

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和4年1月6日(2022.1.6)

【公表番号】特表2021-503934(P2021-503934A)

【公表日】令和3年2月15日(2021.2.15)

【年通号数】公開・登録公報2021-007

【出願番号】特願2020-529489(P2020-529489)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/12	(2006.01)
C 1 2 N	15/86	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/12	Z N A
C 1 2 N	15/86	Z
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	

【手続補正書】

【提出日】令和3年11月22日(2021.11.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

網膜色素上皮の細胞中の遺伝子の発現のための、単離核酸分子の使用であって、前記単離核酸分子は、配列番号1の前記核酸配列と少なくとも80%の同一性を有する少なくとも1000塩基対の核酸配列を含み、前記遺伝子をコードする核酸配列が前記単離核酸分子に作動可能に結合している場合、前記網膜色素上皮の細胞中の遺伝子の発現を駆動するのに有効である、使用。

【請求項2】

前記単離核酸分子は、配列番号1の前記核酸配列と少なくとも95%の同一性を有する少なくとも1000塩基対の核酸配列を含む、請求項1に記載の使用。

【請求項3】

前記単離核酸分子は、配列番号1の前記核酸配列を含む、請求項1に記載の使用。

【請求項4】

前記網膜色素上皮の細胞は、靈長類の細胞である、請求項1に記載の使用。

【請求項5】

前記遺伝子が前記単離核酸分子に作動可能に結合している、請求項1に記載の使用。

【請求項6】

前記単離核酸分子に作動可能に結合している前記遺伝子が、ハロロドシン、チャネルロドシン、MT-ND4、MT-ND1、MT-ND6、MT-CYB、MT-CO3、MT-ND5、MT-ND2、5MT-COI、MT-ATP6、MT-ND4L、OP

A 1、O P A 3、O P A 7、A C O 2、G D N F、C N T F、F G F 2、B D N F、E P O、B C L 2、B C L 2 L 1、エンドスタチン、アンギオスタチン、s F l t、I L 1 0、I L 1 R 1、T G F B I、I L 4、及び桿体由来錐体生存因子（R d C V F）からなる群から選択される、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記単離核酸分子は、最小プロモーター配列を更に含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 8】

前記最小プロモーター配列は、配列番号 2 の核酸配列を含む、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

網膜色素上皮の細胞中の遺伝子の発現のための発現力セットの使用であって、前記発現力セットは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 80 % の同一性を有する少なくとも 100 塩基対の核酸配列を含む単離核酸分子、及び前記網膜色素上皮の細胞における発現のための遺伝子をコードする核酸配列を含み、前記遺伝子をコードする前記核酸配列が前記単離核酸分子に作動可能に結合している、使用。

【請求項 10】

前記単離核酸分子は、配列番号 1 の前記核酸配列と少なくとも 95 % の同一性を有する少なくとも 1000 塩基対の核酸配列を含む、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

前記単離核酸分子は、配列番号 1 の前記核酸配列を含む、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 12】

前記網膜色素上皮の細胞は、靈長類の細胞である、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 13】

前記単離核酸分子に作動可能に結合している前記遺伝子が、ハロロドプシン、チャネルドシン、M T - N D 4、M T - N D 1、M T - N D 6、M T - C Y B、M T - C O 3、M T - N D 5、M T - N D 2、5 M T - C O I、M T - A T P 6、M T - N D 4 L、O P A 1、O P A 3、O P A 7、A C O 2、G D N F、C N T F、F G F 2、B D N F、E P O、B C L 2、B C L 2 L 1、エンドスタチン、アンギオスタチン、s F l t、I L 1 0、I L 1 R 1、T G F B I、I L 4、及び桿体由来錐体生存因子（R d C V F）からなる群から選択される、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 14】

前記単離核酸分子は、最小プロモーター配列を更に含む、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 15】

前記最小プロモーター配列は、配列番号 2 の核酸配列を含む、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 16】

網膜色素上皮の細胞中の遺伝子の発現のためのベクターの使用であって、前記ベクターは発現力セットを含み、前記発現力セットは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 80 % の同一性を有する少なくとも 1000 塩基対の核酸配列を含む単離核酸分子、及び前記網膜色素上皮の細胞における発現のための遺伝子をコードする核酸配列を含み、前記遺伝子をコードする前記核酸配列が前記単離核酸分子に作動可能に結合している、使用。

【請求項 17】

前記単離核酸分子は、配列番号 1 の前記核酸配列と少なくとも 95 % の同一性を有する少なくとも 1000 塩基対の核酸配列を含む、請求項 16 に記載の使用。

【請求項 18】

前記単離核酸分子は、配列番号 1 の前記核酸配列を含む、請求項 16 に記載の使用。

【請求項 19】

前記網膜色素上皮の細胞は、靈長類の細胞である、請求項 16 に記載の使用。

【請求項 20】

前記単離核酸分子に作動可能に結合している前記遺伝子が、ハロロドプシン、チャネルドシン、M T - N D 4、M T - N D 1、M T - N D 6、M T - C Y B、M T - C O 3、

MT - ND 5、MT - ND 2、5 MT - CO I、MT - ATP 6、MT - ND 4 L、OP A 1、OPA 3、OPA 7、ACO 2、GDNF、CNTF、FGF 2、BDNF、EP O、BCL 2、BCL 2 L 1、エンドスタチン、アンギオスタチン、sFlt、IL 10、IL 1 R 1、TGFBI、IL 4、及び桿体由来錐体生存因子(RdCVF)からなる群から選択される、請求項 1 6 に記載の使用。

【請求項 2 1】

前記単離核酸分子は、最小プロモーター配列を更に含む、請求項 1 6 に記載の使用。

【請求項 2 2】

前記最小プロモーター配列は、配列番号 2 の核酸配列を含む、請求項 2 1 に記載の使用。

【請求項 2 3】

前記ベクターは、ウイルスベクターである、請求項 1 6 に記載の使用。

【請求項 2 4】

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 2 3 に記載の使用。

【請求項 2 5】

単離細胞、細胞系又は細胞集団に発現力セットを形質移入することを含む、網膜色素上皮の細胞中で遺伝子を発現させる方法であって、前記発現力セットは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 80 % の同一性を有する少なくとも 1000 塩基対の核酸配列を含む単離核酸分子、及び前記網膜色素上皮の細胞における発現のための遺伝子をコードする核酸配列を含み、前記遺伝子をコードする前記核酸配列が前記単離核酸分子に作動可能に結合しており、ここで、前記細胞が網膜色素上皮の細胞であり、又は前記細胞系若しくは細胞集団が網膜色素上皮の細胞を含む場合、前記遺伝子が前記単離細胞、前記細胞系又は前記細胞集団により発現される方法。

【請求項 2 6】

前記単離核酸分子は、配列番号 1 の前記核酸配列と少なくとも 95 % の同一性を有する少なくとも 1000 塩基対の核酸配列を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記単離核酸分子は、配列番号 1 の前記核酸配列を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記単離核酸分子に作動可能に結合している前記遺伝子が、ハロドシン、チャネルドシン、MT - ND 4、MT - ND 1、MT - ND 6、MT - CYB、MT - CO 3、MT - ND 5、MT - ND 2、5 MT - CO I、MT - ATP 6、MT - ND 4 L、OP A 1、OPA 3、OPA 7、ACO 2、GDNF、CNTF、FGF 2、BDNF、EP O、BCL 2、BCL 2 L 1、エンドスタチン、アンギオスタチン、sFlt、IL 10、IL 1 R 1、TGFBI、IL 4、及び桿体由来錐体生存因子(RdCVF)からなる群から選択される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記単離核酸分子は、最小プロモーター配列を更に含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記最小プロモーター配列は、配列番号 2 の核酸配列を含む、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

単離細胞、細胞系又は細胞集団にベクターを形質移入することを含む、網膜色素上皮の細胞中で遺伝子を発現させる方法であって、前記ベクターは発現力セットを含み、前記発現力セットは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 80 % の同一性を有する少なくとも 1000 塩基対の核酸配列を含む単離核酸分子、及び前記網膜色素上皮の細胞における発現のための遺伝子をコードする核酸配列を含み、前記遺伝子をコードする前記核酸配列が前記単離核酸分子に作動可能に結合している、方法。

【請求項 3 2】

前記単離核酸分子は、配列番号1の前記核酸配列と少なくとも95%の同一性を有する少なくとも1000塩基対の核酸配列を含む、請求項31に記載の方法。

**【請求項33】**

前記単離核酸分子は、配列番号1の前記核酸配列を含む、請求項31に記載の方法。

**【請求項34】**

前記単離核酸分子に作動可能に結合している前記遺伝子が、ハロロドシン、チャネルロドシン、MT-ND4、MT-ND1、MT-ND6、MT-CYB、MT-CO3、MT-ND5、MT-ND2、5MT-COI、MT-ATP6、MT-ND4L、OPA1、OPA3、OPA7、ACO2、GDNF、CNTF、FGF2、BDNF、EP0、BCl2、BCl2L1、エンドスタチン、アンギオスタチン、sFlt、IL10、IL1R1、TGFBI、IL4、及び桿体由来錐体生存因子(RdCVF)からなる群から選択される、請求項31に記載の方法。

**【請求項35】**

前記単離核酸分子は、最小プロモーター配列を更に含む、請求項31に記載の方法。

**【請求項36】**

前記最小プロモーター配列は、配列番号2の核酸配列を含む、請求項35に記載の方法。

**【請求項37】**

前記ベクターは、ウイルスベクターである、請求項31に記載の方法。

**【請求項38】**

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37に記載の方法。

**【手続補正2】**

**【補正対象書類名】**明細書

**【補正対象項目名】**0111

**【補正方法】**変更

**【補正の内容】**

**【0111】**

ウイルス形質移入及び組織製剤

AAV投与は、Kunming, Chinaにおいて眼科医及び外部委託先と連携して実施した。アカゲザルは、ケタミン及びフェノバルビタールナトリウムにより麻酔した。2本の穿刺トンネルは、それぞれ鼻腔及び側頭胸膜領域に配置された25ゲージの穿刺針を使用して作成した。1本のトンネルを通して照明用ファイバーを硝子体腔内に注入し、50μLのAAVは、第2トンネルを通してハミルトンシリンジ上に取り付けた30ゲージ針を使用して網膜下に注射した。3カ月後、単離網膜を30分間に渡りPBS中の4%のPFA中で固定し、次いでPBS中で4%において洗浄ステップを行った。全網膜は、室温で1時間に渡り10%の標準ロバ血清(NDS)、1%のBSA、PBS中の0.5%のTriton X-100により処理した。PBS中3%のNDS、1%のBSA、0.5%のTriton X-100中のモノクローナルラット抗GFP Ab(Molecular Probes Inc.; 1:500)による処理を室温で5日間実施した。二次ロバ抗ラットAlexa Fluor-488Ab(Molecular Probes Inc.; 1:200)による処理を2時間に渡り実施した。切片を洗浄し、スライドガラス上にProLong Gold褪色防止用試薬(Molecular Probes Inc.)と共に載せ、Zeiss LSM 700 Axio Imager Z2レーザー走査型共焦点顕微鏡(Carl Zeiss Inc.)を使用してイメージングした。

本発明は、以下の態様を含み得る。

**[1]**

配列番号1の核酸配列を含み、若しくはそれからなり、又は配列番号1の前記配列と少なくとも80%の同一性を有する少なくとも1000bpの核酸配列からなる単離核酸分

子であって、網膜色素上皮細胞の細胞中の遺伝子の特異的発現を、前記遺伝子をコードする核酸配列が前記単離核酸分子に作動可能に結合している場合にもたらす単離核酸分子。

[ 2 ]

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

[ 3 ]

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

[ 4 ]

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

[ 5 ]

[ 4 ]に記載の発現力セットを含むベクター。

[ 6 ]

ウイルスベクターである、[ 5 ]に記載のベクター。

[ 7 ]

網膜色素上皮細胞の細胞中の遺伝子の前記発現のための、[ 1 ]若しくは[ 2 ]に記載の核酸の、[ 4 ]に記載の発現力セットの、又は[ 5 ]に記載のベクターの使用。

[ 8 ]

単離細胞、細胞系又は細胞集団に[ 4 ]に記載の発現力セットを形質移入するステップを含む、網膜色素上皮細胞の細胞中で遺伝子を発現させる方法であって、前記細胞が網膜色素上皮細胞の細胞であり、又は前記細胞が網膜色素上皮細胞の細胞を含む場合、発現させるべき前記遺伝子を前記単離細胞、前記細胞系又は前記細胞集団により特異的に発現させる方法。

[ 9 ]

[ 4 ]に記載の発現力セット又は[ 5 ]に記載のベクターを含む単離細胞。

[ 10 ]

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

[ 11 ]

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

[ 12 ]

[ 1 ]又は[ 2 ]に記載の単離核酸分子を含む、網膜色素上皮細胞の細胞中で遺伝子を発現させるためのキット。