

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-515819

(P2017-515819A)

(43) 公表日 平成29年6月15日(2017.6.15)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 45/00 (2006.01)	A 61 K 45/00	2 G 04 5
A61K 38/00 (2006.01)	A 61 K 37/02	4 B 06 3
A61K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00	4 C 08 4
A61K 31/7088 (2006.01)	A 61 K 31/7088	4 C 08 6
A61K 31/7105 (2006.01)	A 61 K 31/7105	4 C 08 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 57 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2016-566652 (P2016-566652)	(71) 出願人 508241200
(86) (22) 出願日	平成27年5月7日 (2015.5.7)	サンガモ セラピューティクス, インコ ーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成28年12月5日 (2016.12.5)	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 リッ チモンド カナル ブールバード 501 ポイント リッチモンド テク センタ ー スト エ-100
(86) 國際出願番号	PCT/US2015/029748	(71) 出願人 511027183
(87) 國際公開番号	W02015/171932	シーエイチディーアイ ファウンデーショ ン, インコーポレーテッド
(87) 國際公開日	平成27年11月12日 (2015.11.12)	アメリカ合衆国 10001 ニューヨー ク州, ニューヨーク, スイート 200, セブンス アベニュー 350
(31) 優先権主張番号	61/990,521	(74) 代理人 100078282
(32) 優先日	平成26年5月8日 (2014.5.8)	弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国(US)	最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	62/051,724	
(32) 優先日	平成26年9月17日 (2014.9.17)	
(33) 優先権主張国	米国(US)	

(54) 【発明の名称】ハンチントン病を処置するための方法および組成物

(57) 【要約】

ハンチントン病 (HD) を処置または予防するための方法および組成物が開示される。具体的には、ハンチントン (Htt) 凝集体を低減および/もしくは排除する、運動障害を緩和する、細胞活性 (例えば、ATP活性) を増加させる、ならびに/またはHDを有する被験体においてアポトーシスを低減させるための方法および組成物が提供され、本方法は、被験体に変異体 Htt (mHtt) 対立遺伝子の抑制因子を投与することを含む。被験体においてmHttを検出することを含む、HDを診断するおよび/または該疾患進行を監視する方法がさらに開示される。

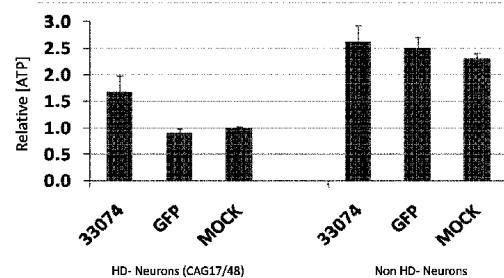


FIGURE 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ハンチントン病（H D）を有する被験体においてニューロンを改変する方法であって、該ニューロンが改変されるように、該被験体に変異体 H t t (m H t t) 対立遺伝子の抑制因子を投与することを含む、方法。

【請求項 2】

前記ニューロンは、H Dニューロンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記改変は、前記ニューロンにおける H t t の凝集を低減すること；該ニューロンにおけるエネルギー代謝を増加させること；該ニューロンにおけるアポトーシスに対する感受性を低減すること、およびそれらの組合せを含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

細胞内の A T P レベルが増加する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

H Dニューロンにおける H t t 凝集体の形成を防止または低減する方法であって、請求項 3 に記載の方法に従って該 H Dニューロンを改変することを含む、方法。

【請求項 6】

H Dニューロンにおける細胞活性を増加させる方法であって、請求項 3 に記載の方法に従って該 H Dニューロンを改変することを含む、方法。

20

【請求項 7】

H Dニューロンにおけるアポトーシスを低減する方法であって、請求項 3 に記載の方法に従って該 H Dニューロンを改変することを含む、方法。

【請求項 8】

運動障害を低減することを必要とする H D 被験体において運動障害を低減するための方法であって、請求項 2 に記載の方法に従って該被験体における H Dニューロンを改変することを含む、方法。

【請求項 9】

前記運動障害は、クラスピングを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記被験体における m H t t レベルを検出することをさらに含む、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 11】

前記 m H t t レベルは、脳脊髄液（C S F）中で検出される、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 12】

前記抑制因子は、ジンクフィンガータンパク質転写因子（Z F）- T F）、T A L - エフェクタードメイン転写因子（T A L E - T F）、C R I S P R / C a s - 転写因子、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（Z F N）、T A L - エフェクタードメインヌクレアーゼ（T A L E N）またはC R I S P R / C a s ヌクレアーゼ系を含む、請求項 1 から 1 1 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 13】

前記抑制因子は、タンパク質として、またはポリヌクレオチドとして前記ニューロンに送達される、請求項 1 から 1 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

前記ポリヌクレオチドは、m R N A、またはプラスミドおよびウイルスベクターからなる群より選択される発現構築物を含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 15】

前記抑制因子は、m H t t 発現を少なくとも 8 5 % 低減させる、請求項 1 から 1 4 のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 16】

Htt 抑制因子、およびmHtt タンパク質のレベルを検出および/または定量するための試薬を含むキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】****関連出願の相互参照**

本出願は、2014年5月8日に出願された米国仮出願第61/990,521号および2014年9月17日に出願された米国仮出願第62/051,724号の利益を主張し、それらの開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0002】**技術分野**

本開示は、ハンチントン病のための診断および治療の分野のものである。

【背景技術】**【0003】****背景**

ハンチントン舞蹈病としても知られる、ハンチントン病 (HD) は、進行性の運動、認知、および精神的混乱障害である。この疾患の平均発症年齢は、35~44歳であるが、症例の約10%においては、21歳より前に発症し、この疾患の診断後の平均寿命は、15~18年である。有病率は、西ヨーロッパ家系で100,000人中約3~7人である。

20

【0004】

ハンチントン病は、1990年代初期に最初に特徴付けられたトリヌクレオチド反復伸長障害の一例である (Di Prospero and Fischbeck (2005) *Nature Reviews Genetics* 6: 756-765を参照されたい)。これらの障害は、3つのヌクレオチドの組の不安定な反復の局所的伸長を伴い、その伸長した反復が存在する遺伝子の機能喪失、毒性機能獲得、またはそれらの両方をもたらし得る。トリヌクレオチド反復は、非コードおよびコード遺伝子領域を含む、遺伝子のいずれの部分にも位置し得る。コード領域内に位置する反復は、典型的に、反復したグルタミンコードトリプレット (CAG) またはアラニンコードトリプレット (CGA) のいずれかを伴う。非コード配列内の伸長した反復領域は、遺伝子の異常な発現につながり得る一方で、コード領域内の伸長した反復 (コドン反復障害としても知られる) は、ミスワールディングおよびタンパク質凝集を引き起こすことがある。異常なタンパク質に関連する病態生理学の正確な原因是、知られていないことが多い。典型的に、トリヌクレオチド伸長の対象となる野生型遺伝子において、これらの領域は、正常な集団において可変数の反復配列を含有するが、罹患した集団においては、反復の回数は、反復の回数の倍加から対数桁の増加まで増加し得る。HDにおいて、反復は、巨大細胞質タンパク質ハンチントン (Htt) のN末端コード領域内に挿入される。正常なHtt 対立遺伝子は、15~20回CAG反復を含有する一方で、35回以上の反復を含有する対立遺伝子は、HDを引き起こす可能性がある対立遺伝子と見なされ、疾患を発症する危険性を付与し得る。

30

36~39回反復を含有する対立遺伝子は、不完全に浸透性であると見なされ、それらの対立遺伝子を内部に持つそれらの個人は、疾患を発症することもしないこともある（または後年に症状を発症することがある）一方で、40回以上の反復を含有する対立遺伝子は、完全に浸透性であると見なされる。実際、これほど多くの反復を有するHD対立遺伝子を持つ無症候性の人物は、何ら報告されてこなかった。若年発症型HD (21歳未満) を有する個人はしばしば、60回以上のCAG反復を有することが見出されている。CAG反復の増加に加えて、HDが反復配列内で+1および+2フレームシフトを伴い得、その結果、その領域が、ポリ-グルタミンではなくポリ-セリンポリペプチド (+1フレームシフトの場合にはAGC反復によってコードされる) トランクをコードすることになることもまた示してきた (Davies and Rubinsztein (2006) *J*

40

50

urnal of Medical Genetics 43 : 893 - 896)。

【0005】

HDにおいて、変異体 Htt 対立遺伝子は、通常、優性形質として一方の親から遺伝する。HD患者から生まれた子供は、他方の親がその障害に罹患していなかった場合、疾患を発症する 50% の可能性を有する。場合によっては、親は、中間の HD 対立遺伝子を有し、無症候性であり得るが、反復伸長に起因して、その子供は疾患を呈する。加えて、HD 対立遺伝子はまた、精子形成中の反復領域の不安定な性質に起因して重症度の増加または発症年齢の低下が数世代にわたって観察される、表現促進として知られる現象も表示し得る。

【0006】

さらに、Htt におけるトリヌクレオチド伸長は、線条体における中型有棘細胞の アミノ酸 (GABA) 投射ニューロンのニューロン欠損につながり、このニューロン欠損は、新皮質においても生じる。エンケファリンを含有し、かつ淡蒼球外節に投射する中型有棘ニューロンは、P 物質を含有し、かつ淡蒼球内節に投射するニューロンよりも影響を受ける。ハンチントン病を有する人々において侵される他の脳領域には、黒質、皮層 3、5、および 6、海馬の CA1 領域、頭頂葉における角回、小脳のプルキンエ細胞、視床下部の外側隆起核、ならびに視床の正中中心核 - 束傍核複合体 (centromedial parafascicular) (Walker (2007) Lancet 369 : 218 - 228) が含まれる。

【0007】

正常な Htt タンパク質の役割は、十分に理解されていないが、それはニューロン形成、アポトーシス細胞死、および小胞輸送に関与し得る。加えて、野生型 Htt が、線条体ニューロンの生存促進因子である、脳由来神経栄養因子 (BDNF) の産生を刺激するという証拠が存在する。HD の進行が HD のマウスモデルにおいて BDNF 発現の減少と関すること (Zuccato et al (2005) Pharmaceutical Research 52 (2) : 133 - 139)、およびアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター媒介性遺伝子送達を介した BDNF またはグリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) のいずれかの送達が HD のマウスモデルにおいて線条体 (striatal) ニューロンを保護し得ることが示されてきた (Kells et al, (2004) Molecular Therapy 9 (5) : 682 - 688)。

【0008】

HDに対する診断および処置の選択肢は、現在のところ非常に限定されている。診断に関して、変更された (変異体) Htt (mHTT) レベルは、疾患負荷スコアおよび疾患進行に伴う可溶性 mHTT 種の濃度増加と有意に関連している。しかしながら、mHTT はその存在量が少ないとことにより、患者の CNS での定量が難しく、そのためインビオの HD の神経病理生物学 (neuropathobiology) における役割の研究が制限され、HTT 低下薬による標的への関与の実証も不可能になっている。例えば、Wildら (2014 年) J Neurol Neurosurg Psychiatry 85 卷 : e4 を参照されたい。

処置に関して、化合物ゲルダナマイシンによるシャペロニンの過剰発現または熱ショック応答の誘導等の、伸長したポリ - グルタミントラクトを通じて生じるタンパク質凝集に関連する毒性を予防するように設計された、いくつかの可能性のある手法は、インビオモデルにおいてこれらの毒性の低減を示してきた。他の治療は、疾患の臨床徴候におけるアポトーシスの役割を標的とする。例えば、一方の親が HD 対立遺伝子を含有し、他方の親がカスパー 1 の優性阻害の対立遺伝子を有した場合のマウスの対合の子孫における動物モデルで、カスパー活性の遮断を介した疾患症状の緩徐化が示してきた。さらに、カスパーによる変異 HD Htt の切断は、疾患の病原性において役割を果たし得る。カスパー - 6 耐性変異体 Htt を担持するトランスジェニックマウスは、カスパー非耐性変異体 Htt 対立遺伝子を担持するマウスと比較して、正常なニューロン機能を維持することが見出され、線条体神経変性を発症しなかった (Graham et al (2006) Cell 125 : 1179 - 1191 を参照されたい)。アポトーシス経路の

10

20

30

40

50

メンバーを標的とする分子もまた、総体症状に対する緩徐化効果を有することが示ってきた。例えば、両方ともカスパーゼ活性を阻害する、化合物 z V A D - f m k およびミノサイクリンは、マウスにおいて疾患徵候を緩徐化することが示してきた。薬物レマセミドもまた、この化合物がN D M A 受容体への変異体 H t t の結合を阻止して、神経細胞への毒性作用の行使を阻止すると考えられたため、ヒトの小規模なH D 治験において使用してきた。しかしながら、これらの治験において、ニューロン機能の統計的に有意な改善は、何ら観察されなかった。加えて、ハンチントン研究グループは、補酵素Qを使用して無作為二重盲検試験を行った。補酵素Q 1 0 で治療された患者の間でより緩徐な疾患進行の傾向が観察されたものの、総計の機能的能力の低下速度における有意な変化は何ら存在しなかった。(Di Prospero and Fischbeck(同書))。

ジンクフィンガータンパク質(「Z F P」)由来のD N A 結合ドメイン、T A L - エフェクタードメイン(「T A L E」)を含む組換え転写因子およびC R I S P R / C a s 転写因子系は、内因性遺伝子の遺伝子発現を制御する能力を有する(例えば、米国特許第8,586,526号；同第6,534,261号；同第6,599,692号；同第6,503,717号；同第6,689,558号；同第7,067,317号；同第7,262,054号；Perez-Pineraら(2013年)Nature Methods 10巻：973～976頁；Platekら(2014年)Plant Biotechnology J. doi:10.1111/pbi.12284を参照されたい)。ジンクフィンガータンパク質を含有するこれらの操作された転写因子を使用した臨床試験は、これらの新規の転写因子が様々な状態を処置できることを示してきた。(例えば、Yuら(2006年)FASEB J. 20巻：479～481頁を参照されたい)。加えて、ジンクフィンガータンパク質(「Z F P」)由来のD N A 結合ドメイン、T A L - エフェクタードメイン(「T A L E」)を含む人工ヌクレアーゼ、T t a g o およびC R I S P R / C a s またはT t a g o ヌクレアーゼ系は非相同末端結合(N H E J : n o n - h o m o l o g o u s e n d j o i n i n g)の後の相同組換え修復(H D R : h o m o l o g y d i r e c t e d r e p a i r)、および/または非相同末端結合(N H E J)によって駆動するプロセスにおける末端捕捉による相同組換え修復のいずれかを含む、ヌクレアーゼが媒介する遺伝子修飾を介して内因性遺伝子の遺伝子発現を修飾する能力を有する。例えば、8,623,618；8,034,598；8,586,526；6,534,261；6,599,692；6,503,717；6,689,558；7,067,317；7,262,054；7,888,121；7,972,854；7,914,796；7,951,925；8,110,379；8,409,861；米国特許公開第20030232410号；同第20050208489号；同第20050026157号；同第20060063231号；同第20080159996号；同第201000218264号；同第20120017290号；同第20110265198号；同第20130137104号；同第20130122591号；同第20130177983号；同第20130177960号および同第20150056705号(それらの開示は、すべての目的でそれらの全体が参考として組み込まれる)を参照されたい。したがってこれらの方法は、非相同末端結合(N H E J)等のエラーを生じるプロセスによる切断の修復または修復錆型を使用した修復(相同組換え修復またはH D R)が遺伝子のノックアウトまたは目的の配列の挿入(標的化組み込み)を引き起こし得るように、標的D N A 配列中で二本鎖切断(D S B)またはニックを誘導するために操作された切断系の使用を伴うことが多い。外部から供給された修復錆型(例えば「ドナー」または「導入遺伝子」)の非存在下における二本鎖切断の導入は、細胞のN H E J 経路によって導入された変異(「インデル」として公知の挿入および/または欠失)を介した標的化遺伝子の不活性化のために一般的に使用されている。例えば、米国特許公開第20110082093号は、H t t に標的化された特異的なジンクフィンガータンパク質を開示しており、米国特許公開第20130253040号は、H t t 等のH D 対立遺伝子の発現を調節するD N A 結合タンパク質に関する。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

20

30

40

50

【0009】

【特許文献1】米国特許第8,586,526号明細書
 【特許文献2】米国特許第6,534,261号明細書
 【特許文献3】米国特許第6,599,692号明細書
 【特許文献4】米国特許第6,503,717号明細書
 【特許文献5】米国特許第6,689,558号明細書
 【特許文献6】米国特許第7,067,317号明細書
 【特許文献7】米国特許第7,262,054号明細書
 【特許文献8】米国特許出願公開第2003/0232410号明細書
 【特許文献9】米国特許出願公開第2005/0208489号明細書
 【特許文献10】米国特許出願公開第2005/0026157号明細書
 【特許文献11】米国特許出願公開第2006/0063231号明細書
 【特許文献12】米国特許出願公開第2008/0159996号明細書
 【特許文献13】米国特許出願公開第2010/00218264号明細書
 【特許文献14】米国特許出願公開第2012/0017290号明細書
 【特許文献15】米国特許出願公開第2011/0265198号明細書
 【特許文献16】米国特許出願公開第2013/0137104号明細書
 【特許文献17】米国特許出願公開第2013/0122591号明細書
 【特許文献18】米国特許出願公開第2013/0177983号明細書
 【特許文献19】米国特許出願公開第2013/0177960号明細書
 【特許文献20】米国特許出願公開第2015/0056705号明細書
 【特許文献21】米国特許出願公開第2011/0082093号明細書
 【特許文献22】米国特許出願公開第2013/0253040号明細書

10

20

20

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Di Prospero and Fischbeck (2005) Nature Reviews Genetics 6: 756-765
 【非特許文献2】Davies and Rubinsztein (2006) Journal of Medical Genetics 43: 893-896
 【非特許文献3】Walker (2007) Lancet 369: 218-228
 【非特許文献4】Zuccato et al (2005) Pharmacological Research 52 (2): 133-139
 【非特許文献5】Kellis et al, (2004) Molecular Therapy 9 (5): 682-688。
 【非特許文献6】Wildら (2014年) J Neurol Neurosurg Psychiatry 85巻: e4
 【非特許文献7】Graham et al (2006) Cell 125: 1179-1191
 【非特許文献8】Perez-Pineiraら (2013年) Nature Methods 10巻: 973~976頁
 【非特許文献9】Plattekら (2014年) Plant Biotechnology J. doi: 10.1111/pbi.12284
 【非特許文献10】Yuら (2006年) FASEB J. 20巻: 479~481頁

30

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

しかしながら、疾患進行を監視するための、HDの神経病理生物学の理解を増すための、および疾患を改変するHD療法を評価するための、mHTTの検出を含むハンチントン病の診断、研究、処置および/または予防のための方法が未だ求められている。

【課題を解決するための手段】

50

【0012】

ハンチントン病を診断および／または処置するための方法および組成物が本明細書で開示される。特に、Htt凝集体を検出する、低減する、および／もしくは排除する、運動障害を緩和する、細胞活性（例えば、ATP活性）を増加させる、ならびに／またはHDを有する被験体においてアポトーシスを低減させるための方法および組成物が本明細書で提供される。

【0013】

したがって、一態様において、HDを有する被験体においてニューロンを改変する方法であって、ニューロンが改変されるように、被験体に変異体Htt対立遺伝子の抑制因子を投与することを含む、方法が本明細書に記載される。ある特定の実施形態において、ニューロンは、変異体Htt対立遺伝子を含むニューロン、および／または増加した量の細胞内で凝集したHttを含むニューロン（「HDニューロン」）である。ある特定の実施形態において、改変は、ニューロン（例えば、HDニューロン）におけるHttの凝集を低減すること；例えば細胞内のATPレベルを増加させることによって、ニューロン（例えば、HDニューロン）のエネルギー代謝を増加させること；および／またはニューロン（例えば、HDニューロン）におけるアポトーシスに対する感受性を低減することを含む。ある特定の実施形態において、被験体は、哺乳類である。

10

【0014】

したがって、他の態様において、HDを有する被験体のHDニューロンにおいてHtt凝集体の形成を防止および／または低減する方法であって、被験体に変異体Htt対立遺伝子の抑制因子を投与することを含む、方法が本明細書に記載される。

20

【0015】

他の態様において、ニューロン（例えば、HDニューロン）における細胞活性（例えば、ATP活性）を増加させる方法であって、ニューロンに変異体Htt対立遺伝子の抑制因子を投与することを含む、方法が本明細書に記載される。

【0016】

他の態様において、ニューロン（例えば、HDニューロン）におけるアポトーシスを低減する方法であって、ニューロンに変異体Htt対立遺伝子の抑制因子を投与することを含む、方法が本明細書に記載される。

30

【0017】

別の態様において、運動障害（例えば、クラスピング（capping））の低減を必要とするHD被験体に変異体Htt対立遺伝子の抑制因子を投与することによって、それを必要とする該被験体において運動障害（例えば、クラスピング）を低減するための方法が本明細書に記載される。

40

【0018】

さらに別の態様において、治療に応答して（例えば、本明細書に記載されるHtt抑制因子の投与に応答して）mHttを検出することを含む、被験体においてmHttを（例えば、CSF中で）検出するための方法が本明細書に記載される。ある特定の実施形態において、検出することは、被験体におけるmHttの量を定量することを含む。本明細書に記載される検出方法のいずれも、HDの診断のために使用することができ、および／またはmHTTレベルが疾患負荷スコアと有意に関連しており、疾患が進行するにつれてmHTTの濃度レベルが増加するため、疾患進行を監視するために使用することができる。さらに、被験体においてmHttを検出する（例えば、定量する）方法のいずれも、HDの神経病理生物学を評価する方法、および／または疾患を改変するHD療法の有効性を評価するための方法で使用することができる。

【0019】

本明細書に記載される方法のいずれにおいても、変異体Htt対立遺伝子の抑制因子は、ZFP-TF、例えば、変異体Htt対立遺伝子に特異的に結合するZFPと転写抑制ドメイン（例えば、KOX、Krab等）とを含む融合タンパク質であり得る。他の実施形態において、変異体Htt対立遺伝子の抑制因子は、TAL-E-TF、例えば変異体H

50

t t 対立遺伝子に特異的に結合する T A L E ポリペプチドと転写抑制ドメイン（例えば、K O X、K R A B 等）とを含む融合タンパク質であり得る。一部の実施形態において、変異体 H t t 対立遺伝子抑制因子は、C a s タンパク質がD N A を切断しないようにC a s タンパク質中のヌクレアーゼドメインが不活性化されているC R I S P R / C a s - T F である。結果生じるC a s R N A ガイドD N A 結合ドメインは転写抑制因子（例えばK O X、K R A B 等）と融合して、変異体 H t t 対立遺伝子を抑制する。依然としてさらなる実施形態において、抑制因子は、変異体 H t t 対立遺伝子を切断してそれを不活性化することにより変異体 H t t 対立遺伝子を抑制するヌクレアーゼ（例えば、Z F N、T A L E N および／またはC R I S P R / C a s 系）を含んでもよい。ある特定の実施形態において、ヌクレアーゼは、ヌクレアーゼによる切断の後の非相同末端結合（N H E J）を介して、挿入および／または欠失（「インデル」）を導入する。他の実施形態において、ヌクレアーゼは、ドナー配列を導入し（相同または非相同組換え方法（h o m o l o g y o r n o n - h o m o l o g y d i r e c t e d m e t h o d s ）によって）、そこでドナーの組み込みが、変異体 H t t 対立遺伝子を不活性化する。

10

【0020】

本明細書に記載される方法のいずれにおいても、抑制因子は、タンパク質、ポリヌクレオチド、またはタンパク質およびポリヌクレオチドの任意の組合せとして、ニューロン（例えば、H D ニューロン）に送達されてもよい。ある特定の実施形態において、抑制因子（複数可）は、発現構築物、例えばプラスミド、またはウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター、アデノウイルス（A d ）ベクター、アデノ隨伴ウイルス（A A V ）ベクター等）を使用して送達される。他の実施形態において、抑制因子は、m R N A として送達される。他の実施形態において、抑制因子（複数可）は、本明細書に記載される発現構築物のいずれか、例えばある発現構築物上の1つの抑制因子（またはその部分）と別の発現構築物上の1つの抑制因子（またはその部分）との組合せを使用して送達される。

20

【0021】

さらに、本明細書に記載される方法のいずれにおいても、抑制因子は、所望の作用を提供する任意の濃度（用量）で送達され得る。ある特定の実施形態において、抑制因子は、レンチウイルスベクターを使用して、2 5 0 から 1 , 0 0 0 の間（またはその間の任意の値）のM O I で送達される。他の実施形態において、抑制因子は、プラスミドベクターを使用して、細胞 1 0 0 , 0 0 0 個当たり 1 5 0 ~ 1 , 5 0 0 n g （またはその間の任意の値）で送達される。依然としてさらなる実施形態において、抑制因子は、アデノ隨伴ウイルスベクターを使用して、細胞 1 個当たり 1 0 , 0 0 0 ~ 5 0 0 , 0 0 0 個のベクターゲノム（またはその間の任意の値）で送達される。他の実施形態において、抑制因子は、m R N A として、細胞 1 0 0 , 0 0 0 個当たり 1 5 0 ~ 1 , 5 0 0 n g （またはその間の任意の値）で送達される。

30

【0022】

本明細書に記載される方法のいずれにおいても、本方法は、被験体の1つまたは複数のH D ニューロンにおいて、約85%またはそれよりも多く、約90%またはそれよりも多く、約92%またはそれよりも多く、または約95%またはそれよりも多くの変異体 H t t 対立遺伝子の抑制をもたらすことができる。

40

【0023】

さらなる態様において、本明細書に記載される発明は、1種または複数のH t t 調節転写因子、例えば、ジンクフィンガータンパク質（Z F P T F ）、T A L E (T A L E - T F) 、およびC R I S P R / C a s - T F の1種または複数を含むH t t 調節転写因子、例えば、Z F P - T F 、T A L E - T F またはC R I S P R / C a s - T F を含む。ある特定の実施形態において、H t t 調節転写因子は、被験体の1つまたは複数のH D ニューロンにおいて変異体 H t t 対立遺伝子の発現を抑制することができる。抑制は、被験体の1つまたは複数のH D ニューロンにおける、被験体の未処置（野生型）ニューロンと比較した場合の、約85%またはそれよりも多く、約90%またはそれよりも多く、約92%またはそれよりも多く、または約95%またはそれよりも多くの変異体 H t t 対立遺伝

50

子の抑制であり得る。ある特定の実施形態において、H_tt調節転写因子は、本明細書に記載される方法の1つまたは複数を達成するのに使用することができる。

【0024】

また、H_tt調節因子（例えば、抑制因子）、ならびに／または本明細書に記載されるH_tt調節因子の構成要素を含むおよび／もしくは本明細書に記載されるH_tt調節因子（またはその構成要素）をコードするポリヌクレオチドの1つまたは複数を含むキットも提供される。キットは、細胞（例えば、ニューロン）、試薬（例えば、例えばCSF中のmH_ttタンパク質を検出および／または定量するための）、および／または本明細書に記載される方法を含む使用のための指示をさらに含んでもよい。

【0025】

これらのおよび他の態様は、本開示を全体として考慮すると、当業者に容易に明らかとなろう。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1は、HDニューロン（示された通り3つの左側のバー）および非HDニューロン（示された通り3つの右側のバー）における、示された構築物を該ニューロンに投与した後の、相対的な細胞内のATPレベルを描写するグラフである。「33074」は、転写抑制ドメイン（K0X）に融合したZFP33074（表1A、変異体H_ttに特異的である）、加えてGFPコード配列を含むZFP-TF抑制因子を指し、「GFP」は、GFPのみをコードする（ZFP-TFはコードしない）構築物を指し、「mock」は、コード配列を有さない構築物を指す。

【0027】

【図2】図2は、TUNELアッセイによって決定された、HDニューロン（示された通り3つの左側のバー）および非HDニューロン（示された通り3つの右側のバー）における、示された構築物を該ニューロンに投与した後（図1を参照）の、アポトーシス細胞の百分率を描写するグラフである。

【0028】

【図3A-H】図3A～3Kは、H_tt変異体対立遺伝子のZFP-TF抑制因子で処置した後のQ175マウスにおける変異体H_tt凝集の防止を描写する。図3A～3Hは、ZFP-TF発現構築物で処置したマウスから得られた脳薄片の免疫組織化学的分析の代表的な画像を示す。図3A～3Dは、核のDNAと、FLAGエピトープタグ（これは、ZFP-TFの存在を示す）のための抗体とを標識する4'，6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）で染色された画像を示す。ZFP-TFは、それが投与される側（同側）にのみ存在する。図3E～3Hは、変異体H_tt凝集体に向けられた抗体（mEM48）で染色した後の代表的な画像を示す。注射を受けなかった反対側の線条体では、変異体H_tt凝集がmEM48抗体によって容易に検出されたが、それと比較して、注射を介してZFP-TF発現構築物を受けた同側の線条体では、非常に低いレベルの変異体H_tt凝集が観察された。図3Iは、示された構築物を有する注射されていない反対側の線条体における細胞1個当たりの凝集体数に正規化した、同側の線条体における細胞1個当たりの核のH_tt凝集体数（FLAG（+）およびGFP（+）細胞に関して定量した場合）を示すグラフである。図3Jは、反対側の線条体からのニューロンの強度に正規化した、示された構築物を受け入れている細胞におけるH_tt凝集体に関する核のmEM48染色の強度を示すグラフである。図3Kは、反対側の線条体のニューロンにおける密度に正規化した、ZFP-TF抑制因子またはGFPを発現する細胞における核周囲の変異体H_tt凝集体の密度を示すグラフである。図3I～3Kにおいて、「GFP」は、GFPをコードするが、ZFP-TF H_tt抑制因子をコードする構築物を指し、「30640」および「30645」は、注射された構築物で使用された具体的なZFP設計物を指す（表1）。クラスカル-ウォリス検定およびダンの多重比較（Dunn's multiple comparison）によって統計的分析を行った；*p<0.05；**p<0.01、***p<0.001；データは、平均値+SEMを伴う棒グラフ

10

20

30

40

50

として表示される。

【図3 I - K】図3 A ~ 3 Kは、H_tt変異体対立遺伝子のZFP-TF抑制因子で処置した後のQ175マウスにおける変異体H_tt凝集の防止を描写する。図3 A ~ 3 Hは、ZFP-TF発現構築物で処置したマウスから得られた脳薄片の免疫組織化学的分析の代表的な画像を示す。図3 A ~ 3 Dは、核のDNAと、FLAGエピトープタグ（これは、ZFP-TFの存在を示す）のための抗体とを標識する4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）で染色された画像を示す。ZFP-TFは、それが投与される側（同側）にのみ存在する。図3 E ~ 3 Hは、変異体H_tt凝集体に向けられた抗体（mEM48）で染色した後の代表的な画像を示す。注射を受けなかった反対側の線条体では、変異体H_tt凝集がmEM48抗体によって容易に検出されたが、それと比較して、注射を介してZFP-TF発現構築物を受けた同側の線条体では、非常に低いレベルの変異体H_tt凝集が観察された。図3 Iは、示された構築物を有する注射されていない反対側の線条体における細胞1個当たりの凝集体数に正規化した、同側の線条体における細胞1個当たりの核のH_tt凝集体数（FLAG (+) およびGFP (+) 細胞に関して定量した場合）を示すグラフである。図3 Jは、反対側の線条体からのニューロンの強度に正規化した、示された構築物を受け入れている細胞におけるH_tt凝集体に関する核のmEM48染色の強度を示すグラフである。図3 Kは、反対側の線条体のニューロンにおける密度に正規化した、ZFP-TF抑制因子またはGFPを発現する細胞における核周囲の変異体H_tt凝集体の密度を示すグラフである。図3 I ~ 3 Kにおいて、「GFP」は、GFPをコードするが、ZFP-TF H_tt抑制因子をコードする構築物を指し、「30640」および「30645」は、注射された構築物で使用された具体的なZFP設計物を指す（表1）。クラスカル-ウォリス検定およびダンの多重比較（Dunn's multiple comparison）によって統計的分析を行った；* p < 0.05；** p < 0.01、*** p < 0.001；データは、平均値 + SEMを伴う棒グラフとして表示される。

【0029】

【図4 A】図4 A ~ 4 Dは、H_tt変異体対立遺伝子のZFP-TF抑制因子で処置した後のQ175マウスにおける変異体H_tt凝集の逆転を描写する。図4 Aは、反対側および同側の線条体においてDARPP-32（線条体特異的なタンパク質）および抗H_tt凝集体抗体であるmEM48で染色されたZFP-TFおよび対照動物の脳切片の代表的な画像を示す。図4 Bは、示された構築物を有する注射されていない反対側の線条体における細胞1個当たりの凝集体の数に正規化した、同側の線条体における細胞1個当たりの核のH_tt凝集体数（FLAG (+) およびGFP (+) 細胞に関して定量した場合）を示すグラフである。図4 Cは、反対側の線条体からのニューロンの強度に正規化した、示された構築物を受け入れている細胞におけるH_tt凝集体に関する核のmEM48染色の強度を示すグラフである。図4 Dは、反対側の線条体のニューロンにおける密度に正規化した、ZFP-TF抑制因子またはGFPを発現する細胞における核周囲の変異体H_tt凝集体の密度を示すグラフである。図4 B ~ 4 Dにおいて、「GFP」は、GFPをコードするが、ZFP-TF H_tt抑制因子をコードする構築物を指し、「GFP-2A-30640」および「GFP-2A-30645」は、GFPおよび注射された構築物で使用された具体的なZFP設計物（表1）をコードする構築物を指す。クラスカル-ウォリス検定およびダンの多重比較によって統計的分析を行った；* p < 0.05；** p < 0.01、*** p < 0.001；データは、平均値 + SEMを伴う棒グラフとして表示される。

【図4 B - D】図4 A ~ 4 Dは、H_tt変異体対立遺伝子のZFP-TF抑制因子で処置した後のQ175マウスにおける変異体H_tt凝集の逆転を描写する。図4 Aは、反対側および同側の線条体においてDARPP-32（線条体特異的なタンパク質）および抗H_tt凝集体抗体であるmEM48で染色されたZFP-TFおよび対照動物の脳切片の代表的な画像を示す。図4 Bは、示された構築物を有する注射されていない反対側の線条体における細胞1個当たりの凝集体の数に正規化した、同側の線条体における細胞1個当た

10

20

30

40

50

りの核の H t t 凝集体数 (F L A G (+) および G F P (+) 細胞に関して定量した場合) を示すグラフである。図 4 C は、反対側の線条体からのニューロンの強度に正規化した、示された構築物を受け入れている細胞における H t t 凝集体に関する核の m E M 4 8 染色の強度を示すグラフである。図 4 D は、反対側の線条体のニューロンにおける密度に正規化した、 Z F P - T F 抑制因子または G F P を発現する細胞における核周囲の変異体 H t t 凝集体の密度を示すグラフである。図 4 B ~ 4 D において、「 G F P 」は、 G F P をコードするが、 Z F P - T F H t t 抑制因子をコードする構築物を指し、「 G F P - 2 A - 3 0 6 4 0 」および「 G F P - 2 A - 3 0 6 4 5 」は、 G F P および注射された構築物で使用された具体的な Z F P 設計物 (表 1) をコードする構築物を指す。クラスカル - ウオリス検定およびダンの多重比較によって統計的分析を行った ; * p < 0 . 0 5 ; ** p < 0 . 0 1 、 *** p < 0 . 0 0 1 ; データは、平均値 + S E M を伴う棒グラフとして表示される。
10

【 0 0 3 0 】

【 図 5 A - C 】 図 5 A ~ 5 C は、 A A V - Z F P - 3 3 0 7 4 を注射した後の Q 1 7 5 マウスの線条体における変異体 H t t 凝集の防止を描写する。 A A V ベクターを 2 力月の月齢で線条体に送達し、 4 力月の月齢で分析を行った。図 5 A は、 A A V を形質導入した (G F P で標識された) 中型有棘ニューロン (M S N 、 D A R P P 3 2 抗体で標識された) における核の H t t 凝集体数を示すグラフである。図 5 B は、 A A V を形質導入した M S N における核外の変異体 H t t 凝集体の密度を示すグラフである。図 5 C は、 A A V を形質導入した M S N における H t t 凝集体を染色した核の m E M 4 8 抗体の強度を示すグラフである。「対照 A A V 」は、 G F P を発現する A A V ベクターを指し、「 Z F P 3 3 0 7 4 」は、自己切断 2 A ペプチドで連結された、 Z F P 3 3 0 7 4 と G F P の両方を発現する A A V ベクターを指す。データは、平均値 + / - S E M を伴うドットプロットとして表示される。対照に対するダンの事後検定によるクラスカル - ウオリスの検定を使用して統計的分析を行った ; *** = p < 0 . 0 0 1 。それぞれの群について、 n = 4 匹の動物を動物 1 匹当たり 6 つの切片を用いて定量に使用した。
20

【 0 0 3 1 】

【 図 6 A - C 】 図 6 A ~ 6 C は、 A A V - Z F P - 3 3 0 7 4 を注射した後の Q 1 7 5 マウスの線条体における変異体 H t t 凝集の低減を描写する。 A A V ベクターを 6 力月の月齢で線条体に送達し、 1 0 力月の月齢で分析を行った。図 6 A は、 A A V を形質導入した (G F P で標識された) 中型有棘ニューロン (M S N 、 D A R P P 3 2 抗体で標識された) における核の H t t 凝集体数を示すグラフである。図 6 B は、 A A V を形質導入した M S N における核外の変異体 H t t 凝集体の密度を示すグラフである。図 6 C は、 A A V を形質導入した M S N における H t t 凝集体を染色した核の m E M 4 8 抗体の強度を示すグラフである。「対照 A A V 」は、 G F P を発現する A A V ベクターを指し、「 Z F P 3 3 0 7 4 」は、自己切断 2 A ペプチドで連結された、 Z F P 3 3 0 7 4 と G F P の両方を発現する A A V ベクターを指す。「 Z F P D B D 」は、ジンクフィンガーの D N A 結合ドメイン (D B D) を欠失していることを除いて「 Z F P 3 3 0 7 4 」に類似した対照 A A V ベクターを指す。データは、平均値 + / - S E M を伴うドットプロットとして表示される。対照に対するダンの事後検定によるクラスカル - ウオリスの検定を使用して統計的分析を行った ; *** = p < 0 . 0 0 1 ; n . s . = 有意ではない。それぞれの群で、 n = 4 匹の動物を動物 1 匹当たり 6 つの切片で定量に使用した。
30

【 0 0 3 2 】

【 図 7 A - B 】 図 7 A および 7 B は、 A A V - Z F P - 3 3 0 7 4 を注射した後の Q 1 7 5 マウスの線条体における免疫染色による D A R P P 3 2 発現の増加を描写する。 A A V ベクターを 6 力月の月齢で線条体に送達し、 1 0 力月の月齢で分析を行った。図 7 A は、 D A R P P 3 2 発現が、 1 0 月齢の Q 1 7 5 マウスにおいて、同じ月齢の野生型マウスと比較して低減することを示す。図 7 B は、 Z F P 3 3 0 7 4 のための A A V ベクターまたは対照 A A V ベクターで処置された Q 1 7 5 の線条体における D A R P P 3 2 レベルを示す。「対照 A A V 」は、 G F P を発現する A A V ベクターを指し、「 Z F P 3 3 0 7 4 」
40

は、自己切断 2 A ペプチドで連結された、ZFP33074 と GFP の両方を発現する AAVベクターを指す。「ZFP DBD」は、ジンクフィンガーのDNA結合ドメイン(DBD)を欠失していることを除いて「ZFP33074」に類似した対照AAVベクターを指す。データは、平均値 + / - SEMを伴うドットプロットとして表示される。対照に対するダンの事後検定によるクラスカル・ウォリスの検定を使用して統計的分析を行った；* = p < 0.05、*** = p < 0.001；n.s. = 有意ではない。それぞれの群について、n = 4 匹の動物を動物 1 匹当たり 6 つの切片を用いて定量に使用した。

【発明を実施するための形態】

【0033】

詳細な説明

ハンチントン病(HD)を検出する、疾患進行を監視する、ハンチントン病を処置および/または予防するための組成物および方法が本明細書で開示される。特に、本明細書に記載される方法は、HDを有する被験体における脳(例えば、HDニューロン)を変更すること、それによってHDのための治療を提供することを可能にする。Htt調節転写因子、例えば、ジンクフィンガータンパク質(ZFP-TF)、TALE(TALE-TF)、またはCRISPR/Cas-TFを含むHtt調節転写因子、例えば、変異体Htt対立遺伝子の発現を抑制するZFP-TF、TALE-TFまたはCRISPR/Cas-TFを使用して、HD被験体におけるHDニューロンは、例えば、HDニューロンにおけるHttの凝集を低減することによって、HDニューロンのエネルギーを増加させることによって(例えば、ATPレベルを増加させることによって)、HDニューロンにおけるアポトーシスを低減することによって、および/またはHD被験体における運動障害を低減することによってHDの作用および/または症状が低減または排除されるように改変することができる。加えて、本明細書に記載される組成物および方法は、患者試料(例えば、CSF)でのHDの検出を可能にする。患者試料でmHttレベルを検出することは、HDの診断;mHttレベルに基づく疾患進行の監視;加えてHD治療の評価を可能にする。

10

20

30

40

【0034】

概要

本明細書に開示される方法の実践ならびに組成物の調製および使用は、別途指定されない限り、分子生物学、生化学、クロマチン構造および分析、計算化学、細胞培養、組換えDNA、ならびに当該分野の技術の範囲内である関連分野における従来の技術を用いる。これらの技術は、文献に完全に説明されている。例えば、Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989および第3版2001、Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987および定期改訂版、METHODS IN ENZYMOLOGYシリーズ、Academic Press, San Diego、Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998、METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P. M. Wasserman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999、ならびにMETHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P. B. Becker, ed.) Human Press, Totowa, 1999を参照されたい。

30

40

【0035】

定義

「核酸」、「ポリヌクレオチド」、および「オリゴヌクレオチド」という用語は、交換可能に使用され、線状または環状立体配座であり、かつ1本鎖または2本鎖形態のいずれ

50

かである、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド重合体を指す。本開示の目的のために、これらの用語は、重合体の長さに関して限定的であると解釈されるべきではない。この用語は、天然ヌクレオチドの既知の類似体、ならびに塩基部分、糖部分および／またはリン酸部分において修飾されるヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート骨格）を包含することができる。一般に、特定のヌクレオチドの類似体は、同じ塩基対形成特異性を有し、すなわち、Aの類似体は、Tと塩基対形成する。

【0036】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基の重合体を指すために交換可能に使用される。この用語はまた、1つ以上のアミノ酸が、対応する天然に存在するアミノ酸の化学的類似体または修飾誘導体である、アミノ酸重合体にも適用される。

10

【0037】

「結合」は、高分子間（例えば、タンパク質と核酸との間）の配列特異的で非共有結合的な相互作用を指す。相互作用が全体として配列特異的である限り、結合相互作用の全ての構成要素が配列特異的である必要はない（例えば、DNA骨格内のリン酸残基との接触）。かかる相互作用は、一般に、 $10^{-6} M^{-1}$ 以下の解離定数（ K_d ）によって特徴付けられる。「親和性」は、結合の強度を指し、すなわち、結合親和性の増加は、 K_d の低下と相関している。

【0038】

「結合タンパク質」は、別の分子に非共有結合的に結合することができるタンパク質である。結合タンパク質は、例えば、DNA分子（DNA結合タンパク質）、RNA分子（RNA結合タンパク質）、および／またはタンパク質分子（タンパク質結合タンパク質）に結合することができる。タンパク質結合タンパク質の場合、それは、それ自体に結合する（そしてホモ二量体、ホモ三量体等を形成する）ことができ、かつ／または、それは、異なるタンパク質（単数または複数）の1つ以上の分子に結合することができる。結合タンパク質は、1つより多くの種類の結合活性を有することができる。例えば、ジンクフィンガータンパク質は、DNA結合活性、RNA結合活性、およびタンパク質結合活性を有する。

20

【0039】

「ジンクフィンガーDNA結合タンパク質」（または結合ドメイン）は、亜鉛イオンの配位によってその構造が安定化される結合ドメイン内のアミノ酸配列の領域である1つ以上のジンクフィンガーを通じて配列特異的な様態でDNAに結合する、タンパク質またはより大きなタンパク質内のドメインである。ジンクフィンガーDNA結合タンパク質という用語は、しばしば、ジンクフィンガータンパク質またはZFPと省略される。

30

【0040】

「TALE DNA結合ドメイン」または「TALE」は、1つ以上のTALE反復ドメイン／単位を含むポリペプチドである。反復ドメインは、TALEの、その同族の標的DNA配列への結合に関与する。単一の「反復単位」（「反復」とも称される）は、典型的には33～35アミノ酸長であり、天然型TALEタンパク質内の他のTALE反復配列との少なくともある程度の配列相同意を示す。例えば、米国特許第8,586,526号を参照されたい。

40

【0041】

「TtAgo」は、遺伝子サイレンシングに関与すると考えられる原核アルゴノートタンパク質である。TtAgoは、細菌Thermusthermophilus由来である。例えば、Swartsら（2014年）Nature 507巻（7491号）：258～261頁、G. Shengら、（2013年）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111巻、652頁）を参照されたい。「TtAgo系」は全て必要な構成要素であり、例えばTtAgo酵素による切断のためのガイドDNAを含む。「組換え」は、2つのポリヌクレオチド間で遺伝情報を交換するプロセスを指し、非相同末端結合（NHEJ）および相同組換えによるドナー捕獲を含むが、これらに限定されない。本開示の目的のために、「相同組

50

換え（H R ）」は、例えば、相同性指向性の修復機構を介して細胞内の2本鎖切断の修復中に起こる、かかる交換の特殊な形態を指す。このプロセスは、ヌクレオチド配列相同性を必要とし、「標的」分子（すなわち、2本鎖切断を経験した分子）の鋳型修復のために「ドナー」分子を使用し、ドナーから標的への遺伝子情報の伝達をもたらすため、「非交差遺伝子変換」または「ショートトラクト遺伝子変換」として様々に知られている。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、かかる伝達は、切断された標的とドナーとの間に形成するヘテロ二重鎖DNAのミスマッチ修正、および／または、標的の一部になる遺伝子情報を再合成するためにドナーが使用される「合成依存鎖アニーリング」、および／または関連プロセスに関与し得る。かかる特殊なH R は、しばしば、ドナーポリヌクレオチドの配列の一部または全てが標的ポリヌクレオチドに組み込まれるように、標的分子の配列の改変をもたらす。

10

【0042】

ジンクフィンガー結合ドメインまたはTALE DNA結合ドメインは、例えば、天然型ジンクフィンガータンパク質の認識ヘリックス領域の操作（1つ以上のアミノ酸の改変）を介して、またはTALEタンパク質のRVDの操作によって、所定のヌクレオチド配列に結合するように「操作」（engineer）することができる。したがって、操作されたジンクフィンガータンパク質またはTALEは、非天然型であるタンパク質である。ジンクフィンガータンパク質またはTALEを操作するための方法の非限定的な例は、設計および選択である。「設計」されたジンクフィンガータンパク質またはTALEは、その設計／組成が、主として合理的基準によってもたらされる、天然には生じないタンパク質である。設計のための合理的基準は、置換規則の適用、ならびに既存のZFP設計および結合データの情報を格納するデータベース内で情報を処理するためのコンピュータアルゴリズムの適用を含む。「選択された」ジンクフィンガータンパク質またはTALEは、その產生が、主としてファージディスプレイ、相互作用トラップ、またはハイブリッド選択等の実験プロセスからもたらされる、天然には見出されないタンパク質である。例えば、米国特許第8,586,526号；同第6,140,081号；同第6,453,242号；同第6,746,838号；同第7,241,573号；同第6,866,997号；同第7,241,574号および同第6,534,261号を参照されたい。また、WO 03/016496も参照されたい。

20

【0043】

「配列」という用語は、任意の長さのヌクレオチド配列を指し、DNAまたはRNAであり得、線状、環状、または分岐状であり得、1本鎖または2本鎖のいずれもあり得る。「ドナー配列」という用語は、ゲノムに挿入されるヌクレオチド配列を指す。ドナー配列は、任意の長さ、例えば、2～10,000ヌクレオチド長（またはその間もしくはそれ以上の任意の整数値）、好ましくは、約100～1,000ヌクレオチド長（またはその間の任意の整数）、より好ましくは、約200～500ヌクレオチド長であり得る。

30

【0044】

「標的部位」または「標的配列」は、結合のための十分な条件が存在する場合に結合分子が結合する核酸の一部分を定義する核酸配列である。

40

【0045】

「外因性」分子は、通常は細胞内に存在しないが、1つ以上の遺伝学的方法、生化学的方法、または他の方法によって細胞内に導入することができる分子である。「通常は細胞内に存在する」は、細胞の特定の発達段階および環境条件に対して決定される。したがって、例えば、筋肉の胚発生の間だけ存在する分子は、成体筋細胞に対する外因性分子である。同様に、熱ショックによって誘導される分子は、非熱ショック細胞に対する外因性分子である。外因性分子は、例えば、機能不全型内因性分子の機能型、または正常機能型内因性分子の機能不全型を含むことができる。

【0046】

外因性分子は、とりわけ、小分子（コンビナトリアル化学プロセスによって生成されるもの等）、または高分子（タンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタン

50

パク質、多糖、上記分子の任意の修飾誘導体)、または上記分子のうちの1つ以上を含む任意の複合体等であってもよい。核酸は、DNAおよびRNAを含み、1本鎖または2本鎖であり得、線状、分岐状、または環状であり得、任意の長さであり得る。核酸は、二重鎖を形成することができるもの、ならびに三重鎖形成核酸を含む。例えば、米国特許第5,176,996号および同第5,422,251号を参照されたい。タンパク質には、DNA結合タンパク質、転写因子、クロマチン再構成因子、メチル化DNA結合タンパク質、ポリメラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ジャイレース、およびヘリカーゼが含まれるが、これらに限定されない。

【0047】

10

外因性分子は、内因性分子と同じ種類の分子、例えば、外因性タンパク質または核酸であり得る。例えば、外因性核酸は、感染ウイルスゲノム、細胞内に導入されたプラスミドもしくはエピソーム、または通常は細胞内に存在しない染色体を含むことができる。細胞内に外因性分子を導入するための方法は、当業者に既知であり、脂質介在性導入(すなわち、中性脂質および陽イオン性脂質を含むリポソーム)、エレクトロポレーション、直接注入、細胞融合、粒子衝突、リン酸カルシウム共沈、DEAE-デキストラン介在性導入、およびウイルスベクター媒介性導入を含むが、これらに限定されない。外因性分子はまた、内因性分子と同じ種類の分子であり得るが、細胞が由来するものとは異なる種に由来し得る。例えば、ヒト核酸配列が、もともとマウスまたはハムスターに由来する細胞株に導入されてよい。

20

【0048】

対照的に、「内因性」分子は、特定の環境条件下で特定の発達段階にある特定の細胞内に通常存在する分子である。例えば、内因性核酸は、染色体、ミトコンドリア、クロロプラスト、もしくは他の細胞小器官のゲノム、または天然型エピソーム核酸を含むことができる。さらなる内因性分子には、タンパク質、例えば、転写因子および酵素が含まれ得る。

【0049】

「融合」分子は、好ましくは共有結合的に、2つ以上のサブユニット分子が連結した分子である。サブユニット分子は、同じ化学型の分子であり得るか、または異なる化学型の分子であり得る。第1の型の融合分子の例としては、融合タンパク質(例えば、ZFPまたはTAL-E DNA結合ドメインと1つ以上の活性化ドメインとの間の融合物)および融合核酸(例えば、上記の融合タンパク質をコードする核酸)が挙げられるが、これらに限定されない。第2の型の融合分子の例としては、三重鎖形成核酸とポリペプチドとの間の融合物、および副溝結合剤と核酸との間の融合物が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0050】

細胞内の融合タンパク質の発現は、融合タンパク質の細胞への送達からもたらされ得るか、または融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドが細胞に送達され、そのポリヌクレオチドが転写され、その転写物が翻訳されて、融合タンパク質を生成することによつてもたらされ得る。トランススプライシング、ポリペプチド切断、およびポリペプチド連結もまた、細胞内のタンパク質の発現に関与する可能性がある。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの細胞への送達方法は、本開示の他の箇所に提示される。

40

【0051】

「多量体化ドメイン」(「二量体化ドメイン」または「タンパク質相互作用ドメイン」とも称される)は、ZFP-TFまたはTAL-E-TFのアミノ末端領域、カルボキシ末端領域、またはアミノおよびカルボキシ末端領域で組み込まれるドメインである。これらのドメインは、複数のZFP-TFまたはTAL-E-TF単位の多量体化を可能にし、その結果、トリヌクレオチド反復ドメインのより大きなトラクトが、野生型の数の長さを有するより短いトラクトと比べて、多量体化ZFP-TFまたはTAL-E-TFによって優先的に結合されるようになる。多量体化ドメインの例としては、ロイシンジッパーが挙げ

50

られる。多量体化ドメインはまた、小分子によって制御されてもよく、その多量体化ドメインは、小分子または外部リガンドの存在下でのみ別の多量体化ドメインとの相互作用を可能にするために適正な立体配座をとる。このようにして、外因性リガンドを使用して、これらのドメインの活性を制御することができる。

【0052】

本開示の目的のために、「遺伝子」は、遺伝子産物（下記を参照されたい）をコードするDNA領域、および遺伝子産物の産生を制御する全てのDNA領域（かかる制御配列がコード配列および/または転写される配列に隣接しているか否かに関わらず）を含む。したがって、遺伝子には、プロモーター配列、ターミネーター、翻訳制御配列（リボソーム結合部位および内部リボソーム進入部位等）、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界要素、複製起点、マトリックス付着部位、および遺伝子座調節領域が含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。

10

【0053】

「遺伝子発現」は、遺伝子内に含まれる情報の遺伝子産物への変換を指す。遺伝子産物は、遺伝子の直接転写産物（例えば、mRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、構造RNA、もしくは任意の他の種類のRNA）、またはmRNAの翻訳によって産生されるタンパク質であり得る。遺伝子産物にはまた、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化、および編集等のプロセスによって修飾されたRNA、ならびに、例えば、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ADPリボシル化、ミリスチン化、およびグリコシル化によって修飾されたタンパク質も含まれる。

20

【0054】

遺伝子発現の「調節」は、遺伝子の活性における変化を指す。発現の調節には、遺伝子の活性化および遺伝子の抑制が含まれ得るが、これらに限定されない。ゲノム編集（例えば、切断、改变、不活性化、ランダム変異）を使用して発現を調節することができる。遺伝子の不活性化は、本明細書に記載されるZFPもTAL Eタンパク質も含まない細胞と比較した、遺伝子発現におけるいずれの低減も指す。故に、遺伝子の不活性化は、部分的または完全であり得る。

20

【0055】

「目的領域」は、細胞クロマチンの任意の領域であり、例えば、外因性分子に結合することが望ましい、遺伝子、または遺伝子内のもしくは遺伝子に隣接する非コード配列等である。結合は、標的DNA切断および/または標的組換えの目的のためであり得る。目的領域は、例えば、染色体、エピソーム、細胞小器官のゲノム（例えば、ミトコンドリア、クロロプラスト）、または感染ウイルスゲノム内に存在し得る。目的領域は、遺伝子のコード領域内、転写される非コード領域（例えば、リーダー配列、トレーラー配列、もしくはイントロン等）内、またはコード領域の上流もしくは下流のいずれかの非転写領域内にあり得る。目的領域は、単一のヌクレオチド対ほど小さいか、または最大2,000ヌクレオチド対長であるか、またはヌクレオチド対の任意の整数値であり得る。

30

【0056】

「真核」細胞には、真菌細胞（酵母等）、植物細胞、動物細胞、哺乳類細胞、およびヒト細胞（例えば、T細胞）が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0057】

「作動的な連結」および「作動的に連結された」（または「作動可能に連結された」）という用語は、両方の構成要素が正常に機能し、構成要素のうちの少なくとも1つが、他の構成要素のうちの少なくとも1つに対して発揮される機能を媒介できる可能性を許容するように構成要素が配置された、2つ以上の構成要素（配列要素等）の並置を指して交換可能に使用される。例示説明として、転写制御配列が、1つ以上の転写制御因子の有無に応じてコード配列の転写レベルを調節する場合、プロモーター等の転写制御配列がコード配列に作動的に連結される。転写制御配列は、一般に、コード配列と共にシスに作動的に連結されるが、それに直接隣接する必要はない。例えば、エンハンサーは、たとえそれらが近接していない場合でも、コード配列に作動的に連結された転写制御配列である。

50

【0058】

融合ポリペプチドに関して、「作動的に連結された」という用語は、構成要素の各々が、そのように連結されていない場合に実行したであろう機能と同じ機能を、他の構成要素との連結において実行するという事実を指すことができる。例えば、ZFPまたはTALE-DNA結合ドメインが活性化ドメインに融合された融合ポリペプチドに関して、融合ポリペプチドにおいて、ZFPまたはTALE-DNA結合ドメイン部分が、その標的部位および/またはその結合部位に結合することができる一方で、活性化ドメインが遺伝子発現を上方制御することが可能である場合、ZFPまたはTALE-DNA結合ドメインと活性化ドメインとは作動的に連結している。遺伝子発現を制御することが可能なドメインに融合されたZFPは、集合的に「ZFP-TF」または「ジンクフィンガー転写因子」と称される一方で、遺伝子発現を制御することが可能なドメインに融合されたTALEは、集合的に「TALE-TF」または「TALE転写因子」と称される。ZFP-DNA結合ドメインが切断ドメインに融合された融合ポリペプチド（「ZFN」または「ジンクフィンガースクレアーゼ」）の場合、融合ポリペプチドにおいて、ZFP-DNA結合ドメイン部分が、その標的部位および/またはその結合部位に結合可能である一方で、切断ドメインが、標的部位の近傍でDNAを切断可能である場合、ZFP-DNA結合ドメインと切断ドメインとは作動的に連結している。TALE-DNA結合ドメインが切断ドメインに融合された融合ポリペプチド（「TALEN」または「TALEスクレアーゼ」）の場合、融合ポリペプチドにおいて、TALE-DNA結合ドメイン部分が、その標的部位および/またはその結合部位に結合可能である一方で、切断ドメインが、標的部位の近傍でDNAを切断可能である場合、TALE-DNA結合ドメインと切断ドメインとは作動的に連結している。Cas-DNA結合ドメインが活性化ドメインに融合されている融合ポリペプチドに関して、融合ポリペプチドにおいて、Cas-DNA結合ドメイン部分がその標的部位および/またはその結合部位と結合することができる一方で、活性化ドメインが遺伝子発現を上方制御することが可能である場合、Cas-DNA結合ドメインおよび活性化ドメインは作動的に連結している。Cas-DNA結合ドメインが切断ドメインに融合されている融合ポリペプチドに関して、融合ポリペプチドにおいて、Cas-DNA結合ドメイン部分がその標的部位および/またはその結合部位と結合することができる一方で、切断ドメインが標的部位の近くでDNAを切断することが可能である場合、Cas-DNA結合ドメインおよび切断ドメインは作動的に連結している。

【0059】

タンパク質、ポリペプチド、または核酸の「機能的断片」は、その配列が、完全長のタンパク質、ポリペプチド、または核酸と同一ではないが、完全長のタンパク質、ポリペプチド、または核酸と同じ機能を保持するタンパク質、ポリペプチド、または核酸である。機能的断片は、対応する天然の分子よりも多いか、少ないか、もしくは同じ数の残基を有することができ、かつ/または、1つ以上のアミノ酸もしくはスクレオチド置換を含有することができる。核酸の機能（例えば、コード機能、別の核酸にハイブリダイズする能力）を決定するための方法は、当該技術分野において周知である。同様に、タンパク質の機能を決定するための方法も周知である。例えば、ポリペプチドのDNA結合機能は、例えば、フィルター結合アッセイ、電気泳動移動度シフトアッセイ、または免疫沈降アッセイによって決定することができる。DNA切断は、ゲル電気泳動によって評価することができる。上記のAusubelらを参照されたい。タンパク質が別のタンパク質と相互作用する能力は、例えば、免疫共沈降、ツーハイブリッドアッセイ、または相補性（遺伝子的相補性もしくは生化学的相補性の両方）によって決定することができる。例えば、Fields et al. (1989) Nature 340: 245-246、米国特許第5,585,245号、およびPCT国際公開第WO98/44350号を参照されたい。

【0060】

「ベクター」は、遺伝子配列を標的細胞に導入することができる。典型的には、「ベクター構築物」、「発現ベクター」、および「遺伝子導入ベクター」は、目的遺伝子の

10

20

30

40

50

発現を誘導することができる、かつ、遺伝子配列を標的細胞に導入することができる、任意の核酸構築物を意味する。故に、この用語は、クローニング、および発現ビヒクル、ならびに組み込みベクターを包含する。

【0061】

「レポーター遺伝子」または「レポーター配列」は、必ずしも必要でないが好ましくは通例のアッセイにおいて、容易に測定される、タンパク質産物を產生する任意の配列を指す。好適なレポーター遺伝子には、抗体の耐性（例えばアンピシリン耐性、ネオマイシン耐性、G 4 1 8 耐性、ピューロマイシン耐性）を媒介するタンパク質をコードする配列、着色したタンパク質または蛍光タンパク質または発光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質、高感度緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ）をコードする配列、ならびに向上した細胞成長および/または遺伝子増幅を媒介するタンパク質（例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ）が含まれるが、これらに限定されない。エピトープタグには、例えば、F L A G、H i s、m y c、T a p、H A、または任意の検出可能なアミノ酸配列の1つ以上のコピーが含まれる。「発現タグ」には、目的遺伝子の発現を監視するために所望の遺伝子配列に作動可能に連結され得るレポーターをコードする配列が含まれる。

10

【0062】

D N A 結合ドメイン

本明細書に記載される方法は、組成物、例えば、H t t 遺伝子中の標的配列に特異的に結合する、特に複数のトリヌクレオチド反復を含む変異体H t t 対立遺伝子に結合するD N A 結合ドメインを含むH t t 調節転写因子を利用する。任意のD N A 結合ドメインが、本明細書で開示された組成物および方法で使用することができる。

20

【0063】

ある特定の実施形態において、H t t 調節転写因子、またはその中のD N A 結合ドメインは、ジンクフィンガータンパク質を含む。標的部位の選択、Z F P、ならびに融合タンパク質（およびそれをコードするポリヌクレオチド）の設計および構築のための方法は、当業者に知られており、米国特許第6,140,081号、同第5,789,538号、同第6,453,242号、同第6,534,261号、同第5,925,523号、同第6,007,988号、同第6,013,453号、同第6,200,759号、国際公開第W O 9 5 / 1 9 4 3 1号、同第W O 9 6 / 0 6 1 6 6号、同第W O 9 8 / 5 3 0 5 7号、同第W O 9 8 / 5 4 3 1 1号、同第W O 0 0 / 2 7 8 7 8号、同第W O 0 1 / 6 0 9 7 0号、同第W O 0 1 / 8 8 1 9 7号、同第W O 0 2 / 0 9 9 0 8 4号、同第W O 9 8 / 5 3 0 5 8号、同第W O 9 8 / 5 3 0 5 9号、同第W O 9 8 / 5 3 0 6 0号、同第W O 0 2 / 0 1 6 5 3 6号、および同第W O 0 3 / 0 1 6 4 9 6号に詳述される。

30

【0064】

ある特定の実施形態において、Z F Pは、変異体H t t 対立遺伝子または野生型H t t 配列のいずれかに選択的に結合することができる。H t t 標的部位は、典型的に、少なくとも1つのジンクフィンガーを含むが、複数のジンクフィンガー（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれよりも多いフィンガー）を含む可能性がある。通常、Z F Pは、少なくとも3つのフィンガーを含む。Z F Pのある特定のものは、4、5、または6個のフィンガーを含む一方で、いくつかのZ F Pは、8、9、10、11、または12個のフィンガーを含む。3つのフィンガーを含むZ F Pは、典型的に、9または10ヌクレオチドを含む標的部位を認識し、4つのフィンガーを含むZ F Pは、典型的に、12～14ヌクレオチドを含む標的部位を認識する一方で、6つのフィンガーを含むZ F Pは、18～21ヌクレオチドを含む標的部位を認識し得る。Z F Pはまた、1つ以上の制御ドメインを含む融合タンパク質であり得、そのドメインは、転写活性化または抑制ドメインであり得る。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、一緒に連結された2つのZ F P D N A 結合ドメインを含む。これらのジンクフィンガータンパク質はゆえに、8、9、10、11、12個、またはそれよりも多いフィンガーを含むことができる。いくつかの実施形態において、2つのD N A 結合ドメインは、1つのD N A 結合ドメインが4

40

50

つ、5つ、または6つのジンクフィンガーを含み、第2のDNA結合ドメインがさらなる4つ、5つ、または5つのジンクフィンガーを含むように、伸長可能な柔軟なリンカーを介して連結される。いくつかの実施形態において、リンカーは、フィンガーアレイが、8、9、10、11、もしくは12個、またはそれよりも多いフィンガーを含む1つのDNA結合ドメインを含むような、標準的なフィンガー間リンカーである。他の実施形態において、リンカーは、柔軟なリンカー等の不定型のリンカーである。DNA結合ドメインは、少なくとも1つの制御ドメインに融合され、「ZFP-ZFP-TF」構造と考えることができる。これらの実施形態の具体的な例は、柔軟なリンカーで連結され、KOX抑制因子に融合された2つのDNA結合ドメインを含む「ZFP-ZFP-KOX」、および2つのZFP-KOX融合タンパク質がリンカーを介して一緒に融合された「ZFP-KOX-ZFP-KOX」と称され得る。
10

【0065】

代替的に、DNA結合ドメインは、ヌクレアーゼに由来してもよい。例えば、I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII、およびI-TevIII等のホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼの認識配列が知られている。また、米国特許第5,420,032号、米国特許第6,833,252号、Bel fort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388、Dujon et al. (1989) Gene 82:115-118、Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127、Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228、Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180、Argast et al. (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353、およびNew England Biolabs catalogueを参照されたい。加えて、ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼのDNA結合特異性は、非天然の標的部位に結合するように操作することができる。例えば、Chevalier et al. (2002) Molec. Cell 10:895-905、Epinat et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962、Ashworth et al. (2006) Nature 441:656-659、Piques et al. (2007) Current Gene Therapy 7:49-66、米国特許公開第20070117128号を参照されたい。
20
30

【0066】

「2本の手を持つ」ジンクフィンガータンパク質は、2つのジンクフィンガードメインが2つの不連続の標的部位に結合するように、ジンクフィンガーDNA結合ドメインの2つのクラスタが介在するアミノ酸によって分離される、タンパク質である。2本の手を持つ種類のジンクフィンガー結合タンパク質の例は、4つのジンクフィンガーのクラスタが、タンパク質のアミノ末端に位置し、3つのフィンガーのクラスタが、カルボキシル末端に位置する、SIP1である(Remacle et al. (1999) EMBO Journal 18(18):5073-5084を参照されたい)。これらのタンパク質におけるジンクフィンガーの各クラスタは、固有の標的配列に結合可能であり、2つの標的配列の間の間隔は、多くのヌクレオチドを含むことができる。2本の手を持つZFPは、例えば、ZFPの一方または両方に融合された、機能的ドメインを含んでもよい。故に、機能的ドメインは、ZFPの一方もしくは両方の外部に結合されてもよく(図1Cを参照されたい)、またはそれらのZFPの間に位置付けられ(両方のZFPに結合され)てもよい(図4を参照されたい)ことが明らかとなろう。
40

【0067】

Htt標的化ZFPの具体的な例は、参照によりその全体が任意の目的で本明細書に組み込まれる米国特許公開第20130253040号、加えて以下の表1に開示される。この表の第1列は、ZFPの内部基準の名称(番号)であり、表2の列1における同じ名
50

称に対応する。「F」は、フィンガーを指し、「F」の後に続く番号は、どのジンクフィンガーかを指す（例えば、「F1」はフィンガー1を指す）。

【表1-1】

表1: Htt標的化ジンクフィンガーパク質

SBS番号	設計物					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
18856	RSDDLRSR (配列番号 1)	RNDNRTK (配列番号 2)	RSDDLTR (配列番号 3)	RSDDRKT (配列番号 4)	RSADLTR (配列番号 5)	QSSDLRR (配列番号 6)
25920	RSAALSR (配列番号 7)	RSDALAR (配列番号 8)	RSDNLSE (配列番号 9)	KRCNLRC (配列番号 10)	QSSDLRR (配列番号 6)	NA
25921	WRSCRSA (配列番号 11)	DRSNLSR (配列番号 12)	QRTHLTQ (配列番号 13)	RSAHLSR (配列番号 14)	TSGHLSR (配列番号 15)	NA
25923	RSDDLRSR (配列番号 1)	RNDNRTK (配列番号 2)	WRSCRSA (配列番号 11)	RSDNLAR (配列番号 16)	QSGHLSR (配列番号 17)	NA
25922	RSAALSR (配列番号 7)	RSDALAR (配列番号 8)	RSDNLSE (配列番号 9)	KRCNLRC (配列番号 10)	QSSDLRSR (配列番号 18)	DRSHLAR (配列番号 19)
32468	RSDNLAR (配列番号 16)	WRGDRVK (配列番号 20)	DRSNLSR (配列番号 12)	TSGSLTR (配列番号 21)	ERGTLAR (配列番号 22)	RSDDRKT (配列番号 4)
32501	RSDALSR (配列番号 23)	DRSHLAR (配列番号 19)	RSDHLSR (配列番号 24)	QSSDLTR (配列番号 25)	TSGNLTR (配列番号 26)	DRSHLAR (配列番号 19)
31809	RSDDLRSR (配列番号 1)	RNDNRTK (配列番号 2)	RSDDLTR (配列番号 3)	RSDDRKT (配列番号 4)	RSDDLTR (配列番号 3)	QSSDLRR (配列番号 6)
32528	QSGHLQR (配列番号 27)	TSGNLTR (配列番号 26)	QSGDLTR (配列番号 28)	DRSHLAR (配列番号 19)	RSDVLST (配列番号 29)	VRSRLRR (配列番号 30)
30580	RSDNLAR (配列番号 16)	WRGDRVK (配列番号 20)	DRSDLSR (配列番号 31)	RSDALAR (配列番号 8)	ERGTLAR (配列番号 22)	RSDDRKT (配列番号 4)
30929	DRSTLRQ (配列番号 32)	DRSDLSR (配列番号 31)	QSSTRAR (配列番号 33)	RSDETLSE (配列番号 34)	HRRSRWG (配列番号 35)	NA
32538	DRSDLSR (配列番号 31)	RRDTLRS (配列番号 36)	RSDHLST (配列番号 37)	QSAHRIT (配列番号 38)	QSGDLTR (配列番号 28)	DRSHLAR (配列番号 19)
32567	RSDHLSE (配列番号 39)	QNAHRKT (配列番号 40)	QSSDLSR (配列番号 18)	HRSTRNR (配列番号 41)	QSSDLSR (配列番号 18)	HRSTRNR (配列番号 41)
29627	DRSNLSR (配列番号	LRQDLKR (配列番号	DRSHLTR (配列番号	DRSNLTR (配列番号	RSDHLST (配列番号	QSAHRIT (配列番号

10

20

30

40

【表1 - 2】

	12)	42)	43)	44)	37)	38)	
29628	TSGNLTR (配列番号 26)	LKQMLAV (配列番号 45)	RSDSLSA (配列番号 46)	DRSDLSR (配列番号 31)	RSDALST (配列番号 47)	DRSTRTK (配列番号 48)	10
29631	QSSDLSR (配列番号 18)	DRSALAR (配列番号 49)	QSSDLSR (配列番号 18)	QSGHLSR (配列番号 17)	RSDVLSE (配列番号 50)	TSGHLSR (配列番号 15)	
29632	RSDTLSE (配列番号 34)	KLCNRKC (配列番号 51)	TSGNLTR (配列番号 26)	HRTSLTD (配列番号 52)	RSAHLSR (配列番号 14)	QSGNLAR (配列番号 53)	
29637	DRSNLSR (配列番号 12)	QSGNLAR (配列番号 53)	DRSNLSR (配列番号 12)	LKHHLTD (配列番号 54)	QSGDLTR (配列番号 28)	YRWLRNN (配列番号 55)	20
29638	RSDHLSQ (配列番号 56)	RSAVRKN (配列番号 57)	QSSDLSR (配列番号 18)	QSGDLTR (配列番号 28)	WSTSLRA (配列番号 58)	NA	
25917	DRSNLSR (配列番号 12)	QRTHLTQ (配列番号 13)	RSSHLSR (配列番号 59)	TSGSLSR (配列番号 60)	TRQNRDT (配列番号 61)	NA	
25916	DQSTLRN (配列番号 62)	RSAALSR (配列番号 7)	RSDALAR (配列番号 8)	RSDNLSE (配列番号 9)	KRCNLRC (配列番号 10)	NA	
33074	RSDNLSE (配 列番号 9)	KRCNLRC (配列番号 10)	QSGDLTR (配列番号 28)	QSGDLTR (配列番号 28)	RSDNLSE (配列番号 9)	KRCNLRC (配列番号 10)	
33080	QSGDLTR (配 列番号 28)	QSGDLTR (配列番号 28)	RSDNLSE (配列番号 9)	KRCNLRC (配列番号 10)	QSGDLTR (配列番号 28)	QSGDLTR (配列番号 28)	
33084	QSSDLSR (配 列番号 18)	HRSTRNR (配列番号 41)	RSDTLSE (配列番号 34)	RRWTLVG (配列番号 63)	NA	NA	30
33088	QSSDLSR (配 列番号 18)	HRSTRNR (配列番号 41)	RSAVLSE (配列番号 64)	QSSDLSR (配列番号 18)	HRSTRNR (配列番号 41)	NA	
30643	RSDNLSE (配 列番号 9)	KRCNLRC (配列番号 10)	QSSDLSR (配列番号 18)	QWSTRKR (配列番号 65)	QSSDLSR (配列番号 18)	QWSTRKR (配列番号 65)	
30648	RSDNLSE (配 列番号 9)	KRCNLRC (配列番号 10)	RSDNLSE (配列番号 9)	KRCNLRC (配列番号 10)	RSDNLSE (配列番号 9)	KRCNLRC (配列番号 10)	
30645	RSDNLSE (配 列番号 9)	KRCNLRC (配列番号 10)	QSSDLSR (配列番号 18)	QWSTRKR (配列番号 65)	QSGDLTR (配列番号 28)	NA	40
30640	QSSDLSR (配列番号	QWSTRKR (配列番号	QSSDLSR (配列番号	QWSTRKR (配列番号	QSGDLTR (配列番号	NA	

【表1-3】

	18)	65)	18)	65)	28)	
30657	RSDTLSE (配列番号 34)	RRWTLVG (配列番号 63)	QSSDLSE (配列番号 18)	HRSTRNR (配列番号 41)	QSSDLSE (配列番号 18)	HRSTRNR (配列番号 41)
30642	QSGDLTR (配列番号 28)	QSSDLSE (配列番号 18)	QWSTRKR (配列番号 65)	QSSDLSE (配列番号 18)	QWSTRKR (配列番号 65)	NA
30646	RSDNLSE (配列番号 9)	KRCNLRC (配列番号 10)	QSGDLTR (配列番号 28)	QSSDLSE (配列番号 18)	QWSTRKR (配列番号 65)	NA
32220	RSDVLSE (配列番号 50)	QSSDLSE (配列番号 18)	HRSTRNR (配列番号 41)	NA	NA	NA
32210	QSGDLTR (配 列番号 28)	QSSDLSE (配列番号 18)	QWSTRKR (配列番号 65)	NA	NA	NA
32215	RSDNLRE (配 列番号 66)	RSDNLSE (配列番号 9)	KRCNLRC (配列番号 10)	NA	NA	NA
30658	QSSDLSE (配 列番号 18)	HRSTRNR (配列番号 41)	QSSDLSE (配列番号 18)	HRSTRNR (配列番号 41)	QSSDLSE (配列番号 18)	NA
32218	QSSDLSE (配 列番号 18)	QSSDLSE (配列番号 18)	NA	NA	NA	NA
32427	ERGTLAR (配 列番号 22)	TSGSLTR (配列番号 21)	RSDNLAR (配列番号 16)	DPSNRVG (配列番号 67)	RSDDLSE (配列番号 68)	DNSRIK (配列番号 69)
32653	RSDHLSE (配列番号 39)	QSGHLSR (配列番号 17)	RSDDLTR (配列番号 3)	YRWLLRS (配列番号 70)	QSSDLSE (配列番号 18)	RKDALVA (配列番号 71)
32677	QSGDLTR (配列番号 28)	RRADLSR (配列番号 72)	DRSHLTR (配列番号 43)	DRSHLAR (配列番号 19)	DRSNLSR (配列番号 12)	LAQPRNK (配列番号 73)
33560	ERGTLAR (配 列番号 22)	QSGSLTR (配列番号 74)	RSDNLAR (配列番号 16)	DDSHRKD (配列番号 75)	RSDDLSE (配列番号 68)	DNSRIK (配列番号 69)
33583	DRSNLSR (配 列番号 12)	HKQHRDA (配列番号 76)	DRSDLSR (配列番号 31)	RRTDLRR (配列番号 77)	RSANLAR (配列番号 78)	DRSHLAR (配列番号 19)
32685	RSDHLSA (配列番号 79)	RSADRTR (配列番号 80)	RSDVLSE (配列番号 50)	TSGHLSR (配列番号 15)	RSDDLTR (配列番号 3)	TSSDRKK (配列番号 81)
32422	RSANLAR (配列番号 78)	RSDDLTR (配列番号 3)	RSDTLSE (配列番号 34)	HHSARRC (配列番号 82)	ERGTLAR (配列番号 22)	DRSNLTR (配列番号 44)
32428	RSDVLST	DNSSRTR	DRSNLSR	HKQHRDA	DRSDLSR	RRTDLRR

10

20

30

40

【表1-4】

	(配列番号 29)	(配列番号 83)	(配列番号 12)	(配列番号 76)	(配列番号 31)	(配列番号 77)
32430	RSDVLST (配列番号 29)	VRSRLRR (配列番号 30)	ERGTLAR (配列番号 22)	TSGSLTR (配列番号 21)	RSDNLAR (配列番号 16)	DPSNRVG (配列番号 67)
32432	RSDVLST (配列番号 29)	VRSRLRR (配列番号 30)	ERGTLAR (配列番号 22)	TSGSLTR (配列番号 21)	RSDHLSA (配列番号 79)	RSADLSR (配列番号 84)
32714	RSDVLST (配列番号 29)	DNSSRTR (配列番号 83)	ERGTLAR (配列番号 22)	QSGNLAR (配列番号 53)	DRSHLTR (配列番号 43)	RNDDRKK (配列番号 85)
32733	DRSNLSR (配列番号 12)	QKVTLAA (配列番号 86)	RSAHLSR (配列番号 14)	TSGNLTR (配列番号 26)	DRSDLSR (配列番号 31)	RRSTLRS (配列番号 87)
30901	DRSALSR (配列番号 88)	QSGSLTR (配列番号 74)	QSSDLSR (配列番号 18)	LKWNLRT (配列番号 89)	RSDNLAR (配列番号 16)	LKWDRQT (配列番号 90)
31952	QSGALAR (配 列番号 91)	RSDDLTR (配列番号 3)	DRSALSR (配列番号 88)	RSDHLTQ (配列番号 92)	QSGDLTR (配列番号 28)	WSTSLRA (配列番号 58)
31921	RSDSLLR (配 列番号 93)	RSDDLTR (配列番号 3)	QSGDLTR (配列番号 28)	RRDWLPQ (配列番号 94)	DRSNLSR (配列番号 12)	RSDDRKT (配列番号 4)
30906	DRSHLSR (配列番号 95)	TSGNLTR (配列番号 26)	QSGDLTR (配列番号 28)	DRSHLAR (配列番号 19)	RSDVLST (配列番号 29)	VRSRLRR (配列番号 30)

10

20

30

【0068】

これらのタンパク質の標的部位についての配列および箇所は、表2に開示される。ZF
P認識ヘリックスが接触している標的部位におけるヌクレオチドは、大文字で示され、接
触していないヌクレオチドは、小文字で示される。

【表2-1】

表2: ヒトおよびマウス Htt 上の標的部位

SBS 番号	標的部位
18856	AcGCTGGCCGGCGGAGGCCGggccgcg (配列番号 96)
25920	gcGCTCAGCAGGTGGTGacccttgtggac (配列番号 97)
25921	atGGTGGAGAGACTGTgaggcggcagc (配列番号 98)
25923	tgGGAGAGacTGTGAGGCCGcagctgg (配列番号 99)
25922	atGGCGCTCAGCAGGTGGTGacccttgtg (配列番号 100)
32468	agCCGGCCGTGGACTCTGAGccgaggtg (配列番号 101)
32427	cgCACTCGcCGCGAGGTTGCCGggacg (配列番号 102)
32501	gtGGCGATGCGGGGGCGTGGtgggta (配列番号 103)
31809	acGCTGCCGGCGGAGGCCGggccgcg (配列番号 96)
32528	ccGGGACGGGTCCAaGATGGAcggccgc (配列番号 104)
30580	agCCGGCCGTGGACTCTGAGccgaggtg (配列番号 101)

40

【表2-2】

30929	ccGTCCCAGCCCCAcggcgcccttg (配列番号 105)	
30658	ctGCTGCTGCTGCTGCTgctggaggac (配列番号 106)	
32538	cgGGTCCAAGATGGACGGCCgctcaggt (配列番号 107)	
32567	ctGCTGCTGCTGCTGGAAAGGacttgagg (配列番号 108)	
29627	tcAGATGGGACGGCGCTGACtggctgg (配列番号 109)	
29628	ctGCCATGGACCTGAATGATgggaccca (配列番号 110)	
29631	gtGGTCTGGGAGCTGTCGCTgatggcgc (配列番号 111)	
29632	ccGAAGGGCCTGATTcAGCTGttacc (配列番号 112)	
29637	aaCTTGAAGTAACaGAAGACtcatcct (配列番号 113)	10
29638	ctTGTACAGCTGTGAGGgtgagcataat (配列番号 114)	
25917	gcCATGGTGGGAGAGAGActgtgaggcgc (配列番号 115)	
25916	ctCAGCAGGTGGTGACCTtggacatt (配列番号 116)	
33074	agCAGCAGcaGCAGCAgCAGCAGcagca (配列番号 117)	
33080	caGCAGCAgCAGCAGcaGCAGCAgca (配列番号 118)	
33084	tgCTGCTGctGCTGCTgctgctggagg (配列番号 119)	
33088	ctGCTGCTgCTGctGCTGCTgctggagg (配列番号 120)	
30643	caGCAGCAGCAGCAgCAGCAGcagcagc (配列番号 118)	
30648	agCAGCAGCAGCAGCAGCAGcagcagca (配列番号 117)	
30645	caGCAGCAGCAgCAGCAGcagcagcagc (配列番号 118)	20
30640	caGCAGCAGCAGCAGCAgca (配列番号 118)	
30657	ctGCTGCTGCTGCTgCTGCTGgaaggac (配列番号 106)	
30642	caGCAGCAGCAGCAGCAgca (配列番号 118)	
30646	caGCAGCAGCAgCAGCAGcagcagcagc (配列番号 118)	
32220	ctGCTGCTgCTGctgctgctggagg (配列番号 121)	
32210	caGCAGCAGCAgca (配列番号 118)	
32215	agCAGCAGCAGcagcagcagcagca (配列番号 117)	
32218	tGCTGCTgctgctgctgctggagg (配列番号 122)	
32653	ggCTGGCTTTGCGGGAAAGGggcgggc (配列番号 123)	
32677	gaATTGACaGGCGGAtGCGTCGtcctct (配列番号 124)	30
33560	cgCACTCGcCGCGAGGgGTTGCCggacg (配列番号 102)	
33583	gcGGCGAGtGCGTCCCCTGACGtcatgc (配列番号 103)	
32685	attCTGCGGGTCTGGCGTGGCgtct (配列番号 104)	
32422	gtGACGTATGCCGGCGGAAGcaggccc (配列番号 105)	
32428	gtGCGTCCCCTGACGTATGCCggcgg (配列番号 106)	
32430	gcCGCGAGGgGTTGCCGGGACGggcccaa (配列番号 107)	
32432	ccGCGAGGGTTGCCGGGACGggcccaaag (配列番号 108)	
32714	caTCGGGCAgGAAGCCGTATGgcaacc (配列番号 109)	
32733	tcCTGCCGATGGGACAGACccctgaaga (配列番号 110)	
30901	gtACTGAGCAATGCTGTAGTCagcaatc (配列番号 111)	40
31952	ccTGTCCAgAGGGTCGCGGTAccctccct (配列番号 112)	
31921	tgCCGGACCTGGCAGCGGGGAGtgggtggc (配列番号 113)	
30906	ccGGGACGGGTCCAaGATGGAGggccgc (配列番号 104)	

【0069】

ある特定の実施形態において、DNA結合ドメインは、天然型または操作された（非天然型）TALエフェクター（T A L E）DNA結合ドメインを含む。例えば、米国特許第8,586,526号を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0070】

キサントモナス属の植物病原性細菌は、重要な作物に多くの病害を引き起こすことが知られている。キサントモナスの病原性は、植物細胞内に25を超える異なるエフェクター

タンパク質を注入する保存された3型分泌(T3S)系に依存する。これらの注入されるタンパク質の中には、植物の転写活性化因子を模倣し、植物のトランスクリプトームを操作する転写活性化因子様エフェクター(TALE)がある(Kay et al(2007) *Science* 318: 648-651を参照されたい)。これらのタンパク質は、DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインを含有する。最もよく特徴付けされたTALEの1つは、キサントモナス・カンペストリス病原型ベシカトリアに由来するAvrBs3である(Bonas et al(1989) *Mol Gen Genet* 218: 127-136および国際公開第WO2010079430号を参照されたい)。TALEは、縦列反復の集中ドメインを含有し、各反復が、これらのタンパク質のDNA結合特異性の要である約34個のアミノ酸を含有する。加えて、これらは、核局在化配列および酸性転写活性化ドメインを含有する(概説についてはSchornack S, et al(2006) *J Plant Physiol* 163(3): 256-272を参照されたい)。加えて、植物病原性細菌である青枯病菌において、brg11およびhpx17と表記される2つの遺伝子が、青枯病菌の次亜種1系統GMI1000および次亜種4系統RS1000において、キサントモナスのAvrBs3ファミリーと相同であることが見出されている(Heuer et al(2007) *Appl and Env Microb* 73(13): 4379-4384を参照されたい)。これらの遺伝子は、ヌクレオチド配列において互いに98.9%同一であるが、hpx17の反復ドメインにおいて1,575bpの欠失分だけ異なる。しかしながら、両方の遺伝子産物が、キサントモナスのAvrBs3ファミリータンパク質と40%未満の配列同一性を有する。

【0071】

これらのTALEの特異性は、縦列反復に見出される配列に依存する。反復した配列は、およそ102bpを含み、反復は、典型的に互いに91~100%相同である(Bonas et al, (同書))。反復の多型性は、通常、12および13位に位置し、12および13位の超可変二残基(diresidues)の正体と、TALEの標的配列における連続したヌクレオチドの正体との間に1対1の対応関係が存在するようである(Moscou and Bogdano, (2009) *Science* 326: 1501およびBoch et al(2009) *Science* 326: 1509-1512を参照されたい)。実験的に、12および13位のHD配列がシトシン(C)への結合をもたらし、NGがTに、NIがA、C、GまたはTに結合し、NNがAまたはGに結合し、NGがTに結合するように、これらのTALEのDNA認識のためのコードが決定されている。これらのDNA結合反復を、新たな反復の組み合わせおよび数を用いてタンパク質へと組み立てて、新たな配列と相互作用することが可能である人工転写因子を作製した)。加えて、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる米国特許第8,586,526号および米国特許公開第20130196373号は、N-capポリペプチド、C-capポリペプチド(例えば、+63、+231または+278)および/または新規の(非定型)RVDを含むTALEを記載している。

【0072】

例示的なTALEは、その全体が参照により組み込まれる米国特許公開第20130253040号、および以下の表3に記載されている。

【0073】

以下の表3に、試験されたTALE-TFの標的および数字の識別子を示す。数値識別子は、「SBS番号」とラベルされ、センス(Sense)またはアンチセンス(Antisense)鎖に対する特異性は、「S/A」と示され、標的、反復単位またはRVDの数、およびC末端の種類も同様に示される。

10

20

30

40

【表3】

表3: Htt特異的TALE-TF

SBS 番号	S/A	標的(5'-3')	配列 番号	RVD	C末端
102449	S	gcAGCAGCAGCAGCAGCAGca	114	17	+63
102450	S	gcAGCAGCAGCAGCAGCAGca	115	14	+63
102451	S	gcAGCAGCAGCAGCAGca	116	11	+63
102452	S	gcAGCAGCAGca	117	8	+63
102453	A	ctGCTGCTGCTGCTGCTGCTg	118	17	+63
102454	A	ctGCTGCTGCTGCTGCTGCTg	119	14	+63
102455	A	ctGCTGCTGCTGCTg	120	11	+63
102456	A	ctGCTGCTGCTg	121	8	+63
102457	S	gcAGCAGCAGCAGCAGCAGca	114	17	+231
102458	S	gcAGCAGCAGCAGCAGca	115	14	+231
102459	S	gcAGCAGCAGCAGca	116	11	+231
102460	S	gcAGCAGCAGca	117	8	+231
102462	A	ctGCTGCTGCTGCTGCTg	119	14	+231
102463	A	ctGCTGCTGCTGCTg	120	11	+231
102464	A	ctGCTGCTGCTg	121	8	+231
102466	S	gcAGCAGCAGCAGCAGca	115	14	+278
102467	S	gcAGCAGCAGCAGca	116	11	+278
102468	S	gcAGCAGCAGca	117	8	+278
102469	A	ctGCTGCTGCTGCTGCTg	118	17	+278
102470	A	ctGCTGCTGCTGCTGCTg	119	14	+278
102471	A	ctGCTGCTGCTGCTg	120	11	+278
102472	A	ctGCTGCTGCTg	121	8	+278

【0074】

ある特定の実施形態において、DNA結合ドメインは、二量体化および/または多量体化ドメイン、例えばコイルドコイル(CC)および二量体化ジンクフィンガー(DZ)を含む。米国特許公開第20130253040号を参照されたい。

【0075】

近年、真核RNAi経路と類似すると仮定されてきた古細菌および多くの細菌におけるRNA媒介性ゲノム防御経路の存在に関して、注目すべき証拠が出現してきた(概説に関しては、GoddeおよびBickerton、2006年. J. Mol. Evol. 62巻: 718~729頁; Lillestolら、2006年. Archaea 2巻: 59~72頁; Makarovaら、2006年. Biol. Direct 1巻: 7号; Sorekら、2008年. Nat. Rev. Microbiol. 6巻: 181~186頁を参照されたい)。このような経路は、CRISPR-Cas系または原核RNAi(pRNAi)として公知であり、2つの進化的に、しばしば物理的に関連する遺伝子座、すなわち系のRNA構成要素をコードするCRISPR(規則的な間隔でクラスター化された短鎖反復回文配列)遺伝子座、およびタンパク質をコードするcas(CRISPR関連)遺伝子座から生じると提唱されている(Jansenら、2002年. Mol. Microbiol. 43巻: 1565~1575頁; Makarovaら、2002年. Nucleic Acids Res. 30巻: 482~496頁; Makarovaら、2006年. Biol. Direct 1巻: 7号; Haftら、2005年. PLoS Comput. Biol. 1巻: e60)。微生物宿主におけるCRISPR遺伝子座は、CRISPR関連(Cas)遺伝子、加えてCRISPR媒介性核酸切断の特異性をプログラミングすることが可能な非コードRNA工

10

20

30

40

50

メントの組合せを含有する。個々の Cas タンパク質は、真核 RNAi 機構のタンパク質構成要素と有意な配列類似性を有していないが、類似した予測機能（例えば、RNA 結合、ヌクレアーゼ、ヘリカーゼ等）を有する（Makarova ら、2006 年. Biol. Direct 1 卷 : 7 号）。

CRISPR 関連 (cas) 遺伝子は、CRISPR 反復 - スペーサーのアレイに結合されていることが多い。40 種より多くの様々な Cas タンパク質ファミリーが記載されている。これらのタンパク質ファミリーのなかでも、Cas1 は、様々な CRISPR / Cas 系の間で偏在的なようである。cas 遺伝子および反復構造の特定の組合せを使用して、8 種の CRISPR サブタイプ (E. coli, Y. pestis, N. meningitidis, D. vulgaris, T. neapolitana, H. marismortui, A. pernix, および M. tuberculosis) が定義されているが、これらのうちいくつかは、反復関連ミステリアスタンパク質 (RAMP : repeat-associated mysterious protein) をコードする追加の遺伝子モジュールと結合している。単一のゲノム中に、1 つより多くの CRISPR サブタイプが生じる可能性がある。CRISPR / Cas サブタイプの散発的な分布から、系が、微生物の進化中に遺伝子水平伝播を受けていることが示唆される。

【0076】

タイプIIのCRISPRは、最初に *S. pyogenes* で記載され、最もよく特徴付けられた系の1つであり、4つの逐次ステップで標的化されたDNA二本鎖切断を行う。第1に、2つの非コードRNA、プレ-crRNAアレイおよびtracrRNAが、CRISPR遺伝子座から転写される。第2に、tracrRNAが、プレ-crRNAの反復領域にハイブリダイズし、個々のスペーサー配列を含有する成熟crRNAへのプレ-crRNAのプロセシングを媒介し、そのスペーサー配列でCas9タンパク質の存在下で二本鎖特異的なRNAアーゼIIによるプロセシングが起こる。第3に、成熟crRNA : tracrRNA複合体は、標的認識の追加の必要条件である、crRNAにおけるスペーサーとプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) の隣にある標的DNAにおけるプロトスペーサーとの間でワトソン - クリック塩基対を形成することによって、Cas9を標的DNAに向かわせる。加えて、tracrRNAがその3'末端でcrRNAと塩基対形成して、この結合がCas9活性を開始させることから、tracrRNAも存在していなければならない。最終的に、Cas9は標的DNAの切断を媒介して、プロトスペーサー内で二本鎖切断を発生させる。CRISPR / Cas 系の活性は、3つのステップ、すなわち (i) 外来のDNA配列をCRISPRアレイに挿入して、「適合」と呼ばれるプロセスにおける将来的な攻撃を防止すること、(ii) 関連タンパク質の発現、加えてアレイの発現およびプロセシング、続いて (iii) 外来の核酸でのRNA媒介干渉で構成される。したがって、細菌細胞において、いわゆる「Cas」タンパク質のいくつかは、CRISPR / Cas 系の天然の機能と関連する。

【0077】

多くの様々な細菌で、タイプIIのCRISPR系が見出されている。Fonfara らによる公的に利用可能なゲノムにおけるBLAST検索 ((2013年) Nuc Acid Res 42巻 (4号) : 2377 ~ 2590 頁) は、347の細菌種でCas9オーソログを見出した。加えてこのグループは、*S. pyogenes*、*S. mutans*、*S. thermophilus*、*C. jejuni*、*N. meningitidis*、*P. multocida* および *F. novicida* 由来の Cas9 オーソログを使用した、インビトロでのDNA標的のCRISPR / Cas 切断を実証した。したがって、用語「Cas9」は、DNA結合ドメインと2つのヌクレアーゼドメインとを含むRNAガイドDNAヌクレアーゼを指し、ここで Cas9 をコードする遺伝子は、任意の好適な細菌に由来していてもよい。

【0078】

Cas9タンパク質は、少なくとも2つのヌクレアーゼドメインを有し、一方のヌクレアーゼドメインは HNH エンドヌクレアーゼに類似しており、他方は Ruv エンドヌクレアーゼドメインに似ている。HNH タイプのドメインは、crRNA に相補的な DNA 鎖の切断に関与するようであり、一方で Ruv ドメインは、非相補鎖を切断する。Cas9

10

20

30

40

50

ヌクレアーゼは、ヌクレアーゼドメインの一方のみが機能的であり、Casニッカーゼが生じるように操作されてもよい(Jinekら(同書)を参照されたい)。ニッカーゼは、酵素の触媒ドメインにおけるアミノ酸の特異的な変異によって、またはドメインがもはや機能的でなくなるようなドメインの一部または全部の切断によって生成され得る。Cas9は2つのヌクレアーゼドメインを含むため、このアプローチは、どちらのドメインでも起こり得る。二本鎖切断は、標的DNAにおいて、2つのこのようなCas9ニッカーゼの使用により達成することができる。ニッカーゼはそれぞれ、DNAの一方の鎖を切断し、2つの使用は、二本鎖切断を引き起こす。

【0079】

crRNA-tracrRNA複合体の必要性は、crRNAとtracrRNAとのアニーリングによって正常に形成されたヘアピンを含む操作された「シングルガイドRNA」(sgRNA)の使用によって回避することができる(Jinekら(2012年)Science 337巻:816頁およびCongら(2013年)Scienceexpress/10.1126/science.1231143を参照されたい)。S.pyrogenesにおいて、操作されたtracrRNA:crRNA融合物、またはsgRNAは、Casが結合したRNAと標的DNAとの間に二本鎖RNA:DNAヘテロ二量体が形成されたときに標的DNAを切断するようにCas9をガイドする。Cas9タンパク質およびPAM配列を含有する操作されたsgRNAを含むこの系は、RNAガイドゲノム編集に使用されており(Ramalingam(同書)を参照されたい)、インビボにおけるゼブラフィッシュ胚のゲノム編集(Hwangら(2013年)Nature Biotechnology 31巻(3号):227頁を参照されたい)に有用であり、編集効率はZFNおよびTALENに類似していた。

10

20

30

30

【0080】

CRISPR遺伝子座の一次生成物は、インベーダー標的配列を含有する短いRNAであるようであり、経路におけるそれらの仮定の役割に基づいてガイドRNAまたは原核生物サイレンシングRNA(psiRNA)と称される(Makarovaら、2006年. Biol. Direct 1巻:7号; Haleら、2008年. RNA、14巻:2572~2579頁)。RNA分析から、CRISPR遺伝子座の転写物は反復配列内で切断されて、個々のインベーダー標的配列と隣接する反復断片とを含有する約60から70ntのRNA中間体を放出することが示される(Tangら、2002年. Proc. Natl. Acad. Sci. 99巻:7536~7541頁; Tangら、2005年. Mol. Microbiol. 55巻:469~481頁; Lillestolら2006年. Archaea 2巻:59~72頁; Brounsら、2008年. Science 321巻:960~964頁; Haleら、2008年. RNA、14巻:2572~2579頁)。古細菌のPyrococcus furiosusにおいて、これらの中間体RNAはさらに、豊富で安定な約35から45ntの成熟psiRNAにプロセシングされる(Haleら、2008年. RNA、14巻:2572~2579頁)。

【0081】

crRNA-tracrRNA複合体の必要性は、crRNAとtracrRNAとのアニーリングによって正常に形成されたヘアピンを含む操作された「シングルガイドRNA」(sgRNA)の使用によって回避することができる(Jinekら(2012年)Science 337巻:816頁およびCongら(2013年)Scienceexpress/10.1126/science.1231143を参照されたい)。S.pyrogenesにおいて、操作されたtracrRNA:crRNA融合物、またはsgRNAは、Casが結合したRNAと標的DNAとの間に二本鎖RNA:DNAヘテロ二量体が形成されたときに標的DNAを切断するようにCas9をガイドする。Cas9タンパク質およびPAM配列を含有する操作されたsgRNAを含むこの系は、RNAガイドゲノム編集に使用されており(Ramalingam(同書)を参照されたい)、インビボにおけるゼブラフィッシュ胚のゲノム編集(Hwangら(2013年)Nature Biotechnology 31巻(3号):227頁を参照されたい)に有用であり、編集効率はZFNおよびTALENに類似していた。

40

【0082】

キメラまたはsgRNAは、任意の所望の標的に相補的な配列を含むように操作されて

50

もよい。一部の実施形態において、ガイド配列は、約 5 またはそれ超、約 10 またはそれ超、約 11 またはそれ超、約 12 またはそれ超、約 13 またはそれ超、約 14 またはそれ超、約 15 またはそれ超、約 16 またはそれ超、約 17 またはそれ超、約 18 またはそれ超、約 19 またはそれ超、約 20 またはそれ超、約 21 またはそれ超、約 22 またはそれ超、約 23 またはそれ超、約 24 またはそれ超、約 25 またはそれ超、約 26 またはそれ超、約 27 またはそれ超、約 28 またはそれ超、約 29 またはそれ超、約 30 またはそれ超、約 35 またはそれ超、約 40 またはそれ超、約 45 またはそれ超、約 50 またはそれ超、約 75 またはそれ超、またはそれよりも多くのヌクレオチド長である。一部の実施形態において、ガイド配列は、約 75 未満、約 50 未満、約 45 未満、約 40 未満、約 35 未満、約 30 未満、約 25 未満、約 20 未満、約 15 未満、約 12 未満、またはそれより少ないヌクレオチド長である。一部の実施形態において、RNA は、標的への相補性と G [n 19] 型を有する 22 塩基、続いて *S. pyogenes* の C R I S P R / C a s 系と共に使用するための N G G または N A G 型のプロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) を含む。したがって、1つの方法において、目的の遺伝子中の公知の Z F N 標的の利用によって、(i) Z F N へテロ二量体の認識配列を、関連ゲノム (ヒト、マウス、または特定の植物種由来) の参照配列とアラインすること；(i i) Z F N の半分の部位の間のスペーサー領域を同定すること；(i i i) スペーサー領域に最も近いモチーフ G [N 20] G G の配置を同定すること (1 個より多くのこのようなモチーフがスペーサーとオーバーラップするとき、スペーサーに対して中心側のモチーフが選択される) ；(i v) s g RNA のコアとしてそのモチーフを使用することによって、s g RNA を設計することができる。この方法は、証明されたヌクレアーゼ標的に頼ることが有利である。代替的に、s g RNA は、単に好適な標的配列が G [n 20] G G 式に従っていることを同定することによって、任意の関心領域を標的化するように設計することができる。相補性領域と共に、s g RNA は、s g RNA の t r a c r RNA 部分のテール領域まで伸長する追加のヌクレオチドを含んでもよい (Hsu ら (2013 年) Nature Biotech doi : 10.1038/nbt.2647 を参照されたい) 。テールは、+ 67 から + 85 ヌクレオチド、またはその間の任意の数のヌクレオチドを有していてよく、好ましい長さは + 85 ヌクレオチドである。端を切りとった s g RNA 、「 t r u - g RNA 」も使用が可能である (Fu ら、(2014 年) Nature Biotech 32 卷 (3 号) : 279 頁を参照されたい) 。 t r u - g RNA において、相補性領域は、17 または 18 ヌクレオチド長に減少する。

【 0083 】

さらに、代替の P A M 配列も利用することができ、その場合、*S. pyogenes* の C a s 9 を使用して、P A M 配列が N G G の代替物として N A G であってもよい (Hsu 2014 年 (同書)) 。また追加の P A M 配列としては、最初の G が欠失したものも挙げることができる (Sander および Joung (2014 年) Nature Biotech 32 卷 (4 号) : 347 頁) 。 *S. pyogenes* のコードされた C a s 9 P A M 配列に加えて、他の細菌源からの C a s 9 タンパク質に特異的な他の P A M 配列を使用することができる。例えば、以下に示す P A M 配列 (Sander および Joung (同書) 、および Esvelt ら、(2013 年) Nat Meth 10 卷 (11 号) : 1116 頁から適合させた) は、これらの C a s 9 タンパク質に特異的である：

10

20

30

40

【表4】

種	PAM	
<i>S. pyogenes</i>	NGG	
<i>S. pyogenes</i>	NAG	
<i>S. mutans</i>	NGG	
<i>S. thermophilus</i>	NGGNG	10
<i>S. thermophilus</i>	NNAAAW	
<i>S. thermophilus</i>	NNAGAA	
<i>S. thermophilus</i>	NNNGATT	
<i>C. jejuni</i>	NNNNACA	
<i>N. meningitidis</i>	NNNNGATT	
<i>P. multocida</i>	GNNNCNNA	20
<i>F. novicida</i>	NG	

【0084】

したがって、*S. pyogenes*のCRISP/Cas系との使用に好適な標的配列は、以下のガイドライン：[n17、n18、n19、またはn20]（G/A）Gに従って選択されてもよい。代替的に、PAM配列は、ガイドラインG[n17、n18、n19、n20]（G/A）Gに従っていてもよい。*S. pyogenes*ではない細菌由来のCas9タンパク質の場合、同じガイドラインが使用される可能性があるが、代替のPAMが*S. pyogenes*のPAM配列の代わりに用いられる。

30

【0085】

可能性のあるオフターゲット配列を回避する特異性の最高尤度を有する標的配列を選択することが最も好ましい。これらの望ましくないオフターゲット配列は、以下の特性を考慮するとによって同定することができる：i) 利用されているCas9タンパク質と共に機能することが公知のPAM配列が後に続く標的配列における類似性；ii) 所望の標的配列からのミスマッチが3つより少ない類似の標的配列；iii) ii)の場合と類似の標的配列であって、ミスマッチが全てPAMの近位領域というよりPAMの遠位領域に配置されている配列（時には「シード」領域と称される、PAMに直接隣接しているかまたはその近位にあるヌクレオチド1～5（Wular(2014年)Nature Biotech doi:10.1038/nbt2889）が認識にとって最も重要であるといういくつかの証拠があることから、ミスマッチがシード領域中に配置された推定上のオフターゲット部位は、sgRNAによって認識される可能性が最も低い可能性がある）；およびiv) ミスマッチが連続して間隔をあけていないか、4ヌクレオチドより多く離れて間隔をあけている、類似の標的配列（Hsu 2014年（同書））。したがって、上記のこれらの基準を使用して、どのCRIPSR/Cas系が採用されることになってもゲノム中の可能性のあるオフターゲット部位の数の分析を行うことによって、sgRNAにとって好適な標的配列を同定することができる。

40

【0086】

ある特定の実施形態において、Casタンパク質は、天然型Casタンパク質の「機能的な誘導体」であり得る。天然配列ポリペプチドの「機能的な誘導体」は、天然配列ポリ

50

ペプチドに共通する定性的な生物学的特性を有する化合物である。「機能的な誘導体」は、対応する天然配列ポリペプチドに共通する生物活性を有するという条件で、天然配列の断片ならびに天然配列ポリペプチドの誘導体およびその断片を含むが、これらに限定されない。本明細書で企図される生物活性は、DNA基質を加水分解して断片にする、機能的な誘導体の能力である。用語「誘導体」は、ポリペプチドのアミノ酸配列バリアント、共有結合による改変体、およびそれらの融合体の両方を包含する。いくつかの態様において、機能的な誘導体は、天然型 Cas タンパク質の単一の生物学的特性を含んでもよい。他の態様において、機能的な誘導体は、天然型 Cas タンパク質の生物学的特性の部分集合を含んでもよい。Cas ポリペプチドまたはそれらの断片の好適な誘導体は、Cas タンパク質またはそれらの断片の変異体、融合体、共有結合による改変体を含むが、これらに限定されない。Cas タンパク質は、Cas タンパク質またはそれらの断片、加えて Cas タンパク質またはそれらの断片の誘導体を含み、これらは、細胞から得てもよいし、または化学合成から得てもよいし、またはこれらの 2 つの手順の組合せによって得てもよい。細胞は、Cas タンパク質を天然に产生する細胞であってもよいし、または Cas タンパク質を天然に产生し、内因性 Cas タンパク質をより高い発現レベルで产生するように、または内因性 Cas と同一または異なる Cas をコードする外因的に導入された核酸から Cas タンパク質を产生するように遺伝子操作されている細胞であってもよい。いくつかのケースにおいて、細胞は、Cas タンパク質を天然に产生せず、Cas タンパク質を产生するように遺伝子操作されている。

10

20

30

40

50

【0087】

例えば米国仮出願第 61/823,689 号では、特異的な遺伝子に標的化した例示的な CRISPR/Cas ヌクレアーゼ系が開示されている。

【0088】

したがって、ヌクレアーゼは、DNA を切断するヌクレアーゼドメインと組み合わせてドナー（導入遺伝子）を挿入することが望ましい任意の遺伝子における標的部位に特異的に結合する DNA 結合ドメインを含む。

【0089】

融合分子

DNA 結合ドメインは、本明細書に記載される方法での使用のために任意の追加の分子（例えば、ポリペプチド）に融合していてもよい。ある特定の実施形態において、本方法は、少なくとも 1 つの DNA 結合分子（例えば、ZFP、TAL-E またはシングルガイド RNA）および異種調節（機能的）ドメイン（またはそれらの機能的な断片）を含む融合分子を採用する。

【0090】

ある特定の実施形態において、機能的ドメインは、転写調節ドメインを含む。一般的なドメインには、例えば、転写因子ドメイン（活性化因子、抑制因子、共活性化因子、共抑制因子）、サイレンサー、癌遺伝子（例えば、myc、jun、fos、myb、max、mad、rel、ets、bcl、myb、mos ファミリーメンバー等）；DNA 修復酵素およびそれらの関連因子と修飾因子；DNA 再配列酵素およびそれらの関連因子と修飾因子；クロマチン関連タンパク質およびそれらの修飾因子（例えば、キナーゼ、アセチラーゼ、およびデアセチラーゼ）；ならびに DNA 修飾酵素（例えば、メチルトランスフェラーゼ、トポイソメラーゼ、ヘリカーゼ、リガーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ）およびそれらの関連因子と修飾因子が含まれる。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第 20130253040 号を参照されたい。

【0091】

活性化を達成するのに好適なドメインには、HSV VP16 活性化ドメイン（例えば、Hagmann et al., J. Virol. 71, 5952-5962 (1997)）、核内ホルモン受容体（例えば、Torchia et al., Curr. Opin. Cell Biol. 10: 373-383 (1998) を参照されたい）；核内

因子カッパBのp65サブユニット(Bitko & Barik, J. Virol. 72: 5610-5618 (1998) およびDoyle & Hunt, Neuroreport 8: 2937-2942 (1997))、Liu et al., Cancer Gene Ther. 5: 3-28 (1998))、またはVP64等の人工キメラ機能的ドメイン(Beerli et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 14623-33)、およびデグロン(Molinari et al., (1999) EMBO J. 18: 6439-6447)が含まれる。さらなる例となる活性化ドメインには、Oct 1、Oct-2A、Sp1、AP-2、およびCTF1(Seipel et al., EMBO J. 11, 4961-4968 (1992) ならびにp300、CBP、PCAF、SRC1 PvALF、AthD2A、およびERF-2が含まれる。例えば、Robyr et al. (2000) Mol. Endocrinol. 14: 329-347、Collingwood et al. (1999) J. Mol. Endocrinol. 23: 255-275、Leo et al. (2000) Gene 245: 1-11、Manteuffel-Cyborowska (1999) Acta Biochim. Pol. 46: 77-89、McKenna et al. (1999) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 69: 3-12、Malik et al. (2000) Trends Biochem. Sci. 25: 277-283、およびLemon et al. (1999) Curr. Opin. Genet. Dev. 9: 499-504を参照されたい。さらなる例となる活性化ドメインには、OsGAI、HALF-1、C1、AP1、ARF-5、-6、-7、および-8、CPRF1、CPRF4、MYC-RP/GP、ならびにTRAB1が含まれるが、これらに限定されない。例えば、Ogawa et al. (2000) Gene 245: 21-29; Okanami et al. (1996) Genes Cells 1: 87-99、Goff et al. (1991) Genes Dev. 5: 298-309、Cho et al. (1999) Plant Mol. Biol. 40: 419-429、Ulmason et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 5844-5849、Sprenger-Haussels et al. (2000) Plant J. 22: 1-8、Gong et al. (1999) Plant Mol. Biol. 41: 33-44、およびHobo et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 15, 348-15, 353を参照されたい。

【0092】

例となる抑制ドメインには、KRAB A/B、KOX、TGF-誘導性初期遺伝子(TIEG)、v-erbA、SID、MBD2、MBD3、DNMTファミリーのメンバー(例えば、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B)、Rb、およびMeCP2が含まれるが、これらに限定されない。例えば、Bird et al. (1999) Cell 99: 443-446、Knoepfler et al. (1999) Cell 99: 447-450、およびRobertson et al. (2000) Nature Genetics 25: 338-342が含まれるが、これらに限定されない。さらなる例となる抑制ドメインには、ROM2およびAthD2Aが含まれるが、これらに限定されない。例えば、Chem et al. (1996) Plant Cell 8: 305-321、およびWu et al. (2000) Plant J. 22: 19-27を参照されたい。

【0093】

融合分子は、当業者に周知であるクローニングおよび生化学的共役方法によって構築される。融合分子は、DNA結合ドメインおよび機能的ドメイン(例えば、転写活性化または抑制ドメイン)を含む。融合分子はまた任意に、核局在化シグナル(例えば、SV40中型T抗原からのもの等)およびエピトープタグ(例えば、FLAGおよびヘマグルチニン等)を含む。融合タンパク質(およびそれらをコードする核酸)は、融合物の構成要素

10

20

30

40

50

の中でも翻訳リーディングフレームが保存されるように設計される。

【0094】

一方の機能的ドメイン（またはその機能的断片）のポリペプチド構成要素と、他方の非タンパク質DNA結合ドメイン（例えば、抗生物質、インターフェーザー、副溝結合剤、核酸）との間の融合物は、当業者に既知の生化学的共役方法によって構築される。例えば、Pierce Chemical Company (Rockford, IL) Catalogueを参照されたい。副溝結合剤とポリペプチドとの間の融合物を作製するための方法および組成物が記載されている。Mapp et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 3930-3935。

【0095】

当業者に既知であるが、融合分子は、薬学的に許容される担体と共に製剤化されてもよい。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1985、および譲受人共通の国際公開第WO00/42219号を参照されたい。

【0096】

融合分子の機能的構成要素／ドメインは、一旦、融合分子がそのDNA結合ドメインを介して標的配列に結合すると遺伝子の転写に影響を及ぼすことが可能な、多様な異なる構成要素のうちのいずれからも選択することができる。よって、機能的構成要素には、活性化因子、抑制因子、共活性化因子、共抑制因子、およびサイレンサー等の種々の転写因子ドメインが含まれ得るが、これらに限定されない。

【0097】

ある特定の実施形態において、融合タンパク質は、DNA結合ドメインとヌクレアーゼドメインとを含むことにより、それらの操作された（ZFPまたはTALE）DNA結合ドメインを介してそれらの意図した核酸標的を認識することができる機能的な実体をもたらし、さらに、ヌクレアーゼ活性を介してDNA結合部位の近くでDNAを切断するヌクレアーゼ（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼまたはTALEヌクレアーゼ）をもたらすことができる。

【0098】

故に、本明細書に記載される方法および組成物は、広く適用可能であり、任意の目的ヌクレアーゼを伴ってもよい。ヌクレアーゼの非限定的な例としては、メガヌクレアーゼ、TALEN、およびジンクフィンガーヌクレアーゼが挙げられる。ヌクレアーゼは、異種のDNA結合および切断ドメイン（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN、異種の切断ドメインを有するメガヌクレアーゼDNA結合ドメイン）を含んでもよく、または代替的に、天然型ヌクレアーゼのDNA結合ドメインが、選択された標的部位に結合するように改変されてもよい（例えば、同族の結合部位とは異なる部位に結合するように遺伝子操作されたメガヌクレアーゼ）。

【0099】

ヌクレアーゼドメインは、任意のヌクレアーゼ、例えば任意のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼ由来でもよい。本明細書に記載されるHttのDNA結合ドメインに融合され得る好適なヌクレアーゼ（切断）ドメインの非限定的な例としては、任意の制限酵素からのドメイン、例えばタイプIIS制限酵素（例えば、FokI）が挙げられる。ある特定の実施形態において、切断ドメインは、切断活性のために二量体化を必要とする半分の切断ドメインである。例えば、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる米国特許第8,586,526号；同第8,409,861号および同第7,888,121号を参照されたい。一般に、融合タンパク質が切断ハーフドメインを含む場合、切断のために2つの融合タンパク質が必要である。代替的に、2つの切断ハーフドメインを含む単一のタンパク質を使用することができる。2つ切断ハーフドメインは、同じエンドヌクレアーゼ（またはその機能的断片）に由来し得るか、または各切断ハーフドメインは、異なるエンドヌクレアーゼ（またはその機能的断片）に由来し得る。加えて、2つの融合タンパク質のそれぞれの標的部位への結合が、例えば、二量体化によって、切断ハーフ

10

20

30

40

50

ドメインが機能的切断ドメインを形成することを可能にする互いの空間的定位に切断ハーフドメインを配置するように、2つの融合タンパク質のための標的部位は互いに対し好ましく配置される。

【0100】

またヌクレアーゼドメインは、切断活性を有し、本明細書に記載されるヌクレアーゼとともに使用することも可能な任意のメガヌクレアーゼ（ホーミングエンドヌクレアーゼ）ドメイン由来であってもよく、I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevIIおよびI-TevIIIを含むが、これらに限定されない。

10

【0101】

ある特定の実施形態において、ヌクレアーゼは、コンパクトTALEN(cTALEN)を含む。これらは、TALEのDNA結合ドメインをTevIヌクレアーゼドメインに連結する単一鎖の融合タンパク質である。融合タンパク質は、TALE領域によって局在化されたニッカーゼとして作用することもできるし、またはTALEのDNA結合ドメインが、メガヌクレアーゼ（例えば、TevI）ヌクレアーゼドメインに対してどこに配置されているかに応じて、二本鎖切断を行うことができる（Beurdeleyら（2013年）Nat Comm: 1~8 DOI: 10.1038/ncomms2782を参照されたい）。

20

【0102】

他の実施形態において、TALE-ヌクレアーゼは、メガTALEである。これらのメガTALEヌクレアーゼは、TALEのDNA結合ドメインおよびメガヌクレアーゼの切断ドメインを含む融合タンパク質である。メガヌクレアーゼ切断ドメインは、単量体として活性であり、活性のために二量体化を必要としない。（Boisselら、（2013年）Nucl Acid Res: 1~13巻、doi: 10.1093/nar/gkt1224を参照されたい）。

20

【0103】

加えて、メガヌクレアーゼのヌクレアーゼドメインはまた、DNA結合機能を示す場合もある。任意のTALENは、追加のTALEN（例えば、1つもしくは複数のメガTALEを有する1つもしくは複数のTALEN(cTALENもしくはFokI-TALEN)ならびに/またはZFNと組み合わせて使用してもよい。

30

【0104】

加えて、切断ドメインは、例えばオフターゲットの切断作用を低減または排除する絶対ヘテロ二量体の形成のために、野生型と比較して1つまたは複数の変更を含んでいてよい。例えば、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる米国特許第7,914,796号；同第8,034,598号；および同第8,623,618号を参照されたい。

【0105】

本明細書に記載されるヌクレアーゼは、二本鎖標的（例えば、遺伝子）において二本鎖または一本鎖切断を起こすことができる。一本鎖切断（「ニック」）の発生は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,703,489号で記載されており、これは、ヌクレアーゼドメインの1つにおける触媒ドメインの変異がどのようにニッカーゼをもたらすのかを記載している。

40

【0106】

したがって、ヌクレアーゼ（切断）ドメインまたは半分の切断ドメインは、切断活性を保持するか、または多量体化（例えば、二量体化）して機能的な切断ドメインを形成する能力を保持するタンパク質の任意の部分であってもよい。

【0107】

代替的に、ヌクレアーゼは、いわゆる「スプリット酵素」技術を使用して、核酸標的部位においてインビボで組み立てられてもよい（例えば、米国特許公開第20090068164号を参照されたい）。かかるスプリット酵素の構成要素は、別個の発現構築物上で

50

発現されてもよく、または、1つのオープンンリーディングフレーム内に連結させることができ、個々の構成要素は、例えば、自己切断2AペプチドまたはIRES配列によって分離される。構成要素は、個々のジンクフィンガー結合ドメイン、またはメガヌクレアーゼ核酸結合ドメインのドメインであってもよい。

【0108】

ヌクレアーゼは、使用前に、例えば米国特許公開第20090111119号で記載されるような酵母ベースの染色体系で、活性に関してスクリーニングすることができる。ヌクレアーゼ発現構築物は、当技術分野において公知の方法を使用して容易に設計することができる。

【0109】

融合タンパク質の発現は、構成的プロモーターまたは誘導的プロモーター、例えば、ラフィノースおよび/またはガラクトースの存在下で活性化（抑制解除）され、グルコースの存在下で抑制されるガラクトキナーゼプロモーターの調節下にあってもよい。ある特定の実施形態において、プロモーターは、例えば高親和性結合部位の包含により、融合タンパク質の発現を自己制御する。例えば、2014年3月18日に出願された米国特許出願第61,955,002号を参照されたい。

10

【0110】

送達

本明細書に記載されるタンパク質および/またはポリヌクレオチド（例えば、ZFP、TALE、CRISPR/Cas）、ならびにタンパク質および/またはポリヌクレオチドを含む組成物は、例えば、mRNAを介したタンパク質の注入、および/または発現構築物（例えば、プラスミド、レンチウイルスベクター、AAVベクター、Adベクターなど）の使用を含む任意の好適な手段で標的細胞に送達されてもよい。

20

【0111】

本明細書に記載されるジンクフィンガータンパク質を含むタンパク質を送達する方法は、例えば、米国特許第6,453,242号、同第6,503,717号、同第6,534,261号、同第6,599,692号、同第6,607,882号、同第6,689,558号、同第6,824,978号、同第6,933,113号、同第6,979,539号、同第7,013,219号、および同第7,163,824号に記載され、これらの全ての開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0112】

プラスミドベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクター等を含むが、これらに限定されない、任意のベクター系が使用されてもよい。また、米国特許第8,586,526号、第6,534,261号、同第6,607,882号、同第6,824,978号、同第6,933,113号、同第6,979,539号、同第7,013,219号、および同第7,163,824号も参照されたく、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。さらに、これらのベクターのいずれも、1つ以上のDNA結合タンパク質コード配列を含み得ることが明らかとなろう。故に、1つ以上のZFP、TALE、またはCRISPR/Casタンパク質が細胞に導入されるとき、ZFP、TALE、またはCRISPR/Casタンパク質をコードする配列は、同じベクター上または異なるベクター上に担持されてもよい。複数のベクターが使用されるとき、各ベクターは、1つまたは複数のZFP、TALE、またはCRISPR/Cas系をコードする配列を含んでもよい。

40

【0113】

従来のウイルスおよび非ウイルスベースの遺伝子導入方法を使用して、操作されたZFP、TALE、またはCRISPR/Cas系をコードする核酸を細胞（例えば、哺乳類細胞）および標的組織に導入することができる。かかる方法をまた使用して、ZFP、TALE、またはCRISPR/Cas系をコードする核酸を細胞にインビトロで投与することもできる。ある特定の実施形態において、ZFP、TALE、またはCRISPR/

50

Cas系をコードする核酸は、インビボまたはエクスピボ遺伝子治療用途のために投与される。非ウイルスベクター送達系は、DNAプラスミド、裸の核酸、およびリポソームまたはポロキサマー等の送達ビヒクルと複合体化された核酸を含む。ウイルスベクター送達系は、細胞への送達後にエピソームのゲノムまたは組み込まれたゲノムのいずれかを有するDNAおよびRNAウイルスを含む。遺伝子治療手順の概説については、Anderson, Science 256: 808-813 (1992)、Nabel & Felgner, TIBTECH 11: 211-217 (1993)、Mitanis & Caskey, TIBTECH 11: 162-166 (1993)、Dillon, TIBTECH 11: 167-175 (1993)、Miller, Nature 357: 455-460 (1992)、Van Brunt, Biotechnology 6 (10) : 1149-1154 (1988)、Vigne, Restorative Neurology and Neuroscience 8: 35-36 (1995)、Kremser & Perricaudet, British Medical Bulletin 51 (1) : 31-44 (1995)、Haddada et al., in Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Boehm (eds.) (1995)、およびYuet al., Gene Therapy 1: 13-26 (1994)を参照されたい。

【0114】

核酸の非ウイルス性送達の方法には、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、バイオリストイック、ビロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン、または脂質：核酸複合体、裸のDNA、裸のRNA、人工ビリオン、および薬剤によって強化されたDNAの取り込みを含む。例えば、Sonitron 2000システム (Rich-Mar) を使用したソノポレーションも、核酸の送達のために使用することができる。好ましい実施形態において、1つ以上の核酸は、mRNAとして送達される。また、キャップ付加されたmRNAの使用により翻訳効率および/またはmRNA安定性を増加させることも好ましい。特に、ARCA (抗逆方向キャップ類似体 (anti-reverse cap analog)) キャップまたはその変異体が好ましい。米国特許US7074596およびUS8153773を参照されたく、参照により本明細書に組み込まれる。

【0115】

さらなる例となる核酸送達系には、Amaxa Biosystems (Cologne, Germany), Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland)、BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA)、およびCopernicus Therapeutics Inc.によって提供されるものが含まれる（例えば、米国公開特許第6008336号を参照されたい）。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号、同第4,946,787号、および同第4,897,355号）に記載されており、リポフェクション試薬は、市販されている（例えば、Transfectam（商標）およびLipofectin（商標）およびLipofectamine（商標）RNAiMAX）。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに好適である、陽イオン性脂質および中性脂質は、Felgner、国際公開第WO91/17424号、同第WO91/16024号のものを含む。送達は、細胞（エクスピボ投与）または標的組織（インビボ投与）へのものであり得る。

【0116】

免疫脂質複合体等の標的化リポソームを含む脂質：核酸複合体の調製は、当業者に周知である（例えば、Crystal, Science 270: 404-410 (1995)、Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2: 291-297 (1995)、Behr et al., Bioconjugate Chem. 5: 382-389 (1994)、Remy et al., Bioconjugate Chem. 5: 647-654 (1994)、Gao et al., Gene The

10

20

30

40

50

rapy 2 : 710 - 722 (1995)、Ahmad et al. , Cancer Res. 52 : 4817 - 4820 (1992)、米国特許第4,186,183号、同第4,217,344号、同第4,235,871号、同第4,261,975号、同第4,485,054号、同第4,501,728号、同第4,774,085号、同第4,837,028号、および同第4,946,787号を参照されたい)。

【0117】

さらなる送達方法は、送達対象の核酸をEnGeneIC送達ビヒクル(EDV)にパッケージングする使用法を含む。これらのEDVは、二重特異性抗体を用いて標的組織に特異的に送達され、その抗体の一方のアームは、標的組織に対する特異性を有し、他方のアームは、EDVに対する特異性を有する。抗体は、EDVを標的細胞表面に運び、次いで、エンドサイトーシスによりEDVが細胞内に取り込まれる。一旦、細胞内に取り込まれると、その内容物が放出される(MacDiarmid et al (2009) Nature Biotechnology 27 (7) : 643を参照されたい)。

10

【0118】

操作されたZFP、TALE、またはCRISPR/Cas系をコードする核酸を送達するためのRNAまたはDNAウイルスベースの系の使用は、ウイルスの標的を体内の特定の細胞に定め、ウイルスのペイロードを核に輸送するための高度に進化したプロセスを活用する。ウイルスベクターは、患者に直接投与することができるか(インビボ)、またはそれらは、インビトロで細胞を治療するために使用することができ、修飾細胞が患者に投与される(エクスピボ)。ZFP、TALE、またはCRISPR/Cas系を送達するための従来のウイルスベースの系には、遺伝子導入のためのレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス、および単純ヘルペスウイルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。宿主ゲノムへの組み込みは、レトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノ随伴ウイルスによる遺伝子導入方法を用いて可能であり、挿入された導入遺伝子の長期発現をもたらすことが多い。さらに、多くの異なる細胞型および標的組織において、高い導入効率が観察されている。

20

【0119】

レトロウイルスの指向性は、外来性エンベローペタンパク質を組み込むことによって改変することができ、標的細胞の可能性のある標的集団を拡張する。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞を形質導入するかまたは感染させることができあり、かつ典型的には高いウイルス力値を生じるレトロウイルスベクターである。レトロウイルス遺伝子導入系の選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、最大6~10kbの外来性配列のパッケージング能力を有する、シス作用性の長い末端反復からなる。ベクターの複製およびパッケージングには、最小限のシス作用性LTRが十分であり、次いでそれらを使用して、治療用遺伝子を標的細胞に組み込んで恒久的な導入遺伝子の発現を提供する。広く使用されているレトロウイルスベクターには、マウス白血病ウイルス(MuLV)、テナガザル白血病ウイルス(GaLV)、サル免疫不全ウイルス(SIV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、およびそれらの組み合わせに基づくものが含まれる(例えば、Buchscher et al. , J. Virol. 66 : 2731 - 2739 (1992)、Johann et al. , J. Virol. 66 : 1635 - 1640 (1992)、Sommerfelt et al. , Virol. 176 : 58 - 59 (1990)、Wilson et al. , J. Virol. 63 : 2374 - 2378 (1989)、Miller et al. , J. Virol. 65 : 2220 - 2224 (1991)、PCT/米国公開第94/05700号を参照されたい)。

30

【0120】

一過性の発現が好ましい用途では、アデノウイルスベースの系を使用することができる。アデノウイルスベースのベクターは、多くの細胞型において非常に高い形質導入効率が可能であり、細胞分裂を必要としない。かかるベクターを用いて、高力値かつ高レベルの発現が得られている。このベクターは、比較的単純な系において大量に産生することができる。アデノ随伴ウイルス(「AAV」)ベクターもまた、例えば、核酸およびペプチド

40

50

のインビトロ產生において、ならびにインビボおよびエクスピボの遺伝子治療手順のために、標的核酸を用いて細胞に形質導入するために使用される（例えば、West et al. , *Virology* 160 : 38 - 47 (1987)、米国特許第4,797,368号、国際公開第WO93/24641号、Kotin, Human Gene Therapy 5 : 793 - 801 (1994)、Muzychuk, J. Clin. Invest. 94 : 1351 (1994)を参照されたい）。組換えAAVベクターの構築は、米国特許第5,173,414号、Tratschin et al. , Mol. Cell. Biol. 5 : 3251 - 3260 (1985)、Tratschin, et al. , Mol. Cell. Biol. 4 : 2072 - 2081 (1984)、Hermonat & Muzychuk, PNAS 81 : 6466 - 6470 (1984)、およびSamulski et al. , J. Virol. 63 : 03822 - 3828 (1989)を含む、いくつかの刊行物に記載される。
10

【0121】

現在のところ、少なくとも6つのウイルスベクターのアプローチが、臨床治験における遺伝子導入に利用可能であり、それらは、ヘルパー細胞株に挿入される遺伝子による欠陥ベクターの補完を伴うアプローチを利用して、形質導入剤を生成する。

【0122】

pLASNおよびMFG-Sは、臨床治験に使用してきたレトロウイルスベクターの例である (Dunbar et al. , Blood 85 : 3048 - 305 (1995)、Kohn et al. , Nat. Med. 1 : 1017 - 102 (1995)、Malech et al. , PNAS 94 : 22 12133 - 12138 (1997))。PA317/pLASNは、遺伝子治療治験で使用された最初の治療用ベクターであった。(Blaese et al. , Science 270 : 475 - 480 (1995))。MFG-Sをパッケージしたベクターについて50%以上の形質導入効率が観察されている。(Ellem et al. , Immunol Immunother. 44 (1) : 10 - 20 (1997)、Dranoff et al. , Hum. Gene Ther. 1 : 111 - 2 (1997))。

【0123】

組換えアデノ随伴ウイルスベクター(rAAV)は、欠損型および非病原性のパルボウイルスアデノ随伴2型ウイルスに基づく、有望な代替の遺伝子送達系である。全てのベクターは、導入遺伝子発現カセットに隣接するAAVの145bpの逆方向末端反復のみを保持するプラスミドに由来する。形質導入された細胞のゲノムへの組み込みに起因する効率的な遺伝子導入および安定した導入遺伝子送達が、このベクター系の主要な特長である。(Wagner et al. , Lancet 351 : 9117 1702 - 3 (1998)、Kearns et al. , Gene Ther. 9 : 748 - 55 (1996))。AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8AAV 8.2、AAV9、およびAAV rh10を含む他のAAV血清型、ならびにAAV2/8、AAV2/5、およびAAV2/6等のシードタイピングされたAAVもまた、本発明において使用することができる。

【0124】

複製欠損型組換えアデノウイルスベクター(Ad)は、高力価で產生することができ、いくつかの異なる細胞型に容易に感染する。ほとんどのアデノウイルスベクターは、導入遺伝子がAdE1a、E1b、および/またはE3遺伝子を置換するように操作され、その後、複製欠損型ベクターは、欠失した遺伝子機能をトランスポンスで供給するヒト293細胞内で伝播させられる。Adベクターは、例えば、肝臓、腎臓、および筋肉中に見出されるもの等の非分裂の分化細胞を含む、複数の種類の組織にインビボで形質導入することができる。従来のAdベクターは、高い輸送能力を有する。臨床治験におけるAdベクターの使用の例は、筋肉内注射を用いた抗腫瘍免疫のためのポリヌクレオチド治療を伴った (Sterman et al. , Hum. Gene Ther. 7 : 1083 - 9 (1998))。臨床治験における遺伝子導入のためのアデノウイルスベクターの使用のさらなる
30
40
50

例としては、Rosenacker et al., Infection 24: 1 5 - 10 (1996)、Sterman et al., Hum. Gene Ther. 9: 7 1083 - 1089 (1998)、Welsh et al., Hum. Gene Ther. 2: 205 - 18 (1995)、Alvarez et al., Hum. Gene Ther. 5: 597 - 613 (1997)、Topf et al., Gene Ther. 5: 507 - 513 (1998)、Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7: 1083 - 1089 (1998) が挙げられる。

【0125】

パッケージング細胞を使用して、宿主細胞を感染させることが可能であるウイルス粒子が形成される。かかる細胞には、アデノウイルスをパッケージングする 293 細胞、およびレトロウイルスをパッケージングする 2 細胞または PA317 細胞が含まれる。遺伝子治療に使用されるウイルスベクターは、通常、核酸ベクターをウイルス粒子中にパッケージングする産生細胞株によって生成される。ベクターは、典型的には、パッケージングおよびその後の宿主への組込みに必要な最小限のウイルス配列を含有し（該当する場合）、他のウイルス配列が、発現対象のタンパク質をコードする発現カセットによって置換される。欠落したウイルス機能は、パッケージング細胞株によってトランスで供給される。例えば、遺伝子治療に使用されるAAVベクターは、典型的には、宿主ゲノムへのパッケージングおよび組込みに必要とされる、AAVゲノムからの逆方向末端反復（ITR）配列のみを有する。ウイルスDNAが細胞株にパッケージングされ、それは他のAAV遺伝子、つまりrepおよびcapをコードするが、ITR配列が欠如しているヘルパープラスミドを含有する。細胞株はまた、ヘルパーとしてのアデノウイルスにも感染させられる。ヘルパーウイルスは、AAVベクターの複製およびヘルパープラスミドからのAAV遺伝子の発現を促進する。このヘルパープラスミドは、ITR配列の欠如に起因して、相当な量ではパッケージングされない。アデノウイルスによる汚染は、例えば、AAVよりもアデノウイルスのほうがより感受性の高い熱処理によって、低減することができる。

【0126】

多くの遺伝子治療の用途において、遺伝子治療ベクターが、特定の組織型に対する高度の特異性をもって送達されることが望ましい。したがって、ウイルスベクターは、ウイルスの外表面上のウイルスコートタンパク質との融合タンパク質としてリガンドを発現させることによって、所与の細胞型に対する特異性を有するように修飾することができる。リガンドは、目的の細胞型上に存在することが知られている受容体に対する親和性を有するように選定される。例えば、Han et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9747 - 9751 (1995) は、モロニーマウス白血病ウイルスを、gp70 に融合されたヒトヘレグリンを発現するように修飾することができ、その組換えウイルスが、ヒト上皮成長因子受容体を発現するある特定のヒト乳癌細胞に感染することを報告した。この原理は、標的細胞が受容体を発現し、ウイルスが細胞表面受容体に対するリガンドを含む融合タンパク質を発現する、他のウイルス標的細胞対にまで拡張することができる。例えば、纖維状ファージは、実質的にいかなる選定された細胞受容体に対しても特異的結合親和性を有する抗体断片（例えば、FAB または Fv）を提示するように、操作することができる。上記の説明は、主としてウイルスベクターに適用されるが、同じ原理を非ウイルスベクターに適用することができる。かかるベクターは、特異的な標的細胞による取り込みを選好する特異的な取り込み配列を含有するように操作することができる。

【0127】

遺伝子治療ベクターは、下に記載されるように、典型的には、全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、もしくは頭蓋内注入）または局所適用による個々の患者への投与によって、インピボで送達することができる。代替的に、ベクターは、個々の患者から外植された細胞（例えば、リンパ球、骨髄穿刺液、組織生検）または万能ドナー造血幹細胞等の細胞にエクスピボで送達することができ、続いて、通常はベクターを組み込んだ細胞の選択後に、細胞が患者に再移植される。

10

20

30

40

50

【0128】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載される組成物（例えば、ポリヌクレオチドおよび／またはタンパク質）は、インピボで直接送達される。組成物（細胞、ポリヌクレオチドおよび／またはタンパク質）は、これらに限定されないが、脳または脊髄への直接注射を含む中枢神経系（CNS）への直接投与であってもよい。これらに限定されないが、海馬、黒質、マイネルト基底核（NBM）、線条体および／または皮質を含む脳の1つまたは複数の領域が、標的化されてもよい。CNS送達の代りに、またはそれに加えて、組成物は、全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、心臓内、筋肉内、髄腔内、真皮下、および／または頭蓋内注入）されてもよい。本明細書に記載される組成物を被験体に直接送達するための（CNSへの直接送達を含む）方法および組成物は、ニードルアセンブリを介した直接注射（例えば、定位的注射）を含むが、これらに限定されない。このような方法は、例えば、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、脳への組成物（発現ベクターを含む）の送達に関する米国特許第7,837,668号；同第8,092,429号、および米国特許公開第20060239966号に記載される。

10

【0129】

診断、研究のため、または遺伝子治療のための（例えば、宿主生物へのトランスフェクトされた細胞の再注入を介した）エクスピボ細胞トランスフェクションは、当業者に周知である。好ましい実施形態において、細胞は、対象生物から単離され、ZFP、TALE、またはCRISPR/Cas系核酸でトランスフェクトされ（遺伝子・cDNAまたはmRNA）、対象生物（例えば、患者）に再注入される。好ましい実施形態において、1つ以上の核酸は、mRNAとして送達される。また、キャップ付加されたmRNAの使用により翻訳効率および／またはmRNA安定性を増加させることも好ましい。特に、ARCA（抗逆方向キャップ類似体（anti-reverse cap analog））キャップまたはその変異体が好ましい。米国特許第7,074,596号および同第8,153,773号を参照されたく、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。エクスピボトランスフェクションに好適な種々の細胞型は、当業者に周知である（例えば、Freshney et al., Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)）、ならびに患者からの細胞の単離および培養方法の考察についてはその中で引用される参考文献を参照されたい）。

20

【0130】

一実施形態において、細胞トランスフェクションおよび遺伝子治療のために幹細胞がエクスピボ手順で使用される。幹細胞を使用することの利点は、それらがインピトロで他の細胞型に分化し得るか、または哺乳動物（細胞のドナー等）に導入され得、それらがその骨髄中で生着することである。GM-CSF、IFN-、およびTNF-等のサイトカインを使用して、CD34+細胞を臨床的に重要な免疫細胞型へとインピトロで分化させるための方法が知られている（Inaba et al., J. Exp. Med. 176:1693-1702 (1992)を参照されたい）。

30

【0131】

幹細胞は、形質導入および分化のために、既知の方法を使用して単離される。例えば、幹細胞は、骨髄細胞を、CD4+およびCD8+（T細胞）、CD45+（汎B細胞）、GR-1（顆粒球）、およびIad（分化抗原提示細胞）等の、所望されない細胞に結合する抗体でパンニングすることによって、骨髄細胞から単離される（Inaba et al., J. Exp. Med. 176:1693-1702 (1992)を参照されたい）。

40

【0132】

修飾された幹細胞もまた、いくつかの実施形態において使用され得る。例えば、アポトーシスへの耐性を与えられたニューロン幹細胞が治療用組成物として使用されてもよく、その幹細胞はまた、本発明のZFP-TFも含有する。アポトーシスへの耐性は、幹細胞内でBAXまたはBAK特異的TALENまたはZFNを使用してBAXおよび／または

50

B A Kをノックアウトすることによって（米国特許第8,597,912号を参照されたい）、または例えばカスパーゼ-6特異的Z F Nを再び使用してカスパーゼにおいて妨害されるものによって、生じ得る。これらの細胞は、変異または野生型H t tを制御することが知られているZ F P T FまたはT A L E T Fでトランスフェクトすることができる。

【0133】

治療用Z F P核酸を含有するベクター（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、リポソーム等）はまた、インビオでの細胞の形質導入のために生物に直接投与することもできる。代替的に、裸のD N Aを投与することができる。投与は、注射、注入、局所適用、およびエレクトロポレーションを含むが、これらに限定されない、血液または組織細胞との最終的な接触に分子を導入するために通常使用される経路のうちのいずれかによる。かかる核酸を投与する好適な方法は、利用可能かつ当業者に周知であり、特定の組成物を投与するために1つを超える経路が使用されてもよいが、特定の経路が、別の経路より即時的かつより効果的な反応を提供できる場合が多い。

10

【0134】

造血幹細胞へのD N Aの導入のための方法は、例えば、米国特許第5,928,638号に開示される。造血幹細胞、例えば、C D 3 4⁺細胞への導入遺伝子の導入に有用なベクターには、アデノウイルス35型が含まれる。

20

【0135】

免疫細胞（例えば、T細胞）への導入遺伝子の導入に好適なベクターには、非組み込み型レンチウイルスベクターが含まれる。例えば、O r y e t a l . (1 9 9 6) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 3 : 1 1 3 8 2 - 1 1 3 8 8 、 D u l l e t a l . (1 9 9 8) J . V i r o l . 7 2 : 8 4 6 3 - 8 4 7 1 、 Z u f f e r y e t a l . (1 9 9 8) J . V i r o l . 7 2 : 9 8 7 3 - 9 8 8 0 、 F o l l e n z i e t a l . (2 0 0 0) N a t u r e G e n e t i c s 2 5 : 2 1 7 - 2 2 2 を参照されたい。

20

【0136】

薬学的に許容される担体は、部分的に、投与されている特定の組成物によって、ならびに組成物を投与するために使用される特定の方法によって、決定される。したがって、下に記載されるように、多種多様な好適な医薬組成物の製剤が利用可能である（例えば、R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s , 1 7 t h e d . , 1 9 8 9 を参照されたい）。

30

【0137】

上述のように、開示される方法および組成物は、原核細胞、真菌細胞、古細菌細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞、脊椎動物細胞、哺乳類細胞、およびヒト細胞を含むが、これらに限定されない、任意の種類の細胞内で使用することができる。タンパク質発現に好適な細胞株は、当業者に知られており、C O S、C H O（例えば、C H O - S、C H O - K 1、C H O - D G 4 4、C H O - D U X B 1 1）、V E R O、M D C K、W I 3 8、V 7 9、B 1 4 A F 2 8 - G 3、B H K、H a K、N S 0、S P 2 / 0 - A g 1 4、H e L a、H E K 2 9 3（例えば、H E K 2 9 3 - F、H E K 2 9 3 - H、H E K 2 9 3 - T）、p e r C 6、ヨトウガ（S f）等の昆虫細胞、ならびにサッカロミセス属、ピチア属、およびシゾサッカロミセス属等の真菌細胞を含むが、これらに限定されない。これらの細胞株の子孫、変異体、および誘導体もまた使用することができる。

40

【0138】

投与される有効量は、患者間で、ならびに投与様式および投与部位に従って異なる。したがって、有効量は、組成物を投与する医師によって最もよく決定され、適切な投与量は、当業者により容易に決定することができる。組み込みおよび発現に十分な時間（典型的には、例えば4～15日）を与えた後、治療用ポリペプチドの血清または他の組織レベルを分析し、投与前の最初のレベルと比較することによって、投与される量が低すぎるか、正しい範囲内であるか、または高すぎるかを決定する。また最初の投与および後続の投与

50

にとって好適なレジメンも変更可能であるが、最初の投与、その後に必要に応じて後続の投与が典型的である。後続の投与は、毎日から、毎年～数年毎までの範囲の多様な間隔で投与されてもよい。ある特定の実施形態において。

【0139】

アデノ随伴ウイルス(A A V)ベクターを使用して Z F P をヒト脳に直接送達するために、線条体 1 つ当たりベクターゲノム $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{12}$ 個(またはその間の任意の値)の用量範囲を適用することができる。述べたように、投与量は、他の脳構造の場合、および異なる送達プロトコールの場合、異なっていてもよい。

【0140】

用途

本明細書に記載される H t t 結合分子(例えば、Z F P 、 T A L E 、 C R I S P R / C a s 系、 T t a g o など)、およびそれらをコードする核酸は、様々な用途に使用することができる。これらの用途としては、H t t 結合分子(D N A 結合タンパク質をコードする核酸を含む)を被験体に投与して、被験体内の標的遺伝子の発現を調節するのに使用する治療方法が挙げられる。調節は、抑制、例えば、 H D の病状に寄与する m H t t の抑制の形態であってもよい。代替的に、内因性の細胞遺伝子の発現の活性化または発現の増加が病状を緩和することができる場合、調節は、活性化の形態であってもよい。依然としてさらなる実施形態において、調節は、例えば変異体 H t t 遺伝子の不活性化のため、切断(例えば、1種または複数のヌクレアーゼによる)であってもよい。上記のように、このような用途のために、H t t 結合分子、またはより典型的には、それらをコードする核酸は、薬学的に許容される担体と共に医薬組成物として製剤化される。

10

20

30

40

50

【0141】

H t t 結合分子、またはそれらをコードするベクターは、単独で、または他の好適な構成要素(例えばリポソーム、ナノ粒子または当技術分野において公知の他の構成要素)と組み合わせて、吸入によって投与されるエアロゾル製剤にことができる(すなわち、それらは「霧状」にことができる)。エアロゾル製剤は、例えばジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの加圧された許容できる噴射剤に入れられていてもよい。例えば静脈内、筋肉内、皮内、および皮下経路などによる、非経口投与に好適な製剤としては、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および製剤を対象となる受容者の血液と等張にする溶質を含有し得る水性および非水性の等張滅菌注射液、ならびに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、および保存剤を含み得る水性および非水性の滅菌懸濁液が挙げられる。組成物は、例えば、静脈内注入、経口、局所、腹腔内、膀胱内または髄腔内に投与することができる。化合物の製剤は、単回投与または複数回投与用の密封容器、例えばアンプルおよびバイアル中で提供されてもよい。注射液および懸濁液は、既述の種類の滅菌された粉末、顆粒、および錠剤から調製することができる。

【0142】

患者に投与される用量は、時間の経過とともに患者に有益な治療応答をもたらすのに十分な用量であるべきである。用量は、採用される特定の H t t 結合分子の有効性および K d 、標的細胞、ならびに患者の状態、加えて処置される患者の体重または体表面積によって決定される。また用量の規模は、特定の患者における特定の化合物またはベクターの投与に付随する任意の有害な副作用の存在、性質、および程度によっても決定される。

【0143】

他の用途において、本明細書に記載される分子の有効性は、患者における、例えば脳脊髄液(C S F)などの試料における m H T T タンパク質の量を測定するように設計された検出方法を使用して分析される。例えば、 Wildら(2014年) J. Neurol. Neurosurg.

Psychiatry 85巻: 10号に記載されるような超高感度イムノアッセイを使用して、患者試料における H D に関連する変異体 H t t タンパク質の存在を検出(および/または定量)することができる。ある特定の実施形態において、 C S F 中の m H t t レベルにおける変化の検出は、本明細書に記載される H D 治療(例えば、 Z F P 、 T A L E など)に応答して被験体における H D の進行を決定するための診断を提供する。

【0144】

イムノアッセイを含む診断アッセイを行うための任意の好適な様式を使用することができる。例えば、ELISAプレート上に、捕獲試薬（例えば抗体、受容体など）を固定することができる。代替的に、磁気粒子スキャニングなどの当技術分野において公知の方法による定量のために、チップ上での超高感度免疫検出で検出試薬が使用される（例えばCornagliaら（2014年）Anal. Chem. 86巻（16号）：8213～23頁を参照されたい）。検出試薬は、結合が起こり得る条件下で、変異体Httタンパク質を含有する疑いのある試料と接触させ、定量は、当技術分野において公知の方法で行われる。

【0145】

それゆえに、mHTTレベルは疾患負荷スコアおよび疾患進行に伴う濃度レベルの増加と関連することから、CSFまたは他の患者試料におけるmHttの検出は、HDにおけるHtt結合分子治療の有効性を監視することを可能にし、同様にHDの神経病理生物学に対する処置の作用を研究する能力を助け、さらに本明細書に記載される疾患を改変するHD療法の臨床試験をサポートするのに使用することができる。

10

【0146】

以下の実施例は、Htt調節因子がジンクフィンガータンパク質またはCRISPR/Cas系を含む本開示の例示的な実施形態に関する。これは単なる例証の目的であることと、操作されたDNA結合ドメインと共に、これらに限定されないが、TALE-TF、追加のZFP、ZFN、TALEN、追加のCRISPR/Cas系、ホーミングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）を含む他のHtt調節物を使用することができることが理解されよう。

20

【実施例】

【0147】

（実施例1）

ZFP-TFは、培養されたHDニューロンの表現型を救済する

様々な研究から、HD患者由来の細胞における拡張したCAG反復に関連する表現型の変化、例えば、細胞内のATPレベルの低減および増殖因子の離脱に対する脆弱性の増加が示されてきた。例えば、Jung-Ilら（2012年）Biochemical Journal 446巻（3号）：359～371頁；HD IPSC Consortium（2012年）Cell Stem Cell 11巻（2号）：264～278頁；Anら（2012年）Cell Stem Cell 11巻（2号）：253～263頁を参照されたい。

30

【0148】

したがって、本発明者らは、患者由来のニューロンにおいて、Httの対立遺伝子特異的なZFP抑制因子の発現がこのような表現型を救済するのかどうかを評価した。簡単に言えば、Venus（GFP）およびZFP-TF 33074-KOX-2A-Venusのためのレンチウイルスベクターを、本明細書および米国特許公開第20130253040号に記載された通りに生成した。切断可能な2Aペプチドは、Venus（GFP）およびZFPを同じベクターから発現させることができ、ZFPを発現する細胞は、GFP発現によって同定することができる。レンチウイルスの発現構築物は、第3世代の自己不活性化HIVベースLVであった。CMVプロモーターの下流に2AリンカーおよびGFP-Venusと共にZFP-TFを挿入することによって、33074発現ベクターを構築した。GFP発現構築物は、CMVプロモーターの下流にGFP-Venusのみを含有する。リポフェクトアミン2000（Life Technologies）を使用した293T細胞の一過性トランスフェクションによって組換えLVを調製した。トランスフェクション後の48および72時間にウイルス上清を回収し、0.45μmフィルターを通過させて濾過し、その後、4、50,000×gで90分の超遠心分離によって（Optima L-80K分取超遠心分離機、Beckman Coulter）300倍に濃縮した。次いでウイルスのペレットをハンクス緩衝化塩溶液（Lonza）に再懸濁し、-80°Cで貯蔵した。ウイルスタイターを293T細胞の感染によって決定し、GFP-VENUS発現のフローサイトメトリー分析によって測定した。

40

50

【0149】

H D - E S C を、アキュターゼを用いて継代し、E 8 培地 (Life Technologies) 中のマトリゲルでコーティングしたプレート上で培養した。S tem P ro 神経誘導培地 (Life Technologies) を使用して神経幹細胞を誘導した。簡単に言えば、gel trex でコーティングした 6 ウェルのディッシュに E S C を細胞 2 0 0 , 0 0 0 個 / ウェルで植え付け、10 ~ 20 % の密集度になつたら培地を S tem P ro 神経誘導培地に変更した。2 日毎に培地を変更し、7 日目に N S C を回収して増やした。S tem P ro N S C S FM 培地 (Life Technologies) を使用して、H D - N S C および非 H D N S C を培養した (H I P (商標) G lobal s tem)。N S C を、gel trex でコーティングしたプレート上でアキュターゼを用いて継代した。B - 2 7 無血清サプリメントおよび G lut a M A X (商標) (Life Technologies) を含む Neurobasal 培地を含有する神経分化培地に培地を変更することにより、ニューロンの分化を誘導した。3 ~ 4 日毎に培地を交換した。

【0150】

V enus (G F P) および Z F P - T F 3 3 0 7 4 - K O X - 2 A - V enus のためのレンチウイルスベクターを用い、5 0 0 の M O I で、分化したニューロンに形質導入した。その後、上清を新しい神経分化培地で置き換え、培養物を最大 2 1 日間維持した。

【0151】

H D 患者 (C A G 1 7 / 4 8) または正常な被験体由来の培養したニューロンの細胞内の A T P レベルを、C ell T iter - G lo (登録商標) 発光アッセイ (Promega) を使用して測定し、各試料中の細胞数を、A pol i ve - G lo (登録商標) アッセイ (Promega) を使用して決定した。簡単に言えば、ニューロン中の細胞内の A T P レベルを、C ell T iter - G lo 発光アッセイ (Promega) を製造業者の指示に従つて使用して測定した。30 分後に、Perkin Elmer の Wallac 1 4 2 0 Victor 2 マイクロプレートリーダーで発光 (R L U) を測定し、A pol i ve - G lo アッセイ (Promega) を使用して蛍光 (A . U .) を測定することによって値をウェル中の細胞数に正規化した。次いで、異なる細胞 / 処置からの細胞 1 個当たりの A T P レベルの値を、m o c k 感染 H D ニューロンの値に正規化した。

【0152】

図 1 で示すように、m o c k 感染またはレンチ - G F P 感染 H D ニューロンは、非 H D (正常) ニューロンと比べて A T P の細胞内レベルを有意に低減させた。対照的に、レンチ - 3 3 0 7 4 - K O X - 2 A - G F P 感染は、H D ニューロンにおける細胞内の A T P レベルの約 6 0 % の増加をもたらしたことから、変異体 H t t 対立遺伝子の Z F P によって引き起こされる抑制が、これらの細胞のエネルギー代謝の低下を正常化することが示される。

【0153】

ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼによる d U T P ニック末端標識 (T U N E L) アッセイを使用して、増殖因子の離脱により誘導された H D および非 H D ニューロンの細胞死を測定した。簡単に言えば、A T P アッセイに関して上記のよう、3 連でニューロンに L V を感染させた。細胞を 1 2 日間培養し、次いで培地を、いかなる添加剤 (増殖因子) も含まない新しい Neurobasal 培地に交換した。細胞を、この増殖因子離脱培地中で 4 8 時間維持した。A pol B r d U R ed D N A 断片化キット (Bio V ision) を使用して T U N E L アッセイを行つた。ニューロンを、4 % パラホルムアルデヒドを用いて氷上で 1 5 分固定した。製造業者の推奨に従つて (A pol B r d U R ed D N A 断片化キット、Bio V ision) 、T U N E L 陽性細胞を定量することによってアポトーシスを評価した。フローサイトメトリーを使用して、抗 B r d U - R ed 染色によるアポトーシスの測定および G F P による L V 形質導入の測定の両方を行つた。

【0154】

10

20

30

40

50

図2で示すように、増殖因子離脱の48時間後、HDニューロン(mock感染)は、非HDニューロン(約20%)より高い割合の細胞死(約50%)を示した。レンチ-GFP感染は、HDニューロンにおける細胞死のレベルに影響を与えた一方で、レンチ-33074-KOX-2A-GFP感染は、アポトーシス細胞の百分率で(約50%から20%への)有意なニューロンの減少を引き起す。

【0155】

したがって、変異体HttのZFPによって引き起こされる抑制は、増殖因子離脱に対するHDニューロンの脆弱性を低減させる。

【0156】

(実施例2)

ZFP-TFはQ175マウスにおいて変異体Htt凝集を防止および逆転する

対立遺伝子特異的な変異体Htt抑制因子であるZFP-TF(ZFP-30640および30645)のインビオにおける有効性を、マウスHtt対立遺伝子の1つのエクソン1が、拡張されたCAG反復(約179のCAG)を含有するヒトHttエクソン1配列で置き換えられたQ175ノックインマウスマルク(2012年)PLoS One 7巻(12号):e49838で試験した。変異体Httの病的な凝集を、Q175マウスの線条体で2カ月の月齢までに検出し始める事ができ、それは加齢に伴って増加し続け、6カ月の月齢までに凝集が十分に確立されるようになる。

【0157】

ZFPが線条体における変異体Httの累積を防止できるかどうかを試験するために、片側の線条体内へのAAV-ZFP、または陰性対照としてAAV-GFP注射(ベクターゲノム2×10¹⁰個/線条体を、2月齢のQ175マウスに行い、ヒトシナプシン1プロモーターによってZFPおよびGFP発現を引き起した。

【0158】

注射(4カ月の月齢)から2カ月後に、脳を回収し、薄片を作り、免疫組織化学分析に供して、ZFPおよびHtt発現を評価した。ZFP発現をFLAGエピトープタグに対する抗体によって検出し、変異体Htt凝集を抗Htt抗体(mEM48)によって検出した。図3A~3Hに、AAV-30645が注射されたマウスからの代表的な画像を示す。注射を受けなかった反対側の線条体において、変異体Htt(mEM48)凝集が容易に検出されたが、AAV-30645が注射された同側の線条体では、ZFPを発現する細胞で非常に低レベルの変異体Htt凝集しか観察されなかった(陽性FLAG染色によって示された)。

【0159】

図3Iで示すように、細胞1個当たりの核のHtt凝集体数を、AAV-ZFPおよびAAV-GFPが注射されたマウスの同側の線条体におけるFLAG(+)およびGFP(+)細胞に関してそれぞれ定量し、次いで注射されていない反対側の線条体における細胞1個当たりの凝集体の数に正規化したところ、ZFP-30640および30645はどちらも、核のHtt凝集体数を有意に低減させた(>90%)(P<0.001、クラスカル-ウォリス検定およびダンの多重比較)。

【0160】

図3Jで示すように、ZFPまたはGFPを発現する細胞における核のmEM48染色の強度を反対側の線条体からのニューロンの強度に正規化したところ、核のmEM48強度における50~60%の低減が、ZFPが注射された線条体で観察された(P<0.01)。図3Kで示すように、ZFPまたはGFPを発現する細胞における核周囲の変異体Htt凝集体の密度を、反対側の線条体のニューロンにおける密度に正規化したところ、核周囲のHtt凝集体密度における45~70%の低減が、ZFPが注射された線条体で観察された(P<0.01)。

【0161】

これらの結果は、Q175マウスの線条体において、ZFP-TFは、2カ月の月齢で注射される場合、4カ月の月齢で変異体Htt凝集を防止したことを示す。

10

20

30

40

50

【0162】

ZFPが十分に確立されたHtt凝集を逆転することができるかどうかを試験するため、6月齢のQ175マウスに、片側の線条体内へのAAV-GFP-2A-ZFP注射を行った。切断可能な2Aペプチドは、同じベクターからGFPおよびZFPを発現させることができ、ZFPを発現する細胞は、GFP発現によって同定することができる。8カ月の月齢で、脳を回収し、薄片を作り、免疫組織化学分析に供して、Htt凝集を評価した。図4Aに、AAV-GFP-2A-30645が注射されたマウスからの代表的な画像を示す。線条体特異的なタンパク質であるDARP-32に対する抗体を使用して線条体を標識した。注射を受けなかった反対側の線条体では、高いレベルの変異体Htt凝集(mEM48抗体によって検出された)が観察されたが、AAV-GFP-2A-30645が注射された同側の線条体では、変異体Htt凝集の低減が観察された。

10

【0163】

さらに、細胞1個当たりの核のHtt凝集体数を、AAV-GFP-2A-ZFPおよびAAV-GFPが注射されたマウスの同側の線条体におけるGFP(+)細胞に関して定量し、次いで注射されていない反対側の線条体における細胞1個当たりの凝集体の数に正規化した。図4Bで示すように、GFP-2A-30640の送達は、Httの核の凝集体数において約20%の低減をもたらし($P < 0.001$ 、クラスカル-ウォリス検定およびダンの多重比較)、GFP-2A-30645の送達も、細胞1個当たりのHttの核の凝集体数においてわずかな低減を引き起こした。

20

【0164】

AAV-GFP-2A-ZFPおよびAAV-GFPが注射されたマウスの同側の線条体からのGFP(+)細胞における核のmEM48染色の強度も、反対側の線条体からのニューロンにおける強度に正規化した。図4Cで示すように、核のmEM48強度におけるおよそ20%の低減($P < 0.001$)が、GFP-2A-30645が注射された線条体で観察された。核のmEM48強度におけるおよそ10%の低減も、GFP-2A-30640が注射された線条体で観察された。

30

【0165】

AAV-GFP-2A-ZFPおよびAAV-GFPが注射されたマウスの同側の線条体におけるGFP(+)細胞における核周囲の変異体Htt凝集体の密度を測定して、反対側の線条体のニューロンにおける密度に正規化した。図4Dで示すように、核周囲のHtt凝集体の密度における30~50%の低減($P < 0.001$)が、ZFPが注射された線条体で観察された。

30

【0166】

これらの結果は、ZFP-TFは、6カ月の月齢で注射される場合、わずか2カ月後にQ175マウスの線条体における既存の変異体Htt凝集を逆転したことを示す。マウスの脳が分析される前にZFPの発現が2カ月より長く継続できる場合、変異体Htt凝集のより実質的な排除が期待される。

40

【0167】

総合すると、データから、HD被験体の脳に送達された変異体Htt-対立遺伝子の抑制因子は、HDニューロンにおける細胞内のATP濃度のレベル増加、HDニューロンにおけるアポトーシスの低減、ならびに既存のHtt凝集体の防止および排除をもたらしたことが実証される。

【0168】

(実施例3)

ZFP-TF処置の有効性

診断試験は、変異体Htt対立遺伝子に特異的なHtt結合分子(例えば、ZFP-TF、TALE-TFなど)で処置された被験体に行われる。HD被験体は、本明細書に記載されるHtt結合分子で処置される。CSFは、標準的な方法(例えば腰椎穿刺)によって被験体から抽出され、次いでmHttタンパク質を検出および定量するための当技術分野において公知の方法に供される(Wildら(同書)を参照されたい)。本明細書に記載

50

される治療後のC S Fにおいて、m H t t タンパク質のレベルは減少する。

【0169】

(実施例4)

Z F P - T F は、Q 1 7 5 マウスにおいて変異体H t t 凝集を防止および低減し、D A R P P 3 2 遺伝子の発現を増加させる。

変異体H t t の別の対立遺伝子特異的な抑制因子Z F P - T F (Z F P - 3 3 0 7 4)のインビボにおける有効性を、マウスH t t 対立遺伝子の1つのエクソン1が、拡張されたC A G 反復(約179のC A G)を含有するヒトH t t エクソン1配列で置き換えられたQ 1 7 5 ノックインマウスマルク(2012年)PLoS One 7巻(12号):e 4 9 8 3 8で試験した。変異体H t t の病的な凝集を、Q 1 7 5 マウスの線条体で2カ月の月齢までに検出し始める事ができる、それは加齢に伴って増加し続け、6カ月の月齢までに凝集が十分に確立されるようになる。

【0170】

Z F P が線条体における変異体H t t の累積を防止できるかどうかを試験するために、片側の線条体内へのA A V - Z F P - 2 A - G F P、または陰性対照としてA A V - G F Pの注射(ベクターゲノム 2×10^{10} 個/線条体)を、2月齢のQ 1 7 5 マウスに行い、ヒトシナプシン1プロモーターによってZ F P およびG F P 発現を引き起こした。自己切断可能な2 A ペプチドは、同じベクターからG F P およびZ F P を発現させることができ、Z F P を発現する細胞は、G F P 発現によって同定することができる。

【0171】

注射から2カ月後(4カ月の月齢)、脳を回収し、薄片を作り、免疫組織化学分析に供して、H t t 発現を評価した。形質導入された細胞をG F P によってマークし、中型有棘ニューロン(M S N)をD A R P P 3 2 抗体で標識し、変異体H t t 凝集を抗H t t 抗体(m E M 4 8)によって検出した。

【0172】

図5 A で示すように、A A V を形質導入したM S N (G F P およびD A R P P 3 2 抗体で標識された)において、細胞1個当たりの核のH t t 凝集体数または封入体数は、Z F P 3 3 0 7 4 によって有意に低減した($P < 0.001$)。図5 B は、A A V を形質導入した細胞における核外の変異体H t t 凝集体の密度が、Z F P 処置線条体において有意に低減したことを示す。 $(P < 0.0001)$ 。図5 C は、核のm E M 4 8 染色(変異体H t t)の強度が、Z F P 処置マウスにおいて有意に低減したことを示す($P < 0.001$)。

【0173】

これらの結果は、Q 1 7 5 マウスの線条体において、Z F P 3 3 0 7 4 は、2カ月の月齢で注射される場合、変異体H t t 凝集を防止することを示す。

【0174】

Q 1 7 5 の線条体においてH t t 凝集が十分に確立された後にZ F P がH t t 凝集を低減できるかどうかを試験するために、A A V - G F P - 2 A - Z F P またはA A V - G F P の片側の線条体内への注射を、6月齢のQ 1 7 5 マウスに行った。10カ月の月齢で、脳を回収し、薄片を作り、免疫組織化学検査に供した。

【0175】

図6 A は、A A V を形質導入したM S N (G F P およびD A R P P 3 2 抗体で標識された)において、細胞1個当たりの核のH t t 凝集体数/封入体数が、Z F P 3 3 0 7 4 によって有意に低減したことを示す($P < 0.001$)。図6 B は、A A V を形質導入した細胞における核外の変異体H t t 凝集体の密度が、Z F P 処置線条体において有意に低減したことを示す。 $(P < 0.0001)$ 。図6 C は、核のm E M 4 8 染色(変異体H t t)の強度が、Z F P 処置マウスにおいて有意に低減したことを示す($P < 0.001$)。

【0176】

図7 A は、10カ月齢のQ 1 7 5 マウスにおいて、M S N マーカーであるD A R P P 3 2 の発現は、年齢を適合させた野生型マウスと比較して低減することを示し($P < 0.0$)

10

20

30

40

50

5)、これらのマウスにおけるM S Nの変性が示唆される。図7Bは、Q175マウスに6カ月の月齢でAAV-ZFP-2A-GFPを注射し、10カ月の月齢でDARP32発現について分析したところ、対照処置マウスと比較して、ZFP33074処置マウスにおいてDARP32発現における有意な増加が見出されたことを示す。

【0177】

総合すると、これらの結果は、ZFP33074は、6カ月の月齢で注射される場合、既存の凝集体の存在下で変異体Httの発現および凝集を低減できることを実証する。さらに、ZFP33074は、DARP32の発現を救済することができ、これは、M S Nの保護を示唆している。DBDを欠失した対照ベクター(ZFP DBD)は、変異体Htt凝集またはDARP32発現に対して効果を有さないので、拡張されたCAG反復に対して、ZFPを補充する(recruit)DNA結合ドメイン(DBD)が必要である。

【0178】

(実施例5)

CRISP R / Cas - TFは、HDニューロンにおいて変異体Htt凝集を防止および低減する

CRISP R / Cas系で使用するためのsgRNAは、当技術分野において公知の方法で合成的に作製される(Hsuら(2013年)Nature Biotech doi: 10.1038/nbt.2647またはSternbergら、(2014年)Nature 507巻: 62頁を参照されたい)。sgRNAは、上記のように操作されており、mHtt中の配列を標的化するように設計されている。例えば、sgRNAは、以下の配列の1つを有していてもよく、ここでPAM配列は下線で示される:

【表5】

5'GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG3' 配列番号122

5'GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG3' 配列番号123

5'GCAGCAGCAGCAGCAGCAG3' 配列番号124

5'GCAGCAGCAGCAGCAG3' 配列番号125

【0179】

CRISP R / Cas転写因子は、当技術分野において公知の方法に従って作製される(例えばPerez-Pinera(2013年)Nature 10巻(10号): 973頁ならびにQiおよびArkin(2014年)Nature Reviews Microbiology 12巻: 341頁を参照されたい)。簡単に言えば、ヌクレアーゼ欠損Cas9タンパク質を使用して、抑制ドメイン(すなわちKRAB)に融合させる。

【0180】

培養されたHDニューロンに、Cas9(ヌクレアーゼ-) - KRAB融合タンパク質をコードするmRNA(20μg / mL)および上記のようなsgRNAをトランスフェクトし、ここでsgRNAは、BTXE830を使用したエレクトロポレーションによって、mRNA(例えば2~4μg)またはDNA発現ベクター(例えば400ng~800ng)を介して導入される。定量的なTaqman分析の5日後に細胞を収集して、mHtt発現を測定する。加えて、細胞を上記の実験に供し、細胞間のATPレベルを測定して、アポトーシスを分析する。データから、sgRNAを使用したmHtt - 特異的なCRISP R / Cas転写因子は、mHttの発現を抑制し、mHttタンパク質凝集によって引き起こされる表現型の特徴を低減させることができることが示される。

【0181】

(実施例6)

運動障害の低減

本明細書に記載されるHtt抑制因子を動物(例えば、マウス)に投与して、これらの

10

20

30

40

50

動物によって示される十分に確立された運動欠陥であるクラスピング動作に関して定期的に試験する (Mangiariniら、1996年 Cell 87巻、493～506頁)。簡単に言えば、各動物をそのホームケージから取り出し、ケージのふたの上に置く。次いで観察者は、表面から約12インチ上に動物が吊り上げられるまで動物を穏やかに後ろおよび前に滑らかな動きで引っ張る。次いで動物を30秒間スコア付けする。前肢のクラスピングのみが観察される場合、動物は1のスコアが与えられる。後肢のクラスピングのみが観察される場合、動物は2のスコアが与えられる。後肢と前肢のクラスピングの両方が観察されるが同時ではない場合、動物は3のスコアが与えられる。中心部へきつく引き戻される後肢と前肢の同時のクラスピングと定義される完全なクラスピングは、4のスコアが与えられる。30秒の吊り上げ後、動物をそのホームケージに戻す。各処置群、加えて年齢を適合させた野生型の同腹子につき、毎週の観察それぞれにおいて完全なクラスピング (4のスコア) を表示する動物の比率を決定する。

10

【0182】

本明細書に記載されるHtt抑制因子は、対照 (Htt抑制因子なし)と比較して、よく特徴付けられた運動欠陥であるクラスピング動作を改善する。

【0183】

本明細書において言及された全ての特許、特許出願、および刊行物は、参照によりそれらの全体がすべての目的のために本明細書に組み込まれる。

【0184】

理解の明確さを目的として、例示説明および実施例を用いてある程度詳細に開示を提供してきたが、当業者には、本開示の趣旨または範囲から逸脱することなく、種々の変更および修正が実施され得ることは明白であろう。したがって、前述の説明および実施例は、限定的であると解釈されるべきではない。

20

【図1】

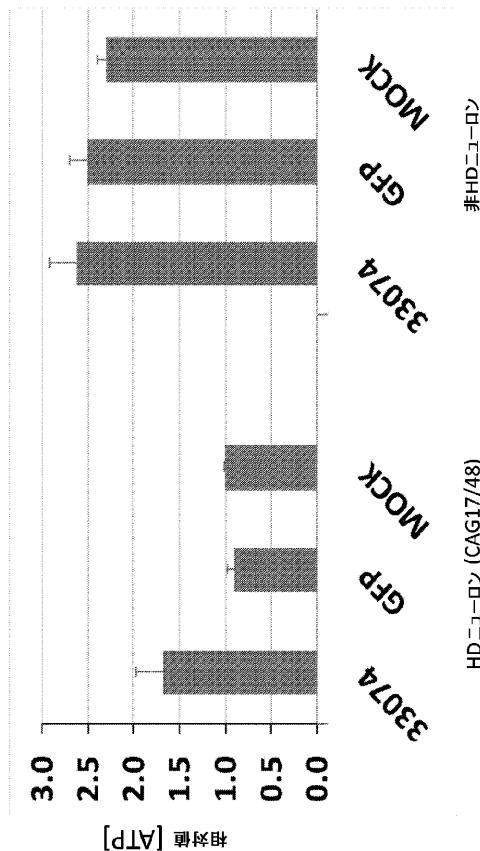


FIGURE 1

【図2】

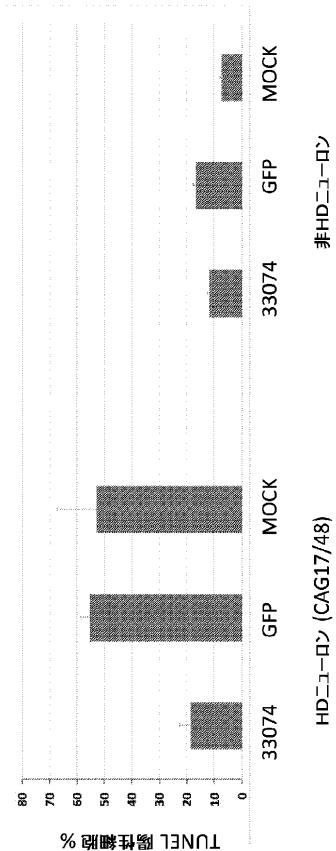


FIGURE 2

【図 3 A - H】

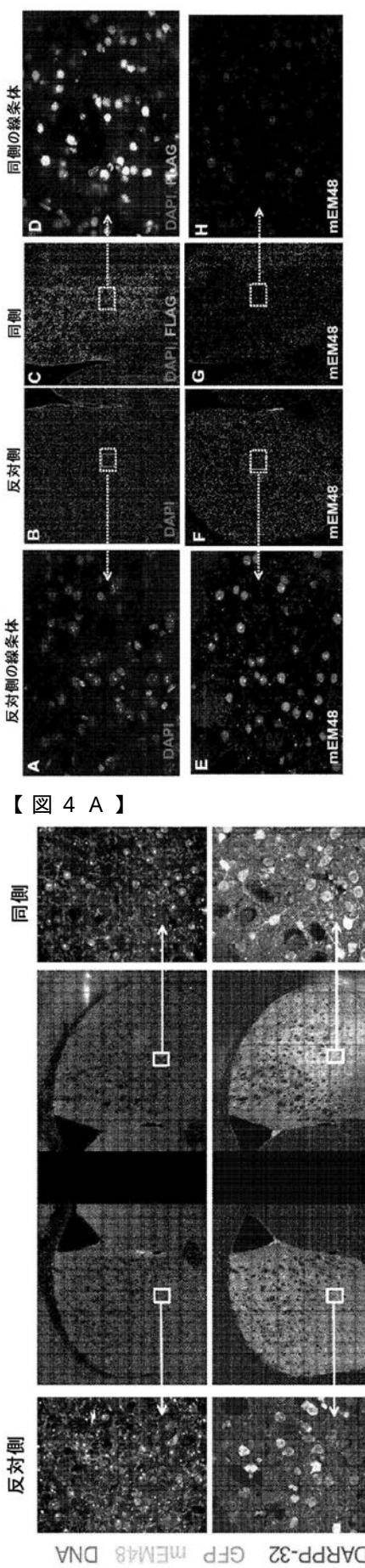


FIGURE 3

FIGURE 4A

【図4A】

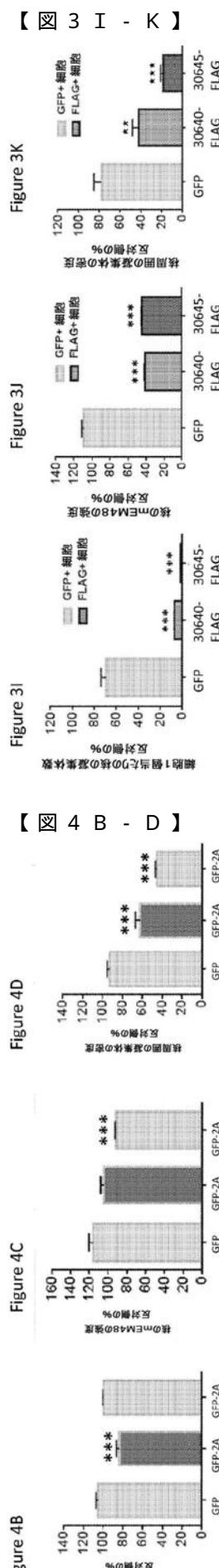


Figure 3J

Figure 3J

Figure 31

【 図 4 B - D 】

Figure 4D

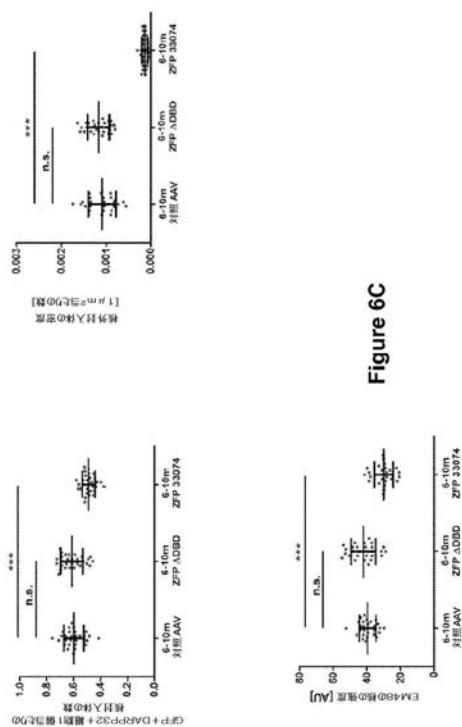
Figure 4C

Figure 4B

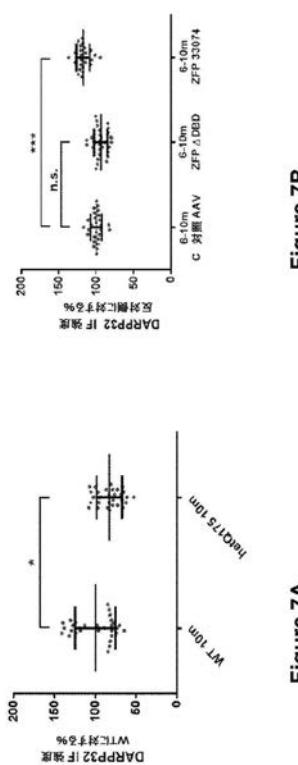
【図 5 A - C】



【図 6 A - C】



【図 7 A - B】



【配列表】

2017515819000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/29748
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 48/00; A61K 38/16; A61K 38/00; A61K 38/54; C07H 21/04 (2015.01) CPC - A61K 48/00; C07K 14/47; A61K 38/1709; C12N 9/96; C12N 15/52 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 48/00; A61K 38/16; A61K 38/00; A61K 38/54; C07H 21/04 (2015.01) CPC - A61K 48/00; C07K 14/47; A61K 38/1709; C12N 9/96; C12N 15/52; USPC - 514/44R; 514/21.2; 514/17.7; 424/94.3; 536/23.2		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8) - A61K 48/00; A61K 38/16; A61K 38/00; A61K 38/54; C07H 21/04 (2015.01) - see keyword below CPC - A61K 48/00; C07K 14/47; A61K 38/1709; C12N 9/96; C12N 15/52; USPC - 514/44R; 514/21.2; 514/17.7; 424/94.3; 536/23.2		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USP, PGPB, EPAB, JPAB); PatBase; Medline; Google; Huntington's disease, HD, Huntington, Htt, mutant, muHtt, mHtt, allele, correct, editing, suppress, modify, repressor, nuclelease, zinc finger, ZFN, TALE, TALEN, CRISPR, cas9, HD neuron, spiny striatum, ATP, energy, aggregation, apoptosis, apoptotic, motor, clasp, kit, reagent, quantify, ie		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GARRIGA-CANUT et al., Synthetic zinc finger repressors reduce mutant huntingtin expression in the brain of R6/2 mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012, Vol.109(45), p. E3136-45. Abstract; pg E3136, col 1, para 1; pg E3137, Fig 1; pg E3138, col 1, para 2; pg E3139, col 2, middle para; pg E3140, col 2, top para; E3141, col 1, para 1, and col 2, para 1 and 5; pg E3142, Fig 6C-D; and pg 3144, col 1, last para	1-3, 5, 8-9 4, 6, 16
X	US 2013/0253040 A1 (MILLER et al.) 26 September 2013 (26.09.2013), para [0004], [0008], [0010], [0011], [0012], [0014], [0032], [0040], [0041], [0139], [0154], [0155], [0157], [0197], and Example 8	1-3, 7
Y	MOCHEL et al., Energy deficit in Huntington disease: why it matters. J Clin Invest. 2011, Vol. 121(2), p. 493-9. Abstract; pg 493, col 1, lower para; pg 484, Fig 1; pg 495, col 1, middle para; and pg 496, col 1, last para, and col 2, para 1	4, 6
Y	US 2010/0120900 A1 (van BILSEN et al.) 13 May 2010 (13.05.2010), Abstract, para [0013], [0018], and [0019]	16
X	US 2013/0336947 A1 (ISALAN et al.) 19 December 2013 (19.12.2013), para [0004], [0011], [0013], [0039], [0041], [0042], [0084], [0166], [0169], [0175], [0176], [0205], [0226], [0243], [0255], [0256], [0262], and [0285]	1-3, 5, 8-9
A	YU et al. Mutant Huntington Causes Context-Dependent Neurodegeneration in Mice with Huntington's Disease. J Neurosci. 2003, Vol. 23(6), p. 2193-202. Abstract; pg 2197, col 2, para 1; and pg 2199, col 2, para 1	1-9, 16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 August 2015 (26.08.2015)	Date of mailing of the international search report 02 OCT 2015	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/29748
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Ehrlich, Huntington's Disease and the Striatal Medium Spiny Neuron: Cell-Autonomous and Non-Cell-Autonomous Mechanisms of Disease. <i>Neurotherapeutics</i> . 2012, Vol. 9(2), p. 270-84. Entire documentation, especially Abstract	1-9, 16
A	US 2009/0098150 A1 (KRAINIC et al.) 16 April 2009 (16.04.2009), para [0032], [0033], [0038], [0097], [0148], and [0149]	1-9, 16

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/29748
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 10-15 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>		
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.</p> <p>Group I, claims 1-9, directed to a method of modifying a neuron in a subject with Huntington's Disease (HD).</p> <p>Group II: Claim 16, directed to a kit for detecting and/or quantifying mHtt protein levels.</p> <p>The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:</p> <p>*****Continued in the extra sheet*****</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p>		
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/29748

Continuation of:
Box No III (unity of invention is lacking)

Special Technical Feature

Group I includes the special technical feature of modifying a neuron in a subject with Huntington's Disease (HD), comprising administering a repressor of a mutant Huntingtin (mHtt) allele to the subject, not required by Group II.

Group II includes the special technical feature of a kit comprising reagents for detecting and/or quantifying mHtt protein levels, not required by Group I.

Common Technical Features

The inventions of Groups I-II share the technical feature of Huntingtin (Htt) repressor.

However, this shared technical features does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2013/0253040 A1 to MILLER et al. (hereinafter 'Miller') as follows:

Miller discloses a mutant Huntingtin (Htt) repressor (para [0012] - repressors (ZFP-TFs or TALE-TFs) ... partially outside the CAG repeat region of Htt ... allowing preferential repression of the mutant allele; para [0014] - 'ZFP-TFs or TALE-TFs are specific for mutant Htt alleles ... specific repression of the mutant Htt allele', wherein 'ZFP-TFs or TALE-TFs' are 'repressors of a mutant Huntingtin allele', as they 'specific repression of the mutant Htt allele; para [0004] - 'Huntingtin (Htt)'; Specification: para [0019] - 'the repressor of the mutant Htt allele may be a ZFP-TF, ... repressor of the mutant Htt allele may be a TALE-TF').

Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I-II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Continuation of item 4: Claims 10-15 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4 (a). These claims are improper multiple dependent claims.

Note:

i) Claim 1 is objected as lacking a definition for the first appeared abbreviation "Htt" limitation in claims. For the purposes of this ISR, "mutant Htt (mHtt)" in claim 1 is rewritten as "mutant Huntingtin (mHtt)".

ii) Claim 3 is objected to as using an improper alternative format in the claim. For the purposes of this ISR, the "and" in the list is replaced with "; or". Claim 3 is construed as follows:

3. The method of claim 1 or claim 2, wherein the modification comprises reducing aggregation of Htt in the neuron; increasing energy metabolism in the neuron; reducing susceptibility to apoptosis in the neuron; or combinations thereof.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K 7/06	Z N A
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N 33/68	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	A

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100113413	弁理士 森下 夏樹
(74)代理人 100181674	弁理士 飯田 貴敏
(74)代理人 100181641	弁理士 石川 大輔
(74)代理人 230113332	弁護士 山本 健策
(72)発明者 フレーリヒ, スティーブン	アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル ブールバード 50 1, スート エ-100, サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 クワック, スン	アメリカ合衆国 ニューヨーク 10001, ニューヨーク, セブンス アベニュー 350 , スート 601, シーエイチディーアイ ファウンデーション, インコーポレーテッド 気付
(72)発明者 ムニヨス - サンファン, イグナシオ	アメリカ合衆国 ニューヨーク 10001, ニューヨーク, セブンス アベニュー 350 , スート 601, シーエイチディーアイ ファウンデーション, インコーポレーテッド 気付
(72)発明者 ザン, エイチ. スティーブ	アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル ブールバード 50 1, スート エ-100, サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド 気付

F ターム(参考) 2G045 AA25 DA36
 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ63 QQ79 QX02
 4C084 AA02 AA03 AA13 AA17 NA14 ZA222
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA22
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZA22
 4H045 AA10 AA30 BA14 BA41 CA40 EA20 FA74