

【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、霊長類の細胞である、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、ハロロドプシン、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カセットの使用であって、前記発現カセットは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する少なくとも 1 0 0 0 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 1 0】**

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 9 5 % の同一性を有する少なくとも 1 0 0 0 塩基対の核酸配列を含む、請求項 9 に記載の使用。

**【請求項 1 1】**

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 1 2】**

前記網膜色素上皮の細胞は、霊長類の細胞である、請求項 9 に記載の使用。

**【請求項 1 3】**

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、チャネルロドシン、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 1 4】**

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 1 5】**

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 1 4 に記載の使用。

。

**【請求項 1 6】**

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カセットを含み、前記発現カセットは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する少なくとも 1 0 0 0 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 1 7】**

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 9 5 % の同一性を有する少なくとも 1 0 0 0 塩基対の核酸配列を含む、請求項 1 6 に記載の使用。

**【請求項 1 8】**

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 6 に記載の使用。

**【請求項 1 9】**

前記網膜色素上皮の細胞は、霊長類の細胞である、請求項 1 6 に記載の使用。

**【請求項 2 0】**

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、チャネルロドシン、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、OPA 1、OPA 3、OPA 7、ACO 2、GDNF、CNTF、FGF 2、BDNF、EPO、BCL 2、BCL 2 L 1、エンドスタチン、アンギオスタチン、s F l t、IL 1 0、IL 1 R 1、TGFB I、IL 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 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 ( A A V ) 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カ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、前記発現カセットは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する少なくとも 1 0 0 0 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 9 5 % の同一性を有する少なくとも 1 0 0 0 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、ハロロドプシン、チャネルロドシン、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、OPA 1、OPA 3、OPA 7、ACO 2、GDNF、CNTF、FGF 2、BDNF、EPO、BCL 2、BCL 2 L 1、エンドスタチン、アンギオスタチン、s F l t、IL 1 0、IL 1 R 1、TGFB I、IL 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 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カセットを含み、前記発現カセットは、配列番号 1 の核酸配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する少なくとも 1 0 0 0 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、ハロロドプシン、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、EPO、BCL2、BCL2L1、エンドスタチン、アンギオスタチン、sFlt、IL10、IL1R1、TGFB1、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、50  $\mu$ L 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 % の標準口バ血清 (NDS)、1 % の BSA、PBS 中の 0.5 % の Triton X-100 により処理した。PBS 中 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。二次口バ抗ラット Alexa Fluor-488 Ab (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 1000 bp 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ず単離核酸分子。

[ 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ェントな条件下でハイブリダイズする配列を含む単離核酸分子。

[ 4 ]

規定の細胞中の遺伝子発現を促進するエレメントとして [ 1 ] 又は [ 2 ] に記載の単離核酸を含む発現カセットであって、前記単離核酸が、少なくとも、網膜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カセット。

[ 5 ]

[ 4 ] に記載の発現カセットを含むベクター。

[ 6 ]

ウイルスベクターである、[ 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 ] に記載の発現カセットの、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 ] に記載の発現カ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 ] に記載の発現カセット又は [ 5 ] に記載のベクターを含む単離細胞。

[ 10 ]

前記発現カ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 ] に記載の発現カセット、[ 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。