

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6942789号  
(P6942789)

(45) 発行日 令和3年9月29日(2021.9.29)

(24) 登録日 令和3年9月10日(2021.9.10)

(51) Int.Cl.

F 1

|              |           |              |       |
|--------------|-----------|--------------|-------|
| A 61 K 38/16 | (2006.01) | A 61 K 38/16 | Z N A |
| A 61 K 35/76 | (2015.01) | A 61 K 35/76 |       |
| A 61 P 27/02 | (2006.01) | A 61 P 27/02 |       |
| A 61 P 43/00 | (2006.01) | A 61 P 43/00 | 1 O 7 |
| A 61 P 25/02 | (2006.01) | A 61 P 25/02 | 1 O 1 |

請求項の数 20 (全 75 頁) 最終頁に続く

|                    |                               |
|--------------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号          | 特願2019-508309 (P2019-508309)  |
| (86) (22) 出願日      | 平成29年4月28日 (2017.4.28)        |
| (65) 公表番号          | 特表2019-518073 (P2019-518073A) |
| (43) 公表日           | 令和1年6月27日 (2019.6.27)         |
| (86) 國際出願番号        | PCT/IB2017/000663             |
| (87) 國際公開番号        | W02017/187272                 |
| (87) 國際公開日         | 平成29年11月2日 (2017.11.2)        |
| 審査請求日              | 令和2年3月27日 (2020.3.27)         |
| (31) 優先権主張番号       | 62/329,692                    |
| (32) 優先日           | 平成28年4月29日 (2016.4.29)        |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US)                        |

|           |   |
|-----------|---|
| (73) 特許権者 | 518383437<br>ジェンサイト バイオロジクス エスター<br>フランス国 75012 パリ リュード<br>ウ フォーブール サン アントワーヌ<br>74 |
| (73) 特許権者 | 507416908<br>ソルボンヌ・ユニヴェルシテ<br>フランス国・75006・パリ・リュード<br>ウ レコール ドゥ メドスィーヌ・21            |
| (73) 特許権者 | 506316557<br>サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ<br>ルシュ シアンティフィック<br>フランス国 75016 パリ リュミケランジュ 3      |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Chrimson を用いた光遺伝学的視覚回復

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

哺乳類の網膜神経節細胞 (RGC) を活性化するための組成物であって、t d - T o m a t o ( t d T ) 蛍光タンパク質に融合した有効量の Chrimson タンパク質を発現するベクターを含み、前記 t d T タンパク質が融合した Chrimson タンパク質が、Chrimson タンパク質単独に比べて、光刺激に対する応答がより効果的である組成物。

## 【請求項 2】

対象でのニューロン介在障害を処置または防止するための組成物であって、t d - T o m a t o ( t d T ) 蛍光タンパク質に融合した有効量の Chrimson タンパク質を発現するベクターを含み、前記 t d T タンパク質が融合した Chrimson タンパク質が、Chrimson タンパク質単独に比べて、光刺激に対する応答がより効果的である組成物。

## 【請求項 3】

内網膜細胞での光への感受性を回復させるための組成物であって、t d - T o m a t o ( t d T ) 蛍光タンパク質に融合した有効量の Chrimson タンパク質を発現するベクターを含み、前記 t d T タンパク質が融合した Chrimson タンパク質が、Chrimson タンパク質単独に比べて、光刺激に対する応答がより効果的である組成物。

## 【請求項 4】

対象に視覚を回復させるための組成物であって、t d - T o m a t o ( t d T ) 蛍光タ

ンパク質に融合した有効量の C h r i m s o n タンパク質を発現するベクターを含み、前記 t d T タンパク質が融合した C h r i m s o n タンパク質が、 C h r i m s o n タンパク質単独に比べて、光刺激に対する応答がより効果的である組成物。

【請求項 5】

光覚または光感受性の欠損により視覚を損失した対象に視覚を回復させるための組成物であって、t d - T o m a t o ( t d T ) 蛍光タンパク質に融合した有効量の C h r i m s o n タンパク質を発現するベクターを含み、前記 t d T タンパク質が融合した C h r i m s o n タンパク質が、 C h r i m s o n タンパク質単独に比べて、光刺激に対する応答がより効果的である組成物。

【請求項 6】

光受容体機能の損失により網膜変性を患う対象の網膜変性を処置または防止するための組成物であって、t d - T o m a t o ( t d T ) 蛍光タンパク質に融合した有効量の C h r i m s o n タンパク質を発現するベクターを含む組成物。

【請求項 7】

光覚または光感受性の欠損により視覚を損失したヒトの目の光受容体機能を回復させるための組成物であって、t d - T o m a t o ( t d T ) 蛍光タンパク質に融合した有効量の C h r i m s o n タンパク質を発現するベクターを含み、前記 t d T タンパク質が融合した C h r i m s o n タンパク質が、 C h r i m s o n タンパク質単独に比べて、光刺激に対する応答がより効果的である組成物。

【請求項 8】

電気的に活性の細胞を脱分極するための組成物であって、t d - T o m a t o ( t d T ) 蛍光タンパク質に融合した有効量の C h r i m s o n タンパク質を発現するベクターを含み、前記 t d T タンパク質が融合した C h r i m s o n タンパク質が、 C h r i m s o n タンパク質単独に比べて、光刺激に対する応答がより効果的である組成物。

【請求項 9】

網膜神経節細胞 ( R G C ) を活性化するための組成物であって、 R G C 応答を誘起する光刺激レベルが放射線安全性限界より低い、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記 C h r i m s o n タンパク質は C h r i m s o n 8 8 または C h r i m s o n R である、請求項 1 から 8 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【請求項 11】

緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) を含有しない、請求項 1 0 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記蛍光タンパク質は、所定細胞数に対する融合 C h r i m s o n タンパク質の発現レベルを、 C h r i m s o n タンパク質単独の発現レベルに比べて増大させる、請求項 1 0 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記融合 C h r i m s o n タンパク質の発現レベルは、前記 C h r i m s o n タンパク質の向上した溶解度、トラフィッキング、および / またはタンパク質構造を通して増大する、請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記ベクターはアデノ随伴ウィルス ( A A V ) ベクターである、請求項 1 から 8 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【請求項 15】

前記 A A V ベクターは A A V 2 ベクターおよび A A V 2 . 7 m 8 ベクターから選択される、請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記 A A V ベクターは A A V 2 . 7 m 8 ベクターである、請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記ベクターは C A G プロモーターを含む、請求項 1 から 8 のいずれか 1 つに記載の組成物。

10

20

30

40

50

成物。

【請求項 1 8】

前記ベクターは硝子体内に注射投与されるように用いられる、請求項 1 から 8 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【請求項 1 9】

t d - T o m a t o ( t d T ) 蛍光タンパク質に融合した有効量の前記 C h r i m s o n タンパク質は長期にわたって発現される、請求項 1 から 8 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【請求項 2 0】

t d - T o m a t o ( t d T ) 蛍光タンパク質に融合した前記 C h r i m s o n タンパク質の発現は投与後少なくとも 2 カ月、または投与後少なくとも 11 カ月持続する、請求項 1 9 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0 0 0 1】

本出願は、2016年4月29日出願の米国仮出願第 6 2 / 3 2 9 , 6 9 2 号の優先権の利益を主張し、その内容の全体が本明細書において参照により援用される。

【0 0 0 2】

本出願は、A S C I I 形式で電子的に提出された配列表を含み、本配列表はその全体が本明細書において参照により援用される。該 A S C I I の複製は、2017年4月28日に作成され、名称 1 2 2 9 5 \_ 0 0 0 6 - 0 0 3 0 4 . t x t 、大きさは 31 バイトである。

【技術分野】

【0 0 0 3】

本開示は、とりわけ、膜をまたぐ伝導性、細胞活性、および細胞機能を変更する組成物および方法を提供し、また細胞内および対象内での外因性光活性イオンチャネルの使用に関する。より詳しくは、本発明の実施形態の 1 つの局面は、哺乳類の網膜神経節細胞 (R G C) を再活性化する方法であって、哺乳類に有効量の C h r i m s o n ポリペプチドを投与することを包含する方法に関する。いくつかの実施形態では、本方法は、放射線安全性限界より低い R G C 応答を誘起する光刺激レベルを含み得る。いくつかの実施形態では、C h r i m s o n ポリペプチドは蛍光タンパク質に融合される。いくつかの実施形態では、蛍光タンパク質は t d T o m a t o ( t d T ) または緑色蛍光タンパク質 (G F P) である。

【背景技術】

【0 0 0 4】

網膜は光受容体よりなり、これらは光情報伝達、すなわち光を、視覚系内の事象の連鎖を伝達し最終的には世界の一表現を生成する電気的および化学的信号へと変換することによる網膜の感光性に関する高度に専門化したニューロンである。脊椎動物の網膜では、光情報伝達は光感応性受容体タンパク質、ロドプシンの活性化によって開始される。

【0 0 0 5】

網膜色素変性 (R P) または黄斑変性 (M D) の場合などの光受容体損失または変性は、網膜内の視覚情報の光情報伝達を、完全に阻害することはないにしても、非常に危うくする。光受容細胞の損失および / または光受容細胞機能の損失が視力の低下、光感受性の低下、および失明の主な原因である。

【0 0 0 6】

現在、網膜変性疾患専用のいくつかの治療アプローチが開発中であり、これらには遺伝子治療、幹細胞治療、光遺伝学、および人工網膜が含まれる (S c h o l l ら、2016 、 S c i e n c e T r a n s l a t i o n a l M e d i c i n e 、 8 ( 3 6 8 ) 、 3 6 8 r v 6 )。

【0 0 0 7】

10

20

30

40

50

例えば、光遺伝学と称する遺伝子工学および神経工学技術によって脳内の他のニューロンに影響を与えることなく明確なニューロン集団の活性を制御することによって対象の網膜の感光性を回復させることができることが提案されている。欠陥遺伝子の置換または修復、またはタンパク質欠乏または不全の修正を経ての遺伝子欠陥の回避を企てる伝統的な遺伝子治療とは対照的に、治療への遺伝学的アプローチは、網膜内の通常は感光性ではない細胞に光に応答する能力を付与し、これにより有効視覚を患者に回復させるために用いることができる。細胞外電気刺激を双極細胞または神経節細胞に与える網膜チップ移植とは異なり、光遺伝学ベースの治療は細胞を細胞内から刺激する。

## 【0008】

光遺伝学 (Deisseroth. Nat Methods 8 (1) : 26 - 9, 20 10 11) は生体組織の特定の細胞内の明確な事象を制御するために遺伝学と光学とを組み合わせることをいう。光遺伝学は、特定の標的メカニズムの使用を通じての細胞型分解能を維持する一方で、神経活性のミリ秒精度での操作を可能にする光活性化チャネルの細胞への導入を包含する。これは、光応答性を授与する遺伝子の発見と細胞への挿入を含む：また、哺乳類と同じ位複雑な有機体へと光を深く送達するための、光感受性を問題の細胞に向けるための、そしてこの光制御の特定の読み出し情報または効果を評価するための関連する諸技術を含む。

## 【0009】

例え、WO 2007024391、WO 2008022772 または WO 20091 27705 は、哺乳類ニューロンでの発現用に設計され、またウィルスベクターを用いて特定の神経細胞集団を遺伝子学的に標的とすることができる、光活性化イオンチャネルおよびポンプ（例え、チャネルロドプシン-2 [ChR2]；halorhodopsin [NpHR]）をコードする植物および微生物（例え、古細菌、バクテリア、および菌類）由来のオプシン遺伝子の使用について記載している。適切な波長を有する光に曝すと、オプシン発現ニューロン内に活動電位が引き起こされ、これによりこれら細胞に光感受性が与えることができる。

## 【0010】

最近、Chlamydomonas reinhardtii または Volvox carteri からの4つのチャネルロドプシン遺伝子由来の数多くのチャネルロドプシンが、神経科学的用途のために設計されている。しかしこれら天然のチャネルロドプシンは青色-緑色 (430 - 550 nm) スペクトルピークのみを有し、C1V1 および Rea ChR などの、設計赤方偏移チャネルロドプシンは緑色 (~545 nm) にピーク波長感度を有する (Mittisら、Nature Methods, 2011 Dec 18; 9 (2) : 159 - 72; Linら、Nature Neuroscience, 2013 Oct; 16 (10) : 1499 - 508)。

## 【0011】

2014年、Klapoetkeら、Nat Methods, 11 (3), 338 - 346 は、従って、前述のチャネルロドプシンには見出せない独特の特徴を持つ新しいオプシンを発見することを目指して、天然のチャネルロドプシンの遺伝子的多様性の研究を通してこれらの限界を克服するよう努めた。WO 2013071231 は従って、新規のチャネルロドプシン、Chronos および Crimson を開示している。これらは互いに異なりまた最先端技術（例え、ChR2 / VChR1）とも異なる活性化スペクトルを有し、また異なる細胞内で遺伝子的に発現させた異なる活性化スペクトルを持つチャネルを発現させ、次に異なる色の光で組織を照射することによって、多数の異なる波長の光を同じ組織内の異なる細胞組を脱分極するために用いるのを可能にする。より詳しくは、Crimson はこれまでのいかなるチャネルロドプシンに比べても 45 nm 赤方偏移しており、これは、赤色光は、他のチャネルロドプシン変種によって必要とされる青色から緑色波長より、組織による分散が弱くまた血液による吸収が少ないため、好適であるという状況にとっては重要となり得る。

## 【0012】

10

20

30

40

50

オプシンは、オプシン発現細胞での可視化を促進し従ってこれらの細胞内位置確認を監視するために蛍光タンパク質に融合させることが多い。さらに、使用する蛍光タンパク質のいくつかのタイプはある状況下ではオプシンの細胞位置確認を変調させることができる事が示されている。例えば、A rrenbergら(2009、P N A S、106(42)、17968 - 73)は同一のオプシンを含有するが蛍光タグは異なる融合タンパク質(すなわち、赤色蛍光タンパク質mCherryまたは黄色蛍光タンパク質YFP)は異なる細胞内コンパートメント内で分配される場合があると観察している。

#### 【0013】

しかしこの観察は、発現レベルまたは膜位置確認での明白な相違は、t d T o m a t o に融合したチャネルロドプシン2発現トランスジェニック動物には見られていないため、t d T o m a t o 蛍光タグでは確認されなかった(Madisenら、2012、N a t N e u r o s c i .、15(5) : 793 - 802)。その上、融合タンパク質の位置確認または発現レベルにおけるこの変化に関連するオプシンの活性についていかなる進展も今日までに報告されていない。

#### 【発明の概要】

#### 【0014】

1つの実施形態では、本開示は、C h r i m s o n タンパク質、より詳しくは、t d T o m a t o (t d T) 蛍光タンパク質または緑色蛍光タンパク質(GFP)に融合したC h r i m s o n R (ChrR)と呼ばれるその1つの特別な突然変異体が、C h r i m s o n タンパク質単独に比べて、光刺激に対する応答がより効果的であることを示す。いくつかの方法の実施形態では、蛍光タンパク質は、所定細胞数に対する融合C h r i m s o n タンパク質の発現レベル、より詳しくはプラズマ膜でのタンパク質レベルを、C h r i m s o n タンパク質単独／非融合の発現レベルと比べて増大させる。いくつかの他の方法の実施形態では、蛍光タンパク質は、融合C h r i m s o n タンパク質のプラズマ膜への細胞トラフィッキングを、C h r i m s o n タンパク質単独／非融合の細胞トラフィッキングと比べて増大させる。いくつかの方法の実施形態では、融合C h r i m s o n タンパク質の発現レベルおよび／または細胞トラフィッキングは、C h r i m s o n タンパク質の向上した溶解度、トラフィッキング、および／またはタンパク質構造を通して増大する。

#### 【0015】

1つの局面では、本開示は、C h r i m s o n タンパク質および蛍光タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を包含する。

#### 【0016】

別の局面では、本開示は、蛍光タンパク質に融合したC h r i m s o n タンパク質をコードするポリヌクレオチドを包含する。

#### 【0017】

別の局面では、本開示は、ベクターを含む組成物を包含する。ベクターはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ポリペプチドは少なくとも1つのC h r i m s o n タンパク質および蛍光タンパク質を含む。

#### 【0018】

さらに別の局面では、本開示は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを含み、ポリペプチドは蛍光タンパク質に融合したC h r i m s o n タンパク質を含む。

#### 【0019】

さらに別の局面では、本開示は、対象におけるニューロン介在の障害を処置または防止する方法を包含し、本方法はベクターを含む組成物を細胞(すなわちニューロン)に投与することを含む。ベクターはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ポリペプチドは少なくとも1つのC h r i m s o n タンパク質および蛍光タンパク質を含む。好ましくは、投与組成物のベクターはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ポリペプチドは蛍光タンパク質に融合したC h r i m s o n タンパク質を含む。

10

20

30

40

50

**【 0 0 2 0 】**

さらに別の局面では、本開示は、内網膜細胞での光への感受性を回復させる方法を包含する。本方法は、ベクターを含む組成物を細胞に投与することを包含する。ベクターはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ポリペプチドは少なくとも1つのChrimsonタンパク質および蛍光タンパク質を含む。好ましくは、投与組成物のベクターはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ポリペプチドは蛍光タンパク質に融合したChrimsonタンパク質を含む。

**【 0 0 2 1 】**

異なる局面では、本開示は、対象に視覚を回復させる方法を包含する。本方法は、光覚または光感受性の欠損により視覚を損失した対象を同定すること、ベクターを含む組成物を目に投与することであって、ベクターはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ポリペプチドは少なくとも1つのChrimsonタンパク質および蛍光タンパク質を含む、組成物を投与すること、ポリペプチドを光により活性化させること、および対象の光感受性を測定することを包含し、ここで光感受性の増大は視覚回復を示す。10

**【 0 0 2 2 】**

別の局面では、本開示は、対象に視覚を回復させる方法であって、本方法は、光覚または光感受性の欠損により視覚を損失した対象を同定すること、ベクターを含む組成物を目に投与することであって、ベクターはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ポリペプチドは蛍光タンパク質に融合した少なくとも1つのChrimsonタンパク質を含む、組成物を投与すること、ポリペプチドを光により活性化させること、および対象の光感受性を測定することを包含し、ここで光感受性の増大は視覚回復を示す。20

**【 0 0 2 3 】**

他の局面では、本開示は、対象の網膜変性を処置または防止する方法を包含する。本方法は、光受容体機能の損失による網膜変性を患う対象を同定すること、ベクターを含む組成物を目に投与することであって、ベクターはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ポリペプチドは少なくとも1つのChrimsonタンパク質および蛍光タンパク質を含む、組成物を投与すること、および対象の光感受性を測定することを包含し、ここで光感受性の増大は網膜変性の処置を示す。

**【 0 0 2 4 】**

さらに別の局面では、本開示は、対象の網膜変性を処置または防止する方法を包含し、本方法は、光受容体機能の損失による網膜変性を患う対象を同定すること、ベクターを含む組成物を投与することであって、ベクターはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ポリペプチドは蛍光タンパク質に融合した少なくとも1つのChrimsonタンパク質を含む、組成物を投与すること、および対象の光感受性を測定することを包含し、ここで光感受性の増大は網膜変性の処置を示す。30

**【 0 0 2 5 】**

ある局面では、本開示は、ヒトの目の光受容体機能を回復させる方法を包含する。本方法は、有効量のベクターを含む組成物を投与することであって、ベクターはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ポリペプチドは少なくとも1つのChrimsonタンパク質および蛍光タンパク質を含む、組成物を投与することを包含する。40

**【 0 0 2 6 】**

別の局面では、本開示は、ヒトの目の光受容体機能を回復させる方法を包含し、本方法は、有効量のベクターを含む組成物を投与することであって、ベクターはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ポリペプチドは蛍光タンパク質に融合した少なくとも1つのChrimsonタンパク質を含む、組成物を投与することを包含する。

**【 0 0 2 7 】**

さらに別の局面では、本開示は、電気的に活性の細胞を脱分極する方法を包含する。本方法は、細胞にベクターを含む組成物を投与することであって、ベクターはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ポリペプチドは少なくとも1つのChrimsonタンパク質および蛍光タンパク質を含む、組成物を投与することを包含する。50

**【0028】**

さらに別の局面では、本開示は、電気的に活性の細胞を脱分極する方法を包含し、本方法は、細胞にベクターを含む組成物を投与することであって、ベクターはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含み、ポリペプチドは蛍光タンパク質に融合した少なくとも1つのChrimsonタンパク質を含む、組成物を投与することを包含する。

**【0029】**

本開示の方法のいくつかの実施形態では、ベクターはアデノ随伴ウィルス(AAV)ベクターである。本方法のいくつかの実施形態では、ベクターはAAV2.7m8ベクターまたはAAV2ベクターである。いくつかの実施形態では、本方法はさらにCAGプロモーターの使用を包含する。

10

**【0030】**

いくつかの実施形態では、ベクターは注射により投与され、好ましくは、硝子体内に注射される。

**【0031】**

本方法のいくつかの実施形態では、有効量のChrimsonタンパク質は長期にわたって発現される。本方法のいくつかの実施形態では、Chrimsonタンパク質の発現は注射後少なくとも11カ月持続する。本方法のいくつかの実施形態では、Chrimsonタンパク質の発現は注射後少なくとも2カ月持続する。

**【0032】**

本方法のいくつかの実施形態では、対象は哺乳類である。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。いくつかの実施形態では、哺乳類はマウスである。本方法のいくつかの実施形態では、マウスはrd1である。本方法のいくつかの実施形態では、哺乳類はラットである。本方法のいくつかの実施形態では、ラットはP23Hである。本方法のいくつかの実施形態では、哺乳類はヒトまたは非ヒト靈長類である。本方法のいくつかの実施形態では、非ヒト靈長類はカニクイザルである。

20

**【0033】**

以下の開示はまた以下の追加の実施形態を提供する。

**【0034】**

実施形態1は、哺乳類の網膜神経節細胞(RGC)を再活性化する方法であって、蛍光タンパク質に融合した有効量のChrimsonタンパク質を発現するベクターを哺乳類に投与することを包含する方法を提供する。

30

**【0035】**

実施形態2は、対象のニューロン介在障害を処置または防止する方法であって、蛍光タンパク質に融合した有効量のChrimsonタンパク質を発現するベクターを備えた組成物をニューロンに投与することを包含する方法を提供する。

**【0036】**

実施形態3は、内網膜細胞での光への感受性を回復させる方法であって、蛍光タンパク質に融合した有効量のChrimsonタンパク質を発現するベクターを備えた組成物を内網膜細胞に投与することを包含する方法を提供する。

40

**【0037】**

実施形態4は、対象に視覚を回復させる方法であって、蛍光タンパク質に融合した有効量のChrimsonタンパク質を発現するベクターを備えた組成物を対象に投与することを包含する方法を提供する。

**【0038】**

実施形態5は、対象に視覚を回復させる方法であって、光覚または光感受性の欠損により視覚を損失した対象を同定すること、および蛍光タンパク質に融合した有効量のChrimsonタンパク質を発現するベクターを備えた組成物を対象に投与することを包含する方法を提供する。

**【0039】**

実施形態6は、対象の網膜変性を処置または防止する方法であって、光受容体機能の損

50

失により網膜変性を患う対象を同定すること、および蛍光タンパク質に融合した有効量の Chrimson タンパク質を発現するベクターを備えた組成物を対象に投与することを包含する方法を提供する。

【0040】

実施形態 7 は、ヒトの目の光受容体機能を回復させる方法であって、光覚または光感受性の欠損により視覚を損失した対象を同定すること、および蛍光タンパク質に融合した有効量の Chrimson タンパク質を発現するベクターを備えた組成物を対象に投与することを包含する方法を提供する。

【0041】

実施形態 8 は、電気的に活性の細胞を脱分極する方法であって、蛍光タンパク質に融合した有効量の Chrimson タンパク質を発現するベクターを備えた組成物を細胞に投与することを包含する方法を提供する。 10

【0042】

実施形態 9 は、実施形態 1 から 8 のいずれか 1 つによる方法であって、RGC 応答を誘起する光刺激レベルが放射線安全性限界より低い、方法を提供する。

【0043】

実施形態 10 は、実施形態 1 から 8 のいずれか 1 つによる方法であって、Chrimson タンパク質は Chrimson 88 または Chrimson R である、方法を提供する。

【0044】

実施形態 11 は、実施形態 10 の方法であって、蛍光タンパク質は Td - Tomato (TdT) タンパク質および緑色蛍光タンパク質 (GFP) から選択される、方法を提供する。 20

【0045】

実施形態 12 は、実施形態 11 の方法であって、TdT タンパク質に融合した Chrimson タンパク質は、Chrimson タンパク質単独に比べて光刺激への応答がより効果的である、方法を提供する。

【0046】

実施形態 13 は、実施形態 10 の方法であって、蛍光タンパク質は、所定細胞数に対する融合 Chrimson タンパク質の発現レベルを、Chrimson タンパク質単独の発現レベルに比べて増大させる、方法を提供する。 30

【0047】

実施形態 14 は、実施形態 13 の方法であって、融合 Chrimson タンパク質の発現レベルは、Chrimson タンパク質の向上した溶解度、トラフィッキング、および / またはタンパク質構造を通して増大する、方法を提供する。

【0048】

実施形態 15 は、実施形態 1 から 8 のいずれか 1 つの方法であって、ベクターはアデノ随伴ウィルス (AAV) ベクターである、方法を提供する。

【0049】

実施形態 16 は、実施形態 15 の方法であって、AAV ベクターは AAV2 ベクターおよび AAV2.7m8 ベクターから選択される、方法を提供する。 40

【0050】

実施形態 17 は、実施形態 16 の方法であって、AAV ベクターは AAV2.7m8 ベクターである、方法を提供する。

【0051】

実施形態 18 は、実施形態 1 から 8 のいずれか 1 つの方法であって、ベクターは CAG プロモーターを含む、方法を提供する。

【0052】

実施形態 19 は、実施形態 1 から 8 のいずれか 1 つの方法であって、ベクターは硝子体内に注射される、方法を提供する。 50

**【0053】**

実施形態20は、実施形態1から8のいずれか1つの方法であって、蛍光タンパク質に融合した有効量のChrimsonタンパク質は長期にわたって発現される、方法を提供する。

**【0054】**

実施形態21は、実施形態20の方法であって、蛍光タンパク質に融合したChrimsonタンパク質の発現は投与後少なくとも2カ月、または投与後少なくとも11カ月持続する、方法を提供する。

**【0055】**

実施形態22は、実施形態1から21のいずれか1つによるベクターの1つまたはそれ以上を備えた組成物を提供する。 10

**【0056】**

実施形態23は、1つまたはそれ以上のChrimsonタンパク質および1つまたはそれ以上の蛍光タンパク質を融合状態でまたは個別にコードする1つまたはそれ以上のボリヌクレオチドを備えた組成物を提供する。

**【0057】**

実施形態24は、請求項1から21のいずれかの方法の1つまたはそれ以上で使用するための請求項22および23のいずれか1つによる組成物を提供する。

**【0058】**

実施形態25は、哺乳類の網膜神経節細胞(RGC)を再活性化する、対象のニューロン介在障害を処置または防止する、内網膜細胞での光への感受性を回復させる、対象の網膜変性を処置または防止する、光受容体機能を回復させる、および/または電気的に活性の細胞を脱分極するための、請求項22および23の組成物のいずれか1つの使用を規定する。 20

**【図面の簡単な説明】****【0059】****【図1】rd1マウスでのインビボの方法**

【図2A-2D】変性rd1マウス網膜はChrimson Rスペクトル感度に一致する波長(wavelength)の光におよび10msより短い持続期間に応答する。図2A:注射後2カ月のChrR-tdT発現rd1マウスの眼底。図2B:MEAチップ上に載置したrd1マウス網膜のTdT蛍光。図2C:ChrR発現マウス網膜のスペクトル感度( $n=1$ 網膜、188個の電極)。図2D: $1e^{-7}$ 光子 $cm^{-2}s^{-1}$ 、590nm、増大持続期間の刺激に応答した追加発火率。すべての記録はL-AP4、CNQXおよびCCPの混合の存在下で行われる。 30

【図3A-3C】Chrimson Rはrd1マウスにおいてtdTと融合するとより効率的である。図3A:ChrRまたはChrR-tdTに感染した網膜間の比較は光刺激への応答においてより効果的であった。図3B:ChrR-tdT発現網膜の応答RGCの生データ、ラスタープロットおよび平均PSTH(それぞれ上から下へ)。図3C:ChrR( $n=4$ 網膜、27個の細胞)またはChrR-tdT( $n=6$ 網膜、548個の細胞)を発現する網膜の強度プロットであって、異なる刺激強度での活性化レベルを示す。 40

【図4A-4G】神経節細胞でのChrimson Rの発現。rd1マウスの網膜神経節細胞(RGC)でのChrR-tdTの発現。インビボでのAAV感染後のChrR-tdTの発現はRGCに大きく限定された。図4A、図4Bおよび図4C:RGCの2つの例での膜局在発現を示す共焦点スタックの投映像。図4A:内因性tdTomatoの画像、免疫学的增幅なし。図B:我々のカスタムメイドのChrR抗体に対する標識化の画像。図4C:両画像(図4Aおよび図4B)のオーバーレイ、tdTomatoおよびChrR抗体に対してそれぞれマジエンタおよびシアン。画像は40×対物レンズで撮影。ChrR-tdTの発現はRGC膜で濃縮される。図4Dおよび図4E:2つのRGC(図4Cの差し込み図参照)の細胞体を示す3つの光学スライスの投影像、60×対物レン 50

ズで撮影。図4Fおよび図4G：それぞれ図4Dおよび図4Eの細胞体に対する蛍光強度の3D表面プロット。最高蛍光強度を示すピークは細胞膜にまたはそれらの近くに集中する。

【図5A-5D】Chrimson Rの長期発現。注射後10カ月のrd1マウスの多電極アレイ記録。図5A：発現が注射後10カ月持続することを示すChrR-tdTの発現網膜の画像。図5B：1つの電極上で測定した活性の例、上 赤色での光刺激、中 フラッシュ10回の繰り返しに対する同じ細胞の応答のラスタープロット、下 平均PTS H（ピン寸法：50ms）。図5C：増大する強度のフラッシュに応答した追加発火率（n=4網膜、308個の電極）。図5D： $1\text{e}^{-7}$ 光子 $\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、590nm、増大持続期間のフラッシュに応答した追加発火率。すべての記録はL-AP4、CNQX 10およびCPPの混合の存在下で行われる。

【図6A-6B】Chrimson RはP23H網膜を活性化する。別の変性齶歯類モデル：P23Hラットについての多電極アレイ記録。図6A：注射後1カ月での多電極アレイ上のP23H網膜の蛍光画像。図6B： $1\text{e}^{-7}$ 光子 $\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、590nm、増大強度の刺激に応答した追加発火率（n=2網膜、91個の電極）。すべての記録はL-AP4、CNQXおよびCPPの混合の存在下で行われる。

【図7】非ヒト靈長類でのインビオの方法。非ヒト靈長類（macaca fasciculatus）でのChrRに対して4つの異なる戦略を試験した。2つの異なる構築物：Chrimson R（ChrR）または融合タンパク質Chrimson R-tdT-Tomato（ChrR-tdT）、共にCAGプロモーター下。2つの異なるウィルスカプシド：ワイルドタイプAAV2および突然変異体AAV2-7m8（Dalkaraら、2013、Science Translational Medicine、5(189)：189ra76）。単一用量のウィルス（ $5\times10^{11}$ vg/目）の注射をMEA（512アレイ、MCS）またはパッチクランプ（ポスターChaffiolら、アブストラクト599-B0072参照）記録の2カ月前に行った。すべての記録はシナプス遮断薬（LAP450μMおよびCPP10μM）の存在下で行った。

【図8A-8C】構築物のインビオ注射後、Chrimson Rを中心窓周辺で発現させる。構築物のインビオ注射が傍中心窓環のRGCでの発現に至る。図8A：網膜外植片の赤外線画像、アステリスクが中心窓ピットのくぼみを示す。黒色ドットはMEAアレイの電極である。図8B：AAV2-7m8-ChrR-tdT構築物に感染した同じ網膜片の蛍光画像。発現は傍中心窓環に制限される。図8C：図8A & 図8Bに表示した網膜外植片スペクトル感度。応答は10回の繰り返しにわたっておよびすべての応答電極にわたっての平均とした。スペクトルの形状およびシナプス遮断薬の存在は、RGCでのChrRが記録された活性の源であることを示す。

【図9A-9G】最も効率的な形質導入へと導くテスト構築物の同定。形質導入は応答電極数および光誘発応答の感度として評価される。図9A：4つの異なる強度での光フラッシュへの1つの電極の応答例。図9B：4つの構築物に対する実験一式の概観。活性電極：活動電位が検出される電極。応答電極：発火率が光刺激によって増大した電極。図9C、図9Dおよび図9E：様々な構築物に対しての各応答網膜に対する群集応答。各着色ラインは個々の電極応答を表し、10回の繰り返しにわたっての平均とした。グラフの各行は1つの網膜からの応答を表し、各列は同じ光刺激（光子/ $\text{cm}^2/\text{s}$ で上部での強度）への異なる網膜の応答を表す。図9F：異なる光強度での各応答網膜に対する平均追加発火率。自然発火率は差し引かれる。図9G：応答閾値をより良好に視覚する図Fの詳細図。すべての刺激は600nmで行われた。

【図10A-10D】AAV2-7m8-ChrR-tdTに感染した網膜での増大する持続期間の傍中心窓RGC刺激への応答。AAV2-7m8-ChrR-tdTに感染した網膜での増大する持続期間の刺激への傍中心窓RGCの応答。図10A：増大する持続期間の光刺激への応答、各ラインは刺激毎に10回の繰り返しにわたる単一電極スパイク密度関数の平均を表す。図10B：テストしたすべての期間に対する平均発火率。図10C：4つの異なる活性閾値に対する異なる刺激持続時間での活性部位の割合。図10D：第 50

1スパイクまでの時間、すべてのテスト持続時間に対する10回の刺激繰り返しにわたる平均。赤色ドットは中央値、四角形の各縁はデータの第25および75百分位数、そして髭部分は個々にプロットされた分離部分以外の残りの部分を示す。1から5ミリ秒間の刺激の中央値の重要な落下は、ほとんどの記録部位がこれらの持続期間の間に応答を始めることを示す。すべての刺激は $2 \times 10^{17}$ 光子 $\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の強度、600+/-20nmで提供した。

【図11】Chrimson R mRNAレベルでのtdTomatoの効果。RT-qPCR反応でのChrimson Rの増幅曲線。縦軸は実験反応に対応するデルタRn値マイナス基準信号のRn値を表す。このパラメータは所与セットのPCRプライマーから生成される特定の信号の大きさを確実に計算する。マジエンタおよび紫色のトレースはChrimson Rを表す；黄色およびオレンジ色のトレースはChrimson R-tdTomatoを表す；暗いおよび明るい青色のトレースは非トランسفェクト対照群である。実験は3回繰り返し、各実験は2プレートで行い、合計6回の繰り返しとした。各サンプルは各プレート上で3通りに行った。

【図12A-12B】HEK293細胞をpssAAV-CAG-Chrimson R-tdTomato、pssAAV-CAG-Chrimson RおよびpssAAV-CAG-Chrimson R-GFPプラスミドでトランسفェクトさせたときのChrimson Rタンパク質のレベル。

【図13】Chrimson Rを発現する細胞数に及ぼすtdTomatoの効果。Chrimson R陽性細胞の百分率は、非トランسفェクト対照群と比べた、プラスミド479(Chrimson R-tdTomato)および480(Chrimson R)でトランسفェクトさせた細胞を表す。蛍光細胞の百分率は、背景蛍光を除去するために閾値を用いることによって決定した。細胞数は細胞当たりの蛍光強度を示してはいないことに注意することが重要である。この細胞カウント法に基づくと、2つの構築物によるトランسفエクション後のChrimson R発現細胞の百分率間に統計学的に有意な相違はない。エラーバーは本実験内でのSEMを表し、実験は各条件に対して技術的2回反復で3回繰り返した。

【図14A-14B】HEK293T細胞でのChrimson Rの細胞内局在性に及ぼすtdTomatoの効果。トランسفェクトさせたHEK293T細胞の画像；共焦点zスタックの最大投影により得た。細胞核を青色(DAPI)で、またChrimson Rを白色で示す。図14AはChrimson R-tdTomatoの局在性を示す；図14BはChrimson R単独の分布を示す。スケールバー20μm。

【図15A-15B】AAV感染後のHEK293T細胞でのChrimson Rの細胞内局在性に及ぼすtdTomatoの効果。トランسفェクトされたHEK293T細胞の画像、共焦点zスタックの最大投影により得た。細胞核を青色(DAPI)で、またChrimson Rを白色で示す。図15AはChrimson R-tdTomatoの局在性を示す；図15BはChrimson R単独の分布を示す。スケールバー20μm。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0060】

本開示において、特に明記のない限り、単数の使用は複数を含み、語「a」または「an」は「少なくとも1つ」を意味し、「または」の使用は「および/または」を意味する。さらに、用語「含むこと(including)」は、「含む(includes)」および「含まれる(included)」などの他の形式と共に、制限がない。また、特に明記のない限り、「要素(element)」または「構成要素(component)」などの用語は、1単位を備える要素および構成要素と、1単位より多い単位を備える要素または構成要素との両方を包含する。

##### 【0061】

本明細書で用いられる百分率または他の数量と関連して用いるときの用語「約」は、その百分率または他の数量のプラスまたはマイナス10%を意味する。例えば、用語「約80%」は80%プラスまたはマイナス8%を包含することになる。

10

20

30

40

50

## 【0062】

特許、特許出願、記事、書籍、および論文を含むがこれらに限定されない本出願で言及するすべての文書または文書の一部は、それらの全体がいかなる目的に対しても本明細書において参照によって明示的に援用される。1つまたはそれ以上の援用文献および類似の資料が、ある用語を本出願でのその用語の定義に矛盾する方法で定義している場合は、本出願が優位となる。

## 【0063】

本明細書で用いる用語「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」は、そうではない指示がない限り、置き換え可能である。

## 【0064】

本明細書で用いられる用語「融合タンパク質」または「別物に融合したタンパク質」は、タンパク質構築物またはキメラタンパク質のことをいう。これは、追加の化学的リンカー無しにそれぞれのペプチド鎖内のペプチド結合を介して共有結合している2つまたはそれ以上のタンパク質またはその断片を含有する単一のタンパク質分子を意味する。1つのタンパク質はそのN末端またはC末端のいずれかで別のタンパク質に融合することができる。融合タンパク質はさらに遺伝的構造から得られるリンカー部分を備えることができる。

## 【0065】

本明細書で用いられ、他に指摘がない限り、用語「処置する(treat)」、「処置すること(treating)」、「処置(treatment)」および「治療(therapy)」は、患者が障害、例えばニューロン介在障害または眼疾患を患有ときに起こる、該障害の1つまたはそれ以上の徴候または結果の重症度を低減させる行為を意図する。本明細書で用いられ、他に指摘がない限り、用語「防止する(prevent)」、「防止すること(preventing)」および「防止(prevention)」は、患者が障害、例えばニューロン介在障害または眼疾患を悪い始める前に起こる、該障害の発現を遅らせ、および/または該障害の重症度を抑えるかまたは低減させる行為を意図する。処置は予防処置、または疾患または症状の診断に続いて施される処置であり得ることは理解されよう。本発明の処置は、障害、疾患、または症状の徴候または特性の低減または除去、または障害、疾患、または症状それ自体を除去し得る。本発明の処置は、障害、疾患、または症状の進行を低減または除去、および、場合によっては疾患、障害、または症状の緩解となり得ることは理解されよう。本発明のいくつかの実施形態では、本発明の1つまたはそれ以上の光活性化イオンチャネルポリペプチドは細胞集団内で発現され、障害または症状を処置する方法において使用され得る。

## 【0066】

本明細書で用いられ、他に特定されない限り、化合物の「治療上有効量」は、ニューロン介在障害または眼疾患の処置または管理において治療的有用性を提供するのに、または障害、例えばニューロン介在障害または眼疾患に関連する1つまたはそれ以上の徴候を遅らせるかまたは最小限にするのに十分な量である。ある化合物の治療上有効量は、その化合物の単独の、または障害、例えばニューロン介在障害または眼疾患の処置または管理において治療的有用性を提供する1つまたはそれ以上の治療および/または治療薬と組み合わせた化合物の量を意味する。用語「治療上有効量」は、ニューロン介在障害または眼疾患を緩和する、眼疾患を改善または低減する、治療全体を改善する、または別の治療薬の治療有効性を向上させる量を包含することができる。

## 【0067】

本明細書で用いられる「患者」または「対象」は、ヒトおよび非ヒト哺乳類、例えば齧歯類、マウス、ラット、非ヒト霊長類、犬および猫などのペット、ならびに例えば羊、牛、馬などの家畜類などであるがこれらに限定されない、本明細書で述べる障害を患っているまたは悪いやすい哺乳類有機体を含む。

## 【0068】

網膜ニューロンの、本発明のChrimsonポリペプチドをコードする核酸(例えばベクター)によるトランスフェクションは、網膜ニューロン、好ましくは双極細胞および

10

20

30

40

50

/または神経節細胞に感光性膜チャネルを提供する。従って、光刺激により、動物の視覚皮質、本明細書で企図される視覚形態を構成する視覚信号の処理を担う脳の領域への視覚刺激の伝達を測定することが可能である。このような視覚は通常のヒトの視覚の形態とは異なり得、光の感覚と呼ばれ、また「光検出」または「光感知」とも命名され得る。従つて、本明細書で用いられる用語「視覚」は、光を刺激として有用に検出する有機体の能力として定義される。「視覚」は以下のこと：(i)光検出または感知、すなわち光が存在するか否かを認識する能力；(ii)光投影、すなわち光刺激が来ている方向を認識する能力；(iii)分解能、すなわち格子または文字標的での異なる輝度レベル（すなわちコントラスト）を検出する能力；および(iv)認知、すなわち標的内の異なるコントラストレベルの参照によって視覚標的の形状を認知する能力を包含するよう企図される。従つて、「視覚」は、光、好ましくは赤色光、より好ましくは約365nmから約700nmの間、約530nmから約640nmの間の波長を有する光の存在を単に検出する能力を含み、いくつかの実施形態では、ピーク活性化は約590nmの波長を有する光と接触すると起こり得る。  
10

#### 【0069】

本明細書で用いられる「機能性誘導体」は、用語が本明細書において接続で用いられようと二者択一で用いられようと関係なく「突然変異体」、「変異体」および「断片」を包含する。好適な変異体は、單一アミノ酸同類置換変異体であるが、例えば2、3、4または5残基の同類置換もまた意図される。いくつかの実施形態では、機能性誘導体は、元のペプチドの全長アミノ酸配列に対して少なくとも70%の相同性、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%の相同性、より好ましくは少なくとも85%の相同性、より好ましくは少なくとも90%の相同性、より好ましくは少なくとも95%の相同性、より好ましくは少なくとも99%の相同性、より好ましくは100%の相同性を有する。相同率は関連するアミノ酸配列の長さに関して決定される。従つて、本発明のポリペプチドがより大きなポリペプチド内にある場合は、相同率は、本発明のポリペプチドに対応するポリペプチド部分のみに関して決定されるのであって、より大きなポリペプチド全体の相同率ではない。ポリペプチドに関する「相同率」は、Basic Local  
20

Alignment Search Tool (BLAST) エンジンを用いて整列させた少なくとも2つのポリペプチド配列間の同一のアミノ酸の百分率のことを行う。Tatusovら(1999)ibid参照。BLASTエンジンはNational Center for Biotechnology Information (NCBI)、Bethesda、Md.によって公開されている。特定の実施形態によれば、機能性誘導体は、元のポリペプチドの全長配列に対して少なくとも70%の相同性を有するアミノ酸配列を備えたポリペプチドであり、1つまたはそれ以上の位置での置換だけその親ポリペプチドと異なるのみである。該置換は好ましくは 同類置換 または セミ同類である。加えて、またはこれに代えて、機能性誘導体は、元のポリペプチドの全長アミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも75%の同一性、より好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも85%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、より好ましくは少なくとも99%の同一性、より好ましくは100%の同一性を有する。同一性または相同性を決定する方法は当該分野で既知である。  
30

#### 【0070】

本明細書で用いられる用語「同類置換」は一般にタンパク質またはポリペプチドの構造および機能特性を維持するアミノ酸置換のことをいう。このような機能的に等価の（同類置換）ペプチドアミノ酸配列は、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でのアミノ酸残基の追加または置換を含むがこれらに限定されず、これらはサイレント変化となり、かくして機能的に等価の遺伝子産物を产生する。同類アミノ酸置換は、極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および/または側鎖残基の両親媒性の類似性に基づいてなされ得る。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸はアラニン、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、およびメチオニンを含む；極性  
40

中性アミノ酸はグリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンを含む；正電荷を持つ（塩基性）アミノ酸はアルギニン、リジン、およびヒスチジンを含む；そして負電荷を持つ（酸性）アミノ酸はアスパラギン酸およびグルタミン酸を含む。

【0071】

いくつかの局面において本発明は、1つまたはそれ以上の光パルスとの接触によって活性化させることができる光活性化イオンチャネルポリペプチドの細胞での発現であって、細胞の強い脱分極をもたらす発現に関する。本発明の光活性化チャネルポリペプチド、本明細書においては光活性化イオンチャネルともいうが、特定の細胞、組織、および／または有機体にて発現させ、適切な波長の光パルスに応答してインビボ、生体外、およびインピトロで細胞を制御するために用いることができる。10

【0072】

本明細書で用いられる用語「イオンチャネル」は孔を形成する膜貫通ポリペプチドを意味し、孔は活性化されると開き、膜にわたる孔を通るイオン伝導を可能にする。

【0073】

本発明によれば、光活性化イオンチャネルポリペプチドは、Chrimsonタンパク質またはその機能性誘導体および蛍光タンパク質を備える。

【0074】

本発明によれば、光活性化イオンチャネルポリペプチドは、蛍光タンパク質に融合したChrimsonタンパク質またはその機能性誘導体を備える。20

【0075】

特定の実施形態によれば、該Chrimsonタンパク質は、タンパク質CHR88（本明細書ではChrimson88、配列番号1ともいう）またはその機能性誘導体、およびK176R置換Chrimson88タンパク質（本明細書ではK176R置換を持つChrimson88またはChrimsonR、配列番号2ともいう）よりなる群から選択される。

【0076】

本発明によれば、光活性化イオンチャネルポリペプチドは、(i)タンパク質CHR88（配列番号1）またはその機能性誘導体、および(ii)蛍光タンパク質を備える。

【0077】

好適な実施形態によれば、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドは、(i)タンパク質ChrimsonR（配列番号2）またはその機能性誘導体、および(ii)蛍光タンパク質を備える。30

【0078】

特定の実施形態によれば、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドは、タンパク質CHR88（配列番号1）またはその機能性誘導体および蛍光タンパク質よりなり、両タンパク質は独立したタンパク質として発現される。

【0079】

別の実施形態によれば、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドは、タンパク質ChrimsonR（配列番号2）またはその機能性誘導体および蛍光タンパク質よりなり、両タンパク質は独立したタンパク質として発現される。40

【0080】

好適な実施形態によれば、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドは、蛍光タンパク質に融合したタンパク質CHR88（配列番号1）またはその機能性誘導体よりなる。

【0081】

より好適な実施形態によれば、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドは、蛍光タンパク質に融合したタンパク質ChrimsonR（配列番号2）またはその機能性誘導体よりなる。

【0082】

10

20

30

40

50

本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドは赤色光、好ましくは約365 nmから約700 nmの間、約530 nmから約640 nmの間の波長を有する光との接触によって強く活性化され、いくつかの実施形態では、ピーク活性は約590 nmの波長を有する光と接触すると起こり得る。

#### 【0083】

本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドを含む興奮性細胞を活性波長領域の光と接觸させることで細胞を強力に脱分極する。本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドを発現する細胞を脱分極するために用いられ得る光の波長の例としては、少なくとも約365 nm、385 nm、405 nm、425 nm、445 nm、465 nm、485 nm、505 nm、525 nm、545 nm、565 nm、585 nm、590 nm、605 nm、625 nm、645 nm、665 nm、685 nm、および700 nmの波長を含み、これらの間のすべての波長を含む。いくつかの実施形態では、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドは590 nmにピーク波長感度を有し、660 nmまでスパイクを引き出し得る。10

#### 【0084】

本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドは、本発明の1つまたはそれ以上の光活性化イオンチャネルポリペプチドが発現される興奮性細胞を脱分極するために用いることができる。いくつかの実施形態では、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドは、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドを活性化しない光の波長によって活性化される光活性化イオンチャネルを発現する1つまたはそれ以上の追加の細胞サブ集団もまた含む細胞集団における細胞サブ集団において発現させることができる。20

#### 【0085】

様々な実施形態において用いることができるペプチドアミノ酸配列は、本明細書で述べる光活性化イオンチャネルポリペプチド（配列番号1または2または5）ならびに機能的に等価のポリペプチドを含む。

#### 【0086】

このような機能的に等価のペプチドアミノ酸配列（同類置換）は、本発明のアミノ酸配列内のアミノ酸残基の追加または置換を含むがこれらに限定されず、これらはサイレント変化となり、このようにして機能的に等価のポリペプチドを産生する。アミノ酸置換は、極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および／または関与残基の両親媒性の類似性に基づいてなされ得る。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸はアラニン、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、およびメチオニンを含む；極性中性アミノ酸はグリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンを含む；正電荷を持つ（塩基性）アミノ酸はアルギニン、リジン、およびヒスチジンを含む；そして負電荷を持つ（酸性）アミノ酸はアスパラギン酸およびグルタミン酸を含む。もしくは同類アミノ酸置換はアミノ酸のハイドロパシー指標（hydrophilicity index）に基づいて行ってもよい。各アミノ酸はその疎水性および電荷特性に基づいてハイドロパシー指標が割り当てられる。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）；トレオニン（-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）；グルタミン酸塩（-3.5）；グルタミン（-3.5）；アスパラギン酸塩（-3.5）；アスパラギン（-3.5）；リジン（-3.9）；およびアルギニン（-4.5）である。タンパク質についての相互的生物学的機能を参照する場合にハイドロパシーアミノ酸指標を用いることは当該分野において了解されている（KyteおよびDoolittle、J. Mol. Biol. 157: 105-132, 1982）。いくつかの例では、いくつかのアミノ酸は、類似のハイドロパシー指標またはスコアを有する他のアミノ酸に置換され依然として類似の生物学的活性を保持し得ることが知られている。ハイドロパシー指標に基づいて変更を行う場合、いくつかの実施形態では、ハイドロパシー指304050

標が±2以内であるアミノ酸の置換が含まれ、一方他の実施形態では、±1以内のアミノ酸置換が含まれ、またさらに別の実施形態では、±0.5以内のアミノ酸置換が含まれる。

### 【0087】

もしくは同類アミノ酸置換は親水性に基づいてなされ得、特に生物学的機能タンパク質またはそれによって作成されたペプチドを免疫学的実施形態で使用することが意図される。いくつかの実施形態では、隣接するアミノ酸の親水性によって決定されるタンパク質の最大局所平均親水性はその免疫原性および抗原性、すなわちタンパク質の生物学的特性と相互に関連する。以下の親水性値はこれらのアミノ酸残基に割り当てられている：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)；トレオニン(-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)；およびトリプトファン(-3.4)。類似の親水性値に基づいて変更を行う場合、いくつかの実施形態では、親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が含まれ、いくつかの実施形態では、±1以内のものが含まれ、そしていくつかの実施形態では、±0.5以内のものが含まれる。

### 【0088】

1つの好適な実施形態によれば、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドはChrimsonポリペプチド（例えばタンパク質ChR88またはその機能性誘導体、またはタンパク質ChrimsonRまたはその機能性誘導体）と蛍光タンパク質との間の融合タンパク質である。ポリペプチドまたはペプチド、またはペプチドの切断形または突然変異形が非関連タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドに融合される融合タンパク質の使用は、本明細書で述べる核酸および/またはアミノ酸配列をコードする所望のペプチドに基づいて設計することができる。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、発現されている融合タンパク質に選択的に結合する抗体を利用することによって容易に精製され得る。

### 【0089】

一般に、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドが機能するのに必要なレチナールまたはレチナール誘導体は、該チャネルポリペプチドでトランスフェクトさせることになる細胞によって產生される。しかし、本発明によれば、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドと、例えば3,4-デヒドロレチナール、13-エチルレチナール、9-dm-レチナール、3-ヒドロキシレチナール、4-ヒドロキシレチナール、ナフチルレチナール；3,7,11-トリメチル-ドデカ-2,4,6,8,10-ペンタエナール；3,7-ジメチル-デカ-2,4,6,8-テトラエナール；3,7-ジメチル-オクタ-2,4,6-トリエナール、ならびに6-7-または8-9-または10-11回転プロックレチナールなどのレチナールまたはレチナール誘導体とを備えたチャネルロドブシンがさらに開示される（WO 03084994）。

### 【0090】

上述の所望のペプチドアミノ酸配列は化学的に合成することができるが（例えば“Proteins: Structures and Molecular Principles”（Creightonら、W.H. Freeman & Company、New York、N.Y.、1984）参照）、大きなポリペプチド配列は、所望のペプチドをコードする核酸配列を含有する核酸を発現するための当該分野で周知の技術を用いて組み換えDNA技術によって有利に產生され得る。このような方法は、ペプチドをコードするヌクレオチド配列および適切な転写および翻訳制御信号を含有する発現ベクターを構築するために用いることができる。これらの方法は、例えば、インビトロ組み換えDNA技法、合成的技法、およびインビオ遺伝子組み換えを含む（例えば“Molecular Cloning, A Laboratory Manual”、上記参照）。もしくは、所望

10

20

30

40

50

のペプチドをコードするヌクレオチド配列をコードするRNAおよび／またはDNAは、例えば合成器を用いて化学的に合成され得る（例えば“Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach”（Gait編、IRL Press、Oxford, 英国、1984）参照）。

#### 【0091】

様々な実施形態で用いることができるペプチドアミノ酸配列は、本明細書で述べる光活性化イオンチャネルポリペプチド（配列番号1または2、5または6）、および機能的に等価のペプチドおよびその機能的誘導体ならびにそれらの機能性断片を含む。実際にいて、いくつかの実施形態では、特別なヌクレオチド配列によってコードされるいかなる所望のペプチドアミノ酸配列も用いることができ、所望のペプチドアミノ酸配列のすべてまたはいかなる部分でもコードするあらゆるポリペプチド配列の使用である。遺伝暗号の退化性はよく知られており、よって各光活性化チャネルポリペプチド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「トリプレット」コドン、または多くの場合にはコドンを遺伝的に代表する。よって、本明細書で企図されるように、本明細書で述べるチャネルロードシンペプチドアミノ酸配列は、遺伝暗号によりひとまとめに考えると（例えば“Molecular Cell Biology”、表4-1、109頁（Darnellら編、W.H.Freeman & Company、New York, NY、1986）、このようなアミノ酸配列をコードすることができる核酸配列のすべての様々な置換および組み合わせを遺伝的に代表する。

#### 【0092】

いくつかの実施形態は、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を備えた単離核酸分子である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は（i）タンパク質ChR88（配列番号1）またはその機能性誘導体、および（ii）蛍光タンパク質を含むポリペプチドをコードする。別の実施形態では、ヌクレオチド配列は、（i）タンパク質ChrimsonR（配列番号2）またはその機能性誘導体、および（ii）蛍光タンパク質を含むポリペプチドをコードする。

#### 【0093】

1つの特別な実施形態によれば、ヌクレオチド配列は、蛍光タンパク質に融合したタンパク質ChR88（配列番号1）またはその機能性誘導体を含むポリペプチドをコードする。好適な実施形態によれば、ヌクレオチド配列は、蛍光タンパク質に融合したタンパク質ChrimsonR（配列番号2）またはその機能性誘導体を含むポリペプチドをコードする。

#### 【0094】

いくつかの特別な実施形態によれば、本発明の蛍光タンパク質はtdTomato（tdT）蛍光タンパク質および緑色蛍光タンパク質（GFP）から選択される。

#### 【0095】

TdTomatoは鮮赤色蛍光タンパク質である（tdTomatoの励起ピーク554nm、発光波長ピーク581nm）（Shaner NCら、Nat Biotech no 1, 22, 1567-1572, 2004）。本発明によるtdTomatoをコードするゲノム配列は、合成構築物タンデムダイマー赤色蛍光タンパク質遺伝子、完全cds（GenBank登録番号AY678269）と少なくとも84%の同一性を示す。好適な実施形態によれば、本発明のコードされたtdTomatoタンパク質部分は、配列番号3のアミノ酸配列と同一のアミノ酸の約70%から約75%の間、より好ましくは約75%から約80%の間、より好ましくは約80%から約90%の間、さらにより好ましくは約90%から約99%の間のポリペプチドである。

#### 【0096】

他の実施形態では、本発明は、配列番号5のアミノ酸配列またはその断片と同一のアミノ酸の約70%から約75%の間、より好ましくは約75%から約80%の間、より好ましくは約80%から約90%の間、さらにより好ましくは約90%から約99%の間のポリペプチドをコードする単離核酸を提供する。

10

20

30

40

50

## 【0097】

本発明の核酸は、1つまたはそれ以上の信号配列（例えばエンハンサー、ポリアデニル化信号、追加の制限酵素部位、多重クローニング部位）および／またはプロモーター配列または他のコーディングセグメントまたはそれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない追加の配列を含み得る。プロモーターは誘導的または構造的な一般的なまたは細胞特異的なプロモーターであり得る。細胞特異的プロモーターの例としては、双極細胞のmG1u6プロモーターがある。いくつかの実施形態は開示した方法のいずれかであり、プロモーターは構造的プロモーターである。いくつかの実施形態は開示した方法のいずれかであり、構造的プロモーターはCMVプロモーターまたはCAGプロモーターを含むがこれらに限定されない（CAGプロモーターは、チキンベータアクチンプロモーター（CBA）およびSV40イントロン挿入に融合したハイブリッドサイトメガロウイルス（CMV）前初期エンハンサーである；Allexopoulosら、BMC Cell Biol. 2008; 9: 2; 配列番号8）。いくつかの実施形態は開示した方法のいずれかであり、プロモーターは誘導的および／または細胞特異的プロモーターを含むがこれらに限定されない。プロモーター、ベクター、エンハンサー、ポリアデニル化部位の選択は当業者には型通りの設計事項である。これら要素は文献に適切に記載されておりまた市販されている。

## 【0098】

いくつかの実施形態では、本発明は、タンパク質またはペプチドであって、そのアミノ酸配列内に本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドまたはその機能的部分または変異体、同定されたもの（例えば配列番号5）など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核酸セグメントおよび組み換えベクターに関する。

## 【0099】

いくつかの実施形態では、本発明は、アミノ酸配列、配列番号6または配列番号7を含む単離核酸セグメントおよび組み換えベクターに関する。

## 【0100】

いくつかの実施形態は、(i)配列番号1または配列番号2のアミノ酸を(ii)配列番号3または配列番号4と共にコードするヌクレオチド配列を備えた組み換え核酸である。

## 【0101】

いくつかの好適な実施形態は、配列番号5のアミノ酸またはその断片をコードするヌクレオチド配列を備えた組み換え核酸である。

## 【0102】

いくつかの好適な実施形態は、ヌクレオチド配列、配列番号6または配列番号7を備えた組み換え核酸である。

## 【0103】

いくつかの実施形態は、異種プロモーターに操作可能に連結した(i)配列番号1または配列番号2のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列、および(ii)異種プロモーターに操作可能に連結した配列番号3または配列番号4のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を備えた組み換え核酸である。

## 【0104】

いくつかの好適な実施形態は、異種プロモーターに操作可能に連結した配列番号5のアミノ酸またはその断片をコードするヌクレオチド配列を備えた組み換え核酸である。

## 【0105】

いくつかの好適な実施形態は、異種プロモーターに操作可能に連結したヌクレオチド配列、配列番号6または配列番号7を備えた組み換え核酸である。

## 【0106】

いくつかの好適な実施形態は、CAG異種プロモーター（配列番号8）に操作可能に連結したヌクレオチド配列、配列番号6または配列番号7を備えた組み換え核酸である。

## 【0107】

10

20

30

40

50

別の局面によれば、本発明は、上記の光活性化イオンチャネルポリペプチドのいずれかをコードする核酸配列を含む核酸発現ベクターに関する。

#### 【0108】

本明細書で用いられる用語「核酸発現ベクター」は、操作可能に連結している別の核酸を異なる遺伝的環境間で輸送することができる核酸分子のことをいう。用語「ベクター」はまた核酸分子を輸送することができるウィルスまたは有機体のことをいう。ベクターの1つのタイプはエピソーム、すなわち過剰染色体複製が可能な核酸分子である。いくつかの有用なベクターは、連結される核酸の自律複製および/または発現が可能なものである。操作可能に連結される遺伝子の発現を指示することが可能なベクターを本明細書では「発現ベクター」という。発現ベクターおよびそれらの使用法は当該分野では周知である。10  
適切な発現ベクターおよびそれらの使用法の非限定な例は本明細書で提示される。好適な実施形態では、ベクターは遺伝子治療、より詳しくはウィルス介在遺伝子導入に適している。遺伝子治療に適したウィルスの例としては、レトロウィルス、アデノウィルス、アデノ随伴ウィルス(AAV)、レンチウィルス、ポックスウィルス(例えばMVA)、アルファウィルス、ヘルペスウィルスがある。しかし、遺伝子治療はさらに、裸のDNA、核酸に関連したリポソームの使用など非ウィルスの方法も包含する。本発明のいくつかの方法で有用なベクターは、光活性化イオンチャネルポリペプチドを分裂細胞および非分裂細胞へと遺伝学的に挿入することができ、また光活性化イオンチャネルポリペプチドをインビオ、インビトロまたは生体外細胞である細胞に挿入することができる。

#### 【0109】

いくつかの実施形態では、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドのための遺伝子を含む核酸発現ベクターはAAVウィルスベクターの間で選択される。好適な実施形態によれば、該AAVウィルスベクターはAAV2、より好ましくはAAV2-7m8ウィルスベクターである(WO2012/145601)。20

#### 【0110】

本発明のいくつかの局面は、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドを用いて、細胞、組織、または対象の障害または症状を処置する方法を含む。本発明の処置法は、障害を処置するために、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドの治療上有効量をこのような処置が必要な対象に投与することを含み得る。

#### 【0111】

本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドの投与は、少なくとも1つの本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドの有効量を含む医薬組成物の投与を含み得る。本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドの投与は、細胞を含む医薬組成物の投与を含み得、細胞は本発明の光活性化イオンチャネルを発現する。本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドの投与は、ベクターを含む医薬組成物の有効量の投与を含み得、ベクターは本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドをコードする核酸配列を備え、ベクターの投与は、対象の細胞での光活性化イオンチャネルポリペプチドの発現をもたらす。

#### 【0112】

いくつかの実施形態では、ニューロン介在障害を処置または防止する方法であって、(a)標的細胞に、該標的細胞で発現可能な本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチド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、該ベクターはプロモーター配列に操作可能に連結された本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームと、オプションとして転写制御配列とを備えた、送達すること、および(b)該標的細胞に該ベクターを発現させることを包含し、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは露光されると該標的細胞を活性化させる方法である。40

#### 【0113】

いくつかの実施形態では、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは、蛍光タンパク質に融合したタンパク質ChR88(配列番号1)またはその機能性誘導体による。

#### 【0114】

10

20

30

40

50

好適な実施形態によれば、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは、蛍光タンパク質に融合した C h r i m s o n R (配列番号 2 ) またはその機能性誘導体よりなる。

【 0 1 1 5 】

好適な実施形態では、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは、 t d T o m a t o ( t d T ) 蛍光タンパク質または緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) よりなる群から選択される蛍光タンパク質に融合したタンパク質 C h R 8 8 (配列番号 1 ) またはその機能性誘導体よりなる。

【 0 1 1 6 】

好適な実施形態によれば、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは、 t d T o m a t o ( t d T ) 蛍光タンパク質 (配列番号 3 ) または緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) (配列番号 4 ) よりなる群から選択される蛍光タンパク質に融合したタンパク質 C h r i m s o n R (配列番号 2 ) またはその機能性誘導体よりなる。

【 0 1 1 7 】

本明細書で用いられ、他に指摘がない限り、本方法および組成物が用いられ得る原因である用語、ニューロン介在障害は、とりわけ神経機能不全、脳の障害、中枢神経系、末梢神経系、神経学的症状、記憶および学習障害、心不整脈、パーキンソン病、眼障害、耳障害、脊髄損傷を含むがこれらに限定されない。

【 0 1 1 8 】

本明細書で用いられ、他に指摘がない限り、本方法および組成物が用いられ得る原因である用語、眼障害は、眼の前部および後部の両方に影響を及ぼす発生異常を含むがこれらに限定されない。前部障害は、緑内障、白内障、角膜ジストロフィー、円錐角膜を含むがこれらに限定されない。後部障害は、光受容体変性、不全、損失および / または死滅により生じる失明障害を含むがこれらに限定されない。網膜障害は、網膜色素変性 ( R P ) 、黄斑変性 ( M D ) 、先天性停止性夜盲、加齢黄斑変性および先天性錐体ジストロフィーを含む。

【 0 1 1 9 】

本発明のいくつかの実施形態による標的細胞は、興奮性細胞または非興奮性細胞であり得る。好ましくは、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドが発現し本発明の方法で用いられ得る細胞である。これは原核細胞および真核細胞を含む。標的細胞は哺乳類の細胞を含むがこれに限定されない。本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドが発現し得る細胞の例としては興奮性細胞があり、これは電気信号を作成しこれに応答することができる細胞を含む。

【 0 1 2 0 】

本発明による標的細胞の非制限の例としては、神経細胞 (ニューロン) 、神経系細胞、心臓細胞、循環系細胞、視覚系細胞、聴覚系細胞、分泌細胞 (膵臓細胞、副腎臓質細胞、下垂体細胞など) 、内分泌細胞、または筋細胞を含む。いくつかの実施形態では、本発明に関連して用いられる標的細胞は、疾患、障害または異常症状を持つと知られていない健全な正常細胞であり得る。いくつかの実施形態では、本発明の方法およびチャネルに関連して用いられる標的細胞は、異常細胞、例えば、変性細胞、神経系病原菌を持った細胞、疾患または症状の細胞モデル、損傷細胞などを含むがこれらに限定されない、障害、疾患、または症状を有すると診断された細胞であり得る。本発明のいくつかの実施形態では、細胞は対照細胞であり得る。

【 0 1 2 1 】

1つの特別な実施形態によれば、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドは、培養物からの細胞、溶液中の細胞、対象から得られる細胞、および / または対象内の細胞 (インビオ細胞) で発現され得る。光活性化イオンチャネルは培養細胞、培養組織 (例えば脳切片調合液など) および生体対象などで発現および活性化され得る。

【 0 1 2 2 】

好適な実施形態では、標的細胞は哺乳類細胞であり電気的興奮性細胞である。好ましくは、これは光受容細胞、網膜桿状体細胞、網膜錐体細胞、網膜神経節細胞 ( R G C ) 、ア

10

20

30

40

50

マクリン細胞、双極（*b i p o r a l*）ニューロン、神経節細胞、らせん神経節細胞（*S G N*）、蝸牛神経核ニューロン、多極ニューロン、顆粒細胞、ニューロン、または海馬細胞である。

【0123】

いくつかの実施形態は網膜に光感受性を回復させる方法であって、（a）標的網膜ニューロンに、該標的網膜ニューロンで発現可能な本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチド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、該ベクターはプロモーター配列に操作可能に連結された本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームと、オプションとして転写制御配列とを含む、送達すること、および（b）該標的網膜ニューロンに該ベクターを発現させることを包含し、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは該網膜ニューロンを感光性にし、これにより該網膜またはその一部に光感受性を回復させる方法である。10

【0124】

1つの実施形態は網膜に光感受性を回復させる方法であり、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは、蛍光タンパク質に融合したタンパク質*C h R 8 8*（配列番号1）またはその機能性誘導体よりなる方法である。

【0125】

1つの好適な実施形態は網膜に光感受性を回復させる方法であり、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは、蛍光タンパク質に融合した*C h r i m s o n R*（配列番号2）またはその機能性誘導体よりなる方法である。20

【0126】

1つの好適な実施形態は網膜に光感受性を回復させる方法であり、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは、*t d T o m a t o*（*t d T*）蛍光タンパク質または緑色蛍光タンパク質（*G F P*）よりなる群から選択される蛍光タンパク質に融合したタンパク質*C h R 8 8*（配列番号1）またはその機能性誘導体よりなる方法である。

【0127】

1つの好適な実施形態は網膜に光感受性を回復させる方法であり、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは、*t d T o m a t o*（*t d T*）蛍光タンパク質（配列番号3）または緑色蛍光タンパク質（*G F P*）（配列番号4）よりなる群から選択される蛍光タンパク質に融合した*C h r i m s o n R*（配列番号2）またはその機能性誘導体よりなる方法である。30

【0128】

いくつかの実施形態は、網膜光受容細胞が変性しつつあるかまたは変性し死滅している視覚損失または失明に悩む対象の網膜に感光性を回復させる方法であって、（a）標的網膜ニューロンに、該標的網膜ニューロンで発現可能な本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチド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、該ベクターはプロモーター配列に操作可能に連結された本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームと、オプションとして転写制御配列とを含む、送達すること、および（b）該標的網膜ニューロンに該ベクターを発現させることを包含し、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは該網膜ニューロンを感光性にし、これにより該網膜またはその一部に光感受性を回復させる方法である。40

【0129】

いくつかの実施形態は、網膜光受容細胞が変性しつつあるかまたは変性し死滅している視覚損失または失明に悩む対象の網膜に感光性を回復させる方法であって、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは、蛍光タンパク質に融合したタンパク質*C h R 8 8*（配列番号1）またはその機能性誘導体よりなる方法である。

【0130】

いくつかの実施形態は、網膜光受容細胞が変性しつつあるかまたは変性し死滅している視覚損失または失明に悩む対象の網膜に感光性を回復させる方法であって、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは、蛍光タンパク質に融合した*C h r i m s o n R*（配50

列番号 2 ) またはその機能性誘導体よりなる方法である。

**【 0 1 3 1 】**

いくつかの好適な実施形態は、網膜光受容細胞が変性しつつあるかまたは変性し死滅している視覚損失または失明に悩む対象の網膜に感光性を回復させる方法であって、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは、 t d T o m a t o ( t d T ) 蛍光タンパク質または緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) よりなる群から選択される蛍光タンパク質に融合したタンパク質 C h R 8 8 ( 配列番号 1 ) またはその機能性誘導体よりなる方法である。

**【 0 1 3 2 】**

いくつかの好適な実施形態は、網膜光受容細胞が変性しつつあるかまたは変性し死滅している視覚損失または失明に悩む対象の網膜に感光性を回復させる方法であって、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは、 t d T o m a t o ( t d T ) 蛍光タンパク質 ( 配列番号 3 ) または緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) ( 配列番号 4 ) よりなる群から選択される蛍光タンパク質に融合した C h r i m s o n R ( 配列番号 2 ) またはその機能性誘導体よりなる方法である。

**【 0 1 3 3 】**

いくつかの実施形態では、神経障害を処置する、または網膜に光感受性を回復させる、または網膜光受容細胞が変性しつつあるかまたは変性し死滅している視覚損失または失明に悩む対象の網膜に光感受性を回復させる方法における標的細胞ニューロンは網膜ニューロンである。

**【 0 1 3 4 】**

いくつかの実施形態は開示した方法のいずれかであり、配列番号 5 のすべてまたは一部のアミノ酸配列を有する発現した光活性化イオンチャネルポリペプチド、またはコードした光活性化イオンチャネルポリペプチドの生物学的活性を保持するその生物学的活性断片または配列番号 5 の生物学的に活性の同類アミノ酸置換変異体またはその断片である。

**【 0 1 3 5 】**

いくつかの実施形態は開示した方法のいずれかであり、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは核酸配列、配列番号 6 によってコードされる。

**【 0 1 3 6 】**

本発明の別の局面は、非侵襲性経頭蓋および / または経硬膜刺激を行って神経回路を調節するために赤外線 ( 6 6 0 n m ) を使用することである。

**【 0 1 3 7 】**

本発明のいくつかの局面の実用動作を、興奮性細胞に本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドを遺伝的に発現させ、細胞を適切な波長の光で照射し、そして光に応答した細胞の急速な脱分極および光の停止時の脱分極からの急速な解除を示すことによって提示した。特定の実現例によっては、本発明の方法はインビボ、生体外、およびインビトロでの細胞機能の光制御が可能である。

**【 0 1 3 8 】**

本発明の方法の非制限の例において、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドおよびその誘導体は、いかなる種類の化学補助物の必要なく、また通常の細胞環境条件およびイオン濃度において哺乳類細胞にて使用される。

**【 0 1 3 9 】**

本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドは、いかなる種類の化学補助物の必要なく、また通常の細胞環境条件およびイオン濃度において哺乳類細胞での発現および使用に適切であることが分かっている。本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドは、 3 6 5 n m から 7 0 0 n m の範囲の光の波長で活性化、 5 3 0 n m から 6 4 0 n m の範囲の光で最適な活性化、また 5 9 0 n m の波長で最適なピーク活性化を行うことが分かっている。

**【 0 1 4 0 】**

光活性化イオンチャネルポリペプチドまたは核酸発現ベクターの有効量は、細胞、組織または対象での光活性化イオンチャネルのレベルを対象にとって有益なレベルへと上げる

10

20

30

40

50

量である。有効量はまた、投与後の兆候の減少など、細胞または対象に及ぼす投与の生理学的效果を評価することによって決定され得る。他のアッセイは当業者には既知であり、処置への応答レベルを測定するために用いられ得る。処置の量は、例えば、投与した光活性化イオンチャネルポリペプチドまたは核酸発現ベクターの量を増減させることによって、光活性化イオンチャネルポリペプチドまたは核酸発現ベクターが投与される治療上の組成を変えることによって、投与経路を変えることによって、投与時間を変えることによって、本発明の光活性化イオンチャネルの活性化量およびパラメータを変えることによってなどにより変更させ得る。有効量は処置される特定の症状、処置される対象の年齢および健康状態、症状の重症度、処置の持続期間、併用療法（あれば）の性質、投与の特定経路、および医療従事者の知識および専門知識内での類似の要因により変動するであろう。10 例えれば、有効量は、光活性化イオンチャネルポリペプチドを発現させることになる対象での細胞の位置および数に依存し得る。有効量はまた、処置される組織の位置にも依存し得る。これらの要因は当業者であれば周知であり、単なる日常の実験で対処することができる。光活性化イオンチャネルポリペプチドのレベルを上げる、および／または対象での光活性化イオンチャネルポリペプチド（単独でまたは他の治療薬との組み合わせで）の活性化の長さまたはタイミングを変えるための最大用量の組成物を使用する、すなわち健全な医療判断による最も高い安全用量または量を使用することが一般に好適である。しかし、患者は医療的な理由、心理的な理由または実質的にいかなる他の理由によりもっと低い用量または許容可能用量を主張するかもしれないことは当業者には理解されよう。

#### 【0141】

本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチド（例えば t d T または G F P と融合した C h R 8 8 または C h r i m s o n R またはその誘導体）は、当該分野で既知の方法を用いて投与され得る。いくつかの実施形態では、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドをコードする核酸が対象に投与され、いくつかの実施形態では、光活性化イオンチャネルポリペプチドが対象に投与される。投与の方法および用量は、特に合併症の場合は、個々の医師または獣医により調整され得る。投与絶対量は、投与用に選択された材料、投与が単一用量か複数用量かどうか、および年齢、健康状態、大きさ、重量、疾患または症状の段階を含む個々の対象パラメータを含む様々な要因に依存することになる。これらの要因は当業者には周知であり、単なる日常の実験で対処することができる。20

#### 【0142】

本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドまたは核酸発現ベクターを送達する医薬組成物は単独で、互いに組み合わせて、および／または他の薬物治療とのまたは対象に投与される他の処置法との組み合わせで投与され得る。上記の方法で使用される医薬組成物は好ましくは、光活性化イオンチャネルポリペプチドのレベルを対象への投与に適切な重量または体積単位で所望の応答を生むレベルへと上げる有効量の治療化合物を含む。30

#### 【0143】

対象の細胞での光活性化イオンチャネルポリペプチドのレベルを上げるために対象に投与される医薬組成物の用量は、様々なパラメータに従って、特に使用する投与モードおよび対象の状態に従って選択することができる。他の要因としては所望の処置期間が含まれる。対象での応答が適用した初期用量で不十分である場合は、より高用量（または異なるより局所的な送達経路による効果的な高用量）を、患者の忍耐が許す範囲で採用し得る。対象に投与された本発明の光活性化イオンチャネルの活性化の量およびタイミング（例えば光波長、露光の長さなど）もまた、特定の対象での処置の有効性に基づいて調整することができる。対象に投与された光活性化イオンチャネルの照射および活性化のためのパラメータは、当該分野で既知の方法を用いてまた過度の実験を必要とせず決定することができる。40

#### 【0144】

対象の所望の細胞、組織または生体領域での本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドのレベルを上げるために医薬組成物を効果的に送達するために用いることができる様々な投与モードは当業者には既知であろう。このような組成物または本発明の他の医薬化合50

物を投与する方法は、局所性、静脈内、経口、腔内、髄腔内、滑液囊内、口腔内、舌下、鼻腔内、経皮、硝子体内、網膜下、皮下、筋肉内および皮内投与であり得る。本発明は本明細書に開示する特定の投与モードによって制限されない。当該分野で標準的な参考文献（例えば Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、1990）は、医薬担体での様々な医薬製剤および処方の送達のための投与および処方のモードを提供する。用量、投与スケジュール、投与部位、投与モード（例えば臓器内）などが本明細書に提示したものとは異なる、本発明の治療化合物の投与に有用な他のプロトコルは当業者には既知であろう。

#### 【0145】

ヒト以外の哺乳類での光活性化イオンチャネルポリペプチドレベルを上げるために細胞またはベクターの投与；および例えば試験目的または獣医学治療目的のための本発明の光活性化イオンチャネルの投与および使用は、上述の条件と実質的に同じ条件の下で実行される。本発明はヒトおよび動物の両方に適用可能であることは当業者には理解されよう。従って、本発明は、ヒトの治療と同様、畜産用および獣医用医薬で使用されるよう意図される。

10

#### 【0146】

本発明のいくつかの局面では、本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドを用いる処置の方法は、神経細胞、神経系細胞、ニューロン、心臓細胞、循環系細胞、視覚系細胞、聴覚系細胞、筋細胞、または内分泌細胞などを含むがこれらに限定されない細胞に適用される。

20

#### 【0147】

本発明の方法を用いて処置され得る障害および症状としては、損傷、脳障害、神経学的症状への変性（例えばパーキンソン病、アルツハイマー病、発作、視覚障害、聴覚障害など）を含む。

#### 【0148】

いくつかの実施形態では、本発明の方法および光活性化イオンチャネルポリペプチドは、視覚系障害の処置、例えば視覚低下または損失を処置するために用いられ得る。本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドまたはこのようなポリペプチドをコードするベクターは、視覚低下または損失に悩む対象に投与され得、発現した光活性化イオンチャネルは視覚系の感光性細胞として機能することができ、これにより対象の視覚機能の獲得を可能にする。

30

#### 【0149】

開示した方法および組成物の臨床応用としては、加齢性黄斑変性、糖尿病性網膜症、および網膜色素変性、ならびに光受容体細胞の損失をもたらす他の症状の眼障害遺伝子治療処置のための、網膜のポスト受容体ニューロンでの本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドの導入による視覚回復；電気ペースメーカー装置よりむしろ心臓鼓動リズムを制御するために房室束（ヒス束）の興奮性心筋細胞に組み込まれた本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドを用いることによる心臓機能の制御；パーキンソン病患者のドーパミン関連の運動不全の回復；脊髄損傷後の呼吸の回復；幹細胞の分化の非侵襲性制御、および組織およびネットワーク機能への移植細胞の特異的貢献の評価などの治療への光遺伝学的アプローチを含む（がこれらに限定されない）。

40

#### 【0150】

同様に、感覚神経的聴覚損失は聴神経での下流標的の光刺激を通して処置され得る（ Hernandezら、2014、J. Clin. Invest. 124 (3)、1114 - 1129 または Darrowら、2015、Brain Res.、1599、44 - 56 参照）。特別な実施形態によれば、本発明は、光学的蝸牛移植片の使用によって伝音損失を処置する方法であって、（a）蝸牛に、該蝸牛で発現可能な本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチド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、該ベクターはプロモーター配列に操作可能に連結された本発明の光活性化イオンチャネルポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームと、オプションとして転写制御配列と

50

を含む、送達すること、(b)該蝸牛に該ベクターを発現させ、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは該蝸牛を感光性にする、発現させること、および(c)蝸牛移植片をフラッシュと共に使用することを包含する方法である。

#### 【0151】

いくつかの実施形態は光学的蝸牛移植片の使用によって伝音損失を処置する方法であって、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは、蛍光タンパク質に融合したタンパク質ChR88(配列番号1)またはその機能性誘導体よりなる方法である。

#### 【0152】

いくつかの好適な実施形態は光学的蝸牛移植片の使用によって伝音損失を処置する方法であって、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは、蛍光タンパク質に融合したChrimsonR(配列番号2)またはその機能性誘導体よりなる方法である。10

#### 【0153】

いくつかの好適な実施形態は光学的蝸牛移植片の使用によって伝音損失を処置する方法であって、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは、tdTomato(tdT)蛍光タンパク質または緑色蛍光タンパク質(GFP)よりなる群から選択される蛍光タンパク質に融合したタンパク質ChR88(配列番号1)またはその機能性誘導体よりなる方法である。

#### 【0154】

いくつかの好適な実施形態は光学的蝸牛移植片の使用によって伝音損失を処置する方法であって、発現した光活性化イオンチャネルポリペプチドは、tdTomato(tdT)蛍光タンパク質(配列番号3)または緑色蛍光タンパク質(GFP)(配列番号4)よりなる群から選択される蛍光タンパク質に融合したChrimsonR(配列番号2)またはその機能性誘導体よりなる方法である。20

#### 【0155】

いくつかの局面における本発明は、核酸配列およびポリヌクレオチド配列を調合すること；調合した核酸配列およびポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドを細胞および膜に発現させること；細胞および/または膜を適切な光で照射すること；および細胞の急速脱分極および/または光に応答して膜を横断する伝導性の変化、ならびに光の停止時の脱分極からの急速な解除を提示することを包含する。膜を通した電圧および光による細胞脱分極を制御可能に変える能力が提示された。本発明は、インビボ、生体外、およびインビトロで細胞機能の光制御を可能にし、また本発明の光活性化イオンチャネルおよびそれらの使用は、薬剤スクリーニング、処置、および研究応用に対して幅広い適用例を有する。それらのいくつかを本明細書において記載する。30

#### 【0156】

本発明の例示的な実現例では、細胞機能を光学的に摂動、調節、または制御する能力は物理的な操作メカニズムに優る多くの利点を提供する。これらの利点は、速度、非侵襲性、およびナノスケールからマクロスケールまでの広大な空間規模に容易にまたがる能力を含む。

#### 【0157】

本発明での試薬の使用(およびこれらが表す分子クラス)は、少なくとも、以前の光活性化イオンチャネルで有用ではない光波長によって活性化される現行のもの、活性化するとゼロカルシウム伝導性を効果的に可能にする光活性化イオンチャネル、および(細胞の多色制御を開く)より古い分子からの様々なスペクトルを可能にする。40

#### 【0158】

以下の実施例の項は、様々な実施形態の実施例に関するさらなる詳細を提供する。以下の実施例で開示される技法は本発明者らによって良好に機能すると発見された技法および/または組成物を表すことは当業者には理解されよう。しかし、本発明の精神および範囲から外れることなく、開示する特定の実施形態には多くの変更を行うことができしきも類似のまたは同様の結果を得ることは、本開示に照らして、当業者であれば理解されよう。これらの実施例は、本明細書に記載した方法およびシステムの例示であって50

、本発明の範囲を制限するよう意図されてはいない。このような非制限の実施例は以下に提供する実施例を含むがこれらに限定されない。

#### 【実施例】

##### 【0159】

###### 実施例1：r d 1 および P 2 3 H 変性齶歯類モデルでの検証

網膜ジストロフィーは、視覚情報の流れを損なう網膜細胞の不全および変性に関連し、最終的には視覚損失および失明に至る。網膜色素変性（R P）は網膜ジストロフィーの最も一般的なタイプであり、世界で4,000人に1人の視覚損失の原因である。R Pは、常染色体優性（症例の30%～40%）、常染色体劣性（50%～60%）、またはX連鎖（5%～15%）として受け継いだ60個より多い遺伝子のいずれかの変性により生じる。10

##### 【0160】

R Pの最も一般的な形態では、桿状光受容体が先ず変性し錐体が続く。従って、R Pの最初の徵候は通常は夜盲症および視野狭窄に至る周辺視野損失である。すべてのR P症状は進行性であり、視野変性のパターンは患者間で異なるが、最終的な結末は失明である。R Pの処置はない。

##### 【0161】

R Pはいくつかの遺伝子での多数タイプの突然変異から生じ、R Pの有意の割合が優性であり、また疾患の経時変化は極めて可変であるため、網膜光遺伝学治療アプローチは潜在的に重要である。この点において、網膜神経節細胞（R G C）は以下の理由で魅力的な標的と思われる：1) R G Cは、軸索が直接突出し視覚情報を視覚皮質中枢へと運ぶ発火細胞である、2) R G Cは進行した網膜変性を患うR P患者の黄斑部で温存されて残っている、3) R P患者において網膜神経線維層の厚さが減少、増加または正常のいずれかである、4) R G C光遺伝学治療のための臨床基準はO C Tおよび走査レーザー偏光分析法を用いて容易に評価することができる。網膜組織の同様の変化に至る光受容体変性は加齢性黄斑変性などのより複雑な網膜疾患で起こっている。20

##### 【0162】

チャネルロドプシン2を用いたR G Cの光遺伝学治療は、R Pの齶歯類モデルおよび正常サルにおいて光誘起網膜電気活性、視覚誘発電位および視覚機能を提供することを証明している。加えて、R G Cは硝子体網膜表面に最も近いため、これらは硝子体内注射によるA A V感染の影響を受けやすく、外科的観点からは主要な利点である。30

##### 【0163】

盲目r d 1マウスの視覚回復のために網膜神経節細胞でのチャネルロドプシン2の異所性発現が示された場合、青色波長領域での必要な高励起閾値によって光毒性についての懸念が生じた。

##### 【0164】

本研究において、我々は、放射線安全性限界は赤色領域の方がかなり高いため、C h r i m s o n R (C h r R)、赤方偏移オプシンの使用について調査した。C h r i m s o n Rは、C h r i m s o nまたはC h r i m s o n 8 8とも呼ばれる微生物オプシンC n C h R 1の高度な形態であり、C h l a m y d o m o n a s N o c t i g a m aから単離された（K l a p o e t k eら、2014、上記参照）。C h r i m s o n 励起スペクトラルは以前のチャネルロドプシンに比べて45nmだけ赤方偏移している。C h r i m s o n RはC h r i m s o nのK 1 7 6 R突然変異体であり、類似の励起スペクトラルを示すがt e t a o<sub>ff</sub>値はより良好である（15.8ms対21.4ms）。我々は2つの変性モデル：盲目r d 1マウスおよび盲目P 2 3 Hラットの視力回復のためのC h r Rの使用について調査した。40

##### 【0165】

本研究の間、我々はさらにC h r Rおよび構築物C h r i m s o n R - t d T o m a t o (C h r R - t d T )の機能的有効性を比較した。

##### 【0166】

10

20

30

40

50

方法(図1) :

遺伝子送達

**【0167】**

マウス実験に使用したウィルス群

**【0168】**

**【表1】**

| 製品番号 | 製品名                                      | 力価<br>(v g / m l) | 注射量<br>(μl) | v g / 目   |    |
|------|--|-------------------|-------------|-----------|----|
| 433  | AAV 2. 7m8-s s CAG-Chrimson R            | 2. 25E+13         | 2           | 4. 50E+10 | 10 |
| 432  | AAV 2. 7m8-s s CAG-Chrimson R-t d Tomato | 1. 54E+13         | 2           | 3. 08E+10 |    |

**【0169】**

G S 0 3 0 \_ N C \_ P H A R \_ 0 0 7 研究のためのウィルス懸濁液は、滅菌 2 m l エッペンドルフ管にて P B S + 0 . 0 0 1 % P l u r o n i c (登録商標) F 6 8 において処方された既製の透明無色の液体とした。ウィルス懸濁液を P B S + 0 . 0 0 1 % P l u r o n i c (登録商標) F 6 8 とのストックウィルス懸濁液からの希釈によって作製した。

**【0170】**

ウィルス懸濁液を使用まで 5 ± 3 で保管した。

**【0171】**

すべての実験は、N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h G u i d e f o r C a r e a n d U s e o f L a b o r a t o r y A n i m a l s に従って行った。プロトコルはL o c a l A n i m a l E t h i c s C o m m i t t e e により承認され、欧州議会のD i r e c t i v e 2 0 1 0 / 6 3 / E U に従って行った。

**【0172】**

生後4週間のマウスをイソフルレンで麻酔し、硝子体内注射を両方に行った。つまり瞳孔を、トロピカミドを用いて拡大させ、針を用いて強膜の縁近くに孔を開けた。次にハミルトンシリンジを用いて 2 μl を太い注射器を通して目に送達した。

マウス注射および動物割り当ての詳細

**【0173】**

**【表2】**

|            | 動物ID   | 注射日        | M E A 日    | 発現時間 |  |
|------------|--------|------------|------------|------|--|
| Chrimson R | 809OD  | 23/01/2015 | 19/02/2015 | 27   |  |
|            | 809OG  | 23/01/2015 | 19/02/2015 | 27   |  |
|            | 810OD  | 23/01/2015 | 10/03/2015 | 46   |  |
|            | 2304OD | 19/02/2015 | 01/04/2015 | 41   |  |
|            | 2304OG | 19/02/2015 | 01/04/2015 | 41   |  |
|            | 2303OG | 19/02/2015 | 25/03/2015 | 34   |  |

|                       |        |            |            |    |
|-----------------------|--------|------------|------------|----|
| Chrimson R-t d Tomato | 875OD  | 23/01/2015 | 18/02/2015 | 26 |
|                       | 874OD  | 23/01/2015 | 20/02/2015 | 28 |
|                       | 874OG  | 23/01/2015 | 20/02/2015 | 28 |
|                       | 2301OG | 19/02/2015 | 07/04/2015 | 47 |
|                       | 2301OD | 19/02/2015 | 07/04/2015 | 47 |
|                       | 2302OG | 19/02/2015 | 13/04/2015 | 53 |
|                       | 2302OD | 19/02/2015 | 13/04/2015 | 53 |

## 【0174】

## 網膜製剤

マウスを AAV 注射後 ~ 5 週間 (27 日から 53 日 : 平均 38 日) または 11 カ月で CO<sub>2</sub> 吸入続いて後頸椎脱臼によって犠牲にした。動物眼球を単離し解剖して、網膜を強膜に接着したままに保つ一方角膜およびレンズを除去した。この眼杯をエームズ溶液 (Sigma - Aldrich, St Louis, MO) で満たした遮光性容器で保存した。次に網膜片 (典型的には網膜の半分) を単離して多電極アレイ記録に使用した。

## 【0175】

## MEA 記録

多電極アレイ (MEA) 記録を生体外マウス網膜から得た。網膜断片をポリリジン (0.1%、Sigma) で予めインキュベートしたセルロース膜上に一晩置いた。極微操作装置上で一度、網膜片を、RGC を電極アレイに向けてMEA (MEA 256 100 / 30 iR - ITO; Multi - Channel Systems, Reutlingen, ドイツ) に対してそっと押し付けた。CHR - tdt 構築物により、電極アレイ上の網膜片での tdt Tomato の蛍光を、MEA システム上に様々な光刺激を送達するために用いられる Nikon Eclipse Ti 倒立顕微鏡 (Nikon, Dusseldorf, ドイツ) 上での記録に先立ってチェックした。実験中、網膜を 34°、1~2 m/s / 分の速度で、95% O<sub>2</sub> および 5% CO<sub>2</sub> により泡立てたエームズ培地 (Sigma - Aldrich, St Louis, MO) で連続して灌流した。選択群 III の代謝調節型グルタミン酸受容体作用薬 L - (+) - 2 - アミノ - 4 - ホスホノ酪酸 (L - AP4, 50 μM, Tocris Bioscience, Bristol, 英国) を新たに希釈し、記録の 10 分前に灌流システムを通して灌流した。600 nm (± 15 nm) に設定され STG 2008 刺激発生器 (MCS) により駆動される Polychrome V 単色光分光器 (Olympus, Hamburg, ドイツ) により全分野光刺激を与えた。出力光強度を  $1.37 \times 10^{14}$  から  $6.78 \times 10^{16}$  光子 · cm<sup>2</sup> · 秒<sup>-1</sup> の範囲にわたるよう測定した。各光強度に対して、2 秒フラッシュを各刺激間に 5 秒の間隔を開けて 10 回繰り返した。我々はまた、多彩色 (最大光強度、 $6.78 \times 10^{16}$  光子 · cm<sup>2</sup> · 秒<sup>-1</sup>) を用いて、または  $600 \pm 20$  nm 色フィルターとつながったデジタルマイクロミラー表示装置 (DMD, Vialux, 解像度  $1024 \times 768$ ) に投影される蛍光顕微鏡 (X - cite, Lumene Dynamics) の光源を用いて、様々な持続時間の刺激への応答を記録した。測定は、網膜のレベルで  $2 \times 10^{17}$  光子 · cm<sup>2</sup> · 秒<sup>-1</sup> の光強度を示した。単一電極活性を、平均スパイク密度関数を用いて刺激の繰り返しにわたって平均化した (20 ミリ秒ガウス標準偏差)。次に応答電極を各單一網膜に対して平均化する。

## 【0176】

## 免疫組織化学および撮像

組織を室温で 4% パラホルムアルデヒドにて 30 分間固定した。PBS、ウシ血清アルブミン (5%)、Triton (0.5%) および Tween (0.25%) の溶液にて飽和および透過化を 1 時間室温で行った。一次抗体 : 1 / 200 tdt Tomato と共に希釈飽和溶液 (BSA 2.5%、Triton 0.25%、Tween 0.125%) にてインキュベーションを 4° で一晩行った。PBS で 20 分間洗浄後、組織を室温で 1 時間二次抗体と共にインキュベートした。さらに 5 回の PBS 洗浄後、組織をベクターシールド中に置き、20X および 63X 対物レンズを備えた共焦点顕微鏡 (Olympus, Tokyo, 日本) を用いて撮像した。

## 【0177】

## 結果

## トランسفェクト細胞の位置特定

CHR - tdt の注射の 5 週間後、光遺伝学タンパク質、CHR の発現が tdt Tomato 蛍光により容易に可視となった。その発現は神経節細胞層ならびに視神經円板に存在する大血管に沿って集中しているのが分かった (図 2A 参照)。

10

20

30

40

50

## 【0178】

## MEA記録

集団レベルでのおよび細胞統一性に影響を及ぼすことなく ChrR および ChrR-tdT の有効性を評価するために、多電極アレイシステムによりトランスフェクト RGC を記録した（図 2B）。記録の成功率が蛍光レポーター、tdTomato を含む構築物へと偏るのを避けるために、網膜片を電極アレイ上に乗せた後組織蛍光を調べた（図 2B）。加えて、残りの光受容体から生じる潜在的な光応答の阻止（Farber ら、1994）を、グルタミンシグナル伝達を妨害することで確実にした（方法の項を参照）。

## 【0179】

2つの異なる症状に対して、動物を1つまたは2つの目で試験した。十分な数の電極が自発的 RGC 活性を示したときに記録を認証した（図 3A）。この活性電極数は 237 から 101 の範囲である。多数の電極から自発的活性を記録する能力は、優れた実験組織状態：1) 健全な網膜および RGC、および 2) 電極の網膜組織との十分な接触の証である。次に、微生物オプシン、ChrR を活性化するために視覚刺激を高い光強度で生成した。ChrR-tdT を注射した7個の目のうち6個、および ChrR 構築物を注射した6個の目のうち4個において、光誘起応答を記録することができた（図 3A～B）。応答する網膜において、光刺激により電気活性を記録する活性電極のパーセンテージを決定した。これは、ChrR-tdT および ChrR 構築物ではそれぞれ 47% および 2% に達した（図 3A）。これらの結果は、rd1マウスの RGC を感光性細胞に形質転換するためには ChrR-tdT は ChrR 構築物よりかなり効果的であることを示唆する。

## 【0180】

## 可変光強度への感度

600 nm の光フラッシュを網膜組織に  $1.37 \times 10^{14}$  から  $6.78 \times 10^{16}$  光子・cm<sup>2</sup>・秒<sup>-1</sup> まで増大する光強度で2秒間当てた。図 2C はそれぞれ ChrR-tdT および ChrR 構築物による記録された応答である。グラフの各ラインは応答電極で記録された活性のプロットを表し、光誘発応答は少なくとも最高光強度に対して記録された。

## 【0181】

これらの図は、ChrR-tdT 構築物によって生成された応答（図 3C）は最高強度を含めすべての強度で ChrR より振幅が有意に大きかったことを明瞭に示す。これらの記録はまた、誘起活性は主に過渡的であり持続振幅に比べてピーク値が高いことを示す。最後に、活性閾値は、 $2.34 \times 10^{15}$  光子・cm<sup>2</sup>・秒<sup>-1</sup> で最初の顕著な活性を持つ、ChrR-tdT 構築物でより低いと思われる。応答を光刺激による最大追加発火率として測定すると、 $2.34 \times 10^{15}$  光子・cm<sup>2</sup>・秒<sup>-1</sup> で ChrR-tdT 発現網膜での応答の閾値がより低いこと、および ChrR 構築物に対する  $8.82 \times 10^{15}$  光子・cm<sup>2</sup>・秒<sup>-1</sup> での活性化が確認される（図 3C）。これらの観察により、ChrR 構築物は、ChrR-tdT 構築物によって生成されるものより、より高い強度閾値および所与の強度に対するより低いスパイク周波数で光遺伝学応答を誘起したことが示される。

## 【0182】

## 波長感度

ChrimsonR の既知の光感受性を確認するために、ならびに誘発活性が ChrimsonR 活性のみによることを証明するために、波長全領域（400 から 650 nm、図 2C）にわたる光刺激を行った。公表データ（Klapoetke ら、2014）から予想されるように、577～598 nm でピーク発火に到達し、ChrimsonR 活性のみに連結した光感受性と一致した。

## 【0183】

## 発現プロフィール

網膜での発現は多くは神経節細胞層、網膜の最も奥の層の細胞に確認された。ChrR-tdT を発現する細胞のほとんどは、tdTomato によって標識されるそれらの軸

10

20

30

40

50

索によって示される網膜神経節細胞（RGC）であった（図4A-C）。ChrR-tdTを発現する細胞の詳しい検討（図4D-E）により、プラズマ膜でまたはその近くでtdTомато蛍光が濃厚であることが明らかになった。このような細胞膜での蛍光の集積はまた比較的弱い発現レベルの細胞で生じた。最後に、我々はChrRに対するポリクローナル抗体を試験する機会を持った（図4）。ChrR抗体標識化により、TdTомато関連蛍光はChrимсонR位置特定にとって良い代理となることが確認された。

#### 【0184】

ChrR-tdTを発現するrd1マウス網膜をウィルスベクター注射（AAV2-7m8-ChrR-tdT）後11カ月で記録すると、RGCは依然として、tdTомато発現の領域で（図5A）光刺激への主要な応答を產生した（図5）。光への感受性は発現1カ月後に記録したものと同様であったが、振幅応答はより低かった（図5C）。これらの低い振幅応答は、光受容体喪失後に生じるRGC変性に帰するものであり、これは網膜色素変性の動物モデルおよび患者で報告されている。最後に、応答の振幅は注射後1カ月で得られた観察と一致する20msで定期的に達していた（図5D）。従って、これらの結果により、ウィルスベクターAAV2-7m8-ChrR-tdTは、盲目rd1動物でのRGCの光応答を駆動するためにChrR-tdTの長く続く発現を誘起することができる事が示された。

#### 【0185】

光受容体の様々な神経変性モデルでRGCを再活性化する際のChrR-tdT発現の潜在性をさらに示すために、ウィルスベクター（AAV2.7m8-ssCAG-ChrимсонR-tdTомато）をP23Hラットにも硝子体内注射した。MEA記録は、適用した光強度に対してのRGC応答振幅の点からみると同様の結果を与えた（図6）。これらの結果により、光受容体の損失後のRGCの光活性化におけるChrR-TdTに対する重要性が確認された。

#### 【0186】

##### 分析

本研究は、網膜変性の2つの異なるモデルの盲目網膜での網膜神経節細胞の再活性化のためのChrRの潜在性を示した。データによれば、ChrR-TdTはChrRよりずっと有力であることが示唆された。ChrR-TdTは安全レベルの光で活性化可能であった。これらの結果により、非ヒト靈長類の網膜でのChrR-TdT発現および機能のさらなる臨床前調査への道が開かれた（以下を参照）。

#### 【0187】

実施例2：安全放射線限界より下での非ヒト靈長類における網膜神経節細胞集団の活性化  
上記の研究では、我々はChrимсонR、赤方偏移オプシンは盲目齶歯類（rd1マウスおよびP23Hラット）での網膜神経節細胞（RGC）の光活性化を誘起することができることを示した。さらに、我々は蛍光タンパク質TdTоматоに融合した拡張形態ChrRは、光に応答する細胞数およびそれらの応答振幅の点からみるとより大きな機能的有効性を提供するように見えることを観察した。齶歯類と対照的に、AAV2は非ヒト靈長類において傍中心窩RGCの環のみを形質導入することは確立されている（Yinら、2011）。AAV2-7m8は、中心窩の環を越えて延び周辺領域での発現の島に至る（Dalkarala、2013）。AAV2ベクターによる同様のパターンの形質導入はヒトにおいても期待される。

#### 【0188】

従って、本治療的介入の翻訳潜在性をさらに評価するために、我々はChrRまたは蛍光タンパク質tdTоматоに融合したChrR（ChrR-tdT）の発現を駆動するAAVベクターの硝子体内注射がRGCの直接光活性化を可能にするのに十分な光遺伝学タンパク質発現をもたらすことができるかどうかを、非ヒト靈長類においてここに評価した。

#### 【0189】

10

20

30

40

50

## 方法(図7参照)

霊長類網膜へと遺伝子送達

## 【0190】

使用したウィルス群

## 【0191】

## 【表3】

| ロット番号 | 製品名                                 | 希釀液           |     |          |
|-------|-------------------------------------|---------------|-----|----------|
|       |                                     | v g / m l     | 量   | v g      |
| 432   | AAV2-7m8-s s CAG-ChrimsonR-tdTomato | 5 x 10 e + 12 | 400 | 2,00E+12 |
| 433   | AAV2-7m8-s s CAG-ChrimsonR          | 5 x 10 e + 12 | 400 | 2,00E+12 |
| 434   | AAV2-s s CAG-ChrimsonR-tdTomato     | 5 x 10 e + 12 | 400 | 2,00E+12 |
| 435   | AAV2-s s CAG-ChrimsonR              | 5 x 10 e + 12 | 400 | 2,00E+12 |

## 【0192】

GS030研究のためのウィルス懸濁液は、滅菌2m lエッペンドルフ管にてP B S + 0 . 0 0 1 % P l u r o n i c (登録商標) F 6 8において処方された既製の透明無色の液体とした。ウィルス懸濁液をP B S + 0 . 0 0 1 % P l u r o n i c (登録商標) F 6 8とのストックウィルス懸濁液からの希釀によって作製した。

10

## 【0193】

ウィルス懸濁液を使用まで5±3で保管した。

## 【0194】

## 【表4】

| ウィルス用量／目    | 注射経路 | 右目                          | 左目                          |
|-------------|------|-----------------------------|-----------------------------|
| 5 E 1 1 v g | 硝子体内 | AAV2-7m8-ChrimsonR-tdTomato | AAV2-7m8-ChrimsonR-tdTomato |
| 5 E 1 1 v g | 硝子体内 | AAV2-7m8-ChrimsonR          | AAV2-7m8-ChrimsonR-tdTomato |
| 5 E 1 1 v g | 硝子体内 | AAV2-7m8-ChrimsonR          | AAV2-7m8-ChrimsonR-tdTomato |
| 5 E 1 1 v g | 硝子体内 | AAV2-7m8-ChrimsonR          | AAV2-7m8-ChrimsonR-tdTomato |
|             |      |                             |                             |
| 5 E 1 1 v g | 硝子体内 | AAV2-ChrimsonR              | AAV2-ChrimsonR-tdTomato     |
| 5 E 1 1 v g | 硝子体内 | AAV2-ChrimsonR              | AAV2-ChrimsonR-tdTomato     |
| 5 E 1 1 v g | 硝子体内 | AAV2-ChrimsonR              | AAV2-ChrimsonR-tdTomato     |
| 5 E 1 1 v g | 硝子体内 | AAV2-ChrimsonR              | AAV2-ChrimsonR-tdTomato     |

20

30

40

## 【0195】

霊長類網膜単離および保存

AAV注射の2カ月(±5日)後霊長類は致死量のペントバルビタールを受けた。眼球を取り出して、滅菌20ゲージ針により目に孔を開けた後CO<sub>2</sub>非依存性培地(T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c)での輸送のために密封袋に置いた。次に網膜を単離し、記録に先立って12から36時間インキュベーター内で網膜外植片として保存した。半側中心窓網膜断片を細胞培養インキュベーター内での保存のためにNeurobabasal+B27培地のポリカーボネートransウェル(C o r n i n g)上に移した。

50

## 【0196】

## MEA記録

多電極アレイ(MEA)記録を生体外半側中心窩網膜から得た。これらの網膜断片をボリリジン(0.1%、Sigma)上に一晩置いた。極微操作装置上で一度、網膜片を電極に向けてMEA(MEA 256 100/30 iR-ITO; Multi-Channel Systems、Reutlingen、ドイツ)に対してそっと押し付けた。利用可能な場合はtdTomato蛍光を、MEAシステムの下に載置したNikon Eclipse Ti倒立顕微鏡(Nikon、Düsseldorf、ドイツ)による記録に先立ってチェックした。実験中、網膜を34°、1~2ml/分の速度で、95%O<sub>2</sub>および5%CO<sub>2</sub>により泡立てたエームズ培地(Sigma-Aldrich、St Louis、MO)で連続して灌流した。

AMP A / カイニン酸グルタミン酸受容体作用薬6 - シアノ - 7 - ニトロキノキサリン - 2 , 3 - ジオン(CNQX、25 μM、Sigma - Aldrich)、NMDAグルタミン酸受容体作用薬[3H]3-(2-カルボキシピペラジン-4-イル)プロピル-1-ホスホン酸(CPP、10 μM、Sigma - Aldrich)および選択群IIIの代謝調節型グルタミン酸受容体作用薬L-(+)-2-アミノ-4-ホスホノ酪酸(L-AP4、50 μM、Tocris Bioscience、Bristol、英国)を新たに希釈し、記録の10分前に灌流システムを通して灌流した。STG 2008刺激発生器(MCS)により駆動されるPolychrom V単色光分光器(Olympus、Hamburg、ドイツ)により全分野光刺激を与えた。出力光強度を1.37 × 10<sup>14</sup>から6.78 × 10<sup>16</sup>光子·cm<sup>-2</sup>·秒<sup>-1</sup>の範囲にわたるよう測定した。各光強度に対して、10秒の間隔で刺激を2秒間に与えて10回繰り返した。400から650 nmまで10 nmの波長帯域の刺激を2秒間に10 nmのステップで10回与えることによって光スペクトル感度を生成した。試験した波長帯域の順番は網膜の順応を避けるためにランダムとした。応答を引き出すために必要な最小時間を明確にするために光刺激は最大光強度で1から2,000ミリ秒の持続期間、5秒ごとに10回の繰り返しで遂行した。

## 【0197】

## 結果

## トランسفェクト細胞の位置特定

AAV2ベクターの硝子体内注射に続く遺伝子送達についての前の研究では、トランسفェクト細胞が、網膜神経節細胞(RGC)の中心窩領域、特に傍中心窩の環に制約されることが示された(Dalkaraら、2013)。従って、RGCを記録するために網膜を切開して分けるとき、tdTomatoの発現をこの領域により注意を払って網膜内で調べた。中心窩をMEA記録のために二等分に切断した。図8は平に載置した網膜上の傍中心窩環でのtdTomatoを発現する細胞を持つ領域を示し、黒色ドットはMEA記録システムの電極を表す。構築物がtdTomatoを含まないときは、網膜を同様に切開し、黄斑色素の黄色変化を用いたその同定に基づいて、中心窩領域を同様に切開して分けた。

## 【0198】

## MEA記録

大集団レベルでのおよび細胞統一性に影響を及ぼすことなく様々な構築物の有効性を評価するために、多電極アレイシステム(MEA)によりトランسفェクトRGCを記録した。16個の記録したNHP網膜すべてにおいて、傍中心窩RGCからの自発的活性を記録することができた(図8B)。RGCスパイクが自発的に記録された「活性」電極の数は、1つのAAV2.7m8-Chrimson R実験(40個の活性電極のみ)の例外を除いて、連続して高かった(平均152個の電極)。多数の電極から自発的活性を記録する能力は、優れた実験状態:1)健全な網膜およびRGC、および2)電極の網膜組織との十分な接触の証である。光パルスを網膜に加えると、多くの電極でスパイク活性の増加が測定された(図8A)。これらの電極を応答電極と名付けた。驚くべきことに、光誘発活性を示す細胞の点からみると網膜間に大きな差異があった(図8B)。実際に、AAV

V2.7m8-ChrR-TdTを注射したすべての網膜( $n = 4$ )は応答電極があつた一方で、他の群すべては応答電極のない網膜であった(AAV2.7m8-ChrR:1/4、AAV2-ChrR-TdT:2/4、AAV2-ChrR:0/4)。トランسفェクト細胞を位置特定する蛍光マーカーTdT o m a t oが無い場合には、光応答が測定されないときサンプリング領域を増やすため電極アレイ上で網膜を何度も再配置したということは言及する価値がある。

#### 【0199】

##### 光感受性

光応答を検出するために、光フラッシュを網膜組織に $1.37 \times 10^{14}$ から $6.78 \times 10^{16}$ 光子 $\cdot cm^2 \cdot 秒^{-1}$ まで上げる光強度により $600 nm$ で2秒間当てた。図9AはAAV2.7m8-ChrR-tdTを注射した目からのRGCでの様々な光強度への応答を示す。次いで、これらの光応答は、50ミリ秒ビン幅のスパイク速度で表された。(図9C)これらの光応答は強い持続成分を示すだけではなく、しばしば過渡的成分も示す。図9C~9Eは、増大する光強度の下での様々な構築物に対するMEA記録した光応答を表す。応答の振幅は光強度の増大と共に増大したが、この最良の構築物を持つ4つの異なる網膜の間であるばらつきが観察された。

#### 【0200】

AAV2.7m8-ChrR-tdT構築物により、すべての網膜が光感受性であるというだけではなく、ほとんどの網膜がより高い応答振幅を示した(図9C)。さらに、RGCは他の処置群に比べてより高い光感受性を示した(図9C~9E)。2個の網膜は $2.34 \times 10^{15}$ 光子 $\cdot cm^2 \cdot 秒^{-1}$ で光応答のスパイクヒストグラムを示した(図9C)。試験した最も高い光強度では、いくつかの電極でのスパイク周波数は $400 Hz$ 近くであった。図9F~9Gは、様々なAAV構築物に対する光強度による光応答の振幅を示すグラフを提供する。曲線は2秒間の刺激中の細胞発火率マイナス自発発火率における平均差を表す。これら2つのグラフは、低い光レベルでの応答振幅をより良好に説明する一方で全範囲の電気応答強度を十分に示すために2つの異なる縦軸目盛で示す。それぞれの応答振幅に従って様々な構築物をランク付けすると、AAV2.7m8-ChrR-tdTでトランسفェクトさせた3個の網膜は、他のトランسفェクト網膜よりずっと感受性が高かった。2個の応答性AAV2-ChrR-tdT網膜のうち、1つは第4位置となり、第2の応答網膜はAAV2.7m8-ChrRを発現する唯一の応答網膜またはAAV2.7m8-ChrR-tdTを発現する第4の網膜と同様のレベルにあった。従って、AAV2.7m8-ChrR-tdTは、多くのより応答性の高い網膜、より高い感受性および一般に最高の電気応答振幅を持つ最も強力な構築物であると思われた。

#### 【0201】

様々な波長での光誘起電気応答を、光遺伝学光応答を示すすべての網膜に対して測定した。この場合、刺激中の発火率を定量化することによって作用スペクトルを確立した。個々の細胞に対して測定した様々な作用スペクトルを平均化するとき、単一網膜の作用スペクトルを得たが、これはちなみに上記のマウスに対して得たものと全く一致した。図8Cは、AAV2.7m8-ChrR-tdTを注射した網膜のスペクトルを示す。活性のピークはChrimsonRの感度のピーク( $575 nm$ )に到達する。

#### 【0202】

##### 可変持続期間刺激

スパイク行動を誘発するために必要な刺激持続期間を決定するために、高い光強度(DMDを光源として使用、 $1.34 \times 10^{18}$ 光子 $\cdot cm^2 \cdot 秒^{-1}$ )で可変持続期間(0.2ミリ秒から2,000ミリ秒)の刺激を加えた。図10は、AAV2.7m8-ChrR-tdTを注射した1個の網膜に対して得られたデータを示す。光応答を、すべての試験持続期間でのすべての応答細胞に対する測定瞬間発火率として示した。刺激中の増大発火率に基づいて活性電極を明確にするために2つの第2刺激を用いた。次にこれらの活性電極のすべてから、より短い刺激への応答を分析して、刺激にわたってまた $50 ms$ を越えて延びるウィンドウ中のスパイク周波数の増加を調べた。図10A~Bに見られるよ

10

20

30

40

50

うに、いくつかの細胞は 0 . 4 秒のような短い刺激に対して発火率の増大を示した。応答電極数ならびに瞬間発火率は 5 0 m s までのより長い刺激に対して連続して増大した。より長い刺激に対して、応答細胞数が変わらなければ瞬間発火率のピークは低下し始める（図 10 A）。臨床設定での最良刺激パラメータを明確にするために、我々は 2 つの重要な要因：所与の刺激持続期間中の活性部位の割合（図 10 C）、および最初のスパイクまでの平均時間（図 10 D）を評価した。選択された持続期間は、高速動力（最初のスパイクまでの時間）で十分な数の潜在的に活性の細胞での活性を始動させると予想される。活性部位の割合を、瞬間発火率の 4 つの異なる閾値（5 - 2 0 - 5 0 - 1 0 0 H z）に対して明確にした。瞬間発火率が考慮した閾値（自発発火率を差し引いた）より高い場合、電極は活性化したとみなされることになる。図 10 C は、追加発火率は 1 m s の刺激に対して 6 0 % より多い電極で 5 H z を越えたことを示す。1 0 0 H z を越える活性レベルを持つ同様の割合の電極（ほぼ 7 0 %）を得るためにには、1 0 m s の刺激が必要である。我々はすべての部位およびすべての持続期間に対して最初のスパイクまでの平均時間を測定することによって分析を完成した。この特定の分析では、自発活性は差し引かなかつたし、追加スパイク行動を誘発しないかまたは非常に低いものしか誘発しない短い持続期間で正確な活性化閾値を決定するのは非常に困難となる。長い中央値（～ 2 0 0 ミリ秒）は実際には細胞の低い自発スパイク率（～ 5 H z）に対応する（0 . 2 ~ 1 m s、図 10 D）。より長い刺激持続期間（4 ~ 1 0 ミリ秒）に対しては、最初のスパイクまでの平均値に対する中央値は安定期に達した。これらのデータにより、この特定の光強度では、1 0 m s は、応答細胞の半分より多くで高い活性率で高速応答動力を提供するであろうことが示される。従って、これらの特性は、網膜神経節細胞の少なくとも映像速度（video rate）活性化と両立し、よって A A V 2 . 7 m 8 - C h r R - t d T は視覚認知にとって十分な発現を提供するであろうことを示す。

#### 【 0 2 0 3 】

##### 分析

3 つの構築物（A A V 2 . 7 m 8 - C h r R - t d T、A A V 2 . 7 m 8 - C h r R、および A A V 2 - C h r R - t d T）の、硝子体内注射後、光に感應しない R G C を光活性化可能細胞へと変える能力をマカクザルで調査した。

#### 【 0 2 0 4 】

先ず、我々のデータは、A A V 2 の硝子体内投与後の傍中心窓環内での R G C の特定の感染を示す以前の研究結果を再現した。しかし、そして D a l k a r a l a ( 2 0 1 3 ) に沿えば、感染率は明らかに A A V 2 . 7 m 8 の方が従来の A A V 2 の場合より強かった。M E A を用いて硝子体内注射の 2 カ月後、平に載置した網膜での R G C の 6 0 0 n m 光への機能的応答を特徴付けた。結果から、A A V 2 . 7 m 8 - C h r R - t d T が、発現レベルおよび機能的活性の両方に關して、4 つの試験した構築物の中で最良の候補であることが明瞭に確立された。これに關して、C h r R - t d T を発現する 4 個の網膜のうち 3 個が照射に応答して大光電流および高頻度の発火を生じさせた。A A V 2 . 7 m 8 - C h r R により処置された 4 個の網膜のうち 1 個しか光に応答しなかつたため、C h r R の t d T o m a t o との融合が光遺伝学タンパク質の機能を著しく向上させることが示される。

#### 【 0 2 0 5 】

本研究において、我々は C h r R - t d T 設計の R G C の刺激を誘発するのに必要な光強度範囲を確立した。様々な光強度での R G C 中の C h r R によって誘発される光電流の分析により、C h r R 活性化および不活性化の動力学についての価値ある情報が得られる。1 0 ミリ秒の刺激で、高速動力による高いスパイク率を生成する多数の応答細胞を回復させることができた。光遺伝学タンパク質の作用スペクトルが確立され、C h r i m s o n R - t d T o m a t o 構築物の最大応答が約 5 7 5 n m 波長であることが示された。総合すれば、これらの結果により、患者の視覚回復のための候補として A A V 2 . 7 m 8 - C h r R - t d T を選択することが可能である。

#### 【 0 2 0 6 】

10

20

30

40

50

実施例3：光遺伝学タンパク質ChrimsonRの発現および位置特定における蛍光タンパク質tdTomatoの役割

非ヒト靈長類および網膜色素変性罹患rd1マウスにおいて、AAV2.7m8-CAG-ChrimsonR-tdTomatoはTdTomatoのない同様の構築物(AAV2.7m8-CAG-ChrimsonR)より実質的により有力であった。従って、我々はその基礎をなすメカニズムを理解することを目指した。そのために、単独のまたはtdTomatoと融合したChrimsonRの発現およびトラフィッキングに焦点を当ててHEK293細胞でのインビトロ研究を行った。

#### 【0207】

方法

10

ヒトHEK293細胞を、10%ウシ胎仔血清を追加したDMEM培地の24ウェルプレートに播種した。細胞は10から70%の合流および流路3と20との間で用いた。pssAAV-CAG-ChrimsonR-tdTomato、pssAAV-CAG-ChrimsonRおよびpssAAV-CAG-ChrimsonR GFPプラスミドの細胞トランスフェクションを、jetPrime(登録商標)をトランスフェクション剤(jetPrime(登録商標))を50μlの緩衝液中の0.5μgのプラスミドDNAに混合)として用いて完成させた。

#### 【0208】

ChrimsonR、ChrimsonR-tdTomatoおよびChrimsonR-GFP mRNA発現をRT-PCRによって調べ、またアクチンハウスキーピング遺伝子発現を平行して行った。ChrimsonRタンパク質量に対応する蛍光の細胞レベルを免疫化学によって評価した。Gensightに属しましたこれによって提供される抗ChrimsonR抗体を1:1,000の希釈で用いた。免疫蛍光定量のためにAllexafluorに結合する二次抗マウス抗体を用いた。

20

#### 【0209】

HEK293T細胞培養

HEK293T(ATCC)(登録商標)CRL-3216<sup>TM</sup>細胞を、10%FBS(Invitrogen)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン(Invitrogen)を追加したDMEM培地(Invitrogen、Waltham、米国)にて10%と70%との間の合流で維持した。

30

#### 【0210】

トランスフェクションおよび感染

細胞のpssAAV-CAG-ChrimsonR-tdTomato(プラスミド479)およびpssAAV-CAG-ChrimsonR(プラスミド480)によるトランスフェクションを、トランスフェクション試薬(<http://www.polyporus-transfection.com/products/jetprime/>)としてのjetPrime(登録商標)を用いて行った。24ウェルプレートを各ウェルの底にガラスのスライドスリップを置いて用意した。ガラスのスライドスリップはポリ-D-リジンおよびラミニンでコーティングした。HEK293T細胞をこれらの24ウェルプレートに各ウェル100,000細胞の密度でトランスフェクションの1日前に培養した。1μlのjetPrime(登録商標)を0.5μgのプラスミドDNA479または480と50μlの緩衝液中で混合した。51.5μlのトランスフェクションミックスを細胞に加え、トランスフェクションの4~6時間後培地を変更した。次に細胞を分析に先立ってトランスフェクションの24時間後インキュベートした。

40

#### 【0211】

感染のために、細胞を上述のように用意した(24ウェルプレートに各ウェル約100,000細胞の密度でトランスフェクションの1日前に培養した)。次の日、1ウェルの細胞をトリプシン処理しカウントして、細胞/ウェルの正確な数を決定しMOIを計算した。次に細胞を500,000のMOIでAAV2-7m8-CAG-ChrimsonR-tdTomato(IDV\_ロット768)またはAAV2-7m8-CAG-Ch

50

r i m s o n R ( I D V \_ ロット 752 ) により感染させた。24時間感染後の細胞を 4 % P F A で固定した。

#### 【 0 2 1 2 】

##### R T - q P C R

N u c l e o s p i n ( 登録商標 ) R N A キット ( M a c h e r e y - N a g e l ) により細胞溶解物から R N A を抽出した。簡潔に述べれば、与えられた試薬を用いて細胞を溶解させ、溶解物をフィルタリングして細胞残屑を除去した。R N A をシリカ膜に連結させた。汚染 D N A を噴霧および D N A s e の作用によって分解した。R N A を洗浄し R N A s e を含まない水中で溶出した。R N A 濃度および純度を、 N a n o d r o p を用いた U V 分光分析によってアッセイした。1 k b サイズのマーカーの存在下で 1 % アガロースゲル上に 1 μ g を堆積させ R N A の質を評価した。次に R N A を二次 D N A s e : T U R B O ( 登録商標 ) D N A s e で処置し ( 反応当たりに 2 U の T U R B O D N A s e を添加し次に室温 ( R T ) で 20 ~ 30 分のインキュベーション ) 、 R T - q P C R のために 1 n g の R N A を使用した。一般的なオリゴ d T プライマーを用いて逆転写を行った。 C h r i m s o n R 配列の一部と一致するプライマー ( プライマー アクチングフォワード : G C T C T T T C C A G C C T T C C T T ( 配列番号 9 ) 、プライマー アクチングリバース : C T T C T G C A T C C T G T C A G C A A ( 配列番号 10 ) 、プライマー C h r i m s o n R フォワード : A C A C C T A C A G G C G A G T G C T T ( 配列番号 11 ) 、プライマー C h r i m s o n R リバース : T C C G T A A G A A G G G T C A C A C C ( 配列番号 12 ) ) により特定の q P C R を行った。ハウスキーピング遺伝子をコードするアクチングに対して標準化を行った。関連分析法を用いた ( 逆転写サンプルの等モル混合物による標準範囲物を調製し 1 : 10 の増分で順次希釈した ) 。標準物の各希釈物を、上記のプライマーとの混合前に q P C R プレート上に 3 通りで与えた。続いて関連発現分析を行った。 R T - q P C R を ( 2 つの 96 ウェルプレート上で ) 2 度繰り返し、各トランスフェクション状態を 3 通りに試験した。

#### 【 0 2 1 3 】

##### 免疫組織化学

細胞を P B S ですすぎ室温で 10 分間 4 % の P F A で固定した。遮断緩衝液 ( 1 % の Triton X - 100 、 0.5 % の Tween 20 および 10 % の B S A 緩衝液を含む P B S ) を室温で 15 分間添加した。次に細胞を、遮断緩衝液 ( 10 % の B S A 、 1 % の Triton X - 100 、 0.5 % の Tween ) 中で、 1 : 1,000 で希釈した C h r i m s o n R ( 0.59 mg / mL ) に対して向けたマウスピリクローナル抗体により R T で 2 時間インキュベートした。3回の P B S 洗浄を行った。次に細胞を、 A l e x a F l u o r 488 ( ロバで生成した A - 31571 Thermofisher 、希釈 1 : 500 ) に結合した二次抗マウス抗体により R T で 1 時間インキュベートした。実験は 3 回 3 通りに行った。

#### 【 0 2 1 4 】

##### アレイ走査撮像および定量化

H E K 293 T 細胞を上述のようにトランスフェクトまたは感染させた。 C h r i m s o n R に対する抗体を上述のように処置済みおよび対照ウェルに加えた。細胞核を H o e c h s t 核染色により 5 分間着色し次に洗浄して C e l l o m i c s A r r a y S c a n V T I 上で撮像した。画像を、浜松 O R C A - E R デジタルカメラを用いて 10 x ズームで遠赤外色および青色チャネルから得た。露光時間を決定するために、標識付きまたは無しのウェルを対照として用いた。取得が完了すると、画像をソフトウェア C e l l o m i c s V i e w で分析した。各パラメータ ( 閾値化、分割、対象境界 ) を手動で設定して、自動細胞カウントが細胞の特殊性を反映するのを確実にした。25分野にわたる自動蛍光細胞カウントおよび核カウントを平均化して、各トランスフェクション状態に対する蛍光細胞のパーセンテージを得た。核の数を上まわる蛍光細胞の数を、 G r a p h p a d プリズムソフトウェアを用いて蛍光細胞のパーセンテージとしてプロットした。実験は 3 回行い、各サンプルを 2 通りで表した。

10

20

30

40

50

## 【0215】

## 共焦点顕微鏡検査

共焦点顕微鏡検査を Olympus FV1000 レーザー走査共焦点顕微鏡で行った。励起および発光クロストークを減らすために、画像を 1 ラインずつ順次獲得し、Nyquist-Shannon サンプリング定理に従って刻み幅を明確にした。最終画像での過飽和ピクセルを最小限にする露光設定を用いた。次に各カバースリップからの 12 ビット画像を FIJI により処理し、Z 断面を、Z 投影機能の下で最大強度を用いて单一プレーン上に投影し、最後に 8 ビット RGB カラーモードに変換した。実験を状態当たり 3 通りで 3 回繰り返した。各カバースリップに対して少なくとも 3 枚の画像を獲得した。

## 【0216】

10

## 結果

## RT-qPCR

RNA をトランسفェクト細胞から抽出し RT-qPCR を用いて定量した(図 11)。面白いことに、我々は Crimson R-tdTomato (479) に比べて Crimson R (480) でトランسفェクトさせた細胞内での方が Crimson R mRNA の量が多いことを検出した。トランسفェクションは Crimson R および Crimson R-tdTomato をコードするプラスミド間で類似すると仮定すると、これは、原理上は Crimson R の方が発現レベルが高いということになる。しかし、細胞内に存在する mRNA の量は直接にタンパク質発現レベルを反映しない。翻訳後のステップが細胞内のタンパク質レベルおよびタンパク質位置特定全体を明確にする。従って、次の実験セットでは、HEK 細胞を Crimson R または Crimson R-tdTomato でトランسفェクトさせ、タンパク質発現を顕微鏡により追跡した。

20

## 【0217】

図 11 は、pssAAV-CAG-CrimsonR-tdTomato、pssAAV-CAG-CrimsonR-GFP プラスミドに対する RT-PCR の生データを示す。アクチン遺伝子 mRNA 発現は試験した構築物に拘わらず類似した。CrimsonR-tdTomato の発現は CrimsonR 単独および CrimsonR-GFP の一方より僅かに低いと思われる。

30

## 【0218】

これに対して、CrimsonR タンパク質のレベルは、pssAAV-CAG-CrimsonR プラスミドよりむしろ pssAAV-CAG-CrimsonR-tdTomato および pssAAV-CAG-CrimsonR-GFP を用いたときの方がより高かった(図 12)。図 12A は、それぞれ pssAAV-CAG-CrimsonR-tdTomato および pssAAV-CAG-CrimsonR でトランسفェクトさせた HEK293 の蛍光画像を示す。細胞核は青色で現れる(DAPI 着色)。

## 【0219】

図 11B は、分析した 50,000 個の細胞のうち、CrimsonR のレベルは、CrimsonR が tdTomato または GFP に融合したときより高かったことを示す。

40

## 【0220】

図 12 は、HEK293 細胞の pssAAV-CAG-CrimsonR-tdTomato、pssAAV-CAG-CrimsonR および pssAAV-CAG-CrimsonR-GFP プラスミドによるトランسفェクションを行ったときの CrimsonR タンパク質のレベルを提供する。

## 【0221】

## アレイ走査撮像および定量化

アレイ走査を用いて、細胞の全数(それらの核に基づく)ならびに CrimsonR

50

(480) 対 Chrimson R - td Tomato (479) プラスミドでトランスフェクトさせたサンプルの抗 Chrimson R 抗体標識の後の蛍光細胞をカウントした。td Tomato に融合したまたは融合していない Chrimson R を発現する細胞数の間の相違は有意ではなかった(図13)。従って、このカウント方法によれば、td Tomato の存在または不在に拘わらず同じ数の細胞が Chrimson R にトランスフェクトされ発現した。しかし、蛍光細胞のパーセンテージは蛍光の位置特定についての情報を伝えるものではない。膜で発現した Chrimson R のみが光活性化時の膜電位の変化に至ることができるので、共焦点顕微鏡検査を用いて、我々は次に td Tomato の存在または不在下での Chrimson R の細胞内位置特定の相違を調査した。

#### 【0222】

10

##### 共焦点顕微鏡検査

トランスフェクト / 感染させた細胞を、材料および方法で述べたように Chrimson R に対する抗体および DAPI で標識した。次にカバースリップを載置して共焦点顕微鏡で観察した。同じパラメータを用いて獲得した Z スタックを最大投影して、HEK 細胞内の Chrimson R の分布の代表画像を得た。これらのデータは、Chrimson R 対 Chrimson R - td Tomato の細胞内位置特定が有意に異なることを示す。Chrimson R は、小胞体細網であると思われるものの中の核周辺領域にとどまる(図14および15)。一方 Chrimson R - td Tomato は核周辺領域での蓄積はなく細胞にわたって広く分布する(図14および15)。注目すべきは、我々はいかなる抗小胞体細網着色も行わなかったが、HEK 細胞での KDEL(配列番号13)などの ER マーカーによる着色パターンが類似の領域を標識するために示された(Wuら、Biochem J、464、13-22、2014)。

20

#### 【0223】

##### 分析

RT-qPCR による転写分析により、mRNA レベルは、Chrimson R 発現プラスミド(480)でトランスフェクトさせた細胞は、Chrimson R - td Tomato 発現プラスミド(479)に比べて僅かに高いことが示された。しかし、td Tomato と融合したまたは融合していない Chrimson R タンパク質を発現する細胞のパーセンテージはトランスフェクション後類似していた。光遺伝子(optogene)の細胞内位置特定の共焦点顕微鏡観察により、Chrimson R - td Tomato は Chrimson R 単独に比べて異なる細胞分布パターンを有することが示された。Chrimson R - td Tomato は細胞内に広く分布した一方で、Chrimson R 単独は本質的には小胞体細網(ER)内に蓄積し、これは ER からの解放およびこれに続く膜への挿入において変化を示すかも知れない。td Tomato は大きな可溶タンパク質である一方 Chrimson R はかなり不溶性のタンパク質である(Shanerら、Nat Methods、2、905-909、2005)。従って、これらのデータにより、td Tomato は実際に光遺伝学タンパク質の溶解性を改善し、Chrimson R の C 末端に融合タンパク質として含めると Chrimson R の ER からの解放を促進させるかも知れないことが示唆される。

30

#### 【0224】

40

以下の配列が本開示で開示される。

#### 【0225】

## 【表5】

<210> SEQ ID NO: 1 Chrimson 88

<211> 350

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

10

<400> 1

Met Ala Glu Leu Ile Ser Ser Ala Thr Arg Ser Leu Phe Ala Ala Gly

1 5 10 15

Gly Ile Asn Pro Trp Pro Asn Pro Tyr His His Glu Asp Met Gly Cys

20

20 25 30

Gly Gly Met Thr Pro Thr Gly Glu Cys Phe Ser Thr Glu Trp Trp Cys

35 40 45

【0226】

Asp Pro Ser Tyr Gly Leu Ser Asp Ala Gly Tyr Gly Tyr Cys Phe Val

50 55 60

Glu Ala Thr Gly Gly Tyr Leu Val Val Gly Val Glu Lys Lys Gln Ala

65 70 75 80

10  
Trp Leu His Ser Arg Gly Thr Pro Gly Glu Lys Ile Gly Ala Gln Val

85 90 95

Cys Gln Trp He Ala Phe Ser Ile Ala Ile Ala Leu Leu Thr Phe Tyr

100 105 110

20  
Gly Phe Ser Ala Trp Lys Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val Tyr Val

115 120 125

Cys Cys Val Glu Val Leu Phe Val Thr Leu Glu Ile Phe Lys Glu Phe

130 135 140

30  
Ser Ser Pro Ala Thr Val Tyr Leu Ser Thr Gly Asn His Ala Tyr Cys

145 150 155 160

Leu Arg Tyr Phe Glu Trp Leu Leu Ser Cys Pro Val Ile Leu Ile Lys

165 170 175

40  
Leu Ser Asn Leu Ser Gly Leu Lys Asn Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met

180 185 190

【 0 2 2 7 】

Gly Leu Ile Val Ser Cys Val Gly Met Ile Val Phe Gly Met Ala Ala

195                200                205

Gly Leu Ala Thr Asp Trp Leu Lys Trp Leu Leu Tyr Ile Val Ser Cys

210                215                220

Ile Tyr Gly Tyr Met Tyr Phe Gln Ala Ala Lys Cys Tyr Val Glu

225                230                235                240

10

Ala Asn His Ser Val Pro Lys Gly His Cys Arg Met Val Val Lys Leu

245                250                255

Met Ala Tyr Ala Tyr Phe Ala Ser Trp Gly Ser Tyr Pro Ile Leu Trp

260                265                270

20

Ala Val Gly Pro Glu Gly Leu Leu Lys Leu Ser Pro Tyr Ala Asn Ser

275                280                285

Ile Gly His Ser Ile Cys Asp Ile Ile Ala Lys Glu Phe Trp Thr Phe

290                295                300

30

Leu Ala His His Leu Arg Ile Lys Ile His Glu His Ile Leu Ile His

305                310                315                320

Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Met Glu Ile Gly Gly Glu Glu Val

325                330                335

40

Glu Val Glu Glu Phe Val Glu Glu Glu Asp Glu Asp Thr Val

340                345                350

<210> SEQ ID NO: 2 Chrimson R

<211> 350

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

<400> 2

Met Ala Glu Leu Ile Ser Ser Ala Thr Arg Ser Leu Phe Ala Ala Gly

1                5                10                15

20

Gly Ile Asn Pro Trp Pro Asn Pro Tyr His His Glu Asp Met Gly Cys

20                25                30

Gly Gly Met Thr Pro Thr Gly Glu Cys Phe Ser Thr Glu Trp Trp Cys

35                40                45

30

Asp Pro Ser Tyr Gly Leu Ser Asp Ala Gly Tyr Gly Tyr Cys Phe Val

50                55                60

Glu Ala Thr Gly Gly Tyr Leu Val Val Gly Val Glu Lys Lys Gln Ala

65                70                75                80

40

【 0 2 2 9 】

Trp Leu His Ser Arg Gly Thr Pro Gly Glu Lys Ile Gly Ala Gln Val

85 90 95

Cys Gln Trp Ile Ala Phe Ser Ile Ala Ile Ala Leu Leu Thr Phe Tyr

100 105 110

Gly Phe Ser Ala Trp Lys Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val Tyr Val

115 120 125

10

Cys Cys Val Glu Val Leu Phe Val Thr Leu Glu Ile Phe Lys Glu Phe

130 135 140

Ser Ser Pro Ala Thr Val Tyr Leu Ser Thr Gly Asn His Ala Tyr Cys

145 150 155 160

20

Leu Arg Tyr Phe Glu Trp Leu Leu Ser Cys Pro Val Ile Leu Ile Arg

165 170 175

Leu Ser Asn Leu Ser Gly Leu Lys Asn Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met

180 185 190

30

Gly Leu Ile Val Ser Cys Val Gly Met Ile Val Phe Gly Met Ala Ala

195 200 205

Gly Leu Ala Thr Asp Trp Leu Lys Trp Leu Leu Tyr Ile Val Ser Cys

40

【 0 2 3 0 】

210 215 220

Ile Tyr Gly Gly Tyr Met Tyr Phe Gln Ala Ala Lys Cys Tyr Val Glu  
225 230 235 240

Ala Asn His Ser Val Pro Lys Gly His Cys Arg Met Val Val Lys Leu  
10  
245 250 255

Met Ala Tyr Ala Tyr Phe Ala Ser Trp Gly Ser Tyr Pro Ile Leu Trp  
260 265 270

Ala Val Gly Pro Glu Gly Leu Leu Lys Leu Ser Pro Tyr Ala Asn Ser  
20  
275 280 285

Ile Gly His Ser Ile Cys Asp Ile Ile Ala Lys Glu Phe Trp Thr Phe  
290 295 300

Leu Ala His His Leu Arg Ile Lys Ile His Glu His Ile Leu Ile His  
305 310 315 320

Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Met Glu Ile Gly Gly Glu Glu Val  
325 330 335

Glu Val Glu Glu Phe Val Glu Glu Asp Glu Asp Thr Val  
340 345 350

【 0 2 3 1 】

10

20

30

40

<210> SEQ ID NO: 3 TdTomato

<211> 475

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

10

<400> 3

Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val

1 5 10 15

Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu

20 25 30 20

Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys Val

35 40 45

Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln

50 55 60 30

Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro

65 70 75 80

Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val

85 90 95

40

【 0 2 3 2 】

Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser

100 105 110

Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg Gly Thr Asn

115 120 125

Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu

130 135 140

10

Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Lys Gly Glu

145 150 155 160

Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu Val Glu

165 170 175

20

Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Tyr

180 185 190

Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr

195 200 205

30

Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His His Leu Phe

210 215 220

Leu Gly His Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Ser Gly Thr Ala

225 230 235 240

40

【 0 2 3 3 】

Ser Ser Glu Asp Asn Asn Met Ala Val Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe  
245 250 255

Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu  
260 265 270

10  
Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu  
275 280 285

Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser  
290 295 300

20  
Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp  
305 310 315 320

Ile Pro Asp Tyr Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu  
325 330 335

30  
Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr Gln Asp  
340 345 350

Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met Arg Gly  
355 360 365

40  
Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly  
370 375 380

【 0 2 3 4 】

Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val Leu Lys  
385            390            395            400

Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Leu  
405            410            415

10  
Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro  
420            425            430

Gly Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu  
435            440            445

20  
Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg His His  
450            455            460

Leu Phe Leu Tyr Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys  
465            470            475

<210> SEQ ID NO: 4 GFP

30

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

40

【 0 2 3 5 】

&lt;400&gt; 4

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val

1 5 10 15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu

20 25 30

10

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys

35 40 45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe

50 55 60

20

Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln

65 70 75 80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg

85 90 95

30

Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val

100 105 110

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile

115 120 125

40

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn

130 135 140

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Gln Lys Asn Gly  
145 150 155 160Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val  
165 170 175

10

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro  
180 185 190Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser  
195 200 205

20

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val  
210 215 220Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys  
225 230 235

30

&lt;210&gt; SEQ ID NO: 5 ChrimsonR tdT

Fusion protein comprising 350 aa from Chrimson R/ 6aa from linker and 475 aa from TdT

&lt;211&gt; 831

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

40

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; source

【 0 2 3 7 】

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

<400> 5

Met Ala Glu Leu Ile Ser Ser Ala Thr Arg Ser Leu Phe Ala Ala Gly

1 5 10 15

10  
Gly Ile Asn Pro Trp Pro Asn Pro Tyr His His Glu Asp Met Gly Cys

20 25 30

Gly Gly Met Thr Pro Thr Gly Glu Cys Phe Ser Thr Glu Trp Trp Cys  
35 40 45

20  
Asp Pro Ser Tyr Gly Leu Ser Asp Ala Gly Tyr Gly Tyr Cys Phe Val  
50 55 60

Glu Ala Thr Gly Gly Tyr Leu Val Val Gly Val Glu Lys Lys Gln Ala  
65 70 75 80

30  
Trp Leu His Ser Arg Gly Thr Pro Gly Glu Lys Ile Gly Ala Gln Val  
85 90 95

Cys Gln Trp Ile Ala Phe Ser Ile Ala Ile Ala Leu Leu Thr Phe Tyr  
100 105 110

40  
Gly Phe Ser Ala Trp Lys Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val Tyr Val  
115 120 125

【 0 2 3 8 】

Cys Cys Val Glu Val Leu Phe Val Thr Leu Glu Ile Phe Lys Glu Phe  
130 135 140

Ser Ser Pro Ala Thr Val Tyr Leu Ser Thr Gly Asn His Ala Tyr Cys  
145 150 155 160

Leu Arg Tyr Phe Glu Trp Leu Leu Ser Cys Pro Val Ile Leu Ile Arg  
165 170 175

Leu Ser Asn Leu Ser Gly Leu Lys Asn Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met  
180 185 190

Gly Leu Ile Val Ser Cys Val Gly Met Ile Val Phe Gly Met Ala Ala  
195 200 205

Gly Leu Ala Thr Asp Trp Leu Lys Trp Leu Leu Tyr Ile Val Ser Cys  
210 215 220

Ile Tyr Gly Gly Tyr Met Tyr Phe Gln Ala Ala Lys Cys Tyr Val Glu  
225 230 235 240

Ala Asn His Ser Val Pro Lys Gly His Cys Arg Met Val Val Lys Leu  
245 250 255

Met Ala Tyr Ala Tyr Phe Ala Ser Trp Gly Ser Tyr Pro Ile Leu Trp  
260 265 270

Ala Val Gly Pro Glu Gly Leu Leu Lys Leu Ser Pro Tyr Ala Asn Ser  
275                280                285

Ile Gly His Ser Ile Cys Asp Ile Ile Ala Lys Glu Phe Trp Thr Phe  
290                295                300

10  
Leu Ala His His Leu Arg Ile Lys Ile His Glu His Ile Leu Ile His  
305                310                315                320

Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Met Glu Ile Gly Gly Glu Glu Val  
325                330                335

20  
Glu Val Glu Glu Phe Val Glu Glu Asp Glu Asp Thr Val Ala Ala  
340                345                350

Pro Val Val Ala Val Ser Lys Gly Glu Glu Val Ile Lys Glu Phe Met  
355                360                365

30  
Arg Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu Phe Glu  
370                375                380

Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala  
385                390                395                400

Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile  
40

【 0 2 4 0 】

405 410 415

Leu Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro

420 425 430

Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys

10

435 440 445

Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr Val Thr

450 455 460

Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val Lys Met

465 470 475 480

20

Arg Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr

485 490 495

Met Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp Gly Val

500 505 510

30

Leu Lys Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His

515 520 525

Tyr Leu Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro Val Gln

530 535 540

40

【 0 2 4 1 】

Leu Pro Gly Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr Ser His  
545 550 555 560

Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Arg  
565 570 575

His His Leu Phe Leu Gly His Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ser  
10  
580 585 590

Ser Gly Thr Ala Ser Ser Glu Asp Asn Asn Met Ala Val Ile Lys Glu  
595 600 605

Phe Met Arg Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Met Asn Gly His Glu  
20  
610 615 620

Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln  
625 630 635 640

Thr Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp  
30  
645 650 655

Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys  
660 665 670

His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly  
40  
675 680 685

【 0 2 4 2 】

Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Leu Val Thr

690                695                700

Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Leu Ile Tyr Lys Val

705                710                715                720

10

Lys Met Arg Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys

725                730                735

Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp

740                745                750

20

Gly Val Leu Lys Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly

755                760                765

Gly His Tyr Leu Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Pro

770                775                780

30

Val Gln Leu Pro Gly Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr

785                790                795                800

Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu

805                810                815

40

Gly Arg His His Leu Phe Leu Tyr Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys

820                825                830

【 0 2 4 3 】

<210> SEQ ID NO: 6 CrimsonR-tdTomato fusion protein encoding gene

<211> 2496

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

10

<400> 6

atggctgagc tgcgtaccccg cggccaccaga tctctgttg ccgcggagg catcaaccct 60

tggcctaacc cttaccacca cgaggacatg ggcgtgtggag gaatgacacc tacaggcgag 120

tgcgttccatca cccgtgtggt gtgtgaccct ttttacggac tgagcgacgc cggatacgga 180

20

tattgttcgtc tggaggccac aggccgtac ctggctgtgg gagtggagaa gaagcaggct 240

tggctgcaca gcagaggcac accaggagaa aagatccgc cccaggctg ccagtggatt 300

gcgttccatca tcgcctatgc cctgtgtaca ttctacggct tcagcgccctg gaaggccact 360

tgcgttgtgg aggaggctta cgtctgttc gtcgtgtgc ttttcgtgac cctggagatc 420

30

tttcaaggagt tcagcagccc cggccacatgt tacctgtata cggcaacca cgcgttgc 480

ctgcgttact tcgatgtggct gctgtttgc cccgtgtatcc tgatcagact gagcaacctg 540

agcggccctga agaacgacta cagcaagcgg accatgggcc tgcgtgtgc tgcgtggaa 600

atgcgttgt tcggcatggc cgcaggactg gtcaccgtt ggcgtcaagt gtcgtgtat 660

【 0 2 4 4 】

40

atcggtctt gcatctacgg cggctacatg tacttccagg ccgccaagtgc ttaacgtggaa 720  
 gccaaccaca gcgtgcctaa aggccattgc cgcatggctg tgaagctgat ggcctacgct 780  
 tacttcgcct ctggggcag ctacccaatc ctctgggcag tgggaccaga aggactgctg 840  
 aagctgagcc ttacgccaa cagcatggc cacagcatct ggcacatcat cgccaaggag 900  
 10  
 tttggaccc tctggccca ccacctgagg atcaagatcc acgaggcacat cctgateccac 960  
 ggccacatcc ggaagaccac caagatggag atcggaggcg aggaggtgga agtggaagag 1020  
 ttctggagg aggaggacga ggacacagtgc gggcacccgg tagtagcgt gagtaaggc 1080  
 gaggaagtga tcaaagagtt catcggttt aaggtgagaa tggaaaggaag catgaacggc 1140  
 20  
 cacgagtgc aaattgggg agaaggagag ggacggccct acgaggcac ccagacagcc 1200  
 aagctgaaag tgacaaaggg cggcccttg ccatcgctt gggacatct gageccacag 1260  
 ttatgtacg gctccaaggc ctatgtaaa catccagctg acattcccgta ttataagaaa 1320  
 ctgagcttcc cccgggggtt taagtggaa agagtgtatgacttcgagga cggaggcctg 1380  
 gtgactgtga cccaggacag ctccctgcag gatggaccc tggatctacaa ggtgaaaatg 1440  
 30  
 agagggacaa attttcccccc tggatggacct gttgtgcaga agaaaactat gggatggag 1500  
 gcctccaccc aaaggctgtt tccacgcac ggggtgctgtt aaggagaaat ccaccaggct 1560  
 ctgaagctgtt aagatggggg acattacctg gtggagttca agacaatcta catggccaag 1620  
 aaacctgtgc agctgccagg ctactattac gtggacacaa aactggatat cacttcacac 1680  
 40  
 aacgaggact acactattgt ggagcgttat gaacggagcg agggagaca ccatctgttc 1740

ctggccatg ggacttgaag taccggctca gggcttagtg gaaccgcctc aagcgaggat 1800

aacaataatgg ctgtgtatcaa agagttcatg agggttaagg tgcgcatgga gggcagcatg 1860

aatgggcacg aattgagat tgaaggagag ggcgaaggga ggccttacga gggcacacag 1920

actgccaagc tgaatgtac caagggagga ccactgcctt tcgcttggga tatcctgtct 1980

cctcagtttacgtacggaaatggccatgtcaagcatacgctgacatccctgattac 2040

aagaaaactgt ctttcccaga gggcttaag tgggagagag tcatgtattt tgaagatgga 2100

ggcctggta ccgtgacaca ggactccct ctgcaggatg gcactctgat ctacaagtc 2160

aaaatgcgat gcaccaattt tccacccgtat gggcccgta tgcaagaagaa aacaatgggg 2220

tggaaegcca gcacttaacg gctgtatcct agagacggag tgctgaaggcg cggaaatccac 2280

caggccctga agctgaaaga cggcgccac tacctggtgg agttcaaaac catctacatg 2340

gccaaagaac cagtgcagct gccccggctat tactatgtgg acacccaagct ggatatacaca 2400

tcccaacaatg aagactacac cattgtggaa cagtatgaga ggtctgaagg acgccaccat 2460

ctgtttctgt acggcatggta tgagctgtat aaataa 2496

10

<210> SEQ ID NO: 7 Nucleotide sequence of rAAV2.7m8-CAG-ChrimsonR-tdTomato vector genome

<211> 4166

<212> DNA

### <213> Artificial Sequence

2203

40

[ 0 2 4 6 ]

&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

&lt;400&gt; 7

cctgcaggca gctgcgcgt cgcgcgtca ctgagggccgc cggggcaaag cccggggcgtc 60

ggcgacatt tggtcgcgg gcctcagtga gcgagcgagc ggcagagag ggagtggcca 120

10

actccatcac taggggttcc tgccgcgcga cgcgctgtt tacctcttgtt cgttacataa 180

cttacggtaa atggccgcgc tggctgaccg cccaaacgacc cccgcccatt gacgtcaata 240

atgaegtatg ttccccatagt aacgcataa gggactttcc attgacgtca atgggtggag 300

tatttacggt aaactgcaca cttggcgtt catcaagtgtt atcatatgcc aagtacgccc 360

20

cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgaccata 420

tgggactttc ctacttggca gtacatctac tggaggccac gttctgttc actctccccca 480

tctccccccc cctccccacc cccaaatttg tatttattta ttttttaattt attttgtca 540

gcgtatggggg cgggggggggg gggggggcgc ggcgcaggcg gggcgggcg gggcgagggg 600

30

cgggggcgagg cggagagggtg cggcgccagc caatcagagc ggcgcgttcc gaaagtttcc 660

ttttatggcg aggccggccgc ggcggccggc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcggccggg 720

agcgggatca gccacccggg tggccgccta gagtcgacga ggaactgaaa aaccagaaag 780

ttaactggta agtttagtct ttgtcttt tatttcaggt ccggatccg gtgggtgtc 840

40

aatcaaaga actgccttc agtggalgtt gccttactt ctaggcctgt aeggaagtgt 900

【 0 2 4 7 】

tacttctgtc ctaaaagc lg cggaattgta cccggggccg atccaccgg tgcgtcgata 960  
 ttctgagccg ccaccatggc tgagctgate agcagcgcca ccagatctct gtttgccgcc 1020  
 ggaggcatca acccttggcc taaccctac caccacgagg acatgggctg tggaggaatg 1080  
 acacacctac agcgtgtt cagcacccgag tgggggtgt acccttcta cgactgagc 1140  
 10  
 gacgcccggat acggatattg ctctggag gccacaggcg gctaccctgt cgtgggagtg 1200  
 gagaagaagc aggcttggct gcacagcaga ggcacaccag gagaaaagat cggccccag 1260  
 gtctgccagt ggatttgtt cageatcgcc atgeccctgc tgacattcta cggttcage 1320  
 gcctggaagg ccacttgcgg ttgggaggag gtctacgtct gttgcgtcga gggtgttc 1380  
 20  
 gtgaccctgg agatctcaa ggagttcage agccccgcca cagtgtacct gtctaccggc 1440  
 aaccacgcct attgcctgctt ctaatcgag tggctgtt ctgcgggt gatectgate 1500  
 agactgagca acctgagcgg cctgaagaac gactacagca agcggaccat gggccgtatc 1560  
 gtgtcttgcg tggaaatgtat cgtttcgcc atggccgcag gactggctac cgattggctc 1620  
 aagtggctgc tgtatategt gtcttgcata taaggccgtt acatgtactt ccaggccgcc 1680  
 30  
 aagtgcgtacg tggaaagccaa ccacagcgtg cctaaaggcc attgcccgtt ggtcgtaag 1740  
 ctgatggcc acgtttactt cgccttgg ggcagttacc caatctctg ggcagtggaa 1800  
 ccagaaggac tggtaagctt gageccctac gccaacagca tcggccacag catctgcac 1860  
 atcatcgcca aggagtttg gaccttcctg gcccaccacc tgaggatcaa gatccacgag 1920  
 40  
 cacatctga tccacggcga catccggaaag accaccaaga tggagatcgg aggcgaggag 1980

gtggaagtgg aagagttcgt ggaggaggag gacgaggaca cagtggccgc accggtagta 2040  
 gcagttagtga agggcgagga agtgatcaaa gagttcatgc ggttaagggt gagaatggaa 2100  
 ggaagcatga acggccacga gtgcgaaatt gagggagaag gagagggacg gccctacgag 2160  
 ggcacccaga cagccaaact gaaagtgcaca aaggcgccc ctctgccatt cgcttggac 2220  
 atcctgagcc cacagtttat gtacggctcc aaggctatg taaaacatcc agctgacatt 2280 10  
 cccgattata agaaactgag cttcccgag gggtaagt gggaaagagt gatgaacttc 2340  
 gaggacggag gcctggtgac tgcgtaccg gacagctccc tgcaggatgg gaccctgate 2400  
 tacaaggtga aaatgagagg gacaaatttt cccctgtatg gacctgtat gcagaagaaa 2460  
 actatggat gggaggcctc caccgaaagg ctgtatccac gcgacgggt gctgaaagga 2520 20  
 gaaatccacc aggetctgaa gctgaaagat gggggacatt acctggtgaa gtcagaagaca 2580  
 atctacatgg ccaagaaacc tggtcagctg ccaggctact attacgtggaa cacaactg 2640  
 gatatcactt cacacaacga ggactacact attgtggagc agtataacg gagcgagggg 2700  
 agacaccatc tggctctggg ccatggact ggaagtaccg gctcagggtc tagtggaaacc 2760 30  
 gcctcaagcg aggataacaa tatggctgtg atcaaagagt tcatgagggt taaggcg 2820  
 atggagggca gcatgaatgg gcacgaattt gagattgaag gagagggcga agggaggct 2880  
 tacgagggca cacagactgc caagctgaaa gtgaccaagg gaggaccact gccttcgt 2940  
 tgggatatcc tgcctctca gtttatgtac ggaagtaagg cctatgtcaa gcatccgcet 3000 40

gacattcctg attacaagaa actgttttc ccagaggct ttaagtggga gagagtgtatg 3060  
 aatttgaag atggaggcct ggtgaccgtg acacaggact cctctctgca ggtatggcact 3120  
 ctgatctaca aagtcaaaat gcgcggcacc aatittecac ccgatggcc cgtgatgcag 3180  
 aagaaaacaa tgggtggga ggccageact gaacggctgt atcctagaga cggagtgctg 3240  
 aagggcgaaa tccaccaggc cctgaagctg aaagacggcg gccactacct ggtggagttc 3300 10  
 aaaaccatct acatggccaa gaaaccatgt cagctccccg gctattacta tgtggacacc 3360  
 aagetggata tcacatccca caatgaagac tacaccatgt tggaacagta tgagaggct 3420  
 gaaggacgcc accatctgtt tctgtacggc atggatgagc tgtataagta aagaagcttg 3480  
 cctcgagcag cgctgctcga gagatctacg ggtggcatcc ctgtgacccc tccccagtgc 3540 20  
 ctetctggc ectggaagtt gecactccag tgeccaccag ccttgtccta ataaaattaa 3600  
 gttgcatcat ttgtctgac taggtgtcct tctataatat tatggggtgg aggggggtgg 3660  
 tatggagcaa gggcaagtt gggaaagacaa cctgttagggc ctgcggggtc tattggaaac 3720  
 caagctggag tgcagtggca caatctggc tcactgcaat ctccgeetcc tgggtcaag 3780 30  
 cgattctcct gcctcagect cccgagttgt tgggattcca ggcattcatg accaggctca 3840  
 gctaattttt gtttttttgg tagagacggg gttcacat attggccagg ctggctccta 3900  
 actcttaatc tcagggtgatc taccacattt ggctcccaa attgctggta ttacaggcgt 3960  
 gaaccactgc tccctccct gtccctctga tttttaggt aaccacgtgc ggacccggcgt 4020 40  
 gcccgcaggaa cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgcctc gctcgctcac 4080

tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgcg cccgggctt gcccgggggg cctcagttag 4140

cgagcgagcg cgcaatgcc tcagg 4166

<210> SEQ ID NO: 8

<211> 783

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

<400> 8

cgttacataa cttaacgtaa atggccgcgc tggctgacgg cccaacgcacc cccgccccatt 60

20

gacgtcaata atgaacctatg ttcccatagt aacgccaata gggacttcc attgaactca 120

atgggtggag tattttacgtt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 180

aagtacgccc ectattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 240

catgacetta tgggacttcc ctacttggca gtacatctac tcgaggccac gttctgcitc 300

30

actctccccca tctccccccc cctccccacc cccaattttt tattttatata ttttttaatt 360

420 attttgtca gcgatggggg cgggggggggg ggggggggcgc gcgcgcaggcg gggcgccccgc

480 gggcgagggg cggggcgagg cggagaggtg cggcgccagc caatcagac ggcgcgcetcc

40

gaaagtttcc ttttatggcg aggccggccgc ggccggccctataaaaaag cgaagcgcgc 540

【 0 2 5 1 】

ggcgggcggg agcgggatca gccacccgg tggccgccta gagtcgacga ggaactgaaa 600

aaccagaaag ttaactggta agtttagtct tttgtctt tatltcaggt cccggatccg 660

gtggtgtgc aaatcaaaga actgctcctc agtggatgtt gccttactt ctggccgt 720

acggaagtgt tacttctgct ctaaaagctg cggaattgta cccgccccg atccacccgt 780

cgc 783

SEQ ID N08CAG promoter : Underlined sequences denote the 3 components of the promoter:  
cytomegalovirus immediate early enhancer, chicken beta-actin promoter and SV40 intron  
insertion respectively.

CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACG  
TCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGG  
AGTATTACGGTAAACTGCCCACTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC  
TATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGAC  
TTTCCCTACTTGCAGTACATCTACTCGAGGCCACGTTCTGCTTCACCTCTCCCATCTCCCCCCC  
CCTCCCCACCCCCAATTTGTATTATTTATTATTTGTGAGCAGCGATGGGGCGGG  
GGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGGGGGGGGCGAGGGGGCGAGGGGGCGAGGGGGAGAGG  
TGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGGCGCTCCCAAAGTTCTCTTATGGCAGGCCGGCG  
CGGCGGCCCTATAAAAAGCGGAAGCGCCGGCGGGAGCGGGATCAGCCACCGCGGTGGCGG  
CCTAGAGTCGACGAGGAACTGAAAAAACAGAAAGTTAACGGTAAGTTAGTCTTTGTCTT  
TATTCAGGTCCGGATCCGGTGGTGGTCAAAATCAAAGAACTGCTCTCAGTGGATGTTGCCT  
TTACTCTAGGCTGTACGGAAGTGTACTCTGCTCTAAAGCTGCGGAATTGTACCCGGC  
CGATCCACCGGTGCG

<210> SEQ ID NO: 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

20

30

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer"

<400> 9

gcttttcc accttccctt

20

【 0 2 5 2 】

40

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer" 10

<400> SEQ ID NO: 10  
cttctgcattc ctgtcagcaa 20

<210> SEQ ID NO: 11  
<211> 20  
<212> DNA 20  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer"

<400> SEQ ID NO: 11 30  
acacccatcacag gegagtgttt 20

<210> SEQ ID NO: 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

40  
<220>  
<221> source

【 0 2 5 3 】

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 12

tccgttaagaa gggtcacacc

20

<210> SEQ ID NO: 13

10

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

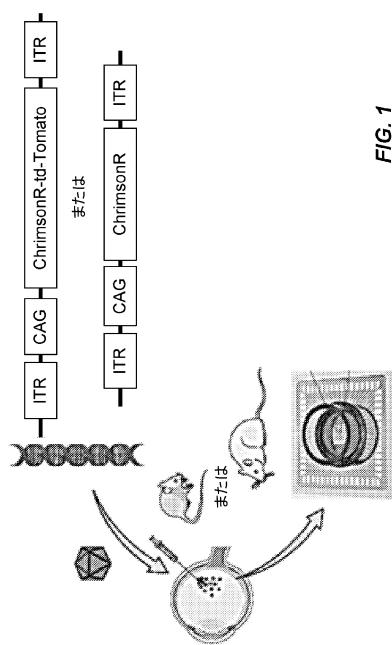
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

20

<400> 13

Lys Asp Glu Leu

【図1】



【図2 A - B】

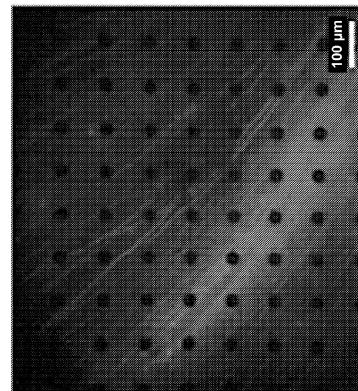


FIG. 2B

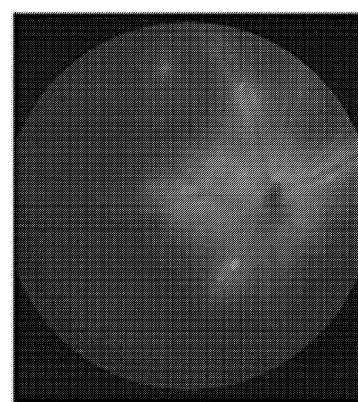


FIG. 2A

FIG. 1

【図2C】

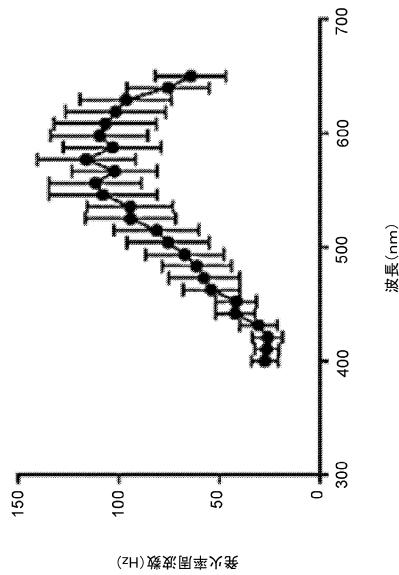


FIG. 2C

【図2D】

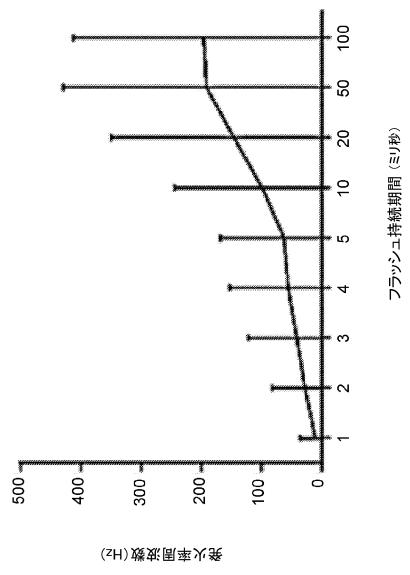
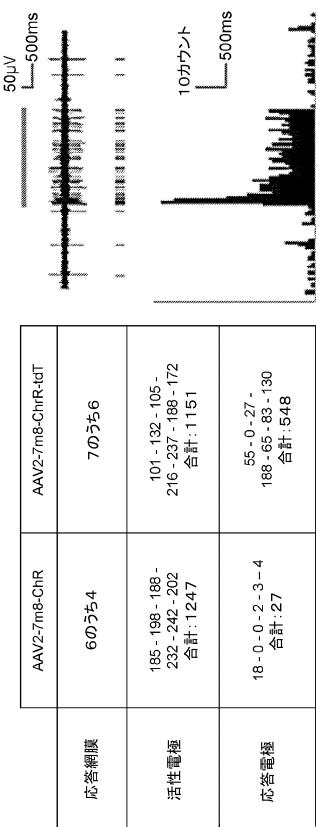


FIG. 2D

【図3A - B】



【図3C】

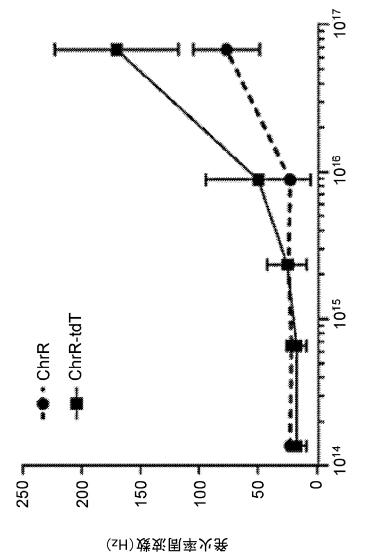
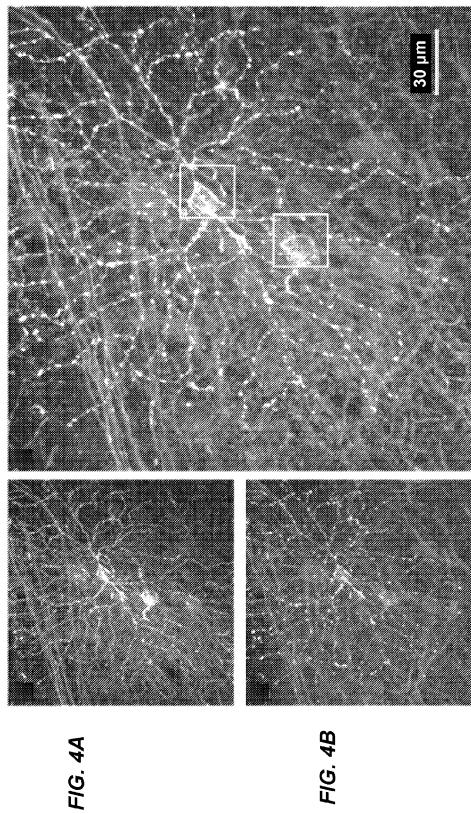
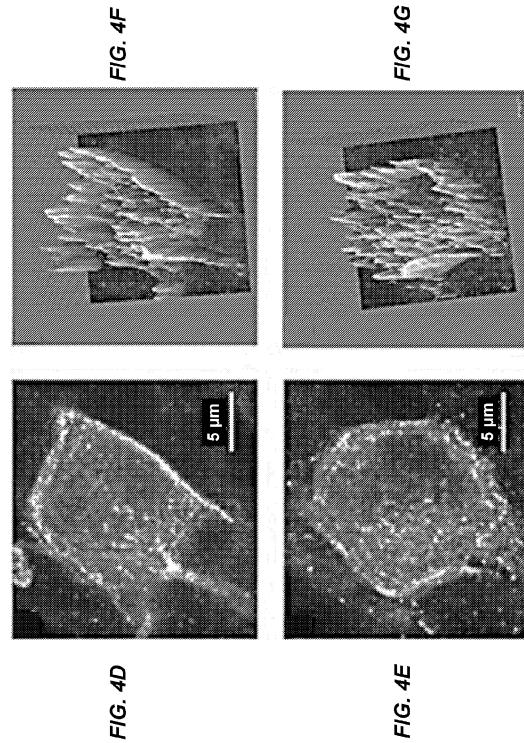


FIG. 3C

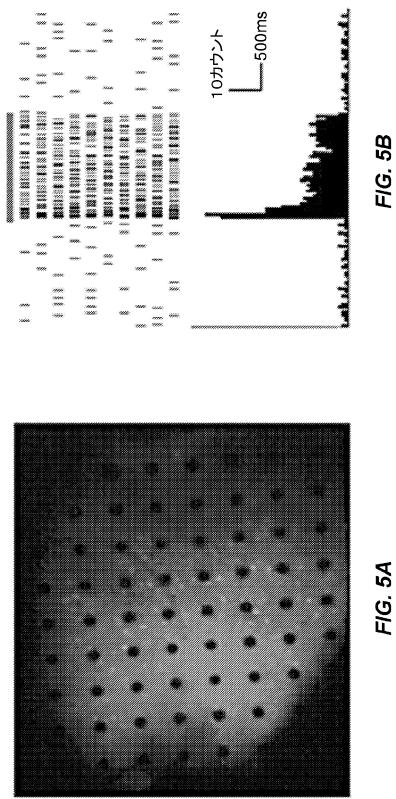
【図 4 A - C】



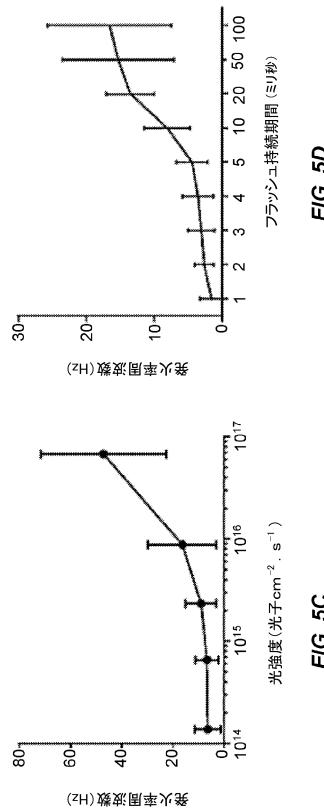
【図 4 D - G】



【図 5 A - B】



【図 5 C - D】



【図 6 A - B】

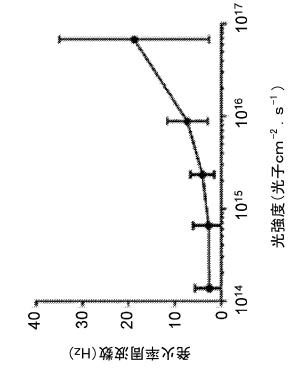


FIG. 6B

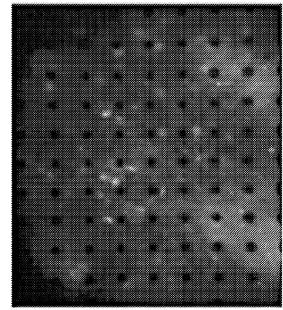


FIG. 6A

【図 7】

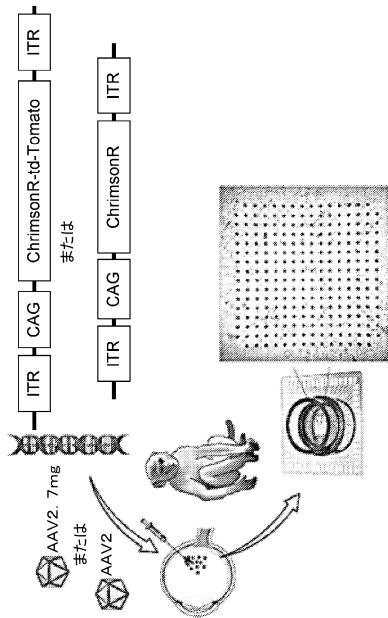


FIG. 7

【図 8 A - B】

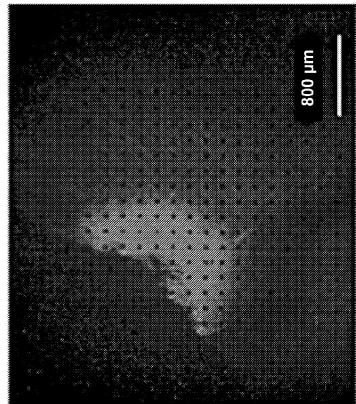


FIG. 8B

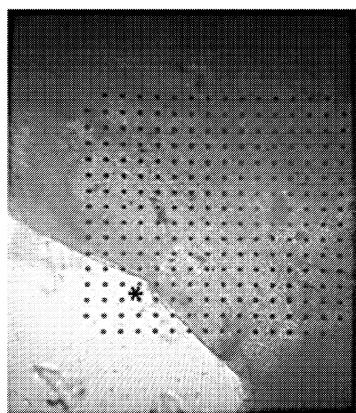


FIG. 8A

【図 8 C】

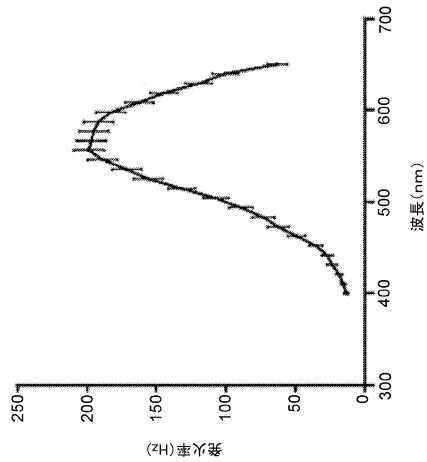
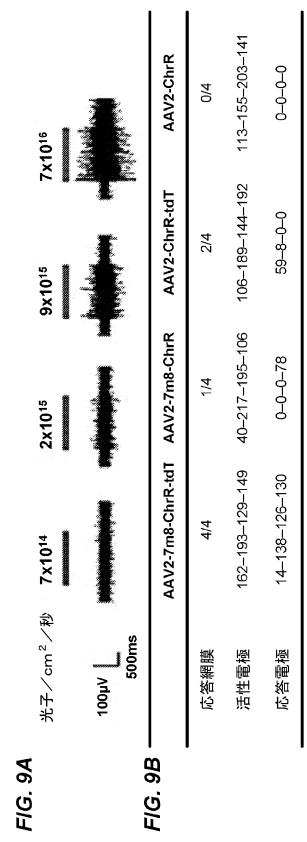
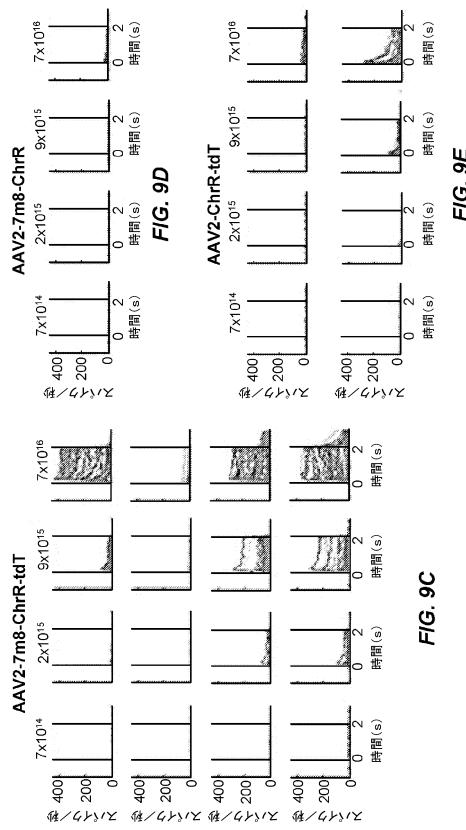


FIG. 8C

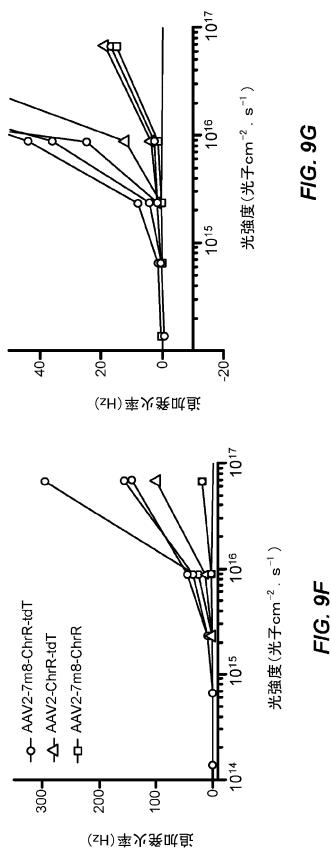
【図 9 A - B】



【図 9 C - E】

FIG. 9C  
FIG. 9D  
FIG. 9E

【図 9 F - G】



【図 10 A】

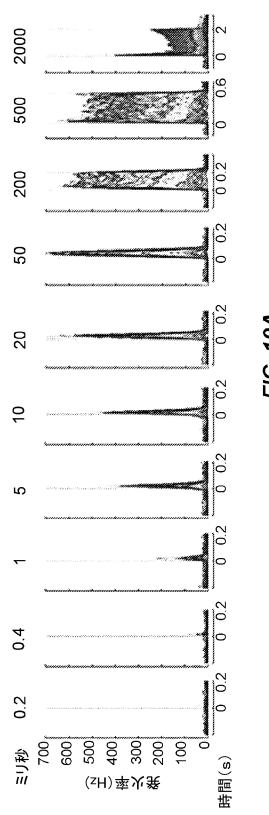


FIG. 10A

【図 10B】

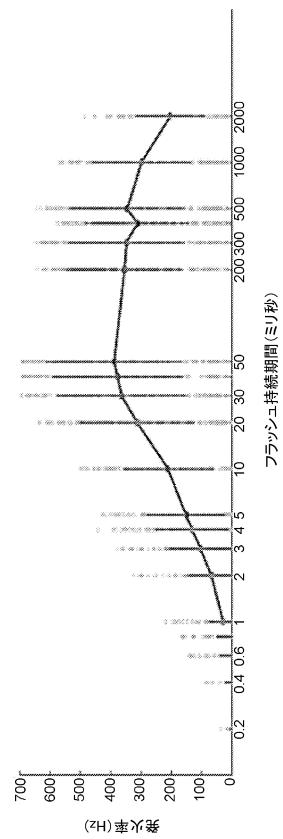


FIG. 10B

【図 10C】

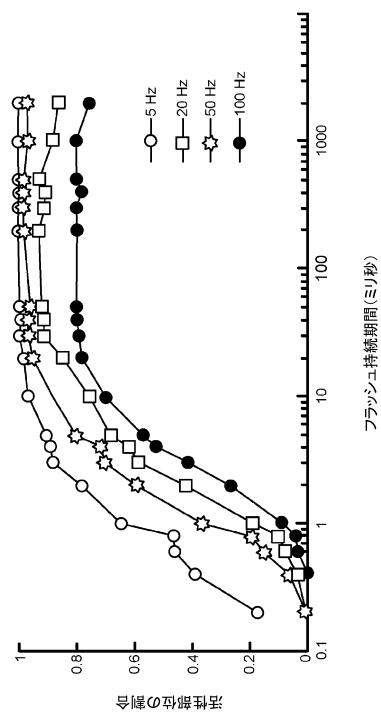


FIG. 10C

【図 10D】

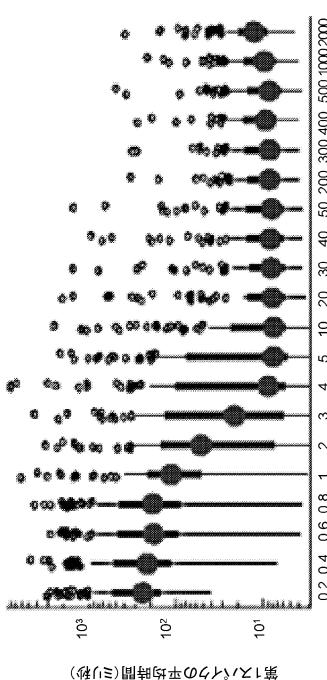


FIG. 10D

【図 11】

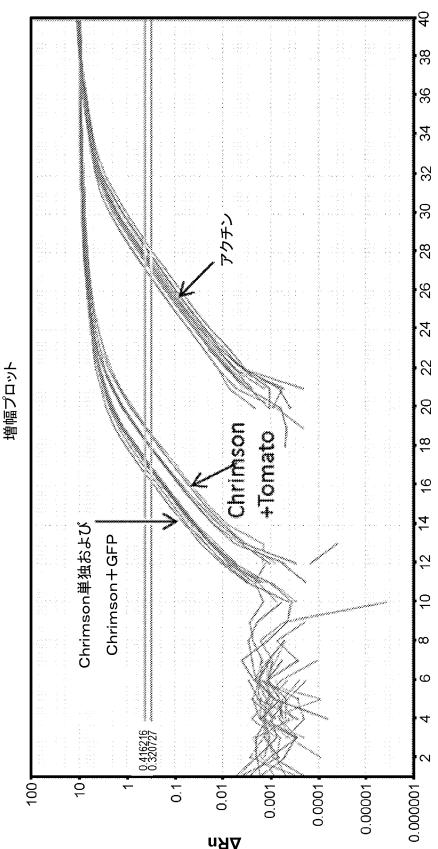


FIG. 11

【図 1 2 A】

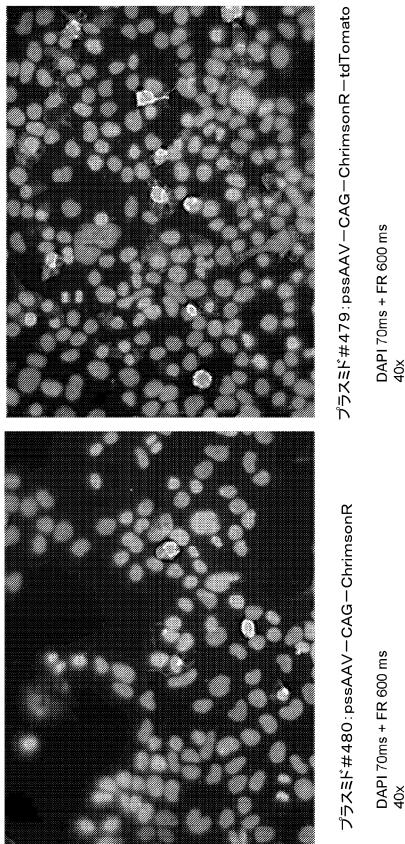


FIG. 12A

【図 1 2 B】

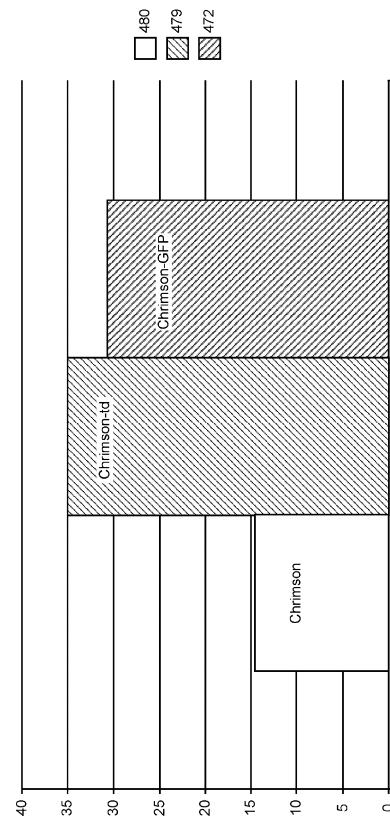


FIG. 12B

【図 1 3】

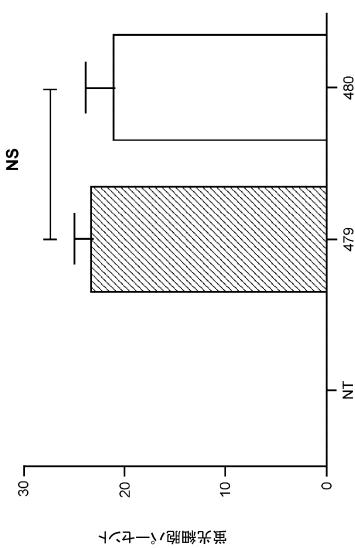


FIG. 13

【図 1 4 A - B】

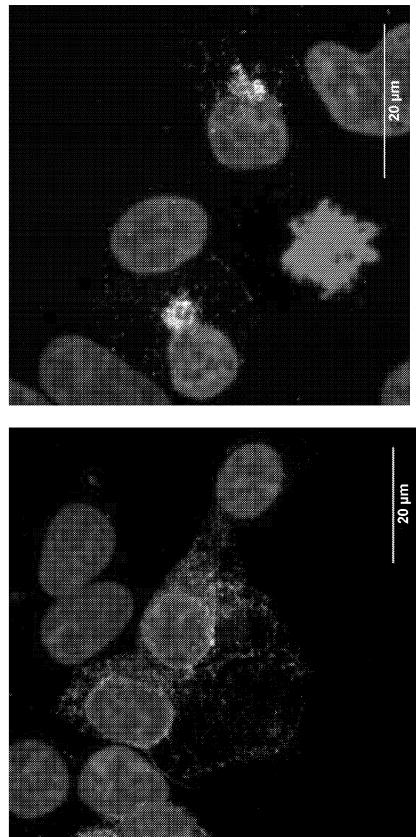


FIG. 14A

FIG. 14B

## 【図 15 A - B】

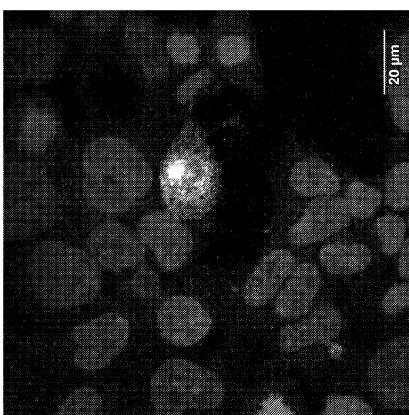


FIG. 15B

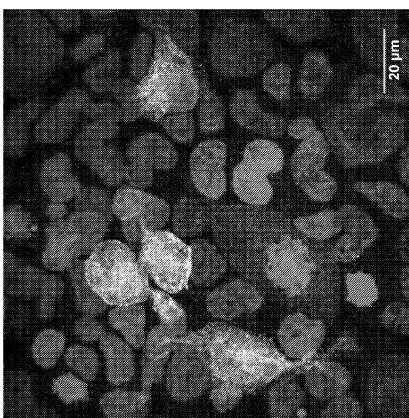


FIG. 15A

## 【配列表】

0006942789000001.app

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl. |        |           | F I                              |
|-------------|--------|-----------|----------------------------------|
| A 6 1 P     | 25/00  | (2006.01) | A 6 1 P    25/00                 |
| A 6 1 P     | 9/10   | (2006.01) | A 6 1 P    9/10                  |
| C 1 2 N     | 5/10   | (2006.01) | C 1 2 N    5/10                  |
| C 1 2 N     | 15/864 | (2006.01) | C 1 2 N    15/864    1 0 0 Z     |
| C 1 2 Q     | 1/6897 | (2018.01) | C 1 2 Q    1/6897              Z |
| C 0 7 K     | 14/405 | (2006.01) | C 0 7 K    14/405                |
| C 0 7 K     | 19/00  | (2006.01) | C 0 7 K    19/00                 |

(73)特許権者 509000747

アンスティトゥー ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ レシェルシュ メディカル(イエヌエスエールエム)

フランス国 エフ-75013 パリ リュ ドゥ トルビアック 101

(74)代理人 110000796

特許業務法人三枝国際特許事務所

(72)発明者 ブリュノー ディディエ

フランス国 21370 パック リュ デュ デシユ 2

(72)発明者 ドゥアール アンヌ

フランス国 75020 パリ リュ ヴィリエール ドゥ リスル-アダン 112

(72)発明者 ダルカラ デニズ

フランス国 94140 アルフォールビル リュ ヴィクトル ユゴー 15

(72)発明者 ドゥーベル イエンス

フランス国 75005 パリ リュ ドーバントン 26

(72)発明者 キャブレット ロマン

フランス国 75012 パリ リュ ドゥ ワティニー 03 エスカリエ イー 2イー エタージュ

(72)発明者 ゴーヴァン グレゴリー

フランス国 75013 パリ リュ ドュ ラ グラシエール 24

(72)発明者 デロシアーズ メリッサ

フランス国 75020 パリ リュ ドュ ラ レユニオン 24

(72)発明者 サヘル ホセ

フランス国 75012 パリ リュ モロー 17 アンスティトゥー デ ラ ビジョン

(72)発明者 ピコー セルジュ

フランス国 77210 アヴォン リュ レミ デュモンセル エヌ38

審査官 大島 彰公

(56)参考文献 國際公開第2013/071231 (WO , A1 )

Nat Methods. , 2014年 , Vol. 11, No. 3 , p. 338-346

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K、A 6 1 P、C 1 2 N、C 1 2 Q、C 0 7 K

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )