

(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 I

A 6 1 K 38/16	(2006.01)	A 6 1 K 38/16	Z N A
A 6 1 K 35/76	(2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 7
A 6 1 P 25/02	(2006.01)	A 6 1 P 25/02	1 0 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) 国際出願番号 PCT/IB2017/000663
 (87) 国際公開番号 W02017/187272
 (87) 国際公開日 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
 ジェンサイト バイオロジクス エスアー
 フランス国 75012 パリ リュ ド
 ウ フォーブール サン アントワヌ
 74
 (73) 特許権者 507416908
 ソルボンヌ・ユニヴェルシテ
 フランス国・75006・パリ・リュ ド
 ウ レコール ドゥ メドシーヌ・21
 (73) 特許権者 506316557
 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ
 ルシュ シアンティフィック
 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、td - Tomato (tdT) 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 tdT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、td - Tomato (tdT) 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 tdT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、td - Tomato (tdT) 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 tdT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、td - Tomato (tdT) 蛍光タ

10

20

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tdT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、td-Tomato(tdT)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tdT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、td-Tomato(tdT)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、td-Tomato(tdT)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tdT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8】

電氣的に活性の細胞を脱分極するための組成物であって、td-Tomato(tdT)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tdT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9】

網膜神経節細胞(RGC)を活性化するための組成物であって、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、請求項1に記載の組成物。

【請求項10】

前記Chrimsonタンパク質はChrimson88またはChrimsonR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(GFP)を含有しない、請求項10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、請求項10に記載の組成物。

【請求項13】

前記融合Chrimsonタンパク質の発現レベルは、前記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、請求項12に記載の組成物。

【請求項14】

前記ベクターはアデノ随伴ウイルス(AAV)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、請求項14に記載の組成物。

【請求項16】

前記AAVベクターはAAV2.7m8ベクターである、請求項15に記載の組成物。

【請求項17】

前記ベクターはCAG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

10

20

30

40

50

成物。

【請求項 18】

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 19】

td - Tomato (tdT) 蛍光タンパク質に融合した有効量の前記 *Chrimson* 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 20】

td - Tomato (tdT) 蛍光タンパク質に融合した前記 *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、請求項 19 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2016 年 4 月 29 日出願の米国仮出願第 62 / 329 , 692 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。

【0002】

本出願は、ASCII 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 ASCII の複製は、2017 年 4 月 28 日に作成され、名称 12295__0006 - 00304 . txt、大きさは 31 バイトである。

【技術分野】

【0003】

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 (RGC) を再活性化する方法であって、哺乳類に有効量の *Chrimson* 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 RGC 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、*Chrimson* 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 *tdTomato (tdT)* または緑色蛍光タンパク質 (GFP) である。

【背景技術】

【0004】

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与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、光情報伝達は光感受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。

【0005】

網膜色素変性 (RP) または黄斑変性 (MD) 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。

【0006】

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 (*Scholl*ら、2016、*Science Translational Medicine*、8 (368)、368rv6)。

【0007】

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, 2011) 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】

例えば、WO2007024391、WO2008022772またはWO2009127705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（例えば、チャンネルロドプシン - 2 [ChR2]；halorhodopsin [NpHR]）をコードする植物および微生物（例えば、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つのチャンネルロドプシン遺伝子由来の数多くのチャンネルロドプシンが、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ン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ReaChRなどの、設計赤方偏移チャンネルロドプシンは緑色 (~545 nm) にピーク波長感度を有する (Mattis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、前述のチャン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、天然のチャン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。WO2013071231は従って、新規のチャンネルロドプシン、ChronosおよびChrimsonを開示している。これらは互いに異なりまた最先端技術（例えば、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ンネルを発現させ、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、Chrimsonはこれまでのいかなるチャン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、他のチャン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

オブシンは、オブ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ブシンの細胞位置確認を変調させることができることが示されている。例えば、Arrenbergら(2009、PNAS、106(42)、17968-73)は同一のオブ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、tdTomato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、tdTomato蛍光タグでは確認されなかった(Madisenら、2012、Nat Neurosci.、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ブ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、Chrimsonタンパク質、より詳しくは、tdTomato(tdT)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ChrimsonR(ChrR)と呼ばれるその1つの特別な突然変異体が、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Chrimson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、Chrimson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Chrimsonタンパク質のプラズマ膜への細胞トラフィッキングを、Chrimson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Chrimson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、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。

【0015】

1つの局面では、本開示は、Chrimson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Chrimson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Chrimson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Chrimson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。

【0020】

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含む。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。

【0021】

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含む。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

【0022】

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

【0023】

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含む。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。

【0024】

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

【0025】

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含む。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

【0026】

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含む。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。

【0027】

さらに別の局面では、本開示は、電氣的に活性の細胞を脱分極する方法を含む。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、電氣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イルス(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霊長類である。本方法のいくつかの実施形態では、非ヒト霊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。

【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。

40

【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、電氣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 Chrimson88 または ChrimsonR である、方法を提供する。

【0044】

20

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。

【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、トラフィック、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イルス(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

【 0 0 5 3 】

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 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、方法を提供する。

【 0 0 5 4 】

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 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、方法を提供する。

【 0 0 5 5 】

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

【 0 0 5 6 】

実施形態 23 は、1 つまたはそれ以上の C h r i m s o n 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ポリヌクレオチドを備えた組成物を提供する。

【 0 0 5 7 】

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。

【 0 0 5 8 】

実施形態 25 は、哺乳類の網膜神経節細胞 (R G C) 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 / または電氣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 】

【 0 0 5 9 】

【 図 1 】 r d 1 マウスでのインビボの方法

【 図 2 A - 2 D 】 変性 r d 1 マウス網膜は C h r i m s o n R スペクトル感度に一致する波長 (w a v e l i g h t) の光におよび 10 m s より短い持続期間に応答する。図 2 A : 注射後 2 カ月の C h r R - t d T 発現 r d 1 マウスの眼底。図 2 B : M E A チップ上に載置した r d 1 マウス網膜の T d T 蛍光。図 2 C : C h r R 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 2 D : $1 e^{17}$ 光子 $c m^{-2} s^{-1}$ 、590 n m、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 - A P 4、C N Q X および C C P の混合の存在下で行われる。

30

【 図 3 A - 3 C 】 C h r i m s o n R は r d 1 マウスにおいて t d T と融合するとより効率的である。図 3 A : C h r R または C h r R - t d T 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 3 B : C h r R - t d T 発現網膜の応答 R G C の生データ、ラスタプロットおよび平均 P S T H (それぞれ上から下へ)。図 3 C : C h r R (n = 4 網膜、27 個の細胞) または C h r R - t d T (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 4 A - 4 G 】 神経節細胞での C h r i m s o n R の発現。r d 1 マウスの網膜神経節細胞 (R G C) での C h r R - t d T の発現。インビボでの A A V 感染後の C h r R - t d T の発現は R G C に大きく限定された。図 4 A、図 4 B および図 4 C : R G C 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 4 A : 内因性 t d T o m a t o の画像、免疫学的増幅なし。図 4 B : 我々のカスタムメイドの C h r R 抗体に対する標識化の画像。図 4 C : 両画像 (図 4 A および図 4 B) のオーバーレイ、t d T o m a t o および C h r R 抗体に対してそれぞれマジェンタおよびシアン。画像は 40 x 対物レンズで撮影。C h r R - t d T の発現は R G C 膜で濃縮される。図 4 D および図 4 E : 2 つの R G C (図 4 C 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映像、60 x 対物レン

50

ズで撮影。図 4 F および図 4 G : それぞれ図 4 D および図 4 E の細胞体に対する蛍光強度の 3 D 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 5 A - 5 D】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 5 A : 発現が注射後 10 カ月持続することを示す Chr R - td T の発現網膜の画像。図 5 B : 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プロット、下 平均 P T S H (ピン寸法 : 50 ms)。図 5 C : 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 5 D : 1×10^{17} 光子 $\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、590 nm、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 - A P 4、C N Q X および C P P の混合の存在下で行われる。

10

【図 6 A - 6 B】Chrimson R は P 23 H 網膜を活性化する。別の変性齧歯類モデル : P 23 H ラットについての多電極アレイ記録。図 6 A : 注射後 1 カ月での多電極アレイ上の P 23 H 網膜の蛍光画像。図 6 B : 1×10^{17} 光子 $\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、590 nm、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 - A P 4、C N Q X および C P P の混合の存在下で行われる。

【図 7】非ヒト霊長類でのインビボの方法。非ヒト霊長類 (macaca fascicularis) での Chr R 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 (Chr R) または融合タンパク質 Chrimson R - td - T o m a t o (Chr R - td T)、共に C A G 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 A A V 2 および突然変異体 A A V 2 - 7 m 8 (Dalkara ら、2013、Science Translational Medicine、5 (189) : 189 r a 76)。単一用量のウィルス (5×10^{11} v g / 目) の注射を M E A (512 アレイ、M C S) またはパッチクランプ (ポスター Chaffiol ら、アブストラクト 599 - B 0072 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 (L A P 4 50 μ M および C P P 10 μ M) の存在下で行った。

20

【図 8 A - 8 C】構築物のインビボ注射後、Chrimson R を中心窩周辺で発現させる。構築物のインビボ注射が傍中心窩環の R G C での発現に至る。図 8 A : 網膜外植片の赤外線画像、アステリスクが中心窩ピットのくぼみを示す。黒色ドットは M E A アレイの電極である。図 8 B : A A V 2 - 7 m 8 - Chr R - td T 構築物に感染した同じ網膜片の蛍光画像。発現は傍中心窩環に制限される。図 8 C : 図 8 A & 図 8 B 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、R G C での Chr R が記録された活性の源であることを示す。

30

【図 9 A - 9 G】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 9 A : 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 9 B : 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 9 C、図 9 D および図 9 E : 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 / cm^2 / 秒で上部での強度) への異なる網膜の応答を表す。図 9 F : 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 9 G : 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 600 nm で行われた。

40

【図 10 A - 10 D】A A V 2 - 7 m 8 - Chr R - td T に感染した網膜での増大する持続期間の傍中心窩 R G C 刺激への応答。A A V 2 - 7 m 8 - Chr R - td T 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窩 R G C の応答。図 10 A : 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 10 B : テストしたすべての期間に対する平均発火率。図 10 C : 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 10 D : 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 2×10^{17} 光子 $\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の強度、 $600 \pm 20 \text{ nm}$ で提供した。

【図11】ChrimsonR mRNAレベルでのtdTomatoの効果。RT-qPCR反応でのChrimsonR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ChrimsonRを表す；黄色およびオレンジ色のトレースはChrimsonR-tdTomatoを表す；暗いおよび明るい青色のトレースは非トランスフ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-ChrimsonR-tdTomato、pssAAV-CAG-ChrimsonRおよびpssAAV-CAG-ChrimsonR-GFPプラスミドでトランスフェクトさせたときのChrimsonRタンパク質のレベル。

【図13】ChrimsonRを発現する細胞数に及ぼすtdTomatoの効果。ChrimsonR陽性細胞の百分率は、非トランスフェクト対照群と比べた、プラスミド479 (ChrimsonR-tdTomato) および480 (ChrimsonR) でトランスフ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、2つの構築物によるトランスフェクション後のChrimsonR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ChrimsonRの細胞内局在性に及ぼすtdTomatoの効果。トランスフェクトさせた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ChrimsonRを白色で示す。図14AはChrimsonR-tdTomatoの局在性を示す；図14BはChrimsonR単独の分布を示す。スケールバー20 μm 。

【図15A - 15B】AAV感染後のHEK293T細胞でのChrimsonRの細胞内局在性に及ぼすtdTomatoの効果。トランスフェクトされた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ChrimsonRを白色で示す。図15AはChrimsonR-tdTomatoの局在性を示す；図15BはChrimsonR単独の分布を示す。スケールバー20 μm 。

【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うときに起こる、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患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患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。従って、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。従って、「視覚」は、光、好ましくは赤色光、より好ましくは約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590 nmの波長を有する光と接触すると起こり得る。

【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、単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。従って、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 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いう。Tatusova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。

【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産生する。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。

【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

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】

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365nmから約700nmの間、約530nmから約640nm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590nm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触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365nm、385nm、405nm、425nm、445nm、465nm、485nm、505nm、525nm、545nm、565nm、585nm、590nm、605nm、625nm、645nm、665nm、685nm、および700nm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590nmにピーク波長感度を有し、660nmまでスパイクを引き出し得る。

【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。

【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有；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（hydrophatic 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

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（ $+3.0 \pm 1$ ）；グルタミン酸（ $+3.0 \pm 1$ ）；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産生される。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回転ブ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プシンがさらに開示される（WO03084994）。

【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産生され得る。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、およびインビボ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。実際において、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ドプ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 Biotechnol、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。

【 0 0 9 7 】

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のまたは細胞特異的なプロモーターであり得る。細胞特異的なプロモーターの例としては、双極細胞の m G l u 6 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 C M V プロモーターまたは C A G プロモーターを含むがこれらに限定されない（C A G プロモーターは、チキンベータアクチンプロモーター（C B A ）および S V 4 0 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（C M V ）前初期エンハンサーである；A l e x o p o u l o u ら、B M C C e l l B i o l . 2 0 0 8 ; 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/または細胞特異的な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。

10

【 0 0 9 8 】

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。

20

【 0 0 9 9 】

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。

【 0 1 0 0 】

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 (i i) 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。

【 0 1 0 1 】

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。

30

【 0 1 0 2 】

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。

【 0 1 0 3 】

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 (i i) 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。

40

【 0 1 0 4 】

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。

【 0 1 0 5 】

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。

【 0 1 0 6 】

いくつかの好適な実施形態は、C A G 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。

【 0 1 0 7 】

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。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、ボックスウィルス(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ボ、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。

10

【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。

30

【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よりなる。

【0114】

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ChrimsonR（配列番号2）またはその機能性誘導体よりなる。

【0115】

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、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。

【0116】

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、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。

10

【0117】

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。

【0118】

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（RP）、黄斑変性（MD）、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。

20

【0119】

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。

30

【0120】

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、副腎髄質細胞、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。

40

【0121】

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（インビボ細胞）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。

【0122】

好適な実施形態では、標的細胞は哺乳類細胞であり電氣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（RGC）、ア

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。

【 0 1 2 3 】

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

【 0 1 2 4 】

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。

【 0 1 2 5 】

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

【 0 1 2 6 】

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。

【 0 1 2 7 】

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

【 0 1 2 8 】

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

【 0 1 2 9 】

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。

【 0 1 3 0 】

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。

【0131】

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、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。

【0132】

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、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。

10

【0133】

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。

【0134】

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。

20

【0135】

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。

【0136】

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 (660 nm) を使用することである。

30

【0137】

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。

【0138】

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。

40

【0139】

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、365 nm から 700 nm の範囲の光の波長で活性化、530 nm から 640 nm の範囲の光で最適な活性化、また 590 nm 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。

【0140】

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

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効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ン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ン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ン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。例えば、有効量は、光活性化イオンチャン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ン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ンネルポリペプチド（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。

10

【0141】

20

本発明の光活性化イオンチャンネルポリペプチド（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ン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ン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。

【0142】

30

本発明の光活性化イオンチャン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ン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。

【0143】

対象の細胞での光活性化イオンチャンネルポリペプチドのレベルを上げるため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ン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ン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ンネルポリペプチドのレベルを上げるため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、滑液嚢内、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ンネルポリペプチドレベルを上げるための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ン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ン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ン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ン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ン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ン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ン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ン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ン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ン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ン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ン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ン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ン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ン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ン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ンネル、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ができることは、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：rd1およびP23H変性齧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(RP)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。RP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】

RP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、RPの最初の徴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RP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。RPの処置はない。

【0161】

RP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、RP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(RGC)は以下の理由で魅力的な標的と思われる：1)RGC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)RGCは進行した網膜変性を患うRP患者の黄斑部で温存されて残っている、3)RP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)RGC光遺伝学治療のための臨床基準はOCT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。網膜組織の同様の变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】

チャンネルロドプシン2を用いたRGCの光遺伝学治療は、RPの齧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、RGC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AAV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rd1マウスの視覚回復のために網膜神経節細胞でのチャンネルロドプシン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、ChrimsonR(ChrR)、赤方偏移オプシンの使用について調査した。ChrimsonRは、ChrimsonまたはChrimson88とも呼ばれる微生物オプシンCnChR1の高度な形態であり、Chlamydomonas Noctigamaから単離された(Klapoetkeら、2014、上記参照)。Chrimson励起スペクトルは以前のチャンネルロドプシンに比べて45nmだけ赤方偏移している。ChrimsonRはChrimsonのK176R突然変異体であり、類似の励起スペクトルを示すが τ_{off} 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rd1マウスおよび盲目P23Hラットの視力回復のためのChrRの使用について調査した。

40

【0165】

本研究の間、我々はさらにChrRおよび構築物ChrimsonR-tdTomato(ChrR-tdT)の機能的有効性を比較した。

【0166】

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 (v g / m l)	注射量 (μ l)	v g / 目
433	AAV2. 7m8-ssCAG-ChrimsonR	2.25E+13	2	4.50E+10
432	AAV2. 7m8-ssCAG-ChrimsonR- tdTomato	1.54E+13	2	3.08E+10

10

【０１６９】

GS030__NC__PHAR__007研究のためのウィルス懸濁液は、滅菌2mlエッペンドルフ管にてPBS+0.001%Pluronic（登録商標）F68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PBS+0.001%Pluronic（登録商標）F68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】

20

すべての実験は、National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animalsに従って行った。プロトコルはLocal Animal Ethics Committeeにより承認され、欧州議会のDirective 2010/63/EU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 μ l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

30

【０１７３】

【表２】

	動物 ID	注射日	MEA日	発現時間
ChrimsonR	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
ChrimsonR- tdTomato	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

40

50

【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CO₂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(MEA256 100/30 iR-ITO; Multi-Channel Systems、Reutlingen、ドイツ)に対してそっと押し付けた。ChrR-tdT構築物により、電極アレイ上の網膜片でのtdTomato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、Düsseldorf、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、1~2ml/分の速度で、95%O₂および5%CO₂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、50μM、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。600nm(±15nm)に設定されSTG2008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 1.37×10^{14} から 6.78×10^{16} 光子・cm²・秒⁻¹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、 6.78×10^{16} 光子・cm²・秒⁻¹)を用いて、または600±20nm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1024×768)に投影される蛍光顕微鏡(X-cite、Lumen 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 2×10^{17} 光子・cm²・秒⁻¹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)。次に応答電極を各単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:1/200tdTomatoと共に希釈飽和溶液(BSA2.5%、Triton0.25%、Tween0.125%)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

トランスフェクト細胞の位置特定

ChrR-tdTの注射の5週間後、光遺伝学タンパク質、ChrRの発現がtdTomato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経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

【 0 1 7 8 】

M E A 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 C h r R および C h r R - t d T 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 R G C を記録した (図 2 B)。記録の成功率が蛍光レポーター、t d T o m a t o 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 2 B)。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 (F a r b e r 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)。

【 0 1 7 9 】

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 R G C 活性を示したときに記録を認証した (図 3 A)。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 R G C、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、C h r R を活性化させるために視覚刺激を高い光強度で生成した。C h r R - t d T を注射した 7 個の目のうち 6 個、および C h r R 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 3 A ~ 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、C h r R - t d T および C h r R 構築物ではそれぞれ 47% および 2% に達した (図 3 A)。これらの結果は、r d 1 マウスの R G C を感光性細胞に形質転換するためには C h r R - t d T は C h r R 構築物よりかなり効果的であることを示唆する。

【 0 1 8 0 】

可変光強度への感度

600 nm の光フラッシュを網膜組織に 1.37×10^{14} から 6.78×10^{16} 光子 $\cdot \text{cm}^2 \cdot \text{秒}^{-1}$ まで増大する光強度で 2 秒間当てた。図 2 C はそれぞれ C h r R - t d T および C h r R 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。

【 0 1 8 1 】

これらの図は、C h r R - t d T 構築物によって生成された応答 (図 3 C) は最高強度を含めすべての強度で C h r R 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、 2.34×10^{15} 光子 $\cdot \text{cm}^2 \cdot \text{秒}^{-1}$ で最初の顕著な活性を持つ、C h r R - t d T 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、 2.34×10^{15} 光子 $\cdot \text{cm}^2 \cdot \text{秒}^{-1}$ で C h r R - t d T 発現網膜での応答の閾値がより低いこと、および C h r R 構築物に対する 8.82×10^{15} 光子 $\cdot \text{cm}^2 \cdot \text{秒}^{-1}$ での活性化が確認される (図 3 C)。これらの観察により、C h r R 構築物は、C h r R - t d T 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。

【 0 1 8 2 】

波長感度

C h r i m s o n R 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 C h r i m s o n R 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 2 C) にわたる光刺激を行った。公表データ (K l a p o e t k e 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、C h r i m s o n R 活性のみに連結した光感受性と一致した。

【 0 1 8 3 】

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。C h r R - t d T を発現する細胞のほとんどは、t d T o m a t o によって標識されるそれらの軸

索によって示される網膜神経節細胞 (RGC) であった (図 4 A - C)。ChrR - tdT を発現する細胞の詳しい検討 (図 4 D - E) により、プラズマ膜でまたはその近くで tdTomato 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、TdTomato 関連蛍光は ChrImsonR 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、tdTomato 発現の領域で (図 5 A) 光刺激への主要な応答を産生した (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 5 C)。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 20 ms で安定期に達していた (図 5 D)。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ことが示された。

【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 - ChrImsonR - tdTomato) 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、非ヒト霊長類の網膜での 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霊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 ChrImsonR、赤方偏移オプシンは盲目齧歯類 (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 TdTomato 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。齧歯類と対照的に、AAV2 は非ヒト霊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 (Dalkara ら、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 tdTomato 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、非ヒト霊長類においてここに評価した。

【0189】

方法（図7参照）

霊長類網膜へと遺伝子送達

【0190】

使用したウイルス群

【0191】

【表3】

ロット 番号	製品名	希釈液		
		v g / m l	量	v g
432	AAV2-7m8-ssCAG- ChrimsonR-tdTomato	5 x 10 e + 1 2	400	2, 00 E + 1 2
433	AAV2-7m8-ssCAG- ChrimsonR	5 x 10 e + 1 2	400	2, 00 E + 1 2
434	AAV2-ssCAG-ChrimsonR- tdTomato	5 x 10 e + 1 2	400	2, 00 E + 1 2
435	AAV2-ssCAG-ChrimsonR	5 x 10 e + 1 2	400	2, 00 E + 1 2

10

【0192】

GS030研究のためのウイルス懸濁液は、滅菌2mlエッペンドルフ管にてPBS + 0.001% Pluronic（登録商標）F68において処方された既製の透明無色の液体とした。ウイルス懸濁液をPBS + 0.001% Pluronic（登録商標）F68とのストックウイルス懸濁液からの希釈によって作製した。

20

【0193】

ウイルス懸濁液を使用まで5 ± 3 で保管した。

【0194】

【表4】

ウイルス用量／目	注射経路	右目	左目
5 E 1 1 v g	硝子体内	AAV2-7m8-ChrimsonR	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

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CO₂非依存性培地（ThermoFisher Scientific）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。半側中心窩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Neurobasal + B27培地のポリカーボネートトランスウェル（Corning）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ポリリジン (0.1%、Sigma) 上に一晚置いた。極微操作装置上で一度、網膜片を電極に向けてMEA (MEA256 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% O₂ および5% CO₂ 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。AMPA/カ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。STG2008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 1.37×10^{14} から 6.78×10^{16} 光子・cm²・秒⁻¹ 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秒間与えて10回繰り返した。400から650nmまで10nmの波長帯域の刺激を2秒間に10nm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

トランスフ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、トランスフェクト細胞が、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) によりトランスフェクト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-ChrimsonR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。光パルスに網膜を加えると、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、AA

V2.7m8-ChrR-TdTを注射したすべての網膜 ($n = 4$) は応答電極があった一方で、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)。トランスフェクト細胞を位置特定する蛍光マーカーTdToma 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 1.37×10^{14} から 6.78×10^{16} 光子 $\cdot \text{cm}^2 \cdot \text{秒}^{-1}$ まで上げる光強度により600nm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ミリ秒ピ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 2.34×10^{15} 光子 $\cdot \text{cm}^2 \cdot \text{秒}^{-1}$ 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400Hz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でトランスフェクトさせた3個の網膜は、他のトランスフ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、単一网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(575nm)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、 1.34×10^{18} 光子 $\cdot \text{cm}^2 \cdot \text{秒}^{-1}$)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50ms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50ms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10A)。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10C)、および最初のスパイクまでの平均時間(図10D)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 - 20 - 50 - 100 Hz)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10Cは、追加発火率は1msの刺激に対して60%より多い電極で5Hzを越えたことを示す。100Hzを越える活性レベルを持つ同様の割合の電極(ほぼ70%)を得るためには、10ms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ったし、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(~200ミリ秒)は実際には細胞の低い自発スパイク率(~5Hz)に対応する(0.2~1ms、図10D)。より長い刺激持続期間(4~10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、10ms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AAV2.7m8-ChrR-tdT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。

【0203】

分析

3つの構築物(AAV2.7m8-ChrR-tdT、AAV2.7m8-ChrR、およびAAV2-ChrR-tdT)の、硝子体内注射後、光に感応しないRGC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。

【0204】

まず、我々のデータは、AAV2の硝子体内投与後の傍中心窩環内でのRGC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Dalkaraら(2013)に沿えば、感染率は明らかにAAV2.7m8の方が従来のAAV2の場合より強かった。MEA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RGCの600nm光への機能的応答を特徴付けた。結果から、AAV2.7m8-ChrR-tdTが、発現レベルおよび機能的活性の両方に関して、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。これに関して、ChrR-tdT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。AAV2.7m8-ChrRにより処置された4個の網膜のうち1個しか光に反応しなかったため、ChrRのtdTomato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。

【0205】

本研究において、我々はChrR-tdT設計のRGC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RGC中のChrRによって誘発される光電流の分析により、ChrR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。10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示された。光遺伝学タンパク質の作用スペクトルが確立され、Chrims on R-tdTomato構築物の最大応答が約575nm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AAV2.7m8-ChrR-tdTを選択することが可能である。

【0206】

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

非ヒト霊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

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%の合流でおよび流路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Alexafluorに結合する二次抗マウス抗体を用いた。

【0209】

HEK293T細胞培養

HEK293T(ATCC)(登録商標)CRL-3216TM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。

【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.polyplus-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。

【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

10

20

30

40

50

rimsonR (IDV__ロット752) により感染させた。24時間感染後の細胞を4% PFAで固定した。

【0212】

RT-qPCR

Nucleospin (登録商標) RNAキット (Macherey - Nagel) により細胞溶解物からRNA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。RNAをシリカ膜に連結させた。汚染DNAを噴霧およびDNaseの作用によって分解した。RNAを洗浄しRNAseを含まない水中で溶出した。RNA濃度および純度を、Nanodropを用いたUV分光分析によってアッセイした。1 kbサイズのマーカーの存在下で1% アガロースゲル上に1 µgを堆積させRNAの質を評価した。次にRNAを二次DNase: TURBO (登録商標) DNaseで処置し(反応あたりに2 UのTURBO DNaseを添加し次に室温(RT)で20~30分のインキュベーション)、RT-qPCRのために1 ngのRNAを使用した。一般的なオリゴdTプライマーを用いて逆転写を行った。Chrims on 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フォワード: GCTCTTTTCCAGCCTTCTT (配列番号9)、プライマーアクチンリバー: CTTCTGCA TCCTGTCAGCAA (配列番号10)、プライマーChrims on Rフォワード: ACACCTACAGGCGAGTGCTT (配列番号11)、プライマーChrims on Rリバー: TCCGTAAGAAGGGTCACACC (配列番号12) により特定のqPCR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qPCR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。RT-qPCR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。

【0213】

免疫組織化学

細胞をPBSですすぎ室温で10分間4%のPFA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BSA緩衝液を含むPBS)を室温で15分間添加した。次に細胞を、遮断緩衝液(10%のBSA、1%のTriton X-100、0.5%のTween)中で、1:1,000で希釈したChrims on R (0.59 mg/mL) に対して向けたマウスポリクローナル抗体によりRTで2時間インキュベートした。3回のPBS洗浄を行った。次に細胞を、AlexaFluor 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RT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。

【0214】

アレイ走査撮像および定量化

HEK293T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。Chrims on 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Hoechst核染色により5分間着色し次に洗浄してCellomics Array Scan VTI上で撮像した。画像を、浜松ORCA-ERデジタルカメラを用いて10x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Cellomics View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、Graphpad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。

【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FII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単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】

結果

RT-qPCR

RNAをトランスフ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ChrimsonR-tdTomato(479)に比べてChrimsonR(480)でトランスフェクトさせた細胞内の方がChrimsonR mRNAの量が多いことを検出した。トランスフェクションはChrimsonRおよびChrimsonR-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ChrimsonR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ChrimsonRまたはChrimsonR-tdTomatoでトランスフェクトさせ、タンパク質発現を顕微鏡により追跡した。

【0217】

図11は、pssAAV-CAG-ChrimsonR-tdTomato、pssAAV-CAG-ChrimsonRおよびpssAAV-CAG-ChrimsonR-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。ChrimsonR-tdTomatoの発現はChrimsonR単独およびChrimsonR-GFPの一方より僅かに低いと思われる。

【0218】

これに対して、ChrimsonRタンパク質のレベルは、pssAAV-CAG-ChrimsonRプラスミドよりむしろpssAAV-CAG-ChrimsonR-tdTomatoおよびpssAAV-CAG-ChrimsonR-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-ChrimsonR-tdTomatoおよびpssAAV-CAG-ChrimsonRでトランスフェクトさせた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、ChrimsonRのレベルは、ChrimsonRがtdTomatoまたはGFPに融合したときより高かったことを示す。

【0220】

図12は、HEK293細胞のpssAAV-CAG-ChrimsonR-tdTomato、pssAAV-CAG-ChrimsonRおよびpssAAV-CAG-ChrimsonR-GFPプラスミドによるトランスフェクションを行ったときのChrimsonR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ChrimsonR

10

20

30

40

50

(480) 対ChrimsonR - tdTomato (479) プラスミドでトランスフェクトさせたサンプルの抗ChrimsonR抗体標識の後の蛍光細胞をカウントした。tdTomatoに融合したまたは融合していないChrimsonR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、tdTomatoの存在または不在に拘わらず同じ数の細胞がChrimsonR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ChrimsonR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tdTomatoの存在または不在下でのChrimsonR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ChrimsonR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ChrimsonRの分布の代表画像を得た。これらのデータは、ChrimsonR対ChrimsonR - tdTomatoの細胞内位置特定が有意に異なることを示す。ChrimsonR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ChrimsonR - tdTomato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、ChrimsonR発現プラスミド(480)でトランスフェクトさせた細胞は、ChrimsonR - tdTomato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、tdTomatoと融合したまたは融合していないChrimsonR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、ChrimsonR - tdTomatoはChrimsonR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。ChrimsonR - tdTomatoは細胞内に広く分布した一方で、ChrimsonR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。tdTomatoは大きな可溶タンパク質である一方ChrimsonR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、tdTomatoは実際に光遺伝学タンパク質の溶解性を改善し、ChrimsonRのC末端に融合タンパク質として含めるとChrimsonR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 25 30

20

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

35 40 45

【 0 2 2 6 】

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

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

10

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

20

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

30

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

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

40

【 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 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

【 0 2 2 8 】

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

245 250 255

10

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

20

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

30

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 Glu Asp Glu Asp Thr Val

340 345 350

40

【 0 2 3 1 】

<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 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

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

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 Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu
325 330 335

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

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

【 0 2 3 4 】

10

20

30

40

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

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

10

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

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

20

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 】

<400> 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

【 0 2 3 6 】

130 135 140

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
145 150 155 160

Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val 10
165 170 175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
180 185 190

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser 20
195 200 205

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
210 215 220

Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys 30
225 230 235

<210> SEQ ID NO: 5 ChromsonR tdT

Fusion protein comprising 350 aa from Chromson R/ 6aa from linker and 475 aa from TdI

<211> 831

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

40

【 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

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

20 25 30

10

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

35 40 45

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

50 55 60

20

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

65 70 75 80

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

85 90 95

30

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

40

【 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

10

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

20

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

30

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

40

【 0 2 3 9 】

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

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

10

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 Glu Asp Glu Asp Thr Val Ala Ala
340 345 350

20

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

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

30

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 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

435 440 445

10

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 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
 580 585 590

10

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
 610 615 620

20

Phe Glu Ile Glu Gly 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
 645 650 655

30

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 Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly
 675 680 685

40

【 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

Lys Met Arg Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asp Gly Pro Val Met Gln Lys
 725 730 735

10

Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Arg Leu Tyr Pro Arg Asp
 740 745 750

Gly Val Leu Lys Gly Glu Ile His Gln Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly
 755 760 765

20

Gly His Tyr Leu Val Glu Phe Lys Thr Ile Tyr Met Ala Lys Lys Pro
 770 775 780

Val Gln Leu Pro Gly Tyr Tyr Tyr Val Asp Thr Lys Leu Asp Ile Thr
 785 790 795 800

30

Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ser Glu
 805 810 815

Gly Arg His His Leu Phe Leu Tyr Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 820 825 830

40

【 0 2 4 3 】

<210> SEQ ID NO: 6 ChrimsonR-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 tgcacagcag cggcaccaga tctctgtttg ccgccggagg catcaacct 60

tggcctaacc cctaccacca cgaggacatg ggctgtggag gaatgacacc tacaggcgag 120

tgttcagca ccgagtgggt gtgtgacct tctacggac tgagcgacgc cggatacggg 180

20

tattgctteg tggaggccac aggcggctac ctggctgtgg gaggggagaa gaagcaggct 240

tggctgcaca gcagaggcac accaggagaa aagatcggcg ccaggtctg ccagtggatt 300

gcttcagca tcgccatgc cctgtgaca ttctacggct tcagcgctg gaaggccact 360

tgcggttggg aggaggtcta cgtctgttc gtcgaggtgc tgttcgtgac cctggagatc 420

30

ttcaaggagt tcagcagccc cgccacagtg tacctgtcta ccggcaacca cgcctattgc 480

ctgcgtact tcgagtggt gctgtcttc cccgtgatcc tgatcagact gagcaacctg 540

agcgccctga agaacgacta cagcaagcgg accatgggcc tgatcgtgc ttgcgtggga 600

atgatcgtgt tcggcatggc cgcaggactg gctaccgalt ggclcaagtg gctgctgtat 660

【 0 2 4 4 】

40

atcgtgtctt gcattctacgg cggctacatg tacttccagg ccgccaagtg ctacgtggaa	720	
gccaaccaca gcgtgcctaa aggccattgc cgcattggtc tgaagctgat ggcctacgt	780	
tacttgcct ctggggcag ctaccaatc ctctgggcag tgggaccaga aggactgctg	840	
aagctgagcc ctacgcaa cagcatggc cacagcatc gcgacatcat cgccaaggag	900	
tttggacct tctggccca ccacctgagg atcaagatcc acgagcacat cctgatecc	960	10
ggcgacatcc ggaagaccac caagatggag atcggaggcg aggaggtgga agtgaagag	1020	
ttcgtggagg aggaggacga ggacacagtg gcggcaccgg tagtagcagt gagtaagggc	1080	
gaggaagtga tcaaagagtt catgcggtt aaggtgagaa tggaaaggaag catgaacggc	1140	
cacgagttcg aaattgaggg agaaggagag ggacggccct acgagggcac ccagacagcc	1200	20
aagctgaaag tgacaaaggg cgggcctctg ccattcgctt gggacatcct gagccacag	1260	
tttatgtacg gctccaaggc ctatgtgaaa catccagctg acattcccga ttataagaaa	1320	
ctgagcttcc ccgaggggtt taagtgggaa agagtgatga acttcgagga cggaggcctg	1380	
gtgactgtga cccaggacag ctccctgcag gatgggacce tgatctacaa ggtgaaaatg	1440	30
agagggacaa atttcccc tgatggacct gtgatgcaga agaaaactat gggatgggag	1500	
gcctccaccg aaaggctgta tccacgcgac ggggtgctga aaggagaaat ccaccaggct	1560	
ctgaagctga aagatggggg acattacctg gtggagtca agacaatcta catggccaag	1620	
aaacctgtgc agctgccagg ctactattac gtggacacaa aactggatat cacttcacac	1680	40
aacgaggact acactattgt ggagcagtat gaacggagcg aggggagaca ccattcttc	1740	

ctgggccatg ggactggaag taccggctca gggctagtg gaaccgcctc aagcgaggat 1800

aacaatatgg ctgtgatcaa agagttcatg aggtttaagg tgcgcatgga gggcagcatg 1860

aatgggcacg aatttgagat tgaaggagag ggcgaaggga ggccttacga gggcacacag 1920

actgccaagc tgaagtgaac caaggaggga cactgcctt tcgcttgga tatectgtct 1980

cctcagtta tttacggaag taaggcctat gtaagcatc ccgctgacat tctgattac 2040

10

aagaaactgt cttccacaga gggctttaag tgggagagag tgatgaattt tgaagatgga 2100

ggcctgggta ccgtgacaca ggactcctct ctgcaggatg gcactctgat ctacaaagtc 2160

aaaatgcgcg gcaccaattt tccaccgat gggcccgta tgcagaagaa aacaatgggg 2220

tgggaggcca gcactgaacg gctgtatcct agagacggag tgcgaaggg cgaaatccac 2280

20

caggccctga agctgaaaga cggcggccac tacctgggtg agtcaaaac catctacatg 2340

gccaagaaac cagtgcagct gcccggctat tactatgtgg acaccaagct ggatatcaca 2400

tcccacaatg aagaclacac cattgtggaa cagtatgaga ggtctgaagg acgccacat 2460

ctgtttctgt acggcatgga tgagctgtat aagtaa 2496

30

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

<211> 4166

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

【 0 2 4 6 】

<221> source

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

<400> 7

cctgcaggca gctgcgcgct cgtcgtctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggteggccg gcctcagtg ggcagcgagc gcgcagagag ggagtgccca 120

actccatcac taggggttcc tgcggccgca cgcgtcgttg tacctctggt cgttacataa 180

cttacggtaa atggcccgc tggctgaccg cccaacgacc ccgcccatt gacgtcaata 240

atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag 300

tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacccc 360

cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta catgacctta 420

tgggacttcc ctacttggea gtacatctac tegaggccac gttctgcttc actctcccca 480

tctccccccc cctccccacc cccaatttfg tatttattta tttttaatt attttgtgca 540

gcgatggggg cggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg gggcggggcy gggcgagggg 600

cggggcgagg cggagagggtg cggcggcagc caatcagagc ggcgcgtcc gaaagttcc 660

tttatggcg aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcggg 720

agcgggatca gccaccgcgg tggcgcccta gagtcgacga ggaactgaaa aaccagaaag 780

ttaactggta agtttagtct tttgtcttt tatttcaggt cccggatccg gtggtggtgc 840

aaateaaaga actgtctctc agtggatggt gcctttactt ctaggcctgt acggaagtgt 900

【 0 2 4 7 】

tacttetgct ctaaaagctg cgggaattgta cccgcggcgg atccaccggt cgcacgata	960	
ttctgagccg ccaccatggc tgagctgate agcagcgcca ccagatctct gtttgcggcc	1020	
ggaggcatca acccttggcc taacccttac caccacgagg acatgggctg tggaggaaatg	1080	
acacctacag gcgagtgcct cagcaccgag tgggtggtgtg acccttctta cggactgagc	1140	
gacgccggat acggatatlg ctctgtggag gccacaggcg gctacctggt cgtgggagtg	1200	10
gagaagaagc aggcttggct gcacagcaga ggcacaccag gagaaaagat cggcgcccg	1260	
gtctgccagt ggatlgctt cagcatcgcc atgccttgc tgacattcta cggttcagc	1320	
gcctggaagg ccacttgcgg ttgggaggag gtctacgtct gttgcgtcga ggtgctgtc	1380	
gtgacctgg agatcttcaa ggagttcagc agccccgcca cagtgtacct gtctaccggc	1440	20
aaccacgctt attgcctgcg ctacttcgag ttgctgctgt ctgccccgt gatectgate	1500	
agactgagca acctgagcgg cctgaagaac gactacagca agcggaccat gggcctgate	1560	
gtgtcttgcg tgggaatgat cgtgttcggc atggccgcag gactggctac cgattggctc	1620	
aagtggctgc tgtatctgt gtcttgcatc tacggcggtt acatgtactt ccaggccgcc	1680	30
aagtgtacg tggaagccaa ccacagcgtg cctaaaggcc attgccgcat ggtcgtgaag	1740	
ctgatggcct acgcttactt cgcctcttgg ggcagctacc caatctctg ggcagtggga	1800	
ccagaaggac tgctgaagct gageccttac gccaacagca tcggccacag catctgcgac	1860	
atcatcgcca aggagtfttg gaccttctg gccaccacc tgaggatcaa gatccacgag	1920	40
cacatctga tccacggcga catccggaag accaccaaga tggagatcgg aggcgaggag	1980	

gtggaagtgg aagagttcgt ggaggaggag gacgaggaca cagtggcggc accggtagta 2040

gcagtgagta agggcgagga agtgalcaaa gagtcatgc ggtttaaggt gagaatggaa 2100

ggaagcatga acggccacga gttcgaaatt gagggagaag gagagggacg gccctacgag 2160

ggcaccacga cagccaagct gaaagtgaca aaggcggggc ctctgccatt cgttgggac 2220

atcctgagcc cacagtttat gtacggctcc aaggcctatg tgaacatcc agctgacatt 2280 10

cccgattata agaaactgag ctccccgag ggglttaagt gggaaagagt gatgaacttc 2340

gaggacggag gcctgggtgac tgtgaccag gacagctccc tgcaggatgg gacctgate 2400

tacaaggtga aaatgagagg gacaaatftt cccctgatg gacctgtgat gcagaagaaa 2460

actatgggat gggaggcctc caccgaaagg ctgtatccac gcgacggggt gctgaaagga 2520 20

gaaatccacc aggtctgaa gctgaaagat gggggacatt acctggtgga gttcaagaca 2580

atctacatgg ccaagaaacc tgtgcagctg ccaggctact attacgtgga cacaaaactg 2640

gatatcactt cacacaacga ggactacact attgtggagc agtatgaacg gagcgagggg 2700

agacaccatc tgttctggg ccatgggact ggaagtaccg gctcagggtc tagtgaacc 2760 30

gcctcaagcg aggataacaa tatggctgtg atcaaagagt tcatgaggtt taagggtcgc 2820

atggagggca gcatgaatgg gcacgaattt gagattgaag gagagggcga agggaggcct 2880

tacgagggca cacagactgc caagctgaaa gtgaccaagg gaggaccact gccittcgt 2940

tgggatatcc tgtctctca gtttatgtac ggaagtaagg cctatgtcaa gcacccgct 3000 40

gacattcctg attacaagaa actgtctttc ccagagggct ttaagtggga gagagtgatg 3060

aattttgaag atggaggcct ggtgaccgtg acacaggact cctctctgca ggalggcact 3120

ctgatctaca aagtcaaaat gcgcggcacc aattttccac ccgatgggcc cgtgatgcag 3180

aagaaaacaa tgggggtggga ggccagcact gaacggctgt atcctagaga cggagtgctg 3240

aagggcgaaa tccaccagge cctgaagctg aaagacggcg gccactacct ggtggagtgc 3300

10

aaaaccatct acatggccaa gaaaccagtg cagctgcccc gctattacta tgtggacacc 3360

aagctggata tcacatccca caatgaagac tacaccattg tggaacagta tgagaggtct 3420

gaaggacgcc accatctgtt tctgtacggc atggatgagc tgtataagta aagaagcttg 3480

cctcgagcag cgtctctcga gagatctacg ggtggcatcc ctgtgacccc tccccagtgc 3540

20

ctctctgge cctggaagtt gccactccag tgcccaccag cctgtccta ataaaattaa 3600

gttgccatct tttgtctgac taggtgtcct tctalaatat tatgggggtgg aggggggtgg 3660

tatggagcaa ggggcaagtt gggaagacaa cctgtagggc ctgcggggtc tattgggaac 3720

caagctggag tgcagtggca caatcttggc tcactgcaat ctccgcctcc tgggttcaag 3780

30

cgattctctt gccacagct cccagttgt tgggattcca ggcatgcatg accaggetca 3840

gctaattttt gtttttttgg tagagacggg gtttaccat attggccagg ctggtctcca 3900

actctaate tcaggtgate taccacett ggctcccaa attgtggga ttacaggcgt 3960

gaaccactgc tcccttccct gtccttctga tttgtaggt aaccacgtgc ggaccgagcg 4020

40

ggcgaggaa cccctagtag tggagttgce cactccctct ctgcgcgctc gctcgetcac 4080

tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgcgc cccgggcttt gcccgggcgc cctcagtgcg 4140

cgagcgagcg cgcagctgcc tgcagg 4166

<210> SEQ ID NO: 8

<211> 783

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<221> source

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

<400> 8

cgttacataa ctacggtaa atggccgcgc ttgctgaccg cccaacgacc cccgccatt 60

20

gacgtcaata atgacgtatg tteccatagt aacgccataa gggactttcc attgacgtca 120

atgggtggag tatttacggg aaactgccca ctgggcagta catcaagtgt atcatatgcc 180

aagtaacccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta 240

catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac tcgaggccac gttctgttc 300

30

actctcccca tctccccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta tttttaatl 360

attttgtgca gcgatggggg cggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg gggcggggcg 420

gggcgagggg cggggcgagg cggagagggt cggcggcagc caatcagagc ggcgcgtcc 480

gaaagtltcc tttatggcg aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc 540

40

【 0 2 5 1 】

ggcgggcgagg agcgggatca gccaccgcgg tggcggccta gagtcgacga ggaactgaaa 600

aaccagaaag ttaactggta agtttagtct tttgtcttt tatltcaggt cccggatccg 660

gtggtggtgc aaatcaaaga actgtctctc agtggatgtt gcctttactt ctaggcctgt 720

acggaagtgt tacttctgct ctaaaagctg cggaattgta cccgcggccg atccaccggt 780

cgc

783

10

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.

CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTCACG
TCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGG
AGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
TATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGAC
TTTCCTACTTGGCAGTACATCTACTCGAGGCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCC
CCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGG
GGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGG
TGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGG
CGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGCGGGATCAGCCACCGCGGTGGCGG
CCTAGAGTCGACGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTT
TATTTCAAGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCT
TTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGC
CGATCCACCGGTCGC

20

<210> SEQ ID NO: 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<221> source

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

<400> 9

gctcttttcc agccttctct

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

cttctgcac ctgtcagcaa

20

<210> SEQ ID NO: 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<221> source

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

<400> SEQ ID NO: 11

acacctacag gegagtgtt

20

30

<210> SEQ ID NO: 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

40

【 0 2 5 3 】

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

<400> 12

tccgtaagaa gggtcacacc

20

<210> SEQ ID NO: 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

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

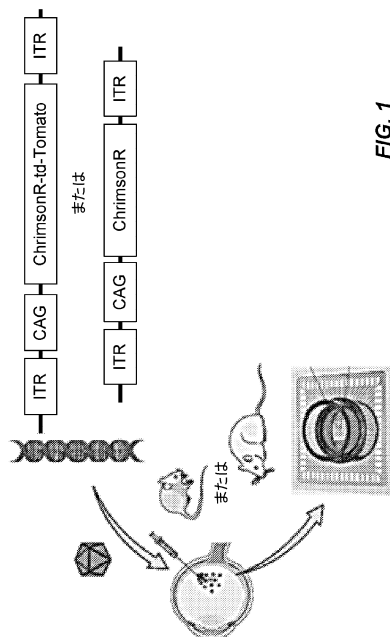
<400> 13

Lys Asp Glu Leu

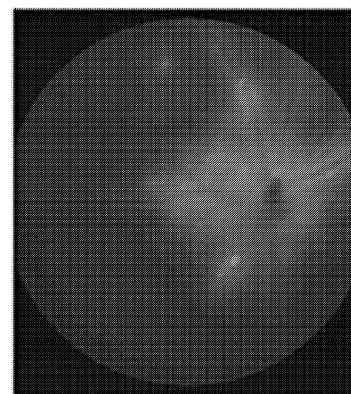
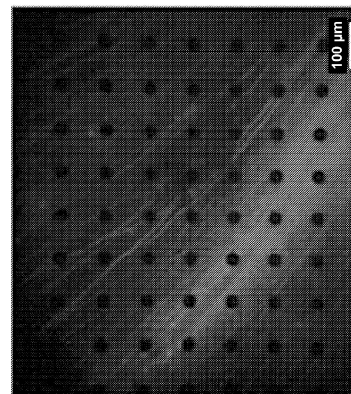
10

20

【 図 1 】



【 図 2 A - B 】



【図 2 C】

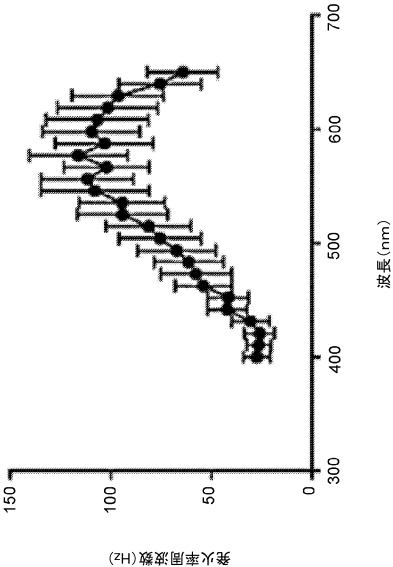


FIG. 2C

【図 2 D】

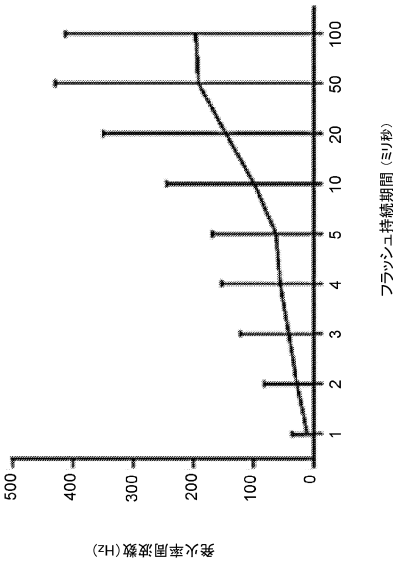


FIG. 2D

【図 3 A - B】

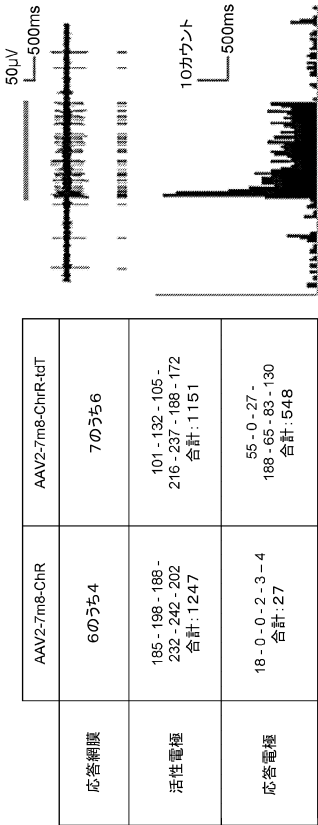


FIG. 3A

【図 3 C】

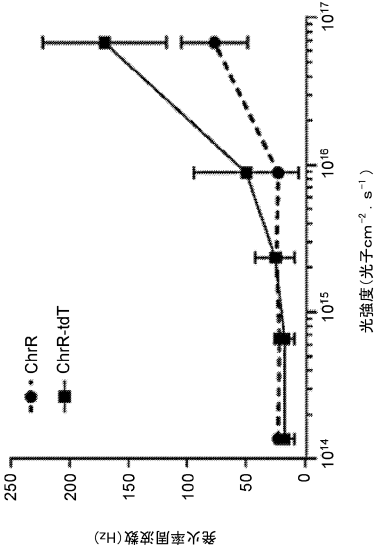
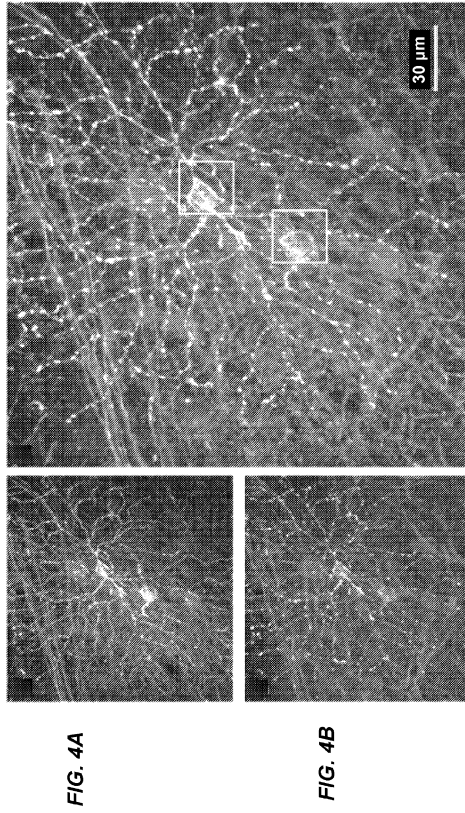
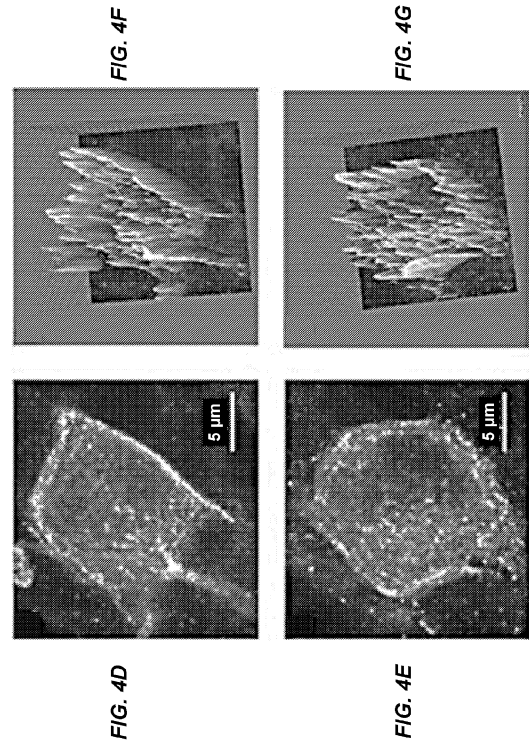


FIG. 3C

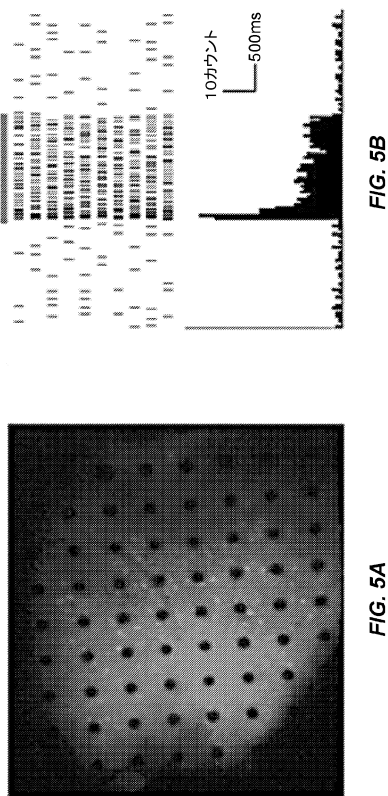
【図 4 A - C】



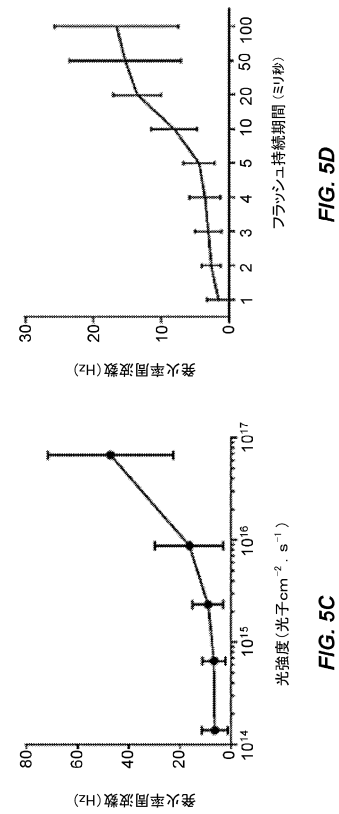
【図 4 D - G】



【図 5 A - B】



【図 5 C - D】



【図 6 A - B】

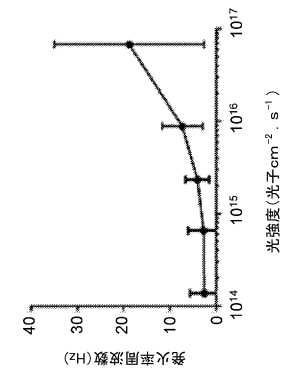


FIG. 6B

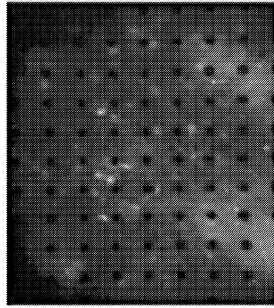


FIG. 6A

【図 8 A - B】

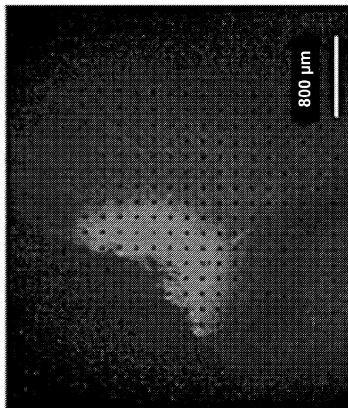


FIG. 8B

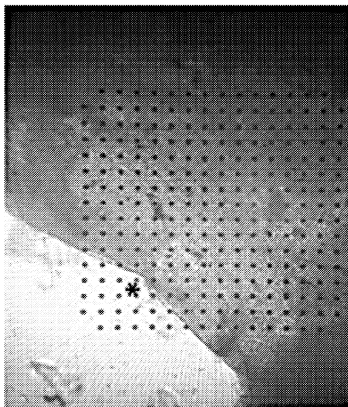


FIG. 8A

【図 7】

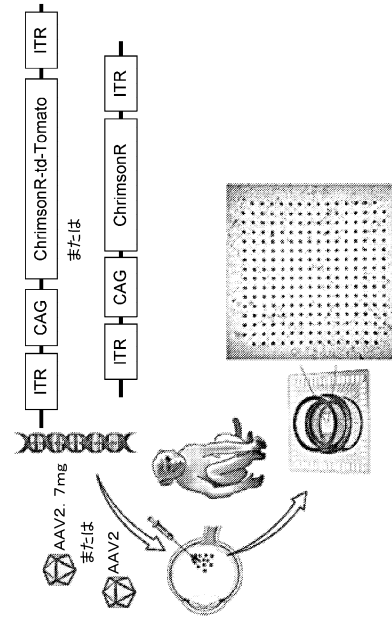


FIG. 7

【図 8 C】

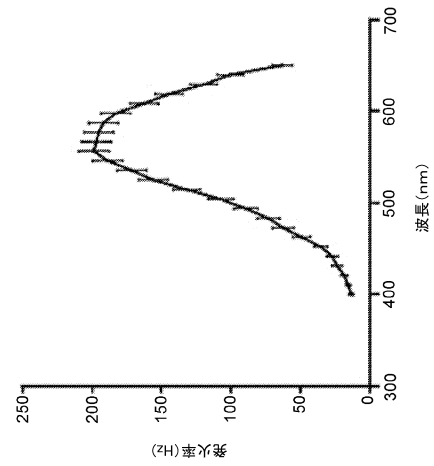
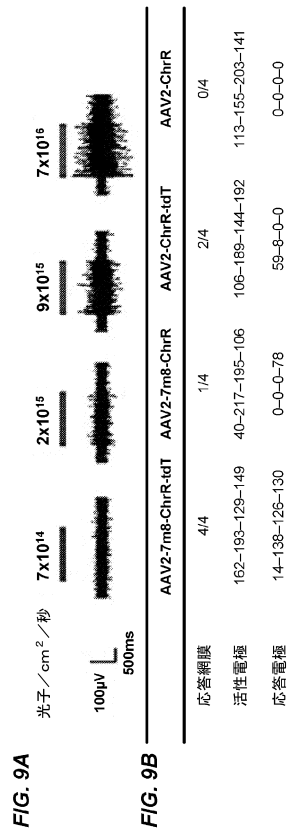
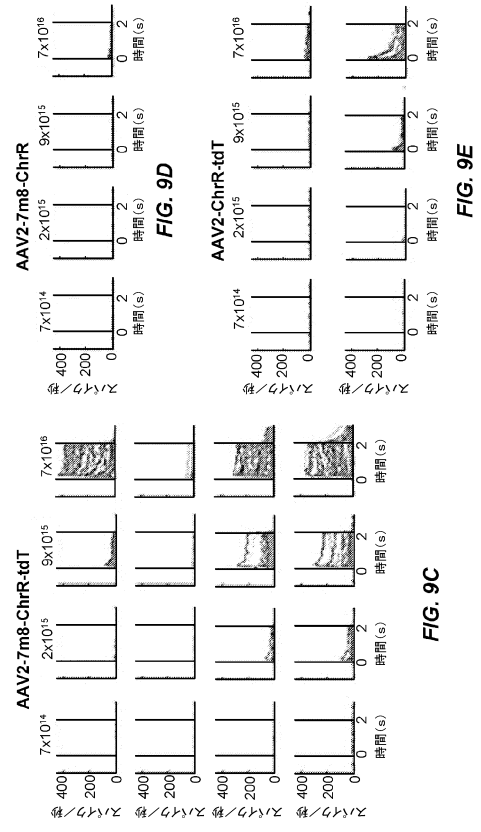


FIG. 8C

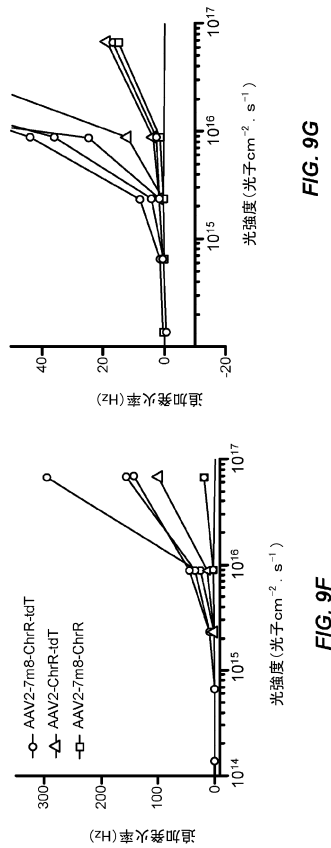
【図 9 A - B】



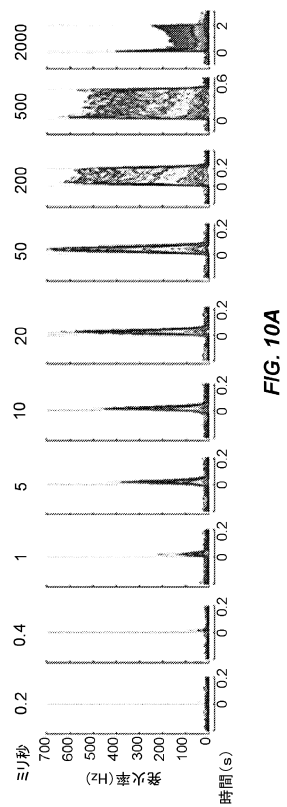
【図 9 C - E】



【図 9 F - G】



【図 10 A】



【図10B】

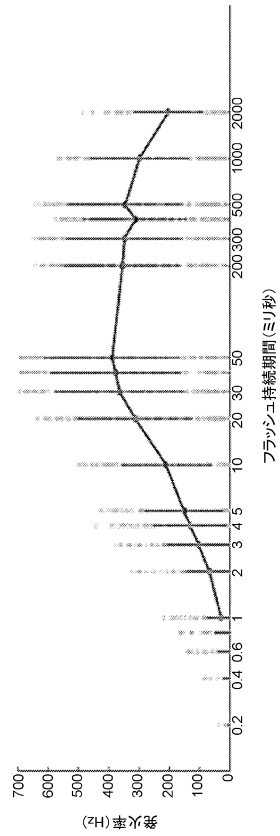


FIG. 10B

【図10C】

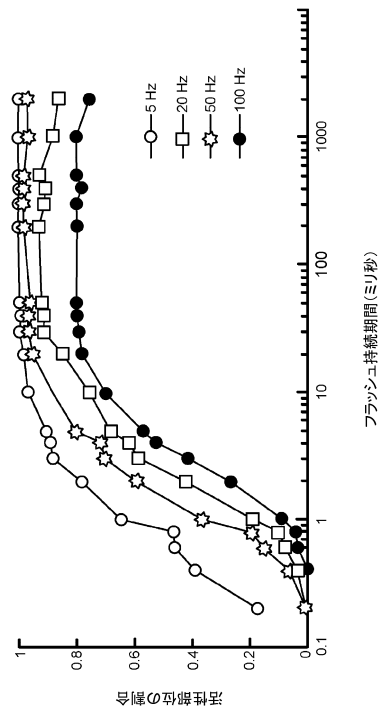


FIG. 10C

【図10D】

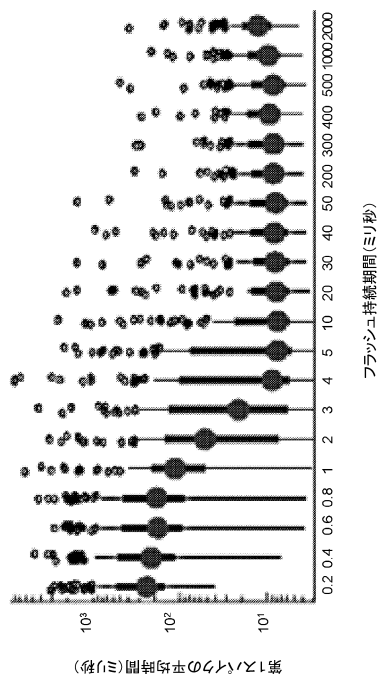


FIG. 10D

【図11】

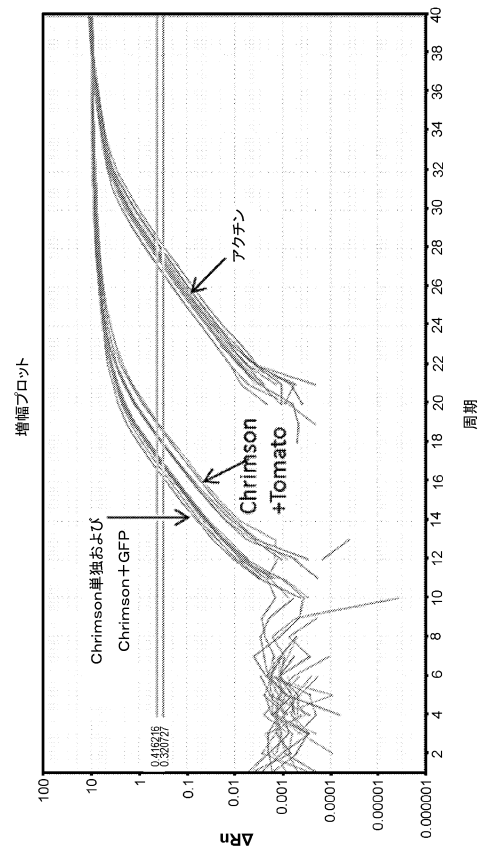


FIG. 11

【図 1 2 A】

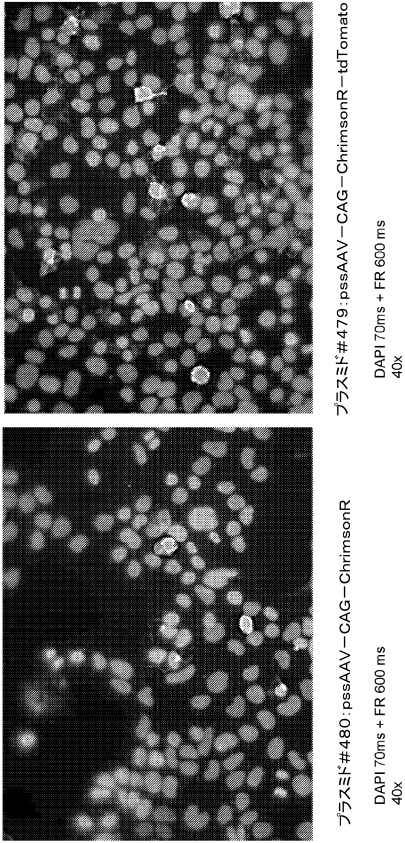


FIG. 12A

【図 1 2 B】

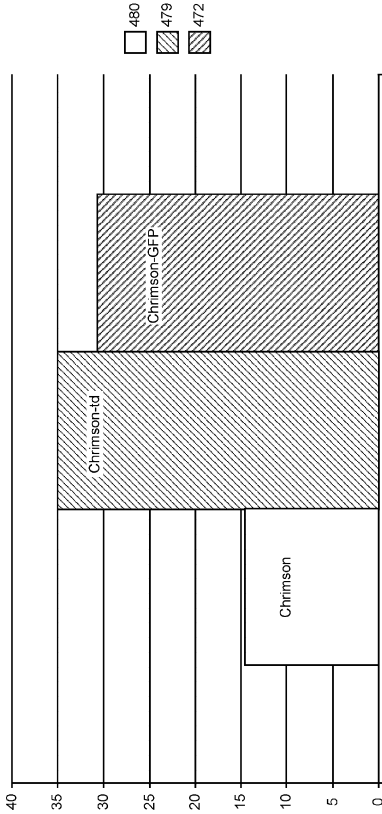


FIG. 12B

【図 1 3】

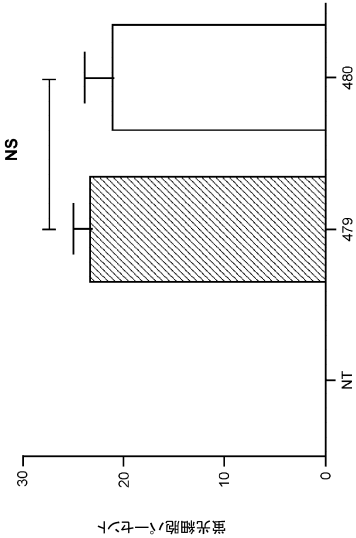


FIG. 13

【図 1 4 A - B】

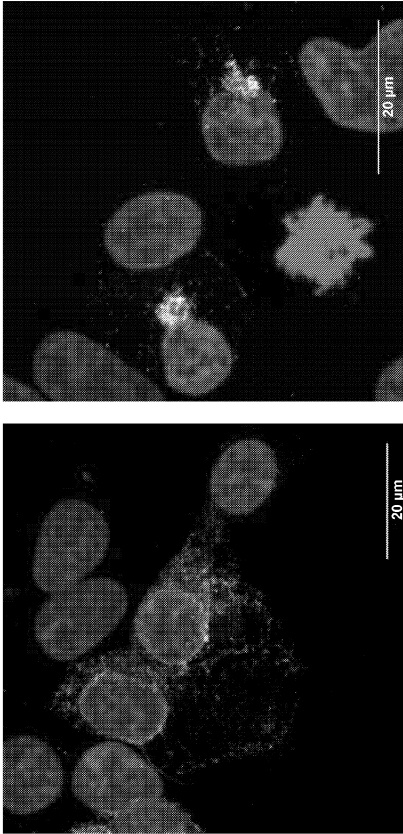


FIG. 14A

FIG. 14B

【図 15 A - B】

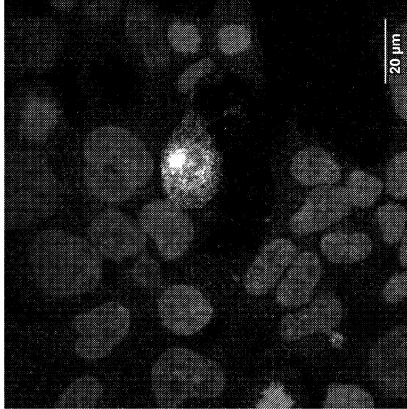


FIG. 15B

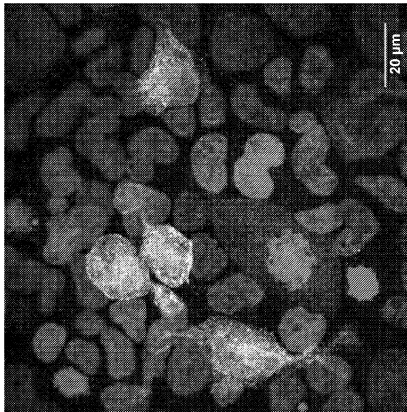


FIG. 15A

【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

アンステイトゥー 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 (イイエスエエールエム)

フランス国 エフ - 7 5 0 1 3 パリ リュ ドゥ トルビアック 1 0 1

(74)代理人 110000796

特許業務法人三枝国際特許事務所

(72)発明者 プリュノー ディディエ

フランス国 2 1 3 7 0 バック リュ デュ デシュ 2

(72)発明者 ドゥアール アンヌ

フランス国 7 5 0 2 0 パリ リュ ヴィリエール ドゥ リスル - アダン 1 1 2

(72)発明者 ダルカラ デニス

フランス国 9 4 1 4 0 アルフォールビル リュ ヴィクトル ユゴー 1 5

(72)発明者 ドゥーベル イェンス

フランス国 7 5 0 0 5 パリ リュ ドーバントン 2 6

(72)発明者 キャブレット ロマン

フランス国 7 5 0 1 2 パリ リュ ドゥ ワティニー 0 3 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 7 5 0 1 3 パリ リュ ドゥ ラ グラシエール 2 4

(72)発明者 デロシアーズ メリッサ

フランス国 7 5 0 2 0 パリ リュ ドゥ ラ レユニオン 2 4

(72)発明者 サヘル ホセ

フランス国 7 5 0 1 2 パリ リュ モロー 1 7 アンステイトゥー デ ラ ビジョン

(72)発明者 ピコー セルジュ

フランス国 7 7 2 1 0 アヴォン リュ レミ デュモンセル エヌ 3 8

審査官 大島 彰公

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 0 7 1 2 3 1 (WO, A 1)

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)