼ活性をもつD N A結合タンパク質は当業者には既知であり、ヌクレアーゼ活性をもつ天然D N A結合タンパク質、たとえばI I型C R I S P R系のC a s 9タンパク質などがこれに含まれる。このようなC a s 9タンパク質及びI I型C R I S P R系は当業界ではよく記述されている。M a k a r o v a e t a l . , N a t u r e R e v i e w s , M i c r o b i o l o g y , V o l . 9 , J u n e 2011 , p p . 467 - 477を、補足情報も含めて参照されたい（本明細書に参照により援用する）。

20

#### 【0123】

ヌクレアーゼ活性機能を有して二本鎖D N Aに切れ目を入れるかまたはそれを切断する、例示的D N A結合タンパク質。そのようなヌクレアーゼ活性は、ヌクレアーゼ活性を示す1つ以上のポリペプチド配列をもつD N A結合タンパク質から得ることができる。そのような例示的D N A結合タンパク質は、2つの別々のヌクレアーゼドメインを持つことができ、各ドメインは、二本鎖D N Aの特定の鎖を切断するかまたは切れ目を入れる役割を担う。ヌクレアーゼ活性を有する、当業者には既知の例示的ポリペプチド配列には、M c r A - H N Hヌクレアーゼ関連ドメイン及びR u v C様ヌクレアーゼドメインが含まれる。したがって、例示的D N A結合タンパク質は、天然の、M c r A - H N Hヌクレアーゼ関連ドメイン及びR u v C様ヌクレアーゼドメインを1つ以上含むものである。

30

#### 【0124】

##### D．組換え発現

本明細書で説明する所望のペプチドアミノ酸配列は、化学合成することができるが（たとえば“P r o t e i n s : S t r u c t u r e s a n d M o l e c u l a r P r i n c i p l e s”（C r e i g h t o n , e d . , W . H . F r e e m a n & C o m p a n y , N e w Y o r k , N Y , 1984）を参照のこと）、大きいポリペプチド配列は、当業界では周知の、所望のペプチドをコードする核酸配列を含む核酸を発現させる技法を用いる組換えD N A技術により生産するのが有利な場合もある。そのような方法により、ペプチドをコードするヌクレオチド配列及び転写と翻訳を制御する適切なシグナルを含む発現ベクターを作製することができる。これらの方法としては、たとえば、インビトロの組換えD N A技法、合成技法、及びインビボの遺伝子組換えが

40

50

挙げられる（たとえば、前掲の“Molecular Cloning, A Laboratory Manual”や“Current Protocols in Molecular Biology”を参照のこと）。あるいは、所望のペプチドをコードするRNA及び/またはDNAをコードするヌクレオチド配列を、たとえばシンセサイザーにより化学合成して作製することができる（たとえば、“Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach”（Gait, ed., IRL Press, Oxford, United Kingdom, 1984）を参照のこと）。

#### 【0125】

様々な宿主発現ベクター系を使って、ペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現させることができる。所望のペプチドまたはポリペプチドが可溶性であるかまたは可溶性の誘導体であるとき、このペプチドまたはポリペプチドを宿主細胞培養液から回収することができる。すなわち、このペプチドまたはポリペプチドが分泌されない場合は宿主細胞から、このペプチドまたはポリペプチドが宿主細胞によって分泌される場合は培養液から、回収することができる。しかし、好適な発現系には、細胞膜内に留められる所望のポリペプチドまたは機能的等価物を発現する、遺伝子操作された宿主細胞も含まれる。そのような発現系からの所望のペプチドの精製または濃縮は、適切な洗浄剤及び脂質ミセルを用いて、当業者には既知の方法により行うことができる。さらに、そのような遺伝子操作された宿主細胞自体は、ペプチドの構造的機能的特徴の保持が望ましいだけでなく、たとえば特定の薬物スクリーニングアッセイで生物学的活性の評価が望ましい状況で使用されることもある。

#### 【0126】

特定の用途では、一過性の発現系が望ましい。しかし、長期間高収率で組換えタンパク質またはペプチドを生産する場合、安定した発現が一般に好まれる。たとえば、所望のタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、または融合タンパク質を安定的に発現する細胞株を遺伝子操作で作製できる。ウイルス複製起点を含む発現ベクターを使用するのではなく、適切な発現制御要素（たとえば、プロモーター、エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）及び選択性マーカーによって制御されるDNAで宿主細胞を形質転換することができる。外来DNAを導入した後、遺伝子操作された細胞を濃縮培地で約1～2日かけて増殖させ、次いで選択培地に変更する。組換えプラスミドの選択性マーカーは、選択に対し耐性を与えるので、細胞はプラスミドを自体の染色体に安定的に組み込み、成長してフォーカスを形成する。次にそれをクローン化して細胞株にすることができる。この方法は、所望の遺伝子産物またはその一部分を発現する細胞株を遺伝子操作により作製するのに有利に使用できる。そのような遺伝子操作された細胞株は、所望のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの内在的な活性に影響を及ぼす化合物のスクリーニング及び評価で特に有用となり得る。

#### 【0127】

いくつかの選択系が使用でき、それらには、限定ではないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Wigler et al., Cell 11:223-232, 1977）、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Szybalska and Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026-2034, 1962）、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Lowy et al., Cell 22:817-823, 1980）遺伝子が含まれ、これらはそれぞれtk<sup>-</sup>細胞、hgprt<sup>-</sup>細胞、aprt<sup>-</sup>細胞で用いることができる。抗代謝耐性を基に、以下の遺伝子を選択することもできる：ジヒドロ葉酸レダクターゼ（dhfr）（メトトレキサートに対する耐性を与える（Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567-3570, 1980, 及びO'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527-1531, 1981））；グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（gpt）（ミコフェノール酸に

対する耐性を与える (Mulligan and Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072-2076, 1981); ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (neo) (アミノグリコシド G-418 に対する耐性を与える (Colbere-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1-14, 1981)); 及びハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ (hpt) (ハイグロマイシンに対する耐性を与える (Santerre et al., Gene 30:147-156, 1984))。

#### 【0128】

本開示の方法で使用するための組成物を提供するために使用することができる宿主細胞 / 発現系としては、限定ではないが、所望のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換えバクテリオファージ DNA、プラスミド DNA、またはコスミド DNA 発現ベクターで形質転換させた細菌 (たとえば、*E. coli*、*B. subtilis*) などの細菌; 所望のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換させた酵母 (たとえば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*); 所望のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換えウイルス発現ベクター (たとえば、バキュロウイルス) に感染させた昆虫細胞系; 組換えウイルス発現ベクター (たとえば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイクウイルス、TMV) に感染させた、または所望のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換えプラスミド発現ベクター (たとえば、Ti プラスミド) で形質転換させた植物細胞系; または所望のペプチドをコードするヌクレオチド配列及び哺乳類細胞のゲノム由来のプロモーター (たとえば、メタロチオネインプロモーター) または哺乳類ウイルス由来のプロモーター (たとえば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス 7.5 K プロモーター) を含む組換え発現コンストラクトを有する哺乳類細胞系 (たとえば、COS、CHO、BHK、293、3T3) が挙げられる。

#### 【0129】

細菌系では、発現させた所望の遺伝子産物の所期の用途に応じて、いくつもの異なる発現ベクターを有利に選択することができる。たとえば、そのようなタンパク質を大量に生産するとき、たとえば所望のペプチドを含む医薬組成物を生成したり、そのタンパク質の抗体を作ったりする場合には、容易に精製できる融合タンパク質産物の高レベルの発現を誘導するベクターが望ましいこともある。そのようなベクターとしては、限定ではないが: *E. coli* 発現ベクター pUR278 (Ruther and Muller-Hill, EMBO J. 2:1791-1794, 1983) (融合タンパク質が生産されるように、所望のペプチドをコードする配列を lacZ コード領域とインフレームで個別にベクター内に結合させることができる); pIN ベクター (Inouye and Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3110, 1985 及び Van Heeke and Schuster, J. Biol. Chem. 264:5503-5509, 1989) などが挙げられる。pGEX ベクター (GE Healthcare 社、ニュージャージー州ピスカタウェイ) も、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として所望のペプチド部分の発現に用いることができる。一般には、そのような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズに吸着させ、次いで遊離グルタチオンの存在下で溶離することによって、溶解細胞から容易に精製することができる。pGEX ベクターは、所望のペプチドをコードするクローン遺伝子産物を GST 部分から解放できるように、トロンピンまたはファクター Xa プロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

#### 【0130】

ある例示的な昆虫系では、*Autographa californica* 核多角体病ウイルス (AcNPV) が、所望のペプチドをコードする配列を発現させるためのベクターとして用いられる。このウイルスは *Spodoptera frugiperda* 細胞中で増殖する。所望のペプチドをコードする配列は、ウイルスの非重要領域 (たとえばポリヘドリン遺伝子) へと個別にクローン化され、AcNPV プロモーター (たとえばポリ

10

20

30

40

50

ヘドリンプロモーター)の制御下に置かれる。所望のペプチドをコードする配列の挿入が成功すると、その結果としてポリヘドリン遺伝子が不活化し、非閉塞組換えウイルス(すなわち、ポリヘドリン遺伝子によってコードされるタンパク質コートのないウイルス)が生産される。次に *Spodoptera frugiperda* 細胞をこの組換えウイルスに感染させ、挿入したポリヌクレオチドをこの細胞内で発現させる(たとえば、Smith et al., J. Virol. 46:584-593, 1983 及び米国特許第 4,215,051 を参照のこと)。

#### 【0131】

哺乳類宿主細胞では、いくつかのウイルスベースの発現系を利用することができる。発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合、所望のペプチドをコードするヌクレオチド配列を、アデノウイルス転写/翻訳複合体、たとえば、後期プロモーター及び三要素リーダー配列に連結することができる。次いでこのキメラ配列を、インビトロまたはインビボの組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入する。ウイルスゲノムの非重要領域(たとえば、領域 E1 または E3)に挿入すると、その結果として感染宿主内で生存でき所望のペプチド産物を発現させる能力のある組換えウイルスが生じる(たとえば、Logan and Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659, 1984 を参照のこと)。挿入された所望のペプチドをコードするヌクレオチド配列が高効率で翻訳されるように、特異的な開始シグナルを要することもある。これらのシグナルには ATG 開始コドン及び隣接する配列が含まれる。場合によっては、ATG 開始コドンをおそらくは含む外生翻訳制御シグナルが準備されることもある。さらに、開始コドンは、挿入した全体が確実に翻訳されるように、所望のペプチドをコードするコード配列の読み枠と一致していなければならない。これらの外生翻訳制御シグナル及び開始コドンは、天然でも合成でも様々な起源であってよい。適切な翻訳エンハンサー要素、転写ターミネーターなどを含めることによって、発現効率を高めることができる(たとえば、Nevins, CRC Crit. Rev. Biochem. 19:307-322, 1986 を参照のこと)。

#### 【0132】

酵母では、構成プロモーターまたは誘導的プロモーターを含むいくつかのベクターを使用することができる。概要としては、たとえば前掲の“Current Protocols in Molecular Biology” Ch. 13, Bitter et al., Meth. Enzymol. 153:516-544, 1987, “DNA Cloning”, Vol. II, Ch. 3 (Glover, ed., IRL Press, Washington, D.C., 1986); Bitter, Meth. Enzymol. 152:673-684, 1987, “The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Life Cycle and Inheritance” (Strathern et al., eds., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1981) 及び “The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression” (Strathern et al., eds., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1982) を参照されたい。

#### 【0133】

植物では、様々な異なる植物発現ベクターを用いることができ、所望のペプチドをコードする配列は、いくつかあるプロモーターのどれによって発現させてもよい。たとえば、CaMV の 35S RNA または 19S RNA プロモーター (Brisson et al., Nature 310:511-514, 1984) または TMV のコートタンパク質プロモーター (Takamatsu et al., EMBO J. 6:307-311, 1987) などのウイルスプロモーターを使用することができる。あるいは

は、RUBISCOの小サブユニットのプロモーター (Coruzzi et al., EMBO J. 3:1671-1679, 1984, and Broglie et al., Science 224:838-843, 1984) またはヒートショックプロモーター、たとえば大豆 hsp17.5-E または hsp17.3-B (Gurley et al., Mol. Cell. Biol. 6:559-565, 1986) などの植物プロモーターを使用することができる。これらのコンストラクトは、たとえばTiプラスミド、Riプラスミド、植物ウイルスベクター、直接DNA形質転換、マイクロインジェクション、または電気穿孔により、植物細胞に導入することができる。そのような技法の概要としては、たとえば、“Methods in Plant Molecular Biology”, Section VIIのWeissbach and Weissbach (Schuler and Zielinski, eds., Academic Press, Inc., New York, NY, 1988)、及び“Plant Molecular Biology”, 2<sup>nd</sup> Ed., Ch. 7-9 (Grierson and Covey, eds., Blackie & Son, Ltd., Glasgow, Scotland, United Kingdom, 1988)を参照されたい。

10

20

30

#### 【0134】

さらには、挿入された所望のペプチドをコードする配列の発現を調節する、または所望のペプチドをコードする核酸配列を所望どおりに修飾しプロセスする宿主細胞株を選択することができる。そのようなタンパク質産物の修飾（たとえば、グリコシル化）及びプロセッシング（たとえば、切断）は、そのタンパク質の特定の機能に影響を及ぼすことができる。種々の宿主細胞が、タンパク質及びペプチドの翻訳後プロセッシング及び修飾に関する特徴的な特定の機構を有している。適切な細胞株または宿主系は、発現する所望のタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドが正しくまたは所望どおりに修飾されプロセッシングされるように、選択することができる。そのために、所望のペプチドをコードする核酸配列の一次転写、及びグリコシル化及び/またはリン酸化の所望のプロセッシングができるような細胞機構を有する真核生物の宿主細胞が使用される。そのような哺乳類宿主細胞としては、限定ではないが、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、VERO細胞、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK)、HeLa細胞、サル腎臓細胞 (COS)、MDCK細胞、293細胞、3T3細胞、WI38細胞、ヒト肝細胞癌細胞（たとえば、HepG2）、及びU937細胞が挙げられる。

#### 【0135】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明する核酸配列の1つを含む組換え宿主細胞。いくつかの実施形態では、本明細書で説明するポリペプチドの1つを含むタンパク質組成物。

#### 【0136】

##### III. 使用方法

いくつかの実施形態では、本明細書で説明する高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンの、部位特異的変異誘発及びキメラ作製による分子操作バリエーション（活性が改善されているものもある）。いくつかの実施形態では、チャネルロドプシンは、走光性及び羞明応答の受容体として働く。チャネルロドプシンが光励起されると、細胞膜の脱分極が開始する。

40

#### 【0137】

いくつかの実施形態では、数種の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをクローン化し、哺乳類HEK293細胞で発現させるとチャネル活性があることが判明した。これらの方法により、新規の陰イオン伝導チャネルロドプシンバリエーションは、種々の用途のなかでもとりわけ光遺伝学に関して優れた特性をもつ、と判定された。

#### 【0138】

光遺伝学の、特に生きた動物での用途に関する主な難点のひとつが、生体組織によって刺激光が散乱し、ヘモグロビンに吸収されることである。長波長吸収の光遺伝学的ツール

50



は、こういった作用からの最小限の光減衰を示すが、ほとんどの微生物ロドプシンはこのカテゴリーに入らない。たとえば、他にもいくつかの有用な特性をもつので光遺伝学では脱分極ツールとして最も頻繁に使用されるChR2の最高吸収波長は、470nmである。

#### 【0139】

一般に、光遺伝学的ツールの長波長吸収は、刺激光の組織散乱とヘモグロビンによる吸収を最小限化することで、刺激光の透過度を増加させるのに望ましいとされている。いくつかの実施形態では、光遺伝学的微生物ロドプシンの長波長感受性は、3,4-デヒドロレチナール(A2レチナール)により強化された。A2レチナール(3,4-デヒドロレチナール)は天然レチノイドであり、その11シス体が特定の無脊椎動物、魚及び両生類の光受容体細胞中に見られ、このレチナールだけの場合もあるし、A1レチナールにさらに発色団がある場合もある。発色団のイオン環に追加の二重結合が存在すると、A1(通常の)レチナールにより形成される色素よりも長波長の光を吸収する色素になる。A1/A2比の変化によって、生物は外的環境に適応する間、自然に視覚スペクトル感受性を順応させるチューニングを行う。ブリーチした微生物ロドプシン(バクテリオロドプシン、ハロロドプシン、感覚性ロドプシンI及びII)をインビトロでオールトランス3,4-デヒドロレチナール(A2レチナール)で再構成しても、それらの吸収スペクトルが長波長にシフトする。いくつかの実施形態では、光遺伝学的ツールのスペクトル特性を、オールトランスA2レチナールの組込みによって修飾した。A2レチナールの付加により、イオンポンプもチャネルロドプシンも、吸収が大幅にレッドシフトした機能的色素を形成する。

10

20

#### 【0140】

いくつかの実施形態では、光遺伝学的微生物ロドプシンの長波長感受性は、A2レチナールを用いて増強させることができる。いくつかの実施形態では、発色団の置換は、光遺伝学的ツールの効率を改善するための相補的戦略となる。A1レチナールをA2レチナールで置換すると、試験ロドプシンは、一般にはその機能の他の側面を改変しなくても、スペクトル感受性がより長い波長に大きくシフトする。

#### 【0141】

光遺伝学的技法には、神経活動の操作と神経細胞機能の制御を可能にする、光活性化チャネルと酵素の導入が含まれる。したがって、いくつかの実施形態では、本開示の方法及び組成物は、細胞に導入され、細胞活性及び細胞機能の操作を容易にすることができる。たとえば米国特許出願第13/622,809号の米国特許公開第20130090454号、ならびにMattis, J., Tye, K. M., Ferenczi, E. A., Ramakrishnan, C., O'Shea, D. J., Prakash, R., Gunaydin, L. A., Hyun, M., Fenno, L. E., Gradinaru, V., Yizhar, O. and Deisseroth, K. (2012) Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. Nat. methods 9, 159-172;及びZhang, F., Vierock, J., Yizhar, O., Fenno, L. E., Tsunoda, S., Kianianmomeni, A., Prigge, M., Berndt, A., Cushman, J., Polle, J., Magnuson, J., Hegemann, P., and Deisseroth, K. (2011) The microbial opsin family of optogenetic tools. Cell 147, 1446-1457)を参照されたい。

30

40

#### 【0142】

光遺伝学的技法は、したがって本開示の方法及び組成物は、複雑な神経回路の機能及び正常な脳内及び様々な神経条件における情報処理を特徴付け、大脳皮質の機能を測定し、

50

学習と記憶のプロセスを特徴付け操作し、シナプス伝達と可塑性のプロセスを特徴付け操作し、遺伝子発現の光制御的な誘導を提供し、細胞の運動などの活動の光制御を提供するのに使用することができる。

#### 【0143】

本開示の方法及び組成物の臨床応用としては（限定ではないが）、次のような治療に関する光遺伝学アプローチが挙げられる：加齢による黄斑退化、糖尿病性網膜症、及び網膜色素変性症、ならびに光受容体細胞が失われるその他の状態の視覚障害の遺伝子治療として網膜の受容体後の神経細胞にチャンネルロドプシンを導入することによる視力回復；電気的ペースメーカー装置ではなく、房室束（ヒス束）の興奮性心筋細胞に組み込まれたチャンネルロドプシンを用いて心拍リズムを制御する、心機能制御；パーキンソン病患者のドーパミン関連運動機能障害の回復；鬱病の寛解；脊髄損傷後の呼吸の改善；幹細胞分化の非侵襲的制御、及び移植細胞の組織及びネットワーク機能に対する具体的な貢献の評価を可能にすること。電気的活性のあるどのような細胞群でも、たとえば限定ではないが、上述したような細胞や心筋細胞などは、ACR抑制の対象とすることができる。そのようなACRは、心筋細胞の活動電位の高效率での光抑制にも有用であり得るので、限定ではないが頻脈などの心機能不全の治療も可能になる。いくつかの実施形態では、本明細書で説明する組成物及び方法は、現行の心臓抗不整脈治療の電気生理学的な負の効果なしに心臓の細胞や組織を容易に光刺激すること、及び脳や心臓の異常興奮部位に特定した刺激またはサイレンシングによって症状を緩和することに使用することができる。いくつかの実施形態では、そのような光遺伝学的技法は、現在埋め込みデバイス治療を受けている人も含めた患者の不規則な心拍を鎮め、回復させ、またはリセットするのに用いることができる。

10

20

#### 【0144】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明する組成物及び方法は、直接的ウイルス遺伝子送達（たとえば限定ではないがAAV）により、または培養液中で生成または形質転換させた、ACRを担持するドナー細胞（たとえば限定ではないが心筋細胞、ブルキンエ細胞及びヒス束細胞など）を送達することにより、心臓の細胞または領域に影響を及ぼすのに用いることができる。

#### 【0145】

いくつかの実施形態では、神経細胞が媒介する障害に罹患している対象の細胞の膜過分極の方法であって、該方法には、該対象の細胞に、該細胞内で発現可能な陰イオン伝導チャンネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする配列番号1、配列番号3または配列番号13からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを送達すること；及び該ベクターを該細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシン発現の結果として膜過分極が生じる。

30

#### 【0146】

いくつかの実施形態では、神経細胞が媒介する障害に罹患している対象の神経細胞のサイレンシングの方法であって、該方法には、該対象の標的神経細胞に、該標的神経細胞内で発現可能な陰イオン伝導チャンネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする配列番号1、配列番号3または配列番号13からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを送達すること；及び該ベクターを該標的神経細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシン発現の結果として該標的神経細胞からのシグナルのサイレンシングが生じる。

40

#### 【0147】

いくつかの実施形態では、失明または盲目に罹患している対象の網膜の感光性を回復させる方法であって、該方法には、該対象の網膜に、網膜神経細胞内で発現可能な陰イオン伝導チャンネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする配列番号1、配列番号3または配列番号13からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを送達すること；及び該ベクターを該網膜神経細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシン発現により、該網膜神経細胞で高レベルの膜電位が得られる。

#### 【0148】

50

したがって、いくつかの実施形態では、陰イオン伝導チャネルロドプシン、高感受性で高効率の膜過分極を提供する光開閉型陰イオンチャネルが、G t A C R 1（配列番号1）及びG t A C R 2（配列番号3）として提供され、これらはG u i l l a r d i a t h e t aの陰イオン伝導チャネルロドプシンに由来しており、光遺伝学的技法及び光遺伝学的治療アプローチを強化するのに用いることができる。

【0149】

陰イオン伝導チャネルロドプシン、限定ではないがロドプシンドメインなどのその機能的または活性部分、及び機能的等価物としては、限定ではないが、天然バージョンのA C R及びそのオソログ及びホモログ、ならびに天然もしくは遺伝子操作（部位を指定した変異誘発、遺伝子シャッフル、または進化の誘導、たとえば米国特許第5,837,458号で説明しているもの）のA C R変異体バージョンが挙げられる。本開示の藻類A C R由来のポリヌクレオチド配列の（遺伝コードの重複による）変性核酸バリエーションの使用も含まれる。

【0150】

いくつかの実施形態では、神経細胞障害を治療する方法が提供され、該方法には、（a）標的神経細胞に、該標的神経細胞内で発現可能な高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする核酸発現ベクターを送達することであって、該ベクターは、高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードしプロモーター配列及び任意選択により転写制御配列に機能的に連結されたオープン読み枠を含んでおり；及び（b）該ベクターを該標的神経細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシン発現の結果として、該標的神経細胞を光曝露すると高感受性で高効率の膜過分極及び神経細胞サイレンシングが生じる。いくつかの実施形態では、ロドプシンドメインは、配列番号1または配列番号3によってコードされている。

【0151】

いくつかの実施形態では、神経細胞障害を治療する方法が提供され、該方法には、（a）標的神経細胞に、該標的神経細胞内で発現可能な藻類由来の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする核酸発現ベクターを送達することであって、該ベクターは、陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードしプロモーター配列及び任意選択により転写制御配列に機能的に連結されたオープン読み枠を含んでおり；及び（b）該ベクターを該標的神経細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシン発現によって、該標的神経細胞は光曝露されるとサイレンシングされる。いくつかの実施形態では、ロドプシンドメインは、配列番号1、配列番号3または配列番号13によってコードされている。

【0152】

いくつかの実施形態では、網膜の光感受性を回復する方法が提供され、該方法には、（a）網膜神経細胞に、該網膜神経細胞内で発現可能な高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする核酸発現ベクターを送達することであって、該ベクターは、高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードしプロモーター配列及び任意選択により転写制御配列に機能的に連結されたオープン読み枠を含んでおり；及び（b）該ベクターを該網膜神経細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシン発現によって、該網膜神経細胞が感光性になり、それによって該網膜またはその一部分の光感受性が回復する。いくつかの実施形態では、ロドプシンドメインは、配列番号1、配列番号3または配列番号13によってコードされている。

【0153】

いくつかの実施形態では、網膜の光感受性を回復する方法が提供され、該方法には、（a）網膜神経細胞に、該網膜神経細胞内で発現可能な高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする核酸発現ベクターを送達することであって、該ベクターは、高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードしプロモーター配列及び任意選択により転写制御配列に機能的に連結されたオープン読み枠を含んでおり；及び（b）該ベクターを該網膜神経細胞内で発現さ

せることが含まれ、ロドプシン発現によって、該網膜神経細胞が感光性になり、それによって該網膜またはその一部分の光感受性が回復する。いくつかの実施形態では、ロドプシンドメインは、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 によってコードされている。

【0154】

いくつかの実施形態では、レチナール光受容体細胞が変性しつつあるかまたは変性して死滅している失明または盲目に罹患している対象の網膜の感光性を回復する方法が提供され、該方法には、(a) 該対象の網膜に、網膜神経細胞内で発現可能な高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする核酸ベクターを送達することであって、該ベクターは、高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードしプロモーター配列及び任意選択により転写制御配列に機能的に連結されたオープン読み枠を含んでおり；及び(b) 該ベクターを該網膜神経細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシン発現によって、該網膜神経細胞が感光性になり、それによって該網膜またはその一部分の感光性が回復する。いくつかの実施形態では、ロドプシンドメインは、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 によってコードされている。

10

【0155】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明する組成物及び方法は、現行の心臓抗不整脈治療の電気生理学的な負の効果なしに心臓の細胞や組織を容易に光刺激すること、または、脳や心臓の異常興奮部位に特定した刺激またはサイレンシングによって症状を緩和することに使用することができる。いくつかの実施形態では、そのような光遺伝学的技法は、現在埋め込みデバイス治療を受けている人も含めた患者の不規則な心拍を鎮め、回復させ、またはリセットするのに用いることができる。

20

【0156】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明する組成物及び方法は、直接的ウイルス遺伝子送達（たとえば限定ではないが AAV）により、または培養液中で生成または形質転換させた、ACR を担持するドナー細胞（たとえば限定ではないが心筋細胞、ブルキンエ細胞及びヒス束細胞など）を送達することにより、心臓の細胞または領域に影響を及ぼすのに用いることができる。

【0157】

いくつかの実施形態では、電気的活性のある細胞が関与する障害に罹患している対象の電気的活性のある細胞の障害を治療する方法が提供され、該方法には、(a) 該対象の細胞に、該細胞内で発現可能な配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 から選択されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを送達すること；及び(b) 該ベクターを該電気的活性のある細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシン発現によって、該電気的活性のある細胞からのシグナルがサイレンシングされる。

30

【0158】

いくつかの実施形態では、電気的活性のある細胞が関与する障害に罹患している対象の電気的活性のある細胞の障害を治療する方法が提供され、該方法には、(a) 該対象に遺伝子導入細胞を送達することであって、該遺伝子導入細胞はその中で発現可能な配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 から選択されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含んでおり；及び(b) 該ベクターを該遺伝子導入細胞内で発現させることが含まれ、発現によって、電気的活性のある細胞からのシグナルがサイレンシングされる。

40

【0159】

いくつかの実施形態では、電気的活性のある細胞が媒介する障害に罹患している対象の電気的活性のある細胞のサイレンシングの方法が提供され、該方法には、(a) 該対象の標的神経細胞に、該標的神経細胞内で発現可能な陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 13 から選択されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを送達すること；及び(b) 該ベクターを該標的の電気的活性のある細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシ

50

ン発現の結果として、電気的活性のある細胞からのシグナルのサイレンシングが生じる。いくつかの実施形態では、組換え宿主細胞が提供され、該宿主細胞は、単離された電気的活性のある細胞である。

【0160】

いくつかの実施形態では、神経細胞障害を治療する方法であって、該方法には、(a) 標的神経細胞に、該標的神経細胞内で発現可能な高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする核酸発現ベクターを送達することであって、前記ベクターは、高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードしプロモーター配列及び任意選択により転写制御配列に機能的に連結されたオープン読み枠を含んでおり；及び(b) 該発現ベクターを該標的神経細胞内で発現させることが含まれ、陰イオン伝導チャネルロドプシン発現によって、該標的神経細胞は光曝露されるとサイレンシングされる。いくつかの実施形態では、上述の発現ベクターは、プロモーター配列とロドプシンドメイン配列とに機能的に連結された1つ以上の転写制御配列も含んでいる。いくつかの実施形態では、高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインは、配列番号1または3の全部または一部のアミノ酸配列、及び配列番号1または3のロドプシンドメイン配列、またはチャネルロドプシンのコードされたロドプシンドメインの生物学的活性を保持しているその生物学的活性断片を有しているか、または配列番号1または3のまたは該断片の生物学的活性のある保存アミノ酸置換バリエーションである。いくつかの実施形態では、発現ベクターとしては、AAVウイルスベクターが含まれる。いくつかの実施形態では、プロモーターは、構成プロモーターである。いくつかの実施形態では、構成プロモーターは、CMVプロモーターまたはハイブリッドCMVエンハンサー/ニワトリ - アクチン(CAG)プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、誘導性の及び/または細胞型特異的プロモーターである。

【0161】

いくつかの実施形態では、網膜の光感受性を回復する方法であって、該方法には、(a) 対象の網膜神経細胞に、該網膜神経細胞内で発現可能な高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする核酸発現ベクターを送達することであって、該発現ベクターは、高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードしプロモーター配列及び任意選択により1つ以上の転写制御配列に機能的に連結されたオープン読み枠を含んでおり；及び(b) 該発現ベクターを該網膜神経細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシン発現によって、該網膜神経細胞が感光性になり、それによって該網膜またはその一部分の光感受性が回復する。いくつかの実施形態では、高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインは、配列番号1または3の全部または一部のアミノ酸配列、及び配列番号1または3のロドプシンドメイン配列、または高効率で高感受性なチャネルロドプシンのコードされたロドプシンドメインの生物学的活性を保持しているその生物学的活性断片を有しているか、または配列番号1、3または13の、及び配列番号1、3または13のロドプシンドメイン配列のまたは該断片の生物学的活性のある保存アミノ酸置換バリエーションである。いくつかの実施形態では、発現ベクターとしてはAAV(たとえば、AAV2)ウイルスベクターが含まれる。いくつかの実施形態では、プロモーターは構成プロモーターである。いくつかの実施形態では、構成プロモーターは、CMVプロモーターまたはハイブリッドCMVエンハンサー/ニワトリ - アクチン(CAG)プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、誘導性の及び/または細胞型特異的プロモーターである。

【0162】

いくつかの実施形態では、レチナール光受容体細胞が変性しつつあるかまたは変性して死滅している失明または盲目に罹患している対象の網膜の感光性を回復する方法であって、該方法には、(a) 該対象の網膜に、網膜神経細胞内で発現可能な高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインをコードする核酸ベクターを送達することであって、該発現ベクターは、高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプ

シンのロドプシンドメインをコードしプロモーター配列及び任意選択により転写制御配列に機能的に連結されたオープン読み枠を含んでおり；及び（b）該発現ベクターを該網膜神経細胞内で発現させることが含まれ、ロドプシン発現によって、該網膜神経細胞が感光性になり、それによって該網膜またはその一部分の感光性が回復する。いくつかの実施形態では、高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインは、配列番号 1、3 または 13 の全部または一部のアミノ酸配列、及び配列番号 1、3 または 13 のロドプシンドメイン配列、または高効率で高感受性の陰イオン伝導チャネルロドプシンのコードされたロドプシンドメインの生物学的活性を保持しているその生物学的活性断片を有しているか、あるいは配列番号 1、3 または 13 の、及び配列番号 1、3 または 13 のロドプシンドメイン配列のまたは該断片の生物学的活性のある保存アミノ酸置換バリエーションである。いくつかの実施形態では、発現ベクターとしては AAV（たとえば、AAV2）ウイルスベクターが含まれる。いくつかの実施形態では、プロモーターは構成プロモーターである。いくつかの実施形態では、構成プロモーターは、CMV プロモーターまたはハイブリッド CMV エンハンサー/ニワトリ - アクチン（CAG）プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、誘導性の及び/または細胞型特異的プロモーターである。

10

#### 【0163】

A．治療剤としての組成物

チャネルロドプシン、または限定ではないがロドプシンドメインなどのその活性断片の治療剤としての使用。特定の実施形態では、本開示の組成物及び は、光遺伝学的技法及びその用途の改善のために用いられ、また、たとえば神経細胞が媒介する障害、神経障害（たとえばパーキンソン病）の診断、予防、及び/または治療の補助、及び視覚障害の治療としても用いることができる。

20

#### 【0164】

特定の実施形態では、本開示の組成物は、たとえば神経細胞が媒介する障害、神経障害（たとえばパーキンソン病）の治療、管理、及び/または予防のため、及び視覚障害の治療として、1 種以上の追加の化合物または剤（「追加の活性剤」）と併用で投与することができる。そのような治療剤は、たとえば、神経細胞が媒介する障害、神経障害（たとえばパーキンソン病）を治療または緩和するために、及び視覚障害の治療として、治療有効用量を患者に投与することができる。治療有効用量とは、疾患症状の発症の遅延、寛解、または妨害をもたらすのに十分な化合物の量を指す。

30

#### 【0165】

そのような組成物の毒性及び治療効果は、細胞培養液や実験動物でたとえば LD<sub>50</sub>（集団の 50 % 致死量）及び ED<sub>50</sub>（集団の 50 % 治療有効用量）を決定する、標準的な製薬上の手順によって決定できる。毒性と治療効果の用量比は治療指標であり、比率 LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub> と表現される。高い治療指標を示す組成物が好ましい。毒性の副作用を示す化合物も特定の実施形態では使用されることがあるが、ふつうは、非感染細胞に与えられる損傷を最小限化することによって有害事象を軽減させるために、そのような組成物の標的を罹患組織部位に特化するような送達系を設計するよう注意するはずである。

40

#### 【0166】

細胞培養アッセイや動物試験から得られるデータを用いて、ヒトに使用する用量範囲を計算することができる。そのような組成物の用量は、毒性がほとんどないかまったくない ED<sub>50</sub> を含めた循環濃度の範囲内であるのが好ましい。用量はこの範囲内で、用いられる剤形や利用される投与経路によって、変わることもある。あらゆる組成物について、治療有効用量は、まずは細胞培養アッセイから見積もることができる。用量は、細胞培養物で決定した IC<sub>50</sub>（すなわち、症状の半分最大抑制が得られる試験組成物の濃度）を含む循環血漿濃度が動物モデルで得られるように計算することができる。この情報を使って、ヒトで有用な用量をより正確に決定することができる。血漿レベルは、たとえば高速液体クロマトグラフィーにより測定することができる。

50

#### 【0167】

たとえば神経障害（たとえばパーキンソン病）の治療及び視覚障害の治療が意図される場合、適切な用量はまた、動物試験から、被験対象の体重 1 k g 当たりの生理活性剤の最大許容用量すなわち M T D を決定することもできる。一般には、試験される少なくとも 1 つの動物種は、哺乳類である。当業者は常にヒトなどの他の種に対する有効用量を推測し毒性を回避している。ヒトで有効性を試験する前に、第 I 相臨床試験により安全な用量を決定することができる。

#### 【 0 1 6 8 】

さらに、生理活性剤は、たとえばその生理活性剤の安定性を強化するような、またはそうではなくその薬理特性を強化するような（たとえば、インビボ半減期の延長、毒性低下など）、定評のあるあらゆる組成物または構造物と結合させてもよい複合体を形成してもよい。

10

#### 【 0 1 6 9 】

そのような治療剤は、当業者には知られているいくつかの方法のどれでも投与することができ、該方法としては、限定ではないが、吸引、皮下注射（s u b - q）、静脈内注射（I . V .）、腹腔内注射（I . P .）、筋内注射（I . M .）、または髄腔内注射、あるいは局所塗布（経皮剤、軟膏、クリーム、膏薬、点眼薬など）が挙げられ、以下により詳しく説明する。

#### 【 0 1 7 0 】

##### B . 医薬組成物

本明細書で説明する組成物にしたがい使用される医薬組成物は、1 種以上の生理学的に許容される担体または賦形剤を使って一般的な方法で製剤することができる。

20

#### 【 0 1 7 1 】

医薬組成物は、たとえば組成物の p H、モル浸透圧濃度、粘度、透明度、色、等張性、匂い、滅菌性、安定性、溶出もしくは放出速度、吸着性もしくは浸透性を改変、維持、または保存するための製剤材料を含むことができる。好適な製剤材料としては、限定はないが：アミノ酸（たとえば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン及びリジン）；抗菌剤；抗酸化剤（たとえば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム及び亜硫酸水素ナトリウム）；緩衝液（たとえば、ホウ酸、炭酸水素、トリス H C l、クエン酸、リン酸などの有機酸）；バルク剤（たとえば、マンニトールやグリシン）；キレート剤（たとえば、エチレンジアミンテトラ酢酸（E D T A））；錯化剤（たとえば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベータ - シクロデキストリン、及びヒドロキシプロピル - ベータ - シクロデキストリン）；充填剤；モノサッカライド、ジサッカライドなどの糖類（たとえば、グルコース、マンノース及びデキストリン）；タンパク質（たとえば、血清アルブミン、ゼラチン及び免疫グロブリン）；着色剤、香料、及び希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（たとえば、ポリビニルピロリドン）；低分子量ポリペプチド；塩形成対イオン（たとえばナトリウム）；保存料（たとえば、ベンザルコニウム塩素イオン、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロロヘキシジン、ソルビン酸及び過酸化水素）；溶媒（たとえば、グリセリン、プロピレングリコール及びポリエチレングリコール）；糖アルコール（たとえば、マンニトールやソルビトール）；懸濁剤；界面活性剤または湿潤剤（たとえば、プルロニック、P E G、ソルビタンエステル、ポリソルベート（たとえば、ポリソルベート 2 0 やポリソルベート 8 0）、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール及び t y l o x a p a l）；安定化剤（たとえば、スクロースやソルビトール）；浸透圧改良剤（たとえば、アルカリ金属ハロゲン化物（たとえば、ナトリウム塩素イオンまたはカリウム塩素イオン）、マンニトール、及びソルビトール）；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤；及び製薬上アジュバント（“ R e m i n g t o n ’ s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s ” , 1 8 <sup>t h</sup> E d . （ G e n n a r o , e d . , M a c k P u b l i s h i n g C o m p a n y , E a s t o n , P A , 1 9 9 0 ））が挙げられる。

30

40

#### 【 0 1 7 2 】

さらに、本明細書で説明する治療ペプチドを半減期延長ビヒクルに結合させることがで

50

きる。特定の例示的半減期延長ビヒクルは当業界では既知であり、限定ではないが、F c ドメイン、ポリエチレングリコール、及びデキストランが挙げられる（たとえば、P C T 国際出願 W O 9 9 / 2 5 0 4 4 を参照のこと）。

【 0 1 7 3 】

これらの剤は、注射による、たとえばボーラス注射や持続点滴による非経口投与用に製剤することができる。注射用製剤は、たとえば、保存料と一緒に、アンプルや反復用量容器内で単位剤形とすることができる。組成物は、水系または油系のビヒクル中の懸濁剤、溶液または乳液の形態であってもよく、懸濁剤、安定剤及び/または分散剤などの配合剤を含んでいることもある。あるいは、活性成分は、好適なビヒクル、たとえば、滅菌されたパイロジェン除去済みの水で使用前に構成される粉末形態とすることもできる。

10

【 0 1 7 4 】

この剤は、たとえば一般的な坐薬基剤であるココアバターやその他グリセリドなどを含む坐薬や停留浣腸剤などの直腸投与用の組成物として製剤することもできる。

【 0 1 7 5 】

既に説明した各種製剤に加えて、剤は、デポー調製物として製剤することもできる。このような長時間作用する製剤は、埋め込み（たとえば皮下や筋内）または筋内注射によって投与されることがある。たとえば、剤は、（たとえば許容される油中の乳剤として）好適なポリマー材料もしくは疎水性材料といっしょに、またはイオン交換樹脂といっしょに、あるいはやや難溶性の誘導体として、たとえばやや難溶性の塩として、製剤することができる。組成物は、所望により、活性成分を含有する1つ以上の単位剤形を収容することができる包装体またはディスペンサー装置に入っているもよい。包装体には、たとえば、金属フォイルまたはプラスチックフォイル、たとえばプリスター・バックなどが含まれることがある。包装体またはディスペンサー装置には、投与時の注意事項が添付されることがある。

20

【 0 1 7 6 】

活性組成物は、当業者には周知の放出制御手段または送達デバイスによって投与することができる。その例としては、限定ではないが、米国特許第3,845,770号、同第3,916,899号、同第3,536,809号、同第3,598,123号、同第4,008,719号、同第5,674,533号、同第5,059,595号、同第5,591,767号、同第5,120,548号、同第5,073,543号、同第5,639,476号、同第5,354,556号、及び同第5,733,566号で説明されているものが挙げられる。そのような剤形は、あらゆる比率の所望の放出プロファイルを提供するために、たとえば、ヒドロプロピルメチルセルロース、その他のポリマーマトリックス、ジェル、浸透膜、浸透圧系、多層コーティング、マイクロ粒子、リボソーム、マイクロスフィア、またはそれらの組合せを用いて1種以上の活性成分を徐放するかまたは放出制御することができる。例示的な徐放性マトリックスとしては、限定ではないが、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリ乳酸（たとえば米国特許第3,773,919号及び欧州特許出願 E P 0 5 8 , 4 8 1 号を参照のこと）、L - グルタミン酸とガンマエチル - L - グルタミン酸のコポリマー（たとえば Sidman et al., Biopolymers 22:547-556, 1983）、ポリ(2 - ヒドロキシエチル - メタクリレート)（たとえば Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, 1981、及び Langer, Chemtech 12:98-105, 1982 を参照のこと）、エチレン酢酸ビニル（前掲の Langer et al.）、及びポリ - D ( - ) - 3 - ヒドロキシブチル酸（欧州特許出願 E P 1 3 3 , 9 8 8 号）が挙げられる。徐放性組成物としては、当業界で知られているいくつかの方法のいずれかで調製することができるリボソーム（たとえば, Epps et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692, 1985 及び欧州特許出願 E P 0 3 6 , 6 7 6 号、E P 0 8 8 , 0 4 6 号、及び E P 1 4 3 , 9 4 9 号）が挙げられる。本開示の組成物に使用される、本明細書で説明するものも含めて当業者には既知の好適な放出制御剤は、容易に選択

30

40

50



することができる。特定の実施形態には、限定ではないが放出制御用のタブレット、カプセル、ジェルキャップ、及びカプレットなどの経口投与に適した単回単位剤形が含まれる。

#### 【0177】

すべての放出制御剤に共通する目的は、非放出制御剤で得られる治療効果よりも高い治療効果を得ることである。理想としては、最適な設計の放出制御調製物を医療に使用する際の特徴は、最小限の薬物を用いて最小限の時間で病状を治療または制御することである。放出制御剤の利点としては、薬物の活性が続くこと、投与回数が少ないこと、及び患者コンプライアンスが高いことが挙げられる。さらに、放出制御剤は、作用が開始する時間または薬物の血中レベルなどのその他の特徴を左右するために用いられることもあり、したがって副作用（たとえば有害事象）の発生を左右することができる。

10

#### 【0178】

ほとんどの放出制御剤は、所望の治療効果が直ちに生じる量の活性成分を最初に放出し、その後は長期間にわたりこの治療効果レベルまたは予防効果レベルが維持できるように、継続的に徐々にその他の量の活性成分を放出するように設計されている。この活性成分の比較的一定したレベルを体内で維持するためには、代謝されて体外に排出される活性成分量を補う速度で薬物が剤形から放出されなくてはならない。活性成分の放出制御は、限定ではないがpH、温度、酵素、水またはその他の生理的な条件もしくは組成などの様々な条件によって刺激することができる。

20

#### 【0179】

場合によっては、本開示の方法及び組成物の活性成分は、一度に、または同じ投与ルートで患者に投与しないことが好ましい。したがって、いくつかの実施形態では、医療関係者が使用する場合に患者への適量の活性成分の投与を簡素化するキットが提供される。

#### 【0180】

典型的なキットには、本開示の治療剤の1種以上の単回単位剤形が、単剤で、または本開示の組成物との併用が可能な別剤の単回単位剤形との組合せで、含まれる。本開示のキットはさらに、活性成分の投与に使用されるデバイスを含むことができる。そのようなデバイスの例としては、限定ではないが、シリンジ、点滴バッグ、パッチ、及び吸引器が挙げられる。

30

#### 【0181】

本開示のキットはさらに、1種以上の活性成分の投与に用いることができる製薬上許容されるビヒクルを含むことができる。たとえば、活性成分が、非経口投与用に再構成する必要のある固体として提供される場合、キットは、好適なビヒクルの密封容器を含むことができ、その中に活性成分を溶解させて、非経口投与に適した、微粒子を含まない滅菌溶液を形成することができる。製薬上許容されるビヒクルの例としては、限定ではないが、注射USP用の水；水系ビヒクル、たとえば限定ではないがナトリウム塩素イオン注射、リンゲル注射、デキストロース注射、デキストロースとナトリウム塩素イオン注射、及び乳酸リンゲル注射；水混和性ビヒクル、たとえば限定ではないが、エチルアルコール、ポリエチレングリコール、及びポリプロピレングリコール；並びに非水系ビヒクル、たとえば限定ではないがコーン油、綿実油、落花生油、ゴマ油、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、及び安息香酸ベンジルが挙げられる。しかし、特定の実施形態では、本開示の剤形は、アルコール類、またはその他の共溶媒、油、タンパク質を一切含まない。

40

#### 【0182】

##### C. 遺伝子導入動物

本開示は、藻類由来の陰イオン伝導チャネルロドプシン導入遺伝子を全細胞中に担持しているヒト遺伝子導入動物と非ヒト遺伝子導入動物、ならびに藻類由来の陰イオン伝導チャネルロドプシン導入遺伝子を全部ではなく一部の細胞中、たとえば特定の電気的活性のある細胞中に担持している非ヒト遺伝子導入動物を作製し使用方法及び組成物を提供する。ヒト及びあらゆる種の非ヒト哺乳類、たとえば限定ではないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、ミニブタ、ヤギ、及び非ヒト霊長類、たとえば、ヒヒ、サル

50

、及びチンパンジーが、藻類由来の陰イオン伝導チャンネルロドプシンポリヌクレオチドを担持する（及び／または、藻類由来のポリペプチドを発現させる）遺伝子導入動物の作製に用いることができ、単一の導入遺伝子として、またはたとえばヘッドトゥーヘッドまたはヘッドトゥーテールに並べてコンカテマーとして、組み込むことができる。藻類由来の陰イオン伝導チャンネルロドプシン導入遺伝子はまた、特定の細胞型に選択的に導入し、活性化させることもできる（たとえば *Lakso et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6232-6236, 1992 を参照されたい）。そのような細胞型に特異的な活性化に必要な制御配列は、対象とする細胞型によって決まり、当業者にとっては明白である。

#### 【0183】

藻類由来陰イオン伝導チャンネルロドプシンまたはその断片の導入遺伝子を、哺乳類陰イオン伝導チャンネルロドプシン遺伝子の内在コピーの染色体部位に組み込むことが望ましい場合は、標的遺伝子組換えが一般的に好ましい。簡単に説明すると、そのような技法を用いる場合、内在性陰イオン伝導チャンネルロドプシン遺伝子に相同ないくつかのヌクレオチド配列を含むベクターが、それらのヌクレオチド配列を染色体配列との相同組換えによって内在性チャンネルロドプシン遺伝子に組み込み、機能を欠損させるように、設計される（すなわち「ノックアウト」動物）。こうすれば、非機能的配列を内在性チャンネルロドプシン遺伝子に挿入することによって、内在性チャンネルロドプシン遺伝子の発現を排除することもできる。導入遺伝子は、特定の細胞型に選択的に導入することもできるので、その細胞型でだけ内在性チャンネルロドプシン遺伝子を不活化することができる（たとえば *Guet al., Science* 265:103-106, 1994）。そのような細胞型に特異的な不活化に必要な制御配列は、対象とする細胞型によって決まり、当業者にとっては明白である。

#### 【0184】

当業界で知られているあらゆる技法を用いて、チャンネルロドプシンまたはその断片の導入遺伝子を動物に導入して遺伝子導入動物の樹立系統を作ることができる。そのような技法としては、限定ではないが、前核マイクロインジェクション（米国特許第4,873,191号）；レトロウイルスによる生殖系細胞への遺伝子導入（*van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6148-6152, 1985）；胚性幹細胞の標的遺伝子組換え（*Thompson et al., Cell* 56:313-321, 1989）；胚の電気穿孔（*Lo, Mol. Cell. Biol.* 3:1803-1814, 1983）；精子による遺伝子導入（*Lavitrano et al., Cell* 57:717-723, 1989）；及び米国特許第5,464,764号で説明されるような陽性陰性の選択が挙げられる。そのような技法の概要としては、たとえば *Gordon, Int. Rev. Cytol.* 115:171-229, 1989 を参照されたい。

#### 【0185】

遺伝子導入動物を作製したら、組換えチャンネルロドプシン遺伝子またはその断片の発現について、標準的技法を活用して検定することができる。初回スクリーニングでは、サザンブロット解析またはPCR技法により動物組織を分析して、チャンネルロドプシン導入遺伝子が組み込まれたかどうかを検定することができる。遺伝子導入動物の組織におけるチャンネルロドプシン導入遺伝子のmRNAの発現レベルは、限定ではないが、動物から採取された細胞型試料のノザンブロット解析、インサイツのハイブリダイゼーション解析、及びRT-PCRなどの技法によって評価することもできる。藻類由来のチャンネルロドプシンの発現組織の試料は、チャンネルロドプシン導入遺伝子産物に対して選択性のある抗体を用いて、免疫細胞化学的に評価することもできる。

#### 【0186】

##### D. 導入遺伝子による治療

特定の実施形態では、本開示の組成物及び は、光遺伝学的技法及び用途を改善するた

10

20

30

40

50

めに用いられ、また、神経障害、たとえば限定ではないがパーキンソン病ならびに視覚障害の診断、予防、及び/または治療の補助にも使用することができる。

【0187】

いくつかの実施形態では、方法及び組成物が、藻類由来の複数のチャネルロドプシンを特定し特徴決定するのに用いられる。チャネルロドプシンのロドプシンドメインのクローニング及び発現、及び哺乳類細胞での発現は、これらのチャネルロドプシンの改良された特徴を光遺伝学的用途ならびに治療剤に使用できることを示している。

【0188】

たとえば、本開示の方法及び組成物は、たとえば哺乳類のレチナール遺伝子治療に用いることができる（他もあるがとりわけ米国特許第5,827,702号、同第7824869号及び米国特許公開第20100015095号ならびにWIPOパンフレットWO2000/15822及びWO1998/48097で説明されているもの）。外生核酸が細胞に吸収されて発現するような条件下で該細胞に該外生核酸を接触させて、遺伝子操作された視覚細胞を生産する。外生核酸は、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはプラスミドとして説明される。組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)を使ったレチナールのレポーター遺伝子、緑色蛍光タンパク質(GFP)の遺伝子導入が健常な霊長類で実証されている(Bennett, J et al. 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 9920-25)。光受容体の急速変性モデルにおけるRP65遺伝子変異を使用しての遺伝子治療、及び変異遺伝子を正常遺伝子と置換または交換する置換治療による光受容体の救済（たとえば米国特許公開第2004/0022766号を参照のこと）が、自然に生じた重篤なレチナール変性疾患のイヌモデル（ヒトLCAと似ているRPE65変異イヌ）の治療に使用されている。ウイルスを使った遺伝子治療方法で、罹患した網膜の生存している網膜神経細胞において感光性膜チャネルまたは分子を発現させることにより、本発明は、回復した視野の空間的・時間的解像度が高い、失明または盲目の恒久的な治療を行うことができる。

【0189】

本開示の陰イオン伝導チャネルロドプシンの活性部分をコードする核酸配列としては、限定ではないが、配列番号1、3及び13で特定されているロドプシンドメインまたは配列番号2のロドプシンドメイン配列をコードする核酸配列が挙げられる。

【0190】

いくつかの実施形態では、真核生物の神経細胞などの細胞の標的ポリヌクレオチドを修飾する方法が提供される。いくつかの実施形態では、この方法には、CRISPR複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて、該標的ポリヌクレオチドを切断し、そうすることでこの標的ポリヌクレオチドを修飾することが含まれ、このCRISPR複合体は、該標的ポリヌクレオチドの標的配列にハイブリダイズしたガイド配列と複合体をなすCRISPR酵素を備えており、該ガイド配列は、tracr配列にハイブリダイズするtracrメイト配列に結合している。いくつかの実施形態では、該切断には、標的配列の位置での該CRISPR酵素による1本または2本の鎖の切断が含まれる。いくつかの実施形態では、該切断の結果、標的遺伝子の転写が減少する。いくつかの実施形態では、この方法はさらに、該切断された標的ポリヌクレオチドを外生テンプレートポリヌクレオチドとの相同組換えによって修復することを含み、該修復の結果として、チャネルロドプシンをコードする1つ以上のヌクレオチドが該標的ポリヌクレオチドに挿入される。

【0191】

ある例示的なDNA結合タンパク質は、II型CRISPR系の、RNAにガイドされるDNA結合タンパク質である。ある例示的なDNA結合タンパク質は、Cas9タンパク質である。一態様においては、遺伝子操作されたCas9-gRNA系が提供され、これは所望により部位特異的な、RNAにガイドされるゲノム切断、及び本明細書で提供する外生チャネルロドプシンをコードする核酸の挿入によるゲノム修飾を可能にする。ガイドRNAは、DNA上の標的部位または標的座位に対し相補的である。ガイドRNAは、crRNA-tracrRNAキメラであってもよい。Cas9は、標的のゲノムDNA

に、またはその近くに結合する。1つ以上のガイドRNAは、標的のゲノムDNAに、またはその近くに結合する。Cas9は標的のゲノムDNAを切断し、このDNAの切断部位に外生ドナーDNAが挿入される。

#### 【0192】

したがって、方法は、ガイドRNAをCas9タンパク質及びチャネルロドプシンをコードする外生核酸といっしょに用いることによって、RNAをコードする核酸及び外生ドナー核酸の挿入、RNAの発現、DNAを切断するようなRNAとCas9と該DNAの共存、及び外生ドナー核酸の挿入を繰り返すことによって、チャネルロドプシンをコードする外生核酸をCas9発現細胞内のDNAに多重的に挿入することに関する。方法のステップは、あらゆる所望の数のDNA修飾を得るために、何度繰り返してもよい。

10

#### 【0193】

いくつかの実施形態では、本明細書で説明するようなチャネルロドプシンを眼の神経細胞に導入し発現させると、たとえば、そのような変性をもつ対象のそのような網膜の光感受性、及び視覚応答の1つ以上の側面や機能的視覚の回復をもたらす。疾患のためこの能力がない対象の網膜の光感受性を回復させることにより、視覚に必要な最も基本的な光応答の機構が提供される。いくつかの実施形態では、陰イオン伝導チャネルロドプシンのGtACR1及びGtACR2などの機能的ドメインは、チャネルロドプシンをインビボで網膜内層神経細胞内で発現させることによって、杆体や錐体に変性している網膜の光感受性回復に用いることができる。いくつかの実施形態では、これらのチャネルロドプシンは、限定ではないが、網膜移植、皮質移植、外側膝状核移植、または視神経移植などの技法により導入することができる。

20

#### 【0194】

いくつかの実施形態では、陰イオン伝導チャネルロドプシンは、対象の網膜の杆体や錐体が死滅した後に残存している領域または部分の網膜神経細胞に、核酸だけをまたは発現ベクターに入れた核酸を導入することによって、挿入される。そのような発現ベクターは、遺伝子治療に用いられることがわかっているウイルス系、たとえば限定ではないが、AAV（たとえばAAV2）、レトロウイルスなどに所望の核酸配列を導入することによって作製することができる。

#### 【0195】

いくつかの実施形態では、陰イオン伝導チャネルロドプシンを網膜介在神経細胞に挿入することができる。するとこれらの細胞は、マウスで電気生理学的に実証されているように、光感受性となることができ、視神経及び高次視覚路を介して、視覚認知が生じる視野にシグナルを送ることができるようになる。いくつかの実施形態では、他にも経路はあるが、硝子体内及び/または網膜下の注射によってチャネルロドプシン分子またはそれを発現するウイルスベクターを送達することができる。

30

#### 【0196】

いくつかの実施形態では、本開示の藻類由来の陰イオン伝導チャネルロドプシンの活性部分、たとえば限定ではないがこれらの陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメインは、網膜の光感受性回復に使用することができ、網膜神経細胞に該神経細胞内で発現可能な藻類由来の陰イオン伝導チャネルロドプシン（たとえば限定ではないがこれらの陰イオン伝導チャネルロドプシンのロドプシンドメイン）をコードする核酸発現ベクターを送達することによって（このベクターには、該ロドプシンをコードするオープン読み枠、該オープン読み枠に機能的に結合されているプロモーター配列、及び任意選択により転写制御配列が含まれている）、及び該ベクターを該神経細胞内で発現させることによって、光感受性を回復させることができる。

40

#### 【0197】

特定の実施形態では、チャネルロドプシンは、藻類由来の陰イオン伝導チャネルロドプシン、たとえば限定ではないが陰イオン伝導チャネルロドプシンの機能的ドメインであってもよく、たとえば限定ではないが、GtACR1、GtACR2またはGt161302またはその生物学的活性断片もしくは保存アミノ酸置換バリエーション、たとえば限定では

50

ないがロドプシンドメインであってもよい。ベクター系は、組換え A A V (たとえば、A A V 2)であってもよく、プロモーターは構成プロモーター、たとえば限定ではないが、C M V プロモーターまたはハイブリッド C M V エンハンサー/ニワトリ - アクチンプロモーター (C A G) であってもよい。

#### 【実施例】

#### 【0198】

##### I V . 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すために、本明細書に含まれるものである。当業者であれば、以下の実施例における本開示の技法は、発明者が見出した、本発明の実施において良好に機能する技法を代表するものであり、したがって本発明の実施の好ましいモードを構成するとみなすことができる、ということを理解されよう。しかし、当業者であれば、本開示に鑑み、開示されている具体的な実施形態に多くの変更を加えることが可能であること、及び、それでも本発明の精神と範囲を逸脱することなく同様または類似の結果が得られることを理解すべきである。

#### 【0199】

##### 実施例 1 材料及び方法

分子生物学的方法：G . t h e t a オブシンの 7 T M ドメインをコードする配列 ( J G I タンパク質モデル 1 1 1 5 9 3、1 4 6 8 2 8、1 6 1 3 0 2 にそれぞれ対応する、2 9 5、2 9 1、2 8 8 a a ) をヒトコドンに使用できるように最適化し合成し ( G e n e w i z 社、米国ニュージャージー州サウスプレインフィールド)、E Y F P タグとインフレーションで、クローン化して哺乳類発現ベクター p c D N A 3 . 1 とした ( L i f e T e c h n o l o g i e s 社、米国ニューヨーク州グランドアイランド)。機能的コンストラクト 1 1 1 5 9 3 ( G t A C R 1 ) 及び 1 4 6 8 2 8 ( G t A C R 2 ) をコードする配列情報は、G e n B a n k ( 受託番号はそれぞれ K P 1 7 1 7 0 8、K P 1 7 1 7 0 9 ) に寄託した。a r c h a e r h o d o p s i n - 3 ( A r c h ) をコードする遺伝子は、E d w a r d S . B o y d e n 博士 ( マサチューセッツ工科大学、米国マサチューセッツ州ボストン ) のご厚意により提供された。変異は、Q u i k C h a n g e X L 部位指定変異誘発キット ( A g i l e n t T e c h n o l o g i e s 社、米国カリフォルニア州サンタクララ ) によって導入し、D N A シーケンシングにより確認した。

#### 【0200】

H E K 2 9 3 記録方法：H E K 2 9 3 ( ヒト胎児由来腎臓 ) 細胞に、S c r e e n F e c t A 形質移入試薬 ( W a c o C h e m i c a l s U S A 社、米国バージニア州リッチモンド ) を用いて形質移入した。保存溶液としてオールトランスレチナル ( S i g m a 社、米国ミズーリ州セントルイス ) をエタノール中最終濃度 5  $\mu$  M で加えた。形質移入後 4 8 ~ 7 2 時間で、A x o p a t c h 2 0 0 B 増幅器 ( M o l e c u l a r D e v i c e s 社、米国カリフォルニア州ユニオンシティ ) で測定した。シグナルは p C l a m p 1 0 ソフトウェアを用いて D i g i d a t a 1 4 4 0 A でデジタル化した ( いずれも M o l e c u l a r D e v i c e s 社 ) 。ホウケイ酸ガラスで抵抗 2 ~ 5 M  $\Omega$  のパッチピペットを作製した。溶液の組成物を表 S 1 に示す。全実験で 4 M の塩橋を用いた。液間電位差 ( L J P ) は C l a m p E x 内蔵 L J P 計算機で計算した。P o l y c h r o m e I V 光源 ( T . I . L . L . P h o t o n i c s 社、独逸 G r a f e l f i n g ) と機械的シャッター ( U n i b l i t z M o d e l L S 6、V i n c e n t A s s o c i a t e s 社、米国ニューヨーク州ロチェスター ; 半開時間 0 . 5 ミリ秒 ) を組み合わせて、連続的な光パルスを提供した。光強度は、内蔵 P o l y c h r o m e システムまたは中性濃度フィルターによって減衰させた。4 0 x 対物レンズの焦平面の最大量子密度は 8 . 5 m W / m m <sup>2</sup> であった。

#### 【0201】

陽イオン透過度を試験するための実験では、バス内で 1 5 0 m M N M G <sup>+</sup> で測定した基準値を、1 5 0 m M N a <sup>+</sup> ( p H 5 . 4 )、1 5 0 m M N a <sup>+</sup> ( p H 7 . 4 )、1 5 0 m M K <sup>+</sup> ( p H 7 . 4 ) または 7 5 m M C a <sup>2+</sup> ( p H 7 . 4 ) でそれぞれ測定し

た値から差し引いて  $E_{rev}$  シフトを計算した。バス内の  $Cl^-$  濃度はすべての陽イオンで  $155.6 \text{ mM}$  であった。陰イオンの透過度の試験では、 $E_{rev}$  シフトは、 $150 \text{ mM Asp}^-$  で測定した基準値を、 $75 \text{ mM SO}_4^{2-}$  または  $150 \text{ mM}$  の  $F^-$ 、 $Br^-$ 、 $I^-$  または  $NO_3^-$  でそれぞれ測定した値から差し引いて計算した。バス内の  $Na^+$  濃度は  $F^-$  を除く全陰イオンで  $150 \text{ mM}$  であった (表 1)。

【表 1】

表 1 : HEPK293細胞を用いた実験のピペット溶液及びバス溶液の組成ならびに液間電位差。

	NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> EGTA	HEPES	NMG	グルコース	NaAsp	NaF	NaBr	NaI	NaNO <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	HCl	LJP ピペット 標準 Asp	LJP ピペット Asp
ピペット 標準	—	126	0.5	2	5	25	12.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ピペット Asp	—	—	0.5	2	5	25	12.2	—	126	—	—	—	—	—	—	—	—
バス 標準	150	—	1.8	1	—	10	4.6	5	—	—	—	—	—	—	—	4.7	12.9
バス Asp	—	—	1.8	1	—	10	4.6	5	150	—	—	—	—	—	—	-7	—
バス pH 5.4	150	—	1.8	1	—	10	—	5	—	—	—	—	—	—	—	4.7	—
バス K	—	150	1.8	1	—	10	4.6	5	—	—	—	—	—	—	—	0.3	—
バス Ca	—	—	75	1	—	10	4.6	5	—	—	—	—	—	—	—	8.4	—
バス NMG	1.5	—	1.8	1	—	10	148.5	5	—	—	—	—	—	—	148.5	10.7	—
バス F	5.6	—	—	—	—	10	4.6	5	—	150	—	—	—	—	—	13.8	—
バス Br	—	—	1.8	1	—	10	4.6	5	—	—	150	—	—	—	—	4.5	—
バス I	—	—	1.8	1	—	10	4.6	5	—	—	—	150	—	—	—	4.3	—
バス NO <sub>3</sub>	—	—	1.8	1	—	10	4.6	5	—	—	—	—	150	—	—	3.3	—
バス SO <sub>4</sub>	—	—	1.8	1	—	10	4.6	5	—	—	—	—	—	75	—	-2.6	—

省略記号 : Asp アスパラギン酸 ; EGTA エチレンジトリコール四酢酸 ; HEPES 4-(2-ヒドロキシエチル)-  
1-ピペラジンエタンスルホン酸 ; LJP 液間電位差 ; NMG N-メチル-D-グルカミン。濃度単位はすべて mM。

神経細胞の記録：神経細胞で発現させるために、G t A C R 2 - E Y F P コンストラクトを、C a r l o s L o i s 博士（マサチューセッツ工科大学、米国マサチューセッツ州ボストン）から提供された p F U G W レンチウイルスベクターに導入した。このレンチウイルスは、リポフェクタミン 2 0 0 0（I n v i t r o g e n 社、米国ニューヨーク州グランドアイランド）を用いて H E K 2 9 3 F T 細胞（I n v i t r o g e n 社、米国ニューヨーク州グランドアイランド）に、エンベローププラスミド p C M V - V S V G、パッケージングプラスミド p 8 . 9（いずれも L o i s 博士提供）及び p F U G W - G t A C R 2 - E Y F P プラスミドの 3 種を形質移入して生産した。E 1 8 S p r a g u e D a w l e y ラットの海馬を B r a i n B i t s 社（米国イリノイ州スプリングフィールド）のキットの一部として入手し、同社提供のプロトコルにより一次神経細胞培養液を調製した。細胞は、ポリリジンでコートしたカバーガラス上の N b A c t i v 4 培地で培養し、0 . 4  $\mu$  M のオールトランスレチナール（培地中酢酸レチナールに追加しての最終濃度）を補充した。形質移入後 1 0 ~ 1 9 日でパッチクランプ測定を行った。H E K 細胞について上述したのと同じ光励起源と測定設定を使った。スパイク形成は電流クランプモードで測定した。溶液の組成を表 2 に示す。

【表 2】

表 2：神経細胞を用いた実験のピペット溶液及びバス溶液の組成ならびに液間電位差

	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	KCl	NaCl	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	HEPES	グルコース	LJP
ピペット	67.5	—	—	—	2	—	—	—
バス Tyrode	—	2	125	3	1	25	30	11.3

省略記号：H E P E S 4 - ( 2 - ヒドロキシエチル ) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸；L J P 液間電位差；N M G N - メチル - D - グルカミン。濃度単位はすべて m M。

## 【0203】

## 実施例 2 ロドプシンの特徴決定

確認されている緑藻植物由来の C h R 約 5 0 種のうち、既に試験されているものはすべて陽イオンチャネルのみである。しかし、これらの生物からクローン化されたいくつかのロドプシン配列は、チャネル活性を示さなかった。緑藻植物 G u i l l a r d i a t h e t a の核ゲノム配列は完全に決定されている（B . A . C u r t i s e t a l . , N a t u r e 4 9 2 , 5 9 ( 2 0 1 2 ) ）。モデルタンパク質を B L A S T 検索すると、微生物（I 型）ロドプシンと相同のヒット数は 5 3 件あった。いずれも C h R に対し高い相同性はなかったが、ある特定のクラスターのモデル（図 1 A）は、緑藻植物 C h R の特徴的な残基特徴をいくらか有していた（図 1 B）。

## 【0204】

G . t h e t a タンパク質の 7 T M ドメインをコードする配列 1 1 1 5 9 3、1 4 6 8 2 8 及び 1 6 1 3 0 2 は、H E K 2 9 3 細胞で良好に発現した。最初の 2 つのコンストラクトは光電流を発生したが、3 番目のコンストラクトは発生しなかった。以下に示すように、最初の 2 つは光開閉型陰イオンチャネルとして機能する。したがって、これらをそれぞれ G t A C R 1 と G t A C R 2（G u i l l a r d i a t h e t a 陰イオンチャネルロドプシン 1 と 2）と命名した。

## 【0205】

標準的な溶液（ピペットは 1 2 6 m M K C l、バスは 1 5 0 m M N a C l、p H 7 . 4；その他の成分は表 1 を参照のこと）を用いて、保持電位（E<sub>h</sub>）- 6 0 m V で G t A C R 1 と G t A C R 2 が発生した電流は、内向き電流であった（図 1 D の大きい図）。G t A C R 1 と G t A C R 2 が発生する平均定常電流は、最も頻繁に用いられる光遺伝学的ツール C r C h R 2 が発生するものよりもそれぞれ 8 倍と 6 倍大きい、不活化はかなり小さかった（図 1 の差込図）。G t A C R 1 と G t A C R 2 の光電流の半減時間は、それぞれ 2 0 0 ミリ秒と 9 0 ミリ秒であった。電流上昇率の刺激強度への依存性は、振幅よ



りも高い飽和レベルが示されたため（図 1 E）、作用スペクトルの作製に用いた。G t A C R 1 は、515 nm の光に最大感受性を示し、またスペクトルの短波長側スローブにシヨルダーを示した（図 1 F）。G t A C R 2 の感受性は 470 nm でピークになり、445 nm と 415 nm でもバンドを有した（図 1 F）。

#### 【0206】

標準の溶液を用いると（前の段落を参照のこと）G t A C R 1 と G t A C R 2 の光電流の符号は膜脱分極後に逆転した（それぞれ図 2 A と図 2 B）。試験範囲の -60 ~ 60 mV では、電流と電圧の関係（I E 曲線）は、緑藻植物 C h R のものとは違って線形であった（図 2 C）（D. Gradmann, A. Berndt, F. Schneider, P. Hegemann, Biophys. J. 101, 1057 (2011) で説明されている）。G. theta ロドプシンのイオン透過性の特徴を決定するため、バス溶液の様々なイオン組成で I E 曲線を測定し、 $E_{rev}$  を決定した。緑藻植物 C h R の最も透過性の高いイオンはプロトンであるが、G t A C R 1 と G t A C R 2 が発生する電流の  $E_{rev}$  は pH に影響されなかった（図 2 C）。さらに、大きな非透過性有機陽イオン N - メチル - グルカミン（ $NMG^+$ ）を  $Na^+$ 、 $K^+$ 、または  $Ca^{2+}$  に換えても  $E_{rev}$  シフトは観察されず（図 2 D）、G t A C R 1 と G t A C R 2 は緑藻植物 C h R が伝導する陽イオンを透過させないことが示唆された。

#### 【0207】

バス内の  $Cl^-$  の大半を大きな有機陰イオンであるアスパラギンに換えて、 $Cl^-$  の Nernst 平衡電位（ $E_{Cl}$ ）81 mV が生じると、 $E_{rev}$  は 80 mV にシフトした（図 3 A ~ 図 3 C）が、これは G t A C R 1 及び G t A C R 2 が発生する電流が受動的  $Cl^-$  輸送による場合のみに予測されたとおりである。次に、種々の陰イオンの透過性を、バス内で非透過性  $Asp^-$  に換えることにより比較した。両方の G. theta A C R で、 $I^-$ 、 $NO_3^-$ 、または  $Br^-$  は、 $Cl^-$  よりもさらに大きな  $E_{rev}$  シフトをもたらし、 $F^-$  は小さなシフトをもたらしたが、 $SO_4^{2-}$  は不透過であった。決定された A C R の透過度順  $NO_3^- > I^- > Br^- > Cl^- > F^- > SO_4^{2-} = Asp^-$  は、動物細胞由来の多くの古典的  $Cl^-$  チャネルの離液系列特徴と一致している。

#### 【0208】

A C R の顕著な特徴は、バクテリオロドプシン（B R）のプロトンアクセプター  $Asp_{85}$  の位置の非カルボン酸残基であり、ほぼ全ての陽イオン選択性 C h R がそこに  $Gl u$  残基を有している（図 1 C で赤色でハイライトしている螺旋体 3 のカラム 5）。これを  $Gl u$  に換えると、発現を阻害することなく電流が 1000 倍超低下した。これらの残存する微弱な電流の動態は大きく変化した。しかし最も重要なのは、バス内で塩素イオンをアスパラギン酸で置換した後  $E_{rev}$  が実質上変化しなかったことから明らかなように（図 6 A）、野生型とは大きく違って、この変異により A C R の陰イオン選択性が排除されたことである。したがって、プロトンアクセプター位置のカルボン酸残基の不存在は、A C R の陰イオン選択性の必須要件であると思われる。対応する位置の非電離残基も、haloarchaea 及び海生フラボバクテリア由来の塩素イオンポンプ型ロドプシンの典型であり（図 1 C）、haloarchaeal ロドプシンについて示されるように、この残基は非光分解状態で塩素イオン結合部位の一部を形成している。

#### 【0209】

神経細胞などのほとんどの動物細胞の細胞質内  $Cl^-$  濃度は低い。そのような条件下では（ピペットでは 6 mM の  $Cl^-$ 、バスでは 156 mM）、G. theta A C R は HEK293 細胞内で  $E_{Cl}$  よりも高い  $E_h$  で過分極電流を発生した（G t A C R 2 は図 4 A、G t A C R 1 は図 6 B）。G t A C R 2 光電流の振幅は G t A C R 1 電流と類似していたが、動態はより速く、このことは神経細胞活性の制御にとって有利である。光電流の振幅が大きいことは、A C R を光誘導過分極の光遺伝学的ツールとして極めて有望なものにしている。G t A C R 2 は、光遺伝学的スパイク抑制でよく使用されるツール、プロトンポンプ archaerhodopsin-3 (Arch) と同様の振幅の過分極光電流を 1 万倍低い光強度で発生した（図 4 B）。最も高効率の  $Cl^-$  伝導 C h R 変異体の過分

極光電流の最大振幅は、 $< 0.6 \text{ nA}$ であったが、動態は非常に緩慢だった。GtACR2では、そのような振幅の電流及び100倍速い動態が、3000倍低い光強度で観察された(図4B)。これらの特性は、GtACRを、これまで利用されている高効率過分極光遺伝学的ツールよりもさらに高効率なものにしている。

#### 【0210】

培養ラット錐体神経細胞で、 $-88 \text{ mV}$ よりも高い $E_h$ でGtACR2が発生する過分極電流(図4C及び図4D)。この値は、まさに発明者らの条件下の $E_{Cl}$ に対応し(表2)、GtACR2が神経細胞において陰イオンのみを伝導することを裏付けている。この厳密な選択性は、これまでに報告されている $Cl^-$ 伝導ChR変異体(残存する陽イオンの透過性により、 $E_{rev}$ は $E_{Cl}$ よりも25~30mV正である)に対し2つめの有利な点である。GtACR2が膜を過分極する電位範囲は、したがって、神経細胞の典型的な静止電位の値も超えてかなり広くなる(図4D)。電流クランプ実験では、GtACR2は、 $3 \times 10^{-3} \text{ mW/mm}^2$ よりも高い光強度で電氣的に誘発されたスパイクを、高い時間精度で、完全に抑制した(図4E及び図4F)。

#### 【0211】

特定の機構に縛られることを望むものではないが、配列に大きな違いがあることから予測できるように、ACRの陰イオン伝導機構は、 $Cl^-$ 伝導ChR変異体のものとは異なるようである。ACRには、CrChR2で説明した、陽イオン選択性フィルターのGlu90に対応するGlu残基が含まれる。この陽イオン伝導チャンネルに $Cl^-$ 透過性を与えるために、Glu90は電荷のない残基(Ser(15))または陽イオン残基(LysまたはArg(14))で置換する必要がある。しかし、ACRにGlu90ホモログが存在することは、陽イオンチャンネルの場合と違って、陰イオンチャンネルでは陰イオン透過性の妨げにならないことを示している。系統的及び機能的に、ACRは、陽イオンチャンネルロドプシン(CCR)とは基本的に異なる別個のロドプシンクラスで構成されている。天然の陰イオンチャンネルとして、ACRは、極めて光感受性が高く、完全な陰イオン選択性があり、及び動態も高速になるような進化によって最適化された、過分極光遺伝学的ツールを提供する。

#### 【0212】

実施例3 PsuACR1は光開閉型陰イオンチャンネル(ACR)である

上述したGtACR由来のACRと非常に類似しているさらなるACRが、海生地中植物*Proteomonas sulcata*で特定されている。この配列は、PsChR1として特定されており(GenBank:KF992074を参照のこと。参照により本明細書に援用する)、培養神経細胞で発現すると、光電流を発生することが示されている(Klapoetke NC, Murata Y, Kim SS, Pulver SR, Birdsey-Benson A, Cho YK, Morimoto TK, Chuong AS, Carpenter EJ, Tian Z, Wang J, Xie Y, Yan Z, Zhang Y, Chow BY, Surek B, Melkonian M, Jayaraman V, Constantine-Paton M, Wong GK, Boyden ES. Nat Methods. 2014 Mar; 11(3):338-46)が、これらの光電流は詳しく特徴づけられておらず、測定も陽イオン伝導と陰イオン伝導の区別をしていなかった。以下の実施例では、対応する*P. sulcata*タンパク質がGtACR由来のACRと似たような光開閉型陰イオン伝導性を示すが、培養哺乳類細胞におけるその光電流の振幅はより小さい、ということを実証する。したがって、本明細書ではこれをPsuACR1(配列番号13及び配列番号14)と呼ぶ。略称Psはすでに緑藻*Platymonas subcordiformis*のCCRで使用されているので、種名の3番目の文字を付加している。

#### 【0213】

さらに、PsuACR1の一次タンパク質配列は、上述のGtACR由来のACR(配列番号1及び3)と全体的に非常に似ており、その特性もいくつか示している。Ps

u A C R 1 は、C r C h R 2 を C l<sup>-</sup> 伝導チャネルに変換するには中性または正電荷の残基で置換する必要があった C r C h R 2 の G l u - 90 に対応する G l u 残基 ( G l u - 64 ) を含んでいる。バクテリオロドプシン ( A s p - 85 ) におけるプロトンアクセプターの位置は、非カルボン酸残基で占められているが、P s u A C R 1 では、G . t h e t a 由来の A C R ( 配列番号 1 及び 3 ) のように S e r ではなく、A l a ( A l a - 93 ) である。最後に、C 1 C 2 キメラの結晶構造により内側陽イオンチャネルゲートを形成すると予測される 3 つの残基 ( T y r - 109、H i s - 173 及び H i s - 304 ) はどれも、P s u A C R 1 A C R ( 配列番号 13 及び 14 ) でも G . t h e t a 由来の A C R ( 配列番号 1 及び 3 ) でも保存されない: T y r - 109 は 3 種のタンパク質全て M e t で置換され; H i s - 173 ( バクテリオロドプシンの A s p - 96 に対応する位置 ) は、G t A C R 1 では L e u で置換され、G t A C R 2 ( 配列番号 3 ) と P s u A C R 1 ( 配列番号 13 ) では G l n ( ロドプシンナトリウムポンプと同様 ) で置換され; H i s - 304 は G t A C R 1 では A l a で置換され、G t A C R 2 では S e r で置換され、P s u A C R 1 ( 配列番号 13 ) では A r g で置換される。

#### 【0214】

P s u A C R 1 ( 配列番号 13 及び 14 ) の電気生理学的特性を決定するために、これをヒト胎児由来腎臓 ( H E K 293 ) 細胞で発現させて、電圧クランプ条件下で光電流値を測定した。その結果を図 7 に示す。発明者らの標準溶液 ( ピペットでは 126 mM K C l、バスでは 150 mM N a C l、p H 7.4 ) を用いて記録した、飽和強度の光パルスに应答する一連の電流トレースを図 7 A に示す。増幅器出力で - 60 mV での平均ピーク振幅は  $707 \pm 184$  pA ( 平均  $\pm$  S E M、n = 18 細胞 ) であり、G . t h e t a 由来の A C R ( 配列番号 1 及び 3 ) が同条件下で発生した電流よりもおよそ 10 倍低かった。別の相違点は、P s u A C R 1 ( 配列番号 13 及び 14 ) の電流は、連続照射の下、急速に不活化して平坦レベル  $56 \pm 2\%$  ( 平均  $\pm$  S E M、n = 18 細胞 ) を示したが、G . t h e t a 由来の A C R ( 配列番号 1 及び 3 ) の光電流の不活化は、より少なく緩慢だったことである。P s u A C R 1 ( 配列番号 13 及び 14 ) の光電流の符号は、膜電位がより正の値にシフトすると逆転した。そのピーク振幅の保持電位 (  $E_h$  ) に対する依存性 ( I E 曲線 ) は線形であり ( 図 7 D の黒線 )、G . t h e t a A C R ( 配列番号 1 及び 3 ) も同様であるが、C C R に典型的な外向きの整流とは対照的である。標準溶液中で記録した光電流の反転電位 (  $E_{rev}$  ) はゼロに近似していた ( 図 7 D の黒色のマークと線 )。

#### 【0215】

バス内の C l<sup>-</sup> の大半をアスパラギン酸に換えると、 $E_{rev}$  は  $72 \pm 2$  mV ( 平均  $\pm$  S E M、n = 5 細胞 ) にシフトした。これらの条件下で測定された典型的な一連の光電流を図 7 B に示し、I E 曲線を図 7 D に示す ( 赤色のマークと線 )。ピペットでは C l<sup>-</sup> を A s p<sup>-</sup> に換え、バス溶液は標準の場合、 $E_{rev}$  は  $-70 \pm 2$  mV にシフトした ( 平均  $\pm$  S E M、n = 4 細胞 )。これらの条件の光電流と I E 曲線をそれぞれ図 8 C と図 8 D に示す ( 青色のマークと線 )。これらの結果は、P s u A C R 1 光電流が受動的 C l<sup>-</sup> 輸送によるものであることを示している。

#### 【0216】

バス内の C l<sup>-</sup> を他の陰イオンに換えて I E 曲線を測定したとき。各陰イオンで測定した、非透過性 A s p<sup>-</sup> からの  $E_{rev}$  値のシフトを図 8 に示す。G . t h e t a A C R については、I<sup>-</sup> が最も透過性の高い、そして F<sup>-</sup> が最も透過性の低いハロゲン化物だったが、二価の硫酸は実質的に不透過であった。同様に、バス内で非透過性 N - メチル - グルカミン ( N M G<sup>+</sup> ) の代わりに N a<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> または C a<sup>2+</sup> で測定したとき、あるいはバス p H が 7.4 から 5.4 に低下したときも、 $E_{rev}$  は実質的にシフトしなかった ( 図 8 )。これらの結果から、P s u A C R 1 が光開閉型陰イオンチャネルであることが裏付けられた。

#### 【0217】

p H 7.4 で測定した P s u A C R 1 光電流の作用スペクトルの最大は 520 nm であ

10

20

30

40

50

り、550 nmにショルダーがあった(図9)。pH 5.4まで低下させても、スペクトル最大値の位置はシフトしなかった。

#### 【0218】

シングルターンオーバー条件下のP s u A C R 1光電流の動態の特徴を決定するために、レーザーフラッシュ(6ナノ秒)を使って光励起した(図10a)。既に特徴決定したG . t h e t aのA C Rと比べると、P s u A C R 1のpH 7.4でのチャネル閉は約8倍速かった(図10b)。電流減衰に3つの指数関数を当てはめた。3つ目の最遅成分の振幅全体への貢献度は最小だった。P s u A C R 1光電流の3種の減衰成分の振幅の電圧依存性(I E曲線)を図10cに示す。全成分の反転電位は実験誤差内で同じであった。G t A C R 1で先に観察されたものとは異なり、全成分の時定数( )の電圧依存性は微弱であった(図13)。ピーク電流の回復速度を二重フラッシュ実験で測定した。P s u A C R 1は、G t A C R 2よりも約5倍速く、G t A C R 1よりも約8倍速かった(図10d)。

#### 【0219】

チャネル電流の反転電位で、高速の負のシグナルが記録された。その時間経過は記録システムの時間分解能により制限された(図11a)。この記録された、P s u A C R 1からの高速電流の内向き方向は、レチナール異性化に関する初期の電荷移動に相当した。P s u A C R 1のこの電流の振幅は試験範囲のバスのV hにもpHにも依存しておらず(図11b及び図11c)、この電流の起点がレチナール異性化であることがさらに示された。

\*\*\*

#### 【0220】

本明細書で開示し権利を主張するすべての方法は、本開示に鑑み、必要以上に実験しなくても作製し実施することができる。本発明の組成物及び方法を好ましい実施形態に照らして説明してきたが、当業者には、本発明の概念、精神及び範囲を逸脱することなく、本明細書で説明する方法、方法のステップまたはステップの順序に変更を加えることができることは明らかになる。より具体的には、化学的及び生理学的に関連のある特定の剤を本明細書で説明する剤と入れ替えても同じかまたは類似の結果が得られることは、当業者には明らかになる。当業者には明白なそのような類似の代用物や変更形態はすべて、付属の特許請求の範囲により定められる本発明の概念、精神及び範囲の内とみなす。

#### 【0221】

##### 参考文献

以下の参考文献は、本明細書に記載の内容の例示的手順やその他の詳細事項を補足する範囲において参照により本明細書に援用する。

1. J. L. Spudich, O. A. Sineshchekov, E. G. Govorunova, Biochem. Biophys. Acta 1837, 546 (2014).
2. O. P. Ernst et al., Chem. Rev. 114, 126 (2014).
3. K. Deisseroth, Nat. Methods 8, 26 (2011).
4. B. Y. Chow, E. S. Boyden, Sci. Transl. Med. 5, 177ps5 (2013).
5. J. Y. Lin, P. M. Knutsen, A. Muller, D. Kleinfeld, R. Y. Tsien, Nat. Neurosci. 16, 1499 (2013).
6. O. A. Sineshchekov, K.-H. Jung, J. L. Spudich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 8689 (2002).
7. G. Nagel et al., Science 296, 2395 (2002).

10

20

30

40

50

8. G. Nagel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 13940 (2003).
9. F. Zhang et al., Nature 446, 633 (2007).
10. X. Han, E. S. Boyden, PLoS One 2, e299 (2007).
11. V. Gradinaru, K. R. Thompson, K. Deisseroth, Brain Cell Biol. 36, 129 (2008).
12. B. Y. Chow et al., Nature 463, 98 (2010).
13. A. S. Chuong et al., Nat. Neurosci. 17, 1123 (2014).
14. J. Wietek et al., Science 344, 409 (2014).
15. A. Berndt, S. Y. Lee, C. Ramakrishnan, K. Deisseroth, Science 344, 420 (2014).
16. F. Zhang et al., Cell 147, 1446 (2011).
17. E. G. Govorunova, O. A. Sineshchekov, H. Li, R. Janz, J. L. Spudich, J. Biol. Chem. 288, 29911 (2013).
18. N. C. Klapoetke et al., Nat. Methods 11, 338 (2014).
19. O. A. Sineshchekov et al., Biophys. J. 89, 4310 (2005).
20. V. Gradinaru et al., Cell 141, 154 (2010).
21. B. A. Curtis et al., Nature 492, 59 (2012).
22. D. Gradmann, A. Berndt, F. Schneider, P. Hegemann, Biophys. J. 101, 1057 (2011).
23. T. J. Jentsch, V. Stein, F. Weinreich, A. A. Zdebik, Physiol Rev. 82, 503 (2002).
24. M. Kolbe, H. Besir, L. O. Essen, D. Oesterhelte, Science 288, 1390 (2000).
25. P. Bregestovski, T. Waseem, M. Mukhtarov, Front. Mol. Neurosci. 2, 15 (2009).
26. S. J. Husson et al., PLoS One 7, e40937 (2012).
27. K. Ruffert et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 410, 737 (2011).
28. K. Eisenhauer et al., J. Biol. Chem. 287, 6904 (2012).

10

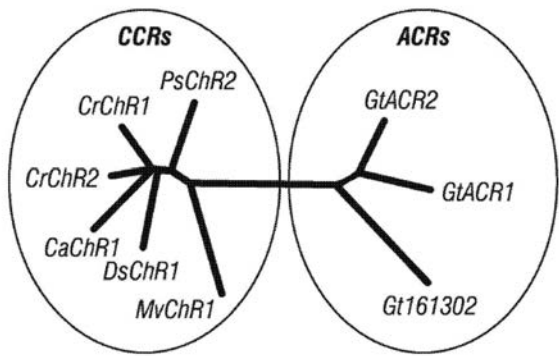
20

30

40

【図 1 A】

【図 1 A】



【図 1 B】

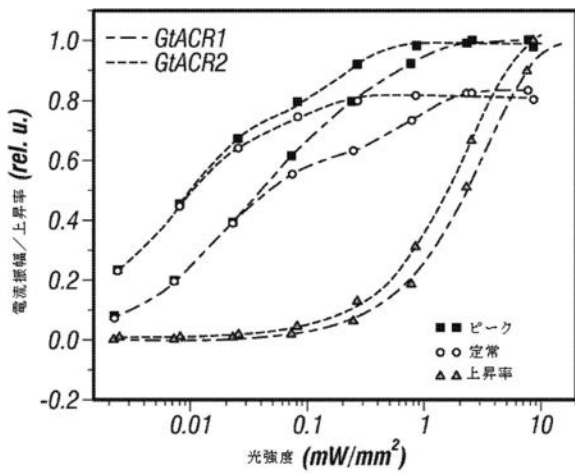
【図 1 B】

螺旋体 2

GtACR1	WEATYLPTE---MITTSL	74	SEQ ID NO: 32
GtACR2	WESVYLPFVE---SITYAL	70	SEQ ID NO: 33
Gt161302	WEFVLVPLTE---CFVYGL	67	SEQ ID NO: 34
CrChR1	WEETIYVATTEMKFIIEYFH	139	SEQ ID NO: 35
CrChR2	WEETIYVCATEMVKVILEFFF	100	SEQ ID NO: 36
CaChR1	WEETIYVCCIELVFICFELYH	146	SEQ ID NO: 37
MvChR1	WEVWFVACIETSIYITAIT	119	SEQ ID NO: 38
HsHR	RPRLIWGATIMIPVLSISSY	77	SEQ ID NO: 39
NmHR	ALSCIVMVSAGLIINSQAVM	71	SEQ ID NO: 40

【図 1 E】

【図 1 E】



【図 1 C】

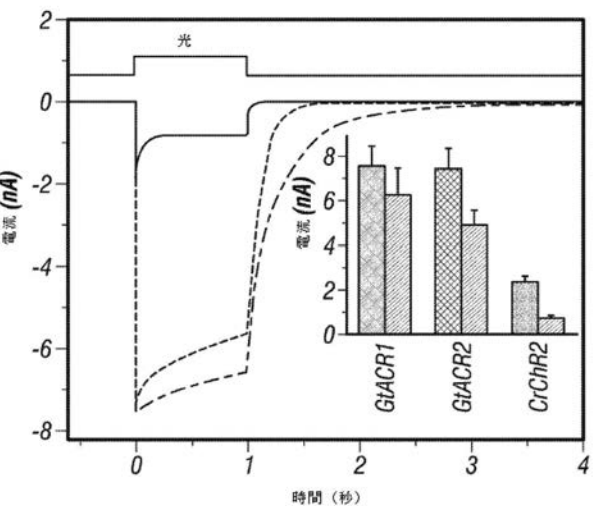
【図 1 C】

螺旋体 3

ARMASWLTCTPIMLGLVSNMA	113	SEQ ID NO: 41
SRMASWLTCTPIMLGLVSNMA	109	SEQ ID NO: 42
TRTVLWLTATVPILINQINGMA	106	SEQ ID NO: 43
LRVADWLLTCTPVILTHLSNLT	178	SEQ ID NO: 44
LRVADWLLTCTPVILTHLSNLT	139	SEQ ID NO: 45
LRVSEWLLCTCPVILTHLSNLT	185	SEQ ID NO: 46
LRVMEWLLCTCPVILTHLSNLT	158	SEQ ID NO: 47
GRVLTWLTSTPMILALGLIA	127	SEQ ID NO: 48
YRVVNMATIECLLLQLLIML	114	SEQ ID NO: 49

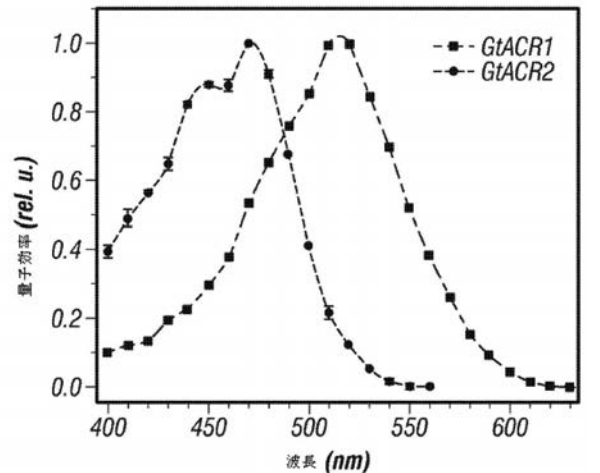
【図 1 D】

【図 1 D】



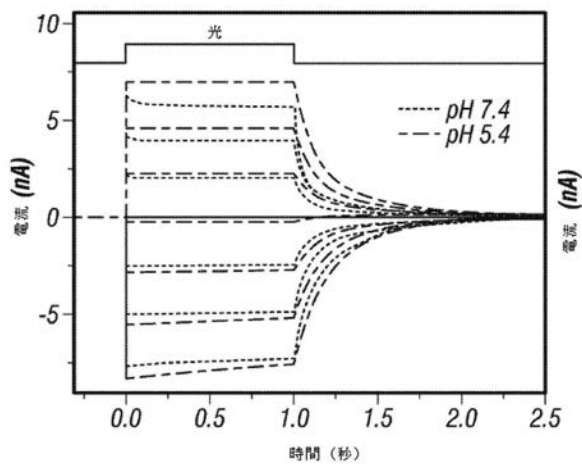
【図 1 F】

【図 1 F】



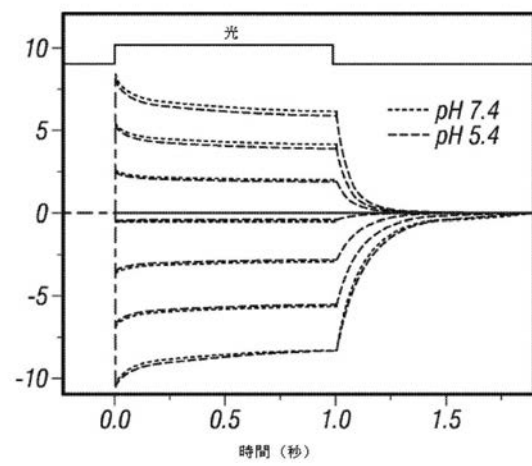
【図 2 A】

【図 2 A】



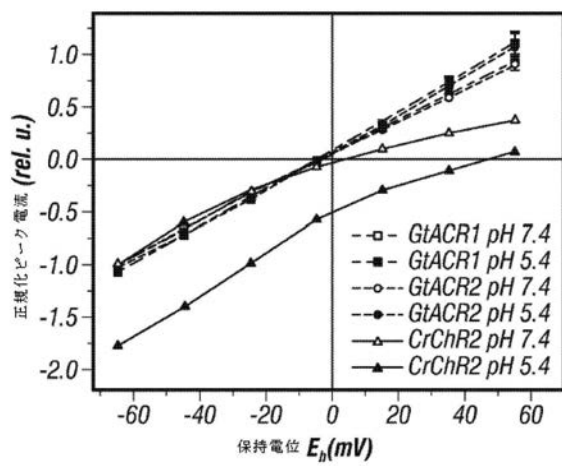
【図 2 B】

【図 2 B】



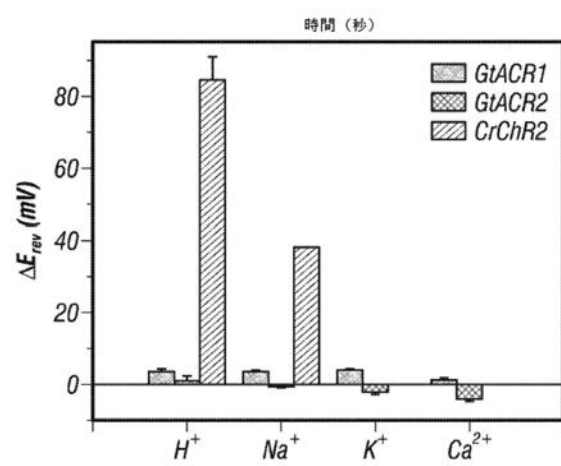
【図 2 C】

【図 2 C】



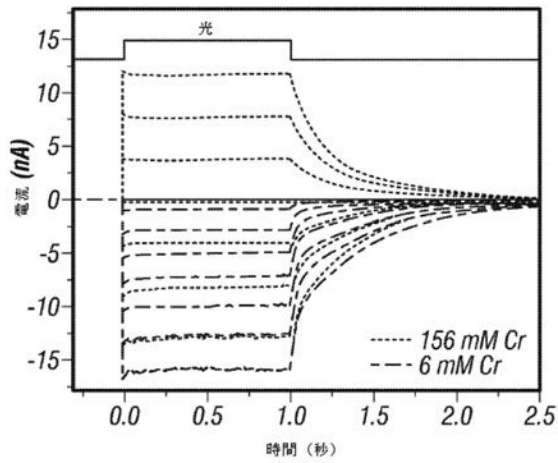
【図 2 D】

【図 2 D】



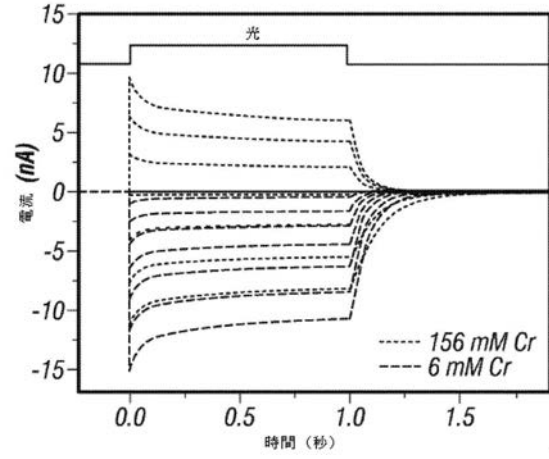
【図 3 A】

【図 3 A】



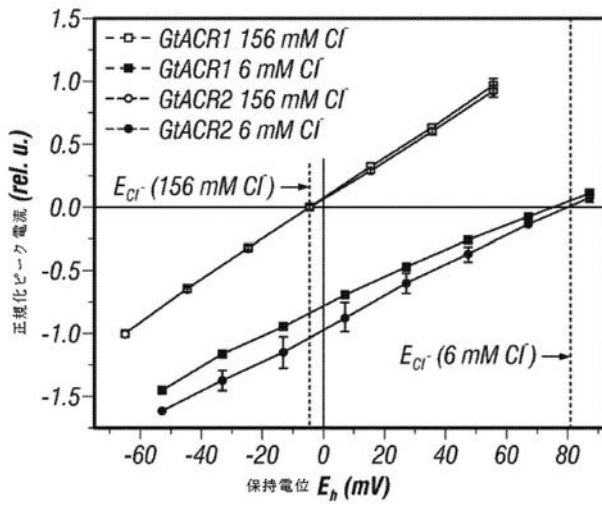
【図 3 B】

【図 3 B】



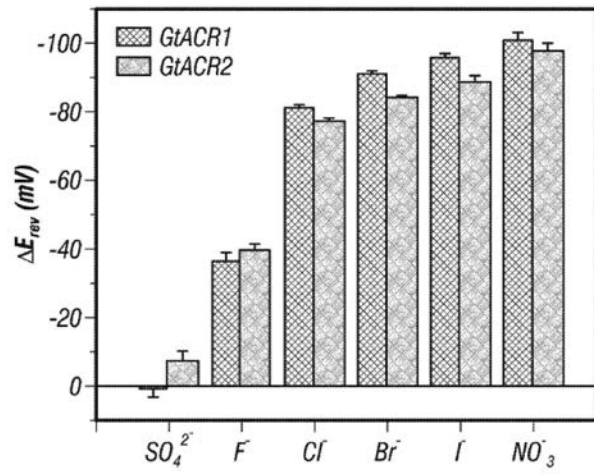
【図 3 C】

【図 3 C】



【図 3 D】

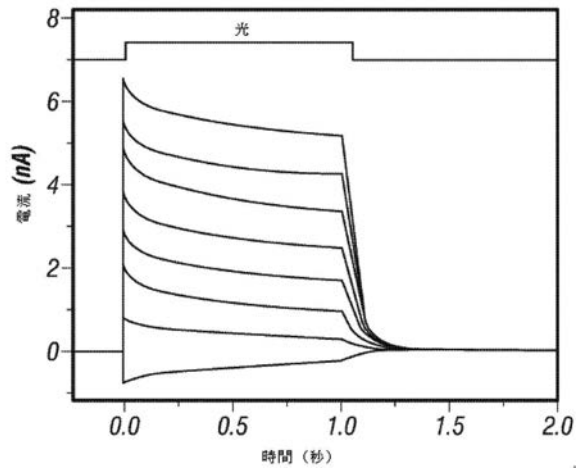
【図 3 D】





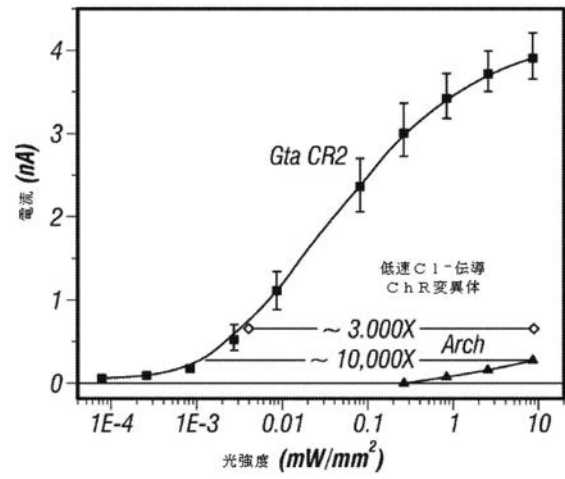
【図 4 A】

【図 4 A】



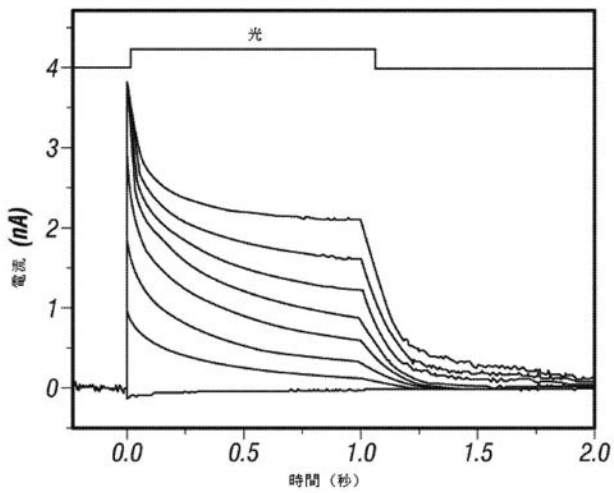
【図 4 B】

【図 4 B】



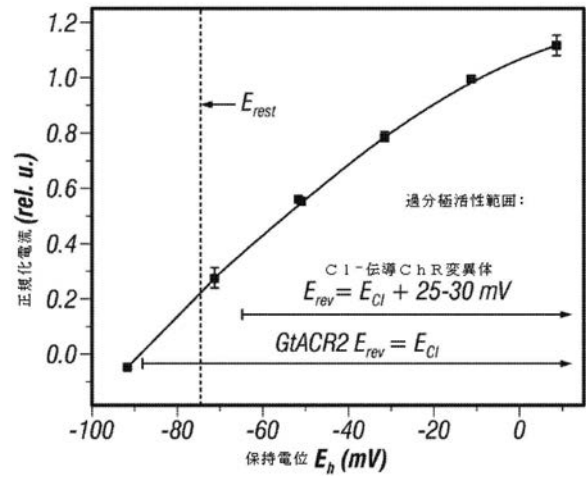
【図 4 C】

【図 4 C】



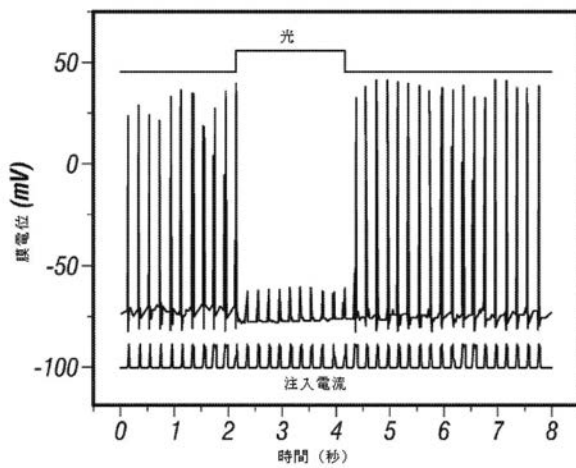
【図 4 D】

【図 4 D】



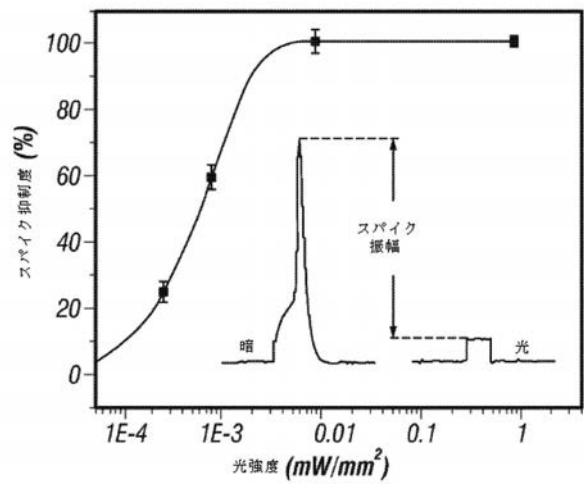
【図 4 E】

【図 4 E】



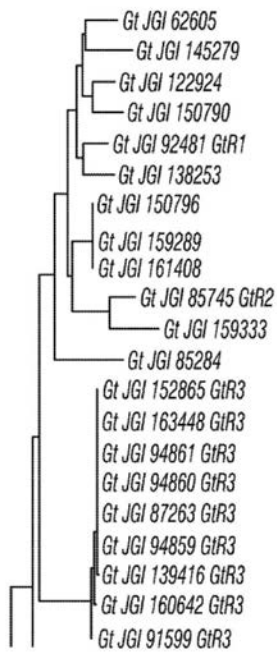
【図 4 F】

【図 4 F】



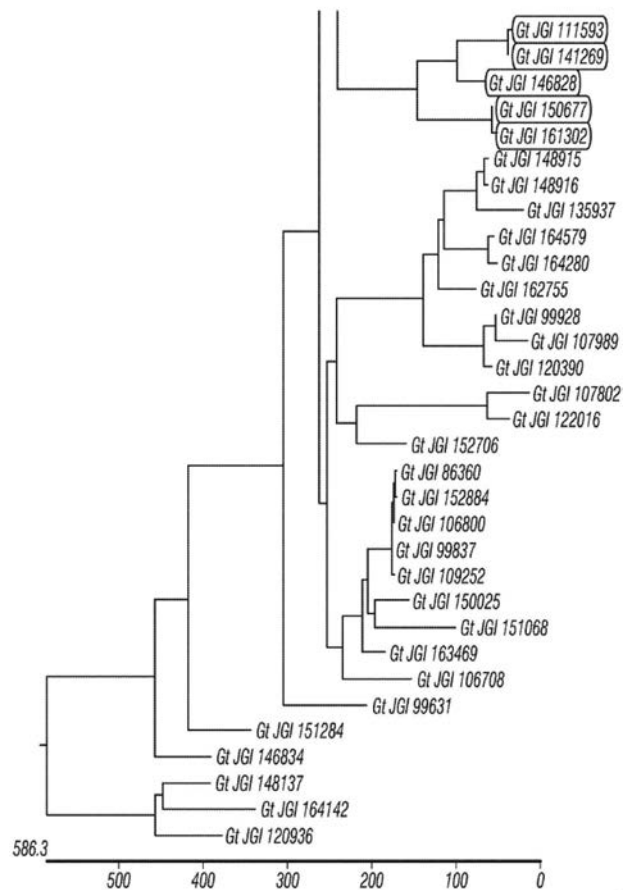
【図 5 - 1】

【図 5】



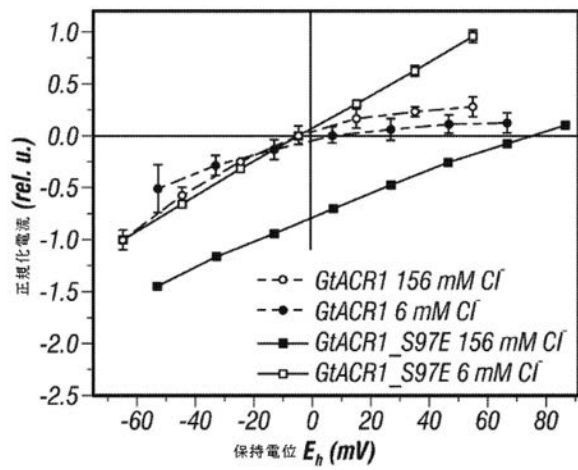
【図 5 - 2】

【図 5 (続き)】



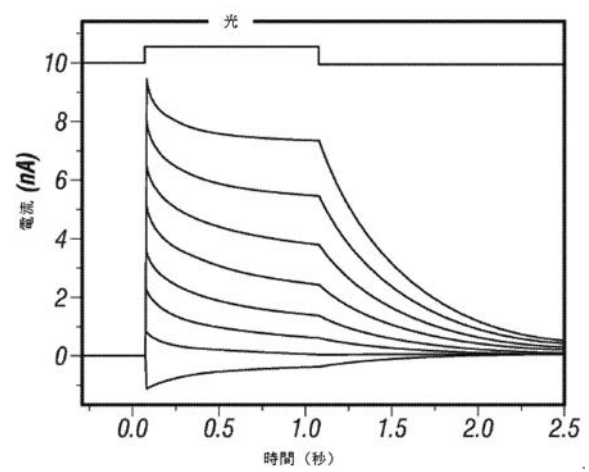
【図 6 A】

【図 6 A】



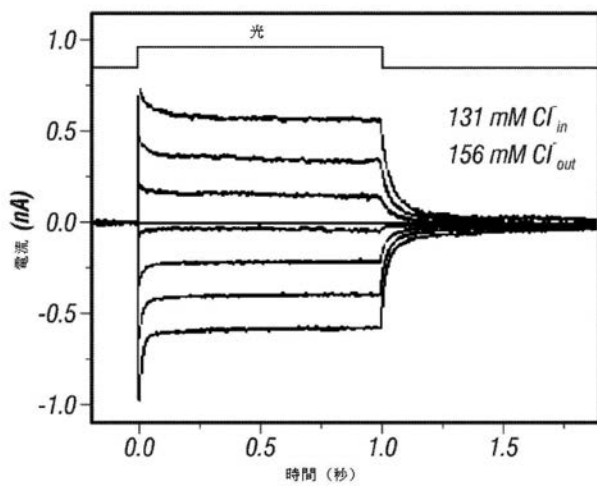
【図 6 B】

【図 6 B】



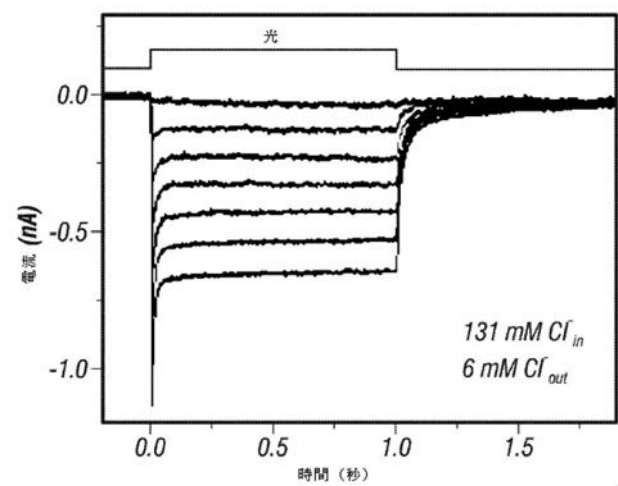
【図 7 A】

【図 7 A】



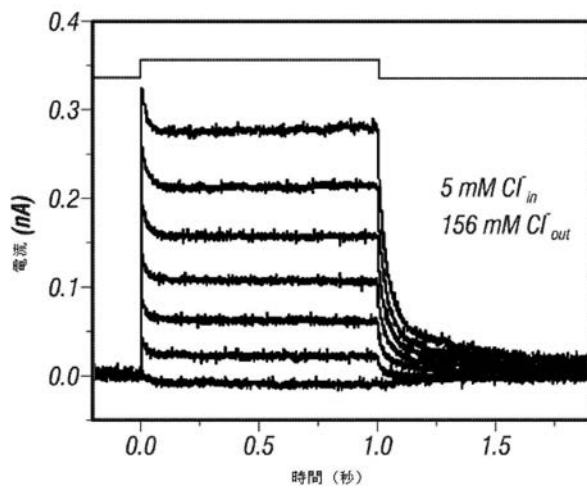
【図 7 B】

【図 7 B】



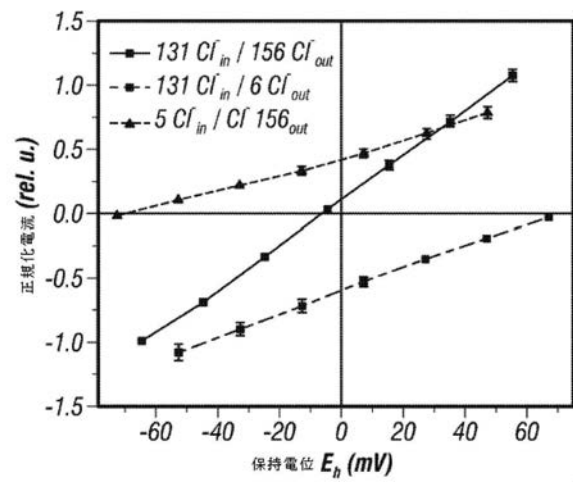
【図 7 C】

【図 7 C】



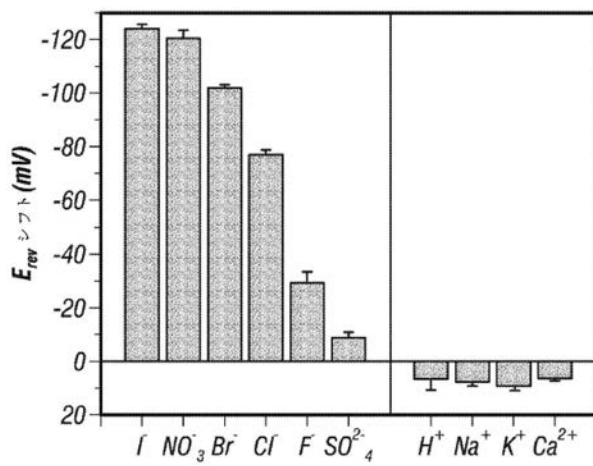
【図 7 D】

【図 7 D】



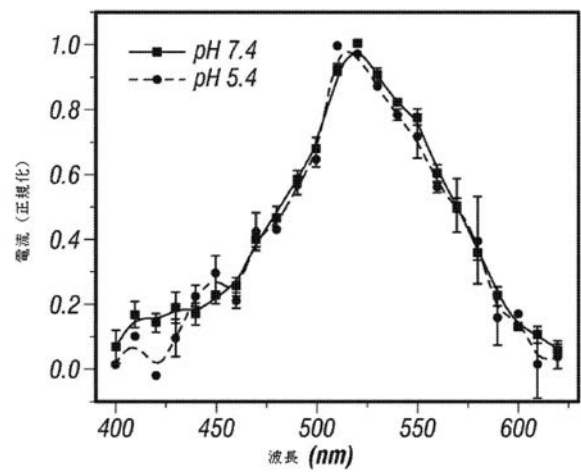
【図 8】

【図 8】



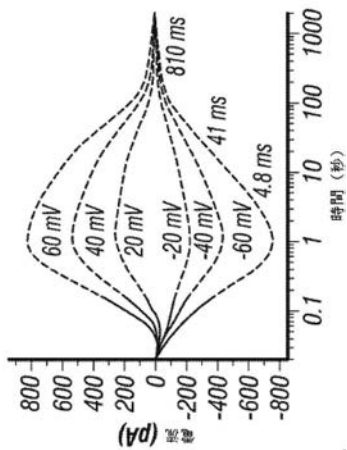
【図 9】

【図 9】



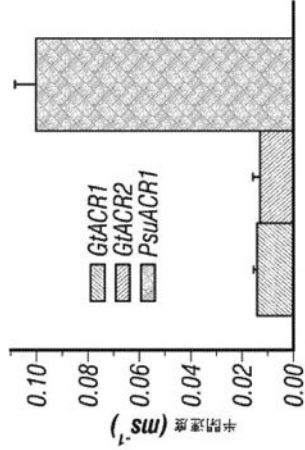
【図10A】

【図10A】



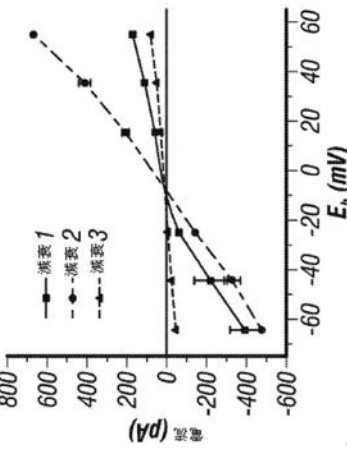
【図10B】

【図10B】



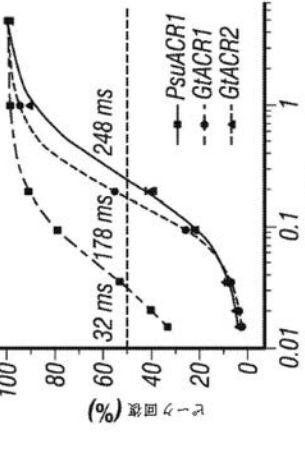
【図10C】

【図10C】



【図10D】

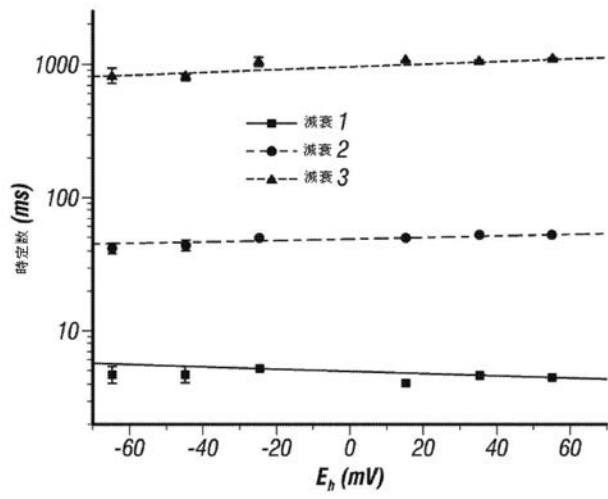
【図10D】





## 【図 1 3】

【図 1 3】



## 【配列表】

2018509909000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 16/23095
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C07K 14/405; C12N 13/00; A61N 5/06 (2016.01) CPC - C07K 14/405; C12N 15/86, 5/87; A61N 5/0622 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C07K 14/405; C12N 13/00; A61N 5/06 (2016.01) CPC: C07K 14/405; C12N 15/86, 5/87; A61N 5/0622 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC: C07K 14/405; C12N 15/86, 5/87; A61N 5/0622 (text search) USPC: 435/455, 325, 320.1, 173.4; 536/23.7; 607/88 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PatBase; Google Patents; Google Scholar Search terms: Channelrhodopsin (ChR), microbial rhodopsin, anion channel, light gated channel, hyperpolarization, cation channel, algae (e.g. Guillardia), optogenetic%, vector, expression, polynucleotide		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y — A	BERNDT et al. Structure-guided transformation of channelrhodopsin into a light-activated chloride channel. Science 25 April 2014 Vol 344 No 6182 Pages 420-424 and online Supplemental Material [Available on the internet: <URL: <a href="http://www.sciencemag.org/content/344/6182/420/suppl/DC1">http://www.sciencemag.org/content/344/6182/420/suppl/DC1</a> >]. Especially abstract, online Supplemental Materials.	1-4, 10, 11, 20, 22 16, 21
Y — A	Uniprot Accession L1J207. Uncharacterized Protein (online) 06 March 2013 retrieved 30 May 2015 [Available on the Internet: <a href="http://www.uniprot.org/uniprot/L1J207">http://www.uniprot.org/uniprot/L1J207</a> ]. Especially pg 1-3.	1-4, 10, 11, 20, 22 16, 21
A	GenBank Accession KF992074. Synthetic construct PsChR1 gene (online) 29 January 2014 [retrieved 4 June 2016]. Available on the Internet: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF992074">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF992074</a> >. Especially pg 1-2.	16, 21
A,P	Govorunova et al. Natural light-gated anion channels: A family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics. Science 07 August 2015 Vol 349 No 6248 Pages 647-650. entire article.	1-4, 10, 11, 20, 22
A, P	GenBank Accession KP171708.1. Synthetic construct ACR1 gene, partial cds. (online) 01 July 2015 [retrieved 04 June 2016] Available on the Internet: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP171708">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP171708</a> >. Especially pg 1-2.	16, 21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 August 2016 (01.08.2016)		Date of mailing of the international search report <b>22 AUG 2016</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/23095

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:  
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.  
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:  
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).  
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

GenCore ver 6.4.1 SEQ ID NOs: 1, 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/23095

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

---Go to Extra Sheet for continuation-----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-4, 10, 11, 16, 20-22, limited to SEQ ID NOs: 1-2 and human host cell

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/23095

-----continued from Box III (Lack of Unity of Invention)-----

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-11, 16, 20-22, 28-40, drawn to a composition comprising an isolated nucleic acid molecule comprising a sequence encoding an anion conducting channelrhodopsin that may be linked to a heterologous promoter sequence. The nucleic acid composition or peptide encoded by the nucleic acid will be searched to the extent that the peptide encodes an amino acid sequence with at least 85% sequence identity to the first named sequence SEQ ID NO: 1 (claim 1) or the nucleotide encoding said peptide sequence, SEQ ID NO: 2 (claim 1), and the first named recombinant host cell, an isolated human cell (claim 3). It is believed that claims 1-4, 10, 11, 16, 20-22 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NOs: 1-2; and an isolated human cell. Additional nucleic acids and amino acid sequences of a channelrhodopsin expressed in a selected host cell will be searched upon payment of additional fees [see instant Specification para [0041-0064] for the description of sequences]. Applicant must specify the claims that encompass any additional elected nucleic acids, peptides, and host cells. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be: nucleic acid sequence SEQ ID NO: 22 (encodes *Mesostigma viride* channelrhodopsin 1 ((MvChR1)) in an isolated human host cell (claims 26-33, 39, 40).

Group II: Claims 12-15, 17-19, 23-25, 41-56, drawn to a method of membrane hyperpolarization or neuronal silencing.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

## Special Technical Features:

Group I+ has the special technical feature of a composition comprising a nucleic acid or peptide encoded by said nucleic acid encoding an anionic channelrhodopsin, not required by Group II.

Group II has the special technical feature of specific method steps to cause membrane hyperpolarization or neuronal silencing in a cell or a cell of a subject, not required by Group I+.

Among the inventions listed as Groups I+ is the specific nucleic acid and amino acid sequences, and recombinant host cell, recited therein. Each of the inventions of Group I+ requires a unique nucleic acid and amino acid sequences and host cell, not required by the other inventions.

## Common Technical Feature:

Groups I+ and II share the common technical feature of a polynucleotide that encodes an amino acid sequence of a rhodopsin domain of an anion-conducting channelrhodopsin linked to a heterologous promoter sequence and expressed in a host cell.

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is obvious the publication titled "Structure-guided transformation of channelrhodopsin into a light-activated chloride channel" by BERNDT et al. (hereinafter "Berndt") [published 25 April 2014 in Science Vol 344 No 6182 Pages 420-424, with online supplemental material available at [www.sciencemag.org/content/344/6182/420/suppl/DC1](http://www.sciencemag.org/content/344/6182/420/suppl/DC1)], in view of Accassion L1J207 by Uniprot (hereinafter "Uniprot") (online) 6 March 2013 [retrieved 30 May 2015] [Available on the internet: <http://www.uniprot.org/uniprot/L1J207>].

As to the common technical feature and claim 1, Berndt teaches a polynucleotide that encodes an amino acid sequence at least 90% identical to a rhodopsin domain of an anion-conducting channelrhodopsin expressible in said cell using a heterologous promoter sequence (abstract; we designed and characterized a class of channelrhodopsins (originally cation-conducting) converted into chloride-conducting anion channels. These tools enable fast optical inhibition of action potentials and can be engineered to display step-function kinetics for stable inhibition, outlasting light pulses and for orders-of-magnitude-greater light sensitivity of inhibited cells; Supplementary Material and Methods, pg 2, para 2, Point mutagenesis of C1C2.....We used AAV vectors bearing the CaMKII alpha promoter for protein expression in neurons, and a pcDNA3.1 vector bearing the CMV promoter for expression in HEK cells"). In addition, Uniprot entry L1J207 (hereinafter "L1J207") (06 March 2013) [retrieved on 30 May 2016 from <http://www.uniprot.org/uniprot/L1J207>] teaches a microbial rhodopsin peptide sequence (pg 1; "the ion-translocating microbial rhodopsin (mr) family") having 100% sequence identity with instant SEQ ID NO: 1 (pg 2-3; AA 1-295 100% sequence identity).

As the common technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common special technical features that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I+ and II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note concerning claim 15: Claim 15 is interpreted to depend from 12, not claim 11 as written, because claim 11 is a dependent composition claim.

Note concerning claim 21: Claim 21, a composition claim, is written to depend from method claim 19, and is more appropriately dependent on composition claim 20, and is interpreted as such.

Note concerning claim 22: Claim 22, a composition claim, is written to depend from method claim 19, and is more appropriately dependent on composition claim 20, and is interpreted as such.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード ( 参考 )
<b>A 6 1 K 35/76 (2015.01)</b>	A 6 1 K 35/76	
<b>A 6 1 K 31/7088 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7088	
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	
<b>A 6 1 P 25/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/00	
<b>C 0 7 K 14/405 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/405	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 スプディック , ジョン リー  
アメリカ合衆国 テキサス 77030 , ヒューストン , ファニン 7000 , スイート 1200 , ユニバーシテイ オブ ティーエックス ヘルス サイエンス センター アット ヒューストン 気付

(72)発明者 ゴボルノヴァ , エレナ ジー .  
アメリカ合衆国 テキサス 77030 , ヒューストン , ファニン 7000 , スイート 1200 , ユニバーシテイ オブ ティーエックス ヘルス サイエンス センター アット ヒューストン 気付

(72)発明者 シネシュチェコフ , オレグ エー .  
アメリカ合衆国 テキサス 77030 , ヒューストン , ファニン 7000 , スイート 1200 , ユニバーシテイ オブ ティーエックス ヘルス サイエンス センター アット ヒューストン 気付

F ターム(参考) 4B065 AA88X AA90X AA93X AB01 AC20 BA02 BA05 CA44  
4C084 AA13 NA14 ZA02  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02  
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZA02  
4H045 CA30 EA20