

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和3年5月13日(2021.5.13)

【公表番号】特表2020-506710(P2020-506710A)

【公表日】令和2年3月5日(2020.3.5)

【年通号数】公開・登録公報2020-009

【出願番号】特願2019-542436(P2019-542436)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/11	(2006.01)
C 1 2 N	15/63	(2006.01)
C 1 2 N	15/86	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	15/90	(2006.01)
C 1 2 N	15/31	(2006.01)
C 1 2 N	15/30	(2006.01)
C 1 2 N	15/29	(2006.01)
C 1 2 N	15/85	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/11	Z N A Z
C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	15/86	Z
C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	15/90	Z
C 1 2 N	15/31	
C 1 2 N	15/30	
C 1 2 N	15/29	
C 1 2 N	15/85	Z

【手続補正書】

【提出日】令和3年4月5日(2021.4.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1の核酸配列を含む、もしくは、からなる、または、少なくとも1800塩基対の核酸配列からなり且つ配列番号1の前記核酸配列と少なくとも80%の同一性を有する、単離核酸分子。

【請求項2】

少なくとも1800塩基対の核酸配列からなり且つ配列番号1の前記核酸配列と少なくとも90%の同一性を有する、請求項1に記載の単離核酸分子。

【請求項3】

少なくとも1800塩基対の核酸配列を含み且つ配列番号1の前記核酸配列と少なくとも95%の同一性を有する、請求項1に記載の単離核酸分子。

【請求項4】

配列番号1の前記核酸配列を含む、請求項1に記載の単離核酸分子。

【請求項5】

網膜神経節細胞中の遺伝子の発現を、前記遺伝子をコードする核酸配列が前記単離核酸分子に作動可能に結合している場合に、駆動するのに有効である、請求項1～4のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項6】

前記網膜神経節細胞が、ヒト網膜神経節細胞である、請求項5に記載の単離核酸分子。

【請求項7】

前記網膜神経節細胞が、マウス網膜神経節細胞である、請求項5に記載の単離核酸分子。

【請求項8】

最小プロモーターをさらに含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項9】

前記最小プロモーターが、配列番号2の核酸配列を含む、請求項8に記載の単離核酸分子。

【請求項10】

請求項1～9のいずれか一項に記載の単離核酸分子を含む発現力セットであって、前記単離核酸分子が、少なくとも、遺伝子をコードする核酸配列に作動可能に結合している発現力セット。

【請求項11】

請求項10に記載の発現力セットを含むベクター。

【請求項12】

ウイルスベクターである、請求項11に記載のベクター。

【請求項13】

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである、請求項11に記載のベクター。

【請求項14】

網膜神経節細胞における遺伝子発現のための、請求項1～9のいずれか一項に記載の単離核酸分子、請求項10に記載の発現力セットまたは請求項11～13のいずれか一項に記載のベクターの使用。

【請求項15】

単離細胞、細胞系または細胞集団に請求項10に記載の発現力セットで形質移入することを含む、網膜神経節細胞中で遺伝子を発現させる方法であって、

前記単離細胞が網膜神経節細胞である、または前記細胞系もしくは前記細胞集団が網膜神経節細胞を含む場合、前記遺伝子を前記単離細胞、前記細胞系または前記細胞集団により発現させる、方法。

【請求項16】

前記単離細胞がヒト細胞である、または、前記細胞系もしくは前記細胞集団がヒト細胞を含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記単離細胞がマウス細胞である、または、前記細胞系もしくは前記細胞集団がマウス細胞を含む、請求項15に記載の方法。

【請求項18】

請求項10に記載の発現力セットまたは請求項11～13のいずれか一項に記載のベクターを含む単離細胞。

【請求項19】

前記発現力セットまたはベクターが、前記細胞のゲノム中に安定的に組み込まれている

、請求項1 8に記載の細胞。

【請求項20】

前記遺伝子の産物が、光感受性分子、MT-ND4、MT-ND1、MT-ND6、MT-CYB、MT-CO3、MT-ND5、MT-ND2、5MT-COI、MT-ATP6、MT-ND4L、OPA1、OPA3、OPA7、ACO2、GDNF、CNTF、FGF2、BDNF、EPO、BCL2、BCL2L1、エンドスタチン、アンギオスタチン、sFlt、IL10、IL1R1、TGFBI、IL4および桿体由来錐体生存因子(RdCVF)からなる群から選択される、請求項1～9のいずれか一項に記載の単離核酸分子、請求項10に記載の発現カセット、請求項11～13のいずれか一項に記載のベクター、請求項14に記載の使用、請求項15～17のいずれか一項に記載の方法または請求項18もしくは19に記載の細胞。

【請求項21】

前記光感受性分子が、ハロロドプシンまたはチャネルロドプシンである、請求項20に記載の単離核酸分子、発現カセット、ベクター、使用、方法または細胞。

【請求項22】

網膜神経節細胞中で遺伝子を発現させるためのキットであって、請求項1～9のいずれか一項に記載の単離核酸分子を含む、キット。

【請求項23】

前記単離核酸分子またはその薬学的に許容可能な配合物を投与するための、針、シリンジ、および／また説明書をさらに含む、請求項22に記載のキット。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0106

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0106】

ウイルス形質移入および組織製剤

マウスにおけるAAV投与のため、麻酔した動物の眼に先の尖った30ゲージ針によって水晶体の近くで強膜を穿刺した。ハミルトンシリンジによって網膜下に2μLのAAV粒子懸濁液を注射した。3週間後、単離した網膜を30分間にわたりPBS中の4%のPFA中で固定し、次いでPBS中で4%において洗浄ステップを行った。全網膜は、室温で1時間にわたり10%の標準ロバ血清(NDS)、1%のBSA、PBS中の0.5%のTriton X-100により処理した。PBS中の3%のNDS、1%のBSA、0.5%のTriton X-100中のモノクローナルラット抗GFP Ab(Molecular Probes Inc.; 1:500)およびポリクローナルヤギ抗ChAT(Millipore; 1:200)による処理を、室温において5日間実施した。二次ロバ抗ラットAlexa Fluor-488Ab(Molecular Probes Inc.; 1:200)、抗ヤギAlexa Fluor-633およびHoechstによる処理を2時間行った。切片を洗浄し、スライドガラス上にProLong Gold褪色防止用試薬(Molecular Probes Inc.)と共に載せ、Zeiss LSM 700 Axio Imager Z2レーザー走査型共焦点顕微鏡(Carl Zeiss Inc.)を使用してイメージングした。非ヒト靈長類におけるAAV投与のためには、Kunming, Chinaの眼科医および外部委託先と連携して、50μLのAAV粒子懸濁剤を網膜下に注射した。3ヶ月後、単離した眼杯を一晩、PBS中の4%のPFA中で固定し、次いでPBS中で4%において洗浄ステップを行った。固定した眼杯を受領した後、感染した網膜領域をバラバラにし、マウス組織について上述した処理と同一の処理を行った。

本発明は、以下の態様を提供しうる。

[1]

配列番号1の核酸配列を含み、もしくはそれからなり、または配列番号1の前記配列と

少なくとも 80 % の同一性を有する少なくとも 1800 bp の核酸配列からなる単離核酸分子であって、網膜神経節細胞中の遺伝子の特異的発現を、前記遺伝子をコードする核酸配列が前記単離核酸分子に作動可能に結合している場合にもたらす単離核酸分子。

[2]

最小プロモーター、例えば、配列番号 2 の最小プロモーターをさらに含む、上記[1]に記載の単離核酸分子。

[3]

上記[1]または[2]に記載の単離核酸分子とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする配列を含む単離核酸分子。

[4]

規定の細胞中の遺伝子発現を促進するエレメントとして上記[1]または[2]に記載の単離核酸を含む発現力セットであって、前記単離核酸が、少なくとも、網膜神経節細胞中で特異的に発現させるべき遺伝子をコードする核酸配列に作動可能に結合している発現力セット。

[5]

上記[4]に記載の発現力セットを含むベクター。

[6]

ウイルスベクターである、上記[5]に記載のベクター。

[7]

網膜神経節細胞中の遺伝子の前記発現のための、上記[1]もしくは[2]に記載の核酸の、上記[4]に記載の発現力セットの、または上記[5]に記載のベクターの使用。

[8]

単離細胞、細胞系または細胞集団に上記[4]に記載の発現力セットを形質移入するステップを含む、網膜神経節細胞中で遺伝子を発現させる方法であって、前記細胞が網膜神経節であり、または前記細胞が網膜神経節を含む場合、発現させるべき前記遺伝子を前記単離細胞、前記細胞系または前記細胞集団により特異的に発現させる方法。

[9]

上記[4]に記載の発現力セットまたは上記[5]に記載のベクターを含む単離細胞。

[10]

前記発現力セットまたはベクターが、前記細胞のゲノム中に安定的に組み込まれている、上記[9]に記載の細胞。

[11]

前記遺伝子の産物が、光感受性分子、例えば、ハロロドプシンまたはチャネルロドプシンである、上記[1]もしくは[2]に記載の単離核酸分子、上記[4]に記載の発現力セット、上記[5]に記載のベクター、上記[7]に記載の使用、上記[8]に記載の方法または上記[9]に記載の細胞。

[12]

上記[1]または[2]に記載の単離核酸分子を含む、網膜神経節細胞中で遺伝子を発現させるためのキット。