

【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カセットであって、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カセット。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の発現カ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 に記載の発現カ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 に記載の発現カ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 に記載の発現カ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】

前記発現カ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 18 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 - ND 4、MT - ND 1、MT - ND 6、MT - CYB、MT - CO 3、MT - ND 5、MT - ND 2、5MT - CO I、MT - ATP 6、MT - ND 4 L、OPA 1、OPA 3、OPA 7、ACO 2、GDNF、CNTF、FGF 2、BDNF、EPO、BCL 2、BCL 2 L 1、エンドスタチン、アングリオスタチン、sFlt、IL 10、IL 1 R 1、TGFB I、IL 4 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 2 μ L 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 % の標準口バ血清 (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。二次口バ抗ラット Alexa Fluor - 488 Ab (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。非ヒト霊長類における 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、50 μ L の AAV 粒子懸濁液を網膜下に注射した。3 カ月後、単離した眼杯を一晚、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ェ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カセットであって、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カセット。

[5]

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

[10]

前記発現カ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] に記載の発現カセット、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。