

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-539458

(P2024-539458A)

(43)公表日 令和6年10月28日(2024.10.28)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 0 1 K	67/0278(2024.01)	A 0 1 K	67/0278	Z N A	4 B 0 6 3
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0	4 C 0 8 6
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02		4 H 0 4 5
C 0 7 K	14/48 (2006.01)	C 0 7 K	14/48		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全27頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-529784(P2024-529784)	(71)出願人	398066918
(86)(22)出願日	令和4年11月21日(2022.11.21)		ザ ジャクソン ラボラトリー
(85)翻訳文提出日	令和6年7月19日(2024.7.19)		T H E J A C K S O N L A B O R A T
(86)国際出願番号	PCT/US2022/080224		O R Y
(87)国際公開番号	WO2023/092118		アメリカ合衆国 メイン州 バー ハーバー
(87)国際公開日	令和5年5月25日(2023.5.25)		メイン ストリート 6 0 0
(31)優先権主張番号	63/282,023	(74)代理人	100078282
(32)優先日	令和3年11月22日(2021.11.22)		弁理士 山本 秀策
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100181674
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		弁理士 飯田 貴敏
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A	(74)代理人	100181641
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		弁理士 石川 大輔
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(74)代理人	230113332
	最終頁に続く		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 破壊された T D P - 4 3 結合部位を有するヒト化スタスミン 2 マウスモデルに関連する方法および組成物

(57)【要約】

本開示は、ヒトエクソン 2 a ポリヌクレオチド配列を含む内因性スタスミン 2 (S t m n 2) 遺伝子を含むマウスモデルを提供する。本開示は、一部の態様において、T a r DNA 結合タンパク質 4 3 (T D P - 4 3) タンパク質症 (例えば、筋萎縮性側索硬化症および前頭側頭型認知症) のマウスモデルを提供する。これらのマウスモデルは、そのようなタンパク質症におけるスタスミン - 2 (S t m n 2) 遺伝子破壊を示す実験的証拠に部分的に基づく。

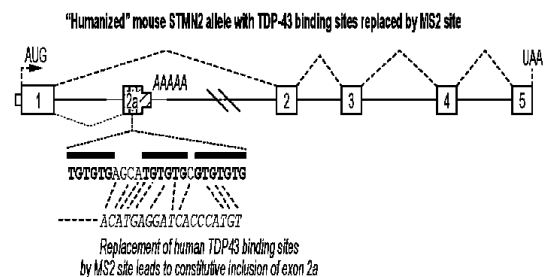


FIG. 2B

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

外因性ポリヌクレオチド配列を含むヒト化スタスミン - 2 (S t m n 2) 遺伝子を含むマウスであって、該外因性ポリヌクレオチド配列はヒト S T M N 2 エクソン 2 a 配列を含む、マウス。

【請求項 2】

前記ヒト S T M N 2 エクソン 2 a 配列が約 2 0 0 ヌクレオチド ~ 約 3 0 0 ヌクレオチドの長さ、必要に応じて約 2 2 0 ヌクレオチド ~ 約 2 2 5 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 1 に記載のマウス。

【請求項 3】

前記外因性ポリヌクレオチド配列が、前記ヒト S T M N 2 エクソン 2 a 配列に隣接するヒトゲノム DNA を含む、請求項 1 または 2 に記載のマウス。

【請求項 4】

前記ヒト S T M N 2 エクソン 2 a 配列がヒト M S 2 ステムループ配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載のマウス。

【請求項 5】

前記ヒト M S 2 ステムループ配列が 5 ' - A C A T G A G G A T C A C C C A T G T - 3 ' (配列番号 4) の配列を含む、請求項 4 に記載のマウス。

【請求項 6】

前記ヒト M S 2 ステムループ配列が T D P - 4 3 結合配列を置換する、請求項 5 に記載のマウス。

【請求項 7】

前記 T D P - 4 3 結合配列が 5 ' - T G T G T G A G C A T G T G T G C G T G T G T G - 3 ' (配列番号 5) の配列を含む、請求項 6 に記載のマウス。

【請求項 8】

前記ヒト S T M N 2 エクソン 2 a 配列が、マウス S t m n 2 遺伝子のイントロン 1 中にある、前記請求項のいずれか一項に記載のマウス。

【請求項 9】

前記マウスが C 5 7 B L / 6 遺伝的背景を有する、前記請求項のいずれか一項に記載のマウス。

【請求項 10】

前記マウスの遺伝子型が C 5 7 B L / 6 J - S t m n 2 e m 8 (S T M N 2 *) L u t z y / M m j a x である、請求項 9 に記載のマウス。

【請求項 11】

前記マウスが T a r DNA 結合タンパク質 4 3 (T D P - 4 3) タンパク質症の 1 つまたは複数の症状を示し、必要に応じて、該 T D P - 4 3 タンパク質症は筋萎縮性側索硬化症 (A L S) および前頭側頭変性症 (F T D) から選択される、前記請求項のいずれか一項に記載のマウス。

【請求項 12】

候補治療剤を前記請求項のいずれか一項に記載のマウスに投与する工程、および改変された表現型について該マウスをアッセイする工程を含む、方法。

【請求項 13】

前記候補治療剤が S t m n 2 mRNA 前駆体の異常なスプライシング / 潜在的スプライシングを遮断する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記候補治療剤が、ヒトエクソン 2 a ポリヌクレオチド配列に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O) である、請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記候補治療剤が小分子薬である、請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

前記表現型が行動表現型、病理学的表現型、認知欠損、運動欠損、運動ニューロン変性、神経筋脱神経から選択される、請求項 12 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記表現型が運動欠損である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記運動欠損が振戦、麻痺、異常歩行、または下肢の握り行動から選択される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記運動欠損がオープンフィールド分析、握力分析、またはロータロッド分析によってアッセイされる、請求項 17 または 18 に記載の方法。

10

【請求項 20】

前記表現型が認知欠損である、請求項 12 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のマウスを作製する方法であって、外因性ポリヌクレオチド配列をマウスの内因性 *Stmn2* 遺伝子のイントロンに、必要に応じて遺伝子編集技術を使用して、導入する工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

20

本出願は、2021年11月22日に提出された米国特許仮出願第63,282,023号の米国特許法第119条(e)の下での利益を主張し、この米国特許仮出願はその全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

(政府の実施権)

本発明は、アメリカ国立衛生研究所によって授与された助成金番号R01NS124203の下での政府の支援を受けてなされた。米国政府は、本発明において特定の権利を有する。

【0003】

(電子配列表の参照)

30

電子配列表(J022770109WO00-SEQ-HJD.xml;サイズ:12,142バイト;作成日:2022年11月22日)の内容は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【背景技術】

【0004】

(背景)

神経変性障害(例えば、筋萎縮性側索硬化症および前頭側頭型認知症)は、世界中で数百万人の人々が罹患している。神経変性疾患は、脳または末梢神経系の神経細胞が経時的に機能を喪失する場合に生じ、最終的には死ぬ。今後40年間にわたり、神経変性疾患の有病率は、米国において二倍になると推定される。処置は、神経変性疾患に関連する身体症状または精神症状の一部を軽減するのを助け得るが、疾患の進行を遅くするための方法は現在存在せず、既知の治療法は存在しない。治療アプローチを開発するために、神経変性疾患患者において観察される主要な疾患機構を再現する非ヒト動物モデルについての継続的な必要性が存在する。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

(概要)

本開示は、一部の態様において、Tar DNA結合タンパク質43(TDP-43)タンパク質症(例えば、筋萎縮性側索硬化症および前頭側頭型認知症)のマウスモデルを

50

提供する。これらのマウスモデルは、そのようなタンパク質症におけるスタスミン - 2 (*Stmn2*) 遺伝子破壊を示す実験的証拠に部分的に基づく。この遺伝子はその mRNA の潜在的スプライシング (*cryptic splicing*) を経て、切断型 mRNA を生じる。本明細書において記載されているマウスモデルは、広範な範囲の神経変性状態の中心となる疾患機構を再現し、このマウスモデルは、例えば、*Stmn2* mRNA 前駆体の潜在的 (異常な) スプライシングを遮断する薬剤 (例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび / または小分子薬) の同定を通じて TDP - 43 タンパク質症における治療法を開発するために、使用され得る。

【 0 0 0 6 】

本開示の一部の態様は、外因性ポリヌクレオチド配列を含むヒト化スタスミン - 2 (*Stmn2*) 遺伝子を含む *Tar* DNA 結合タンパク質 43 (TDP - 43) タンパク質症のマウスモデルを提供し、その外因性ポリヌクレオチド配列はヒト *STMN2* エクソン 2 a 配列を含む。

10

【 0 0 0 7 】

一部の実施形態において、そのヒト *STMN2* エクソン 2 a 配列は、約 200 ヌクレオチド ~ 約 300 ヌクレオチドの長さ、必要に応じて約 220 ヌクレオチド ~ 約 225 ヌクレオチド、好ましくは 222 ヌクレオチドの長さを有する。

【 0 0 0 8 】

一部の実施形態において、その外因性ポリヌクレオチド配列は、そのヒト *STMN2* エクソン 2 a 配列に隣接するヒトゲノム DNA を含む。

20

【 0 0 0 9 】

一部の実施形態において、そのヒト *STMN2* エクソン 2 a 配列はヒト *MS2* ステムループ配列を含む。

【 0 0 1 0 】

一部の実施形態において、そのヒト *MS2* ステムループ配列は 5' - A C A T G A G G A T C A C C C A T G T - 3' (配列番号 4) の配列を含む。

【 0 0 1 1 】

一部の実施形態において、そのヒト *MS2* ステムループ配列は TDP - 43 結合配列を置換する。

【 0 0 1 2 】

一部の実施形態において、その TDP - 43 結合配列は 5' - T G T G T G A G C A T G T G T G C G T G T G T G - 3' (配列番号 5) の配列を含む。

30

【 0 0 1 3 】

一部の実施形態において、そのヒト *STMN2* エクソン 2 a 配列はそのマウス *Stmn2* 遺伝子のイントロン 1 中にある。

【 0 0 1 4 】

一部の実施形態において、そのマウスモデルは C57BL / 6 遺伝的背景を有する。

【 0 0 1 5 】

一部の実施形態において、そのマウスの遺伝子型は C57BL / 6 J - *Stmn2*^{em8} (*STMN2*^{*}) *LutzY* / *Mmjax* である。

40

【 0 0 1 6 】

一部の実施形態において、その TDP - 43 タンパク質症は筋萎縮性側索硬化症 (*ALS*) および前頭側頭変性症 (*frontotemporal degeneration*) (*FTD*) から選択される。

【 0 0 1 7 】

他の態様は、候補治療剤を先行する請求項のいずれか一項に記載のマウスに投与する工程、および改変された表現型についてそのマウスをアッセイする工程を含む、方法を提供する。

【 0 0 1 8 】

一部の実施形態において、その候補治療剤は、*Stmn2* mRNA 前駆体の異常なス

50

ブラッシング / 潜在的スブラッシングを遮断する。

【 0 0 1 9 】

一部の実施形態において、その候補治療剤は、そのヒトエクソン 2 a ポリヌクレオチド配列に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O) である。

【 0 0 2 0 】

一部の実施形態において、その候補治療剤は小分子薬である。

【 0 0 2 1 】

一部の実施形態において、その表現型は、行動表現型、病理学的表現型、認知欠損、運動欠損、運動ニューロン変性、神経筋脱神経から選択される。

【 0 0 2 2 】

一部の実施形態において、その表現型は運動欠損である。

【 0 0 2 3 】

一部の実施形態において、その運動欠損は、振戦、麻痺、異常歩行、または下肢の握り行動 (h i n d l i m b c l a s p i n g) から選択される。

【 0 0 2 4 】

一部の実施形態において、その運動欠損は、オープンフィールド分析、握力分析、またはロータロッド分析によってアッセイされる。

【 0 0 2 5 】

一部の実施形態において、その表現型は認知欠損である。

【 0 0 2 6 】

さらに他の態様は、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載のマウスを作製する方法を提供し、その方法は、その外因性ポリヌクレオチド配列をそのマウスの内因性 S t m n 2 遺伝子のイントロンに、必要に応じて遺伝子編集技術を使用して、導入する工程を含む。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 7 】

【 図 1 】 図 1 A はヒト S T M N 2 遺伝子の模式図を示す。図 1 B はマウス S t m n 2 遺伝子の模式図を示す。

【 図 2 】 図 2 A は、ヒト S T M N 2 のイントロン 1 の 3 9 4 塩基対セグメントを含むマウス S t m n 2 アレルの模式図を示す。この改変されたアレルは、本明細書において「ヒト化マウス S t m n 2 アレル」と呼ばれる。図 2 B は、ヒト T D P - 4 3 結合部位が M S 2 結合部位によって置換されてエクソン 2 (上から下へ、配列番号 5 および配列番号 4) の構成的含有をもたらした、ヒト化マウス S t m n 2 アレルの模式図を示す。

【 図 3 】 図 3 A ~ 図 3 D は、ヒト化 S t m n 2 マウス (すなわち、ヒト化マウス S t m n 2 アレルを含むマウス) の作製およびインビトロ確認に関連する模式図およびデータを示す。一次皮質ニューロンが、スタスミン - 2 マウス遺伝子のイントロン 1 内にヒトエクソン 2 a ゲノム領域を保有するように編集されたマウス胚 (S t m n 2 ^{H u m / +} マウス) から作製され、マウス T D P - 4 3 を標的とする R N a s e - H 依存型 A S O を 1 μ M または 3 μ M 用いて 1 2 日間処理された (図 3 A) 。定量 R T - P C R は T D P - 4 3 の効率的減少を示し (図 3 B) 、これは全長スタスミン - 2 m R N A のレベル減少をもたらす (条件 1 つ当たりの生物学的反復 n = 3 (図 3 C) ; * p < 0 . 0 5 、 * * * p < 0 . 0 0 1 、一元配置分散分析) 。スタスミン - 2 の減少は、T D P - 4 3 喪失の際にマウスエクソン 1 とヒトエクソン 2 a との間の異常なスブラッシングによって媒介され、ヘテロ接合性 S t m n 2 ^{H u m / +} に由来するニューロンにおいて R T - P C R によって検出されるが野生型胚に由来するニューロンでは検出されない (図 3 D) 。

【 図 4 】 図 4 A ~ 図 4 C は、T D P - 4 3 結合部位が M S 2 部位によって置換されたヒトエクソン 2 a を含むように編集されたマウス神経芽腫細胞からのデータを示し、これらは、S t m n 2 の構成的ミスブラッシングおよび減少を示す。野生型 (W T) 同系クローンと比較して T D P - 4 3 結合部位を含まないヒトエクソン 2 a (図 2 B を参照のこと) を一方のアレル (H e t) または両方のアレル (H o m o) 中に導入するための C R I S P R / C a s 9 編集後の、N 2 A 神経芽腫クローンにおける全長マウス S t m n 2 につい

10

20

30

40

50

での定量 R T - P C R (図 4 A) (* * $p < 0.001$ 、一元配置分散分析)。ヘテロ接合性クローンおよびホモ接合性クローンにおけるマウスエクソン 1 とヒトエクソン 2 a との間の構成的スプライシングを示す R T - P C R (図 4 B)。スタスミン - 2 mRNA の構成的ミスプライシングおよびレベル減少は、ヘテロ接合性細胞およびホモ接合性細胞において、それぞれ、S T M N 2 タンパク質の 50 % 減少または完全喪失をもたらす (図 4 C)。

【発明を実施するための形態】

【0028】

(詳細な説明)

筋萎縮性側索硬化症 (A L S) (上位運動ニューロンおよび下位運動ニューロンの早発性喪失が致死性麻痺をもたらす疾患) は、前頭側頭変性症 (F T D) (行動機能障害および言語機能障害によって特徴付けられる神経変性障害) と臨床的、遺伝的、および病理学的な重複を有すると、現在認識されている。運動ニューロンまたは皮質ニューロンの加齢依存的機能障害の基礎をなすものは、未解明のままである。A L S および F T D の細胞機構を理解することへの目印となる寄与が、A L S のほとんどの場合 (> 95 %) ならびに F T D 患者の約 50 % における、罹患ニューロンからの R N A 結合タンパク質 T D P - 43 の細胞質での蓄積および核での喪失という発見から生じた。T D P - 43 の破壊は、孤発性形態および家族性形態の両方の A L S ならびに F T D (T D P - 43 をコードする遺伝子 (T A R D B P) およびプログロニユリンをコードする遺伝子 (G R N) における変異を有する患者ならびに C 9 O R F 7 2 遺伝子において G 4 C 2 反復伸長を有する患者を含む) において、共通する病理学的特徴を示す。T D P - 43 病理は、A L S、F T D、ならびに種々の形態のパーキンソニズムおよび認知症が挙げられる広範囲の神経変性状態 (T D P - 43 タンパク質症と呼ばれる) において報告されている。30 % を超える患者が、アルツハイマー病または辺縁系優位型加齢性 T D P - 43 脳症 (l i m b i c - p r e d o m i n a n t a g e - r e l a t e d T D P - 43 e n c e p h a l o p a t h y) を有する。

【0029】

広範に発現され主に核の、T D P - 43 は、R N A 代謝調節の種々の局面において役割を果たす R N A 結合タンパク質である。患者において、このタンパク質は、罹患していないニューロンの核において検出可能であるが、細胞質凝集物を含むニューロンにおいて核から除去され、これは、T D P - 43 機能喪失が、A L S 病因および F T D 病因の基礎をなす疾患機構の重要な側面であることを強く支持する証拠である。ゲノムワイドアプローチが使用されて、数千個の R N A 標的上での T D P - 43 の結合部位 (好ましい結合部位として G U リッチ配列を有する) を規定し、マウス転写物およびヒト転写物の R N A スプライシングおよび発現に対する T D P - 43 破壊の影響を規定した。

【0030】

T D P - 43 は必須タンパク質であり、マウスにおけるその広範な欠失は胚致死性である。ヒト T D P - 43 を発現する多数のトランスジェニック齧歯類が、疾患を引き起こす変異を含んで、または疾患を引き起こす変異を含まずに、種々のプロモーター下で、作製されている。T D P - 43 の過剰発現は、変異の存在とは無関係にいくつかの致死性表現型を誘導する。しかし、内因性 T D P - 43 に近いレベルを発現するマウスは、変異体および加齢に非依存的な神経学的表現型 (軽度の運動欠損および認知欠損、運動ニューロン変性、ならびに神経筋脱神経が挙げられるが、麻痺も寿命の減少も含まない) を発現する。

【0031】

T D P - 43 タンパク質症の動物モデル化の重要な警告事項は、T D P - 43 によって結合される R N A のレパートリーが種間で異なり、T D P - 43 機能障害によって誘発される R N A プロセシングの変化がマウスとヒトとの間で異なることである。実際の、最近のデータは、T D P - 43 破壊によって最も影響を受けるヒト R N A は神経成長関連因子スタスミン - 2 (S C G 10 としても知られる) をコードするが、スタスミン - 2 R N A

10

20

30

40

50

は齧歯類において TDP - 43 によって結合も調節もされないことを示す。スタスミン - 2 の異常なプロセッシングは、TDP - 43 導入遺伝子を発現するマウスまたは TDP - 43 欠損性マウスにおいて再現されず、その理由は、ヒトスタスミン - 2 遺伝子のイントロン 1 中の潜在的ポリアデニル化シグナルおよび 3 つの GU リッチ TDP - 43 結合部位が、対応するマウスイントロンでは見出されないからである (図 1 A および図 1 B)。一貫して、スタスミン - 2 mRNA 前駆体はマウスにおいて TDP - 43 によって結合されず、スタスミン - 2 mRNA レベルは、マウス N2A 細胞および野生型マウスの中枢神経系において、TDP - 43 の siRNA 媒介性減少または ASO 媒介性減少後に変化しない。Melamed ら、(2019) Nat. Neurosci. (参照により本明細書に援用される) を参照のこと。

10

【0032】

(I. Tar DNA 結合タンパク質 43 (TDP - 43) およびスタスミン - 2)

いくつかの神経変性疾患の共通する神経病理学的特徴は Tar DNA 結合タンパク質 43 (TDP - 43) の誤った局在化および凝集であり、このタンパク質は、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 (hnRNP) ファミリーのメンバーであり、通常は中枢系全体にわたって核で広範に発現される。TDP - 43 の通常の機能および神経変性の病因におけるその役割に関する徹底的な調査は、TDP - 43 摂動が神経毒性をもたらす種々の経路を同定した。筋萎縮性側索硬化症 (ALS) および前頭側頭葉変性症 (FTD) におけるユビキチン化細胞質封入体の主要成分として元々同定されたので、TDP - 43 病理は、アルツハイマー病ならびにパーキンソン病およびハンチントン病、さらに変性筋疾患封入体ミオパチーのかなりの比率の症例の神経病理学的特徴として現在認識されている (Glass JD、J Clin Invest.、2020 年 11 月 2 日; 130 (11) : 5677 ~ 5680 を参照のこと)。

20

【0033】

TDP - 43 は転写サプレッサーである。TDP - 43 の非存在下で、すなわち、TDP - 43 が細胞質へと誤った場所に局在化するので TDP - 43 が核から除去された場合に、潜在的エクソンが露出され転写されて、ALS モデルにおいて神経毒性をもたらす異常な mRNA を生じる。最近、この TDP - 43 サプレッサー機能は、タンパク質スタスミン - 2 (STMN2) の mRNA 前駆体において潜在的初期ポリアデニル化部位を抑制することに特に関係付けられた。TDP - 43 の喪失は、未成熟ポリ A テールの組込みを可能にして、切断型で非機能的形態の STMN2 を生じる (Klim JR ら、Nat Neurosci.、2019; 22 (2) : 167 ~ 179 および Melamed Z ら、Nat Neurosci.、2019; 22 (2) : 180 ~ 190)。STMN2 は、軸索の伸長および維持に必須である高度に保存された細胞質タンパク質である。STMN2 ノックアウトマウスは遅発性の主に運動の軸索障害を発症し (Liedtke W ら、Am J Pathol.、2002; 160 (2) : 469 ~ 480)、これは、ヒト ALS において見られるものと類似する。

30

【0034】

スタスミン遺伝子ファミリーの 4 つのメンバー (別々のゲノム座位から各々がコードされる) のうち、スタスミン - 2 は、マウスおよびヒトの両方の運動ニューロンにおいて最も顕著に発現される。実際、スタスミン - 2 は、ALS において特に影響を受けるこのニューロン集団において最も濃縮される mRNA の上位 25 種の一つである。スタスミン - 2 は、おそらく、軸索成長円錐において微小管動態を促進することによって、神経突起成長 48 において重要な役割を果たすと提唱されている。それは α / β - チューブリンダイマーに結合する。それは、軸索再生に必須であることが示された。軸索損傷の際に、スタスミン - 2 はアップレギュレートされ、軸索を再生する成長円錐に動員される。それは、成体マウスにおいて神経筋接合部 (NMJ) の運動軸索終末で蓄積することが、決定された。

40

【0035】

例示的なヒトスタスミン - 2 タンパク質配列は以下である：

50

【化 1】

MAKTAMAYKEKMKELSMLSLICSCFYPEPRNINIYTYDDMEVKQINKRASQAFELILKPPSPISEAPRTLSPK
 KKDLSEELIQKKLEAAEERRKSQEAQVLKQLAEKREHEREVLQKALEENNNFSKMAEEKLILKMEQIKENREANL
 AAIERLQEKLVKFISSELKESIESQFLELQREGEKQ (配列番号 1)

【0036】

例示的なマウススタスミン - 2 タンパク質配列は以下である：

【化 2】

MAKTAMAYKEKMKELSMLSLICSCFYPEPRNINIYTYDDMEVKQINKRASQAFELILKPPSPISEAPRTLSPK
 KKDLSEELIQKKLEAAEERRKSQEAQVLKQLAEKREHEREVLQKALEENNNFSKMAEEKLILKMEQIKENREANL
 AAIERLQEKERHAAEVRNKNELQVELSG (配列番号 2)

10

【0037】

一部の実施形態において、本明細書において提供されているマウス（マウスモデル）は、遺伝子型 C57BL/6J - Stmn2em8 (STMN2*) LutzY/Mmjax (一般名 Stmn2em8 (STMN2*))、例えば、MMRRC 系統番号 069792 - JAX) を有する。Stmn2em8 (STMN2*) は、ヒト STMN2 エクソン 2a の 222ヌクレオチドを保有するスタスミン様 2 (Stmn2) 遺伝子の CRISPR/cas9 により作製された変異体である。その STMN2 配列は、ヒト MS2 ステムループ配列を含み TDP - 43 結合エレメントを置換するように、改変されている。これらのマウスは、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の前臨床研究において有用であり得る。

20

【0038】

その Stmn2em8 (STMN2*) アレルは、CRISPR/cas9 エンドヌクレアーゼ媒介性ゲノム編集を使用して作製された。ガイド RNA が、スタスミン様 2 遺伝子 (Stmn2) のイントロン 1 を標的として改変型ヒト SMNT2 エクソン 2a を挿入するように、選択された。この系統中のヒト化 / 変異体エクソン 2a は、222ヌクレオチド長であり、エクソン 2a の 5' および 3' にそれぞれ位置する 1491bp および 1548bp のヒトゲノム DNA が両側に隣接している。その 19ヌクレオチド MS2 ステムループは配列 5' - ACATGAGGATCACCCATGT - 3' (配列番号 4) を含む。これは、エクソン 2a 含有マウス - ヒトハイブリッド STMN2 未成熟終止 mRNA 転写物の 3' - UTR において 24ヌクレオチド TDP - 43 結合配列 5' - TGTGTGTGAGCATGTGTGTGCGTGTGTGTG - 3' (配列番号 5) を置換するために使用された。そのドナープラスミド、両方のガイドおよび cas9 エンドヌクレアーゼが 1 細胞 C57BL/6J 接合子に導入され、偽妊娠雌に移入された。そのドナープラスミド中に存在する隣接するマウスイントロン 1 配列は N2A 細胞株に由来したことに留意されたい。その左アーム中には、Ensembl において報告されている C57BL/6J 配列間で異なる 3つの SNP が存在する。これらの SNP のいずれかがエクソン 2a の使用に影響を与えると、予期されていない。子孫が DNA 配列決定によってスクリーニングされて、正確に標的とされた仔が同定され、その後、それらの仔が、生殖系列伝達のために C57BL/6J マウスと繁殖させた。そのアレルを保有する正確に標的とされた単一の樹立系統 (founder) に由来する N1 子孫が、コロニーを確立するために、C57BL/6J と少なくとも 2 世代の間、戻し交雑された。

30

40

【0039】

マウス中のヒト化エクソン 2A (変異体 TDP - 43) の予想ゲノム配列：

【化 3 - 1】

TAGCTGCACAAACCCAGACCTGGGTGTGGTCAGCCCCACAGGGATAGTTAATCCGAAGCAGCTTCCCAGACAGGA
 GGAAGCTCAGAGCACAAACCTAGGCCTGGGCGTGGCCACTGGGAGCTGCTGATAGCGAACCCAGCTCACACCAG
 TTTCTTTTTTGGTTCGTGGGAAGAAAAACACATATTATCCTGTTGTGTCACAAGATCTGTGACCTTATATGAAAAAAT
 GCTAGAATTTTTTTCATTAAAAAAGAAAAATACTGAAGTAGCCAGTGACCCAGATGTTTTTCAGAACCTAGACTGGTT
 CTGTCCATTGGAAAACCTCGGTGTCTGCATTAACCTTTTACCACACTAGAGGGCAATCATGTTCTCTAAAAAAGC
 AGATGATTGATGTAAACCTAGTTCCAAATATTAACCTGTTTAATAAAATCTTTCTTTTACCAGGAACATTCAAGT
 GTTTATTCAATAAGCTGATGCCATGCTTTACCCTAGTGGATGAACAGAGCTTGTACAATTTTCAAGGAGACAGGA

【化 3 - 2】

TGAAATGAGTGGTCATAATCTGAAAGTAGATACACGCCCTGGTTAATTATTCCCTGATGGTTTTACTTCTCAGTT
 TTATTACATTGTTATTATAATACCATTATGTTACTTCTGAGATTTTGTAGTGGATAAATAGTAGAAAAATGTCA
 GTAGTAATAGCAAAGTTATTTAGCAGCCGAATATTTAATGCTTAAAAATAAAGGAATAAATTAAAGAAAAATCAT
 TGTTTACTTCTTCATCGATTGAAATGTGCCCCCTGTTTCAGAGCACATCTGAATATCAGAGTCTCCACCTGCAGAG
 AACATGCAGCTTAGCGAGTAAACAGGCAGGTATGTGATACTGAGGAGGTGTACCAAAAACTGACTGCTGTTATT
 TTTCCCATCTTCTAAGTCTGTCTTTCTTTTCCATTAAAGATAACCTTTTAAATCTAATCCAATGTGATTTCAAT
 CTAGTTTTATCAGATTTCAACAATTATTGAGCATCTCCTTGTAGTGGTTTTCTGTTTATTAGAAAAATCGATGTTA
 ATTTTAAACGAAGTAAGAAGAAATATATAAGTATAAACTAATTTTGGGTATCATCAAAAGTGGATTTTTTAAATAT
 GCATTGATAGAAATTATTTTTTGATTACATTTTATGTAATTCTAATCCAGCTATAAAATATTTAATAGTGTCAAT
 TACTGTGTTCTTCAAACTTTGATGTGCATATGAATTAACCTTTGATTTTCATTAAAAATGCAAATCTGATTTCAATA
 CATCTGGCTTGAGGCAGACATTCTGTCTTCCGAACAAGCTCCCAGATGATGCTGATTCTGACCATAAACACATC
 AGTTTTAGGGATATTAACCTTGTAATATACAGGTATCCCTCCTGGTAAGCTCTGGTATTATGTCTTAACATTTTAA
 AATCTATGGTAATCTTTACAAAATATTTTACTTCCGAACCTCATATACCTGGGGATTTTATTACTCTGGGAATTAT
 GTGTTCTGCCCCATCACTCTCTCTTAATTGGATTTTTTAAATTTATATTATTCATATTGCAGGACTCGGCAGAAAGACCT
 TCGAGAGAAAGGTAGAAAATAAGAATTTGGCTCTCATATGAGGATCACCCATGTGAGAGAGAGAGACAGACAGC
 CTGCCTAAGAAGAAATGAATGTGAATGCGGCTTGTGGCACAGTTGACAAGGATGATAAATCAATAATGCAAGCTT
 ACTATCATTATGAATAGCAATACTGAAGAAATTAACCAAAAGATTGCTGTCTCAATATATCTTATATTTATTA
 TTTACCAAATTATTCTAAGAGTATTTCTTCTGAATACCATGTGAGAAAATTCTTAAGAATTTATTGAGTATGAC
 TGTATATTTGAAAAGAGTGTCTTCTGCTTATCTAAGCCAATAAAGGATCTTCATTATTCAATTCTAACTTTC
 TAAGGAAGTCAACCTACAGATCAGAAAGAGGATCTTCAAGGAATAGCATCAAAGACATAGTCAGGTCTCCCATGC
 AGTGACTGGCTGACCATGCAGCCATTACCACCTTTCTGGAAATATTATGCTGCAAAAATGATACAATACACGAAA
 TATCTCAAATTAATAAATAACATTTCCCAAATAGGGCACTAAAAACATGATCCCAAATAAAACTAGCTTCAGG
 GTTGTGAGAATATACTGTTACTCAACACAAAGTTGGACTAAGTCTCAAAGTTAGCCATTGAGTTGTTGTTAACAG
 TTCATTTAGGGTCTCTCAGAAGCTGGGAACTTTCCATTTTGTCAATTTCTTGTACATTGAAGGAAAGGAAGAC
 AACTTAAGACAGCATTACAAAAGTAATTCATGTTTTAAATGTTTAAATCTGGCAGTCGGGCAGGGCTCTCTGTA
 TAACCTCATTTGGAGATGACAAAAATCTAACTTGAGGGCCTCGAGCCAATAAGTCTTCTATTTCTTTACTCAA
 AACTTTTCCCGCAATGGTGCTTTCTTTCACTGTTTTCTGGTGTATTCTATAAATCCAGATTCTCTATGGGAAG
 TAACCTTTTATTGATTGATTTAACCTTTGTATAGCATATAACATGCAAGGCATTGTTCTAAGAACTTTCCACAT
 ATTAACGTGTGTTAATCACTTAATAATCCTAAGTAGGTTCTATTACAGATATGGAACTGAGGCACAGAAAGTTGA
 AGTATCTTACTCAAGGTACACAGTTAGTCAGATCCAGAATTTGGGCCAGGCCATCTGGCTTCGGAATCCATCT
 TTCACCGATTGCTGCTAGTCTCATATCTGTTCCATGTTAGAGGTGAGCTCCCATTGCAGAGGTACACCTGTGAT
 ATCACCATTTTATTTAAACAGACCAGAGATGGTCTTCTCCTTTCTGATCACAGACTCACCTTGAAGAGAAAATAC
 TTCCAAATTGATGCCTAGTTTTAATAGCTTACCTGGGGCTTATTCAAATAATTGCCATGATTTAGGCTTTGGGAG
 AAAGAGAGCTATGAGGCCGTGTGGTTGTAAACGTATGAGACACATGGCGTTCTGCAGGCTCAGCACAGCATCGAT
 TTCTGGTGGGAACACACTCTGATGACCAGTTCCAGAAATAACATTGACTTAATCTCCTCAGTCCCATCATGGTTA
 GCACATTTCAAATGCCTCCTTAACCTTCCATAGGCCAGAGATATTTAGTTTTAACATTTTGTGTAATAAAAT
 AAATTTACACATTCACATTTAATATACTATTAGATGTTATTTCAAGATTCTCTTCATATTACCATCAAAGCAGG
 CAGGCAGGCAGGAGAGAACTGTAGGAAGGACCAGTTTTTTGTTTGTGTTGCTTGTGTTTGTGGAAAAACACGCAC
 TGTGTTTACGATGTAATCTGTAACATTGTATGAATGTCTGATCCACAGAAAACACTCAAACCCAAATGCTTCCAG
 AACCGAAGCTATTTGCCTCCTAGTTCTTGTCAATTGGGAGACCATGGAGTCTGCACTAAC (配列番号 3)

【0040】

その挿入されたMS2結合配列ACATGAGGATCACCCATGT(配列番号4)
)は、配列TGTGTGAGCATGTGTGTGCGTGTGTG(配列番号5)の置換に
 よってTDP-43結合エレメントを破壊する。

【0041】

そのヒトエクソン2A配列は以下の配列を含む：

10

20

30

40

【化 4】

GACTCGGCAGAAGACCTTCGAGAGAAAGGTAGAAAATAAGAATTTGGCTCTCACATGAGGATCACCCATGTCGAG
AGAGAGAGACAGACAGCCTGCCTAAGAAGAAATGAATGTGAATGCGGCTTGTGGCACAGTTGACAAGGATGATAA
ATCAATAATGCAAGCTTACTATCATTATGAATAGCAATACTGAAGAAATTAAAAACAAAAGATTGCTGTCTC
(配列番号 6)

【0042】

そのポリ A シグナル配列は A T T A A A である。

【0043】

その M u t プライマー結合部位は、C C C T C C T G G T A A G C T C T G G T (配列番号 7) および G G A A G T C A A C C T A C A G A T C A G A A A (配列番号 8) である。 10

【0044】

その隣接マウスイントロン配列に下線を付している。

【0045】

以下の 2 つの独立した戦略が、T D P - 4 3 が減少される場合に最も影響を受けるヒト R N A であるスタスミン - 2 をコードする m R N A を同定するために使用されてきた：1) ヒト神経細胞株における s i R N A による T D P - 4 3 の枯渇；および (2) A L S を引き起こす変異 T D P - 4 3 N 3 5 2 S を両方の内因性 T D P - 4 3 遺伝子座に導入するためのゲノム編集。R N A s e q を使用すると、スタスミン - 2 は、T D P - 4 3 の減少によって最も影響を受けた m R N A であり、2 2 k D スタスミン - 2 タンパク質の対応するほぼ完全な喪失を伴った (M e l a m e d Z ら、N a t N e u r o s c i . , 2 0 1 9 ; 2 2 (2) : 1 8 0 ~ 1 9 0) 。そのスタスミン - 2 遺伝子は、5 つの注釈付きエクソンを含む。しかし、T D P - 4 3 の減少または変異は新規なスプライシングされたエクソンを誘導し、R N A - s e q 読取りはイントロン 1 内にマッピングされた (M e l a m e d Z ら、2 0 1 9) 。この新規なエクソン (本明細書において「エクソン 2 a」と呼ぶ) は、野生型細胞には存在しなかったが、T D P - 4 3 が枯渇された場合または内因性 T D P - 4 3 が N 3 5 2 S 変異を保有するように編集された場合のいずれかで出現した。潜在的 3 ' スプライス部位の使用は、T D P - 4 3 枯渇後または T D P - 4 3 N 3 5 2 S 変異の存在下で S H - S Y 5 Y 細胞中でエクソン 2 a に連結されたエクソン 1 を含む R N A を生じた (R T - によって確認した) が、なんらかの下流エクソン 2 に連結されたエクソン 2 a を含む R N A は、何も同定されなかった。むしろ、エクソン 2 a の 3 ' 境界は、通常はイントロン 1 であるものの内部で潜在的ポリアデニル化部位の使用によって生成されることが、決定された (M e l a m e d Z ら、2 0 1 9) 。T D P - 4 3 の可能性のある結合部位に印を付ける 3 つの「G U G U G U」ヘキサマーが、潜在的 3 ' スプライス部位と、未成熟ポリ A 部位との間の領域において同定された。その使用がエクソン 2 a を生成する。実際、ヒト S H - S Y 5 Y 細胞中の T D P - 4 3 についての紫外線架橋免疫沈降法 (i C L I P) データの分析は、T D P - 4 3 がこれらの 3 つの G U G U G U 配列 (スタスミン - 2 m R N A 前駆体に結合する T D P - 4 3 の唯一の部位群) でスタスミン - 2 m R N A 前駆体に結合することを確認し (図 1 e) 、これにより、その m R N A 前駆体と T D P - 4 3 との物理的相互作用を確認した。まとめると、T D P - 4 3 の減少または疾患関連変異はヒトスタスミン - 2 m R N A 前駆体の異常なスプライシングおよび未成熟ポリアデニル化を駆動し、それにより、スタスミン - 2 生成をサイレンシングする (M e l a m e d Z ら、2 0 1 9) 。 20 30 40

【0046】

(I I . マウスモデル)

本明細書において、簡潔性のために、「マウス」および「マウスモデル」(例えば、ヒト状態の代替物) への言及がなされる。これらの用語は、特に言及されない限りは、本明細書全体を通じて「齧歯類」および「齧歯類モデル」(マウス、ラットおよび他の齧歯類の種が挙げられる) を含むために交換可能に使用され得ることが、理解されるべきである。

【0047】

本明細書において使用されている標準的な遺伝学的命名法は種々の齧歯類系統についての独特な識別を提供し、その系統記号は、使用される系統またはストックの型についての基本情報およびその系統の遺伝的内容を伝えることもまた、理解されるべきである。系統およびストックを記号化するための規則は、マウスの遺伝学的命名法の標準化に関する国際委員会 (International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice) によって公表されている。これらの規則は、Mouse Genome Database (MGD; informatics.jax.org) からオンラインで入手可能である。これらの規則は、印刷版で刊行された (Lyons, 1996)。系統記号は、代表的には、施設登録コード (ラボコード (Lab Code)) を含む。その登録簿は、米国科学アカデミー (National Academy of Sciences, Washington, D.C.) にある実験動物研究協会 (Institute for Laboratory Animal Research (ILAR)) で維持される。ラボコード (Lab Code) は、ILARのウェブサイト (nas.edu/cls/ilar/home.nsf) にて電子的に入手され得る。Davisson MT, Genetic and Phenotypic Definition of Laboratory Mice and Rats / What Constitutes an Acceptable Genetic-Phenotypic Definition, National Research Council (US) International Committee of the Institute for Laboratory Animal Research, Washington (DC): National Academies Press (US); 1999 もまた、参照のこと。

10

20

【0048】

本明細書において提供されているマウスモデルは、外因性ヒトスタスミン - 2 ポリヌクレオチド配列を含むように遺伝子改変された内因性スタスミン - 2 遺伝子 (本明細書において「ヒト化スタスミン - 2 遺伝子」と呼ばれる) を発現する、トランスジェニックマウスモデルである。トランスジェニックマウスは、そのゲノム中に (組み込まれた) 外因性核酸 (例えば、導入遺伝子または導入遺伝子領域) を有するマウスである。

【0049】

トランスジェニックマウスを作製する方法は周知である。トランスジェニックマウスの作製のために使用される3つの従来の方法としては、DNAマイクロインジェクション (Gordon および Ruddle, Science, 1981: 214: 1244 ~ 1244 (参照により本明細書に援用される))、胚性幹細胞媒介性遺伝子移入 (Gossler ら, Proc. Natl. Acad. Sci. 1986, 83: 9065 ~ 9069 (参照により本明細書に援用される)) およびレトロウイルス媒介性遺伝子移入 (Jaenisch, Proc. Natl. Acad. Sci., 1976, 73: 1260 ~ 1264 (参照により本明細書に援用される)) が挙げられ、これらのいずれかが、本明細書において提示されているとおりに使用され得る。例えば、クラスター化された規則的に間隔を空けたパンドロームリピーター (CRISPR/Cas) ヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、またはジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を使用するゲノム編集方法が、本明細書の他の箇所に記載されている。

30

40

【0050】

受精した胚 (例えば、1細胞胚 (例えば、接合子) または多細胞胚 (例えば、接合子後の発生段階、例えば、胚盤胞) への核酸の送達後に、その受精した胚は偽妊娠雌に移入され、その後、これは子孫を出産する。ヒト化スタスミン - 2 遺伝子をコードする核酸の有無は、例えば、多数の遺伝子型決定法 (例えば、配列決定および/またはゲノムPCR) を使用して確認され得る。

【0051】

(III. 核酸: 操作および送達)

50

本明細書において提供されている核酸は、一部の実施形態において、操作されている。操作された核酸とは、天然では存在しない核酸（例えば、互いに共有結合された少なくとも2個のヌクレオチドであり、一部の 경우에는、ホスホジエステル結合（ホスホジエステル骨格と呼ばれる）を含む）である。操作された核酸としては、組換え核酸および合成核酸が挙げられる。組換え核酸とは、2つの別々の生物（例えば、ヒトおよびマウス）に由来する核酸（例えば、単離された核酸、合成核酸またはそれらの組合せ）を連結することによって構築された分子である。合成核酸とは、増幅されているか、または化学的にもしくは他の手段によって合成されている分子である。合成核酸としては、化学的に改変されているかまたは別の方法で改変されているが、天然に存在する核酸分子と塩基対形成（結合）し得る、核酸が挙げられる。組換え核酸および合成核酸としてはまた、上記のいずれかの複製から生じる分子が挙げられる。 10

【0052】

操作された核酸は、DNA（例えば、ゲノムDNA、cDNAもしくはゲノムDNAとcDNAとの組合せ）、RNAまたはハイブリッド分子を含み得、例えば、その核酸は、デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチド（例えば、人工または天然）との任意の組合せ、ならびに2種以上の塩基（ウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、イソシトシンおよびイソグアニンが挙げられる）の任意の組合せを含む。

【0053】

一部の実施形態において、核酸は相補的DNA（cDNA）である。cDNAは、逆転写酵素によって触媒される反応において、一本鎖RNA（例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）またはマイクロRNA（miRNA））テンプレートから合成される。 20

【0054】

本開示の操作された核酸は、標準的な分子生物学の方法を使用して作製され得る（例えば、GreenおよびSambrook、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、2012、Cold Spring Harbor Pressを参照のこと）。一部の実施形態において、核酸は、GIBSON ASSEMBLY（登録商標）Cloning（例えば、Gibson, D. G.ら、Nature Methods、343~345、2009；およびGibson, D. G.ら、Nature Methods、901~903、2010（その各々が本明細書に参照により援用される）を参照のこと）を使用して作製される。GIBSON ASSEMBLY（登録商標）は、代表的には、単一試験管反応において、5'エキソヌクレアーゼ、DNAポリメラーゼの3'伸長活性およびDNAリガーゼ活性という、3種の酵素活性を使用する。その5'エキソヌクレアーゼ活性は、5'末端配列を部分的に切断（chew back）し、その相補配列をアニーリングのために露出させる。その後、そのポリメラーゼ活性は、アニールされたドメインにある間隙を埋める。その後、DNAリガーゼが、そのニックを塞ぎ、DNAフラグメントと一緒に共有結合する。隣接するフラグメントの重複配列は、Golden Gate Assemblyにおいて使用される重複配列よりもかなり長く、したがって、より高い割合の正確なアセンブリを生じる。操作された核酸を作製する他の方法が、本開示にしたがって使用され得る。 30 40

【0055】

遺伝子はヌクレオチドの明瞭な配列であり、そのヌクレオチドの順序は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド中のモノマーの順序を決定する。遺伝子は、代表的にはタンパク質をコードする。遺伝子は、内因性（宿主生物に天然で存在する）であってもよく、外因性（宿主生物に天然で移入されるかもしくは遺伝子操作を通じて移入される）であってもよい。アレルは、変異によって生じ染色体上の同じ座位において見出される、遺伝子の2種以上の選択的形態のうちの一つである。遺伝子は、一部の実施形態において、プロモーター配列、コード領域（例えば、エクソン）、非コード領域（例えば、イントロン）、および調節領域（調節配列とも呼ばれる）を含む。

【0056】

ヒト遺伝子を含むマウスは、ヒト導入遺伝子を含むと考えられる。導入遺伝子は、宿主生物にとって外因性である遺伝子である。すなわち、導入遺伝子は、宿主生物に天然で移入されたかまたは遺伝子操作を通じて移入された、遺伝子である。導入遺伝子は、その宿主生物（その導入遺伝子を含む生物（例えば、マウス））に天然では存在しない。

【 0 0 5 7 】

プロモーターは、RNAポリメラーゼが結合して転写を開始するヌクレオチド配列（例えば、ATG）である。プロモーターは、代表的には、転写開始部位からすぐ上流（その5'末端）に位置する。一部の実施形態において、プロモーターは内因性プロモーターである。内因性プロモーターは、その宿主動物に天然で存在するプロモーターである。

【 0 0 5 8 】

オープンリーディングフレームは、開始コドン（例えば、ATG）で始まり終止コドン（例えば、TAA、TAG、またはTGA）で終わる連続する一続きのコドンであり、ポリペプチド（例えば、タンパク質）をコードする。オープンリーディングフレームは、あるプロモーターがそのオープンリーディングフレームの転写を調節する場合には、そのプロモーターに作動可能に連結されている。

【 0 0 5 9 】

エクソンは、遺伝子のうちのアミノ酸をコードする領域である。イントロン（および他の非コードDNA）は、遺伝子のうちのアミノ酸をコードしない領域である。

【 0 0 6 0 】

生成物（例えば、タンパク質）をコードするヌクレオチド配列は、一部の実施形態において、200塩基対（bp）～100キロベース（kb）の長さを有する。そのヌクレオチド配列は、一部の実施形態において、少なくとも10kbの長さを有する。例えば、そのヌクレオチド配列は、少なくとも15kb、少なくとも20kb、少なくとも25kb、少なくとも30kb、または少なくとも35kbの長さを有し得る。一部の実施形態において、そのヌクレオチド配列は、10kb～100kb、10kb～75kb、10kb～50kb、10kb～30kb、20kb～100kb、20kb～75kb、20kb～50kb、20kb～30kb、30kb～100kb、30kb～75kb、または30kb～50kbの長さを有する。

【 0 0 6 1 】

本明細書において提供されている核酸のいずれか1つは、200bp～500kb、200bp～250kb、または200bp～100kbの長さを有し得る。核酸は、一部の実施形態において、少なくとも10kbの長さを有する。例えば、核酸は、少なくとも15kb、少なくとも20kb、少なくとも25kb、少なくとも30kb、少なくとも35kb、少なくとも50kb、少なくとも100kb、少なくとも200kb、少なくとも300kb、少なくとも400kb、または少なくとも500kbの長さを有し得る。一部の実施形態において、核酸は、10kb～500kb、20kb～400kb、10kb～300kb、10kb～200kb、または10kb～100kbの長さを有する。一部の実施形態において、核酸は、10kb～100kb、10kb～75kb、10kb～50kb、10kb～30kb、20kb～100kb、20kb～75kb、20kb～50kb、20kb～30kb、30kb～100kb、30kb～75kb、または30kb～50kbの長さを有する。核酸は、環状であってもよく、直鎖状であってもよい。

【 0 0 6 2 】

本明細書において記載されている核酸は、一部の実施形態において、改変を含む。改変とは、核酸に関して言えば、対応する野生型核酸（例えば、天然に存在する核酸）と比較したその核酸のあらゆる操作である。したがって、ゲノム改変とは、ゲノム中の対応する野生型核酸（例えば、天然に存在する（改変されていない）核酸）と比較した、ゲノム中の（例えば、コード領域中、非コード領域中、および/または調節領域中の）核酸のあらゆる操作である。核酸（例えば、ゲノム）改変の非限定的例としては、欠失、挿入、「インデル」（欠失および挿入）、ならびに置換（例えば、点変異）が挙げられる。一部の実

10

20

30

40

50

施形態において、遺伝子における欠失、挿入、インデル、または他の改変は、その遺伝子が機能的生成物（例えば、タンパク質）をもはやコードしないように、フレームシフト変異を生じる。改変はまた、化学的改変、例えば、少なくとも1核酸塩基の化学的改変を含む。核酸改変の方法（例えば、遺伝子不活性化を生じる方法）は公知であり、その方法としては、RNA干渉、化学的改変、および遺伝子編集（例えば、リコンビナーゼまたは他のプログラム可能なヌクレアーゼシステム（例えば、CRISPR/Cas、TALEN、および/もしくはZFN）を使用する）が挙げられるが、それらに限定されない。

【0063】

核酸（例えば、遺伝子のアレルまたはアレル（複数））は、検出可能なレベルの機能的遺伝子生成物（例えば、機能的タンパク質）をその核酸が生成しないように、改変され得る。したがって、不活性化されたアレルとは、検出可能なレベルの機能的遺伝子生成物（例えば、機能的タンパク質）を生成しないアレルである。タンパク質の検出可能なレベルとは、標準的なタンパク質検出アッセイ（例えば、フローサイトメトリーおよび/またはELISA）を使用して検出されるタンパク質のあらゆるレベルである。一部の実施形態において、不活性化されたアレルは、転写されない。一部の実施形態において、不活性化されたアレルは、機能的タンパク質をコードしない。

10

【0064】

核酸の送達のために使用されるベクターとしては、ミニサークル、プラスミド、細菌人工染色体（BAC）、および酵母人工染色体が挙げられる。しかし、ベクターは必要ではない可能性があることが、理解されるべきである。例えば、環状化核酸または直鎖状核酸が、そのベクター骨格を用いずに胚に送達され得る。ベクター骨格は小さく（約4 kb）、一方、環状化されるドナーDNAは、例えば、>100 bp ~ 50 kbの範囲であり得る。

20

【0065】

トランスジェニックマウスの作製のために核酸をマウス胚に送達するための方法としては、エレクトロポレーション（例えば、Wang Wら、J Genet Genomics、2016；43（5）：319~27；WO2016/054032；およびWO2017/124086（それらの各々が参照により本明細書に援用される）を参照のこと）、DNAマイクロインジェクション（例えば、GordonおよびRuddle、Science、1981；214：1244~124（参照により本明細書に援用される）を参照のこと）、胚性幹細胞媒介性遺伝子移入（例えば、Gosslerら、Proc Natl Acad Sci、1986；83：9065~9069（参照により本明細書に援用される）を参照のこと）、ならびにレトロウイルス媒介性遺伝子移入（例えば、Jaenisch、Proc Natl Acad Sci、1976；73：1260~1264（参照により本明細書に援用される）を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されず、これらの各々が、本明細書において提示されているとおりに使用され得る。

30

【0066】

（IV．ゲノム編集方法）

操作された核酸（例えば、ガイドRNA、ドナーポリヌクレオチド、および他の核酸コード配列など）は、任意の適切な方法を使用して胚のゲノムに導入され得る。本出願は、例えば、トランスジェニック齧歯類を作製するために胚のゲノムに核酸を導入するための、種々の遺伝子編集技術の使用を企図する。非限定的例としては、プログラム可能なヌクレアーゼベースのシステム、例えば、クラスター化された規則的に間隔を空けた短いパリンドロームリピート（CRISPR）システム、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、および転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）が挙げられる。例えば、Carroll D、Genetics、2011；188（4）：773~782；Joung JKら、Nat Rev Mol Cell Biol、2013；14（1）：49~55；およびGaj Tら、Trends Biotechnol、2013年7月；31（7）：397~405（これらの各々が本明細書に参照により

40

50

援用される)を参照のこと。

【0067】

一部の実施形態において、CRISPRシステムが、本明細書において提供されているマウス胚のゲノムを編集するために使用される。例えば、Harms DWら、Curr Protoc Hum Genet.、2014; 83: 15.7.1~15.7.27; およびInui Mら、Sci Rep.、2014; 4: 5396 (これらの各々が本明細書に参照により援用される)を参照のこと。例えば、Cas9 mRNAもしくはCas9タンパク質、1つもしくは複数のガイドRNA (gRNA)、および/またはドナー核酸が、1細胞(接合子)期もしくはより後期のマウス胚に直接送達(例えば、注射もしくはエレクトロポレーション)され得、相同組換え修復(HDR)を促進し、例えば、操作された核酸(例えば、ドナー核酸)をゲノム中に導入し得る。 10

【0068】

CRISPR/Casシステムは、遺伝子編集のためのRNA誘導型DNA標的化プラットフォームとして別目的で利用されていた、原核生物中の天然に存在する防御機構である。操作されたCRISPRシステムは、ガイドRNA (gRNA) およびCRISPR関連エンドヌクレアーゼ(例えば、Casタンパク質)という2種の主要成分を含む。このgRNAは、ヌクレアーゼ結合のための足場配列と、改変されるべきゲノム標的(例えば、遺伝子)を規定するユーザーが規定したヌクレオチドスペーサー(例えば、約15~25ヌクレオチド、または約20ヌクレオチド)とから構成された、短い合成RNAである。したがって、そのgRNA中に存在する標的配列を単に変更することによって、そのCasタンパク質のゲノム標的を変更し得る。一部の実施形態において、そのCas9エンドヌクレアーゼは、Streptococcus pyogenes (NGG PAM) またはStaphylococcus aureus (NNGRRTもしくはNNGRR(N) PAM) に由来するが、他のCas9ホモログ、Cas9オルソログ、および/またはCas9バリエーション(例えば、Cas9の進化したバージョン)が、本明細書において提供されているとおり使用され得る。本明細書において提供されているとおり使用され得るRNA誘導型ヌクレアーゼのさらなる非限定的例としては、Cpf1 (TTN PAM); SpCas9 D1135Eバリエーション(NGG(減少したNAG結合) PAM); SpCas9 VRRERバリエーション(NGCG PAM); SpCas9 EQRバリエーション(NGAG PAM); SpCas9 VQRバリエーション(NGANまたはN 30 GNG PAM); Neisseria meningitidis (NM) のCas9 (NNNNGATT PAM); Streptococcus thermophilus (ST) のCas9 (NNAAGAAW PAM); およびTreponema denticola (TD) のCas9 (NAAAAAC) が挙げられる。一部の実施形態において、そのCRISPR関連エンドヌクレアーゼは、Cas9、Cpf1、C2c1、およびC2c3から選択される。一部の実施形態において、そのCasヌクレアーゼはCas9である。

【0069】

ガイドRNAは、標的核酸配列にハイブリダイズ(結合)する少なくとも1つのスペーサー配列と、そのエンドヌクレアーゼに結合してそのエンドヌクレアーゼをその標的核酸配列へと誘導するCRISPR反復配列とを、含む。当業者によって理解されたとおり、各gRNAは、そのゲノム標的配列に対して相補的なスペーサー配列を含むように設計される。例えば、Jinekら、Science、2012; 337: 816~821 およびDeltchevaら、Nature、2010; 471: 602~607 (これらの各々が本明細書に参照により援用される)を参照のこと。 40

【0070】

一部の実施形態において、そのRNA誘導型ヌクレアーゼとそのgRNAとは、胚への送達の前に、リボヌクレオタンパク質(RNP)を形成するように複合体化される。

【0071】

RNA誘導型ヌクレアーゼまたはそのRNA誘導型ヌクレアーゼをコードする核酸の濃 50

度は、変化し得る。一部の実施形態において、その濃度は、 $100\text{ ng}/\mu\text{l} \sim 1000\text{ ng}/\mu\text{l}$ である。例えば、その濃度は、 $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $150\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $200\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $250\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $300\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $350\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $400\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $450\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $500\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $550\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $600\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $650\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $700\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $750\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $800\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $850\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $900\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $950\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、または $1000\text{ ng}/\mu\text{l}$ であり得る。一部の実施形態において、その濃度は、 $100\text{ ng}/\mu\text{l} \sim 500\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、または $200\text{ ng}/\mu\text{l} \sim 500\text{ ng}/\mu\text{l}$ である。

【0072】

gRNAの濃度もまた、変化し得る。一部の実施形態において、その濃度は、 $200\text{ ng}/\mu\text{l} \sim 2000\text{ ng}/\mu\text{l}$ である。例えば、その濃度は、 $200\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $300\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $400\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $500\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $600\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $700\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $800\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $900\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $1000\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $1100\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $1200\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $1300\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $1400\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $1500\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $1600\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $1700\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $1700\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $1900\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、または $2000\text{ ng}/\mu\text{l}$ であり得る。一部の実施形態において、その濃度は、 $500\text{ ng}/\mu\text{l} \sim 1000\text{ ng}/\mu\text{l}$ である。一部の実施形態において、その濃度は、 $100\text{ ng}/\mu\text{l} \sim 1000\text{ ng}/\mu\text{l}$ である。例えば、その濃度は、 $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $150\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $200\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $250\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $300\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $350\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $400\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $450\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $500\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $550\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $600\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $650\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $700\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $750\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $800\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $850\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $900\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $950\text{ ng}/\mu\text{l}$ 、または $1000\text{ ng}/\mu\text{l}$ であり得る。

【0073】

一部の実施形態において、RNA誘導型ヌクレアーゼまたはそのRNA誘導型ヌクレアーゼをコードする核酸の濃度と、gRNAの濃度との比は、2:1である。他の実施形態において、RNA誘導型ヌクレアーゼまたはそのRNA誘導型ヌクレアーゼをコードする核酸の濃度と、gRNAの濃度との比は、1:1である。

【0074】

ドナー核酸は、代表的には、ホモロジーアームが両側に隣接している目的の配列を含む。ホモロジーアームは、ゲノム座位中に位置するゲノムDNA領域と相同なssDNA領域である。一方のホモロジーアームは（目的の配列が導入される）目的のゲノム領域の左（5'）側に位置し（左ホモロジーアーム）、別のホモロジーアームは目的のゲノム領域の右（3'）側に位置する（右ホモロジーアーム）。これらのホモロジーアームは、そのssDNAドナーとゲノム座位との間での相同組換えを可能にして、（例えば、CRISPR/Cas9媒介性相同組換え修復（HDR）を介して）目的のゲノム座位への目的の配列の挿入をもたらす。

【0075】

そのホモロジーアームは、長さを変化し得る。例えば、各ホモロジーアーム（左アームおよび右ホモロジーアーム）は、20ヌクレオチド塩基～1000ヌクレオチド塩基の長さを有し得る。一部の実施形態において、各ホモロジーアームは、20ヌクレオチド塩基～200ヌクレオチド塩基、20ヌクレオチド塩基～300ヌクレオチド塩基、20ヌクレオチド塩基～400ヌクレオチド塩基、20ヌクレオチド塩基～500ヌクレオチド塩基、20ヌクレオチド塩基～600ヌクレオチド塩基、20ヌクレオチド塩基～700ヌクレオチド塩基、20ヌクレオチド塩基～800ヌクレオチド塩基、または20ヌクレオチド塩基～900ヌクレオチド塩基の長さを有する。一部の実施形態において、各ホモロジーアームは、20ヌクレオチド塩基、30ヌクレオチド塩基、40ヌクレオチド塩基、50ヌクレオチド塩基、60ヌクレオチド塩基、70ヌクレオチド塩基、80ヌクレオチド塩基、90ヌクレオチド塩基、100ヌクレオチド塩基、150ヌクレオチド塩基、200ヌクレオチド塩基、250ヌクレオチド塩基、300ヌクレオチド塩基、350ヌク

レオチド塩基、400ヌクレオチド塩基、450ヌクレオチド塩基、500ヌクレオチド塩基、550ヌクレオチド塩基、600ヌクレオチド塩基、650ヌクレオチド塩基、700ヌクレオチド塩基、750ヌクレオチド塩基、800ヌクレオチド塩基、850ヌクレオチド塩基、900ヌクレオチド塩基、950ヌクレオチド塩基、または1000ヌクレオチド塩基の長さを有する。一部の実施形態において、一方のホモロジーアームの長さは、もう一方のホモロジーアームの長さとは異なる。例えば、一方のホモロジーアームは20ヌクレオチド塩基の長さを有し得、もう一方のホモロジーアームは50ヌクレオチド塩基の長さを有し得る。一部の実施形態において、そのドナーDNAは一本鎖である。一部の実施形態において、そのドナーDNAは二本鎖である。一部の実施形態において、そのドナーDNAは、例えば、ホスホロチオエート化を介して、改変される。他の改変が、

10

【0076】

(V. 使用の方法)

本明細書において提供されているマウスモデルは、一部の実施形態において、スタスミン-2がどのように神経機能に寄与するのかを決定するために、使用され得る。他の実施形態において、そのマウスモデルは、神経変性疾患（例えば、ALS、FTD、および種々の形態のパーキンソニズムなどが挙げられる、TDP-43タンパク質症など）を処置するための治療アプローチを開発するために使用され得る。したがって、一部の態様において、マウスモデルに候補治療剤分子を投与する工程、およびそのマウスにおける改変された表現型についてアッセイする工程を含む、方法が、本明細書において提供される。

20

【0077】

神経変性疾患のための遺伝子療法の最も有望な橋渡し戦略の中では、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)が、致死性遺伝子発現またはRNAプロセッシング欠陥を矯正することによって寿命を伸ばす実行可能な治療アプローチとして出現してきた。ASOはその相補的標的RNA分子に結合する化学的に改変された短い一本鎖核酸であり、ASOは、改変されていないASOについて、細胞エンドヌクレアーゼであるリボヌクレアーゼHによってDNA-RNAハイブリッドとして認識されるキメラ二重鎖を生成して、その標的RNAの切断および分解をもたらすが、ASO62はそうしない。スーパーオキシドジスムターゼ1(SOD1)遺伝子中に変異を有する家族性ALS患者の処置のための現在臨床試験中の、中枢神経系におけるASO投与という先駆的努力において、SOD1をコードするmRNAを低下させると、疾患進行の顕著な緩徐化をもたらした。それ以来、ASOは、いくつかの神経学的疾患（ハンチントン病、C9ORF72-ALS/FTD67-70、タウオパチー、孤発性ALSおよび脊髄小脳失調症、バッテン病、およびペリツェウス・メルツバッハ病が挙げられる）の遺伝的原因を標的とするために利用されてきた。リボヌクレアーゼHによって認識されないように改変された場合、ASOはmRNA前駆体プロセッシングを調節し得る。実際、致死性神経発達疾患である脊髄性筋萎縮症(SMA)についての最初の処置は、この戦略を使用する。SMA薬物であるスピナラザ(Spinraza)(ヌシネルセン(Nusinersen))としても知られている)は、リボヌクレアーゼH酵素を動員することなくその標的化mRNAに結合する、化学的に改変されたASOベースの薬物であり、スプライシング調節をもたらすが、mRNA分解は

30

40

【0078】

スタスミン-2レベルの減少は、ALS/FTDの特徴であり、孤発性ALSおよびFTDについて現在知られている最も有望な治療的遺伝子標的の一つである。本明細書において提供されているマウスモデルは、一部の実施形態において、スタスミン-2 mRNA前駆体の異常なスプライシングを遮断することによってスタスミン-2レベルを回復するように標的化された、アンチセンスASOベースの治療法を開発するために使用され得る。SMAにおいてSMN2 mRNA前駆体のスプライシングにおけるASO媒介性変化を連想させるアプローチを使用して、例えば、これらのマウスモデルは、孤発性および家族性のALS/FTDにおいてスタスミン-2 ASOの治療能力を試験するた

50

めに使用され得る。

【0079】

本開示の候補治療剤分子としてはまた、スタスミン - 2 mRNA 前駆体またはスタスミン - 2 mRNA のスプライシングの推定または既知の小分子調節因子（例えば、インヒビター、薬物）が挙げられる。

【0080】

マウス表現型における改変（変化）をアッセイすることまたは評価することは、神経変性疾患モデルに関連する種々の表現型と同様に、公知である。その表現型は、例えば、行動表現型または病理学的（例えば、神経病理学的）表現型であり得る（例えば、Kang J. ら、STAR Protoc.、2021年7月7日；2（3）：100654）を参照のこと。Janus C. ら、Methods Mol Biol.、2010；602：323～45；Choi J. ら、NMR Biomed.、2007；20：26～237；van der Staay F. ら、Behav Brain Funct.、2009年2月25日；5：11もまた、参照のこと。

【0081】

一部の実施形態において、その表現型は運動欠損である。運動欠損の非限定的な例としては、振戦、麻痺、異常歩行、および下肢の握り行動が挙げられる。一部の実施形態において、その運動欠損は、オープンフィールド分析、握力分析、またはロータロッド分析によってアッセイされる。

【0082】

一部の実施形態において、その表現型は認知欠損である（例えば、Holter S. ら、Curr Protoc Mouse Biol.、2015年12月2日；5（4）：331～358を参照のこと）。

【0083】

評価され得る他の表現型としては、運動ニューロン変性および／または神経筋脱神経が挙げられる。

【0084】

（さらなる実施形態）

以下の番号を付けた実施形態が、本開示によって包含される：

1. 切断型スタスミン - 2 メッセンジャーリボ核酸（mRNA）をコードする核酸を含むマウス。 30
2. 上記切断型スタスミン - 2 mRNA が、内因性マウススタスミン - 2 遺伝子のエクソン2～エクソン5によってコードされるポリヌクレオチド配列を欠く、実施形態1に記載のマウス。
3. 上記切断型スタスミン - 2 mRNA が、ヒトスタスミン - 2 mRNA の領域を含む、実施形態1または2に記載のマウス。
4. 上記ヒトスタスミン - 2 mRNA の領域がヒトスタスミン - 2 エクソン2 a ポリヌクレオチド配列によってコードされる、実施形態3に記載のマウス。
5. ヒトスタスミン - 2 遺伝子の領域を含む核酸を含むマウス。
6. 上記領域がヒトスタスミン - 2 エクソン2 a ポリヌクレオチド配列とポリアデニル化配列とを含む、実施形態5に記載のマウス。 40
7. 内因性スタスミン - 2 遺伝子座を含むマウスであって、当該内因性スタスミン - 2 遺伝子座は、ヒトスタスミン - 2 エクソン2 a ポリヌクレオチド配列と、必要に応じてポリアデニル化配列とを含む核酸を含む、マウス。
8. 上記ヒトスタスミン - 2 エクソン2 a ポリヌクレオチド配列が350ヌクレオチド塩基対～450ヌクレオチド塩基対の長さを有する、実施形態4、6、または7に記載のマウス。
9. 上記ヒトスタスミン - 2 エクソン2 a ポリヌクレオチド配列が、配列番号6のヌクレオチド配列、または配列番号6のヌクレオチド配列と少なくとも90%同一性もしくは少なくとも95%同一性を有する配列を含む、実施形態8に記載のマウス。 50

10. 上記ヒトスタスミン - 2 エクソン 2 a ポリヌクレオチド配列が上記内因性スタスミン - 2 遺伝子座のイントロン領域中にある、実施形態 4 または 6 ~ 9 のいずれか 1 つに記載のマウス。

11. 上記ヒトスタスミン - 2 エクソン 2 a ポリヌクレオチド配列が上記内因性スタスミン - 2 遺伝子座のエクソン 1 とエクソン 2 との間にある、実施形態 10 に記載のマウス。

12. 上記ヒトスタスミン - 2 エクソン 2 a ポリヌクレオチド配列が T a r DNA 結合タンパク質 43 (T D P - 43) 結合部位を含む、実施形態 4 または 6 ~ 11 のいずれか 1 つに記載のマウス。

13. 上記ヒトスタスミン - 2 エクソン 2 a ポリヌクレオチド配列が、T D P - 43 に結合しない改変型 T D P - 43 結合部位を含む、実施形態 4 または 6 ~ 11 のいずれか 1 つに記載のマウス。 10

14. 実施形態 1 ~ 13 のいずれか 1 つに記載のマウスに候補治療剤分子を投与する工程；および

当該マウスにおける改変された表現型についてアッセイする工程を含む、方法。

15. 上記候補治療剤分子が S t m n 2 mRNA 前駆体の異常なスプライシングを遮断する、実施形態 14 に記載の方法。

16. 上記候補治療剤が、上記ヒトエクソン 2 a ポリヌクレオチド配列に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O) である、実施形態 14 または 15 に記載の方法。 20

17. 上記候補治療剤が小分子薬である、実施形態 14 または 15 に記載の方法。

18. 上記表現型が行動表現型または病理学的表現型である、実施形態 14 ~ 17 のいずれか 1 つに記載の方法。

19. 上記表現型が運動欠損である、実施形態 14 ~ 18 のいずれか 1 つに記載の方法。

20. 上記運動欠損が振戦、麻痺、異常歩行、または下肢の握り行動から選択される、実施形態 19 に記載の方法。

21. 上記運動欠損がオープンフィールド分析、握力分析、またはロータロッド分析によってアッセイされる、実施形態 19 または 20 に記載の方法。

22. 上記表現型が認知欠損である、実施形態 14 ~ 18 のいずれか 1 つに記載の方法。

23. 上記表現型が運動ニューロン変性および / または神経筋脱神経である、実施形態 14 ~ 18 のいずれか 1 つに記載の方法。 30

24. 実施形態 1 ~ 13 のいずれか 1 つに記載のマウスを作製する方法であって、上記核酸を上記マウスのゲノムに導入する工程を含む、方法。

【実施例】

【0085】

(実施例 1 . ノックインヒト化 S t m n 2 マウスの作製)

スタスミン - 2 がどのように神経機能に寄与するかを決定するため、および A L S および F T D におけるスタスミン - 2 レベルの回復に基づく治療アプローチを開発するために、当該分野は、ヒトにおいて当てはまることが実証されているとおり、スタスミン - 2 転写物のプロセシングが T D P - 43 機能に依存的である、より忠実な動物モデルを必要とする。本実施例において、スタスミン - 2 遺伝子のイントロン 1 の一部をヒト化した A L S / F T D マウスモデルを、作製した。このアプローチを使用して、種々の A L S / F T D モデルにおける T D P - 43 機能障害の程度を評価し得、異常なスタスミン - 2 mRNA プロセシングが神経変性に寄与するか否かを確立し得る。 40

【0086】

上記のとおり、そのマウス S t m n 2 遺伝子は、ヒトエクソン 2 a の正確なホモログを含まない。しかし、それは、その S t m n 2 遺伝子のイントロン 1 内に、推定上の (しかし、使用されない) スプライス配列を含む偽エクソン 2 a 領域を含むが、それは、T D P - 43 結合配列およびポリアデニル化シグナルの両方を欠く。T D P - 43 依存的な潜在的スプライシングおよび未成熟ポリアデニル化駆動性スタスミン - 2 喪失を再現する齧歯 50

類モデルを作製するために、C R I S P R / C a s 9 ゲノム編集を使用して、偽エクソン 2 a を含むマウスイントロン 1 の 4 7 9 ヌクレオチド (n t) 領域を、7 5 個の隣接塩基および 9 2 個の隣接塩基とともに 2 2 7 塩基のヒトエクソン 2 a を含む 3 9 4 n t ヒト配列で置換した (図 2 A) 。正確なゲノム編集を、ショートレンジおよびロングレンジの P C R とその後の配列決定とによって確認した。その後、ヘテロ接合性ヒト化 S t m n 2 マウスおよびホモ接合性ヒト化 S t m n 2 マウス (本明細書において S t m n 2 ^{H u m} / + および S t m n 2 ^{H u m} / ^{H u m} と呼ぶ) の両方が生存可能であり繁殖能力があることを、決定した。これらの S t m n 2 ^{H u m} / + マウスに由来する培養した一次皮質ニューロンを使用して (図 3 A) 、ヒト化 S t m n 2 m R N A 前駆体のプロセシングが T D P - 4 3 依存的であると確認した。実際、これらのヒト化一次ニューロンにおける T D P - 4 3 の A S O 媒介性減少 (図 3 B) は全長スタスミン - 2 m R N A の減少を誘発し (図 3 C) 、潜在的スプライス部位およびポリアデニル化部位の両方が使用されて切断型 S t m n 2 m R N A が生成された (ここで、マウスエクソン 1 がスプライシングされてヒトエクソン 2 a になった - 図 3 D) 。

10

【 0 0 8 7 】

(実施例 2 . スタスミン - 2 m R N A 前駆体の潜在的スプライシング / ポリアデニル化の確認)

インビトロ予備結果は、内因性マウススタスミン - 2 遺伝子におけるヒトエクソン 2 a 配列の挿入がスタスミン - 2 m R N A 前駆体プロセシングの T D P - 4 3 依存性を効率的に再現することを強く支持するが、この結果を、P 1 S t m n 2 ^{H u m} / ^{H u m} 仔において T D P - 4 3 s h R N A または対照 s h R N A を発現する A A V 9 の I C V 注射を使用して、成体神経系で確認する。組織を注射の 4 週間後に採集して、イムノブロットおよび定量 R T - P C R によって T D P - 4 3 および全長スタスミン - 2 の R N A レベルおよびタンパク質レベルを測定する。切断型エクソン 2 a 含有 S t m n 2 R N A の作製を、皮質、海馬および小脳から抽出した R N A で評価する (1 群当たり n = 6) 。 T D P - 4 3 の s h R N A 媒介性減少の代替法は、成体マウスにおいてマウス T D P - 4 3 m R N A を標的とする A S O の I C V 注射を使用することであり、これは、忍容性が良好であり中枢神経系における T D P - 4 3 レベルを一時的に減少させると以前に報告された方法である。

20

【 0 0 8 8 】

(実施例 3 . S t m n 2 への T D P - 4 3 の結合を遮断すると、ヒト化エクソン 2 a を含むマウス細胞において S t m n 2 の構成的ミスプライシングおよび減少を誘導する)

マウス内因性遺伝子におけるエクソン 2 a をコードする領域のヒト化 (図 2 A) は、T D P - 4 3 減少の際に潜在的スプライシングを誘導した (図 3 A ~ 図 3 D) 。しかし、そのような細胞系を越えての本質の確認は、哺乳動物神経系の真のインビボでの状況でスタスミン - 2 潜在的スプライシングを標的とする最も効率的な A S O の同定を可能にすることである。このことを達成するために、スタスミン - 2 を標的とする薬物のインビボスクリーニングを、T D P - 4 3 破壊を必要としない構成的スタスミン - 2 ミスプライシングを含むマウスモデルによって促進する。このために、試験を実施して、T D P - 4 3 結合部位を変異させると、ヒト化エクソン 2 a を保有するように操作したマウス N 2 a 神経細胞においてスタスミン - 2 ミスプロセシングをもたらしたか否かを決定した。C R I S P R / C a s 9 操作アプローチを使用して、T D P - 4 3 によって結合された 3 つの G U モチーフを含む 2 4 ヌクレオチドを、M S 2 コートタンパク質 (M C P) によって高親和性で結合される R N A ステムループ構造を採用することが公知である 1 9 ヌクレオチド M S 2 アプタマー配列で置換した (図 2 B) 。そのキメラヒト / マウス内因性スタスミン - 2 遺伝子の一方のアレルまたは両方のアレル中の T D P - 4 3 結合部位を変異させると (図 2 B) 、切断型スタスミン - 2 転写物の長期的生成 (図 4 B) および全長スタスミン - 2 m R N A レベルの減少 (図 4 A) および全長スタスミン - 2 タンパク質レベルの減少 (図 4 C) をもたらした。したがって、スタスミン - 2 ミスプロセシングを標的とする薬物の効率的なインビボ試験のための新規マウスモデルを、作製した。

30

40

50

【0089】

3つのTDP-43結合部位を含むエクソン2aの24塩基セグメントを19塩基MS2結合部位で置換したヒト化スタスミン-2アレルを含む、マウスを作製した(図2B)。2匹の樹立系統を同定した。系統を現在増殖中である。これらを用いて、ヘテロ接合性マウスおよびホモ接合性マウス(S t m n 2 H u m - Δ G U / + および S t m n 2 H u m - Δ G U / H u m - Δ G U)の生存能力を決定し、その後、RNAおよびタンパク質を1月齢動物の種々の脳領域から抽出して(1群当たりn=5、両方の性別)、N2a細胞において観察される(図4A~図4C)とおり、スタスミン-2がTDP-43機能とは無関係にミスプロセッシングされるか否かを決定する。

【0090】

10

本明細書において開示されているすべての参考文献、特許および特許出願は、各々が引用される主題に関して参照により援用され、一部の 경우에는、それはその文書の全体を含み得る。

【0091】

本明細書および特許請求の範囲において文書中で使用される不定冠詞「ある(1つの)(a)」および「ある(1つの)(an)」は、特に反対の明示がなければ、「少なくとも1つ」を意味すると理解されるべきである。

【0092】

特に反対の明示がなければ、本文書において特許請求される1つよりも多い工程または動作を含むあらゆる方法において、その方法の工程または動作の順序は、その方法の工程または動作が記載されている順序には必ずしも限定されないこともまた、理解されるべきである。

20

【0093】

特許請求の範囲ならびに上記の本明細書において、すべての移行句、例えば、「含む(comprising)」、「含む(including)」、「保有する(carrying)」、「有する(having)」、「含む(containing)」、「含む(involving)」、「保持する(holding)」、「から構成される(composed of)」などは、非限定的であり、すなわち、含むが、それらに限定されないことを意味すると理解されるべきである。移行句「からなる」および「から本質的になる」のみは、米国特許庁の特許審査手続きのマニュアル(Manual of Patent Examining Procedures)のセクション2111.03に示されるとおり、それぞれ、限定的移行句または半限定的移行句である。

30

【0094】

数値の前にある用語「約」および「実質的に」は、記載された数値の±10%を意味する。

【0095】

一定範囲の値が提供される場合、その範囲の上端と下端との間(上端および下端を含む)の各値が、本出願において具体的に企図され記載されている。

40

【 図 面 】
【 図 1 】

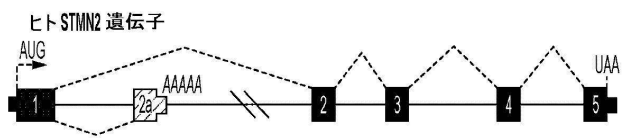


FIG. 1A

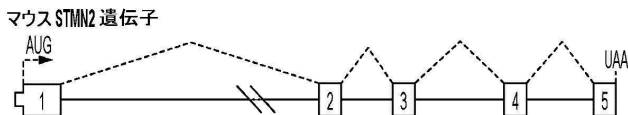
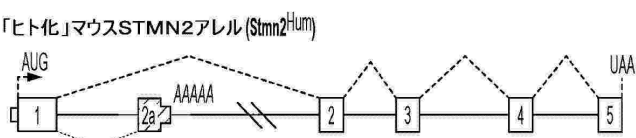


FIG. 1B

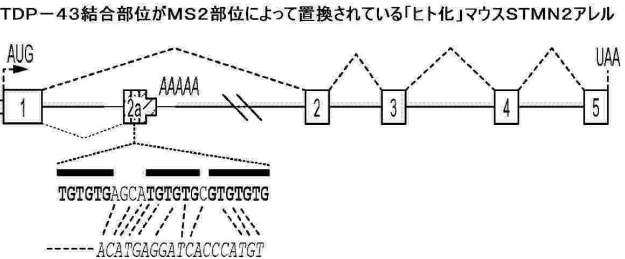
【 図 2 】



ヒト STMN2 のイントロン 1 の
394 塩基対セグメント
TDP-43 が存在しない場合に使用される
潜在的スプライス部位および pA 部位

FIG. 2A

10



MS2 部位によるヒト TDP-43 結合部位の
置換はエクソン 2a の構成的含有をもたらす

FIG. 2B

20

【 図 3 】

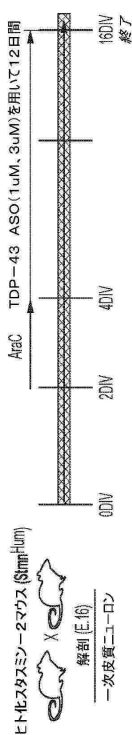


FIG. 3A

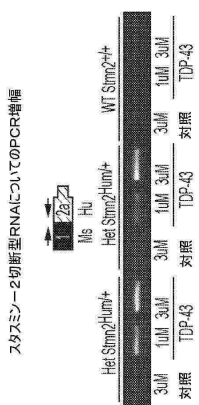


FIG. 3D

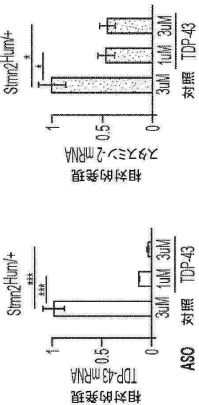


FIG. 3C

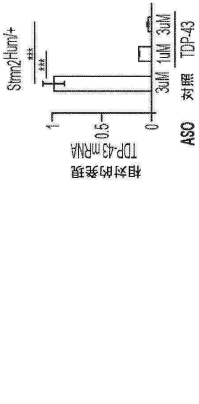


FIG. 3B

【 図 4 】

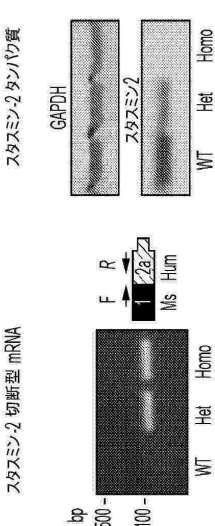


FIG. 4C

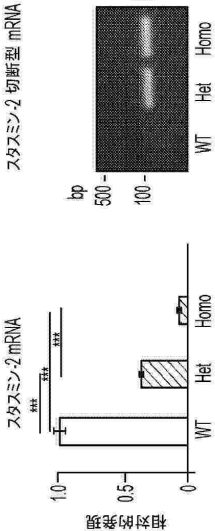


FIG. 4B

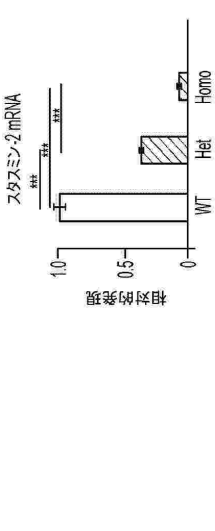


FIG. 4A

30

40

50

【配列表】
2024539458000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/80224

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. A61K 35/30 (2023.01) ADD. C12Q 1/6883 (2023.01) CPC - INV. A01K 67/0276, C12N 15/8509 ADD. A01K 2207/15, A01K 2267/0318, C12Q 2600/158, C12Q 2600/112 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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KIM et al. ALS Genetics: Gains, Losses, and Implications for Future Therapies., Neuron, 9 December 2020, Vol 108, no 5, pp 822-842; pg 828, col 1, para 2, Fig. 3D	1-3
Y	MELAMED et al. Premature polyadenylation-mediated loss of stathmin-2 is a hallmark of TDP-43-dependent neurodegeneration., Nat Neurosci., 14 January 2019, Vol 22, No 2, pp 180-190; pg 181, col 1, para 2, pg 183, col 1, para 3 - col 2, para 1, Fig. 3c, 3d	1-3
Y	US 2012/0192298 A1 (WEINSTEIN et al.) 26 July 2012 (26.07.2012) abstract, para [0248], [0249], [0389]	1-3
X, P	KRUS et al. Loss of Stathmin-2, a hallmark of TDP-43-associated ALS, causes motor neuropathy. Cell Reports, 28 June 2022, vol 39, article no 111001, pp 1-21, entire document	1-3
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "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 31 January 2023		Date of mailing of the international search report FEB 24 2023
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 Karl Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/80224

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/80224

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ 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:
3. ☒ Claims Nos.: 4-21
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ 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.:
4. ☐ 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.:

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ 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.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 K 31/7088(2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N E,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, CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,I T,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,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,ST,SV, SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW		
弁護士 山本 健策		
(72)発明者	ルッツ , キャスリーン マリー	
アメリカ合衆国 メイン 0 4 6 0 9 , パー ハーバー , メイン ストリート 6 0 0		
F ターム (参考)	4B063 QA07 QQ02 QQ43 QQ53 QS38	
	4C084 AA17 NA14 ZA011 ZA222 ZA941 ZC412	
	4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA22 ZA94 ZC41	
	4H045 AA50 BA09 CA40 DA21 EA20 FA74	