

【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 2 年 9 月 24 日 (2020.9.24)

【公表番号】特表 2019-528781 (P2019-528781A)

【公表日】令和 1 年 10 月 17 日 (2019.10.17)

【年通号数】公開・登録公報 2019-042

【出願番号】特願 2019-531572 (P2019-531572)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/29 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 N 13/00 (2006.01)

C 0 7 K 14/705 (2006.01)

A 6 1 P 17/02 (2006.01)

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 19/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/08 (2006.01)

A 6 1 P 3/00 (2006.01)

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

A 6 1 P 27/02 (2006.01)

A 6 1 P 27/16 (2006.01)

A 6 1 P 25/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/16 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/29

C 1 2 N 5/10 Z N A

C 1 2 N 15/63 Z

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 N 13/00

C 0 7 K 14/705

A 6 1 P 17/02

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 19/00

A 6 1 P 25/08

A 6 1 P 3/00

A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 27/02

A 6 1 P 27/16

A 6 1 P 25/00

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 K 38/16

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 8 月 17 日 (2020.8.17)

【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】

単離された光で活性化されるイオンチャネルポリペプチドであって、
1 以上のアミノ酸修飾を含む配列番号 2 のアミノ酸配列を含み、
前記光で活性化されるイオンチャネルポリペプチドが、細胞膜で発現され、活性化光に接触されると、配列番号 2 の前記光で活性化されるイオンチャネルポリペプチドと比べて高いレベルのイオン流及び高いレベルのプロトン流の少なくとも一方を有する、前記単離された光で活性化されるイオンチャネルポリペプチド。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが配列番号 3 ～ 10 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の光で活性化されるイオンチャネルポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号 3 ～ 10 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 4】

1 以上のアミノ酸修飾を含む、配列番号 3 ～ 10 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 5】

前記 1 以上の修飾が、置換、欠失または挿入である、請求項 4 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含む細胞。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。

【請求項 8】

前記核酸配列がプロモーター配列に操作可能に連結される、請求項 7 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 9】

請求項 7 または 8 に記載の単離された核酸分子を含む細胞。

【請求項 10】

請求項 7 または 8 に記載の単離された核酸分子を含む組成物。

【請求項 11】

前記細胞が試験管内、生体外、または生体内にある、請求項 6 または 9 に記載の細胞。

【請求項 12】

請求項 7 または 8 に記載の単離された核酸分子を含むベクター。

【請求項 13】

前記細胞が、光受容体、双極細胞、桿体双極細胞、ON 型錐体双極細胞、網膜神経節細胞、光感受性網膜神経節細胞、水平細胞、アマクリン細胞、または A I I アマクリン細胞である、請求項 6 または 9 に記載の細胞。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0162

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0162】

実施例 1：突然変異体 C o C h o p ポリペプチドの作製及び分析

C h R 2のようなチャネルロドプシン (C h R) は視力回復のための有望な光操作での光センサーである。視力回復でC h R 2を使用するための主要な障害はその低い光感受性である。我々は以前、部位特異的変異誘発を介してその動態を最適化することによって、最も光感受性のC h R 2突然変異体、C h R 2-L 1 3 2 C / T 1 5 9 Sを含むさらに光感受性のC h R 2を作製した。最近、藻類の新たなトランスクリプトームの配列決定によって多数のC h R変異体が報告されている (K l a p o e t k e, e t a l., 2 0 1 4, N a t. M e t h o d s, 1 1 (3) : 3 3 8 - 4 6)。我々は、変異体の1つであるC o C h Rが大きな光電流を示すことを見いだした。本発明では、我々は、部位特異的変異誘発を介してその動態を最適化することによって幾つかの高度に光感受性のC o C h R突然変異体 (すなわち、突然変異体C o C h o p) を作製した。これらの突然変異体には、C o C h R-L 1 1 2 C (配列番号3)、C o C h R-T 1 3 9 C (配列番号5)、C 6 8 S / V 6 9 I (配列番号4)、C 6 8 T / V 6 9 I (配列番号7)、C o C h R-T 1 4 5 A / S 1 4 6 A (配列番号6)、C o C h R-L 1 1 2 C / T 1 3 9 C (配列番号8)、C o C h R-L 1 1 2 C / H 9 4 E (配列番号9)、及びC o C h R-L 1 1 2 C / H 9 4 E / K 2 6 4 T (配列番号10) が挙げられる。C o C h R及びその突然変異体は、480nmでのピークスペクトルを伴ってC h R 2よりもやや赤色にシフトしたスペクトル曲線を示す (図1)。C o C h R突然変異体の光感受性 (C o C h R-L 1 1 2 Cについて示されるような) は、HEK細胞における電気生理学の記録 (図2~5)、及び網膜神経細胞からの多重電極アレイの記録 (図6)、及び生体内での盲目マウスに由来する視運動行動試験 (図7) に基づいて、最も光感受性のC h R 2突然変異体C h R 2-L 1 3 2 C / T 1 5 9 Sのそれよりもはるかに高い。さらに、周囲の光条件下でC o C h R-L 1 1 2 Cを発現しているマウスについて視運動反応を観察することができる (図8)。加えて、C o C h R-L 1 1 2 C突然変異体の長期の安定した発現が網膜神経細胞にて観察された (図9)。

本発明は、例えば以下の実施形態を包含する：

〔実施形態1〕 単離された光で活性化されるイオンチャネルポリペプチドであって、1以上のアミノ酸修飾を含む配列番号2のアミノ酸配列を含み、前記光で活性化されるイオンチャネルポリペプチドが、細胞膜で発現され、活性化光に接触されると、配列番号2の前記光で活性化されるイオンチャネルポリペプチドと比べて高いレベルのイオン流及び高いレベルのプロトン流の少なくとも一方を有する、前記単離された光で活性化されるイオンチャネルポリペプチド。

〔実施形態2〕 前記ポリペプチドが配列番号3~10のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、実施形態1に記載の光で活性化されるイオンチャネルポリペプチド。

〔実施形態3〕 配列番号3~10のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

〔実施形態4〕 1以上のアミノ酸修飾を含む、配列番号3~10のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

〔実施形態5〕 前記1以上の修飾が、置換、欠失または挿入である、実施形態4に記載の単離されたポリペプチド。

〔実施形態6〕 実施形態1~5のいずれかに記載のポリペプチドを含む細胞。

〔実施形態7〕 実施形態1~5のいずれかに記載のポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。

〔実施形態8〕 前記核酸配列がプロモーター配列に操作可能に連結される、実施形態7に記載の単離された核酸分子。

〔実施形態9〕 実施形態7または8に記載の単離された核酸分子を含む細胞。

〔実施形態10〕 実施形態7または8に記載の単離された核酸分子を含む組成物。

〔実施形態11〕 前記細胞が試験管内、生体外、または生体内にある、実施形態6または9に記載の細胞。

〔実施形態12〕 実施形態7または8に記載の単離された核酸分子を含むベクター。

〔実施形態13〕 前記細胞が、光受容体、双極細胞、桿体双極細胞、ON型錐体双極細胞

、網膜神経節細胞、光感受性網膜神経節細胞、水平細胞、アマクリン細胞、またはA I I
アマクリン細胞である、実施形態6または9に記載の細胞。

〔実施形態14〕膜の導電率を変える方法であって、

a. 宿主の膜にて実施形態1～5のいずれかに記載のポリペプチドを発現させることと
、

b. 好適な条件下で前記ポリペプチドを光に接触させて前記宿主の膜の導電率を変化さ
せることとを含む、前記方法。

〔実施形態15〕前記宿主の膜が細胞膜である、実施形態14に記載の方法。

〔実施形態16〕前記宿主の膜が、神経細胞、神経系の細胞、心臓細胞、循環細胞、視覚
系の細胞または聴覚系の細胞の細胞膜である、実施形態15に記載の方法。

〔実施形態17〕対象にて疾患または状態を治療する方法であって、

それを必要とする対象に治療上有効な量の、実施形態1～5に記載のポリペプチドまたは
実施形態7～8に記載の核酸を投与することを含む、前記方法。

〔実施形態18〕前記疾患または状態が、負傷、脳損傷、脊髄損傷、てんかん、代謝性障
害、心機能不全、視力喪失、失明、難聴、聴覚喪失、または神経学的状態である、実施形
態17に記載の方法。

〔実施形態19〕視力を改善するまたは回復させる方法であって、実施形態1～5に記載
のポリペプチドまたは実施形態7～8に記載の核酸を対象に投与することを含む、前記方
法。

〔実施形態20〕前記対象が眼疾患を患っている、実施形態19に記載の方法。

〔実施形態21〕前記眼疾患が黄班変性症または網膜色素変性症である、実施形態20に
記載の方法。

〔実施形態22〕前記視力を改善するまたは回復させることが、以下：光感受性を高める
こと；光電流を誘起するのに必要とされる閾値光強度を下げること；及び視覚野における
視覚誘発電位を高めることのいずれかを含む、実施形態19～21のいずれかに記載の方
法。

〔実施形態23〕網膜色素変性症または加齢性黄班変性症を治療する方法であって、それ
を必要とする対象に実施形態1～5に記載のポリペプチドまたは実施形態7～8に記載の
核酸を投与することを含む、前記方法。

〔実施形態24〕前記組成物が硝子体内または網膜下の注射によって投与される、実施形
態19～23のいずれかに記載の方法。