

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7236707号

(P7236707)

(45)発行日 令和5年3月10日(2023.3.10)

(24)登録日 令和5年3月2日(2023.3.2)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/4375(2006.01)

A 6 1 K 31/4375

Z N A

A 6 1 P 25/14 (2006.01)

A 6 1 P 25/14

A 6 1 P 25/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/00

A 6 1 P 21/00 (2006.01)

A 6 1 P 21/00

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09

Z

請求項の数 24 (全50頁)

(21)出願番号 特願2019-529315(P2019-529315)

(86)(22)出願日 平成29年8月12日(2017.8.12)

(65)公表番号 特表2019-524160(P2019-524160
A)

(43)公表日 令和1年9月5日(2019.9.5)

(86)国際出願番号 PCT/IB2017/054932

(87)国際公開番号 WO2018/029660

(87)国際公開日 平成30年2月15日(2018.2.15)

審査請求日 令和2年8月12日(2020.8.12)

(31)優先権主張番号 62/374,072

(32)優先日 平成28年8月12日(2016.8.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 501181075

ザ・ホスピタル・フォー・シック・チルドレン

THE HOSPITAL FOR SICK CHILDREN

カナダ、エム5ジー・1エックス8、オンタリオ、トロント、ユニバーシティ・アベニュー555番

(73)特許権者 504176911

国立大学法人大阪大学

大阪府吹田市山田丘1番1号

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リピート不安定性と関連する疾患を治療する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞中の(CAG)_nリピートDNA配列の伸長を阻害するための、
式：

ナフチリジン - アザキノロン (NA)

で示される化合物を含む医薬組成物であって、

式中、

ナフチリジンは、1, 8 - ナフチリジン部分を示し、

アザキノロンは、8 - アザキノロン部分を示し、および

記号 - は、連結部分を示し、

前記ナフチリジン - アザキノロン (NA) は、前記1, 8 - ナフチリジン部分がグアニンに水素結合し、および前記8 - アザキノロン部分がアデニンに水素結合することにより、前記(CAG)_nリピートDNAにインターカレートする、
医薬組成物。

【請求項2】

前記医薬組成物が、細胞がインピボでNAと接触するように、用いられることを特徴とする、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記医薬組成物が、細胞がNAと複数回接触するように、用いられることを特徴とする、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記医薬組成物が、細胞がNAと接触する前に、(CAG)nリピートDNA配列中の(CAG)nリピート数を決定するように、用いられることを特徴とする、請求項2または3に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記医薬組成物が、細胞がNAと接触した後に、(CAG)nリピートDNA配列中の(CAG)nリピート数を決定するように、用いられることを特徴とする、請求項2乃至4のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記医薬組成物が、細胞が、(CAG)nリピートDNA配列中の(CAG)nリピート数に応じた量のNAと接触するように、用いられることを特徴とする、請求項1乃至5のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 7】

個体のゲノム中の(CAG)nリピートDNA配列中の(CAG)nリピート数を低減するための、
式：

ナフチリジン - アザキノロン (NA)

で示される化合物を含む医薬組成物であって、

式中、

ナフチリジンは、1, 8 - ナフチリジン部分を示し、

20

アザキノロンは、8 - アザキノロン部分を示し、および

記号 - は、連結部分を示し、

前記ナフチリジン - アザキノロン (NA) は、前記1, 8 - ナフチリジン部分がグアニンに水素結合し、および前記8 - アザキノロン部分がアデニンに水素結合することにより、

前記(CAG)nリピートDNAにインターカレートする、
医薬組成物。

【請求項 8】

NAの罹患組織への直接投与のための、請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

NAの全身投与のための、請求項7に記載の医薬組成物。

30

【請求項 10】

前記投与が、注射により行われる、請求項8または9に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

NAの複数回投与のための、請求項7乃至10のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

複数用量のNAの投与のための、請求項7乃至11のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

(CAG)nリピート数に基づく治療量のNAの投与のための、請求項7乃至12のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

治療量のNAが、約0.01 μMから約1 Mである、請求項13に記載の医薬組成物。

40

【請求項 15】

前記医薬組成物が、NAの投与の前に、個体が、(CAG)nリピートDNA配列を有することが識別されるように、用いられることを特徴とする、請求項7乃至14のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記医薬組成物が、NAの投与の前に、前記個体からの1以上の細胞中の(CAG)nリピート数が決定されるように、用いられることを特徴とする、請求項7乃至15のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

50

前記医薬組成物が、N Aの投与の後に、前記個体からの1以上の細胞中の(C A G)nリピート数がモニタリングされるように、用いられることを特徴とする、請求項7乃至16のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項18】

N Aが、リボソーム又は頭蓋内ポンプを通じて送達される、請求項7乃至17のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項19】

(C A G)nリピートDNA配列の伸長によって引き起こされる個体中の疾患を治療または予防するための、

式：

ナフチリジン - アザキノロン (N A)

で示される化合物を含む医薬組成物であって、

式中、

ナフチリジンは、1, 8 - ナフチリジン部分を示し、

アザキノロンは、8 - アザキノロン部分を示し、および

記号 - は、連結部分を示し、

前記ナフチリジン - アザキノロン (N A) は、前記1, 8 - ナフチリジン部分がグアニンに水素結合し、および前記8 - アザキノロン部分がアデニンに水素結合することにより、前記(C A G)nリピートDNAにインターカレートする、

医薬組成物。

【請求項20】

前記個体が、(C A G)nリピートDNA不安定性によって引き起こされる疾患を有する個体である、請求項19に記載の医薬組成物。

【請求項21】

(C A G)nリピートDNA配列の伸長によって引き起こされる疾患が、ハンチントン病(H D)、ハンチントン類縁疾患2型(H D L 2)、筋緊張性ジストロフィー(D M 1)、脊髄小脳失調症1型(S C A 1)、S C A 2、S C A 3、S C A 6、S C A 7、S C A 8、S C A 1 2、S C A 1 7、球脊髄性筋萎縮症(S B M A)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(D R P L A)、フック角膜内皮ジストロフィー2(F E C D 2)、統合失調症、双極性障害(K C N N 3)、および乳がんリスク因子A 1 B 1からなる群から選択される、請求項19または20に記載の医薬組成物。

【請求項22】

前記医薬組成物が、(C A G)nリピートDNA配列の伸長の前に、N Aが投与されるように、用いられることを特徴とする、請求項19乃至21のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項23】

前記医薬組成物が、誕生前に(子宮内で)、N Aが個体に投与されるように、用いられることを特徴とする、請求項19乃至22のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項24】

前記医薬組成物が、(C A G)nリピートDNA配列の伸長に続いて、N Aが個体に投与されるように、用いられることを特徴とする、請求項19乃至23のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(技術分野)

本件開示は一般にリピート伸長に関連する疾患を治療する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

(背景技術)

遺伝子特異的 C A G / C T G トリヌクレオチド (trinucleotide) リピート伸長は、ハンチントン病 (H D) 及び筋緊張性ジストロフィー (D M 1) を含む、不安定なリピートによって引き起こされる 40 を超える神経変性疾患のうち少なくとも 16 についての原因である。罹患組織における進行中のリピート伸長は、発症年齢、重症度及び進行と関連する。劇的なリピート伸長の変異が同じ個体の組織の間で存在し、5000 リピートを超える違いを伴い、最も大きな伸長は心臓、大脳皮質及び線条体に認められる。個体の臨床的に罹患組織中におけるかなり大きな伸長は、疾患の発症、重症度及び進行とともに、進行性の体細胞伸長と更に関連する。最近の研究は、16 の C A G 疾患のうち少なくとも 6 つ (H D、S C A 1、S C A 2、S C A 3、S C A 7 及び S C A 17) について、D N A 修復タンパク質が発症年齢の主な調整役であることを明らかにし (Genetic Modifiers of Huntington's Disease (GeM-HD) Consortium, 2015, Cell, 162:516-526; Betten court 他, 2016, Annals Neurol., in press)、進行性体細胞伸長と発症年齢の間の相関関係を更にサポートした。この関係は、他のリピート不安定性と関連する疾患同様、それぞれ体細胞伸長を示す全ての 16 C A G 疾患について該当しそうである。

10

従って、体細胞リピート伸長を阻む又は元に戻す方法は、疾患の進行を阻み又は元に戻すために用い得るものであり、治療環境において極めて有益であろう。

【発明の概要】

【0003】

(概要)

本件開示は、リピート D N A 不安定性によって引き起こされる疾患を治療するための方法を提供する。本件開示はまた、リピート D N A の更なる伸長を阻害し、場合によっては伸長したリピート D N A のサイズを低減 (例えば、リピート数を低減) する方法を提供する。

20

1つの態様において、細胞中のリピート D N A 配列の伸長を阻害する方法が提供される。そのような方法は、典型的には、細胞をナフチリジン - アザキノロン (N A) に接触させることを含む。

いくつかの実施形態において、前記接触はインピボで行われる。いくつかの実施形態において、接触工程は、複数回行われる。いくつかの実施形態において、前記方法は更に、接触工程の前に、リピート D N A 配列の中におけるリピート数を決定することを含む。いくつかの実施形態において、前記方法は更に、接触工程の後に、リピート D N A 配列の中

30

におけるリピート数を決定することを含む。

いくつかの実施形態において、細胞は、リピート D N A 配列の中のリピート数に応じた量の N A と接触させられる。いくつかの実施形態において、N A は修飾された N A である。

【0004】

別の態様において、個体のゲノム中のリピート D N A 配列の中でリピート数を低減する方法が提供される。そのような方法は、典型的には、少なくとも 1 用量の治療量のナフチリジン - アザキノロンを個体に投与することを含む。

いくつかの実施形態において、N A は罹患組織に直接投与される。いくつかの実施形態において、N A は全身に投与される。いくつかの実施形態において、投与は注射を通じて行われる。

40

いくつかの実施形態において、N A は複数回投与される。いくつかの実施形態において、複数用量の N A が投与される。いくつかの実施形態において、前記方法は更に、複数回投与する工程を繰り返すことを含む。

いくつかの実施形態において、治療量の N A はリピート数に基づく。いくつかの実施形態において、治療量の N A は約 0 . 0 1 μ M から約 1 M である。

いくつかの実施形態において、前記方法は更に、リピート D N A 配列を有する個体を識別することを含む。いくつかの実施形態において、前記方法は更に、個体からの 1 以上の細胞中のリピート数を決定することを含む。いくつかの実施形態において、前記方法は更に個体からの 1 以上の細胞におけるリピート数をモニタリングすることを含む。

いくつかの実施形態において、N A はそのインピボ安定性を増進するように修飾される

50

。いくつかの実施形態において、NAはリポソーム又は頭蓋内ポンプを通じて送達される。

【0005】

また別の態様において、リピートDNA配列の伸長によって引き起こされる個体中の疾患を治療または予防する方法が提供される。そのような方法は、典型的には、少なくとも1用量の治療量のナフチリジン - アザキノロン (NA) を個体に投与することを含む。

いくつかの実施形態において、そのような方法は更にリピートDNA不安定性によって引き起こされる疾患を有する個体を識別することを含む。リピートDNA配列の伸長により引き起こされる代表的な疾患としては、ハンチントン病 (HD)、ハンチントン類縁疾患2型 (HDL2)、筋緊張性ジストロフィー (DM1)、脊髄小脳失調症1型 (SCA1)、SCA2、SCA3、SCA6、SCA7、SCA8、SCA12、SCA17、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)、フック角膜内皮ジストロフィー2 (FEC2)、統合失調症、双極性障害 (KCNN3) 及び乳がんリスク因子A1B1が挙げられるがこれらに限られるものではない。

10

いくつかの実施形態において、NAはリピートDNA配列の伸長の前に投与される。いくつかの実施形態において、投与工程はリピートDNA配列の伸長の前に起こる。いくつかの実施形態において、NAは、誕生前に (子宮内で) 個体に投与される。いくつかの実施形態において、NAは、リピートDNA配列の伸長に続いて個体に投与される。

ある態様において、伸長したリピートDNA配列によって引き起こされる疾患を有する個体を治療する方法が提供される。そのような方法は、典型的には、少なくとも1用量の治療量のナフチリジン - アザキノロン (NA) を該個体に投与することを含む。

20

【0006】

また別の態様において、個体中のリピートDNA配列の中におけるリピート数を低減する方法が提供される。そのような方法は、典型的には、少なくとも1用量の治療量のナフチリジン - アザキノロン (NA) を個体に投与することを含む

また別の態様において、個体中のリピートDNA配列の伸長を阻害する方法が提供される。そのような方法は、典型的には、少なくとも1用量の治療量のナフチリジン - アザキノロン (NA) を個体に投与することを含む。

いくつかの実施形態において、前記投与は罹患組織に行われる。いくつかの実施形態において、前記投与は注射を通じて行われる。いくつかの実施形態において、前記投与は全身に行われる。

30

いくつかの実施形態において、治療量のNAの用量は1回よりも多く投与される。いくつかの実施形態において、治療量のNAの用量は、リピート数に基づいて用量依存的な方法で投与される。いくつかの実施形態において、治療量のNAの用量は約0.01 μ Mから約1Mである。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の任意の方法は、投与工程を更に複数回繰り返すことを含む。

【0007】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の任意の方法は、更に、リピートDNAの不安定性によって引き起こされる疾患を有する個体を識別することを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の任意の方法は、更に、リピート伸長を有する個体を識別することを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の任意の方法は、個体からの細胞中のリピートサイズを決定することを更に含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の任意の方法は、個体からの細胞中のリピートサイズをモニタリングすることを更に含む。

40

いくつかの実施形態において、NAはそのインビボ安定性を増進するため修飾される。いくつかの実施形態において、NAはリポソーム又は頭蓋内ポンプを通じて送達される。

いくつかの実施形態において、トリヌクレオチドリピートDNA不安定性によって引き起こされる疾患は、ハンチントン病 (HD)、ハンチントン類縁疾患2型 (HDL2)、筋緊張性ジストロフィー (DM1)、脊髄小脳失調症1型 (SCA1)、SCA2、SCA3、SCA6、SCA7、SCA8、SCA12、SCA17、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)、フック角膜内皮ジストロフィ

50

ー 2 (F E C D 2) 、統合失調症、双極性障害 (K C N N 3) または乳がんリスク因子 A 1 B 1 を含む。

【 0 0 0 8 】

別途定義されない限り、本明細書で用いられる全ての技術的及び科学的用語は、本件方法及び組成物の属する分野の当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載される方法及び物質と類似または同等の方法及び物質は、本件方法及び組成物の実施または試験において用いることが可能であるが、適切な方法及び物質は以下に記載される。加えて、物質、方法及び実施例は例示に過ぎず、限定することを意図していない。本明細書で言及される全ての出版物、特許出願、特許及びその他の参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

[本発明1001]

細胞中のリピートDNA配列の伸長を阻害する方法であって、細胞をナフチリジン - アザキノロン (N A) と接触させる工程を含む、方法。

[本発明1002]

前記接触させる工程がインピボで行われる、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記接触させる工程が複数回実施される、本発明1001または1002の方法。

[本発明1004]

更に接触させる工程の前に、リピートDNA配列中のリピート数を決定する工程を含む、本発明1001から1003のいずれかの方法。

20

[本発明1005]

更に接触させる工程の後に、リピートDNA配列中のリピート数を決定する工程を含む、本発明1001から1004のいずれかの方法。

[本発明1006]

細胞を、リピートDNA配列中のリピート数に応じた量のNAと接触させる工程を含む、本発明1001から1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

NAが修飾されたNAである、本発明1001から1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

個体のゲノム中のリピートDNA配列中のリピート数を低減する方法であって、少なくとも1用量の治療量のナフチリジン - アザキノロン (N A) を個体に投与する工程を含む、方法。

30

[本発明1009]

NAが、罹患組織に直接投与される、本発明1008の方法。

[本発明1010]

NAが全身に投与される、本発明1008の方法。

[本発明1011]

前記投与する工程が注射により行われる、本発明1008、1009または1010の方法。

[本発明1012]

NAが複数回投与される、本発明1008から1011のいずれかの方法。

40

[本発明1013]

複数用量のNAが投与される、本発明1008から1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

更に投与する工程を複数回繰り返すことを含む、本発明1008から1013のいずれかの方法。

[本発明1015]

治療量のNAがリピート数に基づく、本発明1008から1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

治療量のNAが約0.01 μ Mから約1Mである、本発明1008から1015のいずれかの方法。

50

[本発明1017]

更にリピートDNA配列を有する個体を識別する工程を含む、本発明1008から1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

更に個体からの1以上の細胞中のリピート数を決定する工程を含む、本発明1008から1017のいずれかの方法。

[本発明1019]

更に個体からの1以上の細胞中のリピート数をモニタリングする工程を含む、本発明1008から1018のいずれかの方法。

[本発明1020]

NAがそのインビボ安定性を増進するように修飾される、本発明1008から1019のいずれかの方法。

[本発明1021]

NAがリポソーム又は頭蓋内ポンプを通じて送達される、本発明1008から1020のいずれかの方法。

[本発明1022]

リピートDNA配列の伸長によって引き起こされる個体中の疾患を治療または予防する方法であって、少なくとも1用量の治療量のナフチリジン - アザキノロン (NA) を個体に投与する工程を含む、方法。

[本発明1023]

更にリピートDNA不安定性によって引き起こされる疾患を有する個体を識別する工程を含む、本発明1022の方法。

[本発明1024]

リピートDNA配列の伸長によって引き起こされる疾患が、ハンチントン病 (HD)、ハンチントン類縁疾患2型 (HDL2)、筋緊張性ジストロフィー (DM1)、脊髄小脳失調症1型 (SCA1)、SCA2、SCA3、SCA6、SCA7、SCA8、SCA12、SCA17、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)、フック角膜内皮ジストロフィー2 (FEC D2)、統合失調症、双極性障害 (KCNN3)、乳がんリスク因子A1B1からなる群から選択される、本発明1022または1023の方法。

[本発明1025]

NAがリピートDNA配列の伸長の前に投与される、本発明1022から1024のいずれかの方法。

[本発明1026]

投与する工程がリピートDNA配列の伸長の前に起こる、本発明1022から1024のいずれかの方法。

[本発明1027]

NAが誕生前に (子宮内で) 個体に投与される、本発明1022から1026のいずれかの方法。

[本発明1028]

NAがリピートDNA配列の伸長に続いて個体に投与される、本発明1022から1024のいずれかの方法。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1A】図1Aはナフチリジン - アザキノロン (NA) の構造を示す。

【図1B】図1BはNAをNBDで標識するために用いられた化学反応を示す。

【図2】図2はNAが長いCAGスリップアウトに結合することを示す実験結果である。図2のパネルAは、2つの複素環、ナフチリジン (赤で示す) 及び8-アザキノロン部分 (青で示す) を含むNAの構造を示す。図2のパネルBは、NA - (CAG) · (CAG) 三要素複合体の模式図を示す。(CAG)_nDNA配列 (左) はヘアピン構造に折りた

10

20

30

40

50

むことが可能であり、C - G塩基対（中央）に隣接するA - Aミスマッチ対を含む。NA分子は、2-アミノ-1,8-ナフチリジン部分（赤）がグアニンに水素結合し、8-アザキノロン部分（青）がアデニンに水素結合して、DNAらせんにインタカレーションすることが可能である。図2のパネルCは、両方の鎖にリピートを伴うゲル精製DNA断片に対するNAの結合を証明し、該リピートは、両方の鎖が³²Pで標識されたCTGトラクトの非リピートDNA上流領域及び下流領域の59bp及び54bpに隣接し、ここでリピートは、完全二本鎖形状の(CAG)₅₀・(CTG)₅₀、(CAG)₅₀・(CTG)₅₀上の房状の短いスリップアウト、(CAG)₅₀・(CTG)₃₀からの長い(CAG)₂₀スリップアウト、または(CAG)₃₀・(CTG)₅₀からの長い(CTG)₂₀スリップアウトである。長いスリップアウトが、単一のスリップアウトとして、完全に塩基が対になった(CTG)_n・(CAG)_nバックボーンから押し出されることについては記載のとおりである(Pearson 他, 2002, Nuc. Acids Res., 30:4534-47)。DNAを濃度を増やしたNA(0.15μM、0.75μM、7.5μM及び50μM)と混合し、4%ポリアクリルアミドゲルで分析した。全てのレーンが同じゲルからであり、それらは明確性のため分離された。NA-DNA複合体をブラケットで示し、遊離DNAを矢印の頭で示す。線状及び(CTG)₂₀スリップアウトDNAの両方について、NAの結合はなかった(白い矢印の頭)；より高濃度のNAにおいて、房状の短いスリップアウトDNAの減少が観察されたが(灰色の矢印の頭)、明確にシフトしたバンドを明らかにすることはできなかった。バンドシフトは(CAG)₂₀スリップアウトDNA(黒い矢印の頭)において明らかであった。図2のパネルDは、NA結合の定量化を示す。線状及び3つのスリップアウト基質について、相対移動を各NA-DNA複合体の移動距離の遊離DNAの移動距離に対する比率として測定した。移動距離は、ウェルから各バンドの一貫した中心点について測定した。デンストメトリー分析がS-DNA基質について行われた。グラフは3つの独立した実験の平均及び対応する標準偏差を示す。図2のパネルEは、ゲル精製DNAヘテロ二本鎖断片で、両方の鎖が³²Pで標識されている(CAG)₅₀・(CTG)₃₀からの長い(CAG)₂₀スリップアウトを伴うものが、熱変性され、(内部鎖構造形成を強化し、内部鎖ハイブリダイゼーションを阻害するため)氷でスナップ冷却され、7.5μMのNAの存在下または非存在下でインキュベートされた(左のパネル)。同じDNAがアルカリ処理によって変性され、7.5μMのNAの存在下または非存在下で、リハイブリダイゼーションされた(右のパネル)。その後、DNAは4%ポリアクリルアミドゲルで解析された。各DNA標本を模式的に示す。(CAG)₅₀鎖(両方のパネル)及びヘテロ二本鎖(CAG)₅₀・(CTG)₃₀(右のパネル)の両方で形成されたNA-DNA複合体をブラケットによって示し、遊離DNAを矢印の頭で示す。NAはいずれの実験においても、(CTG)₃₀ヘアピン断片と結合しなかった(白い矢印の頭)。とりわけ、NAは、相補鎖のリハイブリダイゼーションを阻害しなかった。

【図3】図3は、特に長いCAGスリップアウトのヒト細胞抽出物(HeLa細胞)による修復をNAが阻害したことを示す。図4のパネルAはインビトロ修復アッセイの模式図である。出発DNA及び修復生成物はリピート含有断片を放出し、それをPAGEで分析し、モルレベルでサザンブロッティング及びデンストメトリーによって評価した。NAの存在下または非存在下での長い(CAG)₂₀スリップアウト(図3のパネルB)長い(CTG)₂₀スリップアウト(図3のパネルC)、単一CAGスリップアウト(図3のパネルD)または単一G-Tミスマッチ(図3のパネルE)を含む異なるDNA基質の修復。(CAG)₅₀・(CTG)₃₀、(CAG)₃₀・(CTG)₅₀または(CAG)₅₀・(CTG)₄₉のハイブリッドからスリップDNA基質を調製した。G-Tミスマッチの修復は、模式的に示されるとおり、HindIII制限サイトを再構成する。グラフは、レーン中の全てのリピート含有断片に対する修復生成物で修復効率をパーセントで示し、値は、NA-フリー効率に対して規格化されている。値は3から5つの独立した実験の平均±標準偏差を表す。NA含有は長い(CAG)₂₀スリップアウトの修復を阻害するが(図3のパネルB)、その他の基質の修復効率には影響しない(図3のパネルC、D及びE)。

10

20

30

40

50

【図4】図4は、NA細胞分布、非毒性、及びHD患者細胞中におけるリピート不安定性に対する効果を示す実験結果である。図4のパネルAは(CAG)850を伴うHT1080細胞モデル中のNAの細胞分布を示す。NBD標識NA(緑)が核及び細胞質全体に分布していた。核及び細胞膜はDAPI(青)及びCell Light 細胞膜-RFP(赤)でそれぞれ染色した。スケールバーは20µmを示す。図4のパネルBは、72時間NAで処置されたHT1080-(CAG)850細胞の細胞毒性を示す。細胞生存率をWST-1アッセイで推計した。値は3つの独立した測定の平均値±標準偏差を表す。図4のパネルCは、50µMのNAで処置された、または処置されなかったHT1080-(CAG)850細胞の成長曲線を示す。エラーバーは、3つの実験の標準偏差を示す。図4のパネルD及びEは、リピート不安定性が、HDリピートトラクトを通じてsmall-pool-PCR法によって解析されたことを示す(表2を参照)。ヒストグラムは、(CAG)180を伴うヒトHD初代線維芽細胞GM09197、または(CAG)43を伴うヒトHD初代線維芽細胞GM02191を、NAと共にあるいは抜きで40日間成長させた後のリピート長の分布を示す。リピートアレルの頻度分布を灰色のバーで示す。点線はCAGサイズのピークを示す。アレル長は、10リピートごとのスパンでピンにグルーピングした。230を超えるアレルがグループごとにサイズ分けされた。リピート集団のパーセンテージを、10リピートスパンのピンにグルーピングされたアレルの数をアレルの総数で割ることによって計算した。3つの独立した実験の要約が示されている(図10及び11を参照)。図4のパネルG及びHは、HD線維芽細胞をNAと共にあるいは抜きで40日間インキュベートした後の平均リピートサイズを示す。*P<0.001、スチューデントのt検定。パネルHは、HD線維芽細胞中(NAと共にあるいは抜きで40日間インキュベートした後)のCASK、HTT(正常アレル)、及びMfd15遺伝子座のリピート-トラクト長を示す(図12A及び12Cも参照)。長さの変異はこれらの伸長しなかったもののいずれにおいても観察されなかった。

【図5】図5は、増殖から独立して、rCAG転写に依存するHT1080-(CAG)850細胞中で、NAがCAG収縮を誘発することを示す実験結果である。図5のパネルAは、模式的転写バブル及びHT1080-(CAG)850細胞(初代細胞クローン及びNAと共にあるいは抜きで30日間インキュベートした後の細胞)のsmall-pool-PCRによるCAG/CTGリピート長解析を示す代表的なデータを示す。左のスケールは、分子量マーカー(M)を同等サイズのCAG-リピート断片についてのリピート数に変換したものを示す。図5のパネルBは、HT1080-(CAG)850細胞におけるリピート長分布を示すヒストグラムである。不安定アレルの頻度分布を灰色のバーで示す。安定アレルの頻度を黒いバーで示す。比較を容易にするため、点線は変化しないCAGサイズを示す。アレル長は50リピートのスパンでピンにグルーピングする。リピート集団のパーセンテージを、50リピートスパンのピンにグルーピングされたアレルの数をアレルの総数で割ることによって計算した。50を超えるアレルが各グループにサイズ分けされた。P-値をカイ二乗検定によって計算した(表2)。3つの独立した実験の概要を示す(図10及び11を参照)。図5のパネルCは、NAと共にあるいは抜きで30日間インキュベートした後のHT1080-(CAG)850細胞の平均リピートサイズの変化を示す。P-値をスチューデントのt検定で計算した。パネルDは、NA処置を伴うまたは抜きの非増殖HT1080-(CAG)850細胞のリピート長分布を、下方に平均リピートサイズの変化とともに示す(図15A及び15Bも参照)。NAはまだ効果を有しており、その活性が細胞増殖から独立していることを示している。図5のパネルEは、リピートを転写しない増殖HT1080-(CAG)850細胞(図16A)のNAと共にあるいは抜きでの30日後を示す。リピート長分布及び平均リピートサイズ変化が示されている。NAは効果がなく、転写に依存することを示している。図5のパネルFはNAが伸長CAGトラクトにわたって転写をブロックしないことを示す(図10A及び10Bも参照)。NA処置(50µm)された、またはされていないHT1080-(CAG)850細胞中の導入遺伝子(CAG-方向における転写)のRNA転写レベル。定量逆転写(RT)-PCRを、TaqMan Gene Expression アッセイを用いて実施した。

10

20

30

40

50

NA (50 μ M) は CAG - リピート含有転写物の転写に影響しなかった。データは3つの平均 \pm 標準偏差である。図5のパネルGは、HT1080 - (CAG)850細胞(初代クローン及びNAと共にあるいは抜きで30日間インキュベートした後の細胞)中のCASK、ATXN8、及びMfd15遺伝子座のリピート - トラクト長を示す。長さの変異は、HT1080 - (CAG)850細胞中(NAと共にあるいは抜きで30日間インキュベートした後)の正常な長さの遺伝子座のこれらのリピートのいずれにおいても観察されなかった(図12A及び12Cも参照)。

【図6】図6は、R6/2マウス線条体中でNAがCAG収縮を誘発することを示す実験結果である。図6のパネルAは、CAG長の解析であり、6匹の代表的なR6/2マウスで、4週間の間、1回(マウスi)、2回(マウスii及びiii)または4回(マウスiv、v、vi)NAを注入したものの線条体中のCAGリピート長の分布を示す。NAを生理的食塩水に溶解して、左線条体(青)に注入し、右線条体(赤)には生理的食塩水のみを注入した(図24参照)。NAはCAG転写遺伝子にわたっての転写に影響しない(図15B)。全てのマウスを4回処置し、図25A - 25Hに示す。図6のパネルBは、記載(Lee 他, 2010, BMC Syst. Biol., 4:29)に従って計算した収縮及び伸長不安定性指数に反映された、1回、2回、または4回のNA注入の効果を示す(図27も参照)。図6のパネルCは、記載のとおり計算され、収縮及び伸長の相対的組成に反映された、1回、2回、または4回のNA注入の効果を示す(図27も参照)。図6のパネルDは、CAG長解析であり、4週間にわたって左線条体にNAを4回注入した後の代表的なR6/2マウス(マウスvi)からの線条体、前頭皮質、小脳及び尾の中のCAGリピート長の分布を示す。DNAは左側(青)及び右側(赤)の線条体、前頭皮質、小脳及び尾から、NA処置前(赤)及び後(緑)に単離された。とりわけ、NA処置された半分の線条体中のCAGリピートは、尾における遺伝性の長さ(尾の中のCAG長に基づく前駆アレル長の推計値、この長さは誕生からマウスの生涯を通じて変化しないため; ePAL = 159)よりも短かった。リピートサイズ変化は、NA抜きでの体細胞伸長に対する主要なピークのNA誘発収縮を表す最初の数と遺伝性のアレルに対する収縮を表す第2の数をブラケットで括る。これらのブラケットは、線条体中の二峰性分布の第二モードにおけるサイズ変化を説明しない(図25A - 25Hも参照)。図6のパネルEは、Dに示された様々な組織の不安定性指数を示し、ここで赤及び青の菱形は、生理的食塩水処置/線条体の右側及びNA - 処置/線条体の左側の値をそれぞれ表す(図25A - 25H及び図27Bも参照)。図6のパネルFは、4回注入したR6/2マウスからの線条体の両側におけるMapkap1及びFgd4遺伝子座のリピート - トラクト長を示す(図12A及び12Cも参照)。長さの変異は、これら正常な長さのリピートのいずれにおいても観察されなかった。

【図7】図7は、NA - 結合CAGスリップアウトの高分解能ポリアミドゲル電気泳動分離を示す。(CAG)50 \cdot (CTG)30からの長い(CAG)20スリップアウトを伴い、両鎖を³²P - 標識した1 pmolのゲル精製ヘテロ二本鎖DNAを、濃度を増加させて(0.75 μ M、7.5 μ M、50 μ M、100 μ M、250 μ M、500 μ M、1000 μ M及び1500 μ M)NAと混合し、4%ポリアクリルアミドゲル(左のパネル)または8%のポリアミドゲル(右のパネル)上で分析した。NA - DNA複合体をブラケットで示し、遊離DNAを矢印の頭で示す。相対移動度のシフト(Rm)を、各NA - DNA複合体の移動距離の遊離DNAの移動距離に対する比率で測定した(グラフパネル)。移動距離は、ウェルから各バンドの一貫した中心点を定規で測定した。ヒストグラムは、3つの独立した実験の平均と対応する標準偏差を示す。(CAG)50 \cdot (CTG)30へのNA - 結合は、バンドの広がりを引き起こし、これは以前、他のDNA - 結合配位子において観察された(Nielsen 他, 1988, Biochem., 27:67-73; Barcelo 他, 1991, Biochem., 30:4863-73; Carlsson 他, 1995, Nuc. Acids Res., 23:2413-20; Fox 他, 1988, Nuc. Acids Res., 16:2489-507)。

【図8】図8は、1本鎖にリピートなし(左パネル)または(CAG)nリピートのいずれかを伴い、共通の鎖に³²P - 標識したDNA基質へのNAの結合を示す。3、5、11

10

20

30

40

50

又は15CAGリピートのスリップアウトが単一のスリップアウトとして、完全に塩基が対になったバックボーンから押し出された(トップパネル、DNA配列及び構造を参照)。1pmolの各基質を、濃度を増加させて(15µM及び50µM)NAと混合し、4%ポリアクリルアミドゲルで解析した。全てのレーンは同じゲルからであり、それらは明確に分離された。NA-DNA複合体をブラケットにより示し、遊離DNAを矢印の頭で示す。線状基質については、NAの結合はなく(白い矢印の頭)、NAの濃度が高いほど、短いスリップアウトDNA(3及び5リピート)のわずかな減少が観察されたが(灰色の矢印の頭)、明確にシフトしたバンドを明らかにすることはできない。バンドシフトは(CAG)₁₁及び(CAG)₁₅スリップアウトDNA(黒い矢印の頭)について明らかである。相対移動度シフトを各NA-DNA複合体の移動距離の遊離DNAの移動距離に対する比率で測定した(グラフパネル)。移動距離はウェルから各バンドの一貫した中心点を測定した。ヒストグラムは、3つの独立した実験の平均とそれに対応する標準偏差を示す。P-値をスチューデントのt検定によって計算した。

10

【図9】図9は、CAG/CTGトラクトの存在または複製の方向に関わらず、NAが複製効率または複製フォークの進行に影響しないことを示す。SV40起源の複製を含有する3つの環状プラスミド及び伸長(CAG)₇₉・(CTG)₇₉リピートトラクト(pDM79EF及びpDM79HF)またはリピートなし(pKN16)を、ヒトHeLa細胞抽出物によって複製し、NA処置無しまたは有り(7.5µMまたは15µM)で、インピットで組換えSV40T-Agを添加した。SV40-oriの位置が複製方向及びいずれの鎖がリーディング鎖またはラギング鎖テンプレートとして用いられるかを決定する。pDM79HFはCAG鎖をラギング鎖テンプレートとして用いる一方、pDM79EFはCTG鎖をラギング鎖テンプレートとして用いる(ゲルパネルの上の模式図)。複製生成物を精製し、BamHIで線状にした。同じ量の反応物質をまたBamHI及びDpnIで消化した。DpnIは複製されていない物質及び部分的に複製されている物質を、模式図に示されるように消化する(一番上の図)。完全に複製された物質及び複製されていない物質を分析するために、従前の記載(Panigrahi 他, 2002, J. Biol. Chem., 277:13926-34; Cleary 他, 2002, Nat. Genet., 31(1):37-46; 下の図)のとおり、消化生成物を1%アガロースゲルで電気泳動した。同量の複製されていないプラスミドDNAをDpnIで消化し、臭化エチジウムで染色して、複製されていないプラスミドDNAの完全な消化を示した(下のパネル)。パネルI、臭化エチジウム染色、パネルII、オートラジオグラフ; マーカー(レーン1); DpnI非消化プラスミドDNA(レーン2); DpnI消化非複製プラスミドDNA(レーン3-4); 複製プラスミドDNA、DpnIレジスタント(レーン5)。3つの全ての試験されたテンプレートについて、DpnIレジスタント物質においてはNA存在下又は非存在下での複製に違いはなかった(パネルIII、IV及びV)。

20

30

【図10】図10は、3つの独立した実験からの(CAG)₁₈₀伸長を伴うHD線維芽細胞におけるリピート不安定性にNAが与える効果を独立して解析したものを示す。HDリピートトラクトにわたってSmall-POOL PCRを用いてリピート不安定性を評価した。ヒストグラムは、HD初代線維芽細胞をNAとともにまたはNA抜きで40日間インキュベートした後のリピート長の分布を示す。リピートアレルの頻度分布は、灰色のバーで示す。点線はCAGサイズのピークを示す。

40

【図11】図11は、(CAG)₄₃伸長を伴うHD線維芽細胞におけるリピート不安定性にNAが与える効果を3つの独立した実験から示す。HDリピートトラクトにわたってSmall-POOL PCRを用いてリピート不安定性を評価した。ヒストグラムは、HD初代線維芽細胞をNAとともにまたはNA抜きで40日間インキュベートした後のリピート長の分布を示す。リピートアレルの頻度分布は、灰色のバーで示す。点線はCAGサイズのピークを示す。

【図12】図12は、HD初代線維芽細胞(図12のパネルA)及びHT1080-(CAG)₈₅₀細胞(図12のパネルB)中のCASKの非伸長CAG/CTGリピート長についての超高感度small-POOL PCRを示す代表的なデータである。spPC

50

Rの高感度な変異検出能力をもってしても、NA処置及び非処置細胞のいずれにおいても長さの変異は観察されなかった。いくつかの反応では何ら生成物が示されず、これは、small-pool PCRで用いられる低ゲノムDNAテンプレート希釈においては典型的である。40日間NA処置され、または処置されなかったHD患者線維芽細胞のTBPアレル中の非伸長CAGトラクトの変動性(図12のパネルC)及びNAまたは生理的食塩水を4回注入したHDR6/2マウス線条体におけるリピート長の変動性(図12のパネルD)。リピート長は、Agilentバイオアナライザで解析した。

【図13】図13はNAが一般的な変異原ではないことを証明するデータを示す。NA処置が、CAGスリップアウト以外の配列に対して一般的な変異原として作用するかどうかを評価するため、一分子リアルタイム環状コンセンサスシーケンシング(SMRT-CCS)の高い読み取り正確性及び深度が利用された。一分子シーケンシングは、HPR T1遺伝子(誘発性遺伝的変異のグローバルな効果についての代理指標として広く用いられる)について行われた。一分子シーケンシングは0.5%未満の変異頻度を偽陽性なく検知することができる。図13のパネルAは、変異検知のためのHPR T1シーケンシングの模式図である。簡潔に述べると、細胞を、NA(50 μ M)の添加または生理的食塩水の添加においてのみ異なるが、他は同じ条件下で成長させ、DNAを単離し、HPR T1エキソン2及び3をPCR増幅及びシーケンスした。図13のパネルBは、NA処置サンプル及び生理的食塩水処置サンプルの間での配列変異の比較を示すグラフである。我々は、男性HD患者由来細胞で、NAまたは生理的食塩水処置された、個別X染色体にリンクしたHPR T1アレルの一分子シーケンスのリード(エキソン2及び3、2,897ヌクレオチド)を比較することを選択した。この方法で、それぞれのリードは単一細胞を表すであろう。グラフは、PacBio単一分子ロングリードでシーケンスされたNA処置及び生理的食塩水処置細胞の3つの実験的複製の間での相対変異率による配列変異体の分布を示す。2,402にのぼる個別HPR T1アレルの比較は、何ら配列の違いを明らかにしなかった。最小限の配列変動はあったものの、この点については、NA-処置細胞及び生理的食塩水-処置細胞の間で有意な差はなかった($p = 0.1083$ 、2サンプル コルモゴロフ-スミルノフ検定)。パネルCはSMRTロングリードシーケンシングが、この適用には理想的であったことを示す。何故ならそれは、アンブリコンの全体の長さを、単一の連続したリード中で、リードを通じて高品質なコンセンサス配列を生成する複数のパスを用いて、シーケンスすることができるためである。したがって、配列の違いが別の複製物について存在しないことは、NAが一般的な変異原として作用しないことの証拠である。

【図14】図14は、rCAG転写物を生成するHT1080-(CAG)850におけるリピート不安定性にNAが与える効果についての独立した解析を示す。ヒストグラムは、HT1080-(CAG)850細胞中のリピート長分布を示す。リピート長は、small-pool PCRによって、非処置及びNA処置細胞の両方について、3つの独立した実験において解析した。不安定アレルの頻度分布を灰色のバーで示す。安定アレルの頻度を黒いバーで示す。CAG長トラクトの低減は、各実験で、NA処置細胞において明らかである。比較を円滑化するため、点線は最初の変化していないCAGサイズを示す。P-値をカイ二乗検定で計算した。

【図15】図15は(CAG)850細胞におけるNAの効果が増殖から独立していることを示す。NAの効果を非増殖細胞において試験し、図4と同じ間隔で接触障害を維持した。図15のパネルAは、BrdU-含有媒体中で24時間後のBrdU陽性細胞の割合によって測定した、接触障害及び血清飢餓による増殖の阻止を示す。図15のパネルBは、接触障害下にあるHT1080-(CAG)850細胞中のリピート長分布を示すヒストグラムを示す。リピート長は、small-pool PCRによって、3つの独立した実験において、非処置及びNA処置細胞の両方について解析された。不安定アレルの頻度分布を灰色のバーで示す。安定アレルの頻度を黒いバーで示す。NAの効果は細胞増殖とは独立していた。NAは、接触障害細胞において伸長リピートの収縮に向かってシフトを誘発した($p < 0.05$)。比較を円滑にするため、点線は、変化しなかったCAGサイ

10

20

30

40

50

ズを示す。P - 値をカイ二乗検定で計算した。

【図 16】図 16 は、NA が HTT にわたって転写に影響をしないことを示す。図 16 のパネル A は、HT 1080 - (CAG) 850 及び HT 1080 - 非転写 (CAG) 850 細胞中の導入遺伝子発現の RT - PCR 解析を示す。結果は、CAG リピートが HT 1080 - 非転写細胞に転写されず、単一コピーとしてインテグレートされることを証明する。鎖特異的 RT - PCR (1 週間)。AttB - PhiC31 システムが単一コピーインテグレーションに広く用いられる。図 16 のパネル B は、定量リアルタイム逆転写酵素 (qRT) - PCR により決定され、U6 RNA に規格化され、NA 処置対 PBS 処置 R6 / 2 線条体の比で表現された。データを 3 つの平均 ± 標準偏差で示す。NA が誘発した R - ループからの RNA 部分の置換は観察されず、R - ループから離れて NA が RNA に競合的に結合するであろうことが予想されよう。NA が RNA リピートに結合するため競合できないことは、これら RNA への低い結合性のためである可能性がある。NA と、RNA のあるリピート長である r (CAG) 9 との相互作用に関する研究 (Li 他, 2016, Chem. Asian J., 11:1971-1981)。注目すべきことに、NA の RNA (CAG) 9 への親和性と DNA (CAG) 9 へのそれは、数倍異なる。更に、NA の d (CAG) 9 及び r (CAG) 9 に対する結合化学量論は非常に異なっている。表面プラズモン共鳴 (SPR) アッセイによると、d (CAG) 9 (固定化量は 497 RU であった) 及び r (CAG) 9 (524 RU) について、d (CAG) 9 に結合する NA は、SPR 強度の著しい変化 (140 RU) を生み出す一方で、r (CAG) 9 についてはわずかな変化 (8 RU) しか観察されなかった。エレクトロスプレ - イオン化飛行時間型質量分析計は、NA の d (CAG) 9 に対する親和性が r (CAG) 9 のそれに対するものよりはるかに高いことを示唆した。d (CAG) 9 及び r (CAG) 9 に対する NA - 結合の化学量論量が不明であることから、d (CAG) 9 及び r (CAG) 9 に対する NA - 結合の結合定数を正確に測定することは科学的に困難である。これに加えて、これらの全ての実験は、インビトロで行われ、そこには核酸と NA のみが緩衝溶液中に存在した。r (CAG) 9 に対する NA の結合が、細胞中では著しく効果的ではないということは妥当であるように思われる。RNA リピートに対する NA の強い結合の欠如は、それが R - ループから RNA を競合により離すことができないことと整合的である (図 17 E)。

【図 17】図 17 は、NA が転写、R - ループの形成、RNase によるプロセッシング、または R - ループの生物物理学的安定性に影響を与えないこと示す実験結果である。図 17 のパネル A は、NA (50 μ M) で処置された、あるいは処置されていない HT 1080 - (CAG) 850 細胞中の導入遺伝子の RNA 転写レベルのグラフである (CAG 方向に転写)。定量逆転写 (RT) - PCR を、TaqMan Gene Expression アッセイを用いて行った。NA (50 μ M) は、転写物を含有する CAG - リピートの転写に影響を与えなかった。データは 3 つについての平均 ± 標準偏差である。図 17 のパネル B は R - ループ形成及びプロセッシングの模式図である。矢印は NA が転写、R - ループ形成、RNase A / H 消化、R - ループ生物物理学的安定性、または R - ループプロセッシングのいずれかを中断させ得るステップを指しており、それぞれ図 17 のパネル A、D、C 及び E に示されるように試験した。図 17 のパネル C は (CAG) 79 · (CTG) 79 リピート含有プラスミドであって、NA (120 μ M) の存在下または非存在下でいずれかの鎖に T3 または T7 ポリメラーゼによってインビトロ転写されたものを示す。反応生成物は、その後全ての一本鎖 RNA を開裂するため RNase A (「A」と標識) で処理し、1% アガロースゲルで分析した。RNA - フリースーパーコイル DNA を明らかにするために、RNase H (「H」と標識) によるコントロール処理を行って、RNA : DNA ハイブリッドを除いた。転写中に NA (50 μ M) が存在することは R - ループの形成に影響しなかった。図 17 のパネル D は、(CAG) 79 · (CAG) 79 の伸長トラクト含有スーパーコイルプラスミドのインビトロ転写が、T3 または T7 RNA ポリメラーゼ転写生成物を用いて行われ、NA (120 μ M) の存在下または非存在下で RNase A (「A」と標識) または RNase A 及び RNase H (「H」と標識) で処理されたことを示す。反応生成物はその後 1% アガロースゲルで分析した。NA (50 μ M) は s

sRNAのRNAase Aによる開裂にも、RNAase HによるRNA : DNAハイブリッドのプロセッシングにも影響しなかった。図17のパネルEは、(CAG)₇₉・(CAG)₇₉を伴うスーパーコイルDNA(レーン1)が、T3及びT7RNAポリメラーゼによってインビトロで両鎖上のリピートにわたって転写され、二重R-ループをもたらしたことを示す。二重R-ループをRNAase AまたはH(「A」または「H」と標識された)で処理し、NA(50 μM)とともにインキュベートした。反応生成物を1%アガロースゲルで分析した。RNAase A及びRNAase H(「H」と標識)の両方で処理した二重R-ループを伴うコントロール反応(レーン5)、及びスーパーコイルプラスミドそれ自身(レーン6)は、NA(500 μM、示されていない)によって変化しなかった。ダイマーまたはモノマー形態のスーパーコイルプラスミドの位置を「SC」で示す。上方の「SC」は結合したダイマーを表し、下方の「SC」はモノマーを表す。パネルC、D及びEにおいて、NAは、転写反応(パネルC)、RNAase A/H反応のみ、RNAase A/Hクリーンアップに続く場合のみのいずれかに含まれていた。NAは転写、R-ループ形成、RNAase A/HによるR-ループの消化、またはR-ループからRNAの切断を阻害しない。

10

【図18】図18は、NAのR-ループ形成、プロセッシング、及び不安定性に与える効果を示す。図18のパネルAは、(CAG)₇₉・(CAG)₇₉を伴うスーパーコイルDNA(レーン1)が、インビトロで両鎖上のリピートにわたって転写され、T3及びT7RNAポリメラーゼによって二重R-ループをもたらしたことを示す。二重R-ループはその後RNAase AまたはH(「A」または「H」と標識)で処理され、50 μMのNAとともにインキュベートされた。反応生成物はその後1%アガロースゲルで分析された。高濃度のNAにおいては、R-ループスメアが減少した(レーン4)。RNAase A及びRNAase H(「H」と標識)の両方で処理された二重R-ループを伴うコントロール反応(レーン5)及びスーパーコイルプラスミドのみ(レーン6)は、より高濃度のNAで変化しなかった。ダイマーまたはモノマー形態中のスーパーコイルプラスミドの位置を「SC」で示す。図18のパネルBは、R-ループ形成、プロセッシング及び解析の模式図である。あらかじめ形成された二重R-ループを、最終分化(レチノイン酸)ヒトニューロン様細胞抽出物(SH-SY5Y)によって、NA(50 μM)の存在下、または非存在下で記載されているとおり処置し、DNAリピート長を伸長、収縮または安定としてSTRIPアッセイによって評価した。図18のパネルCは、STRIP解析の代表例を示すグラフである。転写生成物を単離し、処置し、先に(CAG)₇₉・(CAG)₇₉長を安定的に維持することが示された大腸菌細胞に形質転換した。個々のバクテリアのコロニーから単離されたプラスミドは、リピート含有断片を放出するため制限酵素で消化し、4%ポリアクリルアミドゲルで分析し、不安定性のスコアをつけた。

20

30

【図19】図19はNAが伸長したCAGトラクトの収縮を誘発し得る可能なメカニズムを示す。図19のパネルAは転写に誘発された、CTG DNAテンプレート鎖とのハイブリッド中のr(CAG)_nとのR-ループ形成がCAG鎖を置き換え、NAが結合することを可能とすることを示す。NAは様々な量で結合し、より短い、あるいはより長いヘアピンをつくる。R-ループで、またはRNAの除去に伴い再アニールされたDNA鎖上で形成された内部鎖DNAリピート構造は、不明確なメカニズムによって伸長及び収縮を繰り返すように処置されうる。スリップアウトしたCAG及びスリップアウトしたCTGリピートは、主にランダムコイル及びヘアピン立体構造中にそれぞれ存在した。R-ループのプロセッシングに伴うリピート不安定性は、R-ループからスリップDNAの形成及びそれに引き続く異常な修復を通じて起こることが示されている(Panigrahi 他, 2010, PNAS USA, 107:12593-9)。rCAG-dCTG R-ループの形成中に、NAが、変異dCAG鎖上に形成された内部鎖ヘアピンに結合し、それらのヘアピンを図2のパネルDに示されるように更に伸長させることが可能であり得る。図19のパネルBは、同様に、NAが、RNAの除去に続くDNA鎖の記載外の再アニールによって形成されたCAGスリップアウトに結合しうることを示す(図19のパネルB)。これらのNA結合構造は、プロセッシングを、伸長を超えて収縮へとシフトしうる。スリップCAG/CTGリピ

40

50

ートのプロセッシングは複雑であり、未知のヌクレアーゼによる多数のヌクレオチド鎖切断の切れ目（図19のパネルB中の矢印を参照）を含むことが示されている（Hou 他, 2009, Nature Struct. & Mol. Biol., 16:869-75; Pluciennik 他, 2013, PNAS USA, 110:12277-82）。NAはまた一本鎖（CAG）10リピートのギャップに結合することが可能であり、それはCTGスリップアウトの除去の間に起こる可能性がある。（CAG）20スリップアウトの修復をブロックしたそのNAは、ヒト及びその他のDNAポリメラーゼが、NA-結合（CAG）10テンプレートに沿ってプライマーを伸長することができないことと整合する。これらの結果は、転写強化リピート不安定性におけるNAの効果、R-ループプロセッシングにおけるNA攪乱によって引き起こされた可能性を示唆する。

10

【図20】図20は、MutS が、（CAG）20の単一スリップアウトを含有する放射標識されたスリップDNAと、室温で、30分間、10mM Hepes-KOH pH 7.5、110mM KCl、1mM EDTA及び1mM DTTを含む緩衝液中において、結合することが可能であったことを示す。この反応にATP（+/-Mg²⁺）を添加すると、先に証明されたように、MutS のDNAへの結合を中断させる。NAの添加は、MutS とこの基質との結合または解離に何の効果もない。

【図21】図21は、スーパーコイルDNA、線状DNA及び転写誘発R-ループのFAN1開裂を示す。（CAG）79・（CAG）79リピートを含有するスーパーコイルプラスミドは、BamHIで線状化され、37℃で15分間、200nMのFAN1とともにインキュベートされた（左パネル、最初の2つのレーン）。同じスーパーコイルプラスミドを直接200nMのFAN1で処置した（左パネル、第2の2つのレーン）。同じスーパーコイルプラスミドをインビトロでT3RNAポリメラーゼによってCTG鎖にわたって転写した（中央パネル）。転写反応生成物をその後RNaseAで処理し、全ての一本鎖RNAを開裂させ、またはRNaseA及びRNaseHの両方で処理し、RNA:DNAハイブリッドを除去した。これらの反応は、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール（25:24:1、v/v/v）での抽出、及びエタノール沈殿で精製し、37℃で15分間、200nMのFAN1とともにインキュベートした（右のパネル）。全ての反応生成物を、1%アガロースゲル上、1xTBE緩衝液中、80Vで3時間流して解析した。続いてゲルを、臭化エチジウム（0.5mg/ml）で、紫外光（UV）下で全核酸が可視化されるように染色した。FAN1はスーパーコイル及び線状DNA（左パネル）をDNA含有転写誘発R-ループ同様に開裂し、スーパーコイル依存RNA部分を放出する（右パネル）。モノマーまたは多量体形態のスーパーコイルプラスミドの位置を「SC」で示す。「OC」は開環形態を示す。「LN」は線状化プラスミドを示す。

20

【図22】図22は、FAN1開裂が、フラップ-DNA基質中のCAGヘアピンの存在によって変化し、この作用がCAGヘアピンに対するNAの結合によって阻害されることを示す。フラップ-DNA基質（図22のパネルD-Fの配列を参照）を模式的にトップパネルに示す：リピートのない5'-フラップDNA（図22のパネルA）、フラップ中に（CAG）20リピートを伴う5'-フラップDNA（図22のパネルB）、二本鎖領域中に（CAG）20リピートを伴う5'-フラップDNA（図22のパネルC）。全てのDNA構造は、フラップ鎖の5'末端において³²P放射性標識した。1pmolの各基質をNAの濃度を増加させて（7.5µM、15µM、50µM）インキュベートし、続いて200nMのFAN1で処置した。ヌクレアーゼ反応を、未変性8%ポリアクリルアミドゲル上、200V、1時間で解析した。消化生成物の量を、デンシトメリー分析で定量した。全てのレーンは同じゲルからで、それらは明確性のために分けられた。ヒストグラムは、3つの独立した実験の平均と対応する標準偏差を示す。FAN1消化サイトをマップするため、反応生成物を8%の変性ゲル上で、マクサム-ギルバート法シーケンシング反応とともに分離した。切断箇所を矢印の頭で示す（白から黒へ、消化効率の増加を示す）。異なる消化断片は文字（a、b、c）で示す。「s」は開始基質を示す。「s+NA」は、CAGスリップアウトへのNA結合によりシフトした基質を示す。切断箇所は、DNAの末端、ジャンクション・ポイントまたはリピートユニット数のいずれかに対するヌクレ

30

40

50

オチドの場所によって示す。図 2 2 のパネル D - F : 3 つの基質について開裂箇所をマップした ; 図 2 2 のパネル D は図 2 2 のパネル A に対応する ; 図 2 2 のパネル E は図 2 2 のパネル B に対応する ; 図 2 2 のパネル F は図 2 2 のパネル C に対応する。

【図 2 3】図 2 3 は N A が R P A 結合と競合し、C A G テンプレートに沿った D N A ポリメラーゼ の強化された進行をブロックすることを示す。図 2 3 のパネル A は、R P A (2 5 0 n M) (レーン 2) の、(C A G) 2 0 のスリップアウトを含有し両方の鎖が³²P 標識された D N A 基質 (トップの模式図) への結合を示す。該基質は、N A (5 0 μ M) とともに 1 0 分間室温で、R P A 添加前にインキュベートされた。N A は R P A と (C A G) 2 0 基質への結合において競合する (レーン 3) 。 R P A に結合した D N A のパーセンテージがデンシトリー分析によって定量された。ヒストグラムは、3 つの独立した実験の平均及び対応する標準偏差を示す。図 2 3 のパネル B は、ポリメラーゼ伸長アッセイが先に記載のとおり行われたことを示す。0 . 1 μ M の (C A G) 1 0 テンプレートオリゴが、0 . 1 μ M の³²P 標識されたプライマーでアニールされ、N A (5 0 μ M) とともにあるいは抜きで 3 0 分間室温でインキュベートされた。2 5 0 n M の R P A 及び / または 2 0 n M の D N A ポリメラーゼ が反応に添加され、1 5 分間 3 7 ° でインキュベートされた。反応生成物を、6 % のシーケンシングゲル上で、マクサム - ギルバート法シーケンシング反応とともに分離した (レーン 1) 。プライマーのみはレーン 2 である。D N A ポリメラーゼ のみでは、C A G トラクトを通じて合成することはできなかった (レーン 3) が、その作用は、R P A の添加により強化された (レーン 4) 。N A は、C A G テンプレートに沿った D N A ポリメラーゼ の強化された進行をブロックし (レーン 5 及び 6) 、その結果は、C A G トラクトについて N A の結合が R P A に競合することと整合する。図 2 3 のパネル C は、ポリメラーゼが N A - 結合 C A G テンプレートにわたって合成することができないことを通じた N A 誘発の収縮につき可能なメカニズムを模式図で示す。

【図 2 4】図 2 4 は、R 6 / 2 H D マウスのための、N A 及び生理的食塩水の投与計画を示す。

【図 2 5】図 2 5 は、4 回の注入で処置された 1 0 マウスのうちの 8 マウス (マウス v i - x i) の線條体、皮質、小脳及び尾についての C A G リピート長解析及び不安定性指数を示す (図 2 5 のパネル A - H) 。その他の 2 マウスの C A G スキャン (マウス i v 及び v) を図 6 A に示す。

【図 2 6】図 2 6 は、生理的食塩水注入、N A を含む生理的食塩水注入、または注入せずに、その後 H E 染色を行ったマウス線條体の組織学的研究を示す。

【図 2 7】図 2 7 は、全てではなくてもほとんどの N A 処置線條体中のアレルがリピート収縮を被ったことを示し、N A がほとんどの細胞に影響したことを示している。図 2 7 のパネル A は、確立された方法を用い、C A G リピートサイズの G e n e S c a n トレースから体細胞の「不安定性指数」を定量したものを示す。この計算は、相対的高さの閾値を用いてバックグラウンドを補正し、効率的にデータを規格化し、細胞集団中の細胞あたりの主アレルからの平均 C A G 長変化を表す「不安定性指数」を生成する：より大きい指数はより大きい伸長を反映し、より小さい指数はより低い伸長を反映する。N A で処置されたまたは処置されていない線條体の解析は、1、2 及び 4 投与の N A 注入後、不安定性指数が段階的に低減したことを明らかにした (図 6 B、図 2 5 A - 2 5 H) 。パネル B は、N A で 4 回処置された全ての 1 0 マウスについて、不安定性指数をとりまとめたものを示す。N A で 4 回処置された線條体中のリピートサイズ分布は、未処置 (mock-treated) の線條体とは有意な差があった (マン・ホイットニー、 $p = 0 . 0 0 0 3 5$) 。相対ピークの高さの補正により、収縮及び伸長指数並びに収縮 / 伸長ピークの相対的構成の定量が可能となり、記載されているとおり、いずれもが N A 処置の後、収縮が増加することを明らかにした。線條体内注入を行った同じマウスからの大脳皮質及び小脳中の C A G トラクトが右側及び左側で C A G 長の不均一性について同一のパターンを示したことから、N A の効果は注入箇所において局所的であった。

【図 2 8】図 2 8 は、N B D - 標識 N A の構造を確認するための N M R データを示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

(詳細な説明)

遺伝子的に不安定な疾患を引き起こすリピートDNA配列を特に標的とした小分子、またはこれらの配列の結果として形成される構造体は、これらの遺伝子的不安定性をコントロールする潜在力を有する可能性があり、これは、進行する体細胞リピート伸長が疾患の発症及び進行に貢献し得るからである。治療適用のために設計された配位子は、それらの標的に、変異アレルに対する高い特異性で結合しなければならず、全体に対する毒性がほとんど無いから全く無いように伸長を阻止し、または収縮を誘発しなければならない。本件開示はスリップCAG/CTGリピート構造に高い特異性で結合するように設計された小分子 (Nakatani 他, 2005, Nat. Chem. Biol., 1:39-43; Hagihara 他, 2006, Nuc. Acids Symp. Ser. (Oxf.), 50:147-8; 及び Hagihara 他, 2011, Chembiochem., 12:1686-9)、及び伸長したリピートの不安定性を修正し、リピート収縮を導くことについて記載している。本件開示は、特にリピート伸長を低減する最初の潜在的な治療について記載している。とりわけ、本明細書において、NAが伸長を阻止することができ、そのことが疾患の発症、進行または重症度を、遅らせまたは阻むとともに、伸長したリピートの収縮を誘発し、遺伝性の長さよりも短くすることすら可能であることについて報告している。

10

【0011】

本件開示は、個体中のトリヌクレオチドリピートDNA配列中のトリヌクレオチドリピート数を低減する方法について記載している。本件開示はまた、個体中のトリヌクレオチドリピートDNA配列の伸長、または更なる伸長を阻害するために用いることができる方法について記載している。本明細書に記載の方法は、トリヌクレオチドリピートDNA不安定性によって引き起こされる疾患を有する個体を治療するために用いることができる。本明細書において用いられる場合、トリヌクレオチドリピートDNA不安定性によって引き起こされる疾患を治療することは、伸長の進行を、したがってトリヌクレオチドリピートDNA配列の伸長と結びついた症状を、阻止または止めることを指すことができる。また、本明細書で用いられる場合、トリヌクレオチドリピートDNA不安定性によって引き起こされる疾患を治療することは、疾患の進行を反転させることを指すことができる。例えば、トリヌクレオチドリピートDNA配列中のトリヌクレオチドリピート数を閾値内にまたはそれよりも下に低減することが可能であれば、その疾患に関連した症状を止める、若しくは予防する、または場合によっては、初期 (例えば、細胞及び組織の著しい変性前) の介入であれば反転させることさえ、可能である。

20

30

【0012】

本明細書に記載の方法は、少なくとも1用量の治療量のナフチリジン - アザキノロン (NA) を個体に投与することを含む。NAは、2-アミノ-1,8-ナフチリジン部分と8-アザキノロン部分からなる (例えば、図1Aを参照)。NAの2つの分子がDNAらせんにインターカレートし、2-アミノ-1,8-ナフチリジン部分がグアニンと水素結合し、8-アザキノロン部分がアデニンと水素結合することが可能であり、結果として2つのシトシンがらせんから突き出し、あるいは押し出される。いかなる特定の理論にも縛られるものではないが、本明細書で提示する結果は、変異リピートの転写中、有糸分裂後の細胞内でのNAの作用が、伸長した変異性アレルに特異的であり、CAGスリップアウトの修復を調節することによる仲介であることを示している。

40

トリヌクレオチドリピート不安定性によって引き起こされる疾患は、当該技術分野で公知であり、現在のその数は数十にのぼる。本明細書に記載されているようにNAによって治療することができるトリヌクレオチドリピート不安定性疾患には、CAG/CTGトリヌクレオチドリピートに関連する疾患が含まれる。そのような疾患としては、ハンチントン病 (HD)、ハンチントン類縁疾患2型 (HDL2)、筋緊張性ジストロフィー (DM1)、脊髄小脳失調症1型 (SCA1)、SCA2、SCA3、SCA4、SCA6、SCA7、SCA8、SCA12、SCA17、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)、フック角膜内皮ジストロフィー2 (FEC2)

50

、統合失調症、双極性障害（K C N N 3）、乳がんリスク因子A 1 B 1（N C O A 3、S R C - 3、A C T R、p C I P、R A C 3及びT R A M 1としても知られている）が挙げられるがこれらに限られるわけではない。トリヌクレオチドリピートDNA不安定性によって引き起こされる疾患を有する個体は、典型的には、遺伝子解析（例えば、P C R増幅、シーケンシング、制限消化解析、制限断片長多型）を用いてリピートサイズ（例えばトリヌクレオチドリピート数）及び／または伸長領域の存在（例えば伸長）を決定することにより識別される。

【 0 0 1 3 】

N Aは、治療（または効果）量を個体に送達するため、薬学的に許容される担体とともに製剤化することができる。特定の製剤及び治療量は、投与経路、N Aの適用量及び適用の間隔、治療される個体の性別、年齢及び体重、苦痛の深刻さ並びに当該個体の医師の判断を含む様々な要因に依存する。

10

所与の組織（骨格筋、心臓、脳領域等）における体細胞伸長の発達タイミングを決定することは、体細胞伸長の発症を阻止する方法、及び／または影響を受けない長さにより近い長さへの収縮を簡単に誘発する方法でN Aを投与する能力を強化する可能性がある。

本明細書で用いられる場合、「薬学的に許容される担体」には、任意の及び全ての賦形剤、溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌及び抗真菌剤、等張性及び吸収遅延剤等、投与と適合するものを含むことを意図している。そのような媒体及び作用剤の薬学的に許容される担体としての使用は、当該技術分野においてよく知られている。いかなる従来の媒体または作用剤についても、化合物と適合しないとされていない限り、その使用が考慮される。

20

【 0 0 1 4 】

化合物を送達するための薬学的に許容される担体は、当該技術分野で公知である。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, University of the Sciences in Philadelphia, Ed., 21st Edition, 2005, Lippincott Williams & Wilkins; 及び The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman and Gilman, Eds., 12th Ed., 2001, McGraw-Hill Coを参照のこと。特定の製剤で用いられる薬学的に許容される担体のタイプは、様々な要因によることができ、例えば、化合物の物理学的及び化学的特性、投与経路、及び製造工程のようなものがある。薬学的に許容される担体は当該技術分野で入手可能であり、様々な薬局方でリストアップされているものが挙げられる。例えば、米国薬局方（U S P）、日本薬局方（J P）、欧州薬局方（E P）、及び英国薬局方（B P）；米国食品医薬品局（F D A）医薬品評価研究センター（C D E R）出版物（例えば、Inactive Ingredient Guide (1996)）；及び Ash and Ash, Eds. (2002) Handbook of Pharmaceutical Additives, Synapse Information Resources, Inc., Endicott, NY）を参照のこと。

30

本明細書に記載されるN Aを含む医薬組成物は、典型的には、意図する投与経路と適合するように製剤化される。適切な投与経路としては、例えば、経口、直腸、局所、経鼻、経肺、眼、経腸及び非経口投与が挙げられる。非経口投与経路としては、静脈内、筋肉内及び皮下投与、更には腹腔内、動脈内、関節内、心臓内、槽内、皮内、病巣内、眼内、胸膜内、髄腔内、子宮内及び脳室内投与が挙げられる。

40

【 0 0 1 5 】

単に例として、静脈内投与の場合、N Aは、例えば、ホスファート、ヒスチジンまたはシトラートを製剤のp Hを調製するために、等張化剤として例えば塩化ナトリウムやデキストロースを含む生理学的に互換性のある緩衝液を用いた水溶液として製剤化されてもよい。経口投与のために、N Aは、液体または固体の剤形で製剤化することが可能であり、また、即放性または放出調節／徐放性製剤として製剤化することも可能である。個体による経口摂取のため適切な形態としては、例えば錠剤、丸剤、硬及び軟シェルカプセル、液剤、ジェル、シロップ、スラリー、懸濁剤及び乳剤が挙げられる。固体経口剤形は、充填剤、崩壊剤、結合剤（乾または湿）、溶解遅延剤、潤滑剤、流動促進剤、抗付着剤、陽イオン交換樹脂、湿潤剤、抗酸化剤、保存剤、着色剤及び香味剤などの賦形剤を用いて得る

50

ことができる。そのような賦形剤の例としては、セルロース誘導体、クエン酸、ニカルシウムホスファート、ゼラチン、マグネシウムカルボナート、マグネシウム/ナトリウムラウリルスルファート、マンニトール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、シリカート、二酸化ケイ素、ナトリウムベンゾアート、ソルビトール、デンプン、ステアリン酸またはその塩、糖（例えば、デキストロース、スクロース、ラクトース）、タルク、トラガントゴム糊、植物油（水素付加したもの）及びワックスが挙げられる。

【0016】

NAは、例えば、皮膚パッチ、半固形、または液体製剤、例えば、ジェル剤、（ミクロ）乳剤、軟膏剤、溶液剤、（ナノ/ミクロ）懸濁剤、またはフォーム剤を通じて局所投与することが可能である。NAの皮膚及びその下の罹患組織への浸透は、例えば、浸透増強剤；水、有機溶媒、ワックス、オイル、合成または天然ポリマー、界面活性剤、乳化剤を含む親油性、親水性及び疎水性賦形剤の適切な選択及び組合せ；pH調整により；及び/または錯化剤を用いて調節することができる。

NAは、トリヌクレオチドリピートDNA不安定性によって引き起こされる疾患を有する個体に治療量を投与することができる。典型的には、NAの治療量または用量とは、体細胞伸長を阻止またはトリヌクレオチドリピートDNA配列の遺伝によるサイズの低減（例えば、トリヌクレオチドリピート数の低減）のいずれか、そして終局的には、いかなる悪影響ももたらすことなく1以上の症状の低減または改善をもたらすNAの量を指す。いくつかの場合、治療量は、存在するリピート数と相関する。NAの毒性及び治療効果は、細胞培養または実験動物中での標準的な薬学的手順によって、例えば、LD50（集団の50%に対する致死量）及びED50（集団の50%に対する治療効果量）によって、決定することが可能である。致死量の治療効果量に対する比は、治療指数であり、比LD50/ED50として表すことができる。

【0017】

治療量のNAを1回の用量として投与すること（すなわち、単回投与）、または治療量のNAを1回を超える回数の用量として（すなわち、複数回）、または、例えば、ポンプまたはパッチを用いて、ゆっくり、継続的な方法で投与することも可能である。本明細書で用いる場合、治療量のNAは、約0.01 μ Mから約1 M（例えば、約0.05 μ Mから約0.75 M；約0.1 μ Mから約0.5 M；約0.5 μ Mから約0.1 M；約1 μ Mから約50 mM；約50 μ Mから約1 mM；または約100 μ Mから約0.5 mM）のNAを指す。いくつかの実施形態においては、本明細書に記載の組成物中のNAの濃度は、約1%と約50%の間（例えば、約5%と約40%の間；約10%と約30%の間；約15%と約25%の間；または約20%）であることが可能である。いくつかの場合、NAは、用量依存的な方法で、人の遺伝性のトリヌクレオチドリピート数に応じて、または所与の組織における体細胞伸長の速度に応じて、投与することができる。疾患、症状の重症度、及びトリヌクレオチドリピート数によっては、治療量のNA（例えば、1以上の用量において）は、一週間に1度、一カ月に1度、一年に1度、または必要なだけ多くの、あるいは少ない頻度で（例えば、慢性的に頭蓋ポンプとともに）投与することができることが理解されるであろう。

【0018】

また、組織特異的伸長がいくつかのトリヌクレオチドリピートの疾患で示されていることから、NAの治療量は、同じ個体内でも、異なりうる組織においては異なることが理解されるであろう。例えば、HDでは、最も伸長（例えば、最大伸長、最速伸長、またはそれらの組合せ）を示す最初の組織としては、線条体、大脳皮質、大脳基底核、中型有棘ニューロン、及びオスの生殖系列が挙げられ；筋緊張性ジストロフィー1型においては、伸長を示す最初の体細胞組織として、脳、心臓及び大脳皮質が挙げられる。DM1については、例えば、Lopez Castel 他 (2011, Hum. Mol. Genet., 20:1-15) 及びSeriola 他 (2011, Hum. Mol. Genet., 20:176-85)を参照；ハンチントン病については、例えば、De Rooij 他(1995, Hum. Genet., 95:270-4) 及びTelenius 他 (1994, Nat. Genet., 6:409-14)を参照；DRPLAについては、例えば、Aoki 他 (1996, Clin. Genet., 50:1

10

20

30

40

50

99-201)を参照；球脊髄性筋萎縮症（S B M A）については、例えば、Tanaka 他（1996, J. Neurol. Sci., 135:43-50）を参照；S C A 1 及び S C A 3 については、例えば、Cancel 他（1998, Hum. Mutat., 11:23-7）を参照；S C A 7 については、例えばYoon 他（2016, Brain, 139(Pt 3):e20）を参照。また、Cleary & Pearson（2003, Cytogenet. Genome Res., 100:25-55）、Abeliovich 他（1993, Am. J. Hum. Genet., 52:1175-81）、Wohrle 他（1995, Hum. Mol. Genet., 4:1147-53）、Peterlin 他（1996, Pflugers Arch., 431(6 Suppl 2):R199-200）、Anvret 他（1993, Hum. Mol. Genet., 2:1397-400）、Thornton 他（1994, Ann. Neurol., 35:104-7）、及びIshii 他（1996, Hum. Genet., 98:138-40）も参照のこと。

【0019】

本明細書に記載された方法はまた、N A を受けた個体をモニタリングする工程も含むことができる。例えば、当該技術分野で日常的な方法（例えば、P C R 増幅、シークエンシング、制限消化解析、制限断片長多型）を用いて、トリヌクレオチドリピートのサイズを、個体の細胞中でモニターすることができる。モニタリング工程は、所望の頻度で行うことが可能であり、例えば、その個体またはその個体の1以上の組織からの細胞を、N A の投与と同じ頻度（例えば、N A の投与前または後）でモニターすることも、またはその他の望ましい頻度で（例えば、毎週、毎月、または毎年）モニタリングすることもできる。いくつかの場合、モニタリング工程の結果は、治療を必要とする組織、治療量、及び/または個体（または組織）に治療量が送達されるべき適切な頻度を決定する、または決定することを助けることができる。

N A は数多くの方法で、その安定性、組織選択性、取り込みを増加させるように、またはそれらをインピボにおいて組合せるように、修飾することができることを理解されたい。いくつかの場合、N A は、例えば、リポソーム、頭蓋ポンプ、筋肉内拡散、血液脳関門「鍵」、または、投与中にN A に安定させ、及び/または罹患細胞及び/または組織への送達中にN A に保護を提供する別の製剤を経由して送達することができる。

【0020】

本発明に従って、従来の分子生物学、微生物学、生物化学及び当該技術分野における組換えD N A 技術を用いてもよい。そのような技術は、文献に十分に説明されている。本発明は更に、以下の実施例によって記述されるが、特許請求の範囲に記載された本件方法及び組成物の範囲を制限するものではない。

【実施例】

【0021】

（実施例1：N A - C A G / C A G 複合体の特徴づけ）

以前のN A - C A G の特徴づけには、U V - 溶解、エレクトロスプレー法飛行時間型質量分析（E S I - T O F M S）、等温滴定型カロリメトリー（I T C）、表面プラズモン共鳴（S P R）アッセイ、円偏光二色性（C D）分光法、S P R イメージングアッセイ、及び核磁気共鳴（N M R）分光法が用いられていた（Hagihara 他, 2006, Nuc. Acids Symp. Ser. (Oxf.), 50:147-8; Nakatani 他, 2005, Nat. Chem. Biol., 1:39-43; Hagihara 他, 2011, Chem. Bio. Chem., 12:1686-9）。これらの研究は、歪んだ内部鎖ヘアピンの独特なN A - C A G - C A G 構造を明らかにした。N A のナフチリジン及びアザキノロン部分は、相補的な水素結合をグアニン及びアデニンに対してそれぞれ示し、2つのシトシン塩基のC A Gヘアピンからのフリップアウトを引き起こす（図2 A 及び2 B）。各N A 分子 / C A G - C A G の親和性は、 K_a について $1.8 \times 10^6 M^{-1}$ または K_d について $0.56 \times 10^{-6} M$ と見積もられた（Hagihara 他, 2006, Nuc. Acids Symp. Ser. (Oxf.), 50:147-8）。N A は（C A G）₁₀ヘアピンの融点を、N A 50 μM において、 $47.1 (\pm 0.7)$ から $78.8 (\pm 0.1)$ に増加させ、（C T G）₁₀ヘアピンの融点（ $54.4 (\pm 0.3)$ ）を超えた。d（C A G）₁₀の大きな構造変化がC D 分光法によって示され、E S I - T O F 質量分析で確認されたところでは、リピートに対する複数のN A - 結合（少なくとも6 N A 分子）によって、S P R - イメージングアッセイが誘発された。N A - 結合は、（C A G）₁₀ - 30の単離された短いオリゴヌクレオ

チドとともに、より長いリピートについて増加した (Nakatani 他, 2005, Nat. Chem. Biol., 1:39-43)。NA - CAG / CAG 結合構造が、NMR 分光法によって決定され、この構造は、蛋白質構造データバンク (PDB) に登録され、アクセッション番号 1X26 が割り当てられた。これらの特徴は、NA の CAG ヘアピンに対する際立った選択性を説明する；配列 - 特異性及びヘアピン - 特異性の両方が CAG / CTG 伸長アレルを標的としそうである。

【0022】

(実施例 2：NA 合成及び標識)

溶媒及び出発物質は、標準的な供給者から購入し、更なる精製を行うことなく用いた。分析的薄膜クロマトグラフィー (TLC) を、0.2 mm シリカ 60 でコートされた F254 指示薬を伴うプレート上で行った。フラッシュカラムクロマトグラフィーを Wakogel C-200 シリカゲル上で行った。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を、ギルソン社のダイナミックミキサー (モデル 811C) によって、UV 検出器を 254 nm にセットし、Cosmosil 5C18-MS-II カラム (150 x 20 mm) を用いて、0.1% HOAc / H₂O (溶媒 A) 及び MeCN (溶媒 B) の二重溶媒系で実施した。別途記載されていない限り、核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは、21 ± 3 で、Bruker Avance III 700 スペクトロメーター上で記録した。化学シフト () が百万分率 (ppm) で報告された。結合定数 (J) はヘルツで報告された。¹H NMR 化学シフトは、CD₃OD - d₄ 中の残存溶媒ピーク 3.31 ppm に対して参照した。¹³C NMR 化学シフトは、CD₃OD - d₄ について中央溶媒ピーク 49.00 ppm に対して参照した。ESI 質量スペクトルを、サーモ LTQ Orbitrap XL 質量分析計において記録した。

【0023】

4-アミノ-N-((3-((3-((7-メチル-1,8-ナフチリジン-2-イル)アミノ)-3-オキソプロピル)(3-オキソ-3-((7-オキソ-7,8-ジヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル)メチル)アミノ)プロピル)アミノ)プロピル)ブタンアミド (NA - リンカー)

NA (40 mg, 0.09 mmol) 及び tert-ブチル (4-オキソ-4-((3-オキソプロピル)アミノ)ブチル)カルバマート (34 mg, 0.13 mmol) をメタノール中 (2 mL) で撹拌した。酢酸を添加し、混合物の pH を約 6 に調節した。続いて、ナトリウムトリアセトキシボロヒドリド (31 mg, 0.13 mmol) を混合物に添加した。混合物を室温で 12 時間撹拌した。溶媒を蒸発させて乾燥し、残渣を、カラムクロマトグラフィーでシリカゲル上クロロホルム：メタノール = 50 : 1 で溶出することによって精製し、薄い黄色の固体として Boc - NA - リンカー (15 mg, 25%) を得た。Boc - NA - リンカー (15 mg, 0.02 mmol) のクロロホルム溶液 (1 mL) に、4 M HCl (0.5 mL) を含有する酢酸エチルを添加し、反応混合物を室温で、0.5 時間撹拌した。溶媒を蒸発させて乾燥した。残渣を更に HPLC で精製し、NA - リンカー (11 mg, 86%) が白色固体として得られた。

¹H NMR (CD₃OD, 700 MHz): δ = 8.20 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.06 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 2H), 7.76-7.60 (m, 2H), 7.33 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 6.43 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 4.42 (s, 2H), 3.26 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 3.01 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.92 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.87 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.70 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.69 (s, 3H), 2.63 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.56 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.37 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 1.93 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.76 (t, J = 7.1 Hz, 2H). ¹³C NMR (CD₃OD, 175 MHz): δ = 175.4, 174.1, 173.2, 172.9, 164.4, 162.8, 159.8, 153.7, 153.6, 148.3, 139.5, 138.8, 137.3, 136.6, 121.5, 120.9, 118.3, 115.8, 114.1, 113.1, 51.3, 50.4, 49.4, 44.3, 39.0, 37.2, 34.5, 33.7, 32.4, 26.3, 23.6, 23.0. HRMS (ESI) m/z: [C₃₁H₃₉N₉O₄+Na]⁺について計算, 624.3024; 624.3010 が得られた。

【0024】

N-((4-((3-((3-((7-メチル-1,8-ナフチリジン-2-イル)アミノ)-3-オキソプロピル)(3-オキソ

-3-(((7-オキソ-7,8-ジヒドロ-1,8-ナフチリジン-2-イル)メチル)アミノ)プロピル)アミノ)プロピル)アミノ)-4-オキソブチル)-6-((7-ニトロベンゾ[c][1,2,5]オキサジアゾール-4-イル)アミノ)ヘキサナムド (NA-NBD)

NA - リンカー (15 mg , 0 . 02 mmol) 及び NBD - X , SE (スクシンイミジル6-(N-(7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル)アミノ)ヘキサノート) (12 mg , 0 . 03 mmol) をジメチルホルムアミド (3 mL) 中で撹拌した。続いて、トリエチルアミン (5 mg , 0 . 05 mmol) を混合物に添加した。混合物を室温で6時間撹拌した。溶媒を乾燥するまで蒸発させ、残渣をカラムクロマトグラフィーによってシリカゲル上でクロロホルム：メタノール = 20 : 1 とともに溶出させ、粗生成物を得た。粗生成物を更に HPLC で精製し、NA - NBD (13 mg , 59%) が白色固体として得られた。

10

^1H NMR (CD_3OD , 700 MHz): δ = 8.41 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.18 (bs, 1H), 8.04 (q, J = 8.3 Hz, 2H), 7.73 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.66 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.44 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 6.22 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.43 (s, 2H), 3.44 (s, 2H), 3.26 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 3.14 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.09-2.97 (4H), 2.77 (s, 4H), 2.66 (s, 3H), 2.64 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.18 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 1.83 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 1.76-1.70 (4H), 1.65 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.47-1.37 (2H). ^{13}C NMR (CD_3OD , 175 MHz): δ = 174.6, 174.2, 174.1, 173.5, 172.3, 164.4, 162.8, 159.8, 153.7, 153.6, 148.3, 145.1, 144.4, 144.0, 139.5, 138.7, 137.2, 136.6, 121.4, 121.0, 118.3, 115.8, 114.2, 113.1, 98.1, 51.2, 50.0, 49.3, 44.3, 43.1, 38.5, 38.3, 36.9, 35.4, 33.5, 33.0, 32.6, 27.5, 26.1, 25.8, 25.4, 25.1, 23.6. HRMS (ESI) m/z : $[\text{C}_{43}\text{H}_{51}\text{N}_{13}\text{O}_8+\text{Na}]^+$ について計算 900.3883; 900.3875 が得られた。

20

これらの反応は図1Bに示され、NBD - 標識されたNAの構造はNMRによって確認された (図28)。

【0025】

(実施例3：細胞培養)

HT1080 - (CAG)850細胞モデルの構築については先に記載 (Sathasivam 他, 1997, Hum. Genet., 99:692-5) の通りである。簡潔に説明すると、HT1080 (ATCC) ヒト線維肉腫細胞に、800 - 850 (CTG)・(CAG)リピートを含むプラスミド (LC15 - R) (Nakatani 他, 2005, Nat. Chem. Biol., 1:39-43) 及び PhiC31 インテグラーゼをコードするプラスミドを同時形質移入した。形質移入はNucleofector (ロンザ社、バーゼル、スイス)によって行い、安定に形質移入されたクローンを、ピューロマイシンによって選択した。HT1080 - 非転写 (CAG)850細胞モデルが、LC15 - Rの代わりに、リピートの下流のSV40 ポリアデニル化シグナルを添加することによってpLC16から改変されたプラスミドを形質移入することによって確立された。HT1080 - 非転写 (CAG)850細胞モデルは、(リピートの上流に位置するオリジナルのポリアデニル化シグナルに加えて) リピートの下流の追加的なSV40 ポリアデニル化シグナルを挿入することによってpLC16から改変されたプラスミドを形質移入することによって確立され、これによってCAG / CTG リピートは、転写終結要素によってLoxPが導入された (floxed)。AttB - PhiC31 システムはシングルコピーインテグレーションのために幅広く使われてきた。予想通り、このAttB - PhiC31 - 媒介インテグレーションは、導入遺伝子の確認されたシングルインテグレーションの結果としてもたらし、それは誘導をかけた時にのみ、転写された (図16A)。HT1080モデル細胞及びHD初代線維芽細胞株、GM09197 (Coriell Biorepository) で180 CAG リピートの大きく伸長したアレルと23 リピートの非伸長アレルを伴うもの (Sathasivam 他, 1997, Hum. Genet., 99:6692-5)、HD初代線維芽細胞株、GM02191 (Coreill Biorepository) で43 CAG リピートの伸長したアレルと19 リピートの非伸長アレルを伴うものを、37%、二酸化炭素5%で、10%のウシ胎児血清と1%のペニシリン / ストレプトマイシンを補ったダルベッコ改変イーグル培

30

40

50

地で、培養した。細胞は、 $50\text{ }\mu\text{M}$ のNAへの連続的な曝露を伴って、またはNAへの曝露抜きで、30日間（HT1080細胞）または40日間（線維芽細胞）処置した。非増殖細胞での実験については、HT1080細胞はコンフルエントまで成長させ、その後同じ期間処置した。WST-1アッセイを、製造者の指示（ロッシュ社、バーゼル、スイス）に従って行った。全ての細胞株は、マイコプラズマ抜きで試験された。各実験について、3つの生物学的複製が行われた。

【0026】

以前行われたように、接触障害と血清飢餓の下で成長させることによって増殖を阻害した。増殖阻止の程度は、24時間BrdUとともにインキュベートした後の、増殖している、または接触障害された（及び血清飢餓に置かれた）HT1080-（CAG）850細胞中のBrdU陽性細胞を数えることによって、生細胞中で評価した。BrdU陽性細胞のパーセンテージは、増殖細胞中で92.6%、接触障害細胞中で8.17%であった。少ない割合のHT1080-（CAG）850細胞が接触障害及び血清飢餓下においてさえ増殖していたが、その割合は非常に小さかった。30日（研究が行われた期間）後に1つの細胞に由来する細胞が何個あるかについての計算に基づく（増殖、 $1.926^{30} = 348653546.6$ ；接触障害、 $1.0817^{30} = 10.55$ ）、接触障害細胞における増殖の効果は無視できるものであった。

【0027】

（実施例4：顕微鏡観察）

HT1080-（CAG）850細胞を $50\text{ }\mu\text{m}$ のNBD-標識NAとともに48時間、Cell Light Plasma Membrane-RFP, BacMam 2.0（ライフテクノロジーズ社、カールスバッド、CA）で染色し、その後室温で15分間、4%のバラホルムアルデヒドとともに固定し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中で10分間、2回、洗浄した。細胞を、DAPIを含有するVectashield hard-set mounting media（ベクターラボラトリーズ、バーリングヘム、CA）とともに封入した。オリンパス共焦点レーザー走査型顕微鏡FV1000D（オリンパス、東京、日本）を用いて蛍光画像を得た。

【0028】

（実施例5：リピート長解析）

HT1080-（CAG）850クローン及びHD初代線維芽細胞から、Gentra Pure gene Cell Kit（キアゲン社、バレンシア、CA）を用いてゲノムDNAを抽出した。伸長した（CTG）・（CAG）リピートをsmall-pool PCR（sp-PCR）で大きさに従って仕分け、続いて既述のとおりサザンブロットを行った（Sathasivam 他, 1997, Hum. Genet., 99:692-5）。HT1080モデルについては、small-pool PCR（sp-PCR）を1.4-1.7ゲノム相当のインプットとともに行った。モデルにおけるリピートサイズの違いは、最大でも、3000塩基対であり、したがって、非常に保守的に考えれば、本明細書に記載の最適化されたPCR条件下であってさえ、より短いアレルを増幅する方にバイアスがかかる可能性はある。HD初代線維芽細胞については、sp-PCR及びサザンブロットを、記述のとおりわずかに修正しつつ行った（Tome 他, 2013, PLoS Genet., 9:e1003280）。簡潔に述べると、表1に列挙したPCRプライマーを用い、ブロットはDIG-標識（CAG）7ロックした核酸プローブでハイブリダイゼーションした（Nakamori 他, 2009, Neuromuscul. Disord., 19:759-62）。少なくとも50アレル（研究全体で150を超えるアレル）を各3つの実験について解析した。各実験のそれぞれの重複について完全なsmall-pool PCRデータセットから編集したリピート解析の概要を表2に示す。図4D、4E、10、11、5B、5D、5E、14及び15B中のヒストグラムについて、Y軸の「リピート集団の%」は、一定のサイズの一定の長さを伴うリピート生成物を含有するCAGリピートトラクトにわたる、50超の個々のsmall-pool PCR反応の集団を決定することによって計算された。細胞クローンは30日間または40日間、NAとともに、あるいは抜きで成長させた（例えば、Sathasivam 他, 1997, Hum. Genet., 99:692-5を参照）。とりわけ、リピート長分布のヒストグラムは、少なくとも2つの異なる細胞クローンからのもので

あった。長さ分布は次のように決定された：small-pool PCRに続いてサザン
プロットによってCAG/CTGリピート長を解析した。線維芽細胞クローンからのDNA
Aを、平均で、PCRチューブあたり1つの増幅可能な伸長リピートアレルを生産するた
め希釈した。リピートトラクトはPCRの24サイクルによって増幅された。増幅生成物
は、電気泳動的に解析され、CAGリピートオリゴヌクレオチドをプローブしたサザン
プロットによって検出され、リピート長はDNAサイズマーカーに相対的に決定された。左
のスケールは分子量マーカー(M)を同等のサイズのCAG-リピート断片のリピート数
に変換したものを示す。比較を円滑化するため、点線は変化しなかったCAGサイズを示
す。不安定アレルの分布を灰色のバーで示す(左の垂直軸)。安定アレルの頻度を黒いバ
ーで示す(右の垂直軸)。アレル長はX軸に沿って50リピートのスパンでピンにグルー
プ化される。統計的解析のためカイ二乗検定を行い、既述のとおり各セットの実験におい
て伸長した、変化しなかった及び収縮したアレルの頻度を比較した(Nakamori 他, 201
1, Mol. Ther., 19:2222-7)。HTT、CASK、ATXN8、Mfd15、TDP並
びにマウスのMapkap1、Fdg4及びtdp遺伝子座のトリヌクレオチド(3塩基
)及び2塩基トラクト長を、(表1に列举の)プライマーを用いてPCR増幅し、増幅条
件は他に記載のとおりであった(例えば、Kremer 他, 1995, Am. J. Hum. Genet., 57:
343-50; Brook 他, 1992, Cell, 69:385; Koob 他, 1999, 21:379-84; Dietmaier
他, 1997, Cancer Res., 57:4749-56; Kabbarah 他, 2003, Mol. Carcinogen., 38:
155-9を参照)。リピート長の変動性を非伸長CAGアレル及びTBPアレルについてP
CR(高分解能ゲル電気泳動)及びAgilent BioAnalyzerによってそれぞれ研究した。P
CR生成物は、EnhanceITポリマー(Elchrom Scientific社、スイス)を添加した6%
ポリアクリルアミドゲル上で分離し、GelRed(Biotium社、ハイワード、カルフォルニア
)で染色し、Typhoon蛍光イメージセンサー(GE ライフサイエンス社、ピスカタウェイ、
ニュージャージー)でスキャンした。各実験のそれぞれの重複についての完全なsmall-
pool PCRデータセットから編集したリピート解析の概要を表2に示す。

【0029】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. プライマー

		フォワードプライマー	リバースプライマー	配列番号
Small pool PCR	HT1080 細胞モデル (850CAG/CTGについて)	ACC CTA GAA CTG TCT TCG ACT CC	TTC CCG AGT AAG CAG GCA GAG	2
	HTT (HD 細胞中)	GCC CAG AGC CCC ATT CAT TG	AGG AAG CTG AGG AGG CGG CGG	4
HD CAG 解析	HTT (R6/2マウス中)	ATG AAG GCC TTC GAG TCC CTC AAG TCC TTC	CGG CGG TGG CGG CTG TTG	6
	CASK	TTC AGT ACA TTG CTG CTG CTG	AAA AAG GTT CTG CTG ATG GAA	8
非伸長リヒート遺伝子座	ATXN8	TTT GAG AAA GGC TTG TGA GGA CTG AGA ATG	GGT CCT TCA TGT TAG AAA ACC TGG CT	10
	HTT	CCT TCG AGT CCC TCA AGT CCT TC	GGC GGC GGT GGC GGC TGT TG	12
	Mf15	GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT	GCT GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC	14
	マウス Mapkap1	CTC TGA CCT ATC TCC AAT CCT C	TCT CCT TCT CCC TGA TTC AG	16
	マウス Fg4	TAG GTC ATA AAT GAT CTG CTG C	ATG ATA ATC TCT CAA TGA CCC	18
	エキソン 2 & 3	TGG GAT TAC ACG TGT GAA CCA ACC	TGT GAC ACA GGC AGA CTG TGG ATC	20
HPRT1				

本研究で PCR 解析のため用いられたプライマー配列は、図 4、5、6 及び図 10-17、25A-H に提示される。

【 0 0 3 0 】

(実施例 6 : m R N A 定量)

N A を添加してまたは添加せずに 7 2 時間経った後の H T 1 0 8 0 - (C A G) 8 5 0 細胞から、RNeasy Plus Microキット (キアゲン社) を用いて、R N A を採取した。全 R N A にランダムヘキサマーを仕込み、Superscript III (ライフテクノロジーズ社、カールスバッド、C A) で逆転写し、続いて、R N a s e H で処理した。TaqMan Gene Expression アッセイまたは PrimeTime qPCR アッセイを用いて ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (ライフテクノロジーズ社) 上で定量逆転写 (R T) - P C R を行った。プライマー配列を表 1 に示す。導入遺伝子由来 m R N A のレベルを 1 8 S r

10

20

30

40

50

RNAで規格化した。結果は、対応のあるt-検定を用いて統計的に解析した。導入遺伝子mRNAのプライマー配列は、CAGリピート方向に以下のとおりであった：5'-AGAGAA TAG GAA CTT CGG AAT AGG -3'（配列番号：21）及び5'-CCA TGT TCA TGC CTT CTT CTT T-3'（配列番号：22）。プローブ配列は、5'-ACA GCA CAA TAA CCA GCA CGT TGC -3'（配列番号：23）であった。

【0031】

（実施例7：NA-DNA結合）

バンドシフトアッセイの構造を、既述の方法（Pearson 他, 1997, Hum. Mol. Genet., 6:1117-23; Pearson 他, 2002, Nuc. Acids Res., 30:4534-47; Axford 他, 2013, PLoS Genet., 9:e1003866）をわずかに改変した方法により作成した。ヒトDM1ゲノム（CTG） $n \cdot$ （CAG） n リピート（ $n = 30$ または50）を含有するプラスミドを、HindIII消化で線状化した。50リピートのホモ二本鎖スリップ構造（S-DNA）を、Pearson他に記載のとおりアルカリ変性/再生によって形成した（1996, Biochem., 35:5041-53; 1998, Nuc. Acids Res., 26(3):816-23）、長い（CAG）20または（CTG）スリップアウトを伴うヘテロ二本鎖SI-DNAを、既述のとおり調製した（Pearsons 他, 2002, Nuc. Acids Res., 30:4534-47; Axford 他, 2013, PLoS Genet., 9:e1003866）。簡潔に述べると、（CAG）50及び（CTG）30リピートのDNAまたは（CAG）30及び（CTG）50リピートのDNAを等モル量で混合し、その後アルカリ変性/再生によってヘテロ二本鎖化した。断片を含有するリピートは、EcoRI消化によって放出され、電気泳動的に4%ポリアクリルアミドゲル上で分析し、ゲル精製した。精製した断片は、両鎖とも充填反応によって、[- ^{32}P] dNTPsで放射性標識した。各構造の放射能を、チェレンコフ計数を用いて決定し、同等の放射濃度の各構造を、NA濃度を増加させて30分間室温で、1Xの低張緩衝液とともにインキュベートした。結合生成物を電気泳動的に1XTBE緩衝液中の4%（w/v）ポリアクリルアミドゲル上で、200Vの低電圧を2.5時間印加して分析した。各NA分子/CAG-CAGの親和性は、 K_a について $1.8 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ または K_d について $0.56 \times 10^{-6} \text{M}$ と推計した（Nakatani他, 2005, Nat. Chem. Biol., 1:39-43）。

【0032】

（実施例8：複製アッセイ）

インビトロ複製のため、テンプレートを、既述のとおり設計した（Panigrahi 他, 2002, J. Biol. Chem., 277:13926-34; Cleary 他, 2002, Nat. Genet., 31(1):37-46）。簡潔に述べると、EcoRI/HindIII（CTG）79・（CAG）79断片含有ゲノムクローンを、pBluescript KSIにサブクロニングした。SV40-oriを、平滑末端化した（blunted）XbaI断片として、pBluescript KSIのHindIIIまたはEcoRIのいずれかのサイトに、CAGリピートの二方向複製103及び98bp 5'及び3'のSV40オリジンをそれぞれ配置してクローニングした。これらのリピート（pDM79EF及びpDM79HF）及びSV40-oriを伴う別の基質を含むテンプレート及びリピートなし（pKN16）をインビトロで、[- ^{32}P] dCTP及びT-Antigenを添加したHeLa細胞抽出物によって、詳細Panigrahi他（2002, J. Biol. Chem., 277:13926-34）及びCleary et al.（2002, Nat. Genet., 31(1):37-46）に記載されているように複製した。複製反応はNA抜き、またはNA（7.5 μM 及び15 μM ）とともに行われた。放射性複製生成物を精製し、BamHIで線状化し、DpnIで処置した（詳細については図9を参照）。等量の複製されていないpKN16プラスミドDNAを取り出し、DpnIで処置し、複製されていないプラスミドDNAの完全な消化を示した。等量の反応生成物を電気泳動的に15-cm 1%アガロースゲル上で分析した。ゲルを、TBE緩衝液中、16時間、4V/cmで流し、乾燥し、コダックフィルムに曝露した。

【0033】

（実施例9：修復アッセイ）

10

20

30

40

50

スリップDNA構造に対するNAの結合がどのように修復に影響するのかを決定するため、一連の環状スリップヘテロ二本鎖基質を、ニックがスリップアウトの5'または3'のいずれかに位置するリピートの過剰とともに作った(図3)。詳細は既述(Panigrahi 他, 2005, Nat. Struct. & Mol. Biol., 12:654-62; Panigrahi 他, 2010, PNAS USA, 107:12593-8)のとおり、一本鎖環状プラスミドをその相補的な異なるリピート長の線状鎖とハイブリダイゼーションすることによって基質を調製し、線状化されたサイトにニックが位置付けられる結果を得た。基質は、過剰リピート数のみにおいて異なる一本鎖スリップアウト、またはニックの位置以外は同じものであった。全ての基質において、スリップアウトは特有のポイントで、nが30、47、48、または50リピートでありうる(CTG)_n・(CAG)_nの完全な塩基対のバックボーンから押し出された。G-Tがミスマッチな基質を既述(Panigrahi 他, 2005, Nat. Struct. & Mol. Biol., 12:654-62; Panigrahi 他, 2010, PNAS USA, 107:12593-8)のとおり調製した。全てのこれらの基質を、インビトロでHela抽出物によって処置し、その後修復を評価した。修復生成物をサザンブロットで解析し、リピート含有断片について調べ、出発物質と比較し、それによって修復効率の定量的評価がモルレベルで可能となった。各修復アッセイは3回から5回の独立実験において行った。

【0034】

(実施例10: R-ループ形成及びプロセッシング)

収束T3及びT7RNAポリメラーゼプロモーターを伴う伸長(CAG)₇₉・(CTG)₇₉リピートトラクトを帯びたプラスミドについては詳細に既述されている(Panigrahi 他, 2002, J. Biol. Chem., 277:13926-34)。転写反応を既述(Reddy 他, 2014, Nuc. Acids Res., 42:10473-87)のとおり行った。簡潔に述べると、500ngのテンプレートDNAを1x転写緩衝液(ロッシュ社)及び1xウシ血清アルブミン(NEB)中で1時間、20Uの適切なRNAポリメラーゼ(T7、T3またはT7+T3(ロッシュ社))とNA120μMとともにまたは抜きで混合した。サンプルを精製し、1gのRNaseA(ロッシュ社)のみまたは1gのRNaseA(ロッシュ社)及び1UのE. coli RNaseH(ロッシュ社)のいずれかで、30分間、室温で、NA(120μM)の存在または非存在下で処置した。全てのインビトロ転写反応生成物を、1%アガロースゲル上、1xTBE緩衝液中で流し、80Vを3時間印加して解析した。ゲルは続いて臭化エチジウム(0.5mg/ml)で染色し、全ての核酸を紫外光(UV)で可視化した。

【0035】

インビトロ転写から調製したR-ループテンプレート及びRNaseA処理したものを、NAとともにインキュベートし、HelaまたはSH-SY5Y神経芽腫細胞の抽出物によって処置した。後者は既述のとおりレチノイン酸で最終分化されていた(Panigrahi 他, 2005, Nat. Struct. & Mol. Biol., 12:654-62)。これらの細胞抽出物は、CAG/CTGリピートによって形成された、機能的、プロセッシングスリップ鎖DNAであり、複製媒介CAG/CTG伸長及び収縮を誘発することができる。核酸物質が続いて抽出された。サンプルは、QIAquick enzyme clean-up kitを製造者の指示に従って用いて、個別生成物の解析によるトリヌクレオチドリピートの安定性(STRIIP)解析のためバクテリアに形質導入する前に更に精製した。STRIIPアッセイについては詳細に記述されている(Panigrahi 他, 2002, J. Biol. Chem., 277:13926-34; Cleary 他, 2002, Nat. Genetics, 31:37-46)。簡潔に述べると、ヒト細胞抽出物プロセッシングの生成物をE. coli XL1-MutS(アジレント社)に形質導入した。それぞれが1つのプロセッシングされたテンプレートを表す個々のバクテリアコロニーを採取し、制限された成長期間(最大6時間、4-6世代)培養した。ミニプレップDNAを、リピート長の変化について、リピート含有断片を4%ポリアクリルアミドゲル上で解析することによって解析した。リピート長の変化の規模を、4%ポリアクリルアミドゲル上でのリピート含有断片の電気泳動的サイズ測定によって、開始長物質及び既知のサイズマーカーのセットに対して相対的に決定した。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 6 】

出発物質に存在する長さ不均質性（バクテリア中での調製の間の不安定性）及び完全に対になったDNAリピートをHeLa抽出物に対して曝露することにより招きうる任意の不安定性の基礎レベルを評価するための、細胞抽出物プロセッシングコントロールとして、非転写DNAテンプレート（T3またはT7プロモーターからの転写なし）をヒト細胞抽出物で処置して、STRIPに供したものを使用した。これまで発表されてきたように、長さ不均一性のいくつかのレベルは、DNAテンプレートには予期されるものであり、これは、その不安定な79リピートユニットの開始長のためであり、内因性DNA損傷（潜在的に、一本鎖の切断、酸化的損傷、ヌクレオチドのミスマッチ等が含まれる）のプロセッシングから結果として得られ、ヒト細胞抽出物、開始プラスミドに存在するリピート長不均一性はもちろん、STRIP手順の間のバクテリア培養にもよるものである。この開始テンプレートにおけるトラクト長不均一性は、如何なる潜在的R-ループプロセッシング不安定性もそれを超えなければならないという、トラクト長不安定性のバックグラウンドレベルとしての役割を果たす。バックグラウンドよりも有意に大きい数値のみが報告される。ヒト細胞抽出物によるR-ループのプロセッシング生成物の不安定性解析。（A）プロセッシング後の全不安定生成物のパーセンテージ。生成物を、電気泳動的移動に基づき、安定（79リピートを有する）または不安定（79リピートよりも少ない、あるいは多いリピートを有する）のいずれかで特徴づけ、プロットした。データは3つの独立したインビトロ転写及びヒト細胞抽出物によるプロセッシング反応に由来し、各R-ループ形状について解析された150の細胞抽出物処置の個別の生成物を表す～150コロニー（1複製あたり～50コロニー）を伴う。個々の実験を、その3回の間で互いに比較し、カイ二乗検定を用いて、各実験の間に有意な差がないことを確認し、その後各実験条件ごとのデータを蓄積した。既述のとおり（Reddy 他, 2014, Nuc. Acids Res., 42:10473-87）、R-ループのプロセッシング生成物を、DNAコントロールのプロセッシング生成物とカイ二乗検定を用いて比較した。プロセッシングによる収縮及び伸長のパーセンテージ。不安定な生成物を更に、収縮（79リピート未満）及び伸長（79リピート超）に分離し、プロットした。収縮及び伸長の分布は、R-ループ生成物とDNAコントロール生成物の間でカイ二乗検定を用いて比較した。R-ループプロセッシングの不安定生成物の分布。各プロセッシングの不安定生成物について、既知のサイズマーカーに対する相対的な電気泳動移動位置から、既述のとおりサイズを推計し（Panigrahi 他, 2002, J. Biol. Chem., 277:13926-34）、プロットした。

10

20

30

【 0 0 3 7 】

（実施例11：MutS 結合アッセイ）

MutS はバキュロウィルス感染Sf9細胞でhis-タグされたhMSH2及びhMSH3を発現しているものから、既述のとおり精製した（Panigrahi 他, 2010, PNAS USA, 107:12593-8）。結合反応を室温で行った。上述のとおり、長い（CAG）20を伴うヘテロ二本鎖SI-DNAを調製し、末端標識した。タンパク質をDNAとともに30分間、10mM HEPES-KOH pH 7.5、110mM KCl、1mM EDTA及び1mM DTTを含有する緩衝液中で、記載のとおり緩衝液中でATPとともに、あるいはATP抜きでインキュベートした。反応を非変性充填染料（20mM Tris-HCl pH 7.4、4% グリセロール、プロモフェノールブルー）とともに4%未変性ポリアクリルアミドゲル上にロードした。ゲルを1xTBE緩衝液で2時間流した。

40

【 0 0 3 8 】

（実施例12：FAN1ヌクレアーゼアッセイ）

FAN1ヌクレアーゼをバキュロウィルス感染Sf9細胞からPALB2について記載された既述（Buisson 他, 2010, Nat. Struct. Mol. Biol., 17(10):1247-54）のとおり二重-アフィニティ精製戦略を用いて精製した。簡潔に述べると、FAN1を、N-末端でGST-タグによりタグ付けし、C-末端でFLAG/His10-タグ付けした。GST-プルダウンに続いて、PreScission Proteaseとともにイン

50

キュベートすることによってG S T タグを分離し、T a l o n ビーズ (G E ヘルスケア社) 上でアフィニティ精製した。

1 p m o l の 3 2 P 標識、ゲル精製、D N A 構造で 5 ' - フラップ及び、リピート無しか、フラップ中または二本鎖領域に (C A G) 2 0 スリップアウトを含有するもの (配列について図 2 2 D - 2 2 F を参照) を室温で 1 0 分間 N A 濃度を増加させて処置し、または処置しないで、2 0 0 n M の F A N 1 とともに 3 0 分間 3 7 ° でインキュベートした。反応は、既述 (Liu 他, 2010, Science, 329:693-6) のとおり、1 X スクレアーゼ緩衝液中で 1 0 μ l の反応容量で行われた。スクレアーゼ反応は、2 0 m M の E D T A を添加することで停止させ、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (2 5 : 2 4 : 1、v / v / v) で抽出し、続いてエタノール沈殿させることによって精製した。反応生成物を、8 % ポリアクリルアミドゲルで 2 0 V、1 時間、流した。F A N 消化サイトを特定するため、マクサム・ギルパート法シーケンシング (G > A 及び T 反応) の ³²P 標識オリゴが行われた。消化断片は、8 % シーケンシングゲルで、2 5 0 0 V 及び 8 2 W、7 5 分間で分離された。

【 0 0 3 9 】

(実施例 1 3 : ポリメラーゼ伸長アッセイ)

ヒト D N A ポリメラーゼ (P o l) を大腸菌クローンから単離し、イオン交換及びアフィニティクロマトグラフィによって精製した (Chimex, catalog # 1077, Lot # 220 3007)。タンパク質濃度をブラッドフォードアッセイを用いて決定した。

組換えヒトポリメラーゼ (P o l) を、組換えバキュロウィルスベクターを用いて昆虫細胞中で調製し、免疫アフィニティカラムクロマトグラフィーによって、既述 (Zhou 他, 2012, PLoS ONE, 7(6):e39156) のとおり精製した。タンパク質濃度をブラッドフォードアッセイを用いて決定した。

組換え R P A 複合体の精製が、B L 2 1 (D E 3) 細胞中で発現され、Binz 他 (2006, Methods Enzymol., 409:11-38) に記載のとおり精製された。

【 0 0 4 0 】

P o l 伸長アッセイを既述 (Mason 他, 2010, Biochem., 49:5919-28) のとおり、オリゴ含有 (C A G) 1 0 リピートを用いて行った。オリゴの配列及びプライマー条件は既述 (Hagihara 他, 2011, Chem. Bio. Chem., 12:1686-9) のとおりである。簡潔に述べると、0 . 1 μ M のプライマー及び 0 . 1 μ M のオリゴを 9 5 ° で 3 分間変性させ、室温で 3 0 分間アニールし、N A と 3 0 分間室温でインキュベートした。R P A 及び / または P o l を添加し、0 . 1 m M の d N T P s を 1 0 μ l の反応容量に添加することで反応を開始し、3 7 ° で 1 5 分間インキュベートした。2 0 m M の E D T A を添加することで反応を停止し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (2 5 : 2 4 : 1、v / v / v) で抽出し、続いてエタノール沈殿させることによって精製した。ペレットをホルムアルデヒド緩衝液に再懸濁させ、9 5 ° で 1 0 分間変性させ、6 % シーケンシングゲル上で、2 0 0 0 V 及び 9 0 W で 4 0 分間流した。

【 0 0 4 1 】

(実施例 1 4 - r 6 / 2 マウスへの定位的注入)

マウスの取扱い及び実験手順は、動物愛護のための大阪大学ガイドラインに従って行われた。1 回の薬剤適用は、異なる 6 か所への定位的注入、左または右線条体の 3 つの異なる線条体領域それぞれへの薬剤または生理的食塩水の 3 注入を含んでいた (図 2 4 の概略記載のとおり)。無菌状況下で、6 週齢の R 6 / 2 マウスに 5 0 m g / k g のペントバルビタールナトリウムで麻酔をかけ、5 μ l の生理的食塩水 (右側) または 5 0 0 μ M の N A を生理的食塩水に溶解したもの (左側) を線条体の 3 つの異なるサイトに定位注入した。マウスは 4 週間続けて、2 週間おき、または毎週、1 度また 2 度の注入を受けた。定位的注入は、線条体内の 3 つのサイトに次の条件で送達された : (前後 (A P) = 0.0 m m、内側 - 外側 (M L) = プレグマから 1.5 m m、背腹 (D V) = 硬膜表面下 2.5 m m; A P = 1.0 m m, M L = 1.5 m m, D V = 2.5 m m; 及び A P = 0.5 m m, M L = 1.5 m m, D V = 2.5 m m)、1 0 - μ l ハミルトンマイクロシリンジを 0 . 5 μ l / m i n の速度で用いる。投与計画の

概要については図 2 4 を参照。各マウスは、脳の両側が生理的食塩水を右線条体に、N A を左線条体に、定位的注入されていたので、内部コントロールを有していた。従って、我々のN A 処置のコントロールは、各マウスの線条体の反対側である。左右の線条体の両方についてH D のC A G 導入遺伝子及び内因性の長いC A G トラクトにおいてリピート長を評価した。4 回処置されたマウスについては、N A 投与前後に尾から、左右の前頭皮質及び左右の小脳と同様にD N A を採取した。

【 0 0 4 2 】

(実施例 1 5 : 遺伝子スキャン解析)

最初の注入から 4 週間で、マウスの脳組織から既述 (Nakamori 他, 2009, Neuromuscul. Disord., 19:759-62) のとおりD N A を単離した。既述 (Tome 他, 2013, PLoS Genet., 9:e1003280) のとおりP C R を行い、P C R 生成物のサイズをABI310ジェネティックアナライザーでGENESCAN 3.1 ソフトウェア(ライフテクノロジー社)を用いて測定した。

【 0 0 4 3 】

(実施例 1 6 - 不安定性指数計算)

不安定指数計算の手順を既述 (Lee 他, 2010, BMC Syst. Biol., 4:29) に従って、また図 2 7 A に図示及び概略示されるとおりに行った。

【 0 0 4 4 】

(実施例 1 7 : S M R T - C C S シークエンシングによるH P R T 1 シークエンス解析

D N A は 3 つの独立したH D 初代線維芽細胞株G M 0 9 1 9 7 のN A 処置したもの及び 3 つの独立した非処置コントロール細胞から抽出した。H P R T 1 エキソン 2 及び 3 は、高性能Platinum Taq DNAポリメラーゼ (インビトロゲン社、C a t # 1 1 3 0 4) 及び表 1 に示されるプライマーを用いて増幅した。増幅生成物は、一分子リアルタイム (S M R T) シークエンシングを用いて、P a c B i o R S I I 装置上で解析した (図 1 3 A を参照) 。

【 0 0 4 5 】

具体的には、H P R T 1 のエキソン 2 と 3 に及ぶ ~ 2 . 8 k b P C R 生成物が、男性H D 患者由来細胞の 3 つの複製について、N A 処置及び生理的食塩水処置コロニーの両方において、パシフィック・バイオサイエンス社 (P a c B i o) R S I I 上でP 6 - C 4 v 2 ケミストリー、3 6 0 分動画、及び複製 / 処置組合せごと 1 つのS M R T 細胞とともにシークエンスされた。もとの細胞コロニーからの個々の分子は、対応するS M R T 細胞からの単一の長いリードで表された。P a c B i o のS M R T b e l l 構築物は、一分子を 1 回以上 1 つの長いリード中で、S M R T b e l l インサートの周囲でシークエンシングポリメラーゼが「通過 (passes) 」する回数に基づいて配列することを可能にした。平均 9 9 , 0 2 3 の個別のリードがS M R T 細胞あたりシークエンスされた。結果として得られた長いリードは、インサート配列を通じて平均 ~ 7 通過を含有した。S M R T 細胞ごとの平均メジアンインサート長は、2 , 8 7 3 b p であった。P a c B i o の「インサートのリード (reads of insert) 」パイプライン (S M R T 解析 2 . 3 . 0) を用いて、高品質コンセンサス配列が、各長いリードごとに作られ、それは 1 8 を超えるオリジナル分子のコピーを含有し、不完全P C R 分子 (< 2 . 5 k b p) または誤って検出されたP a c B i o アダプターであって、長すぎるコンセンサス配列 (> 3 k b p) をもたらしたもののいずれかとともにコンセンサス配列を排除した。これらのフィルターに基づいて、平均 1 , 3 4 3 コンセンサス配列が複製 / 処置の対ごとに、2 , 4 0 2 配列までの範囲で生成された。コンセンサス配列は、ヒト対照 (GRCh38, chrX:134,473,062-134,475,958) の対応する領域に、B L A S R (S M R T 解析 2.3.0; パラメーター: -affineAlign -affineOpen 8 -affineExtend 0 -bestn 1 -maxMatch 30 -sdpTupleSize 13 -m 5) とともに整列させられ、全ての単塩基対の違いは、完全長アラインメント (2 . 5 - 3 k b p) の配列について、配列とその対照の間で特定された (ミスマッチ、挿入、及び削除) 。コンセンサス配列の平均整列同一性 (average alignment identity) は 9 9 . 6 9 8 % + / - 0 . 3 3 2 1 % で、標準偏差 (S D) が 9 4 . 7 6 7 9 % から 1 0 0 % の範囲

10

20

30

40

50

であった。各複製／処置組合せについて変異率を推計するため、特定の変異体が発生した回数が、ヒト対照（G R C h 3 8）における特定の位置での高品質 P a c B i o コンセンサス配列のリードを、各位置にわたって整列した高品質リードの総数で除して計算した。各複製について、相対変異率を、N A - 処置細胞と生理的食塩水 - 処置細胞の間で、N A - 処置細胞の変異率から生理的食塩水 - 処置細胞の変異率を引いて計算し、絶対相対率 > 0 . 5 % に基づいて過剰な変異率を特定した。全 3 複製にわたって特定された 1 5 , 2 7 7 変異体のうち、過度の変異率が 1 4 9 (1 . 0 %) の N A - 処置配列、1 0 1 (0 . 7 %) の生理的食塩水 - 処置配列について認められた。ヒト対照中で評価された 2 , 8 9 7 位置にわたって、過度な相対変化率が、処置配列の 1 1 3 の異なるサイト (3 . 9 %) 及びコントロール配列の 8 4 サイト (2 . 9 %) において特定された。変異率については、過度な相対変異率を伴う変異体について N A - 及び生理的食塩水 - 配列の間で有意な差はなかった ($p = 0 . 1 0 8 3$ 、2 サンプル、コルモゴロフ - スミルノフ検定) (図 1 3 B)。

【 0 0 4 6 】

(実施例 1 8 : 結果)

C A G 特異的 D N A 結合化合物、ナフチリジン - アザキノロン (N A) を以前設計した (Nakatani 他, 2005, Nat. Chem. Biol., 1:39-43; Hagihara 他, 2006, Nuc. Acids Symp. Ser. (Oxf.), 50:147-8; Hagihara 他, 2011, Chembiochem., 12:1686-9)。詳細な特徴づけにより、N A が歪んだ内側鎖 C A G ヘアピンに結合し、そこでは、N A のナフチリジン及びアザキノロン部分が相補的な水素結合をグアニン及びアデニンに対してそれぞれ示し、二つのシトシン塩基を C A G ヘアピンからフリップアウトさせることを明らかにした (図 2 A 及び 2 B)。N A は高い親和性をもって結合し、(C A G) 1 0 ヘアピンの融点を > 3 0 増加させた (Hagihara 他, 2011, Chembiochem., 12:1686-9)。N A はまた、より長い C A G ヘアピンに対して優先的に結合し、最大の結合は (C A G) 3 0 に対してであり、続いて (C A G) 2 0、そして (C A G) 1 0 に結合した (Nakatani 他, 2005, Nat. Chem. Biol., 1:39-43)。この N A のより長い C A G ヘアピン構造に対する顕著な選択性は、変異リピート遺伝子座におけるスリップ D N A の存在と対になって、伸長アレルを標的とすることを可能とするであろう。

【 0 0 4 7 】

N A が、疾患に関連があり、スリップアウトを伴う、または伴わない (C A G) ・ (C T G) 二本鎖に対して結合することができるかを決定するため、バンドシフト解析を、リピート不安定性の変異中間体のモデルであるスリップ D N A を用いて行った (Pearson 他, 2002, Nuc. Acids Res., 30:4534-47)。これらのインビトロ構造の詳細な生物物理学的特徴は、それらが、D M 1 患者中の変異 D M 1 遺伝子座で特定されたスリップ D N A を反映していることを示す (Axford 他, 2013, PLoS Genet., 9:e1003866)。N A は、(C A G) 5 0 ・ (C A G) 5 0 リピートを含有する完全な二本鎖 D N A 断片には結合せず、高濃度の N A は、完全な二本鎖リピートの構造変化を誘発しなかった (図 2 C - 2 D)。同じ (C A G) 5 0 ・ (C T G) 5 0 分子は誘発することができて、S - D N A と呼ばれるクラスター化した短いスリップアウトを含有し、それは不均質な分子の混合物を含み、それぞれ 2 - 6 2 の短いスリップアウトで、ほとんどがそれぞれ 1 - 5 リピートユニットであり、リピートトラクトに沿って両鎖の様々な場所から突き出す (Pearson 他, 1998, Nuc. Acids Res., 26:816-23; Panigrahi 他, 2010, PNAS USA, 107:12593-9)。S - D N A は限定された程度 N A に結合することが可能であるが、それらの短いスリップアウト及び電気泳動的不均一性は、単シフト種 (single-shifted species) の検出を許さない可能性がある。(C A G) 5 0 ・ (C T G) 3 0 のスリップアウト中の 2 0 C A G リピートの過剰を伴うスリップヘテロ二本鎖は、広範囲にわたり N A によって結合される (図 2 C - 2 D、図 7 も参照)。N A - 結合は、バンド拡大 (band-broadening) を引き起こし、これは以前他の D N A - 結合配位子について観察されたものである (Neilsen 他, 1988, Biochem., 27:67-73; Carlsson 他, 1995, Nuc. Acids Res., 23:2413-20; Barcelo 他, 1991, Biochem., 30:4863-73; Fox 他, 1988, Nuc. Acids Res., 16:2

10

20

30

40

50

489-507; Fox & Woolley, 1990, Biochem. Pharmacol., 39:941-8)。NA存在下で段階的に遅くなるスリップDNAの移動は、NAがヘアピン中の追加的な(CAG)・(CTG)対に結合することと整合的である(図7; Nakatani 他, 2005, Nat. Chem. Biol., 1:39-43)。対照的に、CTGリピートの長いスリップアウトを伴うヘテロ二本鎖、(CAG)30・(CTG)50にはNAは結合しない(図2C - 2D、図2Cの複数のパネルは全て単一ゲルに由来し、明確さのために分離された)。したがって、NAはCAGに結合するが、CTGスリップアウトには結合しない。結合は、CAGスリップDNA構造について定量的に特異であった(図2D)。精製されたスリップ(CAG)50・(CTG)30から単離された(CAG)50及び(CTG)30一本鎖(再変性なし)へのNA存在下での変性はまた、NAが一本鎖(CAG)50に特異的に結合することを示した(図2E、左パネル)。個々の(CAG)50及び(CTG)30一本鎖のNA存在下での再変性は、NAが相補的鎖ハイブリダイゼーションの能力はブロックしなかったが、特異的にスリップアウトCAG鎖に結合し、CTG鎖には結合しなかったことを明らかにした(図2E、右パネル)。単離された一本鎖(CAG)50トラクトの電気泳動シフトの程度は、わずか20だけ過剰にCAGリピートのスリップアウトを有するヘテロ二本鎖(CAG)50・(CTG)30のそれよりも大きく、一度一本鎖が与えられたら、全ての50CAGリピートが全50リピートの長いヘアピンに押し込まれ(図2、パネルEを比較のこと)、それはより多くのNA分子と結合することができる。CTGヘアピン鎖はNAによって結合されない(図2C - 2E)。結合は、長いCAGスリップアウトの方が短いものよりも有意によかった(図8)。これらの結果及びNAの確立した結合モードに基づき、2NA分子に対し1CAG - CAGの比が、以前推計され、ここで、(CAG)20のスリップアウトは20NA分子に結合するであろう。これらの発見はまとめて、疾患に関連するトラクト長の長いCAGリピートスリップアウトに対するNAの構造特異性をサポートするが、NAが伸長した完全二本鎖分子からのスリップアウト押出しを誘発するであろうという主張をサポートしない。

【0048】

NAがスリップDNAのプロセッシングをブロックし、リピート不安定性を修正する可能性が示唆される。NAは、長い(CAG)20スリップアウトを伴うスリップDNAの修復を特異的に阻害するが、(CTG)20スリップアウトを伴うものについては阻害せず(図3A - 3C)、その設計されたCAGヘアピンに対する特異性と整合的である(図2)。NAが(CAG)20スリップアウトの修復をブロックしたことは、ヒト及びその他のDNAポリメラーゼがNA - 結合(CAG)10 - (CAG)20テンプレートに沿ってプライマーを伸長できないことと整合する。長い(CAG)20スリップアウトの修復は、ミスマッチ修復(MMR)とは独立しており、NAの効果は、MMRの関与を必要としないことを示している。対照的に、一本鎖リピートスリップアウトでNAが結合するには小さすぎるものは、ミスマッチ修復MutS (MSH2 - MSH3)複合体を必要とする。NAが結合するには小さすぎる一本鎖余剰CAGリピートスリップアウトの修復におけるNAの効果を評価した。一本鎖リピートCAGまたはCTGスリップアウトの修復は、NAに影響されず、このプロセスにおけるMutS機能はNAに影響されなかったことを示している(図3D)。

【0049】

CAG/CTGスリップヘテロ二本鎖に対するNAの特異性を探索するため、最も頻繁な塩基塩基ミスマッチであるG - Tミスペアの修復におけるNAの効果を評価した。このミスペアの修復は、ミスマッチ修復MutS複合体(MSH2 - MSH6)に依存する。NAはG - T修復には何ら効果がなく、更に、NAはMMRをブロックせず、MMRの遺伝的欠如において発生することが知られているゲノムワイドでの変異を引き起こすことはないことを示している(図3E)。したがって、長いCAGスリップアウトの修復をNAが優先してブロックすることは、リピート不安定性を調節する能力を予想させるであろう。

このNAの潜在的な治療への使用の問いに答えるものとして、NAが細胞透過性であり

10

20

30

40

50

、急性細胞毒性を引き起こし、またはヒト細胞の増殖（図 2 E - 2 G）若しくは DNA 複製（図 8）を遅らせることなく、核に入ることができることが決定された。

【 0 0 5 0 】

HD 患者の細胞を NA で処置すると、伸長したリピートの収縮が誘発された。NA は細胞透過性で、急性細胞毒性を引き起こしたり、ヒト細胞増殖を遅延したり（図 4 A - 4 C）、DNA 複製を変更したりすることなく（図 9）、核に入ることができる。トラクト長が > 200 リピートのものは、脳細胞中に頻繁に認められ、(CAG) 40 - 50 の一般変異が遺伝した HD 個体中で体細胞伸長を招く。NA は、HD 患者由来初代線維芽細胞中のハンチントン病の遺伝子座における (CAG) 180・(CTG) 180 トラクトの収縮方向へ、リピート集団中に有意なシフトを誘発した。NA は伸長した HD リピートの収縮の数を強化し（図 4 D； $P = 7.25 \times 10^{-6}$ 、図 10、各実験のそれぞれの重複について完全な small-pool PCR データセットから編集した、リピート解析は表 2 に概要を記載する。）、リピートの有意な喪失を招いた（図 4 F； $P = 0.0003$ ）。NA はまた伸長した HD リピートの伸長数を低減した（図 4 D； $P = 4.339 \times 10^{-5}$ 、図 10、表 2）。また HD 患者線維芽細胞を、大多数の患者に一般的な変異である 43 CAG リピートの伸長したアレルで処置した。有意な数の NA - 処置細胞が伸長したリピートの収縮を招き、HD 病の閾値である 35 ユニットを下回る 20 リピートの低さくらいまで収縮した（図 4 E 及び 4 G； $P = 3.28 \times 10^{-3}$ 、図 11、表 2）。NA はまた伸長数を低減した（図 4 E； $P = 8.32 \times 10^{-5}$ 、図 4 E；図 11、表 2）。このように、NA は、遺伝し、体細胞において伸長したアレルに共通な、伸長したトラクト長の収縮を誘発することができる。対照的に、NA は非伸長 HD リピート、またはストレス条件下で不安定になりがちな既知の他のマイクロサテライトリピートのいずれにも影響せず（図 4 H 及び図 12）、NA は伸長した CAG / CTG リピートに特異的であり、その他のリピートに有害に影響しないであろうこと示唆する。NA のスリップ DNA 構造に対する特異性のための追加的なコントロールとして、NA の効果を非常に長い、しかし遺伝的には不安定ではない、NA 処置 HD 患者細胞中の TBP 遺伝子の CAG トラクトで評価した。TBP 中のリピートの正常範囲は、25 - 41 であるが、> 49 リピートに伸びると完全に浸透性の疾患 (SCA17) を引き起こし、42 - 48 の伸長は、浸透度を低減する方向に導く。HD 患者細胞中で、非変異 TBP 遺伝子は、38 及び 34 リピートの長さを有し、HD 病 CAG 長の閾値である 34 / 35 リピートを上まわり、またはちょうど下回る。重要なことに、NA は TBP リピートが活発に、NA が結合するスリップ DNA 構造の形成を導くような不安定性事象を経験している場合にのみ、効果を有することが期待されよう。確立された spPCR 法を用いたところ、NA は TBP リピートの長さ分布を変化させなかった（図 12 C、表 2）。従って、NA は、TBP 遺伝子の、大きい変異ではないリピート長に何ら効果がないが（図 12 C、表 2）、(CAG) 43 - 180 の変異 HD トラクトには影響したという事実は、活発に不安定性を経験していてスリップ DNA を含むと推定されるリピートに対する NA の特異性をサポートするものである。非伸長リピートトラクトに NA が影響することができないことは、短いトラクトのスリップ DNA を形成する能力の低さによる可能性があり、そのことはこれら構造が非伸長遺伝子座において欠如していることと整合する。更に、しばしば変異誘発の代用物として用いられる HPR1 遺伝子（エキソン 2 から 3）の 2,402 にのぼる個別アレルの配列解析は、NA 処置された細胞について配列変更を示さず（図 13、パネル B 参照）、NA が一般的な変異原であることを論駁する。この発見は、NA が塩基 - 塩基ミスマッチ修復に影響する能力がないことと整合的である（図 3 E）。これらの結果はともに、NA は、一般に遺伝し、脳細胞中で頻繁に認められ体細胞伸長を招く伸長したリピート長に特異的であり、NA の効果は、活発に不安定なトラクトに特異的であり、その他のリピートまたは配列に有害な影響をあたえないであろうことを示唆する。

【 0 0 5 1 】

リピート集団において、r(CAG) 850 を発現するヒト細胞中の (CAG) 850・(CTG) 850 トラクトの収縮方向への有意なシフトを NA が誘発した (Nakamori

10

20

30

40

50

他, 2011, Human Mol. Genet., 20:580-8) (図 5 A 及び 5 B、並びに図 1 4 ; $P = 4.78 \times 10^{-5}$ 、リピート解析はその概要を表 2 に示す)。NA は有意にリピートトラクトの平均サイズを短くし、リピートユニット喪失の規模は、790 リピートにものぼった (図 4 C ; $P = 6.44 \times 10^{-3}$)。NA の効果は、細胞増殖及び DNA 複製から独立しており (図 5 D、図 1 5)、NA が細胞増殖 (図 4 C) または複製進行 (図 9) に影響しないことと整合する。NA の影響は、リピートにわたっての転写に依存し (図 5 E、図 1 6 A - 1 6 C)、NA は伸長したリピートにわたっての転写を変更しなかった (図 5 F)。NA は非伸長 CAG/CTG トラクトまたはその他のマイクロサテライトリピートに影響しない (図 5 G 及び図 1 2)。これらの結果はともに、NA は、増殖から独立し、リピートにわたっての転写に依存して効果を有することを示唆する。

10

【0052】

転写的に誘発された R - ループは、CAG/CTG 不安定性を導くことができる。上述のとおり観察されたリピート不安定性における NA の転写依存性 (図 5 E) は、転写、R - ループ形成、R - ループの生物物理学的安定性、及び/または不安定性への R - ループのプロセッシングのいずれかに NA が影響しうること示唆するかもしれない。これらの代替手段が試験され、NA が細胞中の伸長リピートの転写レベルを変更しないこと (図 5 F、図 1 6 A - 1 6 C)、あるいはインビトロ転写に影響しないこと (図 1 7 B) が認められた。NA ($120 \mu\text{M}$) は、R - ループ形成に影響せず (図 1 7 B)、あらかじめ形成された R - ループの RNase A または RNase H プロセッシング (図 1 7 C) に影響しなかった。細胞に用いられたものと同じ濃度 ($50 \mu\text{M}$) またはより高い濃度 ($500 \mu\text{M}$) の NA で、R - ループはいまだに検出可能であり、このことは NA が R - ループの生物物理学的安定性に影響しなかったことを示唆する (図 1 7 D)。しかしながら、NA は、ニューロン様ヒト SH-SY5Y 細胞の抽出物による CAG/CTG R - ループのプロセッシングを変更し、収縮生成物の数を有意に増加させたが、伸長生成物の数についてはそうしなかった (図 1 8 c、 $p = 0.002$)。これらのモデルシステムからの結果は、NA がリピート収縮のための R - ループプロセッシングを優先的に引き起こすことを示唆する。

20

【0053】

NA が伸長したリピートの収縮を強化する妥当なメカニズムは、転写誘発 R - ループから生じたスリップ DNA の変型修復を通じたものであり、その経路はその他のレポート (Nakamori 他, 2011, Human Mol. Genet., 20:580-8; Lin 他, 2010, PNAS USA, 107:692-7; Reddy 他, 2014, Nuc. Acids Res., 42:10473-87) 同様、本明細書に提示されるデータによってサポートされる。図 1 9 に概要が示されるように、CAG 転写物を生成するための CTG 鎖の転写の間、HTT 遺伝子で起こる場合のように、位置を移した CAG DNA 鎖上にスリップ DNA を形成する傾向があり、NA は位置を移した dCAG 鎖上に形成された内部鎖ヘアピンに結合する可能性があり、更にこれらをより長いヘアピンに伸長する可能性がある (図 1 9 A)。これらの NA - 結合スリップ DNA は修復を逃れ、収縮を導くであろう。スリップアウトを維持または除去するとき、ヌクレオチド鎖切断の切り目によって (Hou 他, 2009, Nature Struct. Mol. Biol., 16:869-75; Plucienik 他, 2013, PNAS USA, 110, 12277-82) (図 1 9 B の矢印を参照)、NA 結合 (CAG) n テンプレート上での DNA 修復合成はブロックされ (Hagihara 他, 2006, Nuc. Acids Symp. Ser. (Oxf.), 50:147-8; Hagihara 他, 2011, Chembiochem., 12:1686-9)、それによって、伸長よりも収縮が選好されるであろう。このモデルは、DNA 複製がない中での NA 誘発リピート収縮と、転写依存な方法で整合し、そこで NA は、リピート構造の修復を攪乱することを通じてその影響を行使する (図 3 - 5)。

30

40

【0054】

リピート不安定性が起こる可能性のある道筋は多数あり、NA が作用するであろう様々な方法 (DNA 複製、転写、後成的変化、DNA - 損傷等) は、その全てがスリップ DNA を含む。CAG 不安定性における NA の効果は、増殖/複製とは独立しており (図 5 D)、リピートを通じた転写に依存して (図 5 E)、転写、R - ループプロセッシングを通

50

じたスリップDNAの形成、不安定性におけるスリップDNAの関与の見込み、CAGヘアピンに対するNAの特異性（図2）、及びNAのCAG収縮中間物の修復をブロックする能力（図3B）と相まって、これら全てがこの提案されたモデルをサポートする。

【0055】

DNA修復タンパク質とスリップDNAの相互作用をブロックすることによってNAは作用するのであるか？大きなスリップアウト修復のためのタンパク質は知られていないが、この仮説を試験するため、我々は、4つの候補タンパク質、MutS、FAN1及びRPA-polでNAの効果を評価した。多くのマウスモデルが、機能するATPアーゼを伴うミスマッチ修復MutS複合体が、CAG/CTG伸長に拍車をかけることを証明している。NAが20過剰リピートの大きなCAGスリップアウトの修復をブロックする一方で、プロセスはMutSとは独立しており、その他はMutSが引き続き伸長を導くスリップDNAの形成に含まれている可能性があることを示唆していた。DNAに結合するMutSを含むことが予測されるこのプロセスは、NAによって影響される可能性がある。ここで、MutSは、既存のレポート同様、ATPによって分離され得る複合体である長いCAGスリップアウトリピートに結合することができると認められた。NAはMutSのCAGスリップアウトに対する結合をブロックしたり、この複合体のATP媒介分離をブロックしたりすることはなかった（図20）。NAはMutSがスリップアウトに結合することをブロックしないので、また、NAは変性リピート含有DNAからのスリップアウト形成を許さないわけではないので（図2E）、NA単独で、あるいはMutSに強化されて、スリップDNAの形成をブロックするというNAの役割をサポートするものではなかった。MutSは、NAのリPEAT不安定性に対する作用に関与していたとしても、示唆されるとおり、上流で作用し、転写中にスリップDNAを形成する可能性がある。

【0056】

最初脳内で特定されたFAN1/KIAA1018/MTMR15は、DNA構造を偏好するDNA修復ヌクレアーゼである。FAN1は、HDの発症年齢及び5つの他のCAG疾患（SCA1、SCA2、SCA3、SCA7及びSCA17）の修飾因子にかかるいくつかの探索のトップとして最近特定された。FAN1が発症年齢を調節する方法は知られていないが、体細胞リピート不安定性を調節することにより行っていると推測されている。何ら前例はないが、FAN1のリPEAT DNAへの作用を試験した。既に証明されたように、FAN1はスーパーコイル及び線状DNAを開裂させること（図21、左パネル）、DNA含有転写誘発R-ループを開裂させることが可能であり、それによってスーパーコイル依存RNA部分を放出する（図21、右パネル）。ミスアラインしたDNAのアニリングから、R-ループからのRNA喪失に続いて、スリップDNAが発生する可能性がある。FAN1開裂は3つの異なるスリップDNA接合部上にマップされた：コントロール接合部はリピートを欠く；1つはフラップ中にCAGヘアピンを有し；1つは接合部を超えた二本鎖領域にCAGヘアピンを有した（図22、トップパネル、表1）。他の研究のように、FAN1は、5'一本鎖フラップ及びフラップを超えた二本鎖でカットする。コントロール基質については、両サイトにおける開裂は、大体同じである（図22A及び22D）。しかしながら、CAG基質については、開裂は二本鎖及びヘアピン領域で低減する（図22B-22C及び22E-22F、変性ゲル、矢印の頭を参照）。これは、CAGヘアピンの存在がFAN1の作用に影響し得ることを示唆している。反応中に含むNAの量を増加させると、二本鎖基質中のCAG上でのヌクレアーゼ作用が明らかに低減し、とりわけ、CAGヘアピンに近位及びCAGヘアピン中の開裂に影響している（図22C及び22F）。本明細書で証明されることは、スリップCAG基質のFAN1開裂は、CAG不安定性を調節する薬剤として示されてきたNA（図3、5及び6）によって変更することができるということであり、NAがDNA構造特異的ヌクレアーゼであるFAN1の作用を調節することができる可能性をサポートする。FAN1がHD発症年齢を調節するであろう方法は、将来の研究における焦点である。

【0057】

10

20

30

40

50

複製タンパク質 A (R P A) は、多くの DNA 修復プロセスにおけるキープレイヤーであり、ヘアピンのような異常な DNA 構造の形成を、一本鎖領域に結合し安定化することを通じて阻害する。R P A は、難しい DNA テンプレートを通じた DNA ポリメラーゼの進行を、構造化されたテンプレートを溶解することによって強化すると報告されてきた。スリップ DNA への R P A の結合及びポリメラーゼデルタ (p o l 、 C A G リピート不安定性に関係するポリメラーゼ) による進行の強化における N A の効果が評価され、修復能力において脳内で活発であった。N A はスリップ C A G リピートに対する R P A の相互作用を競合的にブロックした (図 2 3)。P o l は、C A G トラクトにわたって合成することができず、このことは、おそらく邪魔なヘアピンを溶解するその能力を通じて、R P A の添加によって回復された (図 2 3 B、レーン 5 - 6)。N A は、C A G テンプレートに沿って p o l の強化された進行をブロックし (図 2 3 A、レーン 5 - 6)、N A が R P A に対し競合的に C A G トラクトに結合することと整合的な結果であった (図 2 3 A)。これらの結果は、ポリメラーゼが N A 結合 C A G テンプレートを通じて合成できないことを通じた C A G 収縮を N A が誘発するメカニズムをサポートする (図 2 3 C)。この結果は、N A が収縮を誘発し得るプロセスをサポートする (図 1 9 の下半分を参照)。我々の F A N 1、P o l 及び R P A の結果は、ともに、N A が C A G スリップアウトに対する修復タンパク質の相互作用または作用を阻止することによって作用する可能性があるとの概念をサポートする原理証明を提供する。N A が C A G 収縮を誘発するため変更することができる正確なプレイヤー及びステップを特定することは、今後決定されることである。

【 0 0 5 8 】

激しい C A G 伸長を示し、変性に敏感な神経組織において、N A はインビボで効果があるのだろうか。マウスと患者の両方で、最も大きい C A G 伸長及びほとんどの変性は線条体中で起こり (Lopez Castel 他, 2010, Nature Reviews, Mol. Cell. Biol., 11:165-170; Kennedy 他, 2003, Human Mol. Genet., 12:3359-67; Goula 他, 2009, PLoS Genet., 5:e1000749; Larson 他, 2015, Neurobiol. Dis., 76:98-111; Kovalenko 他, 2012, PLoS One, 7:e44273)、中型有棘ニューロンが最も攻撃されやすく、最大の C A G 伸長を招く (Kovalenko 他, 2012, PLoS One, 7:e44273)。従って、線条体に焦点をあて、それぞれ 1 5 0 から 1 6 0 程度の C A G リピートを遺伝的に受け継ぐハンチントン病 R 6 / 2 導入遺伝子マウス中の伸長した (C T G) 1 5 0 の不安定性に対する N A の効果が試験された (Goula 他, 2009, PLoS Genet., 5:e1000749; Larson 他, 2015, Neurobiol. Dis., 76:98-111)。ここで各マウスに、左線条体に N A + 生理的食塩水、または内部コントロールとして右線条体に生理的食塩水のみをいずれかを、4 週間の間、注入した (図 2 4)。C A G 伸長はこれらのマウスの線条体で早ければ数週間で明らかであり、それはマウスが年を取るに従って継続する (Goula 他, 2009, PLoS Genet., 5:e1000749; Larson 他, 2015, Neurobiol. Dis., 76:98-111)。1 つのモデルにおいて、C A G リピートは、毎月 1 細胞あたり ~ 3 . 5 C A G ユニットの割合で、追加的なリピートの広く分布したサイズを得ると定量された (Lee 他, 2011, PLoS One, 6:e23647; Mollersen 他, 2010, PLoS Genet., 6:e1001242)。6 週齢 R 6 / 2 マウスへの、N A の線条体内注入の繰り返しは、同じマウスの反対側の線条体への生理的食塩水のみを注入に対して相対的に、伸長したリピートの表面上の収縮を導いた (図 6 A、N A - 処置線条体部分の青いスキャンと生理的食塩水処置線条体部分の赤いスキャンを比較、注入は 1 回、2 回または 4 回投与を 4 週間のスパンで行い、その時 DNA を採取した (図 2 4))。N A の効果は注入サイトに局所的であり、N A - 注入 (青いスキャン) の線条体領域のみがリピート収縮を示し、生理的食塩水 - 注入 (赤いスキャン) では示さず、これによって、生理的食塩水を注入した同じマウスの脳の半分は内部コントロールとして供された。何ら処置がなければ、所与のマウスについて、線条体の C A G 長分布は、左及び右半分の間で区別できなかった。(生理的食塩水中の) N A で処置された半部分が、生理的食塩水のみで処置された半分よりも短い C A G トラクトを有することは、N A が C A G 長の違いを誘発したという解釈をサポートする (図 6 A)。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 9 】

追加的な4週間にわたるNA投与は、継続的な収縮を誘発した（これは、全13マウス（1匹に1注入、2匹に2注入、及び10匹に4注入）について非常に再現性が高かった。図25A - 25Hを参照。NA注入は脳形態を変化させなかった。図26）。NAの効果は、マウス間での遺伝性のリピート長の違いに関わらず、マウス間で一貫していた。HD患者の脳には、二峰性のリピートサイズの分布が存在する。この第2ピークはより大きな伸長であるが、これはほとんどのCAGマウスモデルの線条体において明らかであり、最も脆弱なHD細胞、中型有棘ニューロンからなり、より大きなレベルの伸長したCAG転写を有するものとして、発見された。興味深いことに、NAは二峰性リピート分布のより大きな伸長により大きな効果を有した（図6D）。この線条体におけるより大きなサイズの伸長の部分は、NAが結合するのに十分大きな、大きいスリップアウトを含む変異事象によって起こった可能性がある。HD個体における不安定性解析は、各変異事象において獲得または喪失されたCAGユニットの数は、主として1つのリピートユニットの変化であるが、NAが結合することができるサイズの5 - 15リピートユニットの変化を含む可能性があることを示唆する。DM1患者の脳を含む様々な組織から単離されたDM1遺伝子座におけるスリップDNAが、ピークが~30及び<10リピートで、前者はNAが結合することができるピークである二峰性スリップアウトサイズを示したことは注目に値する。

10

【 0 0 6 0 】

全てではないにせよほとんどのNA処置線条体中のアレルがリピート収縮を受け、NAがほとんどの細胞に影響を与えたことを示している（図6A、図25A - H）。確立された方法を用いて、体細胞「不安定性指数」を定量した：より大きな指数はより大きな伸長を反映し、より低い指数はより低い伸長またはより大きな収縮を反映する（図27）。収縮に対する伸長ピークの数（図6b）または、収縮に対する伸長ピークの相対的な組成（%）（図6C）は、それに続く処置とともにより大きくなった。NAで4回処置された線条体中のリピートサイズ分布は、未処置（mock-treated）線条体から著しく異なっていた（マン・ホイットニー、 $p = 0.00034$ 、または対応のあるt - 検定、 $p = 0.00019$ ）。NAの効果は注入したサイトにおいて局所的であり、線条体内注入を行った同じマウスからの小脳及び大脳皮質のCAGトラクトは、右側と左側とでCAG長不均一性について同一のパターンを示した（図6C及び6D、図25A - 25H）。

20

30

【 0 0 6 1 】

NAが、伸長を阻止するだけでなく収縮を誘発したことは、NA処置した線条体中のピークリピート長が、マウスの人生を通じて変化しない同じマウスの尾の遺伝的トラクト長よりも短いという事実によってサポートされる（図5D及び図25）。重要なことに、所与のマウスについて、NAで処置された線条体の半分におけるリピートサイズ分布は、尾の遺伝による長さに対して相対的に、収縮の方向にシフトした一方で、生理的食塩水で処置した線条体の半分は引き続き伸長を招いた（図6B - 6E、図25A - 25H、生理的食塩水 - 対NA処置 - 対尾CAG長の主ピークのデルタは4 - 7CAGユニット異なることを参照）。これは、NAの線条体への注入が、伸長したCAGトラクトの収縮を誘発したこと、及びその組織中の伸長バイアスに対抗してそうすることができることをサポートし（自発的な伸長速度が~5.75CAGユニット/月）、この発見は細胞中で観察されたNA誘発収縮と整合的である（図3及び図5）。インビボにおけるNAの効果は伸長したリピートに特異的であり、非伸長リピートには何の効果もない（図6E及び12D）。NAの効果は、DNA転写よりもむしろゲノム維持を含むものであった可能性が高く、それは6週齢の処置マウスが出生後、マウスの出生6 - 17日後に転写ピークがくる「脳成長スパーク」を経験したことからもうかがえる。CAG-RNAレベルは、伸長が最大の線条体細胞中で最も大きく、NAがリピートにわたって転写を変更しなかったことから、転写が含まれそうである（図16C）。このことは、NAが、細胞増殖とは独立して収縮を誘発することと整合的である（図5E）。このように、NAは、選択的な神経細胞の脆弱性を示すHD個体中の組織内のほとんどの細胞で、伸長したCAGリピートの収縮を誘

40

50

発することができた。

【 0 0 6 2 】

これらの約 1 5 0 C A G リピートを有するマウスを 4 週間の期間にわたって N A 処置したことによる発見は、多くのニューロンが、~ 0 . 5 リピート喪失 / 週の収縮を招いていたことを示している。これを H D に冒されたヒトに外挿すると、N A のような薬剤を、体細胞 C A G 伸長の急な発症前に適用すると、効果的に伸長をブロックし、遺伝により伸長したアレルより短い長さに収縮することを誘発し、1 年にわたる治療によってリピートを 5 - 2 5 リピート収縮することができるであろう。平均を上回る 6 0 - 7 0 リピートの H D アレルについて、これは著しく、疾患の発症と進行を修正することを可能とするであろう。

10

【 0 0 6 3 】

複数のモデルシステムを用いた様々なアプローチからのデータは、調和のとれた解釈を導いた。例えば、様々な細胞モデル中での N A に強化された収縮は、インビボでの収縮の増加と整合的であり、N A の効果が複製フォークにおいて存在しないこと、複製から独立しているが転写を必要としていることは、全て、転写が起こる細胞または線条体中での増殖の要請欠如と整合的である。加えて、N A が R - ループプロセッシングの収縮に影響することは、N A が r C A G - d C T G R - ループを生成し、C A G D N A 鎖を移す転写を経験し、N A に結合することを許容する細胞株及び線条体中の不安定性に影響することと整合的である。更に、N A が（短いものではなく）長い C A G スリップアウトに結合してその修復を阻害することは、N A が、大きな跳躍伸長を経験する線条体中のより長いリ

20

【 0 0 6 4 】

C A G / C T G 不安定性の細胞モデルを用いた過去の研究は、外因的に添加された化合物がリピート不安定性のレベルを修正することができることを証明した（Yang 他, 2003, Am. J. Hum. Genet., 73:1092-105; Gomes-Pereira 他, 2006, Mutat. Res., 598:15-34）。しかしながら、効果的な化合物は D N A 損傷剤（エチルメタンスルホナート、臭化エチジウム、マイトマイシン C 及び D N A ポリメラーゼ阻害剤）であって伸長リピートへの特異性に欠け、したがって、ゲノム全体にわたって有害突然変異を誘発する。別の研究では、（C A G）6 アンチセンスオリゴヌクレオチドは（C T G）8 0 0 の不安定性を低減することが可能であったが、伸長したリピートの収縮は誘発しなかった（Nakamori 他, 2011, Mol. Ther., 19:2222-7）。

30

【 0 0 6 5 】

ミトコンドリアを標的とする化合物、X J B - 5 - 1 3 1 は、未知のプロセスによって、収縮を誘発するのではなくむしろ穏やかに C A G 伸長を抑制することが報告され、この化合物もまた収縮を抑制した。フリドライヒ運動失調症患者中で伸長される二本鎖 G A A リピートを標的とする配列特異的ポリアミドは、G A A 三重鎖構造の形成を妨げ、F R D A 細胞中の G A A リピート伸長を抑制したが、収縮は誘発しなかった。変異アレルをターゲットとするための H D 細胞の C R I S P R / C a s 9 処置は、プロモータ領域、転写開始サイト、及び変異 H T T アレルの C A G 伸長部分にわたる ~ 4 4 k b D N A を削除し、その結果、機能性非変異アレルとともにハプロ不全をもたらす。低分子アプローチは、インビボにおけるいくつかの酵素仲介経路のハードル（送達、特異性等）を克服することが

40

【 0 0 6 6 】

これらの過去のアプローチとは対照的に、我々の結果は、C A G リピートを含む D N A スリップ鎖構造に結合する D N A 配位子である N A が、更なる伸長よりむしろ収縮の方にリピート不安定性の動態をシフトすることができることを示す。N A はスリップ D N A と D N A 修復タンパク質との相互作用を攪乱することによりスリップ D N A の異常修復のサイクルを阻害することで作用する可能性がある。その他の核酸結合化合物であって、有害リピート r（C U G）R N A タンパク質相互作用または C A G / C T G 転写を攻撃する方向に効果があることが証明された化合物（Bernat 他, 2015, Neuron, 87:28-46）もま

50

たりリピート不安定性に影響する可能性がある。NAの属性 - その配列特異性及び構造特異性、その伸長リピートを含有するスリップDNAに対する優遇効果、その罹患脳領域中インピボで収縮を誘発する能力 - は、疾患を引き起こす伸長リピートの収縮を誘発し伸長を阻害することによって、CAGリピート不安定性に影響を与える低分子DNA結合化合物の潜在力を示す第1級の例である。このような低分子のヒトの脳への投与は、一度治療において最適化されれば、効果的にその根本的原因を標的として、伸長の変異により引き起こされる全ての下流の効果に対応することであろう。

【0067】

【表2】

表2 Small Pool PCRの結果

細胞タイプ	研究	処置	% 伸長 ^a	% 変化なし	% 収縮 ^a	P値 ^b	平均 リピート サイズ の変化 ^c	P値 ^f
HT1080- (CAG)850	初代 クローン		7.7	76.9	15.4		-28.8	
	Ex 1	No NA	8.8	49.1	42.1	0.042	-68.1	
		50 uM NA	14.8	28.4	56.8		-107.2	
	Ex 2	No NA	21.1	45.1	33.8	0.008	-36.1	
		50 uM NA	11.3	27.4	60.0		-129.3	
	Ex 3	No NA	21.8	43.6	34.5	0.017	-41.3	
		50 uM NA	15.2	23.7	61.0		-147.1	
	合計	No NA	17.5	45.9	36.6	4.78E- 05	-47.2	6.44E- 03
		50 uM NA	13.9	26.7	59.4		-125.7	
HT1080 (CAG)850 接触阻害	Ex 1	No NA	26.8	46.4	26.8	0.036	-17.9	
		50 uM NA	15.9	34.9	49.2		-86.9	
	Ex 2	No NA	22.0	44.0	34.0	0.049	-46.8	
		50 uM NA	17.9	25.0	57.1		-107.6	
	Ex 3	No NA	17.5	52.6	29.8	0.030	-26.2	
		50 uM NA	16.0	30.0	54.0		-105.0	
	合計	No NA	22.1	47.9	30.1	8.78E- 05	-30.0	9.36E- 03
		50 uM NA	16.6	30.2	53.3		-90.9	
HT1080 - 非転写 (CAG)850	Ex 1	No NA	14.0	62.0	24.0	0.862	-48.5	
		50 uM NA	11.1	66.7	22.2		-68.8	

10

20

30

40

50

(CAG)850	Ex 2	No NA	15.5	62.1	22.4	0.990	-64.4	0.766
		50 uM NA	16.1	62.5	21.4		-36.6	
	Ex 3	No NA	9.8	67.2	23.0	0.976	-66.1	
		50 uM NA	9.1	69.1	21.8		-62.8	
	合計	No NA	13.0	63.9	23.1	0.918	-60.3	
		50 uM NA	12.1	66.1	21.8		-55.9	
HD 線維芽細胞 (CAG)180	Ex 1	No NA	28.0	54.0	18.0	0.011	187.0	2.90E-04
		50 uM NA	12.6	58.6	28.8		178.5	
	Ex 2	No NA	22.9	59.6	17.4	0.029	185.8	
		50 uM NA	13.1	56.1	30.8		176.5	
	Ex 3	No NA	30.5	48.4	21.1	0.016	187.5	
		50 uM NA	15.1	50.9	34.0		177.5	
	合計	No NA	27.0	54.3	18.8	7.25E-06	186.7	
		50 uM NA	13.6	55.2	31.2		177.5	
HD 線維芽細胞 (CAG)43	Ex 1	No NA	14.4	67.3	18.3	0.020	43.7	2.94E-04
		50 uM NA	4.6	67.0	28.4		40.6	
	Ex 2	No NA	14.7	68.8	16.5	0.042	43.2	
		50 uM NA	5.6	69.2	25.2		40.4	
	Ex 3	No NA	12.9	71.6	15.5	0.045	43.3	
		50 uM NA	4.5	73.2	22.3		41.0	
	合計	No NA	14.0	69.3	16.7	3.28E-05	43.4	
		50 uM NA	4.9	69.8	25.3		40.7	

10

20

データはHD患者線維芽細胞 (GM09197; (CAG)180 及び GM02191、(CAG)43)、及び HT1080-(CAG)850、図 5、6、及び図 10 及び 11、14、及び 15 に示す) の解析から要約した。

30

- a カットオフポイント ± 25 リピートを用いて、伸長及び収縮を決定した。
- b P-値はカイニ乗検定を用いて計算し、HT1080-(CAG)850 細胞の集団内の伸長、変化なし、及び収縮アレルの割合を比較した。
- c 全てのアレル (伸長 + 変化なし + 収縮) について、リピートサイズの平均変化をリピート数で表現した。リピートサイズの平均変化は、small-pool PCT により短いアレルの増幅が選好されるため、収縮の方にバイアスがかかったことに留意。
- d カットオフポイント ± 10 リピートを用いて、伸長及び収縮を決定した。
- e P-値はカイニ乗検定を用いて計算し、HD線維芽細胞の集団内の伸長、ピークリピート、及び収縮アレルの割合を比較した。
- f P-値はスチューデントのt検定を用いて計算した。

40

【 0 0 6 8 】

本明細書において、数々の異なる態様とともに本件方法及び組成物を記載してきたが、様々な態様についての先の記載は、例示を意図するものであり、本件方法及び組成物の範囲を限定するものではないことが理解されるであろう。その他の態様、有利な点、及び修正は、続く特許請求の範囲の範囲内である。

開示された方法及び組成物の生成物のために、それとともに、またはその調製において用いることが可能である方法及び組成物、または開示された方法及び組成物の生成物が、開示されている。これらの及びその他の物質が本明細書で開示され、これらの方法及び組成物の組合せ、部分集合、相互作用、グループ等が開示されていることが理解される。す

50

なわち、各様々な個々の及び集合的な組合せ、及びこれら組成物及び方法の順列は、明示的に開示されていなくても、そのそれぞれが本明細書において具体的に考慮され、記載されたものである。例えば、もし、特定の本件組成物または特定の方法が開示され、議論され、多数の組成物または方法が議論されれば、組成物及び方法のそれぞれ全ての組合せ及び順列は、そうでないと明示しない限り、考慮されたものである。同様に、任意のこれらの部分集合または組合せもまた、考慮され、開示されたものである。

【図面】

【図 1 A】

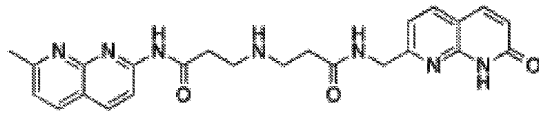


FIGURE 1A

【図 1 B】

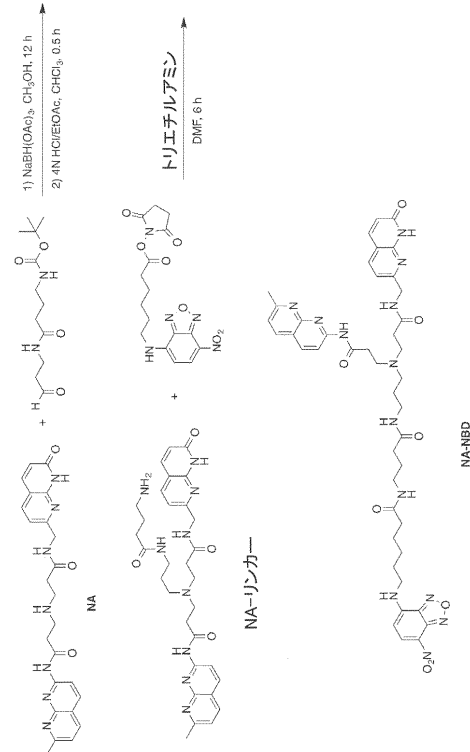


FIGURE 1B

【図 2】

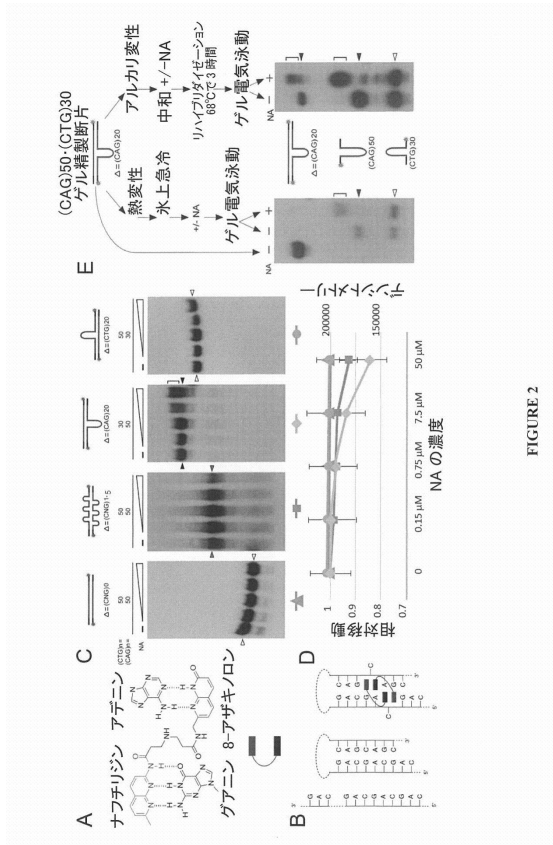


FIGURE 2

【図 3】

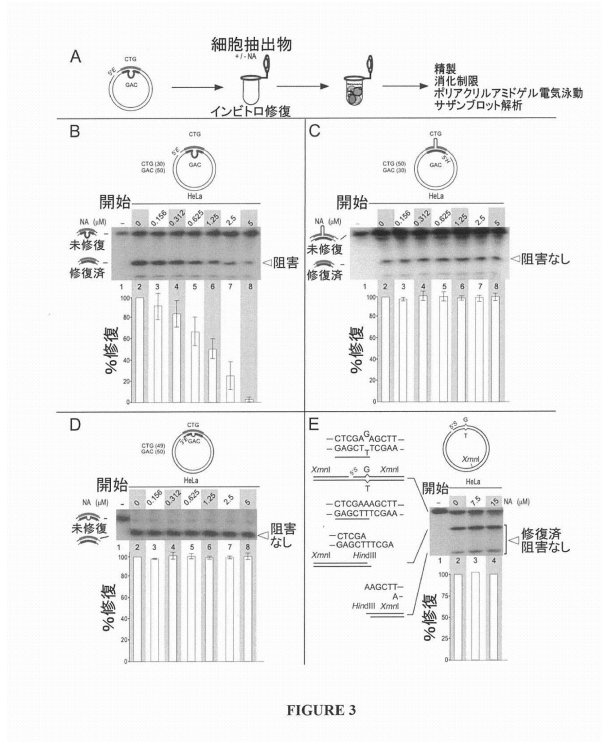


FIGURE 3

【図 4】

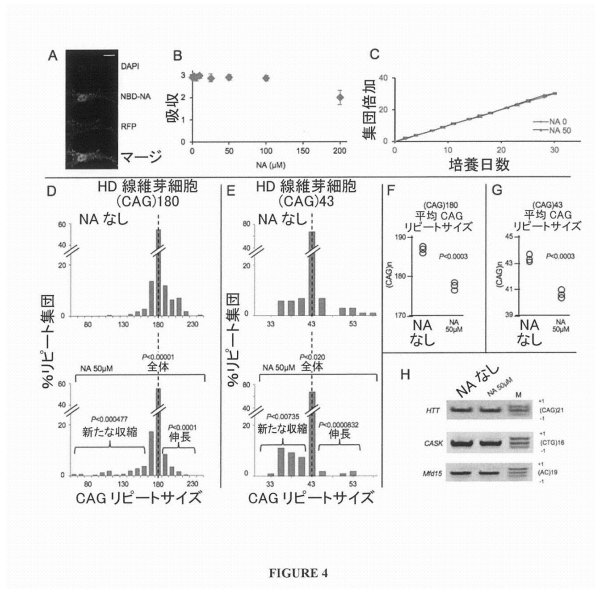


FIGURE 4

【図 5】

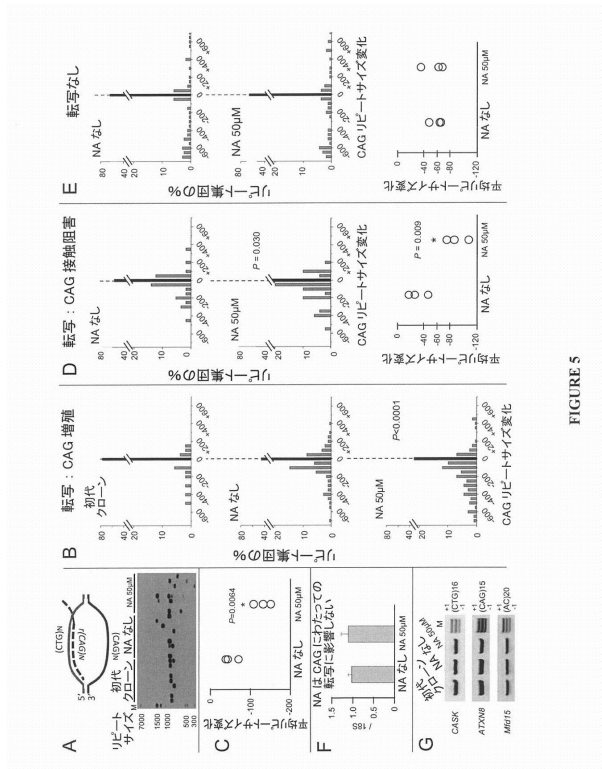


FIGURE 5

10

20

30

40

50

【図 6】

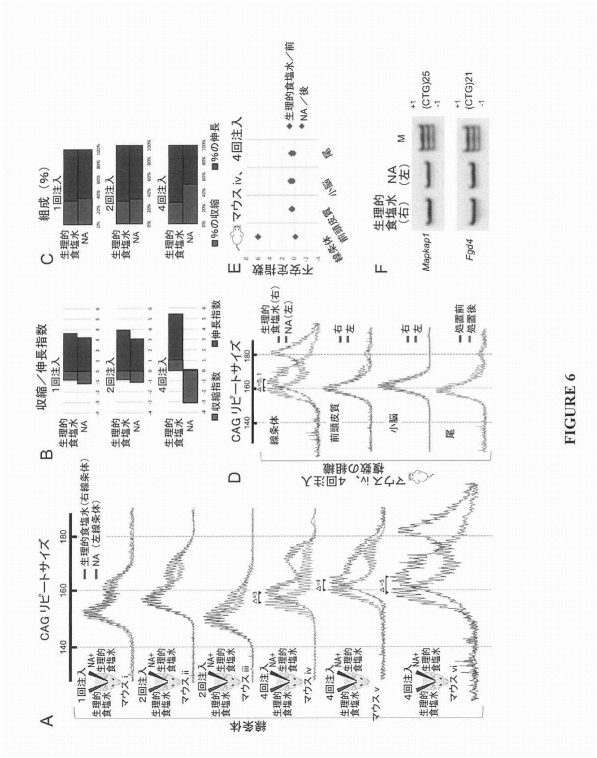


FIGURE 6

【図 7】

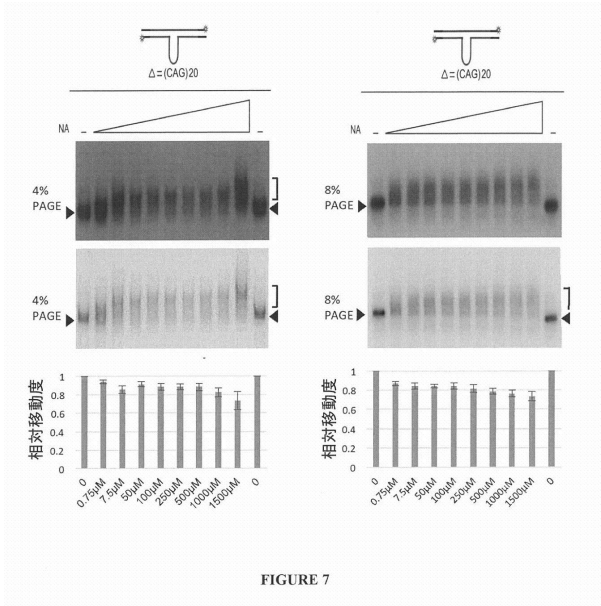


FIGURE 7

【図 8】

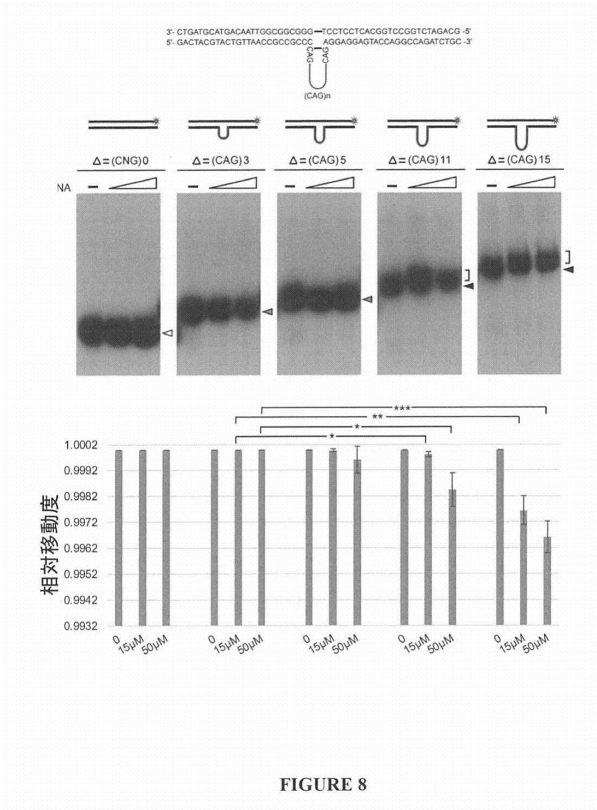


FIGURE 8

【図 9】

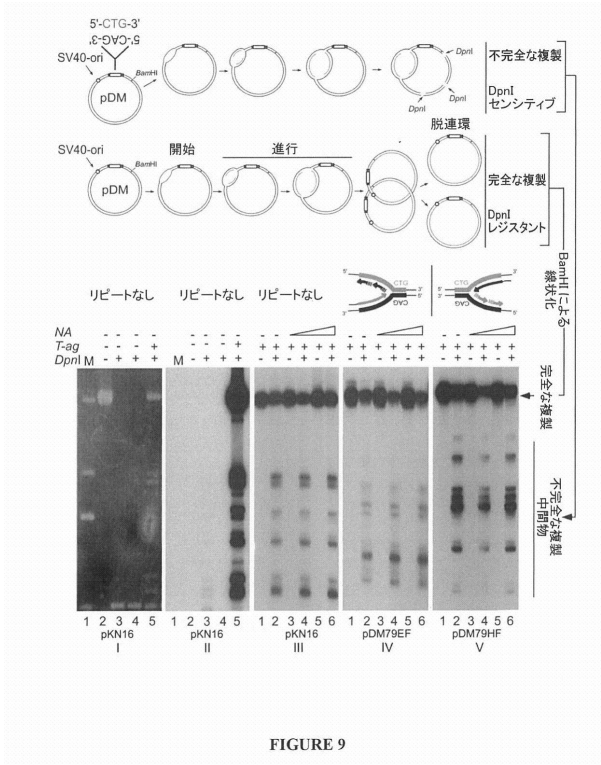


FIGURE 9

10

20

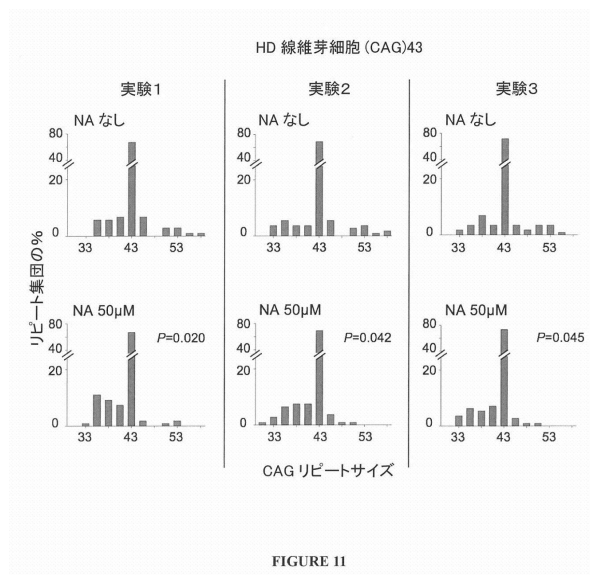
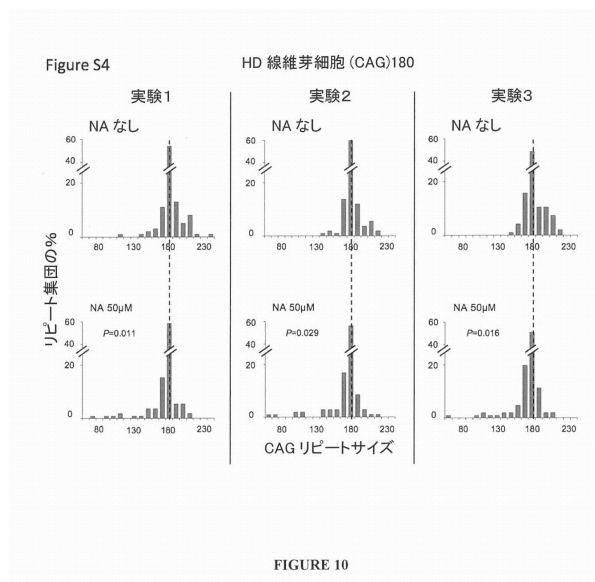
30

40

50

【 図 1 0 】

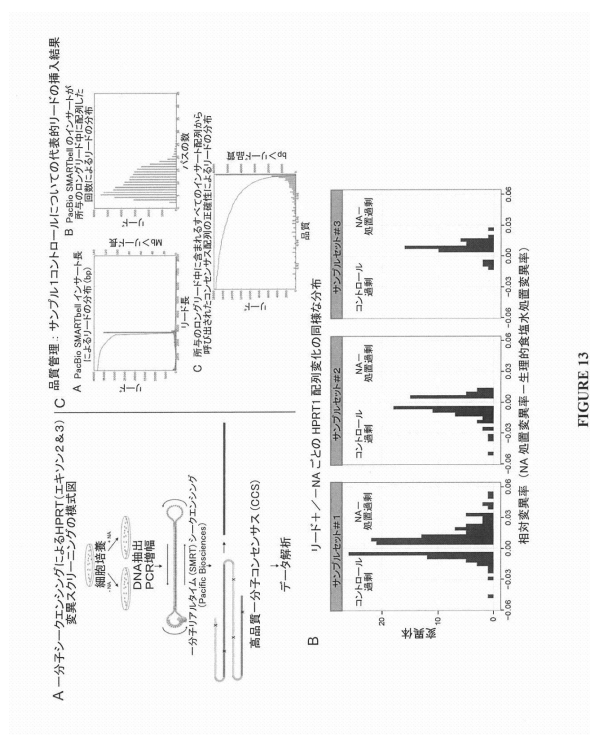
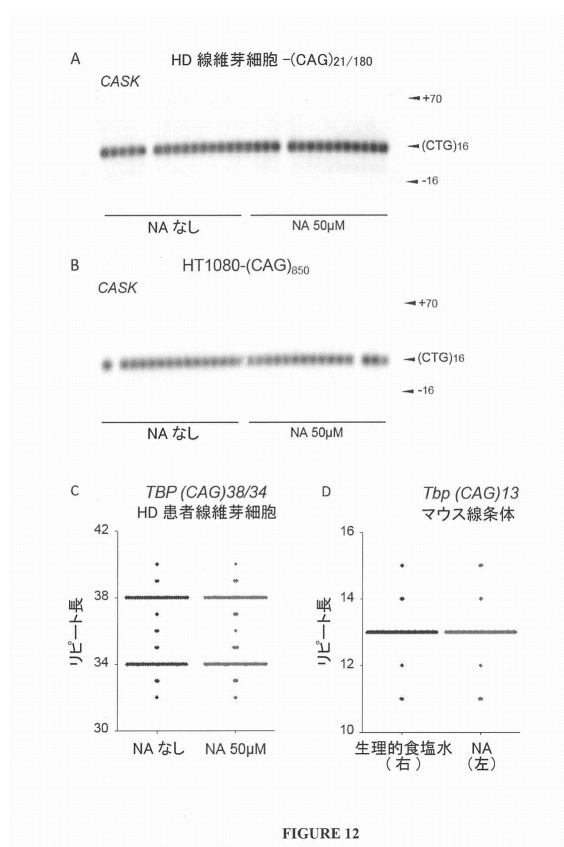
【 図 1 1 】



10

【 叉 1 2 】

【图 13】



20

30

40

【図 14】

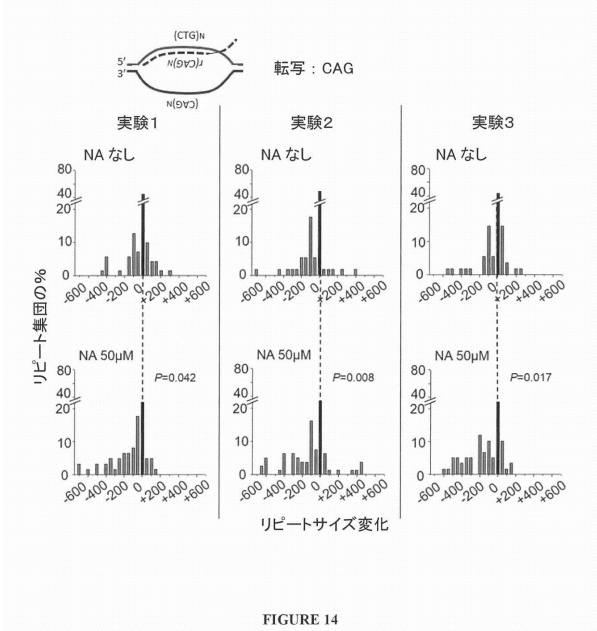


FIGURE 14

【図 15】

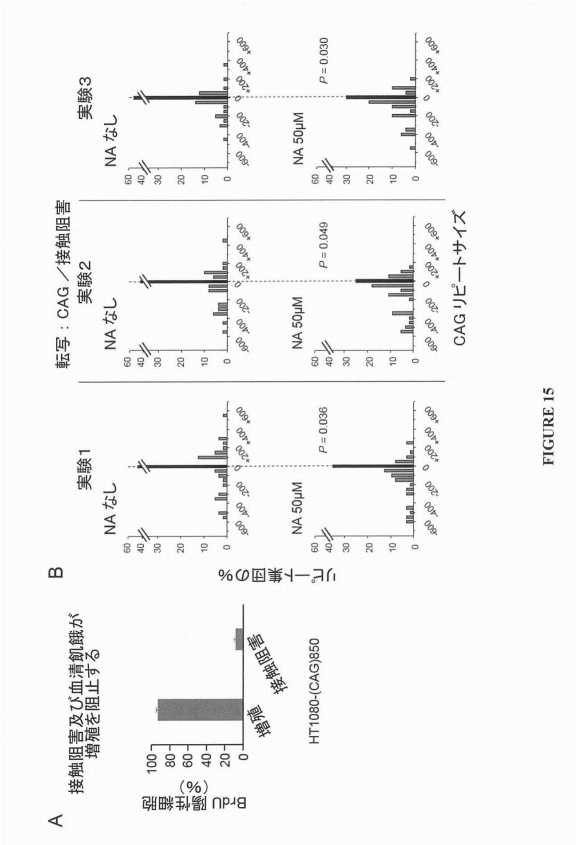


FIGURE 15

【図 16】

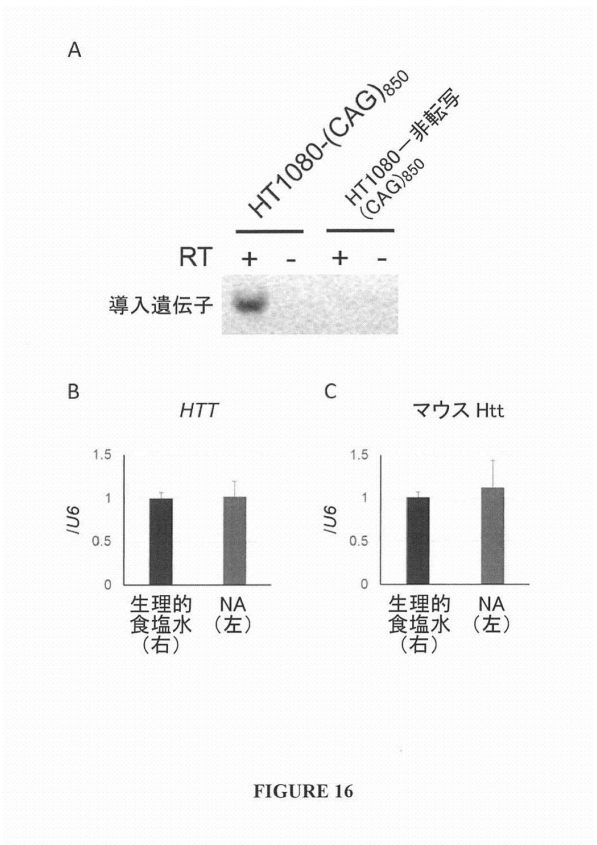


FIGURE 16

【図 17】

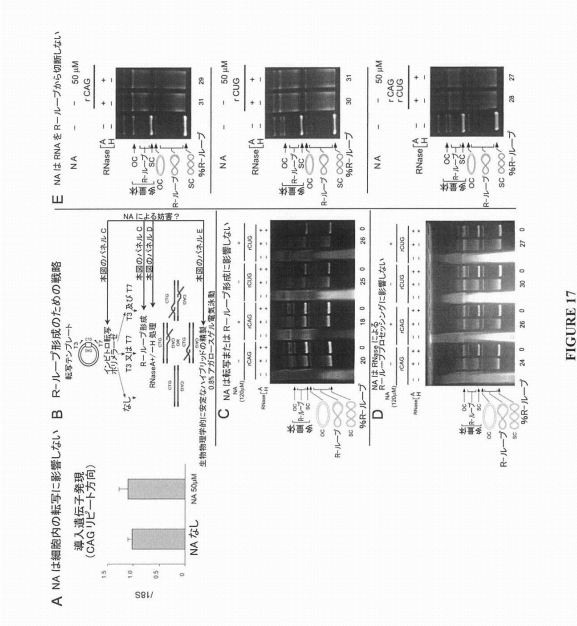


FIGURE 17

10

20

30

40

50

【図 2 2】

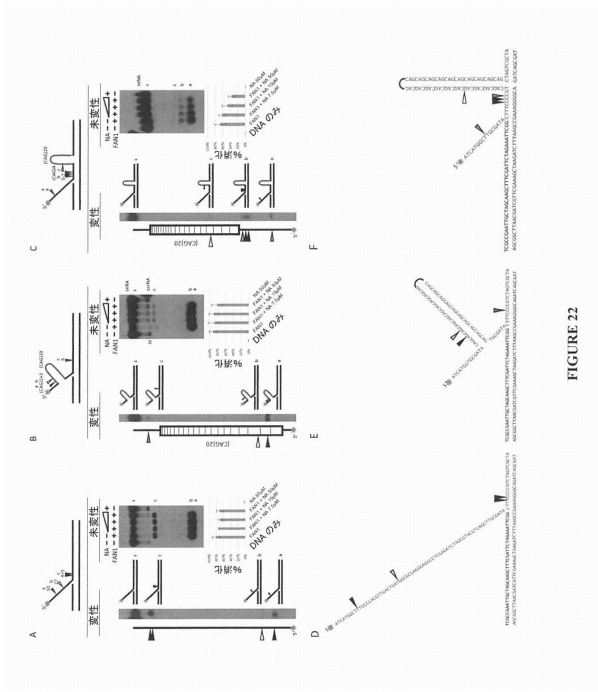


FIGURE 22

【図 2 3】

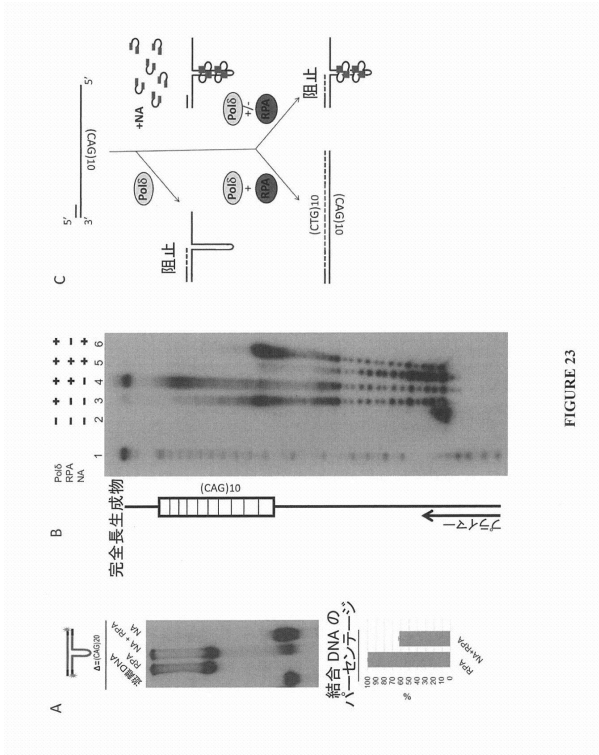


FIGURE 23

【図 2 4】

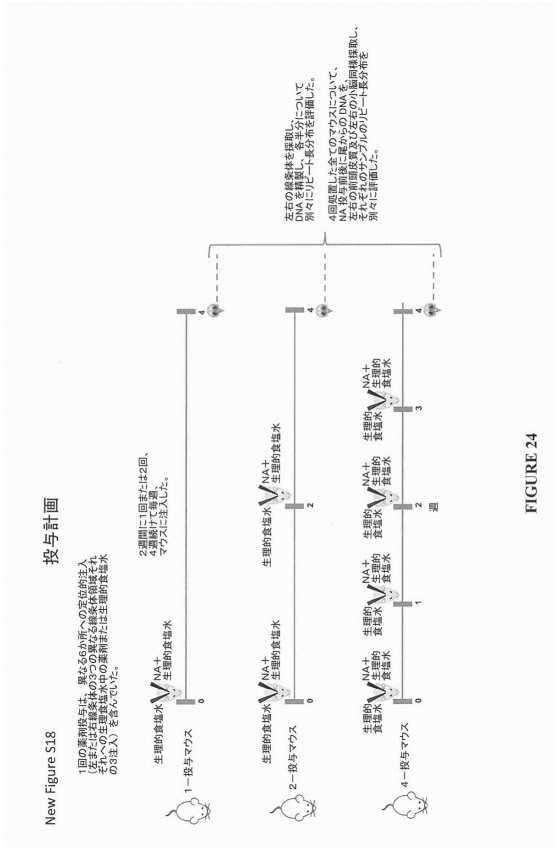


FIGURE 24

【図 2 5】

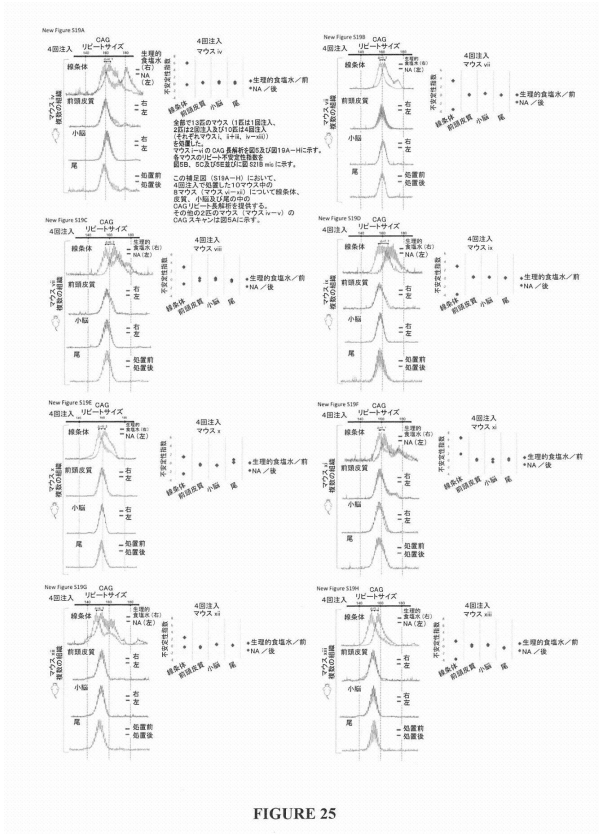


FIGURE 25

【図 26】

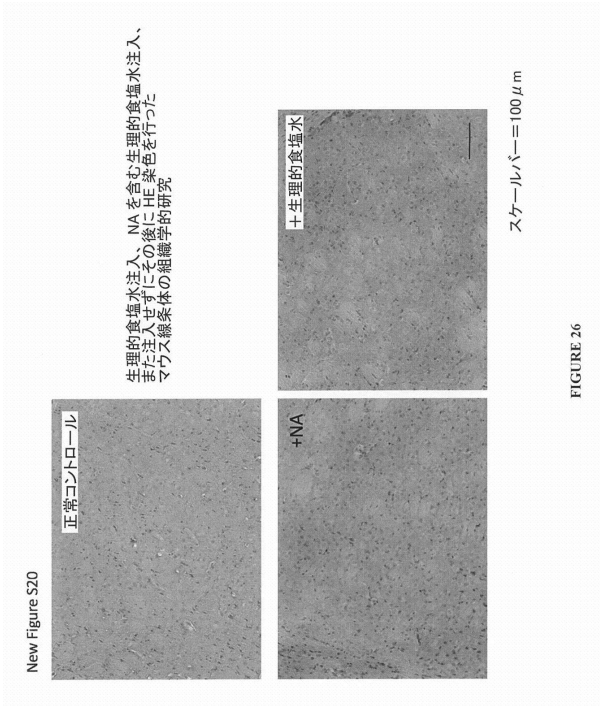
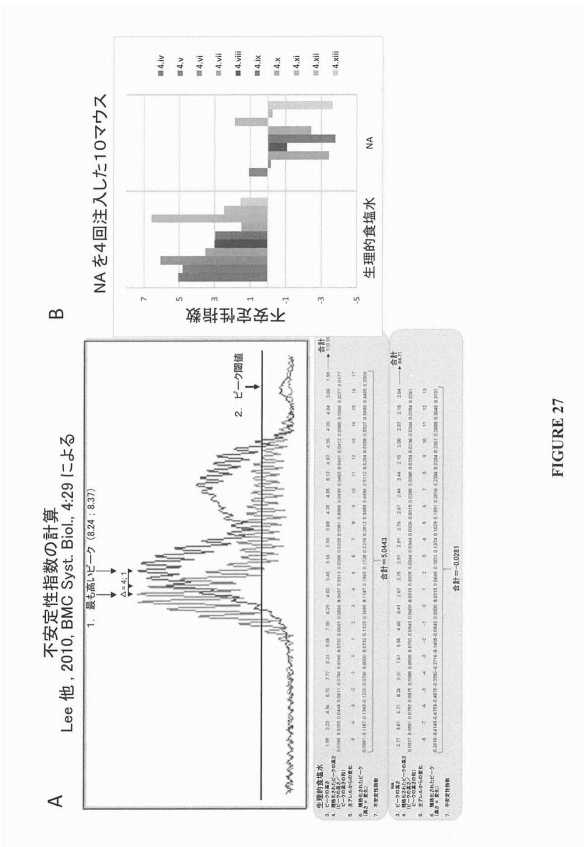
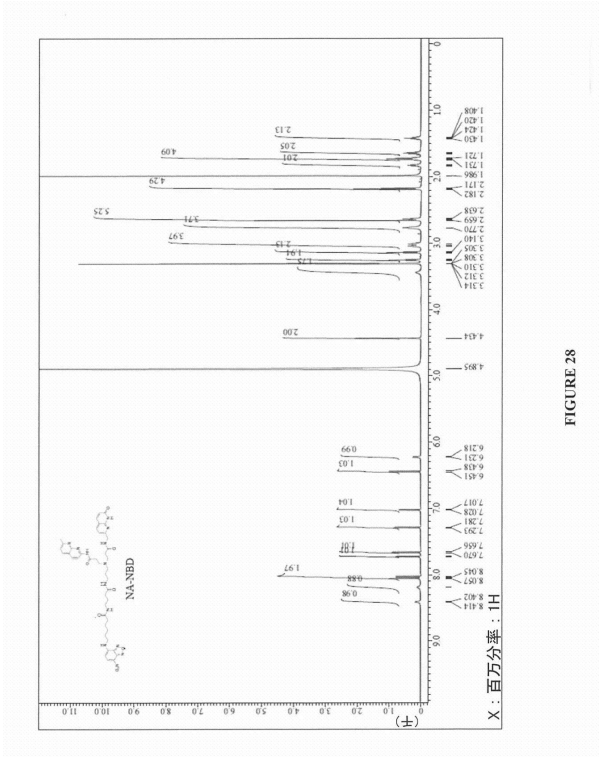


FIGURE 26

【図 27】



【図 28】



10

20

30

40

50

【配列表】

0007236707000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
- (74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ピアソン クリストファー イー
カナダ エム4エル 2ビー4 オンタリオ トロント ジェラルド ストリート イースト 1822
- (72)発明者 中森 雅之
大阪府吹田市山田丘1番1号
- (72)発明者 中谷 和彦
大阪府吹田市山田丘1番1号
- 審査官 石井 裕美子
- (56)参考文献 HAGIHARA M; ET AL , SMALL MOLECULE MODULATES HAIRPIN STRUCTURES IN CAG TRINUCLEOTIDE REPEATS , CHEMBIOCHEM , 2011年 , VOL:12 , PAGE(S):1686 - 1689 , <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201100260>
阪田彬裕, 外7名, 「CAGリピートDNAおよびRNAを標的としたナフチリジン - アザキノロン誘導体の開発と転写および翻訳への阻害効果」, 日本薬学会第136年会要旨集(2016 March), 28S-am01S
JINXING LI; ET AL , NAPHTHYRIDINE-BENZOAZAQUINOLONE: EVALUATION OF A TRICYCLIC SYSTEM FOR THE BINDING 以下備考, CHEMISTRY AN ASIAN JOURNAL , 2016年07月05日 , VOL:11, NR:13 , PAGE(S):1971 - 1981 , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27146450> , TO (CAG)N REPEAT DNA AND RNA
中谷和彦, 外3名, 「CAG リピート結合リガンドの発見に基づいたリピート伸長抑制」, ゲノム特定領域最終報告書 2005年度
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0
A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0
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 / 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)