

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6145043号  
(P6145043)

(45) 発行日 平成29年6月7日(2017.6.7)

(24) 登録日 平成29年5月19日(2017.5.19)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 N 5/06 (2006.01)

A 6 1 N 5/06

Z

請求項の数 15 (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2013-537855 (P2013-537855)  
 (86) (22) 出願日 平成23年11月4日(2011.11.4)  
 (65) 公表番号 特表2014-502177 (P2014-502177A)  
 (43) 公表日 平成26年1月30日(2014.1.30)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/059287  
 (87) 国際公開番号 W02012/061684  
 (87) 国際公開日 平成24年5月10日(2012.5.10)  
 審査請求日 平成26年10月31日(2014.10.31)  
 (31) 優先権主張番号 61/410,729  
 (32) 優先日 平成22年11月5日(2010.11.5)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 503115205  
 ザ ボード オブ トラスティーズ オブ  
 ザ レランド スタンフォード ジュニ  
 ア ユニバーシティ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 943  
 06、パロ アルト、エル カミーノ レ  
 アル 3000  
 (74) 代理人 100149294  
 弁理士 内田 直人  
 (72) 発明者 アニキーバ, ポリーナ  
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O  
 2144, サマービル, ジェイ ストリ  
 ト 39, アpartment 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光遺伝的方法で使用するための光の上方変換

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体の神経細胞の原形質膜を脱分極化または過分極化する方法に用いるための、ランタニドをドーブした複数のナノ粒子と光応答性オプシンとを含む製造品であって、

前記複数のナノ粒子は、赤外線または近赤外線スペクトル内の電磁放射線に曝露されると、前記赤外線または近赤外線スペクトル内の前記電磁放射線が、前記ナノ粒子によって可視スペクトル内の光に上方変換されるものであり、前記光応答性オプシンは、前記神経細胞の原形質膜上で発現され、前記可視スペクトル内の光によるオプシンの活性化が、前記原形質膜の脱分極または過分極を誘導するものであり、

前記光応答性オプシンが、配列番号 6、7、8、9、10 および 11 のいずれかに示すアミノ酸配列と少なくとも 90% のアミノ酸配列同一性があるか、あるいは配列番号 2 および 3 のいずれかに示すアミノ酸配列と少なくとも 95% のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含み、光応答性オプシンのアミノ酸配列が配列番号 6、7、8、9、10 および 11 のいずれかである場合には前記原形質膜が脱分極化され、光応答性オプシンのアミノ酸配列が配列番号 2 または 3 である場合には前記原形質膜が過分極化される、製造品。

【請求項 2】

個体の神経細胞の原形質膜を脱分極化または過分極化する方法に用いるための、ランタニドをドーブした複数のナノ粒子と光応答性オプシンをコードするポリヌクレオチドとを含む製造品であって、

10

20

前記光応答性タンパク質は、個体の神経細胞の原形質膜上で発現され、前記オプシンが、光で照明されたときに神経細胞の膜の脱分極または過分極を誘導することが可能であり、

前記ランタニドをドーブした複数のナノ粒子は前記神経細胞に近接しており、

前記複数のナノ粒子は、赤外線または近赤外線スペクトル内の電磁放射線に曝露されると、前記赤外線または近赤外線スペクトル内の前記電磁放射線が、可視スペクトル内の光に上方変換され、前記可視スペクトル内の光によるオプシンの活性化が、前記原形質膜の脱分極または過分極を誘導するものであり、

前記光応答性オプシンが、配列番号 6、7、8、9、10 および 11 のいずれかに示すアミノ酸配列と少なくとも 90% のアミノ酸配列同一性があるか、あるいは配列番号 2 および 3 のいずれかに示すアミノ酸配列と少なくとも 95% のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含み、光応答性オプシンのアミノ酸配列が配列番号 6、7、8、9、10 および 11 のいずれかである場合には前記原形質膜が脱分極化され、光応答性オプシンのアミノ酸配列が配列番号 2 または 3 である場合には前記原形質膜が過分極化される、製造品。

10

【請求項 3】

前記光応答性オプシンが、配列番号 6、7、8、9、10 および 11 のいずれかに示すアミノ酸配列と少なくとも 95% のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の製造品。

【請求項 4】

20

前記光応答性オプシンが、配列番号 6、7、8、9、10 および 11 のいずれかに示すアミノ酸配列と少なくとも 98% のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の製造品。

【請求項 5】

前記ランタニドをドーブしたナノ粒子が、ランタン、セリウム、プラセオジウム、ネオジウム、プロメチウム、サマリウム、ユーロピウム、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホルミウム、エルビウム、ツリウム、イッテルビウム、およビルテチウムからなる群より選択されるランタニド金属を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の製造品。

【請求項 6】

30

前記ランタニドをドーブしたナノ粒子が、 $\text{NaYF}_4 : \text{Yb} / \text{X} / \text{Gd}$  を含み、X が、Er、Tm、または Er / Tm である、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の製造品。

【請求項 7】

前記赤外線または近赤外線スペクトル内の電磁放射線が、約 450 nm ~ 約 550 nm の波長を有する光に上方変換される、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の製造品。

【請求項 8】

前記赤外線または近赤外線スペクトル内の電磁放射線が、赤色、黄色または琥珀色の光に対応する波長を有する光に上方変換される、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の製造品。

【請求項 9】

40

前記赤外線または近赤外線スペクトル内の電磁放射線が、緑色または青色の光に対応する波長を有する光に上方変換される、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の製造品。

【請求項 10】

前記個体が、ヒト以外の動物である、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の製造品。

【請求項 11】

前記個体が、ヒトである、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の製造品。

【請求項 12】

前記神経細胞が、中枢神経系内の神経細胞である、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の製造品。

【請求項 13】

50

前記神経細胞が、末梢神経系内の神経細胞である、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の製造品。

【請求項 14】

ヒトまたはヒト以外の動物の頭蓋骨が外科的に薄くされ、赤外線または近赤外線の源が、薄くなった頭蓋骨領域上に直接配置される、請求項 10 または 11 に記載の製造品。

【請求項 15】

前記神経細胞が、中枢神経系または末梢神経系内の神経細胞である、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の製造品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、その開示がその全体で参照することにより本明細書に組み込まれる、2010年11月5日出願の米国仮出願第61/410,729号に対して優先権を請求する。

【0002】

本願は、赤外線または近赤外線波長からの電磁放射線を可視光スペクトルに上方変換する、ランタニドをドーブしたナノ粒子を含む、組成物と、光を送達してニューロンにおいて発現された光応答性オプシントタンパク質を活性化し、ニューロンの膜分極状態を選択的に改変するために、ランタニドをドーブしたナノ粒子を使用する方法に関する。

【背景技術】

20

【0003】

光遺伝学は、機能している無傷の生体系とペースを保つために必要とされる時間精度（ミリ秒の時間尺度）で、自由に行動しているほ乳類および他の動物の体内でさえも、生体組織の標的細胞内の特定の事象を制御するために使用される、遺伝的および光学的方法の組み合わせである。光遺伝学の特徴は、特定の標的機構の使用を通して細胞型分解能を維持しながら、ニューロン膜電位の時間的に正確な操作を可能にする、標的神経細胞の原形質膜への高速光応答性オプシンチャンネルまたはポンプタンパク質の導入である。神経系の機能を調べるために使用することができる微生物オプシンの中には、照射された時に膜過分極を推進するために使用される、ハロロドプシン（NpHR）、および光への暴露時に膜を脱分極化するために使用される、チャンネルロドプシンがある。わずか2～3年の間に、光遺伝学の分野は、特定の細胞型が、生体内の神経回路等の生物組織の機能にどのように貢献するかという基本的な科学的理解をさらに深めてきた。また、臨床側では、光遺伝学によって動かされた研究が、不安、記憶、恐怖、および依存症等の複雑なほ乳類の挙動の根底にある神経学的機構への洞察につながってきた。

30

【0004】

これらの進歩にもかかわらず、動物での光遺伝的方法の使用は、動物が光源に係留される、または動物に外科学的に埋め込まれた光源を有することを要求するという有意な欠点を抱えている。また、脳の中のニューロンの機能を改変するために光遺伝的方法が使用される時に、これらのニューロンに近接して光源が配置されなければならない。これは、動物の頭蓋骨にドリルで穴を開けることを必要とし、また、関心の脳領域が脳自体の奥深くに位置する時に、実用的困難も提示する。光が神経組織を不十分に通過するため、これは、周辺脳組織への意図しない損傷をもたらし得る、光ファイバ光源を脳に挿入することを余儀なくさせる。

40

【0005】

したがって、必要とされるものは、神経細胞の原形質膜上に光応答性オプシントタンパク質を発現する動物の脳および末梢神経系内に位置するニューロンへ光を非侵襲的に送達する方法である。

【0006】

本明細書の全体を通して、出版物（例えば、科学論文）、特許出願、特許等を参照し、その全ては、それらの全体で参照することにより本明細書に組み込まれる。

50

## 【発明の概要】

## 【0007】

本明細書では、赤外線（IR）または近赤外線（NIR）スペクトルと関連付けられる波長からの電磁放射線を、可視光と関連付けられる波長に上方偏移させることが可能なナノ粒子の使用を介して、神経原形質膜上で光応答性オプシタンパク質を発現するニューロンへ光を非侵襲的に送達するための組成物および方法が提供される。

## 【0008】

したがって、本明細書では、（a）神経細胞に近接して複数のランタニドをドーブしたナノ粒子を配置することと、（b）複数のナノ粒子を、赤外線（IR）または近赤外線（NIR）スペクトル内の電磁放射線に暴露させることであって、IRまたはNIRスペクトル内の電磁放射線は、ナノ粒子によって可視スペクトル内の光に上方変換され、光応答性オプシンが、神経細胞の原形質膜上で発現され、可視スペクトル内の光によるオプシンの活性化は、原形質膜の脱分極を誘発する、暴露させることとを含む、個体の神経細胞の原形質膜を脱分極化する方法が提供される。

10

## 【0009】

他の態様では、（a）光応答性オプシンをコードするポリヌクレオチドを個体に投与することであって、光応答性タンパク質は、前記個体の神経細胞の原形質膜上で発現され、オプシンは、光で照射された時に神経細胞の膜脱分極を誘発することが可能である、投与することと、（b）神経細胞に近接して複数のランタニドをドーブしたナノ粒子を投与することと、（c）複数のナノ粒子を、赤外線（IR）または近赤外線（NIR）スペクトル内の電磁放射線に暴露させることであって、IRまたはNIRスペクトル内の電磁放射線は、可視スペクトル内の光に上方変換され、可視スペクトル内の光によるオプシンの活性化は、原形質膜の脱分極を誘発する、暴露させることとを含む、個体の神経細胞の原形質膜を脱分極化する方法が本明細書で提供される。

20

## 【0010】

いくつかの態様では、（a）神経細胞に近接して複数のランタニドをドーブしたナノ粒子を配置することと、（b）複数のナノ粒子を、赤外線（IR）または近赤外線（NIR）スペクトル内の電磁放射線に暴露させることであって、IRまたはNIRスペクトル内の電磁放射線は、ナノ粒子によって可視スペクトル内の光に上方変換され、光応答性オプシンが、原形質膜上で発現され、可視スペクトル内の光によるオプシンの活性化は、原形質膜の過分極を誘発する、暴露させることとを含む、個体の神経細胞の原形質膜を過分極化する方法が本明細書で提供される。

30

## 【0011】

さらに他の態様では、（a）光応答性オプシンをコードするポリヌクレオチドを個体に投与することであって、光応答性タンパク質は、前記個体の神経細胞の原形質膜上で発現され、オプシンは、光で照射された時に神経細胞の膜過分極を誘発することが可能である、投与することと、（b）神経細胞に近接して複数のランタニドをドーブしたナノ粒子を投与することと、（c）複数のナノ粒子を、赤外線（IR）または近赤外線（NIR）スペクトル内の電磁放射線に暴露させることであって、IRまたはNIRスペクトル内の電磁放射線は、可視スペクトル内の光に上方変換され、可視スペクトル内の光によるオプシンの活性化は、原形質膜の過分極を誘発する、暴露させることとを含む、個体の神経細胞の原形質膜を過分極化する方法が本明細書で提供される。

40

## 【0012】

本開示は、生体内の光の深部送達のための上方変換を伴う装置および方法を対象とする。本開示の態様は、概して、可視光スペクトルへの近赤外光の上方変換を使用する、生体内の組織への光の送達、および本明細書で論議される用途に関する方法に関する。

## 【0013】

本開示のある態様は、生体組織内に埋め込まれる光源を対象とする。ナノ粒子溶液からのナノ粒子は、光応答性チャネル/オプシンを発現する細胞を含む、標的細胞集団に固着する。ナノ粒子は、第2の異なる波長の光を発することによって、第1の波長の光の受容

50

に応答するように構成される。例えば、ナノ粒子は、受容した光を上方変換し、それにより、より高い周波数の光を発することができる。

【0014】

本開示の実施形態は、オプシン遺伝子を持つウイルスおよびナノ粒子溶液の関心部位の注射を対象とする。ウイルスは、関心部位における標的細胞集団にオプシン遺伝子を発現させる。種々の異なる光源が可能である。異なる波長の使用は、例えば、ある波長が、脳またはその他の組織による吸収の対応する減少を示すため、異なる（外部）光源の使用を促進するために特に有用となり得る。

【0015】

本開示の特定の実施形態と一致して、発光ダイオード（「LED」）は、薄くなった頭蓋骨の一部分の上に配置される。LEDは、頭蓋骨の薄くなった部分の付近で皮下に配置され、LEDの場所および/または配向は、少なくとも部分的に、標的細胞集団の場所に基づいて選択される。例えば、LEDは、LEDと標的細胞集団との間の距離を短縮するように配置し、それに従って配向することができる。

【0016】

本開示のあるより具体的な態様では、LEDからの光は、周辺組織を通過してナノ粒子へと進む。（近）赤外光がナノ粒子に衝突する時に、ナノ粒子は、赤外線（IR）光子を吸収し、可視光子を発する。次いで、可視光子は、その中で応答を引き起こす（例えば、神経興奮または阻害を誘起する）標的細胞集団内で発現されるオプシンによって吸収される。

【0017】

LEDは、ペースメーカーに使用されるものと同様のバッテリーによって電力供給することができる。LEDは、頭蓋骨および介在組織を通過して進むことができる、特に700nm~1000nmの間の赤外線スペクトル内の光を発することができる。ナノ粒子から発せられた光は、450~550nmの間を中心としたスペクトルを有する。発せられる光の波長は、ナノ粒子の特性に依存する。

【0018】

上記の概説は、本開示の各例証実施形態または全実装を説明することを目的としていない。

【図面の簡単な説明】

【0019】

種々の例示的实施形態は、以下の説明および添付図面を考慮して、より完全に理解されてもよい。

【図A】図1：本開示の実施形態と一致する、頭蓋骨の断面図を示す。図2：本開示の実施形態と一致する、標的ニューロンへの光送達を示す。

【図B】図3：本開示の実施形態と一致する、複数の光源を使用するシステムを描写する。

【0020】

本開示は、種々の修正および代替形態に従うが、それらの詳細は、一例として図面に示されており、詳細に説明される。しかしながら、本開示を説明される特定の実施形態に限定することを意図しないと理解されたい。逆に、請求項で定義される態様を含む、本開示の範囲内に入る全ての修正、同等物、および代替案を対象とすることを意図する。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明は、とりわけ、神経細胞の原形質膜上で1つ以上の光応答性オプシタンパク質を発現する、それらの神経細胞へ光を送達するための組成物および方法を提供する。本発明者らは、神経細胞の原形質膜上の光応答性オプシタンパク質を活性化し、細胞の膜分極状態を選択的に改変するために、赤外線（IR）または近赤外線（NIR）電磁放射線を可視光スペクトルに対応する波長に変換する、ランタニド金属（例えば、ガドリニウム）でドーブされたナノ粒子を使用することができると発見した。可視光と違って、IRま

たはNIR電磁エネルギーは、生物組織に容易に浸透する。例えば、NIRは、最大で4センチメートルの距離にわたって生物組織に浸透することができる(Heyward & Dale Wagner, "Applied Body Composition Assessment", 2nd edition (2004), p. 100)。波長の関数としての組織中の光浸透を計算するために有用なある方程式が、米国特許第7,043,287号で開示され、その内容は参照することにより本明細書に組み込まれる。同様に、米国特許出願公開第2007/0027411号は、近赤外線低水準レーザ治療光が3~5cmの間の深さまで身体に浸透することを開示している。したがって、光遺伝的方法での電磁放射線のIRまたはNIR源の使用は、神経細胞に直接近接して光源を配置する必要性を軽減することができる。具体的には、脳での光遺伝的技法については、IRまたはNIR電磁エネルギーと組み合わせた、ランタニドをドープしたナノ粒子の使用が、頭蓋骨を穿孔する、または光ファイバ光源を脳に挿入する必要なく、オプシントタンパク質の活性化を可能にすることができる。同様に、末梢神経系では、皮下に配置された、または皮膚に対して装着されたIRまたはNIR源を介して、オプシン発現神経を活性化することができる。

10

#### 【0022】

##### 一般的技法

本発明の実践は、特に指示されない限り、当業者に周知である、分子生物学、微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学、免疫学、および生理学の従来技法を採用する。そのような技法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) and Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition (Sambrook and Russell, 2001), (jointly referred to herein as "Sambrook"); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987, including supplements through 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Harlow and Lane (1988), Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York; Harlow and Lane (1999), Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (jointly referred to herein as "Harlow and Lane"); Beaucage et al. eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000), Handbook of Experimental Immunology, 4th edition (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987)、およびGene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987)等の文献で十分に説明されている。他の有用な参考文献は、HarrisonのPrinciples of Internal Medicine (McGraw Hill; J. Isseleacher et al., eds.)、およびLanthanide Luminescence: Photophysical, Analytical and Biological Aspects (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg; Hanninen & Harma, eds., 2011)を含む。

20

30

40

#### 【0023】

50

## 定義

本明細書で使用されるように、「赤外線」または「近赤外線」または「赤外光」または「近赤外光」とは、 $0.74\text{ }\mu\text{m}$ における可視赤色光の公称境界から測定され、 $300\text{ }\mu\text{m}$ にまで及び、可視光の直上にあるスペクトル内の電磁放射線を指す。これらの波長は、約1から400THzの周波数範囲に対応する。具体的には、「近赤外線」または「近赤外光」はまた、水の吸収によって定義される、波長が $0.75\sim 1.4\text{ }\mu\text{m}$ となる電磁放射線も指す。

## 【0024】

「可視光」は、 $380\text{ nm}$ から $750\text{ nm}$ の間の波長を伴う電磁放射線として定義される。一般に、光を含む「電磁放射線」は、高い熱エネルギーを伴う分子（または隣接原子）の一部あるいは原子（または分子）中の電子等の帯電粒子の移動（振動）の加速および減速または変化によって生成される。

## 【0025】

本明細書で使用されるような「ナノ粒子」という用語はまた、ナノ結晶、ナノロッド、ナノクラスタ、クラスタ、粒子、ドット、量子ドット、小粒子、およびナノ構造材料を指すこともできる。「ナノ粒子」という用語は、量子サイズ効果と関連付けられる、 $100\text{ nm}$ 未満の（必ずしもではないが一般的に）小さいサイズを伴う全ての材料を包含する。

## 【0026】

「個体」は、ヒトを含むほ乳類である。ほ乳類は、家畜、スポーツ用動物、ペット、霊長類、マウス、およびラットを含むが、それらに限定されない。個体はまた、イヌおよびネコを含むが、それらに限定されない、伴侶動物も含む。いくつかの態様では、個体は、ほ乳類等のヒトではない動物である。別の態様では、個体は、ヒトである。

## 【0027】

本明細書で使用されるように、「1つの」および「その」という単数形は、特に指示されない限り、複数の参照を含む。

## 【0028】

本明細書の全体を通して挙げられる全ての最大数値制限は、全てのより低い数値制限が本明細書で明示的に書かれたかのように、そのようなより低い数値制限を含むことが意図される。本明細書の全体を通して挙げられる全ての最小数値制限は、全てのより高い数値制限が本明細書で明示的に書かれたかのように、そのようなより高い数値制限を含む。本明細書の全体を通して挙げられる全ての数値範囲は、そのようなより広い数値範囲内に入る全てのより狭い数値範囲が、本明細書で明示的に書かれたかのように、そのようなより狭い数値範囲を含む。

## 【0029】

ランタニドをドーピングしたナノ粒子

材料科学では、ドーピングは、特定の鉄または原子種をホスト格子核構造に組み込んで、新しい有用な性質を伴うハイブリッド材料を生産するために一般的に使用されている。ナノ粒子を合成する時に、ドーピングは、粒子のサイズおよび形状だけでなく、近赤外線（NIR）励起を可視発光に変換する能力等の他の性質にも影響を及ぼすことができる。

## 【0030】

ランタニド金属またはランタノイド（「希土類」金属としても知られている）は、原子番号57（ランタン）から71（ルテチウム）の要素であり、しばしば、それらの化学的類似性により、イットリウム（原子番号39）およびスカンジウム（原子番号21）を含む。ランタニドイオンは、光子上方変換として知られている過程を通して、近赤外線長波長励起放射をより短い可視波長に変換する能力を含む、独特のルミネセンス特性を示す。ランタニドは通常、三価カチオンとして存在し、その場合、それらの電子構成は、 $1(\text{Ce}^{3+})$ から $14(\text{Lu}^{3+})$ まで様々である $n$ を伴う $(\text{Xe})4f$ である。 $f$ 多様体内の遷移は、長期ルミネセンスならびに明確な吸収および発光線等の、ランタニドイオンの光物理的性質の多くに関与する。 $f$ 電子は、充填 $5s$ および $5p$ 軌道によって外部摂動から保護され、したがって、線状スペクトルを生じる。加えて、ランタニドの $f-f$ 電子遷

10

20

30

40

50

移は、ラボルテの法則で禁止され、マイクロ～ミリ秒範囲内で長い励起状態持続期間につながる。

#### 【0031】

いくつかの実施形態では、ランタニドをドーブしたナノ粒子を合成するために、任意の公知の方法を使用することができる。そのような方法は、当技術分野で周知である（例えば、そのそれぞれの開示が、それらの全体で参照することにより本明細書に組み込まれる、Xu & Li, 2007, Clin Chem., 53(8): 1503-10; Wang et al., 2010, Nature, 463(7284): 1061-5; 米国特許出願公開第2003/0030067号および第2010/0261263号、ならびに米国特許第7,550,201号を参照されたい）。例えば、いくつかの実施形態では、ランタニドをドーブしたナノロッドを $\text{NaYF}_4$ 誘電体コアで合成することができ、0.3 g  $\text{NaOH}$ の脱イオン水溶液(1.5 ml)が、攪拌下で5 mlのエタノールおよび5 mlのオレイン酸と混合される。結果として生じる混合物に、2 mlの $\text{RECl}_3$  (0.2 M、 $\text{RE} = \text{Y}$ 、 $\text{Yb}$ 、 $\text{Er}$ 、 $\text{Gd}$ 、 $\text{Sm}$ 、 $\text{Nd}$ 、または $\text{La}$ )および1 mlの $\text{NH}_4\text{F}$  (2 M)が選択的に添加される。次いで、溶液は、オートクレーブの中へ移され、200 で2時間加熱される。次いで、遠心分離によってナノロッドが得られ、水およびエタノールで数回洗浄され、最終的にシクロヘキサン中で再分散させられる。別の非限定的実施例では、3 mlのオレイン酸および7 mlの1-オクタデセンを含有するフラスコに添加されたメタノール中の2 mlの $\text{RECl}_3$  (0.2 M、 $\text{RE} = \text{Y}$ 、 $\text{Yb}$ 、 $\text{Er}$ 、 $\text{Gd}$ 、または $\text{Tm}$ )を使用して、ナノ粒子を合成することができる。次いで、この溶液は、160 で30分間加熱され、室温まで冷却される。その後、 $\text{NH}_4\text{F}$  (1.6 mmol)および $\text{NaOH}$  (1 mmol)の5 mlメタノール溶液が添加され、溶液は30分間攪拌される。メタノールの蒸発後、溶液は次に、アルゴン下で1.5時間にわたって300 まで加熱され、室温まで冷却される。結果として生じるナノ粒子は、エタノールの添加によって沈殿させられ、遠心分離によって収集され、メタノールおよびエタノールで数回洗浄され、最終的にシクロヘキサン中で再分散させられる。

#### 【0032】

一実施形態では、ランタニドをドーブしたナノ粒子コアの材料は、多種多様な誘電材料を含むことができる。種々の実施形態では、誘電体コアは、ランタニドをドーブした酸化物材料を含むことができる。ランタニドは、ランタン( $\text{La}$ )、セリウム( $\text{Ce}$ )、プラセオジウム( $\text{Pr}$ )、ネオジウム( $\text{Nd}$ )、プロメチウム( $\text{Pm}$ )、サマリウム( $\text{Sm}$ )、ユーロピウム( $\text{Eu}$ )、ガドリニウム( $\text{Gd}$ )、テルビウム( $\text{Tb}$ )、ジスプロシウム( $\text{Dy}$ )、ホルミウム( $\text{Ho}$ )、エルビウム( $\text{Er}$ )、ツリウム( $\text{Tm}$ )、イットルビウム( $\text{Yb}$ )、およびルテチウム( $\text{Lu}$ )を含む。他の好適な誘電体コア材料は、イットリウム( $\text{Y}$ )およびスカンジウム( $\text{Sc}$ )等の非ランタニド元素を含む。したがって、好適な誘電体コア材料は、 $\text{Y}_2\text{O}_3$ 、 $\text{Y}_2\text{O}_2\text{S}$ 、 $\text{NaYF}_4$ 、 $\text{NaYbF}_4$ 、 $\text{Na}$ をドーブした $\text{YbF}_3$ 、 $\text{YAG}$ 、 $\text{YAP}$ 、 $\text{Nd}_2\text{O}_3$ 、 $\text{LaF}_3$ 、 $\text{LaCl}_3$ 、 $\text{La}_2\text{O}_3$ 、 $\text{TiO}_2$ 、 $\text{LuPO}_4$ 、 $\text{YVO}_4$ 、 $\text{YbF}_3$ 、 $\text{YF}_3$ 、または $\text{SiO}_2$ を含むが、それらに限定されない。一実施形態では、誘電体ナノ粒子コアは、 $\text{NaYF}_4$ である。これらの誘電体コアは、1つ以上の $\text{Er}$ 、 $\text{Eu}$ 、 $\text{Yb}$ 、 $\text{Tm}$ 、 $\text{Nd}$ 、 $\text{Tb}$ 、 $\text{Ce}$ 、 $\text{Y}$ 、 $\text{U}$ 、 $\text{Pr}$ 、 $\text{La}$ 、 $\text{Gd}$ 、および他の希土類種、またはそれらの組み合わせでドーブすることができる。一実施形態では、誘電体コア材料は、 $\text{Gd}$ でドーブされる。別の実施形態では、ランタニドをドーブしたナノ粒子は、 $\text{NaYF}_4 : \text{Yb} / \text{X} / \text{Gd}$ を含み、 $\text{X}$ は、 $\text{Er}$ 、 $\text{Tm}$ 、または $\text{Er} / \text{Tm}$ である。いくつかの実施形態では、ランタニドをドーブしたナノ粒子は、約0 mol%、約5 mol%、約10 mol%、約15 mol%、約20 mol%、約25 mol%、約30 mol%、約35 mol%、約40 mol%、約45 mol%、約50 mol%、約55 mol%、または約60 mol%  $\text{Gd}^{3+}$  イオンを含めた、これらの値の間の任意のmol%を含む、いずれかでドーブされた $\text{NaYF}_4 : \text{Yb} / \text{Er}$  (18/2 mol%)誘電体コアを含む。他の実施形態では、ランタニドをドーブしたナノ粒子は、約0 mol%、約5 mol%、約10 mol%、約15 mol%、約20 mol%、約25



mol %、または約 30 mol % Yb<sup>3+</sup> + イオンを含めた、これらの値の間の任意の mol % を含む、いずれかでドーピングされた NaYF<sub>4</sub>:Yb/Er (18/2 mol %) 誘電体コアを含む。さらに他の実施形態では、ランタニドをドーピングしたナノ粒子は、約 0 mol %、約 5 mol %、約 10 mol %、約 15 mol %、約 20 mol %、約 25 mol %、または約 30 mol % Er<sup>3+</sup> + イオンを含めた、これらの値の間の任意の mol % を含む、いずれかでドーピングされた NaYF<sub>4</sub>:Yb/Er (18/2 mol %) 誘電体コアを含む。他の実施形態では、ランタニドをドーピングしたナノ粒子は、約 0 mol %、約 5 mol %、約 10 mol %、約 15 mol %、約 20 mol %、約 25 mol %、または約 30 mol % Tm<sup>3+</sup> + イオンを含めた、これらの値の間の任意の mol % を含む、いずれかでドーピングされた NaYF<sub>4</sub>:Yb/Er (18/2 mol %) 誘電体コアを含む。別の実施形態では、ランタニドをドーピングしたナノ粒子は、NaYF<sub>4</sub>:Yb/Er/Gd (18/2/5 mol %)、NaYF<sub>4</sub>:Yb/Tm/Er/Gd (20/0.2/0.1/5 mol %)、NaYF<sub>4</sub>:Yb/Tm/Er/Gd (20/0.2/0.05/5 mol %)、および NaYF<sub>4</sub>:Yb/Tm/Gd (20/0.2/5 mol %) から成る群より選択される。

10

### 【0033】

いくつかの態様では、本明細書で開示されるランタニドをドーピングしたナノ粒子は、関心の神経細胞（その原形質膜上で1つ以上の光応答性オプシントタンパク質を発現する神経細胞等）の表面上で発現される1つ以上の分子に、1つ以上の送達分子を標的化するように、それらに共役される。これらは、制限なく、抗体またはそれらの断片、小分子、ならびにレクチンまたは任意の他の炭水化物モチーフを含むことができる。送達分子は、ランタニドをドーピングしたナノ粒子が、IRまたはNIR電磁放射線の上方変換時に活性化を可能にするように、オプシントタンパク質にごく接近したままであることを確実にする。ナノ粒子への抗体共役は、当技術分野で周知である（例えば、そのそれぞれの内容が、それらの全体で参照することにより本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2010/0209352号および第2008/0267876号を参照）。

20

### 【0034】

別の態様では、ランタニドをドーピングしたナノ粒子は、関心の神経細胞（その原形質膜上で1つ以上の光応答性オプシントタンパク質を発現する神経細胞等）の近位に（隣接して、または周辺等）外科的に配置される、生体適合性材料内に埋め込む、または閉じ込めることができる。いくつかの実施形態では、ランタニドをドーピングしたナノ粒子によるIRまたはNIR電磁放射線の上方変換によって産生される可視光が、関心の神経細胞の表面上で発現される光応答性オプシントタンパク質に到達することができるように、生体適合性材料は透明である。ランタニドをドーピングしたナノ粒子を埋め込む、または閉じ込めるために使用される生体適合性材料は、Ioplex材料および2-ヒドロキシエチルメタクリレートまたはアクリルアミドに基づくもの等の他のヒドロゲル、およびBiomer (Ethicon Corp.)、Avcothane (Avco-Everett Laboratories) を含む、ポリエーテルポリウレタン尿素 (PEUU)、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン (Gore-Tex (商標))、ポリ(塩化ビニル)、ポリジメチルシロキサン、エチレン・アクリル酸共重合体、編物または織物 Dacron、ポリエステル・ポリウレタン、ポリウレタン、ポリカーボネートポリウレタン (Corethane (商標))、ポリアミド (Nylon)、およびポリスチレンを含むことができるが、それらに限定されない。一実施形態では、生体適合性材料は、ポリジメチルシロキサン (PDMS) となり得る。本明細書で開示されるランタニドをドーピングしたナノ粒子を埋め込む、および/または閉じ込めるために使用されてもよい、付加的な化合物は、そのそれぞれの内容が、それらの全体で参照することにより本明細書に組み込まれる、Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, 3rd Edition 1982 (Vol. 19, pp. 275-313, and Vol. 18, pp. 219-2220), van der Giessen et al., 1996, Circulation, 94:1690

30

40

50

- 1997 (1996)、米国特許出願公開第2011/0054305号、および米国特許第6,491,965号で説明されている。

【0035】

光応答性オプシントタンパク質

本明細書では、中枢または末梢神経系のニューロンを選択的に過分極化または脱分極化するための光遺伝学ベースの組成物が提供される。光遺伝学とは、機能している無傷の生体系とベースを保つために必要とされる時間精度（ミリ秒の時間尺度）で、自由に行動しているほ乳類および他の動物の体内でさえも、生体組織の標的細胞内の特定の事象を制御するために使用される、遺伝的および光学的方法の組み合わせを指す。光遺伝学は、特定の標的機構の使用を通して細胞型分解能を維持しながら、ニューロン膜電位の時間的に正確な操作を可能にする、標的神経細胞の原形質膜への高速光応答性チャネルまたはポンプタンパク質の導入を必要とする。

10

【0036】

本発明で使用されてもよい、光応答性オプシンは、光によってニューロンにおける過分極を誘発するオプシンと、光によってニューロンにおける脱分極を誘発するオプシンを含む。オプシンの実施例は、以下の表1および2で示される。

【0037】

【表1】

【表1】可視スペクトルにわたる細胞活性の阻害のための識別されたオプシンを示す。

オプシン型	生物起源	波長感度	定義された動作
<i>NpHR</i>	ナトロノモナス・パラオニス	最大589 nm	阻害（過分極）
<i>BR</i>	ハロバクテリウム・ハロビウム	最大570 nm	阻害（過分極）
<i>AR</i>	アセタバダリアアセタブラム	最大518 nm	阻害（過分極）
<i>GtR3</i>	グイラルディア・セータ	最大472 nm	阻害（過分極）
<i>Mac</i>	レプトスフェリア・マクラン	最大470~500 nm	阻害（過分極）
<i>NpHr3.0</i>	ナトロノモナス・パラオニス	680 nm有用 最大589 nm	阻害（過分極）
<i>NpHR3.1</i>	ナトロノモナス・パラオニス	680 nm有用 最大589 nm	阻害（過分極）

20

30

【0038】

## 【表 2】

【表 2】可視スペクトルにわたる興奮および変調のための識別されたオプシンを示す。

オプシン型	生物起源	波長感度	定義された動作
<i>VChR1</i>	ボルボックス・カル テリ	589 nm有用 最大535 nm	興奮 (脱分極)
<i>DChR</i>	ドナリエラ・サリナ	最大500 nm	興奮 (脱分極)
<i>ChR2</i>	コナミドリムシ	最大470 nm 380~405 nm有用	興奮 (脱分極)
<i>ChETA</i>	コナミドリムシ	最大470 nm 380~405 nm有用	興奮 (脱分極)
<i>SFO</i>	コナミドリムシ	最大470 nm 最大530 nm	興奮 (脱分極) 不活性化
<i>SSFO</i>	コナミドリムシ	最大445 nm 590 nm、390~400 nm	段階的活性化 (脱分 極) 不活性化
<i>C1V1</i>	ボルボックス・カル テリおよび コナミドリムシ	最大542 nm	興奮 (脱分極)
<i>C1V1 E122</i>	ボルボックス・カル テリおよび コナミドリムシ	最大546 nm	興奮 (脱分極)
<i>C1V1 E162</i>	ボルボックス・カル テリおよび コナミドリムシ	最大542 nm	興奮 (脱分極)
<i>C1V1 E122/E162</i>	ボルボックス・カル テリおよび コナミドリムシ	最大546 nm	興奮 (脱分極)

## 【0039】

本明細書で使用されるように、光応答性オプシン (NpHR、BR、AR、GtR3、Mac、ChR2、VChR1、DChR、およびChETA等) は、自然発生タンパク質および機能的変異形、断片、断片を含む融合タンパク質、または全長タンパク質を含む。例えば、シグナルペプチドが削除されてもよい。変異形は、自然発生タンパク質配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のうちのいずれかで同一である、アミノ酸配列を有してもよい。機能的変異形は、自然発生タンパク質と同じまたは同様の過分極機能または脱分極機能を有してもよい。

## 【0040】

## 強化細胞内輸送アミノ酸モチーフ

本開示は、ほ乳類細胞の原形質膜への輸送を強化する、1つ以上のアミノ酸配列モチーフの追加によって、細胞において発現される光応答性オプシンタンパク質の修飾を提供する。進化的により単純な生物に由来する構成要素を有する、光応答性オプシンタンパク質は、ほ乳類細胞によって発現されない、または耐えられなくてもよく、あるいはほ乳類細胞において高レベルで発現された時に低下した細胞内局在性を示してもよい。その結果として、いくつかの実施形態では、細胞において発現される光応答性オプシンタンパク質は、シグナルペプチド、小胞体 (ER) 移行シグナル、膜輸送シグナル、および/またはN末端ゴルジ移行シグナルから成る群より選択される、1つ以上の1つ以上のアミノ酸配列モチーフに融合させることができる。ほ乳類細胞の原形質膜への光応答性オプシンタンパク質輸送を強化する、1つ以上のアミノ酸配列モチーフは、光応答性オプシンタンパク質

のN末端、C末端、またはNおよびC末端の両方に融合させることができる。随意で、光応答性オプシントタンパク質および1つ以上のアミノ酸配列モチーフは、リンカーによって分離されてもよい。いくつかの実施形態では、光応答性オプシントタンパク質は、細胞原形質膜へのタンパク質の輸送を強化する輸送シグナル(t s)の追加によって修飾することができる。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、ヒト内向き整流カリウムチャネルKir2.1のアミノ酸配列から導出することができる。他の実施形態では、輸送シグナルは、アミノ酸配列KSRITSEGEYIPLDQIDINVを含むことができる。

#### 【0041】

細胞の原形質膜への光応答性オプシントタンパク質の輸送を強化することができる、付加的なタンパク質モチーフは、その全体で参照することにより本明細書に組み込まれる、米

10

#### 【0042】

#### 光応答性塩素ポンプ

いくつかの態様では、本明細書で説明される光応答性オプシントタンパク質は、光応答性塩素ポンプである。本明細書で提供される方法のいくつかの態様では、光応答性塩素ポンプのハロロドプシン族の1つ以上の構成要素が、中枢および末梢神経系のニューロンの原形質膜上で発現される。

#### 【0043】

20

いくつかの態様では、中枢または末梢神経系の神経細胞の原形質膜上で発現される、1つ以上の光応答性塩素ポンプタンパク質は、ナトロノモナス・パラオニスに由来することができる。いくつかの実施形態では、光応答性塩素ポンプタンパク質は、琥珀色光ならびに赤色光に応答することができ、光応答性塩素ポンプタンパク質が琥珀色または赤色光で照射された時に、介在ニューロン内の過分極電流を伸介することができる。光応答性塩素ポンプを活性化することができる光の波長は、約580から約630nmの間となり得る。いくつかの実施形態では、光は、約590nmの波長にあり得る、または光は、約630nmよりも大きい(例えば、約740nm未満)波長を有することができる。別の実施形態では、光は、約630nmの波長を有する。いくつかの実施形態では、光応答性塩素ポンプタンパク質は、光の連続パルスに暴露された時に、少なくとも約90分にわたって神経細胞膜を過分極化することができる。いくつかの実施形態では、光応答性塩素ポンプタンパク質は、配列番号1で示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、アミノ酸配列を含むことができる。加えて、光応答性塩素ポンプタンパク質は、光に対する感受性を増加または減少させ、光の特定の波長に対する感受性を増加または減少させ、および/または細胞の原形質膜の分極状態を調節する光応答性タンパク質の能力を増加または減少させるように、天然アミノ酸配列に導入される置換、削除、および/または挿入を含むことができる。いくつかの実施形態では、光応答性塩素ポンプタンパク質は、1つ以上の保存アミノ酸置換を含有する。いくつかの実施形態では、光応答性タンパク質は、1つ以上の非保存アミノ酸置換を含有する。天然アミノ酸配列に導入される置換、削除、および/または挿入を含む、光応答性タンパク質は、光に

30

40

#### 【0044】

加えて、他の態様では、光応答性塩素ポンプタンパク質は、配列番号1で示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、コアアミノ酸配列と、小胞体(ER)移行シグナルとを含むことができる。このER移行シグナルは、コアアミノ酸配列のC末端に融合させることができ、またはコアアミノ酸配列のN末端に融合させることができる。いくつかの実施形態では、ER移行シグナルは、リンカーによってコアアミノ酸配列に結合される。リンカーは、長さで約5、10、20、30、40、50、75、100、125

50

、150、175、200、225、250、275、300、400、または500個のうちのいずれかであるアミノ酸を含むことができる。リンカーはさらに、例えば、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、またはシアン蛍光タンパク質であるが、それらに限定されない、蛍光タンパク質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ER移行シグナルは、アミノ酸配列FXYENEを含むことができ、Xは、任意のアミノ酸となり得る。別の実施形態では、ER移行シグナルは、アミノ酸配列VXXSLを含むことができ、Xは、任意のアミノ酸となり得る。いくつかの実施形態では、ER移行シグナルは、アミノ酸配列FCYENENVを含むことができる。

#### 【0045】

他の態様では、本明細書で提供される光応答性塩素ポンプタンパク質は、細胞膜上で発現される光応答性タンパク質を含むことができ、タンパク質は、配列番号1で示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、コアアミノ酸配列と、輸送シグナル（例えば、原形質膜への光応答性塩素ポンプタンパク質の輸送を強化することができる）とを含む。輸送シグナルは、コアアミノ酸配列のC末端に融合させることができ、またはコアアミノ酸配列のN末端に融合させることができる。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、長さで約5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400、または500個のうちのいずれかであるアミノ酸を含むことができる、リンカーによって、コアアミノ酸配列に結合することができる。リンカーはさらに、例えば、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、またはシアン蛍光タンパク質であるが、それらに限定されない、蛍光タンパク質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、ヒト内向き整流カリウムチャネルKir2.1のアミノ酸配列から導出することができる。他の実施形態では、輸送シグナルは、アミノ酸配列KSRIITSEGEYIPLDQIDINVを含むことができる。

#### 【0046】

いくつかの態様では、光応答性塩素ポンプタンパク質は、配列番号1で示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、コアアミノ酸配列と、ER移行シグナル、シグナルペプチド、および膜輸送シグナルから成る群より選択される、ほ乳類細胞の原形質膜への輸送を強化する、少なくとも1つの（1つ、2つ、3つ、またそれ以上等）アミノ酸配列モチーフとを含むことができる。いくつかの実施形態では、光応答性塩素ポンプタンパク質は、N末端シグナルペプチド、C末端ER移行シグナル、およびC末端輸送シグナルを含む。いくつかの実施形態では、C末端ER移行シグナルおよびC末端輸送シグナルは、リンカーによって結合することができる。リンカーは、長さで約5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400、または500個のうちのいずれかであるアミノ酸を含むことができる。リンカーはまた、例えば、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、またはシアン蛍光タンパク質であるが、それらに限定されない、蛍光タンパク質をさらに含むこともできる。いくつかの実施形態では、ER移行シグナルは、輸送シグナルよりもC末端に位置することができる。他の実施形態では、輸送シグナルは、ER移行シグナルよりもC末端に位置することができる。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、アミノ酸配列MTETLPPTESAVALLQAEを含む。別の実施形態では、光応答性塩素ポンプタンパク質は、配列番号2と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

#### 【0047】

また、他の態様では、光応答性塩素ポンプタンパク質は、配列番号1で示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、コアアミノ酸配列を含むことができ、配列番号1のN末端シグナルペプチドは、削除または置換される。いくつかの実施形態では、他の

10

20

30

40

50

シグナルペプチド（他のオブシンからのシグナルペプチド等）を使用することができる。光応答性タンパク質はさらに、本明細書で説明されるER移行シグナルおよび/または膜輸送シグナルを含むことができる。いくつかの実施形態では、光応答性塩素ポンプタンパク質は、配列番号3と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む。

#### 【0048】

いくつかの実施形態では、光応答性オブシンタンパク質は、配列番号1で示される配列と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む、NpHRオブシンタンパク質である。いくつかの実施形態では、NpHRオブシンタンパク質はさらに、小胞体（ER）移行シグナルおよび/または膜輸送シグナルを含む。例えば、NpHRオブシンタンパク質は、配列番号1で示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列と、小胞体（ER）移行シグナルとを含む。いくつかの実施形態では、配列番号1で示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列は、リンカーを通してER移行シグナルに結合される。いくつかの実施形態では、ER移行シグナルは、アミノ酸配列FXYENEを含み、Xは、任意のアミノ酸となり得る。別の実施形態では、ER移行シグナルは、アミノ酸配列VXXSLを含み、Xは、任意のアミノ酸となり得る。いくつかの実施形態では、ER移行シグナルは、アミノ酸配列FCYENEVを含む。いくつかの実施形態では、NpHRオブシンタンパク質は、配列番号1で示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列と、ER移行シグナルと、膜輸送シグナルとを含む。他の実施形態では、NpHRオブシンタンパク質は、N末端からC末端まで、配列番号1で示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列と、ER移行シグナルと、膜輸送シグナルとを含む。他の実施形態では、NpHRオブシンタンパク質は、N末端からC末端まで、配列番号1で示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列と、膜輸送シグナルと、ER移行シグナルとを含む。いくつかの実施形態では、膜輸送シグナルは、ヒト内向き整流カリウムチャネルKir2.1のアミノ酸配列から導出される。いくつかの実施形態では、膜輸送シグナルは、アミノ酸配列KSRIITSEGEYIPLDQIDINVを含む。いくつかの実施形態では、膜輸送シグナルは、リンカーによって、配列番号1で示される配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列に結合される。いくつかの実施形態では、膜輸送シグナルは、リンカーを通してER移行シグナルに結合される。リンカーは、長さで5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400、または500個のうちのいずれかであるアミノ酸を含んでもよい。リンカーはさらに、例えば、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、またはシアン蛍光タンパク質であるが、それらに限定されない、蛍光タンパク質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、光応答性オブシンタンパク質はさらに、N末端シグナルペプチドを含む。いくつかの実施形態では、光応答性オブシンタンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、光応答性オブシンタンパク質は、配列番号3のアミノ酸配列を含む。

#### 【0049】

また、本明細書では、配列番号1で示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、コアアミノ酸配列と、ER移行シグナルと、膜輸送シグナルとを含む、光応答性タンパク質等の、本明細書で説明される光応答性塩素イオンポンプタンパク質のうちのいずれかをコードするポリヌクレオチドも提供される。別の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2および/または配列番号3と少なくとも95%同一であるアミノ酸をコードする、配列を含む。ポリヌクレオチドは、発現ベクター（本明細書で説明されるウイルスベクター等であるが、それに限定されない）の中にあってもよい。ポリヌクレオチドは、中枢または末梢神経系のニューロンでの光応答性塩素イオンポンプタンパク質の発現に使用されてもよい。

#### 【0050】

光応答性塩素ポンプタンパク質に関係付けられるさらなる開示は、米国特許出願公開第

10

20

30

40

50

2009/0093403号および第2010/0145418号、ならびに国際特許出願第PCT/US2011/028893号で見出すことができ、そのそれぞれの開示は、それらの全体で参照することにより本明細書に組み込まれる。

【0051】

光応答性プロトンポンプ

いくつかの態様では、本明細書で説明される光応答性オプシントタンパク質は、光応答性プロトンポンプである。本明細書で提供される組成物および方法のいくつかの態様では、1つ以上の光応答性プロトンポンプが、中枢または末梢神経系のニューロンの原形質膜上で発現される。

【0052】

いくつかの実施形態では、光応答性プロトンポンプタンパク質は、青色光にตอบสนองすることができ、かつグイラルディア・セータに由来することができ、プロトンポンプタンパク質は、細胞が青色光で照射された時に、過分極電流を仲介することが可能となり得る。光は、約450から約495nmの間の波長を有することができ、または約490nmの波長を有することができる。別の実施形態では、光応答性プロトンポンプタンパク質は、配列番号4で示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、アミノ酸配列を含むことができる。光応答性プロトンポンプタンパク質は、加えて、光に対する感受性を増加または減少させ、光の特定の波長に対する感受性を増加または減少させ、および/または細胞の原形質膜の分極状態を調節する光応答性プロトンポンプタンパク質の能力を増加または減少させるように、天然アミノ酸配列に導入される置換、削除、および/または挿入を含むことができる。加えて、光応答性プロトンポンプタンパク質は、1つ以上の保存アミノ酸置換および/または1つ以上の非保存アミノ酸置換を含有することができる。天然アミノ酸配列に導入される置換、削除、および/または挿入を含む、光応答性プロトンポンプタンパク質は、光にตอบสนองして、神経細胞の原形質膜を過分極化する能力を好適に保持する。

【0053】

本明細書で開示される方法の他の態様では、光応答性プロトンポンプタンパク質は、配列番号4で示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、コアアミノ酸配列と、シグナルペプチド、ER移行シグナル、および膜輸送シグナルから成る群より選択される、ほ乳類細胞の原形質膜への輸送を強化する、少なくとも1つの(1つ、2つ、3つ、またそれ以上等)アミノ酸配列モチーフとを含むことができる。いくつかの実施形態では、光応答性プロトンポンプタンパク質は、N末端シグナルペプチドと、C末端ER移行シグナルとを含む。いくつかの実施形態では、光応答性プロトンポンプタンパク質は、N末端シグナルペプチドと、C末端輸送シグナルとを含む。いくつかの実施形態では、光応答性プロトンポンプタンパク質は、N末端シグナルペプチドと、C末端ER移行シグナルと、C末端輸送シグナルとを含む。いくつかの実施形態では、光応答性プロトンポンプタンパク質は、C末端ER移行シグナルと、C末端輸送シグナルとを含む。いくつかの実施形態では、C末端ER移行シグナルおよびC末端輸送シグナルは、リンカーによって結合される。リンカーは、長さで約5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400、または500個のうちのいずれかであるアミノ酸を含むことができる。リンカーはさらに、例えば、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、またはシアン蛍光タンパク質であるが、それらに限定されない、蛍光タンパク質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ER移行シグナルは、輸送シグナルよりもC末端に位置する。いくつかの実施形態では、輸送シグナルは、ER移行シグナルよりもC末端に位置する。

【0054】

また、本明細書では、配列番号4で示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一で

10

20

30

40

50

ある、コアアミノ酸配列を含む、光応答性プロトンポンプタンパク質等の、本明細書で説明される光応答性プロトンポンプタンパク質のうちのいずれかをコードする単離ポリヌクレオチドも提供される。また、本明細書では、配列番号4で示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、コアアミノ酸配列を含む、光応答性プロトンポンプタンパク質等の、本明細書で説明されるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、発現ベクター（本明細書で説明されるウイルスベクター等）も提供される。ポリヌクレオチドは、中枢または末梢神経系の神経細胞での光応答性プロトンポンプの発現に使用されてもよい。

#### 【0055】

光応答性プロトンポンプタンパク質に関係付けられるさらなる開示は、国際特許出願第PCT/US2011/028893号で見出すことができ、その開示は、その全体で参照することにより本明細書に組み込まれる。

#### 【0056】

##### 光活性化カチオンチャンネルタンパク質

いくつかの態様では、本明細書で説明される光応答性オプシントタンパク質は、光活性化カチオンチャンネルタンパク質である。本明細書で提供される方法のいくつかの態様では、1つ以上の光活性化カチオンチャンネルは、中枢または末梢神経系の神経細胞の原形質膜上で発現することができる。

#### 【0057】

いくつかの態様では、光活性化カチオンチャンネルタンパク質は、コナミドリムシに由来することができ、カチオンチャンネルタンパク質は、細胞が光で照射された時に、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能となり得る。別の実施形態では、光活性化カチオンチャンネルタンパク質は、配列番号5で示される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である、アミノ酸配列を含むことができる。コナミドリムシに由来する光活性化カチオンチャンネルタンパク質を活性化するために使用される光は、約460から約495nmの間の波長を有することができ、または約480nmの波長を有することができる。加えて、光は、少なくとも約100Hzの強度を有することができる。いくつかの実施形態では、100Hzの強度を有する光を用いた、コナミドリムシに由来する光活性化カチオンチャンネルの活性化は、光活性化カチオンチャンネルを発現するニューロンの脱分極誘発性シナプス枯渇を引き起こすことができる。光活性化カチオンチャンネルタンパク質は、加えて、光に対する感受性を増加または減少させ、光の特定の波長に対する感受性を増加または減少させ、および/または細胞の原形質膜の分極状態を調節する光活性化カチオンチャンネルタンパク質の能力を増加または減少させるように、天然アミノ酸配列に導入される置換、削除、および/または挿入を含むことができる。

#### 【0058】

加えて、光活性化カチオンチャンネルタンパク質は、1つ以上の保存アミノ酸置換および/または1つ以上の非保存アミノ酸置換を含有することができる。天然アミノ酸配列に導入される置換、削除、および/または挿入を含む、光活性化プロトンポンプタンパク質は、光に応答して、神経細胞の原形質膜を脱分極化する能力を好適に保持する。

#### 【0059】

光活性化カチオンチャンネルタンパク質と関連付けられるさらなる開示は、米国特許出願公開第2007/0054319号、ならびに国際特許出願公開第WO2009/131837号および第WO2007/024391号で見出すことができ、そのそれぞれの開示は、それらの全体で参照することにより本明細書に組み込まれる。

#### 【0060】

##### 段階機能オプシンおよび安定化段階機能オプシン

他の実施形態では、光活性化カチオンチャンネルタンパク質は、タンパク質のレチナール結合ポケットの全体を通した主要位置に特定のアミノ酸置換を有することができる、段階

10

20

30

40

50



機能オブシン (S F O) タンパク質または安定化段階機能オブシン (S S F O) タンパク質となり得る。いくつかの実施形態では、S F O タンパク質は、配列番号 5 のアミノ酸残基 C 1 2 8 に突然変異を有することができる。他の実施形態では、S F O タンパク質は、配列番号 5 の中に C 1 2 8 A 突然変異を有する。他の実施形態では、S F O タンパク質は、配列番号 5 の中に C 1 2 8 S 突然変異を有する。別の実施形態では、S F O タンパク質は、配列番号 5 の中に C 1 2 8 T 突然変異を有する。いくつかの実施形態では、S F O タンパク質は、配列番号 6 で示される配列と少なくとも約 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一である、アミノ酸配列を含むことができる。

#### 【 0 0 6 1 】

いくつかの実施形態では、S S F O タンパク質は、配列番号 5 のアミノ酸残基 D 1 5 6 に突然変異を有することができる。他の実施形態では、S S F O タンパク質は、配列番号 5 の両方のアミノ酸残基 C 1 2 8 および D 1 5 6 に突然変異を有することができる。一実施形態では、S S F O タンパク質は、配列番号 5 の中に C 1 2 8 S および D 1 5 6 A 突然変異を有する。別の実施形態では、S S F O タンパク質は、配列番号 7 で示される配列と少なくとも約 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一である、アミノ酸配列を含むことができる。

#### 【 0 0 6 2 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される S F O または S S F O タンパク質は、細胞が青色光で照射された時に、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能となり得る。他の実施形態では、光は、約 4 4 5 n m の波長を有することができる。加えて、光は、約 1 0 0 H z の強度を有することができる。いくつかの実施形態では、1 0 0 H z の強度を有する光を用いた、S F O または S S F O タンパク質の活性化は、S F O または S S F O タンパク質を発現するニューロンの脱分極誘発性シナプス枯渇を引き起こすことができる。いくつかの実施形態では、開示された段階機能オブシンおよび安定化段階機能オブシンタンパク質のうちのそれぞれは、光に応じて神経細胞の膜を脱分極化するために使用するための特定の性質および特性を有することができる。

#### 【 0 0 6 3 】

S F O または S S F O タンパク質と関連付けられるさらなる開示は、国際特許出願公開第 W O 2 0 1 0 / 0 5 6 9 7 0 号、ならびに米国仮特許出願第 6 1 / 4 1 0 , 7 0 4 号および第 6 1 / 5 1 1 , 9 0 5 号で見出すことができ、そのそれぞれの開示は、それらの全体で参照することにより本明細書に組み込まれる。

#### 【 0 0 6 4 】

##### C 1 V 1 キメラカチオンチャンネル

他の実施形態では、光活性化カチオンチャンネルタンパク質は、ボルボックス・カルテリ の V C h R 1 タンパク質およびコナミドリムシの C h R 1 タンパク質に由来する C 1 V 1 キメラタンパク質となり得、タンパク質は、C h R 1 の第 1 および第 2 の膜貫通ヘリックスによって置換される、少なくとも第 1 および第 2 の膜貫通ヘリックスを有する、V C h R 1 のアミノ酸配列を含み、光に応答し、細胞が光で照射された時に、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能である。いくつかの実施形態では、C 1 V 1 タンパク質はさらに、キメラ光応答性タンパク質の第 2 および第 3 の膜貫通ヘリックスの間に位置する、細胞内ループドメイン内に置換を含むことができ、細胞内ループドメインの少なくとも一部分は、C h R 1 の対応する部分によって置換される。別の実施形態では、C 1 V 1 キメラタンパク質の細胞内ループドメインの一部分は、C h R 1 のアミノ酸残基 A 1 4 5 にまで及ぶ、C h R 1 からの対応する部分と置換することができる。他の実施形態では、C 1 V 1 キメラタンパク質はさらに、キメラ光応答性タンパク質の第 3 の膜貫通ヘリックス内に置換を含むことができ、第 3 の膜貫通ヘリックスの少なくとも一部分は、C h R 1 の対応する配列によって置換される。さらに別の実施形態では、C 1 V 1 キメラタンパク質の細胞内ループドメインの一部分は、C h R 1 のアミノ酸残基 W 1 6 3 にまで及ぶ、C h R 1 からの対応する部分と置換することができる。他の実施形態では、C 1 V 1 キメラタンバ

10

20

30

40

50

ク質は、配列番号 8 で示される配列と少なくとも約 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一である、アミノ酸配列を含むことができる。

#### 【0065】

いくつかの実施形態では、C1V1タンパク質は、細胞が緑色光で照射された時に、細胞内の脱分極電流を仲介することができる。他の実施形態では、光は、約 540 nm から約 560 nm の間の波長を有することができる。いくつかの実施形態では、光は、約 542 nm の波長を有することができる。いくつかの実施形態では、C1V1キメラタンパク質は、細胞が紫色光で照射された時に、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能ではない。いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、細胞が約 405 nm の波長を有する光で照射された時に、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能ではない。加えて、光は、約 100 Hz の強度を有することができる。いくつかの実施形態では、100 Hz の強度を有する光を用いた、C1V1キメラタンパク質の活性化は、C1V1キメラタンパク質を発現するニューロンの脱分極誘発性シナプス枯渇を引き起こすことができる。いくつかの実施形態では、開示された C1V1キメラタンパク質は、光に応じて神経細胞の膜を脱分極化する際に使用するための特定の性質および特性を有することができる。

#### 【0066】

##### C1V1キメラ突然変異体

いくつかの態様では、本発明は、置換または変異アミノ酸配列を含む、ポリペプチドを含むことができ、変異ポリペプチドは、前駆体 C1V1キメラポリペプチドの特徴的な光応答性質を保持するが、また、いくつかの特定の態様では、改変した性質を保有してもよい。例えば、本明細書で説明される変異光活性化 C1V1キメラタンパク質は、動物細胞内または動物細胞原形質膜上の両方での増加したレベルの発現、光の異なる波長、具体的には赤色光に暴露された時の改変した応答性、および/または特質の組み合わせを示すことができ、それにより、キメラ C1V1ポリペプチドは、低い脱感作、高速非活性化、他の光活性化カチオンチャネルを用いた最低限の相互活性化のための低い紫色光活性化、および/または動物細胞での強力な発現という性質を保有する。

#### 【0067】

したがって、本明細書では、キメラポリペプチドの VChR1 部分のレチナール結合ポケットの全体を通した主要位置に特定のアミノ酸置換を有することができる、C1V1キメラ光活性化タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、C1V1タンパク質は、配列番号 8 のアミノ酸残基 E122 に突然変異を有することができる。いくつかの実施形態では、C1V1タンパク質は、配列番号 8 のアミノ酸残基 E162 に突然変異を有することができる。他の実施形態では、C1V1タンパク質は、配列番号 8 のアミノ酸残基 E162 および E122 の両方に突然変異を有することができる。他の実施形態では、C1V1タンパク質は、配列番号 9、配列番号 10 または配列番号 11 で示される配列と少なくとも約 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% 同一である、アミノ酸配列を含むことができる。いくつかの実施形態では、開示された変異 C1V1キメラタンパク質のうちのそれぞれは、光に応じて動物細胞の膜を脱分極化する際に使用するための特定の性質および特性を有することができる。

#### 【0068】

いくつかの態様では、C1V1-E122変異キメラタンパク質は、細胞が光で照射された時に、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能である。いくつかの実施形態では、光は、緑色光となり得る。他の実施形態では、光は、約 540 nm から約 560 nm の間の波長を有することができる。いくつかの実施形態では、光は、約 546 nm の波長を有することができる。他の実施形態では、C1V1-E122変異キメラタンパク質は、細胞が赤色光で照射された時に、細胞内の脱分極電流を仲介することができる。いくつかの実施形態では、赤色光は、約 630 nm の波長を有することができる。いくつかの実施形態では、C1V1-E122変異キメラタンパク質は、細胞が紫色光で照射された時に、

細胞内の脱分極電流を仲介しない。いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、細胞が約405 nmの波長を有する光で照射された時に、細胞内の脱分極電流を仲介しない。加えて、光は、約100 Hzの強度を有することができる。いくつかの実施形態では、100 Hzの強度を有する光を用いた、C1V1-E122変異キメラタンパク質の活性化は、C1V1-E122変異キメラタンパク質を発現するニューロンの脱分極誘発性シナプス枯渇を引き起こすことができる。いくつかの実施形態では、開示されたC1V1-E122変異キメラタンパク質は、光に応じて神経細胞の膜を脱分極化するために使用するための特定の性質および特性を有することができる。

#### 【0069】

他の態様では、C1V1-E162変異キメラタンパク質は、細胞が光で照射された時に、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能である。いくつかの実施形態では、光は、緑色光となり得る。他の実施形態では、光は、約540 nmから約535 nmの間の波長を有することができる。いくつかの実施形態では、光は、約542 nmの波長を有することができる。他の実施形態では、光は、約530 nmの波長を有することができる。いくつかの実施形態では、C1V1-E162変異キメラタンパク質は、細胞が紫色光で照射された時に、細胞内の脱分極電流を仲介しない。いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、細胞が約405 nmの波長を有する光で照射された時に、細胞内の脱分極電流を仲介しない。加えて、光は、約100 Hzの強度を有することができる。いくつかの実施形態では、100 Hzの強度を有する光を用いた、C1V1-E162変異キメラタンパク質の活性化は、C1V1-E162変異キメラタンパク質を発現するニューロンの脱分極誘発性シナプス枯渇を引き起こすことができる。いくつかの実施形態では、開示されたC1V1-E162変異キメラタンパク質は、光に応じて神経細胞の膜を脱分極化するために使用するための特定の性質および特性を有することができる。

#### 【0070】

さらに他の態様では、C1V1-E122/E162変異キメラタンパク質は、細胞が光で照射された時に、細胞内の脱分極電流を仲介することが可能である。いくつかの実施形態では、光は、緑色光となり得る。他の実施形態では、光は、約540 nmから約560 nmの間の波長を有することができる。いくつかの実施形態では、光は、約546 nmの波長を有することができる。いくつかの実施形態では、C1V1-E122/E162変異キメラタンパク質は、細胞が紫色光で照射された時に、細胞内の脱分極電流を仲介しない。いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、細胞が約405 nmの波長を有する光で照射された時に、細胞内の脱分極電流を仲介しない。いくつかの実施形態では、C1V1-E122/E162変異キメラタンパク質は、E122/E162において突然変異が欠けているC1V1キメラタンパク質と比べて、または他の光活性化カチオンチャンネルタンパク質と比べて、紫色光に暴露された時に少ない活性化を示すことができる。加えて、光は、約100 Hzの強度を有することができる。いくつかの実施形態では、100 Hzの強度を有する光を用いた、C1V1-E122/E162変異キメラタンパク質の活性化は、C1V1-E122/E162変異キメラタンパク質を発現するニューロンの脱分極誘発性シナプス枯渇を引き起こすことができる。いくつかの実施形態では、開示されたC1V1-E122/E162変異キメラタンパク質は、光に応じて神経細胞の膜を脱分極化するために使用するための特定の性質および特性を有することができる。

#### 【0071】

C1V1キメラカチオンチャンネルならびに同チャンネルの突然変異体に関係付けられるさらなる開示は、米国仮特許出願第61/410,736号、第61/410,744号および第61/511,912号で見出すことができ、そのそれぞれの開示は、それらの全体で参照することにより本明細書に組み込まれる。

#### 【0072】

#### ポリヌクレオチド

本開示はまた、本明細書で説明される光応答性オプシントタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチドも提供する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレ

10

20

30

40

50

オチドは、発現カセットを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、上記の核酸を含むベクターである。いくつかの実施形態では、本開示の光活性化タンパク質をコードする核酸は、プロモータに動作可能に結合される。プロモータは、当技術分野で周知である。宿主細胞で機能する任意のプロモータを、本開示の光応答性オプシントタンパク質および/またはその任意の変異形の発現に使用することができる。一実施形態では、光応答性オプシントタンパク質の発現を駆動するために使用されるプロモータは、運動ニューロンに特有であるプロモータである。別の実施形態では、光応答性オプシントタンパク質の発現を駆動するために使用されるプロモータは、中枢神経系ニューロンに特有であるプロモータである。他の実施形態では、プロモータは、交感および/または副交感神経系の両方のニューロンにおける光応答性オプシントタンパク質の発現を駆動することが可能である。特定の動物細胞における光応答性オプシントタンパク質またはその変異形の発現を駆動するのに有用である、開始制御領域またはプロモータは、多数あり、当業者に周知である。これらの核酸を駆動することが可能な事実上いかなるプロモータも使用することができる。運動ニューロン特有の遺伝子の例は、例えば、Kudo, et al., Human Mol. Genetics, 2010, 19(16): 3233-3253で見出すことができ、その内容は、それらの全体で参照することにより本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、光活性化タンパク質の発現を駆動するために使用されるプロモータは、中枢および末梢神経系の両方のニューロンにおいて導入遺伝子の堅調な発現を駆動することが可能である、Thy1プロモータとなり得る(例えば、Llewellyn, et al., 2010, Nat. Med., 16(10): 1161-1166を参照)。他の実施形態では、光応答性オプシントタンパク質の発現を駆動するために使用されるプロモータは、EF1プロモータ、サイトメガロウイルス(CMV)プロモータ、CAGプロモータ、シナプシンプロモータ、あるいはほ乳類の末梢および/または中枢神経系ニューロンにおいて光応答性オプシントタンパク質の発現を駆動することが可能な任意の他の普遍的プロモータとなり得る。

#### 【0073】

また、本明細書では、本明細書で説明される光応答性オプシントタンパク質またはその任意の変異形をコードするヌクレオチド配列を含む、ベクターが提供される。本発明に従って投与することができるベクターはまた、ベクターのポリヌクレオチドから転写された時に標的動物細胞の原形質膜上で光応答性オプシントタンパク質の蓄積をもたらす、RNA(例えば、mRNA)をコードするヌクレオチド配列を含む、ベクターも含む。使用されてもよいベクターは、制限なく、レンチウイルス、HSV、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを含む。レンチウイルスは、HIV-1、HIV-2、SIV、FIV、およびEIAVを含むが、それらに限定されない。レンチウイルスは、VSV、狂犬病、Mo-MLV、バキュロウイルス、およびエボラを含むが、それらに限定されない、他のウイルスの外膜タンパク質を伴う偽型であってもよい。そのようなベクターは、当技術分野での標準方法を使用して調製されてもよい。

#### 【0074】

いくつかの実施形態では、ベクターは、組み換えAAVベクターである。AAVベクターは、安定した部位特異的方式で、感染する細胞のゲノムに統合することができる、比較的小さいサイズのDNAウイルスである。それらは、細胞成長、形態、または分化にいずれの影響も誘発することなく、広範囲の細胞に感染することができ、ヒトの病理に関与するように思われない。AAVゲノムは、クローン化され、配列決定され、特徴付けられている。それは、約4700個の塩基を包含し、ウイルスの複製起点としての機能を果たす、約145個の塩基の逆方向末端反復(ITR)領域を各端に含有する。残りのゲノムは、ウイルス複製およびウイルス遺伝子の発現に関与するrep遺伝子を含有するゲノムの左側部分、およびウイルスのカプシドタンパク質をコードするcap遺伝子を含有するゲノムの右側部分といった、カプシド形成機能を持つ2つの必須領域に分けられる。

#### 【0075】

AAVベクターは、当技術分野での標準方法を使用して調製されてもよい。任意の血清

型のアデノ随伴ウイルスが好適である（例えば、そのそれぞれの開示が、それらの全体で参照することにより本明細書に組み込まれる、Blacklow, pp. 165 - 174 of "Parvoviruses and Human Disease" J. R. Pattison, ed. (1988); Rose, Comprehensive Virology 3:1, 1974; P. Tattersall "The Evolution of Parvovirus Taxonomy" in Parvoviruses (JR Kerr, SF Cotmore, ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, Eds.) p5 - 14, Huddersfield, London, UK (2006); および DE Bowles, JE Rabinowitz, RJ Samulski "The Genus Dependovirus" (JR Kerr, SF Cotmore, ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, Eds.) p15 - 23, Huddersfield, London, UK (2006) を参照されたい)。ベクターを純化するための方法は、例えば、米国特許第 6,566,118 号、第 6,989,264 号、および第 6,995,006 号、ならびに「Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombinant AAV Vectors」と題された国際特許出願公開第 WO/1999/011764 号で見出されてもよく、その開示は、それらの全体で参照することにより本明細書に組み込まれる。ハイブリッドベクターの調製は、例えば、PCT 出願第 PCT/US2005/027091 号で説明されており、その開示は、その全体で参照することにより本明細書に組み込まれる。生体外および生体内で遺伝子を導入するための AAV に由来するベクターの使用が説明されている（例えば、その全てがそれらの全体で参照することにより本明細書に組み込まれる、国際特許出願公開第 WO91/18088 号および第 WO93/09239 号、米国特許第 4,797,368 号、第 6,596,535 号および第 5,139,941 号、ならびに欧州特許第 0488528 号を参照）。これらの出版物は、rep および/または cap 遺伝子が削除され、関心遺伝子によって置換される、種々の AAV 由来構築物、および生体外で（培養細胞に）または生体内で（生物に直接）関心遺伝子を導入するためのこれらの構築物の使用を説明する。2つの AAV 逆方向末端反復（ITR）領域が両側に並び、関心の核酸配列を含有するプラスミド、および AAV カプシド形成遺伝子（rep および cap 遺伝子）を持つプラスミドを、ヒトヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス）に感染した細胞株に同時導入することによって、本発明による複製欠損組み換え AAV を調製することができる。次いで、産生される AAV 組み換え型は、標準技法によって純化される。

#### 【0076】

いくつかの実施形態では、本発明の方法で使用するためのベクターは、ウイルス粒子（例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、および AAV16 を含むが、それらに限定されない、AAV ウイルス粒子）にカプシド形成される。したがって、本発明は、本明細書で説明されるベクターのうちのいずれかを含む、組み換えウイルス粒子を含む（組み換えポリヌクレオチドを含有するため組み換え型である）。そのような粒子を産生する方法は、当技術分野で公知であり、米国特許第 6,596,535 号で説明されており、その開示は、その全体で参照することにより本明細書に組み込まれる。

#### 【0077】

光応答性オプシタンパク質およびランタニドをドープしたナノ粒子の送達

いくつかの態様では、本明細書で開示される光応答性オプシタンパク質をコードするポリヌクレオチド（例えば、AAV1 ベクター）は、定位固定注射（例えば、そのそれぞれの内容が、それらの全体で参照することにより本明細書に組み込まれる、Stein et al., J. Virol., 1999, 73:34243429; Davidson et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 9

10

20

30

40

50

7 : 3 4 2 8 - 3 4 3 2 ; D a v i d s o n e t a l . , N a t . G e n e t . , 1 9 9 3 , 3 : 2 1 9 - 2 2 3 ; および A l i s k y & D a v i d s o n , H u m . G e n e T h e r . , 2 0 0 0 , 1 1 : 2 3 1 5 - 2 3 2 9 を参照) または蛍光透視法によるもの等の当技術分野で公知の神経外科技法を使用した、針、カテーテル、または関連デバイスを用いて、中枢または末梢神経系のニューロンに直接送達することができる。いくつかの実施形態では、本明細書で開示される光応答性オプシントパク質をコードするポリヌクレオチド(例えば、AAV1ベクター)は、脊髄神経(頸部脊髄神経、胸部脊髄神経、腰椎神経、仙骨脊髄神経、および/または尾骨脊髄神経)のうちのいずれか1つへの注射によって、末梢神経系のニューロンに送達することができる。

【0078】

10

イオン脂質またはポリマーを用いたトランスフェクション、エレクトロポレーション、光学トランスフェクション、インペールフェクション、または遺伝子銃を介する等であるが、それらに限定されない、光応答性オプシントパク質を関心の神経へ送達する他の方法も使用することができる。

【0079】

別の態様では、本明細書で開示される光応答性オプシントパク質をコードするポリヌクレオチド(例えば、AAV2ベクター)は、末梢神経系のニューロンによって神経支配された筋肉に直接送達することができる。特定の筋肉を神経支配する特定の細胞体に直接ウイルスベクターを注射することに固有の制限により、研究者らは、筋肉に直接ウイルスベクターを注射することによって、導入遺伝子を末梢ニューロンに送達しようとしてきた。これらの実験は、アデノウイルス、AAV2、および狂犬病糖タンパク質偽型レンチウイルス等のいくつかのウイルス血清型を、筋細胞によって取り込み、神経筋シナプスを横断して運動ニューロンへ逆行的に輸送することができると示した(例えば、そのそれぞれの開示が、それらの全体で参照することにより本明細書に組み込まれる、Azzouz et al. , 2009, Antioxid Redox Signal. , 11(7) : 1523 - 34 ; Kaspar et al. , 2003, Science , 301(5634) : 839 - 842 ; Manabe et al. , 2002, Apoptosis , 7(4) : 329 - 334 を参照)。

20

【0080】

したがって、いくつかの実施形態では、本明細書で開示される光応答性オプシントパク質を発現するベクター(例えば、AAV2ベクター)は、関心の筋肉への直接注射によって、筋肉の神経支配に関与するニューロンに送達することができる。

30

【0081】

本明細書で開示されるランタニドをドープしたナノ粒子は、ナノ粒子が送達される1つまたは複数の解剖学的部位に応じて、血管内で、頭蓋内で、脳内で、筋肉内で、皮内で、静脈内で、眼球内で、経口で、経鼻的に、局所的に、または切開外科手技による等の任意の経路によって、1つ以上の光応答性オプシントパク質を発現するニューロンに送達することができる。加えて、ナノ粒子は、上記で説明されるもののうちのいずれか等の光応答性オプシントパク質を発現するポリヌクレオチドベクターの送達に使用される同じ経路によって、送達することができる。ナノ粒子はまた、心臓切開手術の場合のような切開方式で、または定位固定手術中に脳の中で、または特定の臓器の血液供給まで進むカテーテルを使用する血管内介入方法によって、または他の介入方法によって、投入することもできる。

40

【0082】

本明細書で開示される光応答性オプシントパク質をコードする、ポリヌクレオチドおよび/またはランタニドをドープしたナノ粒子の送達および/または保管に使用される医薬組成物は、薬学的に有用な組成物を調製するための既知の方法に従って製剤することができる。製剤は、当業者に周知であり、容易に利用可能ないくつかの情報源で説明されている。例えば、RemingtonのPharmaceutical Sciences (Martin E W , 1995 , Easton Pa. , Mack Publish

50

ing Company, 19th ed.) は、本発明と関連して使用することができる製剤を説明している。非経口投与に好適な製剤は、例えば、製剤を意図した受容者の血液と等張性にする酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、および溶質を含有してもよい、水性滅菌注射液と、懸濁化剤および増粘剤を含んでもよい、水性および非水性滅菌懸濁液とを含む。製剤は、単位用量または複数用量容器、例えば、密閉アンプルおよびバイアルの中で提示されてもよく、使用前に、滅菌液体キャリア、例えば、注射用蒸留水の状態のみを必要とする、フリーズドライした（凍結乾燥した）状態で保管されてもよい。

#### 【0083】

ランタニドをドーブしたナノ粒子はまた、注入または注射によって、血管内で、または腹腔内で投与されてもよい。ナノ粒子および/または細胞の溶液を、水中で調製し、随意で、非毒性界面活性剤と混合することができる。分散もまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチン、およびそれらの混合物の中で、および油の中で調製することもできる。保管および使用の通常の条件下で、これらの調合液は、微生物の成長を防止する防腐剤を含有する。

#### 【0084】

本明細書で説明されるランタニドをドーブしたナノ粒子の注入または注射に好適な医薬剤形は、滅菌注射または注入剤または分散の即時調製のために適合される、活性成分を含む滅菌水溶液または分散または滅菌粉末を含むことができる。液体キャリアまたは媒体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール、および同等物）、植物油、非毒性グリセリルエステル、およびそれらの好適な混合物を含む、溶媒または液体分散媒質となり得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル、および同等物によって引き起こすことができる。

#### 【0085】

赤外線または近赤外線電磁放射線源

赤外線（IR）または近赤外線（NIR）スペクトル内の波長を有する電磁放射線源を産生することが可能である、任意のデバイスが、本明細書で説明されるランタニドをドーブしたナノ粒子と組み合わせて、ニューロンの表面上で発現される1つ以上の光応答性タンパク質を活性化するために使用されてもよい。IRまたはNIR源は、光刺激を脳の特定の標的領域に提供するように構成することができる。IRまたはNIR源は、加えて、連続IRあるいはNIR電磁放射線および/またはパルスIRあるいはNIR電磁放射線を提供することができ、所定のパルス系列でIRまたはNIR電磁放射線を提供するようにプログラム可能であってもよい。

#### 【0086】

他の態様では、埋込型IRまたはNIR源は、外部電源への物理的係留を必要としない。いくつかの実施形態では、電源は、IRまたはNIR源に電力供給するための内部バッテリーとなり得る。別の実施形態では、埋込型IRまたはNIR源は、IRまたはNIR源に電力供給するための外部電源から無線で伝達された電磁エネルギーを受容するための外部アンテナを備えてもよい。無線で伝達された電磁エネルギーは、電波、マイクロ波、あるいはIRまたはNIR発生源に電力供給するように外部源から伝達することができる任意の他の電磁エネルギー源となり得る。一実施形態では、IRまたはNIR源は、半導体または当技術分野で公知の他の過程を使用して生産される、集積回路によって制御される。

#### 【0087】

いくつかの態様では、埋込型IRまたはNIR電磁放射線源は、外部コントローラによって外部から起動することができる。外部コントローラは、伝送コイルに載置することができる、発電機を備えることができる。外部コントローラのいくつかの実施形態では、電力を発電機に提供するために、バッテリーをそれに接続することができる。スイッチを発電機に接続することができ、個人が発電機を手動で起動または動作停止することを可能にする。いくつかの実施形態では、スイッチの起動時に、発電機は、外部コントローラ上の伝

10

20

30

40

50

送コイルと埋込型 I R または N I R 源の外部アンテナとの間の電磁結合を通して、電力を I R または N I R 電磁放射線源に提供することができる。無線周波数磁気インダクタンス結合が使用される時に、電波の動作周波数は、約 1 から 20 MHz の間を含めた、これらの数の間の任意の値を含むことができる（例えば、約 1 MHz、約 2 MHz、約 3 MHz、約 4 MHz、約 5 MHz、約 6 MHz、約 7 MHz、約 8 MHz、約 9 MHz、約 10 MHz、約 11 MHz、約 12 MHz、約 13 MHz、約 14 MHz、約 15 MHz、約 16 MHz、約 17 MHz、約 18 MHz、約 19 MHz、または約 20 MHz）。しかし、受光器または生物医学テレメトリシステム等の他の結合技術が使用されてもよい（例えば、Kiourti, "Biomedical Telemetry: Communication between Implanted Devices and the External World, Opticon 1826, (8): Spring, 2010 を参照）。

10

**【0088】**

いくつかの態様では、I R または N I R 電磁放射線によって產生される、神経細胞（1 つ以上の光応答性オプシントパク質を発現する神経細胞等）に到達する I R または N I R 電磁放射線の強度は、約 0.05 mW/mm<sup>2</sup>、0.1 mW/mm<sup>2</sup>、0.2 mW/mm<sup>2</sup>、0.3 mW/mm<sup>2</sup>、0.4 mW/mm<sup>2</sup>、0.5 mW/mm<sup>2</sup>、約 0.6 mW/mm<sup>2</sup>、約 0.7 mW/mm<sup>2</sup>、約 0.8 mW/mm<sup>2</sup>、約 0.9 mW/mm<sup>2</sup>、約 1.0 mW/mm<sup>2</sup>、約 1.1 mW/mm<sup>2</sup>、約 1.2 mW/mm<sup>2</sup>、約 1.3 mW/mm<sup>2</sup>、約 1.4 mW/mm<sup>2</sup>、約 1.5 mW/mm<sup>2</sup>、約 1.6 mW/mm<sup>2</sup>、約 1.7 mW/mm<sup>2</sup>、約 1.8 mW/mm<sup>2</sup>、約 1.9 mW/mm<sup>2</sup>、約 2.0 mW/mm<sup>2</sup>、約 2.1 mW/mm<sup>2</sup>、約 2.2 mW/mm<sup>2</sup>、約 2.3 mW/mm<sup>2</sup>、約 2.4 mW/mm<sup>2</sup>、約 2.5 mW/mm<sup>2</sup>、約 3 mW/mm<sup>2</sup>、約 3.5 mW/mm<sup>2</sup>、約 4 mW/mm<sup>2</sup>、約 4.5 mW/mm<sup>2</sup>、約 5 mW/mm<sup>2</sup>、約 5.5 mW/mm<sup>2</sup>、約 6 mW/mm<sup>2</sup>、約 7 mW/mm<sup>2</sup>、約 8 mW/mm<sup>2</sup>、約 9 mW/mm<sup>2</sup>、または約 10 mW/mm<sup>2</sup> のうちのいずれかを含めた、これらの数の間の値を含む強度を有する。

20

**【0089】**

他の態様では、I R または N I R 電磁放射線源によって產生される I R または N I R 電磁放射線は、約 740 nm から約 300,000 nm 等の赤外線スペクトル全体を包含する波長を有することができる。他の実施形態では、I R または N I R 電磁放射線源によって產生される I R または N I R 電磁放射線は、約 740 nm から約 1400 nm 等の N I R スペクトルに対応する波長を有することができる。他の実施形態では、產生される N I R 電磁放射線は、700 nm から 1000 nm の間の波長を有する。

30

**【0090】**

いくつかの態様では、I R または N I R 電磁放射線源は、本明細書で開示されるランタニドをドーブしたナノ粒子と組み合わせて使用された時に、個体の脳または中枢神経系内の神経細胞（1 つ以上の光応答性オプシントパク質を発現する神経細胞等）の原形質膜を過分極化または脱分極化するために使用される。いくつかの実施形態では、個体の頭蓋骨が、骨を穿孔することなく、脳の関心領域に隣接する領域中で外科的に薄くされる。次いで、I R または N I R 電磁放射線源を、薄くなった頭蓋骨領域上に直接配置することができる。他の実施形態では、I R または N I R 電磁放射線発生器が、薄くなった頭蓋骨領域に直接隣接して個体の皮下に埋め込まれる。

40

**【0091】**

いくつかの態様では、I R または N I R 電磁放射線源は、本明細書で開示されるランタニドをドーブしたナノ粒子と組み合わせて使用された時に、個体の脳または末梢神経系内の神経細胞（1 つ以上の光応答性オプシントパク質を発現する神経細胞等）の原形質膜を過分極化または脱分極化するために使用される。いくつかの実施形態では、I R または N I R 電磁放射線源は、関心の末梢神経細胞に直接隣接して個体の皮下に外科的に埋め込まれる。他の実施形態では、I R または N I R 電磁放射線源は、関心の末梢神経細胞に直接隣接して皮膚に当てて配置される。一実施形態では、I R または N I R 電磁放射線源は

50



、プレスレットまたはカフ構成で皮膚に当てて保持される。

【0092】

I RまたはN I R電磁放射線源の実施例、具体的には、皮下に埋め込まれるほど小さいものは、米国特許出願公開第2009/0143842号、第2011/0152969号、第2011/0144749号、および第2011/0054305号で見出すことができ、そのそれぞれの開示は、それらの全体で参照することにより本明細書に組み込まれる。

【0093】

なおも他の態様では、本明細書で開示されるランタニドをドーブしたナノ粒子は、より高い波長可視光をより低い波長可視光（青色または緑色光等）に上方変換するように、可視スペクトル内のより高い波長の光（赤色光等）に暴露させることができる。上記で説明されるように、光は生物組織を不十分に通過する。しかしながら、可視光は、組織に浸透する時に、赤色光に対応するより高い波長（例えば、約620nmから740nmの間）で浸透する。したがって、本明細書で開示されるランタニドをドーブしたナノ粒子は、加えて、赤色光に対応する波長を、緑色または青色光に対応する波長（例えば、約440nmから570nmの間）に上方偏移するために、可視光の光源と組み合わせて使用することができる。光源を含む、光刺激デバイスの例は、国際特許出願第PCT/US08/50628号および第PCT/US09/49936号で、ならびにLlewellyn et al., 2010, Nat. Med., 16(10): 161-165で見出すことができ、そのそれぞれの開示は、それらの全体で参照することにより本明細書に組み込まれる。

本発明の方法

【0094】

神経細胞の脱分極

本明細書では、神経細胞に近接して複数のランタニドをドーブしたナノ粒子を配置することと、複数のナノ粒子を、赤外線（I R）または近赤外線（N I R）スペクトル内の電磁放射線に暴露させることとであって、I RまたはN I Rスペクトル内の電磁放射線は、ナノ粒子によって可視スペクトル内の光に上方変換され、光応答性オプシンが、神経細胞の原形質膜上で発現され、可視スペクトル内の光によるオプシンの活性化は、原形質膜の脱分極を誘発する、暴露させることとを含む、個体の神経細胞の原形質膜を脱分極化する方法が提供される。

【0095】

また、本明細書では、光応答性オプシンをコードするポリヌクレオチドを、個体の脳内の神経細胞に投与することとであって、光応答性タンパク質は、神経細胞の原形質膜上で発現され、オプシンは、光で照射された時に神経細胞の膜脱分極を誘発することが可能である、投与することと、神経細胞に近接して複数のランタニドをドーブしたナノ粒子を投与すること、複数のナノ粒子を、赤外線（I R）または近（I R）スペクトル内の電磁放射線に暴露させることとであって、I Rまたは近I Rスペクトル内の電磁放射線は、可視スペクトル内の光に上方変換され、可視スペクトル内の光によるオプシンの活性化は、原形質膜の脱分極を誘発する、暴露させることとを含む、個体の神経細胞の原形質膜を脱分極化する方法が提供される。

【0096】

いくつかの実施形態では、光応答性オプシンタンパク質は、ChR2、VC h R1、またはC1V1である。他の実施形態では、光応答性オプシンタンパク質は、SFO、SSF O、C1V1 - E122、C1V1 - E162、およびC1V1 - E122 / E162から成る群より選択される。

【0097】

ランタニド金属は、ランタン、セリウム、プラセオジウム、ネオジウム、プロメチウム、サマリウム、ユーロピウム、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホルミウム、エルビウム、ツリウム、イッテルビウム、またはルテチウム等のランタニド系列の元素のう

10

20

30

40

50

ちのいずれかからのイオンまたは原子となり得る。他の実施形態では、ナノ粒子は、 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{X}/\text{Gd}$ を含み、Xは、Er、Tm、またはEr/Tmである。

【0098】

IRまたは近IRスペクトル内の電磁放射線は、約450nmから約550nmの波長を有する光に上方変換することができる。光は、赤色、黄色、琥珀色、橙色、緑色、または青色光に対応する波長を有することができる。いくつかの実施形態では、個体は、ヒトまたはヒトではない動物である。他の実施形態では、神経細胞は、末梢神経系内にある。別の実施形態では、神経細胞は、中枢神経系内にある。

【0099】

#### 神経細胞の過分極

10

本明細書では、神経細胞に近接して複数のランタニドをドープしたナノ粒子を配置することと、複数のナノ粒子を、赤外線(IR)または近赤外線(NIR)スペクトル内の電磁放射線に暴露させることとであって、IRまたはNIRスペクトル内の電磁放射線は、ナノ粒子によって可視スペクトル内の光に上方変換され、光応答性オプシンが、神経細胞の原形質膜上で発現され、可視スペクトル内の光によるオプシンの活性化は、原形質膜の過分極を誘発する、暴露させることとを含む、個体の神経細胞の原形質膜を過分極化する方法が提供される。

【0100】

また、本明細書では、光応答性オプシンをコードするポリヌクレオチドを、個体の脳内の神経細胞に投与することとであって、光応答性タンパク質は、神経細胞の原形質膜上で発現され、オプシンは、光で照射された時に神経細胞の膜過分極を誘発することが可能である、投与することと、神経細胞に近接して複数のランタニドをドープしたナノ粒子を投与することと、複数のナノ粒子を、赤外線(IR)または近(IR)スペクトル内の電磁放射線に暴露させることとであって、IRまたは近IRスペクトル内の電磁放射線は、可視スペクトル内の光に上方変換され、可視スペクトル内の光によるオプシンの活性化は、原形質膜の過分極を誘発する、暴露させることと、個体の神経細胞の原形質膜を過分極化する方法が提供される。

20

【0101】

いくつかの実施形態では、光応答性オプシンタンパク質は、NpHRまたはGtR3である。

30

【0102】

ランタニド金属は、ランタン、セリウム、プラセオジウム、ネオジウム、プロメチウム、サマリウム、ユーロピウム、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホルミウム、エルビウム、ツリウム、イッテルビウム、またはルテチウム等のランタニド系列の元素のうちのいずれかからのイオンまたは原子となり得る。他の実施形態では、ナノ粒子は、 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{X}/\text{Gd}$ を含み、Xは、Er、Tm、またはEr/Tmである。

【0103】

IRまたは近IRスペクトル内の電磁放射線は、約450nmから約550nmの波長を有する光に上方変換することができる。光は、赤色、黄色、琥珀色、橙色、緑色、または青色光に対応する波長を有することができる。いくつかの実施形態では、個体は、ヒトまたはヒトではない動物である。他の実施形態では、神経細胞は、末梢神経系内にある。別の実施形態では、神経細胞は、中枢神経系内にある。

40

【0104】

#### キット

また、本明細書では、光応答性オプシンタンパク質(本明細書で説明される光応答性オプシンタンパク質のうちのいずれか等)をコードするポリヌクレオチドと、中枢および/または末梢神経系の1つ以上のニューロンの膜分極状態を改変するために本明細書で開示される方法のうちのいずれかで使用するためのランタニドをドープしたナノ粒子とを含む、キットが提供される。いくつかの実施形態では、キットはさらに、赤外線または近赤外線電磁放射線源を備える。他の実施形態では、キットはさらに、本明細書で説明されるボ

50

リヌクレオチドおよびランタニドをドーブしたナノ粒子を使用するための説明書を備える。なおも他の実施形態では、本明細書で説明されるランタニドをドーブしたナノ粒子は、生体適合性材料（上記で説明される生体適合性材料のうちのいずれか等）に埋め込まれる、および／または閉じ込められる。

例示的实施形態

【0105】

本開示の態様は、添付図面と関連して以下に続く、本開示の種々の実施形態の詳細な説明を考慮して、より完全に理解されてもよい。この説明および種々の実施形態は、以下のように提示される。

【0106】

本明細書で論議される実施形態および具体的用途は、上記の態様、実施形態、および実装のうちの1つ以上と、ならびに図に示され、以下で説明されるものと関連して実装されてもよい。また、参照することにより本明細書に完全に組み込まれる、Wang et al., 2010, Nature, 463 (7284): 1061-5を参照してもよい。方法論、デバイス、および物質を含む、光応答性分子および／またはオプシンに関するさらなる詳細については、Zhangらに対する「System for Optical Stimulation of Target Cells」と題された米国特許出願公開第2010/0190229号、Boydénらに対する「System for Optical Stimulation of Target Cells」と題された米国特許出願公開第2007/0261127号といった、背景出版物も参照してもよい。これらの出願は、暫定特許文書の一部を形成し、参照することにより本明細書に完全に組み込まれる。これらの出版物と一致して、光刺激および標的細胞の制御を提供するために、多数のオプシンを生体内および生体外のほ乳類細胞で使用することができる。例えば、ChR2がニューロン等の電気的興奮性細胞に導入された時に、ChR2チャネルロドプシンの光活性化が、細胞の興奮および／または発火をもたらすことができる。NpHRがニューロン等の電気的興奮性細胞に導入された時の場合において、NpHRオプシンの光活性化が、細胞の発火の阻害をもたらすことができる。上記で参照した特許出願の開示のこれらおよび他の態様は、本開示の種々の態様を実装する際に有用であってもよい。

【0107】

本開示の種々の実施形態では、例えば、近赤外線上方変換ナノ結晶を使用した、光遺伝学を用いた神経回路の操作に有用となり得るような光の低侵襲的送達が達成される。これは、例えば、被検体の脳を含む、生体組織内の光源の埋込を回避するために使用される。ほ乳類組織は、スペクトルの近赤外線部分（700～1000 nm）の中に透過性窓を有する。したがって、本開示の態様は、関心部位で赤外光を可視波長に変換することによって、脳の奥深くへエネルギーを送達するために（近）赤外光を使用する目的でのナノ粒子の使用に関する。

【0108】

ある実施形態では、脳内の関心部位で可視波長を送達することは、ランタニドをドーブしたナノ結晶における光学的上方変換の過程を通して達成される。上方変換中に、3～4つの光子が材料によって吸収され、次いで、材料は、吸収された光子のエネルギーの約1.5～2倍のエネルギーで1つの光子を放出する。例えば、NaYF<sub>4</sub>:Yb/X/Gdナノ結晶は、ドープの性質および相対含量（X = Er、Tm、Er/Tm）に応じて、980 nmの光を吸収し、450～550 nmの間を中心としたスペクトルを伴う光を発する。ナノ粒子から発せられる光を修飾することに関するさらなる情報については、その開示が、その全体で参照することにより本明細書に組み込まれる、Wang et al., Nature, 2010, 463 (7284): 1061-5を参照されたい。

【0109】

ある実施形態では、標的細胞集団を修飾し、近赤外光を、修飾標的細胞集団を刺激する可視光に変換するナノ粒子を提供するように、単一段階手術が行われる。手術中に、外科

10

20

30

40

50

医は、オブシン遺伝子を持つアデノ随伴ウイルスおよびナノ粒子溶液の両方を関心部位に注射する。

【0110】

ウイルスは、標的細胞集団のみに感染するように最適化される。同様に、ナノ粒子も標的細胞集団に固着するように、ナノ粒子は、抗体で機能化される。あるより具体的な実施形態では、標的細胞集団は、特定のニューロン型である。手術が完了した後に、近赤外光を発するLEDが、皮膚の下で、患者の頭蓋骨の薄くなった部分の上に配置される。バッテリーもまた、LEDに電力供給するように皮膚の下に埋め込むことができる。ある実施形態では、バッテリーは、ペースメーカーバッテリーのものと同様の特性を有する。バッテリーを制御して特定間隔でエネルギーをLEDに送達し、特定間隔でLED光パルスをもたらすために、マイクロコントローラを使用することができる。

10

【0111】

本開示のある態様は、生体内の光遺伝学の使用を対象とする。生体内で適用される光遺伝学は、脳内の深くに位置することができる、特定のニューロン集団への光送達に依存する。ほ乳類組織は、高度に吸収性であり、可視スペクトル内の光を散乱させる。しかしながら、近赤外光は、過剰な吸収または散乱を伴わずに、脳の深い準位まで浸透することができる。

【0112】

本開示のある態様は、標的ニューロンの付近で脳にナノ粒子を埋め込むことを対象とする。ナノ粒子は、ランタニドをドーブしたナノ粒子となり得る。ランタニドまたは他のドーパントでドーブされたナノ粒子は、特定のオブシンの活性スペクトルに対して最適化することができる。その開示が、その全体で参照することにより本明細書に組み込まれる、Wang et al., Nature, 2010, 463 (7284): 1061-5でさらに詳細に論議されるように、ランタニドをドーブしたナノ結晶から発せられる光のスペクトルは、どのドーパントがどれだけ使用されるかに基づいて操作することができる。同様に、他の分子でドーブされたナノ粒子から発せられる光は、ドーパントの濃度に基づいて操作することができる。

20

【0113】

ナノ粒子のドーピングに応じて、異なる出力スペクトルを提供する能力は、急性神経操作への非侵襲的アプローチを可能にする。LED等の光源を、皮下の薄くなった頭蓋骨上に載置することができる。ナノ粒子の組成物、および標的ニューロンに送達されるオブシンに応じて、本開示の態様は、神経の興奮またはサイレンシングに使用することができる。同様に、複数の神経細胞集団が、組み合わせた種々のドーパントおよびオブシンの使用を通して同時に制御されてもよい。

30

【0114】

図1を参照すると、患者の頭部100が示されている。標的(神経)細胞集団114は、光応答性分子を含む。これらの光応答性分子は、チャネルロドプシン(例えば、ChR1またはChR2)またはハロロドプシン(NpHR)に由来するオブシンを含むことができるが、必ずしもそれらに限定されない。特定の分子を、標的細胞集団への所望の効果および/または分子が光に応答する波長に基づいて、調整/選択することができる。

40

【0115】

ナノ結晶110が、標的細胞集団の付近に、または標的細胞集団に導入される。本開示の種々の実施形態は、標的細胞集団の付近にナノ結晶を位置付け、位置付けを維持するための方法およびデバイスを対象とする。ある実施形態は、抗体を使用して、ナノ結晶を標的細胞集団の(または付近の)細胞に固着することを対象とする。

【0116】

他の例示的实施形態によれば、ナノ結晶を含む構造を導入することができる。例えば、メッシュ構造をナノ結晶で被覆することができる。合成メッシュは、ニューロン全体(例えば、細胞体)が通過することを可能にすることなく、樹状突起および軸索がメッシュを通過することを可能にするよう構築することができる。そのようなメッシュの一実施例は

50

、直径が約 3 ~ 7 ミクロンである細孔を有し、ポリエチレンテレフタレートでできている。このメッシュ構造は、その中に含有された光応答性細胞 / ニューロンで構築し、および / または光応答性細胞を含む標的細胞集団の付近に配置することができる。別の実施形態と一致して、それぞれナノ結晶の溶液を含有する、1 つ以上の透明カプセルを、標的細胞集団の付近に位置付けることができる。

#### 【 0 1 1 7 】

本開示の実施形態はまた、刺激の種々の光源も対象とする。これらの光源は、外部レーザー源および発光ダイオード ( L E D ) を含むことができるが、それらに限定されない。本開示の特定の態様は、光がある波長 ( 例えば、( 近 ) 赤外線 ) にある時に介在材料によって引き起こされる、比較的低い吸収および / または散乱 / 拡散を対象とする。したがって、光源は、光の強度または力の損失をほとんど伴わずに組織に浸透する能力により、外部に位置することができる。また、低減した拡散が、光の送達のための比較的高い空間精度を提供するために特に有用となり得る。したがって、本開示の実施形態は、空間的に正確な光刺激を使用して個別に制御することができる、それぞれのナノ結晶を伴う複数の標的細胞集団を対象とする。例えば、ナノ結晶は、脳内のいくつかの場所に埋め込むことができる。次いで、光源は、それぞれの特定の場所に向けることができる。複数の光源もまた、複数の場所の同時刺激に使用することができる。

#### 【 0 1 1 8 】

本開示の特定の実施形態と一致して、頭蓋骨 1 0 2 は、薄くなった部分 1 0 6 を有する。L E D 1 0 4 は、頭蓋骨の薄くなった部分より上側に位置し、近赤外光 1 0 8 を発する。I R は、ナノ結晶 1 1 0 に衝突する時に吸収される。ナノ結晶は、I R 光 1 0 8 の吸収に応じて、可視光 1 1 2 を発する。可視光 1 1 2 は、修飾細胞 1 1 4 によって吸収される。

#### 【 0 1 1 9 】

図 1 に示されるシステムは、患者の脳組織の奥深くの標的細胞への光の送達を可能にする。光応答性分子は、関心の神経細胞型へ特異的に標的化することができる。同様に、ナノ結晶 1 1 2 は、標的化されている神経細胞 1 1 4 の種類に基づいて選択される抗体で神経細胞に固着される。

#### 【 0 1 2 0 】

図 2 を参照すると、一群のニューロンが、7 0 0 ~ 1 0 0 0 n m の赤外光 2 0 8 で照射される。標的ニューロン 2 1 4 は、オプシン遺伝子を発現し、どのオプシン、およびどのような光の波長がニューロン 2 1 4 によって吸収されるかに応じて、ニューロンが活性化または阻害されることを可能にする。標的ニューロン 2 1 4 は、他のニューロン 2 1 6 の間に間置することができる。差し込み図 2 0 2 に示されるように、標的ニューロン 2 1 4 は、抗体を介して神経細胞膜に固着される上方変換ナノ粒子 2 1 0 で被覆される。ナノ粒子 2 1 0 は、I R 光子を吸収し、神経活性化を誘起するオプシンによって吸収される可視光子を発する。

#### 【 0 1 2 1 】

図 2 のシステムは、種々の標的ニューロン 2 1 4 とともに使用することができる。標的ニューロン 2 1 4 において発現されるオプシン遺伝子 2 1 5 は、標的ニューロンに基づいて修飾される。同様に、ナノ粒子 2 1 0 を標的ニューロン膜に固着するために使用される抗体は、特定の膜型に付着するように修飾される。差し込み図 2 0 2 に示されるように、ナノ粒子 2 1 0 は、ナノ粒子 2 1 0 によって放出される可視光子が標的ニューロン 2 1 4 によって吸収されるように、標的ニューロンに密接に結合される。

#### 【 0 1 2 2 】

図 3 は、本開示の実施形態と一致する、複数の光源を使用するシステムを描写する。患者は、標的場所 3 0 8 ~ 3 1 2 に位置するナノ粒子を有する。システムは、標的場所 3 0 8 ~ 3 1 2 に位置するナノ粒子によって上方変換される周波数で光を生成するように構成することができる、光源 3 0 2 ~ 3 0 6 を含む。3 つの光源が描写されているが、任意の数の光源があり得る。これらの光源は、埋め込まれた光源 ( 例えば、頭蓋骨上に埋め込ま

10

20

30

40

50

れたLED)またはそれらの組み合わせを使用して、患者の外部にあり得る(例えば、機械的位置付けを使用して、いくつかの光源を方向付ける標的化システム)。標的場所308~312は、光学的応答性膜分子を有する細胞を含む。これらの光学的応答性膜分子は、上方変換された周波数における光に反応する。

#### 【0123】

異なる光源302~306からの光の交差点314に位置するナノ粒子は、単一の光源からの光路内の場所を含む、他の場所に対して増加した強度の光刺激を受容する。このようにして、光源のうちのそれぞれの光強度を閾値レベル未満に設定することができる。複数の光源が同じ場所に方向付けられる時に、その場所で閾値強度レベルを超えることができる。これは、3次元での空間制御を可能にし、また、非標的組織への不慮の影響の低減を可能にする。一実施形態と一致して、閾値レベルは、標的細胞への所望の影響(例えば、興奮または阻害)を引き起こすために必要な光の量に従って設定することができる。他の実施形態と一致して、閾値レベルは、非標的組織への悪影響(例えば、加熱)を回避するように設定することができる。

10

#### 【0124】

複数の光源の使用はまた、光強度の段階的な増加をもたらすこともできる。例えば、光強度の増加によって引き起こされる付加的な刺激の影響を監視することによって、疾患モデルを検査することができる。独立光源の使用は、時間的および空間的增加または減少に対する比較的単純な制御を可能にする。本開示の他の実施形態と一致して、光源の空間精度を、異なる光源の間で変化させることができる。例えば、第1の光源は、標的細胞場所全体を照射する光を提供することができる。これは、集団内の全ての細胞が照射されることを可能にする。第2の光源は、標的細胞場所全体未満を照射する焦点を有する光を提供することができる。第1および第2(またはそれ以上)の光源の組み合わせは、同じ細胞集団内で異なるレベルの刺激を提供するために使用することができる。

20

#### 【0125】

本開示の実施形態は、走査モードで動作する1つ以上の光源の使用に関する。光源は、標的細胞集団内の特定の場所に向けられる。標的細胞集団内で走査する、または別様に移動するために光源が使用されるにつれて、刺激の影響を監視することができる。これは、複数の光源の使用によって提供される3次元制御と関連して特に有用となり得る。

#### 【0126】

本開示の種々の実施形態は、異なる波長で光を発するナノ結晶の使用を対象とする。これは、異なる光吸収スペクトルを有する複数のオブシンを使用する時に、特に有用となり得る。ナノ結晶は、異なるオブシンに向けて標的化し、および/または対応する場所に配置することができる。本開示は、種々の修正および代替形態に従うが、それらの詳細は、一例として図面に示されており、さらに詳細に説明される。本開示を説明される特定の実施形態および/または用途に限定することを意図しないと理解されたい。逆に、本開示の精神および範囲内に入る全ての修正、同等物、および代替案を対象とすることを意図する。

30

#### 【実施例】

#### 【0127】

実施例1：側坐核のコリン作動性介在ニューロンを過分極化するための光遺伝学の使用におけるランタニドをドープしたナノ粒子の使用

40

側坐核(NAc)は、腹側線条体の主要部を形成するニューロンの集合である。NAcは、報酬、喜び、笑い、依存症、攻撃、恐怖、およびプラセボ効果と関連付けられる複雑な哺乳類の挙動において重要な役割を果たすと考えられている。NAc内のコリン作動性介在ニューロンは、局所神経細胞集団の1%未満を構成するが、それでもなお、NAcの全体を通して突出し、その既知のコリン作動性入力のみを提供する。この実施例では、ランタニドをドープしたナノ粒子と組み合わせて光応答性塩素ポンプタンパク質を使用する、光遺伝的アプローチは、高い時間分解能および高い細胞型特性の両方を伴って、これらの細胞における活動電位発火を阻止するために使用される。特異的にコリン作動性介在ニ

50

ユーロンにおいて微生物オプシン遺伝子を発現するために、Creリコンビナーゼを発現する遺伝子導入マウス系が、コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) プロモータの下で採用される。強化黄色蛍光タンパク質 (eYFP) のためのコード配列を伴ってフレーム内で融合された、黄色光ゲート第3世代塩素ポンプハロロドプシン (eNpHR3.0) 遺伝子を持つ、Cre誘発性アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターが、定位固定的に注射される。

#### 【0128】

具体的には、マウスに麻酔をし、次いで、定位固定頭部装置に配置する。手術を4～6週齢マウスに行い、眼が乾燥することを防止するように、全体を通して眼軟膏を塗布する。頭皮の正中切開を行い、その後に開頭術が続く、次いで、10  $\mu$ l 注射器および34ゲージ金属針を用いてAAVベクターを注射する。注入ポンプによって、注射量および流速 (0.15  $\mu$ l / 分で1  $\mu$ l) を制御する。各Nacは、2回の注射 (注射1: AP1.15 mm、ML0.8 mm、DV-4.8 mm、注射2: AP1.15 mm、ML0.8 mm、DV-4.2 mm) を受容する。ウイルス注射および線維位置は、事実上シエル全体が刺激されるように選択される。

#### 【0129】

次に、針を引き出す前に、NaYF<sub>4</sub>:Yb/Er/Gdナノ粒子をNacに注射する。3.4、8.5、または17 nmolの濃度のNaYF<sub>4</sub>:Yb/Er/Gdナノ粒子が使用される。AAVベクターおよびランタニドをドープしたナノ粒子の両方の注射が完了した後に、針を定位置でさらに5分間残し、次いで、非常にゆっくりと引き出す。

#### 【0130】

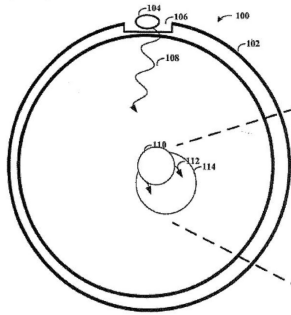
回復期間後、マウスに再び麻酔し、マウスの頭蓋骨を薄くし、電磁放射線のNIR源を薄くなった頭蓋骨領域に隣接して配置する。光刺激を使用して、以前に説明された方法 (Gradinaru et al., J. Neurosci., 27, 14231-14238 (2007)) に基づいて、同時NIR刺激および細胞外電氣的記録を行う。電極は、電極の先端が300～500  $\mu$ mだけ線維を超えて突出している状態で、タングステン電極 (1M、.005 in、パリレン絶縁) から成る。電極を、約100  $\mu$ m増分でNacを通して低減し、NIR上方変換光応答を、各増分で記録する。デジタル化し、ディスクに記録する前に、信号を増幅し、帯域通過フィルタにかける (300 Hz 低カットオフ、10 kHz 高カットオフ)。各部位において、5回の刺激反復を提示して保存する。

#### 【0131】

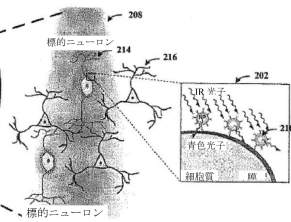
本発明を純粋に例示することを目的とし、したがって、決して本発明を限定すると見なされるべきではない、実施例はまた、上記で論議される本発明の態様および実施形態を説明および詳述する。先述の実施例および詳細な説明は、限定ではなく例証として提供される。本明細書で引用される出版物、特許出願、および特許は、各個別出版物、特許出願、または特許が、参照することにより組み込まれると特異的および個別に示されたかのように、参照することにより本明細書に組み込まれる。具体的には、本明細書で引用される全ての出版物は、本発明と関連して使用され得る組成物および方法を説明および開示する目的で、参照することにより本明細書に明示的に組み込まれる。先述の発明は、理解を明確にする目的で、例証および一例として、いくらか詳細に説明されているが、本発明の教示に照らして、添付の請求項の精神または範囲から逸脱することなく、ある変更および修正が行われてもよいことが、当業者に容易に明白となるであろう。

## 【図A】

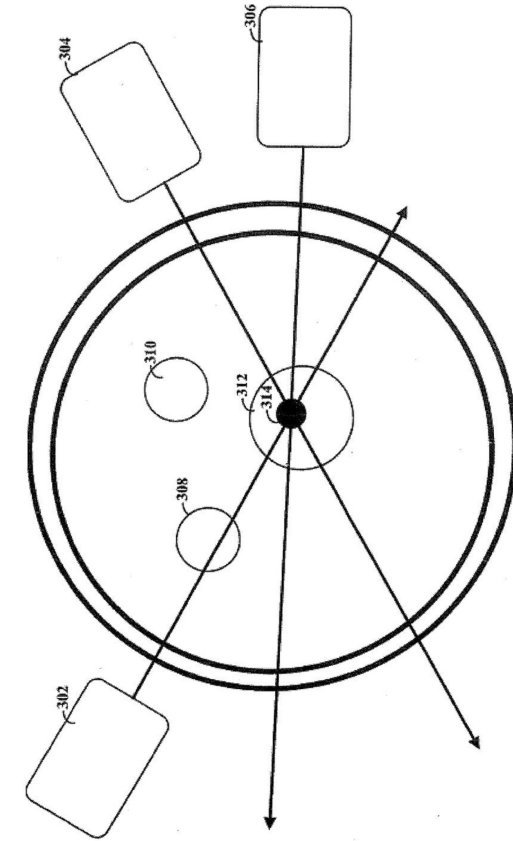
【図1】



【図2】



## 【図B】



【図3】

## 【配列表】

0006145043000001.app



---

フロントページの続き

(72)発明者 ダイスロス, カール

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94305, パロ アルト, ピーター カッツ サークル  
70

審査官 中村 一雄

(56)参考文献 国際公開第2010/123993(WO, A1)

国際公開第2010/056970(WO, A2)

特開2010-227537(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61N 5/06