

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7071361号

(P7071361)

(45)発行日 令和4年5月18日(2022.5.18)

(24)登録日 令和4年5月10日(2022.5.10)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/11

Z Z N A

C 1 2 N 15/864 (2006.01)

C 1 2 N 15/864

1 0 0 Z

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 P 21/00 (2006.01)

C 1 2 P 21/00

C

請求項の数 28 (全21頁)

(21)出願番号 特願2019-529555(P2019-529555)

(73)特許権者 518089687

(86)(22)出願日 平成29年11月29日(2017.11.29)

フリードリッヒ ミーシェー インスティ

(65)公表番号 特表2020-503852(P2020-503852
A)

トゥート フォー バイオメディカル リ

(43)公表日 令和2年2月6日(2020.2.6)

サーチ

(86)国際出願番号 PCT/EP2017/080827

スイス国 4 0 5 8 パーゼル, マウルベ

(87)国際公開番号 WO2018/099974

ーアシュトラッセ 6 6

(87)国際公開日 平成30年6月7日(2018.6.7)

(74)代理人 100092783

審査請求日 令和2年11月26日(2020.11.26)

弁理士 小林 浩

(31)優先権主張番号 16201747.9

(74)代理人 100120134

(32)優先日 平成28年12月1日(2016.12.1)

弁理士 大森 規雄

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(74)代理人 100149010

弁理士 星川 亮

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ロスカ, ボトンド

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 インターニューロン中の遺伝子の特異的発現のためのプロモーターSYNP107

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1の核酸配列を含み、もしくはそれからなる単離核酸分子。

【請求項2】

配列番号1の核酸配列を含む、請求項1に記載の単離核酸分子。

【請求項3】

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、インターニューロン中での前記遺伝子の発現をドライブするのに有効である、請求項1または2に記載の単離核酸分子。

【請求項4】

最小プロモーターをさらに含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の単離核酸分子。

【請求項5】

前記最小プロモーターが配列番号2の核酸配列を含む、請求項4に記載の単離核酸分子。

【請求項6】

請求項1～5のいずれか1項に記載の単離核酸分子を含む発現カセットであって、前記単離核酸分子が、少なくとも、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。

【請求項7】

遺伝子をコードする前記核酸配列が、チャンネルロドプシン遺伝子またはハロロドプシン遺伝子をコードする、請求項6に記載の発現カセット。

【請求項 8】

請求項 6 または 7 に記載の発現カセットを含むベクター。

【請求項 9】

ウイルスベクターである、請求項 8 に記載のベクター。

【請求項 10】

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである、請求項 9 に記載のベクター。

【請求項 11】

インターニューロン中の遺伝子の in vitro または ex vivo 発現のための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の核酸の、請求項 6 または 7 に記載の発現カセットの、または請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のベクターの使用。

10

【請求項 12】

単離細胞、細胞系または細胞集団に請求項 6 または 7 に記載の発現カセットを形質移入することを含む、インターニューロン中で遺伝子を発現させる in vitro または ex vivo 方法であって、前記単離細胞がインターニューロンであり、または前記細胞系もしくは細胞集団がインターニューロンを含む場合、前記遺伝子を前記単離細胞、前記細胞系または前記細胞集団により発現させる、方法。

【請求項 13】

請求項 6 または 7 に記載の発現カセットまたは請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のベクターを含む単離細胞。

【請求項 14】

前記発現カセットまたはベクターが、前記細胞のゲノム中に安定的に組み込まれている、請求項 13 に記載の細胞。

20

【請求項 15】

前記遺伝子が、光感受性分子をコードする、請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の単離核酸分子。

【請求項 16】

前記光感受性分子が、ハロロドプシンまたはチャネルロドプシンである、請求項 15 に記載の単離核酸分子。

【請求項 17】

前記遺伝子が、光感受性分子をコードする、請求項 6 に記載の発現カセット。

30

【請求項 18】

前記光感受性分子が、ハロロドプシンまたはチャネルロドプシンである、請求項 17 に記載の発現カセット。

【請求項 19】

前記遺伝子が、光感受性分子をコードする、請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 20】

前記光感受性分子が、ハロロドプシンまたはチャネルロドプシンである、請求項 19 に記載のベクター。

【請求項 21】

前記遺伝子が、光感受性分子をコードする、請求項 11 に記載の使用。

40

【請求項 22】

前記光感受性分子が、ハロロドプシンまたはチャネルロドプシンである、請求項 21 に記載の使用。

【請求項 23】

前記遺伝子が、光感受性分子をコードする、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 24】

前記光感受性分子が、ハロロドプシンまたはチャネルロドプシンである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

50

前記遺伝子が、光感受性分子をコードする、請求項 1 3 または 1 4 に記載の細胞。

【請求項 2 6】

光感受性分子がハロロドプシンまたはチャネルロドプシンである、請求項 2 5 に記載の細胞。

【請求項 2 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の単離核酸分子を含む、インターニューロン中で遺伝子を発現させるためのキット。

【請求項 2 8】

針、シリンジ、および/または単離された核酸分子もしくはその医薬的に許容可能な配合物を投与することについての説明書をさらに含む、請求項 2 7 に記載のキット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、インターニューロン中で遺伝子の発現を特異的にもたらす核酸配列に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発現目的のため、組換え遺伝子は、通常、標的細胞、細胞集団または組織中に、異種遺伝子の転写を可能とする活性発現カセットの環境下の c D N A 構築物として形質移入される。D N A 構築物は、シス制御エレメント、例として、エンハンサー、サイレンサー、インスレーターおよびプロモーター（本明細書においてまとめて「プロモーター」と称される）における多くのトランス作用性転写因子（T F）の活性を含むプロセスにおける細胞転写機構により認識される。

20

【0 0 0 3】

遺伝子プロモーターは、それらの調節のレベルの全てに関与し、D N A 配列、転写因子結合およびエピジェネティックな特色の影響を組み込むことにより遺伝子転写における決定因子として機能する。これらは、例えば、プラスミドベクターによりコードされる導入遺伝子発現の強度および前記導入遺伝子が発現される 1 つまたは複数の細胞タイプを決定する。

【0 0 0 4】

哺乳動物細胞中の異種遺伝子発現をドライブするために使用される最も一般的なプロモーターは、ヒトおよびマウスサイトメガロウイルス（C M V）主要最初期プロモーターである。これらは強力な発現を付与し、いくつかの細胞タイプにおいてロバストであることが証明されている。他のウイルスプロモーター、例えば、S V 4 0 最初期プロモーターおよびラウス肉腫ウイルス（R S V）ロングターミナルリピート（L T R）プロモーターも発現カセット中で高頻度で使用される。

30

【0 0 0 5】

ウイルスプロモーターの代わりに、細胞プロモーターを使用することもできる。公知のプロモーターの中には、大量に転写される細胞転写産物、例えば、ベータ - アクチン、伸長因子 1 - アルファ（E F - 1 アルファ）、またはユビキチンをコードするハウスキーピング遺伝子からのものがある。ウイルスプロモーターと比較して、真核生物遺伝子発現は複雑であり、多くの異なる因子の正確な協調を要求する。

40

【0 0 0 6】

導入遺伝子発現のための内因性調節エレメントの使用に関する態様の 1 つは、安定な m R N A の生成であり、発現が、それに応じてトランス作用性転写因子が提供される宿主細胞の天然環境中で生じ得ることである。真核生物遺伝子の発現は、シスおよびトランス作用性調節エレメントの複雑な機構により制御されるため、ほとんどの細胞プロモーターは、詳細な機能の特徴付けが欠けている。真核生物プロモーターの一部は、通常、その転写される配列のすぐ上流に位置し、転写開始点として機能する。コアプロモーターは、転写機構により認識されるのに十分である転写開始部位（T S S）を直接囲む。近位プロモーターは、コアプロモーターの上流の領域を含み、T S S および転写調節に要求される他の配

50

列特色を含有する。転写因子は、プロモーターおよびエンハンサー配列中の調節モチーフに結合し、それにより、ヌクレオソーム構造および最終的に転写の開始を可能とするその位置を変更するクロマチンおよびヒストン修飾酵素を活性化させることにより配列特異的に作用する。機能プロモーターの同定は、主に、関連する上流または下流のエンハンサーエレメントの存在に依存的である。

【 0 0 0 7 】

導入遺伝子発現のための内因性調節エレメントの使用に関する別の重大な態様は、一部のプロモーターが細胞特異的様式で作用し得、規定のタイプの細胞中で、またはプロモーターに依存して特定のサブセットの細胞中で導入遺伝子の発現をもたらすことである。

【 0 0 0 8 】

したがって、本発明の 1 つの課題は、哺乳動物細胞中で高い発現レベルで、細胞タイプ特異的様式で組換え遺伝子を発現させるのに好適な新たな配列を得ることである。

【 0 0 0 9 】

このような配列は、例えば、神経変性障害、視力回復、創薬、腫瘍療法および障害の診断の研究のための系を開発するための神経細胞特異的プロモーターについての当分野における必要性に対処する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 0 】

本発明者らは、エピジェネティクス、バイオインフォマティクスおよび神経科学を組み合わせることで眼球中に存在する場合、インターニューロン中でのみ遺伝子発現をドライブするプロモーターを見出した。

【 0 0 1 1 】

本発明の配列の核酸配列は、

【化 1】

```

AACAAAGTCTATCATAATAATTACAGGATGTGAACCTGGGAGGATAATTACAGGACCCCGGGC
GCAATAAATAATTACAGGAATCGAATATGGAATTATAATTACAGGATCTGAAGAATCAAGTAT
AATTACAGGAGCCGTTGTGTGCTGTATAATTACAGGAATGATCATTATTGCATAATTACAGG
ATAGGTGTGCCGCTACATAATTACAGGAGGTTTCAGCCCAACTATAATTACAGGACTAGGCA
AGTTCGGTATAATTACAGGATGGCGCTGCCCCCAATAATTACAGGATAGCTGACTTCGGTA
ATAATTACAGGACATTCTCGCCAGACTATAATTACAGGATGCAACTAGACTCTGATAATTACA
GGATCGTCTTAAATTGCCATAATTACAGGAACAAGCATACGTTGCATAATTACAGGACCCCTA
TTCTAGTGTATAATTACAGGATGTGCACAACCAAAAATAATTACAGGATAATTGTCTTGACTG
ATAATTACAGGAGGGTGTGATACACCTATAATTACAGGAGCTCGAGATCTGCGATCTGCATC
TCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCC
CAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGG
CCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCTAGGCTT
TTGCAAA (配列番号1)

```

である。

【 0 0 1 2 】

したがって、本発明は、配列番号 1 の核酸配列または配列番号 1 の前記核酸配列と少なくとも 70 % の同一性を有する少なくとも 700 bp の核酸配列を含み、またはそれからなる単離核酸分子であって、遺伝子をコードする前記核酸配列に作動可能に結合している前記遺伝子のインターニューロン中の発現を特異的にもたらす単離核酸分子を提供する。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも 700 bp であり、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。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも 700 bp であり、配列番号 1 の前記核酸配列と少なくとも 85 % の同一性を有

10

20

30

40

50

する。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも700bpであり、配列番号1の前記核酸配列と少なくとも90%の同一性を有する。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも700bpであり、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。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも700bpであり、配列番号1の前記核酸配列と少なくとも96%の同一性を有する。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも700bpであり、配列番号1の前記核酸配列と少なくとも97%の同一性を有する。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも700bpであり、配列番号1の前記核酸配列と少なくとも98%の同一性を有する。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも700bpであり、配列番号1の前記核酸配列と少なくとも99%の同一性を有する。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも700bpであり、配列番号1の前記核酸配列と100%の同一性を有する。

10

【0013】

本発明の単離核酸分子は、最小プロモーター、例えば、SV40最小プロモーター、例えば、SV40最小プロモーターまたは配列

【化2】

ATCCTCACATGGTCCTGCTGGAGTTAGTAGAGGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCCAGCTA
TCACATCCACTGTGTTGTTGTGAACTGGAATCCACTATAGGCCA (配列番号2)

を有するものをさらに含み得る。

20

【0014】

上記の本発明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も提供される。

【0015】

本発明はまた、上記の本発明の単離核酸を含む発現カセットであって、前記プロモーターが、少なくとも、インターニューロン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を提供する。

【0016】

本発明はさらに、本発明の発現カセットを含むベクターを提供する。一部の実施形態において、前記ベクターは、ウイルスベクターである。

30

【0017】

本発明はまた、インターニューロン中の遺伝子の発現のための、本発明の核酸の、本発明の発現カセットの、または本発明のベクターの使用を包含する。

【0018】

本発明はさらに、単離細胞、細胞系または細胞集団（例えば、組織）に本発明の発現カセットを形質移入するステップを含む、インターニューロン中で遺伝子を発現させる方法であって、前記細胞がインターニューロンであり、または前記細胞がインターニューロンを含む場合、発現させるべき遺伝子を単離細胞、細胞系または細胞集団により発現させる方法を提供する。一部の実施形態において、単離細胞、細胞系または細胞集団もしくは組織はヒトである。

40

【0019】

本発明はまた、本発明の発現カセットを含む単離細胞を提供する。一部の実施形態において、発現カセットまたはベクターは、前記細胞のゲノム中に安定的に組み込まれている。

【0020】

本発明のプロモーターに作動可能に結合させることができる典型的な遺伝子は、ハロロドプシンまたはチャネルロドプシンをコードする遺伝子である。

【0021】

さらに、本発明はまた、本発明の単離核酸分子を含む、インターニューロン中で遺伝子を発現させるためのキットを提供する。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 2 2 】

【図 1】全ての G A B A 作動性インターニューロンを標識する、成体 G A D 6 7 - c r e x A i 9 (t d T o m a t o) マウスにおける A A V - s y n P 1 0 7 - C h R 2 - E G F P の皮質 V 1 注射から 3 週間後の配列番号 1 を有するプロモーターからの E G F P 発現のレーザー走査型共焦点顕微鏡写真。G A B A 作動性インターニューロン中の誘導発現を観察することができる。緑色 = 配列番号 1 によりドライブされた E G F P。赤色 = t d T o m a t o。スケールバー：20 μm。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 3 】

本発明者らは、エピジェネティクス、バイオインフォマティクスおよび神経科学を組み合わせることで眼球中に存在する場合、インターニューロン中でのみ遺伝子発現をドライブするプロモーターを見出した。

【 0 0 2 4 】

本発明の配列の核酸配列は、

【化 3】

```

AACAAAGTCTATCATAATAATTACAGGATGTGAACCTGGGAGGATAATTACAGGACCCCGGGC
GCAATAAATAATTACAGGAATCGAATATGGAATTATAATTACAGGATCTGAAGAATCAAGTAT
AATTACAGGAGCCGTTGTGTGCTGTATAATTACAGGAATGATCATTATTGCATAATTACAGG
ATAGGTGTGCCGCTACATAATTACAGGAGGTTTCAGCCCACTATAATTACAGGACTAGGCA
AGTTCGGTATAATTACAGGATGGCGCTGCCCCCAATAATTACAGGATAGCTGACTTCGGTA
ATAATTACAGGACATTCTCGCCAGACTATAATTACAGGATGCAACTAGACTCTGATAATTACA
GGATCGTCTTAAATTGCCATAATTACAGGAACAAGCATACGTTGCATAATTACAGGACCCCTA
TTCTAGTGTATAATTACAGGATGTGCACAACCAAAAATAATTACAGGATAATTGTCTTGACTG
ATAATTACAGGAGGGTGTGATACACCTATAATTACAGGAGCTCGAGATCTGCGATCTGCATC
TCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCC
CAGTTCGCGCCATTCTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGG
CCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCTAGGCTT
TTGCAAA (配列番号1)

```

である。

【 0 0 2 5 】

したがって、本発明は、配列番号 1 の核酸配列または配列番号 1 の前記核酸配列と少なくとも 70 % の同一性を有する少なくとも 700 bp の核酸配列を含み、またはそれからなる単離核酸分子であって、遺伝子をコードする前記核酸配列に作動可能に結合している前記遺伝子のインターニューロン中の発現を特異的にもたらし単離核酸分子を提供する。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも 700 bp であり、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。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも 700 bp であり、配列番号 1 の前記核酸配列と少なくとも 85 % の同一性を有する。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも 700 bp であり、配列番号 1 の前記核酸配列と少なくとも 90 % の同一性を有する。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも 700 bp であり、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。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも 700 bp であり、配列番号 1 の前記核酸配列と少なくとも 96 % の同一性を有する。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも 700 bp であり、配列番号 1 の前記核酸配列と少なくとも 97 % の同一性を有する。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも 700 bp であり、配列番号 1 の前記核酸配列と少なくとも 98 % の同一性を有する。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも 700 bp であり、配列番号 1 の前記核酸配列と少なくとも 99 % の同一性を有する。一部の実施形態において、核酸配列は、少なくとも 70

0 b p であり、配列番号 1 の前記核酸配列と 1 0 0 % の同一性を有する。

【 0 0 2 6 】

本発明の単離核酸分子は、最小プロモーター、例えば、S V 4 0 最小プロモーター、例えば、S V 4 0 最小プロモーターまたは配列を有するものをさらに含み得る。

【 化 4 】

ATCCTCACATGGTCCTGCTGGAGTTAGTAGAGGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCCAGCTA
TCACATCCACTGTGTTGTTGTGAACTGGAATCCACTATAGGCCA (配列番号2)

【 0 0 2 7 】

上記の本発明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も提供される。

【 0 0 2 8 】

本発明はまた、上記の本発明の単離核酸を含む発現カセットであって、前記プロモーターが、少なくとも、インターニューロン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を提供する。

【 0 0 2 9 】

本発明はさらに、本発明の発現カセットを含むベクターを提供する。一部の実施形態において、前記ベクターは、ウイルスベクターである。

【 0 0 3 0 】

本発明はまた、インターニューロン中の遺伝子の発現のための、本発明の核酸の、本発明の発現カセットの、または本発明のベクターの使用を包含する。

【 0 0 3 1 】

本発明はさらに、単離細胞、細胞系または細胞集団（例えば、組織）に本発明の発現カセットを形質移入するステップを含む、インターニューロン中で遺伝子を発現させる方法であって、前記細胞がインターニューロンであり、または前記細胞がインターニューロンを含む場合、発現させるべき遺伝子を単離細胞、細胞系または細胞集団により発現させる方法を提供する。一部の実施形態において、単離細胞、細胞系または細胞集団もしくは組織はヒトである。

【 0 0 3 2 】

本発明はまた、本発明の発現カセットを含む単離細胞を提供する。一部の実施形態において、発現カセットまたはベクターは、前記細胞のゲノム中に安定的に組み込まれる。

【 0 0 3 3 】

本発明のプロモーターに作動可能に結合させることができる典型的な遺伝子は、ハロロドプシンまたはチャネルロドプシンをコードする遺伝子である。

【 0 0 3 4 】

さらに、本発明はまた、本発明の単離核酸分子を含む、インターニューロン中で遺伝子を発現させるためのキットを提供する。

【 0 0 3 5 】

本明細書において使用される場合、用語「プロモーター」は、任意のシス調節エレメント、例として、エンハンサー、サイレンサー、インスレーターおよびプロモーターを指す。プロモーターは、転写が必要とされる遺伝子の上流に（5'領域に向かって）一般には位置するDNAの領域である。プロモーターは、それが制御する遺伝子の適切な活性化または抑制を可能とする。本発明の関連において、プロモーターは、それらに作動可能に結合している遺伝子のインターニューロン中での特異的発現をもたらす。「あるタイプの細胞中でのみの発現」とも称される「特異的発現」は、目的の遺伝子を発現する細胞の少なくとも75%超が、規定されたタイプ、すなわち、本事例においてはインターニューロンであることを意味する。

【 0 0 3 6 】

発現カセットは典型的には、宿主細胞中への発現カセットの侵入および宿主細胞中の発現

10

20

30

40

50

カセットの維持を促進するベクター中に導入される。このようなベクターは一般に使用されており、当業者に周知である。多数のそのようなベクターは、例えば、Invitrogen、Stratagene、Clontechなどから市販されており、多数のガイド、例えば、Ausubel、Guthrie、Strathern、またはBergerなどに記載されている（全て前掲）。このようなベクターとしては、典型的には、多重クロニング部位、および追加のエレメント、例えば、複製起点、選択マーカー遺伝子（例えば、LEU2、URA3、TRP1、HIS3、GFP）、セントロメア配列などと共にプロモーター、ポリアデニル化シグナルなどが挙げられる。

【0037】

ウイルスベクター、例えば、AAV、PRVまたはレンチウイルスは、本発明のプロモーターを使用して遺伝子をインターニューロンに標的化し、送達するのに好適である。

10

【0038】

神経細胞のアウトプットは、電気的方法、例えば、多電極アレイもしくはパッチクランプを使用して、または視覚的方法、例えば、蛍光の検出を使用して計測することができる。

【0039】

本発明の核酸配列を使用する方法であって、本発明のプロモーター下で1つ以上の導入遺伝子を発現するインターニューロンと試験化合物を接触させるステップ、および前記試験化合物の存在下で得られたインターニューロンの少なくとも1つのアウトプットを、前記試験化合物の不存在下で得られた同一のアウトプットと比較するステップを含む方法は、インターニューロンが関与する神経障害の治療のための治療剤を同定するために使用することができる。

20

【0040】

さらに、本発明のプロモーターを使用する方法であって、本発明のプロモーターの制御下で1つ以上の導入遺伝子を発現するインターニューロンを薬剤と接触させるステップ、および前記薬剤との接触後に得られた少なくとも1つのアウトプットを、前記薬剤との前記接触前に得られた同一のアウトプットと比較するステップを含む方法も、視力回復のインビトロ試験に使用することができる。

【0041】

チャンネルロドプシンは、光開閉型イオンチャンネルとして機能するオプシントタンパク質のサブファミリーである。これらは、単細胞緑藻中で感覚光受容器として機能し、走光性、すなわち、光に応答する運動を制御する。他の生物体の細胞中で発現されると、それらは、細胞内酸性度、カルシウム流入、電気興奮性、および他の細胞プロセスを制御するための光の使用を可能とする。以下の少なくとも3つの「天然」チャンネルロドプシン：チャンネルロドプシン-1（ChR1）、チャンネルロドプシン-2（ChR2）、およびボルボックスチャンネルロドプシン（VChR1）が現在公知である。さらに、これらのタンパク質の一部の改変/改善バージョンも存在する。全ての公知のチャンネルロドプシンは非特異的陽イオンチャンネルであり、H⁺、Na⁺、K⁺、およびCa²⁺イオンを伝導する。

30

【0042】

ハロロドプシンは、塩化物イオンに特異的な光駆動性イオンポンプであり、好塩菌として公知の系統発生的に古代の「細菌」（古細菌）に見出される。これは、レチニリデンタンパク質ファミリーの7回膜貫通型タンパク質であり、光駆動性プロトンポンプバクテリオロドプシンと相同であり、網膜中で光を感知する色素の脊椎動物ロドプシンと三次構造において類似する（しかし、一次配列構造においては類似しない）。ハロロドプシンは、光駆動性イオンチャンネルのチャンネルロドプシンとも配列類似性を共有する。ハロロドプシンは、必須の光異性化可能ビタミンA誘導体オールトランスレチナールを含有する。ハロロドプシンは、結晶構造が公知の数少ない膜タンパク質の1つである。ハロロドプシンアイソフォームは、好塩菌の複数の種、例として、H. サリナラム（H. salinarum）およびN. ファラオニス（N. pharaonis）に見出すことができる。非常に進行中の研究はこれらの違いを探究中であり、それらを使用して光周期およびポンプ特性を別個に解析している。バクテリオロドプシンの後に、ハロロドプシンは研究される最良の

40

50

I 型（微生物）オプシンであり得る。ハロロドプシンレチナール複合体のピーク吸光度は約 570 nm である。近年、ハロロドプシンは、オプトジェネティクスにおけるツールとなっている。青色光活性化イオンチャネルのチャネルロドプシン - 2 が、青色光の短いパルスで興奮性細胞（例えば、ニューロン、筋細胞、膵臓細胞、および免疫細胞）を活性化させる能力を開くように、ハロロドプシンは、黄色光の短いパルスで興奮性細胞を静める能力を開く。このように、ハロロドプシンおよびチャネルロドプシンは一緒になって、神経活動の多色光学的な活性化、鎮静、および脱同期を可能とし、強力な神経工学のツールボックスを作出する。

【0043】

一部の実施形態において、プロモーターは、生存インターニューロン中で検出可能である少なくとも 1 つのレポーター遺伝子を発現する、組織に標的化されるベクターの一部である。

10

【0044】

本発明に好適なウイルスベクターは、当分野において周知である。例えば、AAV、PRV またはレンチウイルスは、遺伝子をインターニューロンに標的化し、送達するのに好適である。

【0045】

形質移入された細胞のアウトプットは、周知の方法を使用して、例えば、電気的方法、例えば、多電極アレイもしくはパッチクランプを使用して、または視覚的方法、例えば、蛍光の検出を使用して計測することができる。一部の場合、内境界膜の顕微手術により内境界膜が除去される。他の場合、記録は、内境界膜に実施されたスライスを通して達成される。

20

【0046】

インターニューロンの任意の供給源を、本発明に使用することができる。本発明の一部の実施形態において、細胞は、ヒト由来であり、またはその中に存在する。他の実施形態において、組織、または細胞は、動物からのもの、例えば、ウシまたはげっ歯類起源のものである。

【0047】

本明細書において使用される場合、用語「動物」は、全ての動物を含むように本明細書において使用される。本発明の一部の実施形態において、非ヒト動物は脊椎動物である。動物の例は、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、ネコ、イヌなどである。用語「動物」はまた、胚期および胎生期を含め、全ての発生段階における個々の動物を含む。「遺伝子改変動物」は、細胞下レベルでの意図的な遺伝子操作、例えば、標的化組換え、マイクロインジェクションまたは組換えウイルスの感染によるものにより、直接的または間接的に変更され、または受け入れられた遺伝子情報を担持する 1 つ以上の細胞を含有する任意の動物である。用語「遺伝子改変動物」は、古典的な交雑も体外受精も包含するものではなく、むしろ、1 つ以上の細胞が組換え DNA 分子により変更され、またはそれを受け入れている動物を包含することを意味する。この組換え DNA 分子は、規定の遺伝子座に特異的に標的化され得、染色体内にランダムに組み込まれ得、またはそれは、染色体外複製 DNA であり得る。用語「生殖細胞系列遺伝子改変動物」は、遺伝子変更または遺伝子情報が生殖細胞系列細胞中に導入され、それにより、遺伝子情報をその子孫へ伝達する能力が付与された遺伝子改変動物を指す。このような子孫が、実際、その変更または遺伝子情報の一部または全部を保有する場合、それらは、同様に遺伝子改変動物である。

30

40

【0048】

変更または遺伝子情報は、レシピエントが属する動物の種にとって外来、もしくは特定の個々のレシピエントにとってのみ外来であり得、またはレシピエントにより既に保有される遺伝子情報であり得る。その最後の場合、変更され、または導入された遺伝子は、天然遺伝子とは異なって発現され得、または全く発現され得ない。

【0049】

50

標的遺伝子を変更するために使用される遺伝子は広範な技術により得ることができ、それとしては、限定されるものではないが、ゲノム資源からの単離、単離 mRNA テンプレートからの cDNA の調製、直接的合成、またはそれらの組合せが挙げられる。

【0050】

導入遺伝子導入のための標的細胞のタイプは、ES 細胞である。ES 細胞は、インビトロで培養された着床前胚から得ることができ、胚と融合することができる (Evans et al. (1981), Nature 292: 154 - 156; Bradley et al. (1984), Nature 309: 255 - 258; Gossler et al. (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9065 - 9069; Robertson et al. (1986), Nature 322: 445 - 448; Wood et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4582 - 4584)。導入遺伝子は、標準的技術、例えば、エレクトロポレーションを使用する DNA 形質移入により、またはレトロウイルス媒介性形質導入により ES 細胞中に効率的に導入することができる。得られた形質転換 ES 細胞は、その後、凝集により桑実胚と組み合わせることができ、または非ヒト動物からの胚盤胞中に注射することができる。その後、導入 ES 細胞は胚をコロニー化し、得られたキメラ動物の生殖細胞系列に寄与する (Jaenisch (1988), Science 240: 1468 - 1474)。遺伝子標的化された遺伝子改変マウスの生成における遺伝子標的化された ES 細胞の使用は 1987 年に記載され (Thomas et al. (1987), Cell 51: 503 - 512)、他箇所でも概説されている (Frohman et al. (1989), Cell 56: 145 - 147; Capecchi (1989), Trends in Genet. 5: 70 - 76; Baribault et al. (1989), Mol. Biol. Med. 6: 481 - 492; Wagner (1990), EMBO J. 9: 3025 - 3032; Bradley et al. (1992), Bio/Technology 10: 534 - 539)。

【0051】

染色体アレル中に特異的变化を挿入するための標的化相同組換えを使用することにより、任意の遺伝子領域を不活性化させ、または所望される任意の突然変異に変更する技術が利用可能である。

【0052】

本明細書において使用される場合、「標的化遺伝子」は、ヒトの介入により非ヒト動物の生殖細胞系列中に導入される DNA 配列であり、それとしては、限定されるものではないが、本明細書に記載の方法が挙げられる。本発明の標的化遺伝子としては、同族の内因性アレルを特異的に変化させるように設計される DNA 配列が挙げられる。

【0053】

本発明において、「単離」は、その元の環境 (例えば、それが天然に存在する場合、天然の環境) から取り出された材料を指し、したがって、その天然状態から「人工的に」変更されている。例えば、単離ポリヌクレオチドは、ベクターもしくは物質の組成物の一部であり得、または細胞内に含有され得、依然として「単離」されている。それというのも、そのベクター、物質の組成物、または特定の細胞はそのポリヌクレオチドの元の環境ではないためである。用語「単離」は、ゲノムライブラリーも cDNA ライブラリーも、全細胞トータル RNA 調製物も mRNA 調製物も、ゲノム DNA 調製物 (電気泳動により分離され、プロット上に転写されたものを含む) も、剪断された全細胞ゲノム DNA 調製物も、当分野が本発明のポリヌクレオチド / 配列の区別される特色を実証していない他の組成物も指さない。単離 DNA 分子のさらなる例としては、異種宿主細胞中で維持された組換え DNA 分子または溶液中の (部分的に、または実質的に) 精製された DNA 分子が挙げられる。単離 RNA 分子としては、本発明の DNA 分子のインビボまたはインビトロ RNA 転写産物が挙げられる。しかしながら、ライブラリーの他のメンバーから単離されていないライブラリー (例えば、ゲノムまたは cDNA ライブラリー) のメンバーであるクローン中に (例えば、ライブラリーのそのクローンおよび他のメンバーを含有する均質な溶

液の形態で)、あるいは細胞または細胞溶解物から取り出された染色体(例えば、核型におけるような「染色体スプレッド」)内に、あるいはランダムに剪断されたゲノムDNAの調製物または1つ以上の制限酵素により切断されたゲノムDNAの調製物内に含有される核酸は、この発明においては、「単離」されていない。本明細書にさらに考察されたとおり、本発明による単離核酸分子は、天然に、組換えにより、または合成により產生することができる。

【0054】

「ポリヌクレオチド」は、一本鎖DNAおよび二本鎖DNA、一本鎖領域および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖RNAおよび二本鎖RNA、ならびに一本鎖領域および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖、またはより典型的には二本鎖、または一本鎖領域および二本鎖領域の混合物であり得るDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子から構成され得る。さらに、ポリヌクレオチドは、RNAまたはDNAまたはRNAおよびDNAの両方を含む三本鎖領域から構成され得る。ポリヌクレオチドはまた、1つ以上の改変塩基または安定性のためにもしくは他の理由のために改変されたDNAもしくはRNA骨格を含有し得る。「改変」塩基としては、例えば、トリチル化塩基および異常塩基、例えば、イノシンが挙げられる。種々の改変がDNAおよびRNAになされ得；したがって、「ポリヌクレオチド」は、化学的に、酵素的に、または代謝的に改変された形態を包含する。

10

【0055】

表現「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」は、そのポリペプチドについてのコード配列のみを含むポリヌクレオチドならびに追加のコード配列および/または非コード配列を含むポリヌクレオチドを包含する。

20

【0056】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、50%のホルムアミド、5×SSC(750mMのNaCl、75mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%の硫酸デキストラン、および20μg/ml変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中の42における一晩のインキュベーションとそれに続く約50における0.1×SSC中のフィルターの洗浄を指す。ハイブリダイゼーションおよびシグナル検出のストリンジェンシーの変化は、主に、ホルムアミド濃度(より低い割合のホルムアミドがストリンジェンシーの低下をもたらす)；塩条件、または温度の操作を通して達成される。例えば、中程度に高いストリンジェンシー条件としては、6×SSPE(20×SSPE=3MのNaCl；0.2MのNaH₂PO₄；0.02MのEDTA、pH7.4)、0.5%のSDS、30%のホルムアミド、100μg/mlのサケ精子ブロッキングDNAを含む溶液中の37における一晩のインキュベーションとそれに続く50における1×SSPE、0.1%のSDSによる洗浄が挙げられる。さらに、いっそうより低いストリンジェンシーを達成するため、ストリンジェントなハイブリダイゼーション後に実施される洗浄は、より高い塩濃度(例えば、5×SSC)において行うことができる。上記の条件における変法は、ハイブリダイゼーション実験においてバックグラウンドを抑制するために使用される代替ブロッキング試薬の包含および/または置換を通して達成することができる。典型的なブロッキング試薬としては、デンハルト試薬、BLOTTING、ヘパリン、変性サケ精子DNA、および市販の専売配合物が挙げられる。規定のブロッキング試薬の包含は、適合性についての問題に起因して上記のハイブリダイゼーション条件の改変を要求し得る。

30

40

【0057】

ポリペプチドに言及する場合の用語「断片」、「誘導体」および「アナログ」は、そのようなポリペプチドと実質的に同一の生物学的機能または活性のいずれかを保持するポリペプチドを意味する。アナログとしては、プロタンパク質部分の開裂により活性化させて活性成熟ポリペプチドを產生することができるプロタンパク質が挙げられる。

【0058】

用語「遺伝子」は、ポリペプチド鎖の產生に關与するDNAのセグメントを意味し；それ

50

は、コード領域に先行する領域およびその後続く領域「リーダーおよびトレーラー」ならびに個々のコードセグメント（エクソン）間の介在配列（イントロン）を含む。

【0059】

ポリペプチドは、ペプチド結合により互いに連結しているアミノ酸または改変ペプチド結合により互いに連結しているアミノ酸、すなわち、ペプチドイソスターから構成され得、20個の遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含有し得る。ポリペプチドは、天然プロセス、例えば、翻訳後プロセッシング、または当分野において周知の化学修飾技術のいずれかにより修飾することができる。このような修飾は、基礎的な教本およびより詳細なモノグラフ、ならびに膨大な研究論文に十分記載されている。修飾は、ポリペプチド中のいずれの箇所においても生じ得、その箇所としては、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端が挙げられる。同一のタイプの修飾が、所与のポリペプチド中のいくつかの部位において同一または変動する程度で存在し得ることが認識される。さらに、所与のポリペプチドは、多くのタイプの修飾を含有し得る。ポリペプチドは、例えば、ユビキチン化の結果として分枝鎖であり得、それらは分枝を有し、または分枝を有さない環状であり得る。環状、分枝鎖、および分枝鎖環状ポリペプチドは翻訳後の天然プロセスから生じ得、または合成方法により作製することができる。修飾としては、限定されるものではないが、アセチル化、アシル化、ビオチン化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合性付着、ヘム部分の共有結合性付着、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合性付着、脂質または脂質誘導体の共有結合性付着、ホスホチジリンシトール (phosphatidylinositol) の共有結合性付着、架橋、環化、公知の保護/ブロッキング基による誘導体化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合性架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、抗体分子または他の細胞リガンドへの結合、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解プロセッシング（例えば、開裂）、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、タンパク質へのアミノ酸のトランスファーRNA媒介付加、例えば、アルギニル化、およびユビキチン化が挙げられる（例えば、PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. I-12 (1983); Seifter et al., Meth Enzymol 182: 626-646 (1990); Rattan et al., Ann NY Acad Sci 663: 48-62 (1992) 参照）。

【0060】

「生物学的活性を有する」ポリペプチド断片は、用量依存性を伴い、または伴わない、特定の生物学的アッセイにおいて計測される元のポリペプチド、例えば、成熟形態の活性と類似するが必ずしも同一でなくてもよい活性を示すポリペプチドを指す。用量依存性が存在する場合、それは、ポリペプチドのそれと同一である必要はなく、むしろ、元のポリペプチドと比較して所与の活性において用量依存性と実質的に類似する（すなわち、候補ポリペプチドは、元のポリペプチドに対して高い活性または約25倍以下少ない、一部の実施形態においては、約10倍以下少ない活性、もしくは約3倍以下少ない活性を示す）。

【0061】

種ホモログは、本明細書に提供される配列から好適なプローブまたはプライマーを作製し、好適な核酸資源を所望のホモログについてスクリーニングすることにより単離および同定することができる。

【0062】

「バリエント」は、元のポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが、その必須の特性を保持するポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。一般に、バリエントは、元

のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと全体的に密接に類似し、多くの領域において、同一である。

【0063】

実際問題として、任意の特定の核酸分子またはポリペプチドが、本発明のヌクレオチド配列と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるか否かは、慣用的には、公知のコンピュータプログラムを使用して決定することができる。グローバル配列アラインメントとも称される、クエリ配列（本発明の配列）と対象配列との間の最良の全体的なマッチを決定するための好ましい方法は、Brutlagら（Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245）のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを使用して決定することができる。配列アラインメントにおいて、クエリ配列および対象配列は両方ともDNA配列である。RNA配列は、UをTに変換することにより比較することができる。前記グローバル配列アラインメントの結果は、パーセント同一性におけるものである。パーセント同一性を計算するためのDNA配列のFASTDBアラインメントに使用される好ましいパラメータは以下である：行列＝ユニタリー、k-タプル＝4、ミスマッチペナルティ＝1、結合ペナルティ＝30、ランダム化グループ長＝0、カットオフスコア＝1、ギャップペナルティ＝5、ギャップサイズペナルティ0.05、ウィンドウサイズ＝500または対象ヌクレオチド配列の長さのどちらか短い方。対象配列が、内部欠失のためではなく5'または3'欠失に起因してクエリ配列よりも短い場合、その結果を手作業により補正しなければならない。これは、FASTDBプログラムが、パーセント同一性を計算する場合、対象配列の5'および3'トランケーションを考慮しないためである。クエリ配列に対して5'または3'末端においてトランケートされた対象配列について、パーセント同一性は、クエリ配列の全塩基のパーセントとして、マッチング/アラインメントされていない対象配列の5'および3'であるクエリ配列の塩基の数を計算することにより補正される。ヌクレオチドがマッチング/アラインメントされているか否かは、FASTDB配列アラインメントの結果により決定される。次いで、この割合は、規定のパラメータを使用する上記のFASTDBプログラムにより計算されたパーセント同一性から減算され、最終のパーセント同一性スコアに達する。この補正スコアが、本発明のために使用されるものである。クエリ配列とマッチング/アラインメントされていない、FASTDBアラインメントによりディスプレイされる対象配列の5'および3'塩基の外側の塩基のみが、パーセント同一性スコアを手作業により調整する目的に計算される。例えば、90塩基の対象配列は、100塩基のクエリ配列とアラインメントされてパーセント同一性が決定される。欠失は対象配列の5'末端において生じ、したがって、FASTDBアラインメントは、5'末端における最初の10塩基のマッチング/アラインメントを示さない。この10個の損なわれた塩基はその配列の10%（マッチングされていない5'および3'末端における塩基の数/クエリ配列中の塩基の総数）に相当し、したがって、10%がFASTDBプログラムにより計算されたパーセント同一性スコアから減算される。残りの90塩基が完全にマッチした場合、最終のパーセント同一性は90%である。別の例において、90塩基の対象配列が、100塩基のクエリ配列と比較される。この場合、欠失は内部欠失であるため、クエリとマッチング/アラインメントされていない対象配列の5'にも3'にも塩基は存在しない。この場合、FASTDBにより計算されたパーセント同一性は、手作業により補正されない。再度述べると、クエリ配列とマッチング/アラインメントされていない対象配列の5'および3'の塩基のみが手作業により補正される。

【0064】

本発明のクエリアミノ酸配列と少なくとも、例えば95%「同一の」アミノ酸配列を有するポリペプチドにより、対象ポリペプチドのアミノ酸配列は、対象ポリペプチド配列がクエリアミノ酸配列のそれぞれの100アミノ酸につき5つまでのアミノ酸変更を含み得ることを除きクエリ配列と同一であることが意図される。換言すると、クエリアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るため、対象配列中のアミノ酸残基の5%までを挿入し、欠失し、または別のアミノ酸と置換することができる

10

20

30

40

50

。参照配列のこれらの変更は、参照アミノ酸配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置において、またはそれらの末端位置の間のいずれの箇所でも、参照配列中の残基の間に個々に、または参照配列内の1つ以上の連続する群として散在して生じ得る。

【0065】

実際問題として、任意の特定のポリペプチドが、例えば、配列に示されるアミノ酸配列または寄託DNAクローンによりコードされるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるか否かは、慣用的には、公知のコンピュータプログラムを使用して決定することができる。グローバル配列アラインメントとも称される、クエリ配列（本発明の配列）と対象配列との間の最良の全体的なマッチを決定するための好ましい方法は、Brutlagら（Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245）のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを使用して決定することができる。配列アラインメントにおいて、クエリ配列および対象配列は両方ともヌクレオチド配列または両方ともアミノ酸配列のいずれかである。前記グローバル配列アラインメントの結果は、パーセント同一性におけるものである。FASTDBアミノ酸アラインメントに使用される好ましいパラメータは以下である：行列 = PAM0、k-タプル = 2、ミスマッチペナルティ - - I、結合ペナルティ = 20、ランダム化グループ長 = 0、カットオフスコア = 1、ウィンドウサイズ = 配列長、ギャップペナルティ - - 5、ギャップサイズペナルティ - - 0.05、ウィンドウサイズ = 500または対象アミノ酸配列の長さのどちらか短い方。対象配列が、内部欠失のためではなくNまたはC末端欠失に起因してクエリ配列よりも短い場合、その結果を手作業により補正しなければならない。これは、FASTDBプログラムが、グローバルパーセント同一性を計算する場合、対象配列のNおよびC末端トランケーションを考慮しないためである。クエリ配列に対してNおよびC末端においてトランケートされた対象配列について、パーセント同一性は、クエリ配列の全塩基のパーセントとして、対応する対象残基とマッチング/アラインメントされていない、対象配列のNおよびC末端であるクエリ配列の残基の数を計算することにより補正される。残基がマッチング/アラインメントされているか否かは、FASTDB配列アラインメントの結果により決定される。次いで、この割合は、規定のパラメータを使用する上記のFASTDBプログラムにより計算されたパーセント同一性から減算され、最終のパーセント同一性スコアに達する。この最終パーセント同一性スコアが、本発明のために使用されるものである。クエリ配列とマッチング/アラインメントされていない、対象配列のNおよびC末端にある残基のみが、パーセント同一性スコアを手作業により調整する目的に考慮される。それは、対象配列の最も遠いNおよびC末端残基の外側のクエリ残基位置のみである。クエリ配列とマッチング/アラインメントされていない、FASTDBアラインメントにおいてディスプレイされる対象配列のNおよびC末端の外側の残基位置のみが手作業により補正される。他の手作業による補正は、本発明のために行われるべきでない。

【0066】

天然に存在するタンパク質バリエーションは、「アレルバリエーション」と呼ばれ、生物体の染色体上の所与の遺伝子座を占める遺伝子のいくつかの代替形態の1つを指す（Genes 11, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)）。これらのアレルバリエーションは、ポリヌクレオチドレベルおよび/またはポリペプチドレベルのいずれかにおいて変動し得る。あるいは、天然に存在しないバリエーションは、突然変異誘発技術により、または直接的合成により産生することができる。

【0067】

「標識」は、直接的に、またはシグナル産生系の1つ以上の追加のメンバーとの相互作用を通して、検出可能なシグナルを提供し得る薬剤を指す。直接的に検出可能であり、本発明において使用することができる標識としては、蛍光標識が挙げられる。具体的なフルオロフォアとしては、フルオレセイン、ローダミン、BODIPY、シアニン色素などが挙げられる。

【0068】

10

20

30

40

50

「蛍光標識」は、ある波長の光を、別の波長の光により活性化された場合に放射する能力を有する任意の標識を指す。

【0069】

「蛍光」は、蛍光シグナルの任意の検出可能な特徴を指し、それとしては、強度、スペクトル、波長、細胞内分布などが挙げられる。

【0070】

蛍光を「検出すること」は、定性的または定量的方法を使用して細胞の蛍光を評価することを指す。本発明の実施形態の一部において、蛍光は、定性的様式で検出される。換言すれば、組換え融合タンパク質が発現されるか否かを示す蛍光マーカーが存在するか否かである。他の例として、蛍光は、例えば、蛍光強度、スペクトル、または細胞内分布を計測する定量的手段を使用して測定することができ、異なる条件下で得られる値の統計的比較を可能とする。レベルは、定性的方法、例えば、複数の試料、例えば、蛍光顕微鏡または他の光学的検出器（例えば、画像分析システムなど）を使用して検出される試料のヒトによる目視分析および比較を使用して測定することもができる。蛍光における「変更」または「モジュレーション」は、別の条件と比較した特定の条件下での蛍光の強度、細胞内分布、スペクトル、波長、または他の側面における任意の検出可能な差を指す。例えば、「変更」または「モジュレーション」は定量的に検出され、その差は統計的に有意な差である。蛍光における任意の「変更」または「モジュレーション」は、標準的な機器、例えば、蛍光顕微鏡、CCD、もしくは任意の他の蛍光検出器を使用して検出することができ、自動システム、例えば、統合システムを使用して検出することができ、またはヒト観測者による変更の主観的検出を反映し得る。

【0071】

「緑色蛍光タンパク質」(GFP)は、青色光に曝露された場合に緑色の蛍光を発する、クラゲのエクオレア・ビクトリア(*Aequorea victoria*)/エクオレア・エクオレア(*Aequorea aequorea*)/エクオレア・フォルスカレア(*Aequorea forskalea*)から最初に単離された、238アミノ酸(26.9 kDa)から構成されるタンパク質である。A.ビクトリア(*A. victoria*)からのGFPは、395 nmの波長におけるメジャー励起ピークおよび475 nmにおけるマイナーピークを有する。この発光ピークは509 nmであり、それは、可視スペクトルの低い方の緑色部分に存在する。ウミシイタケ(レニラ・レニフォルミス(*Renilla reniformis*))からのGFPは、498 nmにおける単一のメジャー励起ピークを有する。広範な使用法の潜在性および研究者らの発展的要望に起因して、GFPの多くの異なる突然変異体が遺伝子操作されている。最初の主要な改善は、Roger TsienによりNatureにおいて1995年に報告された単一点突然変異(S65T)であった。この突然変異は、GFPのスペクトル特徴を大幅に改善し、増加した蛍光、光安定性およびピーク放射を509 nmに保持したままのメジャー励起ピークの488 nmへのシフトをもたらした。この足場への37 フォールディング効率(F64L)点突然変異体の追加は、増強型GFP(EGFP)を生じさせた。EGFPは、 $9.13 \times 10^{-21} \text{ m}^2$ /分子の光学的断面積としても公知であり、 $55,000 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ としても引用される、消衰係数(と表示される)を有する。十分にフォールディングしていないペプチドと融合した場合でさえもGFPが迅速にフォールディングし、成熟するのを可能とする一連の突然変異であるスーパーフォルダー(Superfolder)GFPが2006年に報告された。

【0072】

「黄色蛍光タンパク質」(YFP)は、エクオレア・ビクトリア(*Aequorea victoria*)に由来する緑色蛍光タンパク質の遺伝子突然変異体である。この励起ピークは514 nmであり、その発光ピークは527 nmである。

【0073】

本明細書において使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が明らかに他に記述しない限り、複数の参照対象を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 4 】

「ウイルス」は、宿主細胞の外側では成長も繁殖もし得ない超顕微鏡的感染性物質である。それぞれのウイルス粒子、またはビリオンは、キャプシドと呼ばれる保護タンパク質コート内の遺伝子材料、DNA、またはRNAからなる。キャプシド形状は、単純ならせんおよび正二十面体（多面体またはほぼ球形）形態から、尾部またはエンベロープを有するより複雑な構造まで変動する。ウイルスは、細胞生物形態に感染し、感染される宿主のタイプに応じて動物、植物および細菌タイプに分類される。

【 0 0 7 5 】

本明細書において使用される場合、用語「経シナプス性ウイルス」は、あるニューロンから別の介在ニューロンにシナプスを通して移動し得るウイルスを指す。このような経シナプス性ウイルスの例は、ラブドウイルス、例えば、狂犬病ウイルス、およびアルファヘルペスウイルス、例えば、仮性狂犬病ウイルスまたは単純ヘルペスウイルスである。本明細書において使用される場合、用語「経シナプス性ウイルス」はまた、あるニューロンから別の介在ニューロンにシナプスを通して移動する能力をそれ自体で有するウイルスのサブユニットおよび生物学的ベクター、例えば、そのようなサブユニットを組み込み、あるニューロンから別の介在ニューロンにシナプスを通して移動する能力を実証する改変ウイルスを包含する。

10

【 0 0 7 6 】

経シナプス性移動は、順行性または逆行性のいずれかであり得る。逆行性移動の間、ウイルスは、シナプス後ニューロンからシナプス前ニューロンに動く。したがって、順行性移動の間、ウイルスは、シナプス前ニューロンからシナプス後ニューロンに動く。

20

【 0 0 7 7 】

ホモログは、共通の祖先を共有するタンパク質を指す。アナログは、共通の祖先を共有しないが、それらを1つのクラスに含めることにさせるいくつかの（構造的よりむしろ）機能的な類似性を有する（例えば、トリプシン様セリンプロテイナーゼおよびサブチリシンは明らかに関連せず、活性部位の外側のそれらの構造は完全に異なるが、それらは、事実上幾何的に同一の活性部位を有し、したがって、アナログへの収束進化の一例とみなされる）。

【 0 0 7 8 】

ホモログの2つのサブクラスのオルソログおよびパラログが存在する。オルソログは、異なる種における同一遺伝子である（例えば、シトコム（cytochrome）「c」）。同一生物体における2つの遺伝子は、オルソログであり得ない。パラログは遺伝子重複の結果である（例えば、ヘモグロビンベータおよびデルタ）。2つの遺伝子/タンパク質が相同であり、同一生物体内に存在する場合、それらはパラログである。

30

【 0 0 7 9 】

本明細書において使用される場合、用語「障害」は、不快感、疾患、疾病、臨床病態、または病的状態を指す。

【 0 0 8 0 】

本明細書において使用される場合、用語「薬学的に許容可能な担体」は、活性成分の生物学的活性の有効性に干渉せず、化学的に不活性であり、それが投与される患者に対して毒性ではない担体媒体を指す。

40

【 0 0 8 1 】

本明細書において使用される場合、用語「薬学的に許容可能な誘導体」は、対象に対して比較的無毒である、例えば、本発明のスクリーニングの方法を使用して同定される薬剤の任意のホモログ、アナログ、または断片を指す。

【 0 0 8 2 】

用語「治療剤」は、障害または障害の合併症の予防または治療を補助する任意の分子、化合物、または治療物を指す。

【 0 0 8 3 】

適合性医薬担体中に配合されたそのような薬剤を含む組成物は、治療のために調製し、包

50

装し、ラベル貼付することができる。

【 0 0 8 4 】

複合体が水溶性である場合、それは、適切な緩衝液、例えば、リン酸緩衝生理食塩水または他の生理学的に適合性の溶液中で配合することができる。

【 0 0 8 5 】

あるいは、得られた複合体が水性溶媒中で不十分な溶解度を有する場合、それは、非イオン性界面活性剤、例えば、T w e e n、またはポリエチレングリコールと共に配合することができる。したがって、化合物および生理学的に許容可能なその溶媒和物は、（口腔または鼻腔のいずれかを介する）吸入もしくは吹送による投与または経口、バツカル、非経口、直腸投与のために配合することができ、または腫瘍の場合、固形腫瘍中に直接注射することができる。

10

【 0 0 8 6 】

経口投与について、医薬製剤は、液体形態、例えば、液剤、シロップ剤もしくは懸濁液剤であり得、または使用前の水もしくは他の好適なビヒクルによる再構成のための薬物製品として提供することができる。このような液体製剤は、薬学的に許容可能な添加剤、例えば、懸濁化剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または水添食用脂）；乳化剤（例えば、レシチンまたはアカシアガム）；非水性ビヒクル（例えば、アーモンド油、油性エステル、または分留植物油）；および保存剤（例えば、メチルもしくはプロピル p - ヒドロキシベンゾエートまたはソルビン酸）を用いて慣用の手段により調製することができる。医薬組成物は、薬学的に許容可能な賦形剤、例えば、結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；増量剤（例えば、ラクトース、微結晶性セルロースまたはリン酸水素カルシウム）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ）；崩壊剤（例えば、ジャガイモデンプンまたはデンプングリコール酸ナトリウム）；または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）を用いて慣用の手段により調製される、例えば、錠剤またはカプセル剤の形態をとり得る。錠剤は、当分野において周知の方法によりコーティングすることができる。

20

【 0 0 8 7 】

経口投与のための製剤は、活性化合物の徐放性を与えるように好適に配合することができる。

30

【 0 0 8 8 】

化合物は、注射、例えば、ボーラス注射または持続注入による非経口投与のために配合することができる。注射用配合物は、添加される保存剤と共に、単位剤形中で、例えば、アンプル中または複数用量容器中で提供することができる。

【 0 0 8 9 】

組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液またはエマルションのような形態をとり得、配合用薬剤（ f o r m u l a t o r y a g e n t ）、例えば、懸濁化剤、安定剤および/または分散剤を含有し得る。あるいは、活性成分は、使用前の好適なビヒクル、例えば、滅菌パイロジェンフリー水による構成のための粉末の形態であり得る。

【 0 0 9 0 】

化合物は、例えば、局所的適用、例えば、クリーム剤またはローション剤として配合することもできる。

40

【 0 0 9 1 】

上記の配合物に加えて、化合物はまた、デポー製剤として配合することができる。このような長時間作用性配合物は、埋込（例えば、眼内、皮下または筋肉内）により、または眼内注射により投与することができる。

【 0 0 9 2 】

したがって、例えば、化合物は、好適なポリマーもしくは疎水性材料と共に（例えば、許容可能な油中のエマルションとして）、またはイオン交換樹脂と共に、または難溶性誘導体、例えば、難溶性塩として配合することができる。リポソームおよびエマルションは、

50

親水性薬物のための送達ビヒクルまたは担体の周知の例である。

【0093】

組成物は、所望により、活性成分を含有する1つ以上の単位剤形を含有し得るパックまたは分注装置中で提供することができる。パックは、例えば、金属またはプラスチックホイール、例えば、プリスターパックを含み得る。パックまたは分注装置には、投与についての説明書を添付することができる。

【0094】

本発明はまた、本発明の治療レジメンを実施するためのキットを提供する。このようなキットは、1つ以上の容器中で、治療または予防有効量の組成物を薬学的に許容可能な形態で含む。

【0095】

キットのバイアル中の組成物は、例えば、滅菌生理食塩水、デキストロース溶液、または緩衝溶液、または他の薬学的に許容可能な滅菌流体との組合せで、薬学的に許容可能な溶液の形態であり得る。あるいは、複合体は、凍結乾燥または乾燥させることができ；この場合、キットは、場合により、容器中で複合体を再構成して注射目的の溶液を形成するための好ましくは滅菌した薬学的に許容可能な溶液（例えば、生理食塩水、デキストロース溶液など）をさらに含む。

【0096】

別の実施形態において、キットは、複合体を注射するための、好ましくは無菌形態で包装された針もしくはシリンジ、および/または包装されたアルコールパッドをさらに含む。臨床医または患者による組成物の投与についての説明書が場合により含まれる。

【0097】

「インターニューロン」（リレーニューロン、連合ニューロン、介在ニューロン、中間型ニューロンまたは局所回路ニューロンとも呼ばれる）は、ヒト体内に見出されるニューロンの3つの分類の1つである。インターニューロンは、神経回路を作出し、感覚または運動ニューロンと中枢神経系（CNS）との間の伝達を可能とする。これらは、反射、成体哺乳動物脳中の神経オシレーションおよび神経発生において機能することが見出されている。インターニューロンは、2つの群：局所インターニューロン、およびリレーインターニューロンにさらに分類することができ、両方の群は、本明細書において使用される場合、用語「インターニューロン」により包含される。局所インターニューロンは、短い軸索を有し、隣接ニューロンと回路を形成して情報の小片を分析する。リレーインターニューロンは、長い軸索を有し、脳のある領域中のニューロンの回路を他の領域中のものと接続する。インターニューロン間の相互作用は、脳が複雑な機能、例えば、学習、および意思決定を実行するのを可能とする。本発明のプロモーターは、全てのタイプのインターニューロン、例えば、GABA作動性インターニューロン、パルプアルブミン発現インターニューロン、またはコリン作動性インターニューロン中で遺伝子を発現させるために使用することができる。

【0098】

インターニューロンは、多数の疾患、例として、精神障害、パーキンソン病および神経変性疾患に関連している。

【0099】

特に定義のない限り、本明細書において使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する分野の当業者により一般に理解されているものと同じの意味を有する。本明細書に記載のものと類似または均等の方法および材料は、本発明の実施または試験に使用することができるが、好適な方法および材料が以下に記載される。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優先される。さらに、材料、方法、および実施例は説明のためのものにすぎず、限定的なものではない。

【実施例】

【0100】

遺伝子構築物

10

20

30

40

50

本試験において使用されるプロモーターID番号1は、754bpからなる。ChR2-eGFPコード配列をこのプロモーターおよび最適化コザック配列(GCCACC)直後に挿入し、それにウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE)およびSV40ポリアデニル化部位が続いた。それぞれ5.86E+11および4.18E+11GC/mLの力価を有するAAV血清型2/9を使用して、皮質ニューロンを標的化した。

【0101】

ウイルス形質移入および組織調製

V1へのAAV投与のため、マウスにフェンタニル-メedetミジン-ミダゾラム(フェンタニル0.05mg/kg、メedetミジン0.5mg/kg、ミダゾラム5.0mg/kg)を麻酔した。Coliquifilm(Coliquifilm、Allergan、S01XA20)を眼球に施与して脱水を防止した。30G針を使用して一次視覚野上方に両半球中でいくつかの孔を作製した。1μlのAAVを引張(pulled)ハウケイ酸ガラスピペット(1.5mmの外径、チップ直径100μm)中にロードした。ピペットをそれぞれの孔に通してガイドし、針を注射前に1mm下げた。注射後、麻酔をナロキソン1.2mg/kg、アチパメゾール2.5mg/kg、およびフルマゼニル0.5mg/kgのミックスにより拮抗させた。3週間後、単離された脳をPBS中4%PFA中で一晩固定し、次いでPBS中で4に於いて洗浄ステップを行った。ピラトームを使用して150μm厚の冠状切片を作製した。最初にスライスを30%のスクロース中で凍結保護してから3回の冷凍融解サイクルを行った。次いで、これらをPBS中10%の正常口バ血清(NDS)、1%のBSA、0.5%のTriton X-100により室温において2時間処理した。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)およびポリクローナルウサギ抗RFP(Rockland、600-401-379、1:500)による処理を、室温において2~3日間実施した。二次口バ抗ラットAlexa Fluor-488 Ab(Molecular Probes Inc.; 1:200)および抗ウサギAlexa Fluor-568(Life Technologies、A10042、1:200)による処理を2時間行った。切片を洗浄し、スライドガラス上にProLong Gold褐色防止用試薬(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。

以下の態様を包含し得る。

[1] 配列番号1の核酸配列を含み、もしくはそれからなり、または配列番号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700bpの核酸配列からなる単離核酸分子であって、インターニューロン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さらに含む、上記[1]に記載の単離核酸分子。

[3] 上記[1]または[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上記[1]または[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、桿体光受容器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] 上記[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、上記[5]に記載のベクター。

[7] インターニューロン中の遺伝子の前記発現のための、上記[1]もしくは[2]に記載の核酸の、上記[4]に記載の発現力セットの、または上記[5]に記載のベクターの使用。

10

20

30

40

50

〔 8 〕 単離細胞、細胞系または細胞集団に上記〔 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、桿体光受容器中で遺伝子を発現させる方法であって、前記細胞がインターニューロンであり、または前記細胞がインターニューロンを含む場合、発現させるべき前記遺伝子を前記単離細胞、前記細胞系または前記細胞集団により特異的に発現させる方法。

〔 9 〕 上記〔 4 〕に記載の発現カセットまたは上記〔 5 〕に記載のベクターを含む単離細胞。

〔 10 〕 前記発現カセットまたはベクターが、前記細胞のゲノム中に安定的に組み込まれている、上記〔 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、ハロロドプシンまたはチャネルロドプシンである、上記〔 1 〕もしくは〔 2 〕に記載の単離核酸分子、上記〔 4 〕に記載の発現カセット、上記〔 5 〕に記載のベクター、上記〔 7 〕に記載の使用、上記〔 8 〕に記載の方法または上記〔 9 〕に記載の細胞。

〔 12 〕 上記〔 1 〕または〔 2 〕に記載の単離核酸分子を含む、インターニューロン中で遺伝子を発現させるためのキット。

【図面】

【図 1】

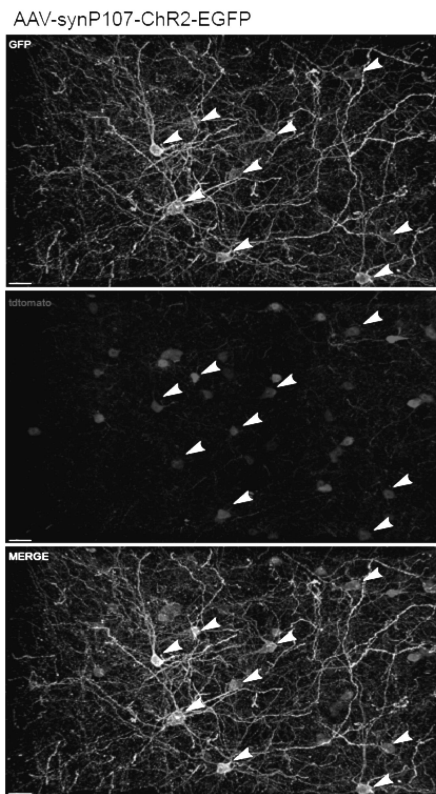


Figure 1

【配列表】

0007071361000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- スイス国 4 1 0 4 オーバーヴィル, イム ドリッセル 8 2
(72)発明者 ユエットナー, ジョゼフィーヌ
スイス国 4 0 5 4 パーゼル, ロットベルグシュトラーク 9
(72)発明者 テイシェイラ, ミゲル
スイス国 4 0 5 8 パーゼル, タンゲンテンヴェーグ 3 0
審査官 小金井 悟
(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 1 1 8 5 0 7 (W O , A 1)
Front. Neural Circuits., 2009年11月09日, Vol.3, No.19, pp.1-24
(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
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 / B I O S I S / M E D L I N E / E M B A S E (S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
G o o g l e / G o o g l e S c h o l a r