

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-511908

(P2023-511908A)

(43)公表日 令和5年3月23日(2023.3.23)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 B 0 6 5
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/861 (2006.01)	C 1 2 N	15/861	Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z	4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全51頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-544353(P2022-544353)	(71)出願人	508241200		
(86)(22)出願日	令和3年1月22日(2021.1.22)		サンガモ セラピューティクス, インコ		
(85)翻訳文提出日	令和4年9月21日(2022.9.21)		ーポレイテッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/014780		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4		
(87)国際公開番号	WO2021/151012		0 0 5 ブリズベン マリーナ ブール		
(87)国際公開日	令和3年7月29日(2021.7.29)		バード 7 0 0 0		
(31)優先権主張番号	62/964,501	(74)代理人	100145403		
(32)優先日	令和2年1月22日(2020.1.22)		弁理士 山尾 憲人		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100122301		
(81)指定国・地域	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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100157956		
			弁理士 稲井 史生		
		(74)代理人	100170520		
			弁理士 笹倉 真奈美		
		(74)代理人	100221545		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 タウ発現抑制のためのジンクフィンガータンパク質転写因子

(57)【要約】

本開示は、神経系におけるタウの発現を阻害するジンクフィンガー融合タンパク質、およびアルツハイマー病、前頭側頭型認知症、および別のタウオパチーなどの神経変性疾患を処置するために該タンパク質を使用する方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ジンクフィンガータンパク質（ZFP）ドメインおよび転写抑制ドメインを含む融合タンパク質であって、ZFPドメインがヒト微小管関連タンパク質タウ（MAPT）遺伝子の標的領域に結合する、融合タンパク質。

【請求項 2】

標的領域が、MAPT 遺伝子の転写開始部位（TSS）の 1.5 kb 以内にある、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 3】

標的領域が、MAPT 遺伝子の TSS の上流 1000 bps 以内、および／または TSS の下流 500 bps 以内にある、請求項 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

ないかまたは最小限の検出可能なオフターゲット結合または活性とともに、融合タンパク質が、MAPT 遺伝子の発現を少なくとも約 40%、75%、90%、95%、または 99% 抑制する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

転写抑制ドメインが、KRABドメインを含み、所望により該KRABドメインがヒトKOX1タンパク質由来である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

DNA 結合ドメインが、ペプチドリンカーを通して転写リプレッサーに連結されている、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

ZFPドメインが、図 14 または 16 に示される DNA 結合認識ヘリックス配列を含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

ZFPドメインが、図 14 または 16 の単一行に示されるような DNA 結合認識ヘリックス配列を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

融合タンパク質の ZFPドメインが、
4 つ、5 つ、または 6 つのジンクフィンガーを含み；
図 14 または 16 に示される標的配列に結合し；
図 15 または 17 に示される ZFP 転写因子の DNA 結合認識ヘリックス配列を含み；
図 14、15、16、または 17 に示されるように連結される DNA 結合認識ヘリックス配列を含み；および／または
配列番号 89～196、197～248 および 267～307 から選択されるアミノ酸配列を含む、
請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の融合タンパク質のコード配列を含む核酸構築物であって、該コード配列が転写調節エレメントに作動可能に連結されている、核酸構築物。

【請求項 11】

転写調節エレメントが、脳細胞において構成的に活性または誘導可能である哺乳動物プロモーターである、請求項 10 に記載の核酸構築物であって、ここで所望により構築物が組換えウイルス構築物である、核酸構築物。

【請求項 12】

請求項 10 または 11 に記載の核酸構築物を含む、組換えウイルス。

【請求項 13】

組換えウイルスが、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、またはレ

10

20

30

40

50

ンチウイルスベクターである、請求項 12 に記載の組換えウイルス。

【請求項 14】

請求項 10 または 11 に記載の核酸構築物、または請求項 12 または 13 に記載の組換えウイルス、および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 15】

請求項 10 または 11 に記載の核酸構築物、または請求項 12 または 13 に記載の組換えウイルスを含む、宿主細胞。

【請求項 16】

宿主細胞がヒト細胞である、請求項 15 に記載の宿主細胞。

【請求項 17】

宿主細胞が、脳細胞または多能性幹細胞であり、所望により幹細胞が胚性幹細胞または誘導可能多能性幹細胞 (iPSC) である、請求項 15 または 16 に記載の宿主細胞。

【請求項 18】

ヒト脳細胞におけるタウの発現を阻害する方法であって、所望により請求項 10 または 11 に記載の核酸構築物、請求項 12 または 13 に記載の組換えウイルスの導入を通して、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を細胞中に導入すること、またはそれにより細胞におけるタウの発現を阻害することを含む、方法。

【請求項 19】

ヒト脳細胞が、ニューロン、グリア細胞、上皮細胞、神経上皮細胞、内皮細胞、または希突起膠細胞である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

細胞が、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、外傷性脳損傷 (TBI)、発作性疾患、皮質基底核変性症 (CBD)、慢性外傷性脳症 (CTE)、または別のタウオパチーを患っているかまたは発症するリスクがある患者の脳中にある、請求項 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 21】

融合タンパク質を発現する組換えウイルスを細胞中に導入することを含む、請求項 18 から 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

組換えウイルスが、所望により血清型 9 または AAV9 由来のシュードタイプの、アデノ随伴ウイルス (AAV) である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする組換え AAV または核酸構築物を患者に投与することを含む、処置を必要とする患者においてタウオパチーを処置する方法。

【請求項 24】

AAV または核酸構築物が、静脈内、鞘内、大脳内、脳室内、大槽内、海馬内、視床内、または実質内経路を介して患者に導入される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

タウオパチーが、アルツハイマー病、または前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、外傷性脳損傷 (TBI)、発作性疾患、皮質基底核変性症 (CBD)、または慢性外傷性脳症 (CTE) である、請求項 23 または 24 に記載の方法。

【請求項 26】

請求項 18 から 25 のいずれか一項に記載の方法における使用のための、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、請求項 10 または 11 に記載の核酸構築物、請求項 12 または 13 に記載の組換えウイルス、または請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 27】

請求項 18 から 25 のいずれか一項に記載の方法における使用のための医薬の製造のための、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の融合タンパク質、または請求項 10 または 11 に記載の核酸構築物、または請求項 12 または 13 に記載の組換えウイルスの使用。

10

20

30

40

50

【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、2020年1月22日に出願された米国仮出願62／964,501の優先権を主張する。

【0002】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2021年1月19日に作成されたこのASCIIコピ―は、025297__WO016__SL.txtという名前で、サイズは304,337バイトである。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

タウとしても既知である微小管関連タンパク質タウ(MAPT)は、特定の脳の病状において重要な役割を果たしている。ミスフォールドされたタウの神経原線維変化(NFT)および他の病理学的タウ封入体への凝集は、まとめてタウオパチーと呼ばれる多くの神経変性状態に関与している。これらは、アルツハイマー病(AD)、前頭側頭型認知症(FTD)、進行性核上性麻痺(PSP)、難治性遺伝性てんかん(例えば、ドラベ症候群)、外傷性脳損傷(TBI)、皮質基底核変性症(CBD)、および慢性外傷性脳症(CTE)を含む。例えば、Benussi et al., *Front Aging Neurosci.* (2015) 7:171; Gheyara et al., *Ann Neurol.* (2014) 76:443-56; Scholz and Bras, *Int J Mol Sci.* (2015) 16(10):24629-55; and McKee et al., *Brain Pathol.* (2015) 25(3):350-64を参照のこと。

【0004】

タウはプリオン様の特性を有することが示唆されている。いくつかの研究は、タウの過剰リン酸化がタウのミスフォールディングを引き起こす可能性があることを示す。ミスフォールドされたタウ凝集体は、脳全体に広がることができる(Takeda et al., *Nat Commun.* (2015) 6:8490; Hyman, *Neuron* (2014) 82:1189; de Calignon et al., *Neuron* (2012) 73:685-97)。これらの凝集体は、タウオパチーにおいて見いだされるNFTの形成における最初の工程であってもよい。NFTは、ADの初期段階において嗅内皮質および内側側頭葉に限定されているが、重度の臨床症状が現れる頃までに、NFTは脳全体に広がる。NFTおよびアミロイドベータプラークの両方がADを有する患者において見出だされ、アミロイド沈着はタウの病状および脳遠位領域の沈着を増加させることが示されている(Bennett et al., *Am J Pathol.* (2017) 187(7):1601-12)。局所的なタウの蓄積および拡散は、げっ歯類モデルおよびヒト疾患における神経細胞の喪失と密接に関連している(Pooler et al., *Acta Neuropathol Commun.* (2015) 3:14; La Joie et al., *Sci Transl Med.* (2020) 12:524)。凝集したタウの蓄積によって発揮される神経毒性に加えて、タウの可溶性オリゴマー形態も同様に毒性があるようである(Guerrero-Munoz et al., *Front Cell Neurosci.* (2015) 9:464)。可溶性のミスフォールドされた内因性タウは、種々の神経ストレス状態において神経毒性のメディエーターとしての役割を果たしているようである。

【0005】

内因性タウの減少は、異なる遺伝的マウスモデルにおけるAD様の病理に有益であることが示されている(Roberson et al., *Science* (2007) 316:750-4; DeVos et al., *Sci Transl Med.* (2017) 9(374):eaag0481; Wegmann et al., *EMBO J.* (2015) 1-14)。脳中のタウレベルの低下は、ストレス誘導性および発作誘導性のニューロン損傷、および外傷性脳損傷に起因する学習および記憶障害からも保護するようである(Lopes et al., *PNAS* (2016) 113:e3755-63; Gheyara, *supra*; DeVos et

10

20

30

40

50

al., J Neurosci. (2013) 33(31):12887-97; Cheng et al., PLoS One (2014) 9(12):e115765)。しかしながら、タウオパチーに対する効果的な治療法はない。インビボでのタウノックダウンは、タウmRNAに結合してその翻訳を妨げるアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) の投与によって (DeVos (2017) ibid; DeVos et al., Neurotherapeutics (2013) 10(3):486-97)、または抗タウ抗体の静脈注射によって (Asuni et al., J Neurosci. (2007) 27:9115-29; Ittner et al., J Neurochem. (2015) 132:135-45; Herrmann et al., J Neurochem. (2015) 132:1-4; Yanamandra et al., Neuron (2013) 80(2):402-14)、達成されている。どちらのアプローチも脳内のタウタンパク質の減少を促進してもよいが、患者の生涯にわたって慢性的な投与が必要である。抗体は、血液脳関門および細胞膜透過性が乏しく、このことは中枢神経系内での拡散および神経内タウとの結合能力の両方を制限することができる。さらに、病原性タウ種の正体および数は現在不明であり、タウオパチー間で異なってもよい。抗タウ抗体治療法の開発は困難である。

10

【0006】

脳の病状におけるタウの重要な役割および有効な治療法の欠如を考えると、ADを含むタウオパチーの予防および処置のためにこのタンパク質を標的とする治療法を開発する緊急の必要性がある。

【発明の概要】

【0007】

本開示は、ヒトMAPT遺伝子内またはその近くの部位を標的とするジンクフィンガータンパク質 (ZFP) を提供する。本開示のZFPは、DNAレベルで微小管関連タンパク質タウ (MAPT) 遺伝子の発現を特異的に阻害するために、転写因子に融合されてもよい。これらの融合タンパク質は、(i) MAPT遺伝子の標的領域に特異的に結合するZFPドメインおよび、(ii) 遺伝子の転写を低下させる少なくとも1つの転写抑制ドメインを含有する。

20

【0008】

一態様において、本開示は、ジンクフィンガータンパク質 (ZFP) ドメインおよび転写抑制ドメインを含む融合タンパク質を提供し、ここでZFPドメインは、ヒトMAPT遺伝子の標的領域に結合する。いくつかの実施形態において、標的領域は、MAPT遺伝子の転写開始部位 (TSS) の1.5 kb以内、例えば、TSSの上流1000 bps以内、および／またはMAPT遺伝子のTSSの下流500 bps以内にある。

30

【0009】

いくつかの実施形態において、ZFPドメインは、1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれ以上）のジンクフィンガーを含み、所望により融合タンパク質は、所望により周知の方法によって検出可能ないかまたは最小限のオフターゲット結合または活性（例えば、MAPT遺伝子ではない遺伝子への結合）とともに、MAPT遺伝子の発現を少なくとも約40%、75%、90%、95%、または99%抑制する。本ZFPのDNA結合認識ヘリックスアミノ酸配列の非限定的な例を、図14または16に示す。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、図14または16に示される1つ以上の認識ヘリックス配列を含む。さらなる実施形態において、融合タンパク質は、図16に示される示されたバックボーン変異ありまたはなしで、図14または16における単一行に示される認識ヘリックス配列の一部または全部を含む。特定の実施形態において、融合タンパク質は、図15または17に示されるアミノ酸配列を含む。

40

【0010】

いくつかの実施形態において、本融合タンパク質の転写抑制因子ドメインはKRABドメインを含み、ここで所望によりKRABドメインは、ヒトKRX1タンパク質に由来する。いくつかの実施形態において、ZFPドメインは、ペプチドリinkerを通して転写リプレッサーに連結されている。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は核局在化シグナルを含む。

【0011】

50

いくつかの実施形態において、融合タンパク質のZFPドメインは、図14または16の単一行に示される4、5、または6個のジンクフィンガー認識ヘリックス配列を含み；図14または16に示される標的配列に結合し；図15または17に示されるZFP転写因子のジンクフィンガー認識ヘリックス配列を含み（例えば、FPTF71377、71385、73034、73122、73131、または73133）；および／または図14、15、16または17に示されるように連結されるジンクフィンガー認識ヘリックス配列を含む（例えば、ZFP-TF71377、71385、73034、73122、73131、または73133）。

【0012】

特定の実施形態において、本融合タンパク質は、配列番号89～196、197～248および267～307から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0013】

別の態様において、本開示は、本融合タンパク質のコード配列を含む核酸構築物を提供し、ここでコード配列は、転写調節エレメントに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、転写調節エレメントは、脳細胞において構成的に活性または誘導可能である哺乳動物プロモーターである。特定の実施形態において、構築物は、組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）構築物などの組換えウイルス構築物である。

【0014】

別の態様において、本開示は、本核酸構築物を含む宿主細胞を提供する。宿主細胞は、ヒト脳細胞または多能性幹細胞（例えば、胚性幹細胞または誘導可能多能性幹細胞（iPSC））などのヒト細胞であってもよい。

20

【0015】

さらに別の局面において、本開示は、所望により本明細書の核酸構築物の導入を通して、本明細書の融合タンパク質を細胞中に導入すること、それにより細胞中のタウの発現を阻害することを含む、ヒト脳細胞（例えば、ニューロン、グリア細胞、上皮細胞、神経上皮細胞、内皮細胞、または希突起膠細胞）におけるタウの発現を阻害する方法を提供する。いくつかの実施形態において、細胞は、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、外傷性脳損傷（TBI）、発作性疾患、皮質基底核変性症（CBD）、慢性外傷性脳症（CTE）、または別のタウオパチーを患っているかまたは発症するリスクがある患者の脳中にある。特定の実施形態において、この方法は、融合タンパク質を発現する組換えウイルス（例えば、神経栄養血清型またはAAV9などのシュードタイプの組換えAAV）を細胞中に導入することを含む。

30

【0016】

関連する態様において、本開示は、本明細書の融合タンパク質をコードする組換えAAVを患者に投与することを含む、患者のタウオパチーを処置する（例えば、その進行を遅らせる）方法を提供する。いくつかの実施形態において、AAVは、静脈内、鞘内、大脳内、脳室内、大槽内、海馬内、視床内、または実質内経路を介して患者に導入される。いくつかの実施形態において、タウオパチーは、アルツハイマー病、または前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、外傷性脳損傷（TBI）、発作性疾患、皮質基底核変性症（CBD）、または慢性外傷性脳症（CTE）である。

40

【0017】

また、本明細書において、本明細書に記載の処置方法において使用するための融合タンパク質、および該処置方法における医薬の製造のための本明細書での融合タンパク質の使用も提供される。

【0018】

本発明の他の特徴、目的、および利点は、以下の詳細な説明において明らかである。しかしながら、詳細な説明は、本発明の実施形態および態様を示しているが、限定ではなく例示としてのみ与えられていることが理解されるべきである。本発明の範囲内での種々の変更および修正は、詳細な説明から当業者に明らかになる。

【図面の簡単な説明】

50

【0019】

図1は、遺伝子中の18塩基対を認識する操作された6フィンガージンクフィンガータンパク質転写因子（ZFP-TF）によるMAPT遺伝子の特異的標的化を実証する図である。ZFP-TFが遺伝子に結合すると、MAPT転写が減少し、このことはMAPT mRNAおよびタウタンパク質レベルを減少させる。該図は、配列番号308を開示する。

【0020】

図2は、抗タウZFP-TFによるMAPT遺伝子の標的化を実証する図である。初代MAPT mRNAは上部のバーに表示され、エクソン1は太い矢印で表される。遺伝子およびmRNAの下のカスタ内の小さな五角形（370；オレンジおよび青）は、本明細書に例示されている代表的なZFP-TFによって標的とされるMAPT遺伝子内の領域を示す。青色の五角形は、ヒトMAPT遺伝子の特異的に標的とするZFP-TFを表し、オレンジ色の五角形はヒトおよび非ヒト霊長類（NHP）MAPT遺伝子の両方を標的とする。右向きの五角形は、ZFP-TFが遺伝子のセンス鎖に結合することを示す。左向きの五角形は、ZFP-TFが遺伝子のアンチセンス鎖に結合することを示す。

【0021】

図3は、370個のZFP-TFのライブラリーから選択される48個のZFP-TFのタウ抑制活性を示す一群のグラフである（図14）。各グラフのy軸は、2つのハウスキーピング遺伝子（Atp5bおよびEif4a2）の幾何平均に対して正規化されたタウmRNA発現であり、SK-N-MC細胞における異なるZFP-TFをコードするmRNAをトランスフェクトしてから20時間後に評価された。mRNA用量は、左から右に増加する（3、10、30、100、300、および1,000 ng）。バーは4つの技術的反復の平均を表し、エラーバーは標準偏差を表す。グラフの下の数字は、ZFP-TFの内部参照番号である。滴定スケールの拡大版は、図の右下に示される。

【0022】

図4は、親ZFP-TFの標的特異性を改良するための最適化戦略を実証する図である。これは、親ZFP-TFの最大3つのジンクフィンガーモジュールの位置（-4）、（-5）、（-9）、および／または（-14）で、アルギニン（R）残基をグルタミン（Q）に変異させることを含む。突然変異は、ジンクフィンガーおよび標的DNAのリン酸骨格の間の保存された非特異的接触に影響を与える。

【0023】

図5Aおよび5Bは、MAPT遺伝子における変異抗タウZFP-TFの標的領域を実証する図である。MAPT mRNAは赤いバーとして表示される。図5Aにおいて、遺伝子下の第一のカスタ内の小さな五角形（赤および白）は、親ZFP-TFによって標的とされるMAPT遺伝子内の領域を表す。遺伝子下にある第二のカスタの小さな五角形（赤）は、親ZFP-TFのR→Q変異体が標的とするMAPT遺伝子の領域を示す。図5Bは、MAPT遺伝子における代表的な親および突然変異ZFP-TFの標的領域の拡大図を示す。オレンジ色の五角形は親ZFP-TFを表し、赤い五角形はそれらのR→Q変異体を表す。右向きの五角形は、ZFP-TFが遺伝子のセンス鎖に結合することを示す。左向きの五角形は、ZFP-TFが遺伝子のアンチセンス鎖に結合することを示す。親ZFP-TFには71###の番号が付けられ、突然変異ZFP-TFには73###の番号が付けられる。図5Bは、出現順に配列番号309～311をそれぞれ開示する。

【0024】

図6は、～340個の変異体のライブラリーからの代表的なR→Q変異体ZFP-TF（図16）のタウ抑制活性を示す一群のグラフである。各グラフのy軸は、2つのハウスキーピング遺伝子（Atp5bおよびEif4a2）の幾何平均に対して正規化されたタウmRNA発現であり、SK-N-MC細胞における異なるZFP-TFをコードするmRNAをトランスフェクトしてから20時間後に評価された。mRNAの量は左から右に増加する（3、10、30、100、300、および1,000 ng）。親ZFP-TF

ごとに最大7つのR→Q変異体が表示される。バーは4つの技術的反復の平均を表し、エラーバーは標準偏差を表す。グラフの下に数字は、ZFP-TFの内部参照番号である。滴定スケールの拡大版は、図の右下に示される。

【0025】

図7Aは、ヒトiPSC由来ニューロンにおける代表的なZFP-TFのタウ抑制活性を示す一群のグラフである。y軸は、3つのハウスキーピング遺伝子(ATP5B、EIF4A2、およびGAPDH)の幾何平均に対して正規化されたタウmRNA発現であり、ヒトiPSC由来ニューロンにおける異なるZFP-TFについて、AAV6による形質導入の32日後に評価された。使用したAAV6の量は、左から右に増加するAAV6の用量(1E3、3E3、1E4、3E4、1E5、および3E5のMOI)とともに、右下の凡例に示される。製剤緩衝液(Mock)で処置されるニューロンが、陰性対照として使用された。バーは4つの技術的反復の平均を表し、エラーバーは標準偏差を表す。

10

【0026】

図7Bは、ヒトiPSC由来ニューロン、ヒトSK-N-MC細胞、および初代マウスニューロンにおける代表的なR→Q変異体ZFP-TFのヒトタウ抑制活性を比較する一群のグラフである。y軸は、ハウスキーピング遺伝子ATP5B、EIF4A2、および所望によりGAPDHの幾何平均に対して正規化されたタウmRNA発現であり、ヒトiPSC由来ニューロンおよび初代マウスニューロンにおける異なるZFP-TFそれぞれについて、AAV6による形質導入の32日後および7日後に評価されるかまたは、SK-N-MC細胞における異なるZFP-TFをコードするmRNAでのトランスフェクションの20時間後に評価される。使用されるAAV6またはmRNAの量は、左から右に増加するAAV6(1E3、3E3、1E4、3E4、1E5、および3E5のMOI)およびmRNA(3、10、30、100、300、および1,000ng)用量とともに、x軸の下に示される。バーは4つの技術的反復の平均を表し、エラーバーは標準偏差を表す。滴定スケールの拡大版は、図の下に示される。ヒトMAPTの標的配列およびマウスMaptのオーソログ標的部位の間の不一致の数は、初代マウスニューロンにおいてテストされる各ZFPのバーの上に示される。

20

【0027】

図8は、代表的なR→Q変異体ZFP-TFでの処置後、それぞれ19日後または7日後のヒトiPSC由来ニューロンおよび初代マウスニューロンのトランスクリプトーム中の変化を示すAffymetrix/マイクロアレイデータのボルケーノ/散布図のパネルである。青い長方形は、ニューロンにおいてテストされる最高用量で各代表的なZFP-TFを用いて達成されるヒトタウ抑制のレベルを示す。赤および緑で示される数字は、それぞれダウンレギュレートおよびアップレギュレートされたオフターゲット遺伝子の数を示し；黄色の円は、タウ遺伝子座内の異なる転写物を表し；赤い円は、ダウンレギュレートされたオフターゲット遺伝子を表し；および緑の円は、アップレギュレートされたオフターゲット遺伝子を表す。ヒトおよびマウスのマイクロアレイデータは、少なくとも2回の独立した実験および、実験ごとの5~8回の生物学的反復から得られた。CPNE6は参照ZFPのアーティファクトであると示されたため、オフターゲットカウントから除外された。

30

40

【0028】

図9は、タウ遺伝子座(ヒトタウおよびSTH)およびオフターゲット遺伝子(CPNE6およびIGF2)内の転写物の発現レベルに対する代表的なR→Q変異体ZFP-TFの効果を示す一群のグラフである。モック処置およびタウ遺伝子座に結合しないZFP-TFをネガティブコントロールとして使用した。y軸は、3つのハウスキーピング遺伝子(ATP5B、EIF4A2、およびGAPDH)の幾何平均に対して正規化されたmRNA発現であり、ヒトiPSC由来ニューロンにおける異なるZFP-TFをコードするmRNAでのトランスフェクションの32日後に評価された。使用されるAAV6の量は右下の凡例に示され、AAV6の用量は左から右に増加する(1E3、3E3、1E4、3E4、1E5、および3E5のMOI)。青い長方形は、ニューロンにおいてテスト

50

される最大用量で各代表的な ZFP-TF を用いて達成されるヒトタウ抑制のレベルを示す。バーは 4 つの技術的反復の平均を表し、エラーバーは標準偏差を表す。

【0029】

図 10 は、C57BL/6 マウスにおける代表的な R→Q 変異体 ZFP-TF をコードする AAV9 の実質内 (IPa) 送達後の ZFP-TF、マウス Mapt、NeuN、および神経炎症マーカー mRNA 発現レベルを示す一群のグラフである。各グラフにおける y 軸は、ヒトシナプシン 1 プロモーター下で ZFP-TF をコードする AAV9 (用量 - 半球あたり 3E10 VG) で処置してから 4 週間後の成体マウスの脳の右半球から得られた海馬組織中の ZFP-TF、Mapt、Gfap、Iba1、および NeuN の絶対または正規化された mRNA 発現レベルである。ビヒクル処置 (VEH) および GFP をコードする ZFP-TF での処置は、ネガティブコントロールとして使用された。使用される ZFP-TF は、x 軸に示される。色付きのバーは 4 匹のマウスの値の平均を表し、エラーバーは標準偏差を表す。各図の矢印は、他の群の値が正規化される群を示す。

10

【0030】

図 11 は、htau マウスにおける代表的な R→Q 変異体 ZFP-TF またはポジティブコントロール ZFP-TF 構築物 (57890-T2A-65918) をコードする AAV9 の実質内 (IPa) 送達後の ZFP-TF、ヒト MAPT、マウス Mapt、ヒト STH、GFP、NeuN、および神経炎症マーカー mRNA 発現レベルを示す一群のグラフである。各グラフにおける y 軸は、ヒトシナプシン 1 プロモーターの下で ZFP-TF をコードする AAV9 (用量 - 半球あたり 3E9、1E10、または 3E10 VG) を用いた処置の 3 または 6 か月後の成体マウスの脳の右半球から得られる海馬組織中の ZFP-TF、ヒト MAPT、マウス Mapt、ヒト STH、GFP、GFAP、IBA1、および NeuN の絶対または正規化された mRNA 発現レベルである。ビヒクル処置 (VEH) をネガティブコントロールとして使用した。評価された ZFP-TF、用量、および時点は、x 軸に示される。色付きのバーは、1 群あたり 5 ~ 8 匹のマウスの値の平均を表し、エラーバーは標準偏差を表す。

20

【0031】

図 12 は、htau マウスにおける代表的な R→Q 変異体 ZFP-TF またはポジティブコントロール ZFP-TF 構築物 (57890-T2A-65918) をコードする AAV9 の実質内 (IPa) 送達後のヒトタウタンパク質レベルを示すグラフである。各グラフにおける y 軸は、ヒトシナプシン 1 プロモーターの下で ZFP-TF をコードする AAV9 (用量 - 3E9、1E10、または 3E10 VG / 半球) を用いた処置の 3 または 6 か月後の成体マウスの脳の右半球から得られる海馬組織中の絶対または正規化された総タウタンパク質レベルである。ビヒクル処置 (VEH) をネガティブコントロールとして使用した。評価される ZFP-TF、用量、および時点は、x 軸に示される。色付きのバーは、1 群あたり 5 ~ 8 匹のマウスの値の平均を表し、エラーバーは標準偏差を表す。

30

【0032】

図 13 は、htau マウスにおける代表的な R→Q 変異体 ZFP-TF をコードする AAV9 の実質内 (IPa) 送達後のヒト MAPT 転写物、NeuN タンパク質、および DAPI を示す、多重インサイチューハイブリダイゼーション / 免疫蛍光染色からの画像のパネルである。代表的な画像は、ヒトシナプシン 1 プロモーターの下で ZFP-TF をコードする AAV9 (用量 - 半球あたり 3E9 VG) を用いた処置の 3 か月後の成体マウスの脳の左半球からの海馬領域について示される。ビヒクル処置 (VEH) をネガティブコントロールとして使用した。

40

【0033】

図 14 は、本開示の例示的な ZFP を示す表である。各 4、5、または 6 本のフィンガー ZFP (すなわち、F1-F4、F1-F5、または F1-F6) について単一行で示される DNA 結合認識ヘリックス配列のゲノム標的配列 (つまり、結合された配列) が大文字で示される。この図は、表 1 に示される各 ZFP のジンクフィンガー間および ZFP ドメインおよびリプレッサードメイン (すなわち、L1、L2、L3、L4、L5、また

50

は L 6) 間の例示的なペプチドリンカー配列も示す。各配列についての配列番号を括弧内に示す。

【0034】

図 15 は、図 14 に示される ZFP を含む ZFP-TF についての例示的な全タンパク質配列を示す表である。DNA 結合認識ヘリックス配列は太字で示される。ジンクフィンガーリンカーには下線が引かれる一方、ドメイン間リンカーには二重下線が引かれる。各配列の配列番号を括弧内に示す。

【0035】

図 16 は、本開示の例示的な R→Q ZFP を示す表である。示される各 4、5、または 6 本のフィンガー ZFP (すなわち、F1-F4、F1-F5、または F1-F6) につ

10

【0036】

図 17 は、図 16 に示される ZFP を含む R→Q ZFP-TF の例示的な完全なタンパク質配列を示す表である。DNA 結合認識ヘリックス配列は太字で示される。ジンクフィンガーリンカーには下線が引かれる一方、ドメイン間リンカーには二重下線が引かれる。各配列についての配列番号を括弧内に示す。

20

【0037】

発明の詳細な説明

本開示は、ヒト MAPT 遺伝子内またはその近くの部位を標的とする (すなわち、DNA 配列に結合する) ZFP ドメインを提供する。本明細書に記載の ZFP ドメインは、別の機能分子またはドメインに結合または融合されてもよい。本開示の ZFP ドメインは、ヒト MAPT 遺伝子の mRNA への転写を抑制する転写因子に融合されてもよい。融合タンパク質は、ジンクフィンガータンパク質転写因子 (ZFP-TF) と呼ばれ、ヒト MAPT 遺伝子の特異的に標的とし、その RNA への転写を抑制する。これらの ZFP-TF は、MAPT 遺伝子内またはその近くの標的領域に特異的に結合するジンクフィンガータンパク質 (ZFP) ドメインおよび、遺伝子の転写を低下させる転写抑制ドメインを含む。ZFP-TF を患者の脳に導入することによってニューロンにおけるタウのレベルを低下させることは、凝集体および NFT へのタウの集合を阻害する (例えば、低下または停止させる) ことが期待される。タウ凝集体の細胞から細胞への伝播が、減少または防止される。本 ZFP-TF は、タウオパチーの予防および/または処置に使用することができる。

30

【0038】

タウ阻害に対する本 ZFP-TF アプローチは、(i) タウ mRNA に結合してその翻訳を防止するアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) および (ii) 免疫療法抗-タウ抗体の投与を含む、他のものによってテストされている現在のアプローチを超えるいくつかの利点を有する。ZFP-TF は (ZFP-TF 発現構築物を患者に導入することにより) 1 回のみ投与する必要があるが、ASO は繰り返し投与する必要がある。さらに、ZFP-TF アプローチは、各細胞のゲノム中で MAPT 遺伝子の 2 つの対立遺伝子を使用することのみ必要とする。対照的に、ASO は、各細胞中で MAPT mRNA の多数のコピーに関与する必要がある。さらに、ASO の分布および向性は固定されている一方、ZFP-TF アプローチは、プロモーター、血清型、および投与経路を変更することにより、異なる細胞型および脳領域を標的にすることができる。

40

【0039】

抗体はタウタンパク質種またはコンフォメーションのサブセットにしか結合できないため、本 ZFP-TF アプローチは、抗体アプローチよりも有利である。これは、強力な治療

50

効果については十分ではなくてもよい。対照的に、ZFP-TFはDNAレベルでタウ発現を抑制し、タウオパチー全体で見出される異なるタウ配座異性体および翻訳後修飾型を含む、全ての形態のタウのレベルを低下させる。したがって、ZFP-TFは、抗体とは異なり、毒性種の形態にとらわれない。さらに、抗体は主に細胞外タウに作用すると考えられるが、ZFP-TFは細胞内の総タウレベルを直接低下させることができるため、細胞外タウレベルを間接的に低下させることができる。したがって、本ZFP-TFアプローチは、タウが細胞内でその病理を発揮し、病原種が不明であるため、より効果的であると予想される。さらに、抗体は、典型的には末梢に、繰り返し投与する必要がある、その結果、血液脳関門を通過する効率が低下し、一方で、ZFP-TFは、発現構築物の一度のみの送達を必要とし、脳実質へ直接、CSF中へ、または静脈内を含む、複数の経路を介して投与できる。

10

【0040】

I. ZFPドメインの標的

本融合タンパク質のZFPドメインは、ヒトMAPT遺伝子内またはその近くの標的領域に特異的に結合する。図1は、MAPT遺伝子のDNA配列へのZFPドメインの結合を実証する。該図におけるZFPドメインは6つのジンクフィンガーを有する。しかし、以下でさらに説明するように、より少ないかまたはより多いジンクフィンガーを有するZFPドメインも使用できる。

【0041】

ヒトMAPT遺伝子は、約134kbに及び、およびchr17q21.31:45,894,382~46,028,334(GRCh38.p13)にマッピングされている。そのヌクレオチド配列は、GenBankアクセッション番号ENSG00000186868で入手できる。MAPT遺伝子は13~16個のエクソンを含む。エクソン1、4、5、7、9、11、および12は構成的に発現されるが、エクソン2、3、および10は、かわりにスプライシングされた変異体に由来するタウタンパク質種中に存在することができ、これは大人の脳における6つの異なるタウタンパク質アイソフォームの存在につながる。完全長のヒトタウタンパク質は、次の配列を有する：

20

【化1】

```

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT
PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG
TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQEPESGK VVQEGFLREP GPPGLSHQLM
SGMPGAPLLP EGPREATRQP SGTGPEDTEG GRHAPELLKH QLLGDLHQEG
PPLKGAGGKE RPGSKEEVDE DRDVESSPQ DSPPSKASPA QDGRPPQTAA
REATSIPGFP AEGAIPLPVD FLSKVSTEIP ASEPDGPSVG RAKGQDAPLE
FTFHVEITPN VQKEQAHSEE HLGRAAFPGA PGEGPEARGP SLGEDTKEAD
LPEPSEKQPA AAPRGKPVSR VPQLKARMVS KSKDGTGSDD KKAKTSTRSS
AKTLKNRPCL SPKHPTPGSS DPLIQPSSPA VCPEPPSSPK YVSSVTSRTG
SSGAKEMKLK GADGKTKIAT PRGAAPPQK GQANATRIPA KTPPAPKTPP
SSGEPPKSGD RSGYSSPGSP GTPGSRSTP SLPTPPTREP KKVAVVRTTP
KSPSSAKSRL QTAPVMPDL KNVKSKIGST ENLKHQPGGG KVQIINKKLD
LSNVQSKCGS KDNIKHVP GG GSVQIVYKPV DLSKVTSKCG SLGNIHHKPG
GGQVEVKSEK LDFKDRVQSK IGSLDNITHV PGGGNKKIET HKLTFRENAK
AKTDHGAEIV YKSPVVS GDT SPRHLSNVSS TGSIDMVDSP QLATLADEV S
ASLAKQGL (配列番号 1; P10636)

```

30

40

【0042】

ZFP-TFのDNA結合ZFPドメインは、融合タンパク質をMAPT遺伝子の標的領域に向かわせ、融合タンパク質の転写抑制ドメインを標的領域にもたらし、抑制ドメインは転写コリプレッサー複合体を動員して、クロマチンをRNAポリメラーゼIIによる転写を許容しない状態に変更する。ZFP-TFの標的領域は、遺伝子発現の抑制を可能

50

にするMAPT遺伝子内またはその近くの任意の適切な部位であることができる。例として、標的領域は、MAPT転写開始部位(TSS)またはMAPT転写調節エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、RNAポリメラーゼ休止部位など)を含むか、またはそれらに隣接する(下流または上流のいずれか)。

【0043】

いくつかの実施形態において、ゲノム標的領域は少なくとも8bpsの長さである。例えば、標的領域は、長さが12、15、16、17、18、19、20、21、24、27、30、33、または36bpsなど、長さが8bpsから40bpsであってもよい。標的配列は、遺伝子のセンス鎖または遺伝子のアンチセンス鎖上にあってもよい。標的化の精度を確保し、ZFP-TFによるオフターゲット結合または活性を低減するために、好ましくは、選択されたMAPT標的領域の配列は、他の遺伝子における配列に、75%未満の相同性(例えば、70%未満、65%未満、60%未満、または50%未満)を有する。特定の実施形態において、本ZFP-TFの標的領域は、長さが12~20(例えば、12~18、15~19、15、18、または19)bpsであり、TSSの1500bps上流から1000bps下流(例えば、-1000bpsから+1000bps、+750、または+500bps)以内にある。

【0044】

いくつかの実施形態において、本操作されたZFPは、図14または16の単一行に示されるような標的部位(すなわち、標的配列)に結合し、好ましくは、オフターゲット結合または活性が検出されないかまたはほとんど検出されず、これらの標的部位内の連続または非連続配列を含む。いくつかの実施形態において、標的部位は、配列番号37~88および249のいずれか1つを含むおよび/またはその中にある。

【0045】

標的セグメントをさらに評価するための他の基準は、かかるセグメントまたは関連セグメントに結合するZFPの以前の入手可能性、所与の標的セグメントに結合するための新しいZFPの設計の容易さ、および標的外結合リスクを含む。

【0046】

II. ジンクフィンガータンパク質ドメイン

「ジンクフィンガータンパク質」または「ZFP」は、亜鉛によって安定化されるDNA結合ドメインを有するタンパク質を指す。ZFPは配列特異的にDNAに結合する。ZFPの個々のDNA結合単位は「ジンクフィンガー」と呼ばれる。各フィンガーは、通常7つのアミノ酸残基で構成され、DNA結合の特異性を決定するDNA結合「認識ヘリックス」を含有する。ZFPドメインは少なくとも1つのフィンガーを有し、各フィンガーは2~4塩基対のヌクレオチド、通常は3~4塩基対のDNA(連続または非連続)に結合する。各ジンクフィンガーは通常、約30のアミノ酸を含み、亜鉛をキレート化する。操作されたZFPは、天然に存在するZFPと比較して、新しい結合特異性を有することができる。操作方法は、合理的な設計やおよび種々のタイプの選択を含むが、これらに限定されない。合理的設計は、例えば、トリプレット(またはクアドラプレット)ヌクレオチド配列および個々のジンクフィンガーアミノ酸配列を含むデータベースを使用することを含み、ここで各トリプレットまたはクアドラプレットヌクレオチド配列は、特定のトリプレットまたはクアドラプレット配列に結合するジンクフィンガーの1つ以上のアミノ酸配列と関連している。例えば、米国特許5,789,538;5,925,523;6,007,988;6,013,453;6,140,081;6,200,759;6,453,242;6,534,261;6,979,539;および8,586,526;および国際特許出願WO95/19431;WO96/06166;WO98/53057;WO98/53058;WO98/53059;WO98/53060;WO98/54311;WO00/27878;WO01/60970;WO01/88197;WO02/016536;WO02/099084;およびWO03/016496に詳細に記載されるZFP設計法を参照のこと。本明細書に記載のZFPドメインは、別の分子(例えば、ドメイン)、例えばタンパク質に結合または融合されてもよい。かかるZFP

P融合は、遺伝子活性化（例えば、活性化ドメイン）、遺伝子抑制（例えば、抑制ドメイン）、リガンド結合（例えば、リガンド結合ドメイン）、ハイスループットスクリーニング（例えば、リガンド結合ドメイン）、局在超変異（例えば、活性化誘導シチジンデアミナーゼドメイン）、クロマチン修飾（例えば、ヒストンデアセチラーゼドメイン）、組換え（例えば、リコンビナーゼドメイン）、標的統合（例えば、インテグララーゼドメイン）、DNA修飾（例えば、DNAメチルトランスフェラーゼドメイン）、塩基編集（例えば、ベースエディタードメイン）、または標的DNA切断（例えば、ヌクレアーゼドメイン）を可能にするドメインを含んでもよい。操作されたZFPドメインの例を図14および16に示す。

【0047】

本操作されたZFP融合物のZFPドメインは、少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、またはそれ以上）のジンクフィンガーを含んでもよい。1本のフィンガーを有するZFPドメインは、通常、3または4個のヌクレオチドを含む標的部位を認識する。2本のフィンガーを有するZFPドメインは、通常、6または8ヌクレオチドを含む標的部位を認識する。3本のフィンガーを有するZFPドメインは、通常、9または12ヌクレオチドを含む標的部位を認識する。4本のフィンガーを有するZFPドメインは、通常、12から15個のヌクレオチドを含む標的部位を認識する。5本のフィンガーを有するZFPドメインは、通常、15～18ヌクレオチドを含む標的部位を認識する。6本のフィンガーを有するZFPドメインは、18～21ヌクレオチドを含む標的部位を認識できる。

【0048】

いくつかの実施形態において、本操作されたZFPは、図14または16に示されるように、任意の認識ヘリックスのアミノ酸の少なくとも4つを有するDNA結合認識ヘリックス配列を含む。他の実施形態において、本操作されたZFPは、図14または16に示されるDNA結合認識ヘリックス配列を含む。例えば、操作されたZFPは、図14または16に示されるように、F1、F2、F3、F4、F5、またはF6の配列を含んでもよい。

【0049】

いくつかの実施形態において、本操作されたZFPは、図4または16の単一行に示される2つの隣接するDNA結合認識ヘリックス配列を含む。例えば、操作されたZFPは、図14または16の単一行に示されるように、F1-F2、F2-F3、F3-F4、F4-F5、またはF5-F6（例えば、F1-F4、F1-F5、またはF1-F6）の配列を含んでもよい。

【0050】

いくつかの実施形態において、本操作されたZFPは、図4または16の単一行に示されるDNA結合認識ヘリックス配列を含む。例えば、操作されたZFPは、図14または16の単一行に示されるように、F1、F2、F3、F4、F5、およびF6（例えば、F1-F4、F1-F5、またはF1-F6）の配列を含んでもよい。

【0051】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の操作されたZFPは、図15の単一行に示される配列の認識ヘリックスおよび骨格部分を含む。いくつかの実施形態において、図15の単一行に示される配列は翻訳後修飾後に現れるため、本明細書に記載の操作されたZFPは、該配列の認識ヘリックスおよび骨格部分を含む。例えば、翻訳後修飾は、図15に示されるように配列からイニシエーターメチオニン残基を除去することができる。

【0052】

ZFPドメインの標的特異性は、例えば、米国特許公開2018/0087072に記載されるように、ZFP骨格配列への突然変異によって改良されてもよい。突然変異は、DNAバックボーン上のリン酸と非特異的に相互作用できるが、ヌクレオチド標的特異性には関与しないZFPバックボーンの残基に加えられたものを含む。いくつかの実施形態において、これらの変異は、カチオン性アミノ酸残基を中性またはアニオン性アミノ酸残

10

20

30

40

50

基に変異させることを含む。いくつかの実施形態において、これらの突然変異は、極性アミノ酸残基を中性または非極性アミノ酸残基に突然変異させることを含む。さらなる実施形態において、変異は、DNA結合ヘリックスに対して位置（-4）、（-5）、（-9）および／または（-14）で作製される。いくつかの実施形態において、ジンクフィンガーは、位置（-4）、（-5）、（-9）および／または（-14）に1つ以上の変異を含んでもよい。さらなる実施形態において、マルチフィンガーZFPドメイン中の1つ以上のジンクフィンガーは、位置（-4）、（-5）、（-9）および／または（-14）に変異を含んでもよい。いくつかの実施形態において、位置（-4）、（-5）、（-9）および／または（-14）（例えば、アルギニン（R）またはリジン（K））のアミノ酸は、アラニン（A）、ロイシン（L）、セリン（S）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、チロシン（Y）、および／またはグルタミン（Q）に変異される。いくつかの実施形態において、位置（-5）のR残基はQに変異している。図16における記号「[^]」は、示された認識ヘリックスの1番目のアミノ酸の4番目の上流のアルギニン（R）残基がグルタミン（Q）に変化していることを示す。各認識ヘリックス配列において、7つのDNA結合アミノ酸の位置に-1、+1、+2、+3、+4、+5、および+6の番号が付けられる。したがって、RからQへの置換についての位置は（-5）として番号が付けられる。

10

【0053】

いくつかの実施形態において、本操作されたZFPは、図16に示されるように、DNA結合認識ヘリックス配列および関連する骨格変異を含む。いくつかの実施形態において、本操作されたZFPは、図16の単一行に示されるように、DNA結合認識ヘリックス配列および関連する骨格変異を含む。

20

【0054】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の操作されたZFPは、図17の単一行に示される配列の認識ヘリックスおよび骨格部分を含む。いくつかの実施形態において、図17の単一行に示される配列は翻訳後修飾後に現れるため、本明細書に記載の操作されたZFPは、該配列の認識ヘリックスおよび骨格部分を含む。例えば、翻訳後修飾は、図17に示されるように配列からイニシエーターメチオニン残基を除去してもよい。

【0055】

III. ジンクフィンガータンパク質転写因子

30

本明細書に記載のZFPドメインは、転写因子に融合されてもよい。いくつかの実施形態において、本融合タンパク質は、DNA結合ジンクフィンガータンパク質（ZFP）ドメインおよび転写因子ドメイン（すなわち、ZFP-TF）を含有する。いくつかの実施形態において、転写因子は転写リプレッサードメインであってもよく、ここでZFPおよびリプレッサードメインは、直接ペプチジル結合もしくはペプチドリinkerによって、または二量体化によって（例えば、ロイシンジッパー、STATタンパク質N末端ドメイン、またはFK506結合タンパク質を通して）互いに結合してもよい。本明細書で 사용되는場合、「融合タンパク質」は、共有結合したドメインを有するポリペプチド、ならびに非共有結合を介して互いに結合したポリペプチドの複合体を指す。転写抑制ドメインは、ZFPドメインのC末端またはN末端を含む任意の適切な位置でZFPドメインと結合

40

【0056】

いくつかの実施形態において、本ZFP-TFは、約25 nM未満のKDでそれらの標的に結合し、ヒトMAPT遺伝子の転写を20%以上（例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、またはそれ以上）抑制する。いくつかの実施形態において、本ZFP-TFの2つ以上が細胞内で発現され、細胞内のMAPT発現を相乗的に調節する（例えば、米国特許出願公開第2020/0101133号および第2020/0109406号を参照）。かかる相乗的ZFPは、2Aリンカーペプチド、例えば、T2A GSGEGRGSLLTCTGDVEENPGP（配列番号19）によって連結されてもよい。したがって、MAPT発現の最適な抑制を達成するために

50

、ZFP-TFがMAPT遺伝子の異なる標的領域に結合する場合、本ZFP-TFの2つ以上を患者において同時に使用してもよい。

【0057】

いくつかの実施形態において、本ZFP-TFは、1つ以上のジンクフィンガードメインを含む。ドメインは、例えば、1つのドメインが1つ以上（例えば、4、5、または6）のジンクフィンガーを含み、別のドメインが追加の1つ以上（例えば、4、5、または6）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一緒に連結され得る。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または12個以上のフィンガーを含む1つのDNA結合ドメインを含むように、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、柔軟なリンカーなどの非定型リンカーである。例えば、2つのZFPドメインは、構成（N末端からC末端まで）ZFP-ZFP-TF、TF-ZFP-ZFP、ZFP-TF-ZFP、またはZFP-TF-ZFP-TF（2つのZFP-TF融合タンパク質がリンカーを介して融合されている）において転写リプレッサーTFに連結されてもよい。

10

【0058】

いくつかの実施形態において、ZFP-TFは「2つの手を有する（two-handed）」である、すなわち、2つのZFPドメインが2つの不連続な標的部位に結合するように、介在するアミノ酸によって分離された2つのジンクフィンガークラスター（2つのZFPドメイン）を含む。ジンクフィンガー結合タンパク質の2つの手を有するタイプの例はSIP1であり、ここで4つのジンクフィンガーのクラスター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ーがカルボキシル末端に位置する(Remacle et al., EMBO J. (1999) 18(18):5073-84を参照)。これらのタンパク質のジンクフィンガーの各クラスターは、固有の標的配列に結合することができ、2つの標的配列間の間隔は多くのヌクレオチドを含むことができる。

20

【0059】

いくつかの実施形態において、好ましくはないかまたはほとんどない検出可能なオフターゲット結合または活性とともに、本明細書に記載の操作されたZFP-TFは、図14または16の単一行に示されるように標的部位に結合する。オフターゲット結合は、例えば、オフターゲット遺伝子におけるZFP-TFの活性を測定することによって決定されてもよい。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の操作されたZFP-TFは、図14または16に示されるDNA結合認識ヘリックス配列を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の操作されたZFP-TFは、図14または16の単一行に示される2つの隣接するDNA結合認識ヘリックス配列を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の操作されたZFP-TFは、図14または16の単一行に示されるDNA結合認識ヘリックス配列を含む。

30

【0060】

A. 転写リプレッサードメイン

本ZFP-TFは、本明細書に記載の操作されたZFPドメインおよび、MAPT遺伝子の転写活性を弱める1つ以上の転写抑制ドメインを含む。1つ以上の操作されたZFPドメインおよび1つ以上の転写リプレッサードメインは、柔軟なリンカーによって結合されてもよい。転写抑制ドメインの非限定的な例は、KOX1またはZIM3のKRABドメイン（または任意の他のKRABドメイン含有タンパク質である。例えば、Alerasool et al., Nature Methods (2020) 17:1093-6を参照）、KAP-1、MAD、FKHR、EGR-1、ERD、SID、TGF-βベータ誘導可能初期遺伝子（TIEG）、v-ERB-A、MBD2、MBD3、TRa、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）、核ホルモン受容体（例えば、エストロゲン受容体または甲状腺ホルモン受容体）、DNMTファミリーのメンバー（DNMT1、DNMT3A、DNMT3Bなど）、Rb、およびMeCP2である。例えば、Bird et al., Cell (1999) 99:451-4; Tyler et al., Cell (1999) 99:443-6; Knoepfler et al., Cell (1999) 99:447-50; and Robertson et al., Nature Genet. (2000)

40

50

25:338-42を参照のこと。さらなる例示的な抑制ドメインは、ROM2およびAtHD2Aを含むが、これらに限定されない。例えば、Chem et al., Plant Cell (1996) 8:305-21; and Wu et al., Plant J. (2000) 22:19-27を参照のこと。

【0061】

いくつかの実施形態において、転写リプレッサードメインは、ヒトジンクフィンガータンパク質10/KOX1 (ZNF10/KOX1) のクルッペル関連ボックス (KRAB) ドメインからの配列を含む (例えば、GenBank 番号NM_015394.4)。例示的なKRABドメイン配列は、次のとおりである：

【化2】

```
DAKSLTAWSR TLVTFKDV FV DFTREEWKLL DTAQQIVYRN VMLENYKNLV
SLGYQLTKPD VILRLEK GEE PWLVEREIHQ ETHPDSETAF EIKSSV
```

(配列番号 2)

10

このKRAB配列の変異体も、それらが同一または類似の転写抑制機能を有する限り、使用されてもよい。

【0062】

B. ペプチドリinker

ZFPドメインおよび本ZFP-TFの転写抑制ドメインおよび／またはZFPドメイン内のジンクフィンガーは、ペプチドリinker、例えば約5～200アミノ酸 (例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個以上のアミノ酸) の切断不可能なペプチドリinkerを通して連結されてもよい。典型的に、好ましいリンカーは、組換え融合タンパク質として合成される柔軟なアミノ酸部分配列である。いくつかの実施形態において、ジンクフィンガーは、標的核酸分子内の連結されたモジュール標的サブ部位間にギャップがないように連結される。他の実施形態において、ジンクフィンガーは、連結されたモジュールが、標的核酸分子内の連結されたモジュール標的サブ部位間に1、2または3塩基対のギャップを有する標的部位に結合することを可能にするように設計されたリンカーによって連結される。例えば、米国特許番号8,772,453を参照のこと。

20

【0063】

いくつかの実施形態において、ペプチドリinkerは、長さが3～20個のアミノ酸残基であり、Gおよび／またはSが豊富である。かかるリンカーの非限定的な例は、G4S型リンカー (配列番号18)、すなわち、1つ以上 (例えば、2、3、または4) のGGGGS (配列番号15) モチーフを含有するリンカー、またはモチーフのバリエーション (モチーフからの1、2、または3個のアミノ酸の挿入、欠失、および置き換えを有するものなど) である。

30

【0064】

ZFPドメインおよび、本ZFP-TFの転写リプレッサードメインおよび／またはZFPドメイン内のジンクフィンガーを連結するために使用されてもよいリンカー設計方法および例示的なリンカーは、米国特許番号6,479,626; 7,851,216; 8,772,453; 9,394,531; 9,567,609; および10,724,020; およびPCT公開番号WO1999/045132; WO2001/053480; WO2009/154686; WO2011/139349; WO2015/031619; およびWO2017/136049に記載されている。本明細書に記載のタンパク質は、適切なリンカーの任意の組み合わせを含んでもよい。

40

【0065】

リンカーの非限定的な例は、DGGGS (配列番号: 3)、TGEKP (配列番号: 4)、LRQKDG ERP (配列番号: 5)、GGR R (配列番号: 6)、GGR RGGGS (配列番号: 7)、LRQRDGERP (配列番号: 8)、LRQKDG GGS ERP (配列番号: 9)、LRQKD (G3S) 2ERP (配列番号: 10)、TGSQKP (

50

配列番号：11）、LRQKDAARGS（配列番号：13）、LRQKDAARGSGG（配列番号：14）である。ジンクフィンガーを連結するための、および／またはドメインを連結するための追加の例示的なリンカーを表1に列挙する。表1に列挙されるフィンガーフィンガーリンカーは、骨格配列の一部、例えば、FQまたはFAを含む。

【0066】

表1は、ジンクフィンガーアミノ酸配列および／またはZFPおよび、図14または16に示される機能ドメイン配列を連結するために使用されてもよい例示的な代替ペプチドリンカーを実証する。

【表1】

表1

リンカー位置	リンカーカテゴリー	例示的なリンカー		
		リンカーコード	ペプチド配列	配列番号
フィンガー フィンガー	塩基スキッピングなし	0a	TGEKPFQ	20
		0b	TGGQRPQ	21
		0c	TGSQKPFQ	22
		0d	TGSQRPQ	23
		0f	TGEKPFA	24
		1a	TGGGGSQRPQ	25
	1塩基スキッピング	1b	TGGGGSQKPFQ	26
		1c	THPRAPIKPFQ	27
		1d	TPNRRPAPKPFQ	28
		1e	TVPRPTPKPFQ	29
		1f	TYPRPIAAKPFQ	30
	2塩基スキッピング	2a	TGGGSGGSQRPQ	31
		2b	TGGGSGGSQKPFQ	32
		2d	TLAPRPYRPPKPFQ	33
		2e	TPGGKSSRTDRNKPFQ	34
		2f	TPNPHRRTPSHKPFQ	35
ZFP-機能性 ドメイン（ド メイン間）	ZFP-TF	C0	LRGSGG	36
		C1	LRQKDAARGS	13
		C1k	LRQKDAARGSGG	14

【0067】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の本操作されたZFPは、図14または16の単一行に示されるように連結される2つの隣接するDNA結合認識ヘリックス配列を含む。例えば、操作されたZFPは、図14または16の単一行に示されるように、F1～F2、F2～F3、F3～F4、F4～F5、またはF5～F6の配列を含んでもよい。他の実施形態において、同じリンカーカテゴリーからの異なるリンカーを使用することができる。

【0068】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の本改変ZFPは、図14または16の単一行に示されるように連結されるDNA結合認識ヘリックス配列を含む。例えば、操作されたZFPは、図14または16の単一行に示されるように、F1～F4、F1～F5、またはF1～F6の連結配列を含んでもよい。他の実施形態において、同じリンカーカテゴリーから1つ以上の異なるリンカーを使用してもよい。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の操作されたZFP-TFは、図15または17の単一行に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、図15または17の単一行に示される配列は翻訳後修飾後に現れるため、本明細書に記載の操作されたZFP-TFは、該配列

の認識ヘリックス、骨格、およびリンカー部分を含む。いくつかの実施形態において、図15または17の単一行に示されるアミノ酸配列は翻訳後修飾後に現れるため、本明細書に記載の操作されたZFP-TFは、該配列を含む。例えば、翻訳後修飾は、図15または17に示されるように配列からイニシエーターメチオニン残基を除去してもよい。

【0069】

IV. ZFP-TFの発現

本開示のZFP-TFは、それをコードする核酸分子を通して患者に導入されてもよい。核酸分子は、RNAまたはcDNA分子であってもよい。核酸は、脂質：核酸複合体（例えば、リポソーム）を含む組成物の注射によって患者の脳に導入されてもよい。あるいは、ZFP-TFは、ZFP-TFをコードする配列を含む核酸発現ベクターを介して患者に導入されてもよい。発現ベクターは、神経系の細胞におけるZFP-TFのコード配列の発現を可能にするプロモーター、エンハンサー、転写シグナル配列、および転写終結配列などの発現制御配列を含んでもよい。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、安定なエピソームとして細胞内に存在し続ける。他の実施形態において、発現ベクターは細胞のゲノムに組み込まれる。

【0070】

いくつかの実施形態において、脳におけるZFP-TF発現を指示するためのベクター上のプロモーターは、構成的活性プロモーターまたは誘導可能プロモーターである。適切なプロモーターは、これに限定されないが、ラウス肉腫ウイルス（RSV）長末端反復（LTR）プロモーター（所望によりRSVエンハンサーを有する）、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター（所望によりCMVエンハンサーを有する）、CMV前初期プロモーター、シミアンウイルス40（SV40）プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）プロモーター、 β -アクトチンプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）プロモーター、EF1 α プロモーター、モロニーマウス白血病ウイルス（MoMLV）LTR、クレアチンキナーゼベース（CK6）プロモーター、トランスサイレチンプロモーター（TTR）、チミジンキナーゼ（TK）プロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター（TRE）、B型肝炎ウイルス（HBV）プロモーター、ヒト α 1-アンチトリプシン（hAAT）プロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター（LSP）、E2因子（E2F）プロモーター、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）プロモーター、CMVエンハンサー／ニワトリ β -アクトチン／ウサギ β -グロビンプロモーター（CAGプロモーター；Niwa et al., Gene (1991) 108(2):193-9）、およびRU-486応答性プロモーターを含む。シナプシンIプロモーター、カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII（CamKII）プロモーター、メチルCpG結合タンパク質2（MeCP2）プロモーター、コリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）プロモーター、カルビンジン（Calb）プロモーター、CAMKIIプロモーター、PrPプロモーター、GFAPプロモーターなどのニューロン特異的プロモーター、またはニューロンおよびグリア細胞への発現を制限する操作されたまたは天然のプロモーターも、使用されてもよい。グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーターまたはアルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリー、メンバーL1（Aldh1L1）プロモーターなどの星状細胞特異的プロモーターも使用されてもよい。Olig2プロモーターなどの希突起膠細胞特異的プロモーターも使用されてもよい。さらに、プロモーターは、ZFP-TFが結合し、それ自体の発現レベルを予め設定された閾値まで抑制することができる、1つ以上の自己調節エレメントを含んでもよい。米国特許9,624,498を参照のこと。

【0071】

これに限定されないが、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、マイクロインジェクション、陽イオン性または陰イオン性リポソーム、核局在シグナルと組み合わせたりリポソーム、天然リポソーム（例えば、エクソソーム）、またはウイルス形質導入を含む、ヌクレオチド配列を細胞中に導入する任意の方法を使用することができる。

【0072】

10

20

30

40

50

発現ベクターのインビボ送達のために、ウイルス形質導入を使用してもよい。当技術分野で既知の様々なウイルスベクター、例えば、ワクシニアベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ポキシウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レトロウイルスベクター、およびハイブリッドウイルスベクターは、本開示における使用のために当業者により適合されてもよい。いくつかの実施形態において、本明細書で使用されるウイルスベクターは組換えAAV（rAAV）ベクターである。AAVベクターは、分裂細胞および非分裂細胞の両方に感染し、長期発現のための安定したエピソーム構造として存在し、免疫原性が非常に低いため、CNS遺伝子送達に特に適している（Hadaczek et al., Mol Ther. (2010) 18:1458–61; Zaiss, et al., Gene Ther. (2008) 15:808–16）。任意の適切なAAV血清型を使用してもよい。例えば、AAVは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV8.2、AAV9、AAV. AAV2/8、AAV2/5、AAV2/6、AAV2/9、またはAAV2/6/9などの血清型または偽型、または本明細書に列挙されたAAV血清型のうちの1つの変異体または誘導体である血清型（すなわち、複数の血清型に由来するAAV；たとえば、該rAAVは、ゲノム中にAAV2逆方向末端反復（ITR）およびAAV8、5、6、または9キャプシドを含む）。いくつかの実施形態において、発現ベクターはAAVウイルスベクターであり、昆虫細胞／バキュロウイルス生産系または哺乳動物細胞生産系などの生産システムにおいてAAVビリオンの生産を可能にするために両端にITR配列を有することを含む、ゲノムが構築物を含む組換えAAVビリオンによって標的ヒト細胞中に導入される。AAVは、キャプシドタンパク質が免疫原性を低下させるか、またはヒトまたは非ヒト霊長類における形質導入能力を増強するように操作されてもよい。いくつかの実施形態において、AAV9が使用される。本明細書に記載のウイルスベクターは、当技術分野で既知の方法を使用して生成されてもよい。ウイルス粒子を産生するために、任意の適切な許容細胞型またはパッケージング細胞型を使用してもよい。例えば、哺乳動物（例えば、293）または昆虫（例えば、sf9）細胞をパッケージング細胞株として使用してもよい。

10

20

【0073】

V. 薬学的適用

本ZFP-TFは、タウ発現のダウンレギュレーションを必要とする患者を処置するために使用することができる。患者は、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、外傷性脳損傷、発作性疾患、皮質基底核変性症、パーキンソン病、レビー小体型認知症（DLB）および／または別のタウオパチーなどの神経変性疾患を患っているかまたは発症するリスクがある。危険にさらされている患者は、遺伝的に素因がある人、脳震盪などの脳損傷を繰り返し受けた人、環境神経毒にさらされた人を含む、本開示は、対象の神経系に治療有効量（例えば、MAPT発現の十分な抑制を可能にする量）のZFP-TF（例えば、それを発現するrAAVベクター）を導入することを含む、処置を必要とするヒト患者などの対象において神経疾患（例えば、神経変性疾患などのタウオパチー）を処置する方法を提供する。「処置する」なる語は、症状の緩和、症状の発症の予防、疾患の進行の遅延、生活の質の改善、および生存率の向上を包含する。

30

【0074】

本開示は、組換えゲノムがZFP-TFについての発現カセットを含むrAAVなどのウイルスベクターを含む医薬組成物を提供する。医薬組成物（例えば、人工脳脊髄液またはaCSF）は、水、生理食塩水（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、デキストロース、グリセロール、スクロース、ラクトース、ゼラチン、デキストラン、アルブミン、またはペクチンなどの薬学的に許容される担体をさらに含んでもよい。さらに、組成物は、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、安定化剤、または医薬組成物の有効性を高める他の試薬などの補助物質を含んでもよい。医薬組成物は、リポソーム、ナノカプセル、微粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、およびベシクルなどの送達ビヒクルを含んでもよい。

40

【0075】

本開示の治療薬によって標的とされる細胞は、これに限定されないが、神経細胞（例え

50

ば、運動ニューロン、感覚ニューロン、ドーパミン作動性ニューロン、コリン作動性ニューロン、グルタミン酸作動性ニューロン、GABA作動性ニューロン、またはセロトニン作動性ニューロン）；グリア細胞（例えば、希突起膠細胞、星状細胞、周皮細胞、シュワン細胞、またはミクログリア細胞）；上皮細胞；または神経上皮細胞を含む、脳における細胞である。

【0076】

治療によって標的とされる脳領域は、特定の皮質領域、嗅内皮質、海馬、小脳、淡蒼球、視床、中脳、尾状核、被殻、黒質、橋、延髄など、タウオパチーにおいて最も顕著に影響を受けるものであってもよい。これらの領域は、海馬内注射、脳内注射、大槽内（ICM）注射、またはより一般的には実質内注射、視床内注射、脳室内（ICV）注射、髄腔内注射、または静脈内注射によって直接到達できる。他の投与経路は、脳内、脳室内、鼻腔内、または眼内投与を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、例えば、髄腔内および／または脳内注射、または大槽内注射または脳室内注射を通じた、脳脊髄液（CSF）への直接投与後に、CNS組織全体に広がる。他の実施形態において、ウイルスベクターは血液脳関門を通過し、静脈内投与後に対象のCNS組織全体に広範囲に分布する。他の実施形態において、ウイルスベクターは、実質内注射を介して標的領域に直接送達される。場合により、ウイルスベクターは、実質内送達に続いて、他の脳領域への逆行性または順行性輸送を受けてもよい。いくつかの局面において、ウイルスベクターは、高効率で安定かつ非毒性の遺伝子導入を達成する、明確なCNS組織標的化能力（例えば、CNS組織向性）を有する。

10

20

【0077】

例として、医薬組成物は、脳室内投与を通して、例えば患者の前脳の脳室領域、例えば右側脳室、左側脳室、第三脳室、または第四脳室中に、患者に提供されてもよい。医薬組成物は、脳内投与、例えば、大脳、髄質、橋、小脳、視床、線条体、尾状核、被殻、黒質、中脳、尾状核、被殻、嗅球、青斑核、脳幹、淡蒼球、海馬、大脳皮質、頭蓋内腔、髄膜、硬膜、くも膜、または脳の軟膜へのまたはその近くへの組成物の注射によって患者に提供されてもよい。脳内投与は、場合によって、脳を取り囲むくも膜下腔の脳脊髄液（CSF）への薬剤の投与を含んでもよい。

【0078】

場合によっては、脳内投与は、定位手術を用いた注射を含む。定位固定手順は、当技術分野で周知であり、典型的に、特定の脳内領域、例えば心室領域への注入を誘導するために一緒に使用されるコンピュータおよび三次元走査装置の使用を含む。マイクロインジェクションポンプ（例えば、World Precision Instruments製）も使用されてもよい。場合により、ウイルスベクターを含む組成物を送達するためにマイクロインジェクションポンプが使用される。場合により、組成物の注入速度は、 $0.1 \mu\text{l}/\text{分} \sim 100 \mu\text{l}/\text{分}$ の範囲である。当業者に理解されるように、注入速度は、例えば対象の種、対象の年齢、対象の体重／サイズ、AAVの血清型、必要な投与量、および標的とされる脳内領域を含む様々な要因に依存する。したがって、他の注入速度は、特定の状況において適切であると当業者によってみなされてもよい。

30

【0079】

対象へのrAAVの送達は、例えば、静脈内投与によって達成されてもよい。特定の例において、rAAV（例えば、 $10^{10} \sim 10^{15} \text{ Vg}$ ）を、脳組織、脊髄、脳脊髄液（CSF）、神経細胞、グリア細胞、髄膜、星状細胞、希突起膠細胞、ミクログリア、間隙などに局所的に送達することが望ましくてもよい。場合により、組換えAAVは、海馬、大脳皮質、小脳小葉、小脳、大脳、髄質、橋、視床、線条体、尾状核、被殻、黒質、中脳、尾状核、被殻、嗅球、青斑核、脳幹、淡蒼球、頭蓋内腔、髄膜、硬膜、くも膜、または脳の軟膜、または他の脳領域に加えて、脳室領域またはその近くに注射することによってCNSに直接送達されてもよい。AAVは、針、カテーテル、または関連機器を用いて、定位注射などの当技術分野で既知の神経外科技術を使用して送達されてもよい（例えば、Stein et al., J Vir. (1999) 73:3424-9; Davidson et al., PNAS (2000) 97:

40

50

3428-32; Davidson et al., Nat Genet. (1993) 3:219-223; および Alisky and Davidson, Hum Gene Ther. (2000) 11:2315-29を参照)。

【0080】

本明細書で特に定義しない限り、本開示に関連して使用される科学用語および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。例示的な方法および材料を以下に記載するが、本明細書に記載のものと同様または同等の方法および材料を本開示の実施または試験に使用することもできる。矛盾する場合は、定義を含む本明細書が優先される。一般に、本明細書に記載される神経学、医学、医用および薬学化学、ならびに細胞生物学に関連して使用される命名法および技術は、当技術分野で周知であり、一般的に使用されるものである。酵素反応および精製技術は、当技術分野で一般的に達成されるように、または本明細書に記載されるように、製造元の仕様書に従って実施される。さらに、文脈上別段の要求がない限り、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含むものとする。本明細書および実施形態を通じて、「有する(have)」および「含む(comprising)」という言葉、または「有する(has)」、「有する(having)」、「含む(comprises)」、または「含む(comprising)」などの変形は、記載された整数または整数の群を含むことを意味すると理解されるが、任意の他の整数または整数の群を除外するものではない。本明細書で言及されたすべての刊行物および他の参考文献は、参照によりその全体が組み込まれる。本明細書では多くの文書が引用されているが、この引用は、これらの文書のいずれかが当技術分野における共通の一般知識の一部を形成することを認めるものではない。本明細書で使用される用語「およそ」または「約」は、1つ以上の目的の値に適用される場合、記載された参照値に類似する値を指す。特定の実施形態において、別段の記載がない限り、または文脈から明らかでない限り、この用語は、記載された参照値のいずれかの方向で（より大きいまたは小さい）10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下の範囲内に入る値の範囲を指す。

【0081】

本発明をよりよく理解するために、以下の実施例を記載する。これらの実施例は、説明のみを目的としており、本発明の範囲を決して限定するものと解釈されるべきではない。

【0082】

V I. 例示的な実施形態

本開示の非限定的な例示の実施形態を以下に説明する。

1. 標的配列に結合し、図14の単一行に示されるZFP IDに対応するDNA結合ジंकフィンガー認識ヘリックス配列を含むZFP-TF融合タンパク質であって、ここでZFP IDは52288である、ZFP-TF融合タンパク質。
2. 標的配列に結合し、図14の単一行に示されるZFP IDに対応するDNA結合ジंकフィンガー認識ヘリックス配列を含むZFP-TF融合タンパク質であって、ここでZFP IDは52389である、ZFP-TF融合タンパク質。
3. 標的配列に結合し、図14の単一行に示されるZFP IDに対応するDNA結合ジंकフィンガー認識ヘリックス配列を含むZFP-TF融合タンパク質であって、ここでZFP IDは52364である、ZFP-TF融合タンパク質。
4. 標的配列に結合し、図14の単一行に示されるZFP IDに対応するDNA結合ジंकフィンガー認識ヘリックス配列を含むZFP-TF融合タンパク質であって、ここでZFP IDは57890である、ZFP-TF融合タンパク質。
5. 標的配列に結合し、図14の単一行に示されるZFP IDに対応するDNA結合ジंकフィンガー認識ヘリックス配列を含むZFP-TF融合タンパク質であって、ここでZFP IDは71214である、ZFP-TF融合タンパク質。
6. 標的配列に結合し、図14の単一行に示されるZFP IDに対応するDNA結合ジंकフィンガー認識ヘリックス配列を含むZFP-TF融合タンパク質であって、ここでZFP IDは71218である、ZFP-TF融合タンパク質。
7. 標的配列に結合し、図14の単一行に示されるZFP IDに対応するDNA結合ジंकフィンガー認識ヘリックス配列を含むZFP-TF融合タンパク質であって、ここで

24. 標的配列に結合し、図14の単一行に示されるZFP IDに対応するDNA結合

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

40. 標的配列に結合し、図14の単一行に示されるZFP IDに対応するDNA結合ジンクフィンガー認識ヘリックス配列を含むZFP-TF融合タンパク質であって、ここでZFP IDは71420である、ZFP-TF融合タンパク質。

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

57. 標的配列に結合し、図16の単一行に示されるようなZFP IDに対応するDNA結合ジンクフィンガー認識ヘリックス配列および骨格変異を含むZFP-TF融合タン

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

90. 標的配列に結合し、図16の単一行に示されるZFP IDに対応するDNA結合ジンクフィンガー認識ヘリックス配列および骨格変異を含むZFP-TF融合タンパク質であって、ここでZFP IDは73200である、ZFP-TF融合タンパク質。

91. 標的配列に結合し、図16の単一行に示されるZFP IDに対応するDNA結合ジンクフィンガー認識ヘリックス配列および骨格変異を含むZFP-TF融合タンパク質であって、ここでZFP IDは73201である、ZFP-TF融合タンパク質。
92. 標的配列に結合し、図16の単一行に示されるZFP IDに対応するDNA結合ジンクフィンガー認識ヘリックス配列および骨格変異を含むZFP-TF融合タンパク質であって、ここでZFP IDは73202である、ZFP-TF融合タンパク質。
93. 標的配列に結合し、図16の単一行に示されるZFP IDに対応するDNA結合ジンクフィンガー認識ヘリックス配列および骨格変異を含むZFP-TF融合タンパク質であって、ここでZFP IDは73203である、ZFP-TF融合タンパク質。
94. ZFP-TF融合タンパク質が転写リプレッサードメインを含む、実施形態1～93のいずれか1つのZFP-TF融合タンパク質。
95. 転写リプレッサードメインがKRABドメインを含む、実施形態94のZFP-TF融合タンパク質。
96. 転写抑制ドメインが配列番号2を含む、実施形態94のZFP-TF融合タンパク質。
97. 実施形態1～96のいずれか1つの融合タンパク質を細胞中に導入することを含む、ヒト脳細胞におけるタウの発現を阻害する方法。
98. 実施形態1～96のいずれか1つの2つ以上の異なる融合タンパク質を細胞中に導入することを含む、ヒト脳細胞におけるタウの発現を阻害する方法。
99. 実施形態4 (ZFP ID 57890) および実施形態53 (ZFP ID 65918) の融合タンパク質を細胞中に導入することを含む、ヒト脳細胞におけるタウの発現を阻害する方法。
100. 融合タンパク質のそれぞれが転写リプレッサードメインを含み、所望により転写リプレッサードメインがKRABドメインである、実施形態98または99の方法。
101. 融合タンパク質が共送達される、実施形態98～100のいずれか1つの方法。
102. 融合タンパク質が2A自己切断ペプチドによって連結されている、実施形態98～100のいずれか1つの方法。

10

20

【0083】

実施例

実施例1：抗タウZFP-TFのスクリーニング

タウの発現を抑制するZFP-TFを同定するために、TSSの1000bp上流から500bp下流に及ぶヒトMAPT遺伝子の領域の15、18、または19bp配列に結合すると予測される370個のZFP-TFのライブラリーを、タウ抑制活性について設計し、スクリーニングした。ZFP-TFの標的領域は、図2において五角形で示されている。五角形の方法は、ZFP-TFが結合するDNA鎖を示す(5'から3')。この研究において、KRABドメイン配列(配列番号2)を転写リプレッサーとして使用し、ZFPドメインのC末端に融合させた。代表的な52個のZFP-TFの配列を以下の図14に示す。インビトロ転写用の鋳型を、PCR(フォワードプライマーGCAGAGCTCTCTGGCTAAGTAGAG(配列番号16);リバースプライマーT(180)CTGGCAAGTAGAAGGCACAG(配列番号17))を使用して、pVAX-ZFPまたはpVAX-GFPプラスミドから生成した。製造元の指示に従って、メッセンジャーRNAをmMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific)を使用して合成し、RNeasy96カラム(Qiagen)を使用して精製した。次いで、各ZFP-TFをコードするmRNAを96ウェルプレートに6回希釈で分注した。

30

40

【0084】

スクリーニングを、SK-N-MCヒト神経上皮細胞株で実施した。SK-N-MC細胞はヒトタウを高レベルで発現するため、タウ発現を低下させるZFP-TFの試験に適している。SK-N-MC細胞を、コンフルエントになるまで組織培養フラスコで培養した。細胞を150,000細胞/ウェルで96ウェルプレートに播種し、Amaxa(登

50

録商標) S F 溶液に再懸濁した。次いで、細胞を Z F P - T F m R N A (6 用量: 3、10、30、100、300、および 1000 ng) と混合し、A m a x a (登録商標) シャトルプレートウェルに移した。細胞を、A m a x a (登録商標) N u c l e o f e c t o r (登録商標) 機器 (L o n z a ; プログラム C M - 137) を使用してトランスフェクトした。イーグルの M E M 細胞培地をプレートの各ウェルに加えた。細胞を 96 ウェル組織培養プレートに移し、37℃で20時間インキュベートした。

【0085】

次いで、細胞を溶解し、製造者の指示に従って C 2 C T キットを使用して逆転写を行った。T a q M a n 定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (q P C R) を使用して、ハウスキーピング遺伝子 A t p 5 b および E i f 4 a 2 の発現レベルの幾何平均に正規化された M A P T の発現レベルを測定した。M A P T を標的としないことが既知であるモックトランスフェクションおよび Z F P - T F を用いたトランスフェクションをネガティブコントロールとして使用した。

10

【0086】

試験した Z F P - T F の ~ 29% でタウの 50% 以上の用量依存的抑制が見出された。達成された最大抑制は 100% であったが、タウをより低い程度に抑制した Z F P - T F も特定した (例えば、最高用量で約 90%、約 75%、または約 50%)。図 3 A ~ D はスクリーニングデータを示す。また、ヒト i P S C 由来ニューロンにおいて 52 の代表的な Z F P - T F をテストした (データは示さず)。

【0087】

20

実施例 2 : 抗タウ Z F P - T F の標的特異性の最適化

Z F P - T F の標的特異性を最適化するために、ジンクフィンガーのうち 3 つまでのアルギニン (R) 残基をグルタミン (Q) に変異させた。このアルギニン残基は、DNA 結合ヘリックスの 1 番目のアミノ酸の上流の 4 番目のアミノ酸に位置し、各ジンクフィンガーの β シート中にある (図 4、5 A および 5 B)。この残基は、標的 DNA のリン酸骨格との保存された非特異的接触に参与している。各親 Z F P - T F を、示されたヘリックスの 1 番目のアミノ酸の 4 番目の位置上流で変異させ、最大 7 つの異なる R $\rightarrow$ Q 変異体を生成させた。41 個の代表的な R $\rightarrow$ Q 変異体 Z F P - T F の配列を以下の図 16 に示す。M iller et al., Nat Biotechnol. (2019) 37:945-52 も参照のこと。

【0088】

30

実施例 3 : 親の抗タウ Z F P - T F の R $\rightarrow$ Q 変異体のスクリーニング

ヒトタウの発現を最もよく抑制する親 Z F P - T F の R $\rightarrow$ Q 変異体を同定するために、約 340 の変異体 Z F P - T F のライブラリーを実施例 1 に記載のようにスクリーニングした。 $\rightarrow$ Q 変異体 Z F P - T F を、それぞれの Z F P - T F をコードする A A V で形質導入されたヒト i P S C 由来ニューロンおよび初代マウス皮質ニューロンでもテストした。

【0089】

A A V 生産

組換えアデノ随伴ウイルスベクター (r A A V) を、トリプルトランスフェクション法によって生成させた。簡単に言えば、H E K 293 細胞を 10 層の C e l l S t a c k チャンバー (C o r n i n g , A c t o n , M A) に播種し、3 日間 80% の密度まで増殖させた。3 つのプラスミド - (i) R e p および C a p 遺伝子を含む A A V ヘルパープラスミド、(i i) アデノウイルスヘルパー遺伝子を含むアデノウイルスヘルパープラスミド、および (i i i) A A V 2 逆方向末端反復が隣接するパッケージングされる配列を含むトランスジーンプラスミドを、リン酸カルシウムを使用して細胞中にトランスフェクトした。3 日後、細胞を回収した。次いで、細胞を 3 回の凍結 / 融解によって溶解し、遠心分離によって細胞破片を除去した。r A A V を、ポリエチレングリコールを使用して沈殿させた。再懸濁後、塩化セシウム勾配で一晩超遠心分離することによりウイルスを精製した。ウイルスを透析によって処方し、次いでフィルター滅菌した。P B S + 0.001% P l u r o n i c F - 68 で希釈してすべての A A V バッチの力価 (ウイルスゲノム / m l) を調整した後、A A V を 1 回使用量に分注し、使用するまで - 80℃ で保存した。解

40

50

凍後、再凍結はしなかった。

【0090】

ヒト iPSC 由来の GABA 作動性ニューロンを Cellular Dynamics International から購入し、ポリ-L-オルニチンおよびラミニンでコーティングした 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 40,000 細胞の密度で播種し、製造元の指示に従って維持した。細胞を、プレーティングの 48 時間後に示された MOI で所望の ZFP-TF を発現する AAV に感染させ、最大 32 日間維持した（3～5 日ごとに 50～75% の培地交換を行った）。実験期間の終了時に細胞を回収し、RNA を分離し、遺伝子発現解析のために RT-qPCR を実施した。マイクロアレイ分析のために、細胞を播種の 48 時間後に 1 E5VG / 細胞でトランスフェクトし、ウイルストランスフェクションの 19 日後に回収した。

10

【0091】

初代マウスニューロン培養および ZFP-TF AAV 感染

初代マウス皮質ニューロン (MCN) を、Gibco から購入した。細胞を、ポリ-D-リジンでコーティングした 96 ウェルまたは 24 ウェルプレートに、それぞれ 50,000 または 200,000 細胞 / ウェルで播種し、GlutaMAX (登録商標) I サプリメント、B27 サプリメント、およびペニシリン / ストレプトマイシンを含有する Gibco Neurobasal Medium を使用して、製造元の仕様書に従って維持した。播種の 48 時間後 (DIV2 で)、96 ウェルプレートの 50,000 細胞 / ウェルを指定された MOI で AAV-ZFP に感染させ、7 日後に採取し (DIV9 で、3～4 日ごとに 50% の培地交換を行った)、その後 RT-qPCR による RNA 分離および遺伝子発現解析を行った。あるいは、24 ウェルプレートの 200,000 ニューロン / ウェルを 1 E5VG / 細胞で処置して、100% の形質導入率を確保し、DIV9 でのマイクロアレイ解析のために同様の方法で処置した。

20

【0092】

図 6 は、代表的な R→Q 変異体 ZFP-TF のスクリーニングデータを示す。図 7A および 7B は、それぞれの ZFP-TF をコードする AAV で形質導入されたヒト iPSC 由来ニューロンおよびマウス一次ニューロンにおける、代表的な ZFP-TF およびそれらの R→Q 変異体の用量依存的活性を示す。

30

【0093】

これらの図におけるデータは、R→Q 変異体 ZFP-TF が広範囲のタウ抑制活性プロファイルを示し、試験した最高用量でのヒト iPSC 由来ニューロンにおけるヒトタウ mRNA 抑制は約 45% から 100% の範囲にあった。初代皮質マウスニューロンにおける代表的な R→Q 変異体 ZFP-TF の発現は、7 日後に全マウス Mapt の用量依存的抑制をもたらさなかったため、試験された ZFP-TF はヒト MAPT を特異的に標的とすることも明らかである。

【0094】

実施例 4：抗タウ ZFP-TF のオフターゲット活性

親 ZFP-TF の R→Q 変異体が全体的な遺伝子発現に及ぼすオフターゲットの影響を評価するために、代表的な R→Q 変異体 ZFP-TF をコードする AAV で処置されたヒト iPSC 由来ニューロンおよび初代マウス皮質ニューロンから分離された全 RNA に対してマイクロアレイ (Clariom S Array および Clariom D Array) 実験を実施した。また、定量的 RT-qPCR 分析を実行して、これらの ZFP-TF がタウ遺伝子座 (ヒトタウおよび STH) 内の転写産物の発現レベルおよびマイクロアレイ研究で特定された明らかなオフターゲット遺伝子 (CPNE6 および IGF2) の発現レベルに及ぼす影響を比較した。

40

【0095】

マイクロアレイ分析

マイクロアレイ分析を製造元のプロトコル (Thermo Fisher Scientific) に従って行い、アッセイ結果を TAC4 ソフトウェアを使用して分析した。

50

R T-q P C R 分析を使用して、F D R 補正 p 値 ≤ 0.05 の明らかなオフターゲットをさらに調査した。

【0096】

R T-q P C R を用いた遺伝子発現解析

製造者の指示に従って C 2 C T キットを用いて逆転写を行った。T a q M a n 定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (q P C R) を使用して、M a p t、S t h、C p n e 6、および I g f 2 の転写レベルを測定した。遺伝子発現レベルを、ハウスキーピング遺伝子 A t p 5 b、E i f 4 a 2、および G a p d h の発現レベルの幾何平均に対して正規化した。M A P T、S T H、C P N E 6、および I G F 2 を標的としないことが既知であるモックトランスフェクションおよび Z F P-T F を用いたトランスフェクションをネガティブコントロールとして使用した。

10

【0097】

図 8 は、ヒト i P S C 由来ニューロンおよび初代マウス皮質ニューロンにおける 6 つの代表的な R $\rightarrow$ Q 変異体 Z F P-T F のマイクロアレイ結果を示す。図 9 は、代表的な R $\rightarrow$ Q 変異体 Z F P-T F で形質導入されたヒト i P S C 由来ニューロンにおける M a p t、S t h、C p n e 6、および I g f 2 遺伝子発現についての R T-q P C R 結果を示す。

【0098】

R $\rightarrow$ Q 変異体 Z F P-T F は低いかまたはない検出可能なオフターゲット活性を示すことを見出した。

【0099】

20

実施例 5：抗タウ Z F P-T F の代表的な R $\rightarrow$ Q 変異体のインビボ耐性

海馬内定位固定 A A V 9 投与後の Z F P-T F 媒介タウ抑制の潜在的な有害作用を評価するために、さまざまなヒトタウ抑制活性を有する親 Z F P-T F の R $\rightarrow$ Q 変異体をコードする A A V で処置してから 4 週間後の成体 C 5 7 B L / 6 マウスの脳から分離された海馬組織における Z F P-T F、タウ、G f a p、I b a 1、および N e u N 発現の定量的 R T-q P C R 分析を通して導入遺伝子発現および神経炎症マーカーの発現レベルを評価した。

【0100】

その後の分析のために海馬組織を採取するために、マウスを P B S で灌流し、脳を摘出し、氷上で解剖した。海馬をかみそりの刃またはメスで切り刻み、切り刻んだ組織を R N A および D N A 分析用に指定された 2 つの部分に分割した。次いで、細かく刻んだ組織を液体窒素で急速冷凍し、分析まで -80°C で維持した。

30

【0101】

逆転写は、H i g h C a p a c i t y R T K i t (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) キットを製造元の指示に従って使用して実施した。T a q M a n 定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (q P C R) を使用して、Z F P-T F、M a p t、G f a p、I b a 1、および N e u N の発現レベルを測定した。遺伝子発現レベルを、ハウスキーピング遺伝子 A t p 5 b、E i f 4 a 2、および G a p d h の発現レベルの幾何平均に対して正規化した。ビヒクル処置および A A V 発現緑色蛍光タンパク質 (G F P) による処置を、ネガティブコントロールとして使用した。

40

【0102】

試験した R $\rightarrow$ Q 変異体 Z F P-T F のほとんどが、最大投与量でインビボで良好に許容されることを見出した。いくつかの候補では、神経炎症マーカーの発現レベルに有意な変化はなかった。さらに、いくつかの候補はマウスのタウに対して交差反応性を示さず、高度の特異性を示す。代表的な R $\rightarrow$ Q 変異体 Z F P-T F で処置した成体マウスは、安定したマウス M a p t 発現を示し、これらの Z F P-T F がヒト M A P T 遺伝子の特異的に標的としていることを示す。しかし、1 つの融合タンパク質は Z F P-T F の発現低下を示し、別の融合タンパク質は神経炎症マーカー G f a p および I b a 1 の発現レベルの上昇をもたらした。テストされた Z F P-T F のいずれも、ニューロンマーカー N e u N の発現レベルの低下をもたらさなかった。これらの所見は、この研究で試験されたタウ Z F P

50

ーTF候補がマウスにおいてインビボで望ましいプロファイルを有し、マウス脳における発現に続く神経炎症マーカーの上昇および神経細胞の喪失の証拠が最小限に抑えられていることを示す（図10）。

【0103】

実施例6：抗タウZFP-TFの代表的なR→Q変異体によるヒトタウmRNAおよびタンパク質のインビボ還元

インビボでのヒトタウmRNAおよびタンパク質の減少を評価するために、本明細書に記載されるように、抗タウZFP-TFをhtaumマウス（B6.Cg-Mapt^{tm1(EGFP)KltTg(MAPT)8cPdav/J}、Jackson Labs）に投与した。htaumマウスは、GFP発現構築物をマウスMaptの最初のコーディングエクソンに挿入することによって機能的にノックアウトされた内因性（マウス）Maptをバックグラウンドに、野生型のヒトMAPT遺伝子を発現する。マウスは、ビヒクル、73133、73034、73122、または65918.T2A.57890（マウスMapt遺伝子の部位を標的とするように設計された2つのZFPを共発現する構築物）のいずれかをコードするAAV9ベクターの背側および腹側海馬への定位二重、両側注射を受けた。ZFP-TF73133、73034、および73122を、半球あたり3E9、1E0、および3E10VGの用量でテストした一方、ZFP-TF65918.T2A.57890を、半球あたり3E9VGのみでテストした。マウスの別の群を、分子、生化学的、および免疫組織学的エンドポイントの注射後3ヶ月または6ヶ月で犠牲にした。

10

20

【0104】

htaumマウスの脳から単離された海馬組織において、ZFP導入遺伝子、ヒトMAPT、内因性マウスMapt、および内因性Mapt翻訳を妨害するGFPカセットの発現レベルを定量的RT-qPCRによって評価した。Gfap、Iba1、NeuNなどの神経炎症マーカーおよび神経細胞マーカーも評価した。さらに、サイトヒン（STH）なる名前のヒトMAPT内の未知の機能のイントロン転写産物のレベルを評価した。

【0105】

その後の分析のために海馬組織を採取するために、マウスをPBSで灌流し、脳を摘出し、氷上で解剖した。右半球については、海馬をかみそりの刃またはメスで切り刻み、切り刻んだ組織をRNAおよびタンパク質分析用に指定された2つの部分に分割した。次いで、細かく刻んだ組織を液体窒素で急速冷凍し、分析まで-80℃で維持した。左半球について、海馬を10%NBFで24時間落下固定し、70%エタノールに移し、次いでinsituハイブリダイゼーション（ISH）分析のためにパラフィンブロックに包埋した。

30

【0106】

mRNA分析のために、マイクロアレイRNA抽出キット（Thermo Fisher Scientific）用のMagMaxを使用して全RNAを抽出し、メーカーの指示に従って、High Capacity RT Kit（Thermo Fisher Scientific）キットを使用して逆転写を行った。TaqMan（登録商標）定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）を使用して、標的遺伝子の発現レベルを測定した。ZFP導入遺伝子の発現を、RT-qPCR反応の入力として使用される総RNAの量に正規化した。他のすべての標的遺伝子の発現レベルを、ハウスキーピング遺伝子Atp5b、Eif4a2、およびGapdhの発現レベルの幾何平均に対して正規化した。すべての処置群を、ビヒクル群について観察された正規化されたレベルの平均にスケリングした。

40

【0107】

タンパク質分析のために、全ヒトタウELISA（Thermo Fisher Scientific）キットを使用して、製造業者のプロトコルに従ってヒトタウタンパク質のレベルを定量化した。総タウレベルを、BCAタンパク質アッセイによって決定された総タンパク質に対して正規化した。すべての処置群を、ビヒクル群について観察された

50

正規化されたレベルの平均にスケーリングした。

【0108】

I S H分析のために、製造業者のプロトコル (A d v a n c e d C e l l D i a g n o s t i c s) に従って、パラフィン包埋ブロックを切断し、多重R N A s c o p e / 免疫蛍光染色のために処置した。切片の核をD A P Iで染色し、ヒトM A P T転写物をR N A s c o p eで染色し、N e u Nタンパク質を免疫蛍光法で染色した。

【0109】

Z F P - T Fの各々を、3ヶ月および6ヶ月の両方の時点で、対応する用量ごとに試験されたすべての構築物にわたって、持続的で用量依存的に、同様のレベルで発現させた。ヒトを標的とした抗タウZ F P - T Fは、両方の時点で試験した最高用量で、ヒトタウm R N Aを最大93% (73133)、または54~61% (73034および73122) まで特異的に減少させることができた。Z F P - T F 73133および73034は、タウm R N Aの用量依存的な減少をもたらしたが、73122は、テストされた用量の範囲全体で横ばい効果をもたらした (約46~68%の減少)。同様の結果を、テストされたすべてのZ F P - T FおよびタイムポイントについてのイントロンM A P TトランスクリプトS T Hについて観察した。73133、73034、および73034について、内因性マウスM a p tまたはG F P発現の有意な減少はなかった。65918、T2A、57890を標的とする異種間では、テストされた単回投与 (半球あたり3 E 9 V G) で、両方の時点でヒトおよびマウスの両方のタウが50%を超えて減少した。Z F P処置群において、神経炎症およびニューロンマーカーG f a p、I b a 1、またはN e u nの発現レベルの変化は観察されないか、または最小限の有意な変化が観察された (図11)。

10

20

【0110】

ヒト標的化抗タウZ F P - T Fは、同様に、両方の時点で試験した最高用量でヒトタウタンパク質レベルを97% (73133) から>64~80% (73034および73122) まで減少させた。Z F P - T F 73133および73034は、タウタンパク質の用量依存的な減少をもたらしたのに対し、73122は、試験された用量の範囲にわたって横ばい効果をもたらした (約54~80%の減少; 図12)。

【0111】

R N A s c o p e分析は、処置h t a uマウスの海馬におけるZ F P依存性の程度のヒトM A P T転写物の減少を示した。ビヒクルで処置したマウスと比較して、Z F P - T F 73133で処置した海馬のN e u N陽性ニューロンは、3 e 9試験用量で3か月後に検出可能なM A P T転写産物が最小限しか残っていなかった。対照的に、73122は中間レベルの検出可能なM A P T転写物が残っており、バルクM A P T m R N Aおよびタウタンパク質分析と一致して、このZ F P - T Fについての総抑制が少ないことを示している (図13)。これらの単一細胞データは、S K - N - M C細胞、培養ヒトi P S C由来ニューロン、およびh t a uマウスからのバルク脳組織で発現されたM A P T標的Z F P - T Fについて得られた抑制結果を裏付ける。

30

【0112】

これらの知見は、この研究で試験されたタウZ F P - T F候補が、マウスにおいてインビボで望ましいタウ低下プロファイルを有し、神経炎症マーカー上昇の証拠が最小限であり、h t a uマウス脳における発現後のニューロン損失がないことを示す。

40

【図面】

【図 1】

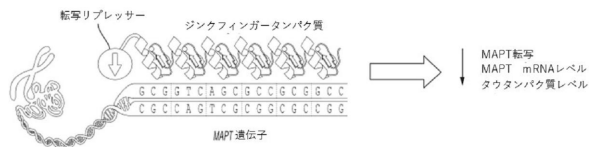


FIG. 1

【図 2】

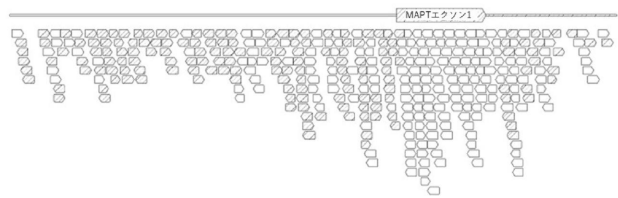


FIG. 2

【図 3 - 1】

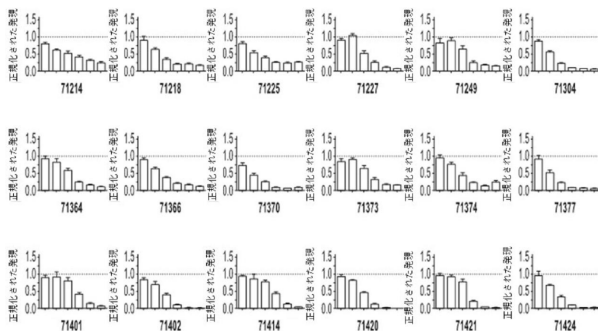


FIG. 3

【図 3 - 2】

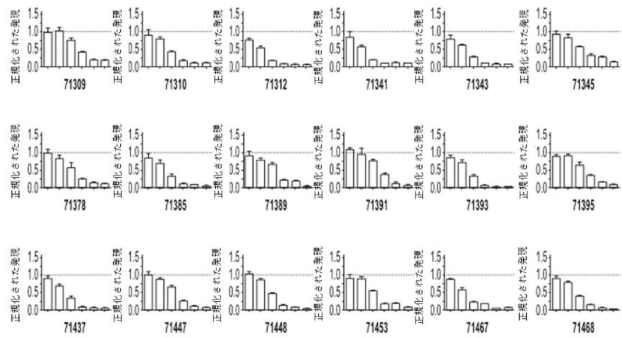


FIG. 3

続き

【図 3 - 3】

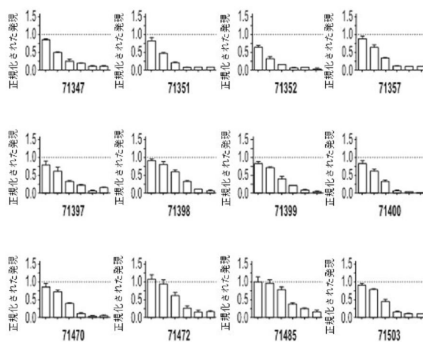


FIG. 3

続き

【図 4】

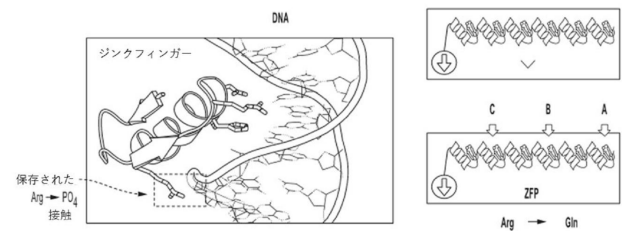
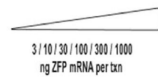


FIG. 4



10

20

30

40

50

【図 5 - 1】

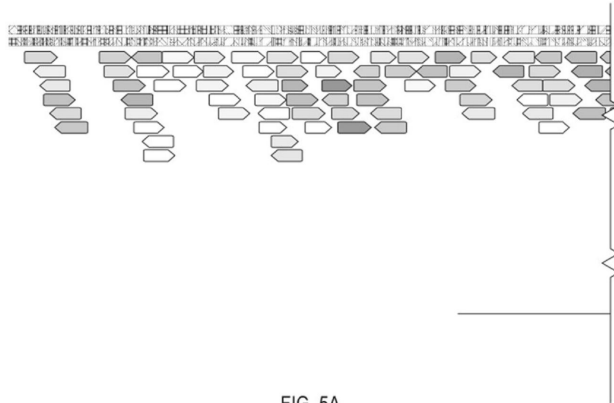


FIG. 5A

【図 5 - 2】

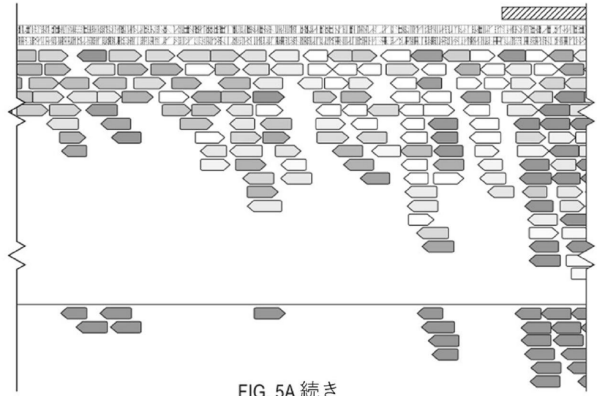


FIG. 5A 続き

【図 5 - 3】

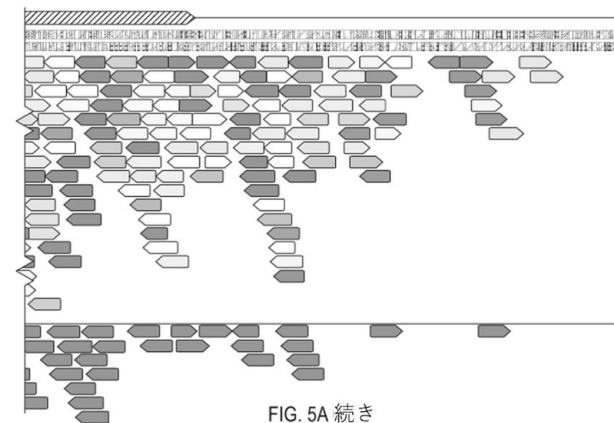


FIG. 5A 続き

【図 6 - 1】

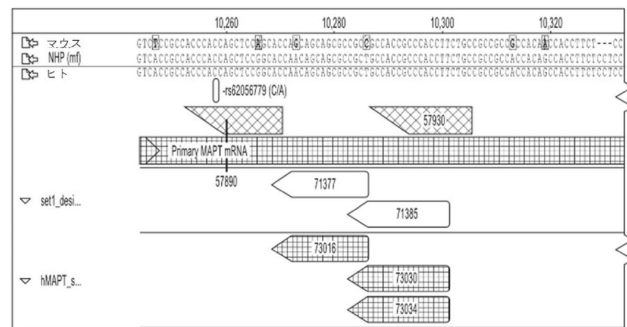
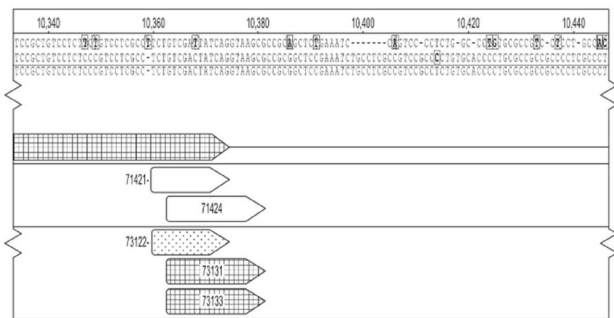
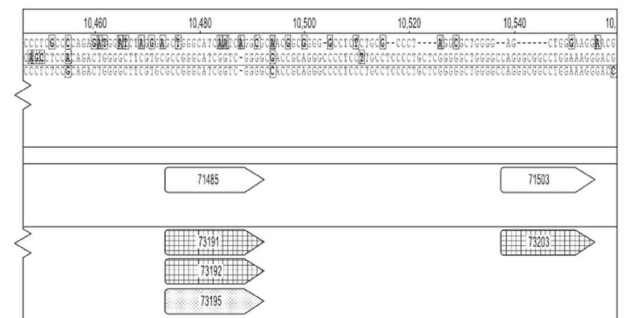


FIG. 5B

【図 6 - 2】

FIG. 5B
続き

【図 6 - 3】

FIG. 5B
続き

10

20

30

40

50

【図 7 - 1】

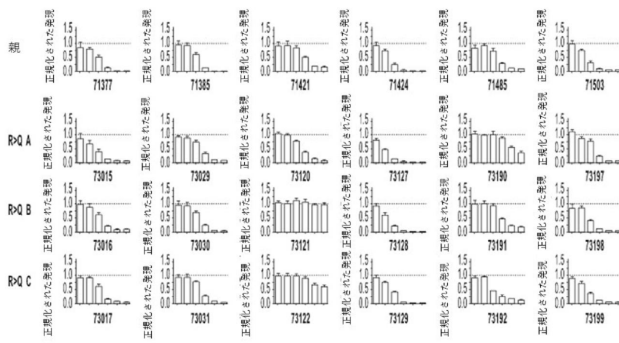
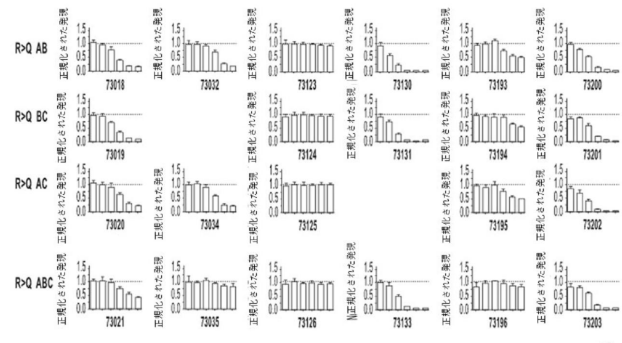


FIG. 6

【図 7 - 2】

FIG. 6
続き3 / 10 / 30 / 100 / 300 / 1000
ng ZFP mRNA per bn

10

【図 8 - 1】

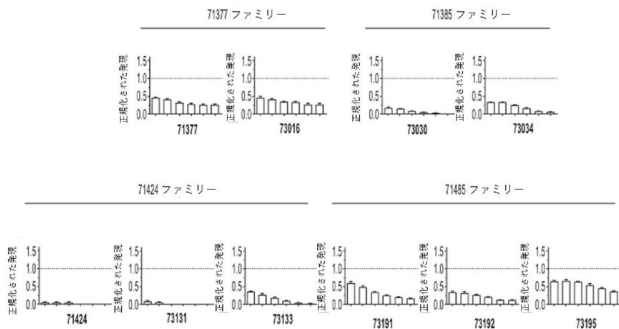
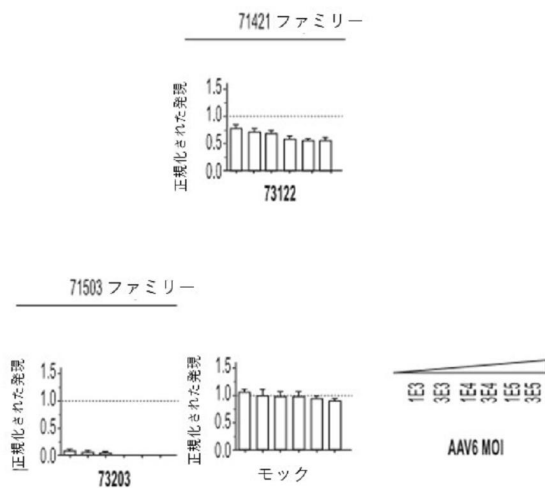


FIG. 7A

【図 8 - 2】

FIG. 7A
続き1E3 1E2 1E1 1E0 1E-1 1E-2
AAV6 MOI

20

30

40

50

【図 9 - 1】

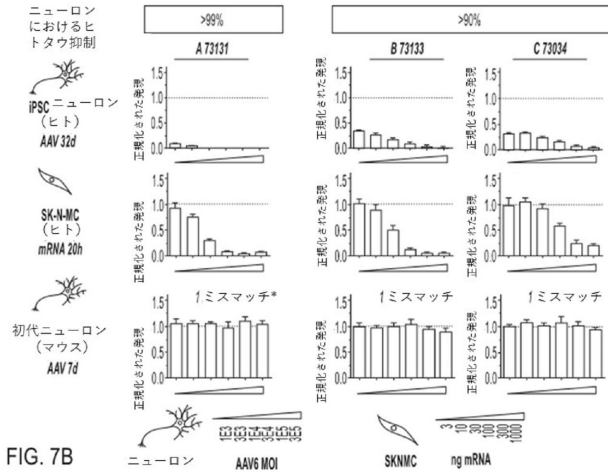


FIG. 7B

【図 9 - 2】

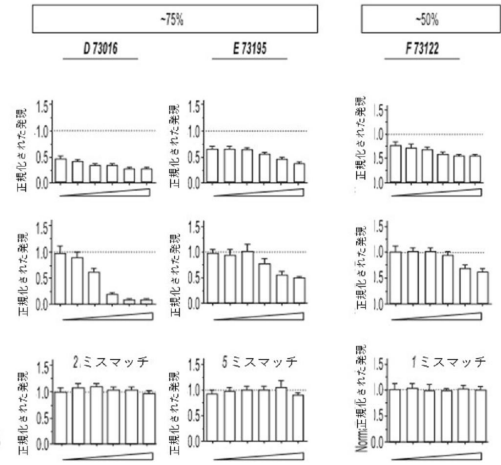


FIG. 7B
続き

10

【図 10 - 1】

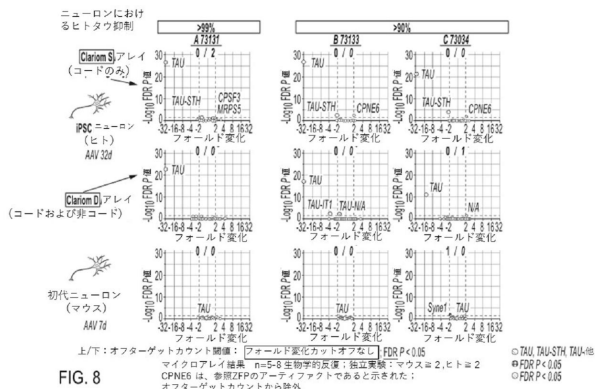


FIG. 8

【図 10 - 2】

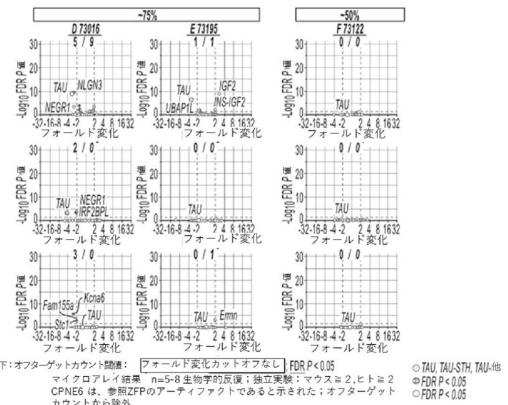


FIG. 8
続き

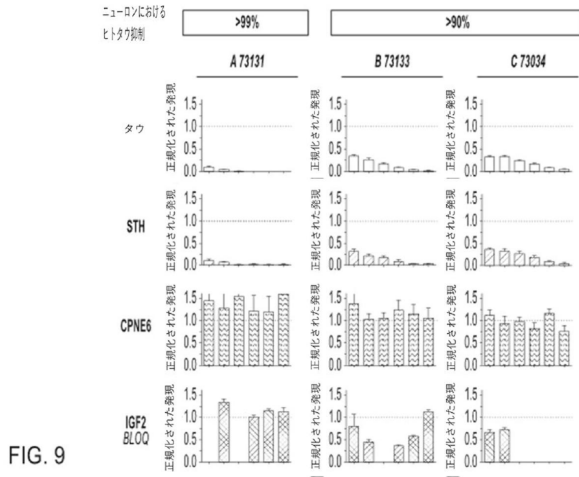
20

30

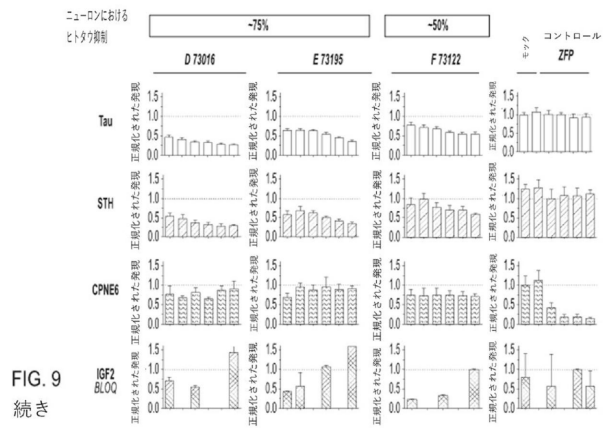
40

50

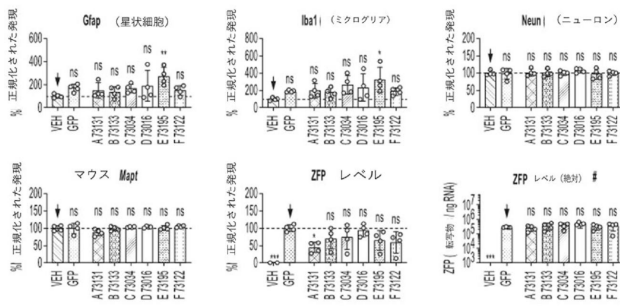
【図 1 1 - 1】



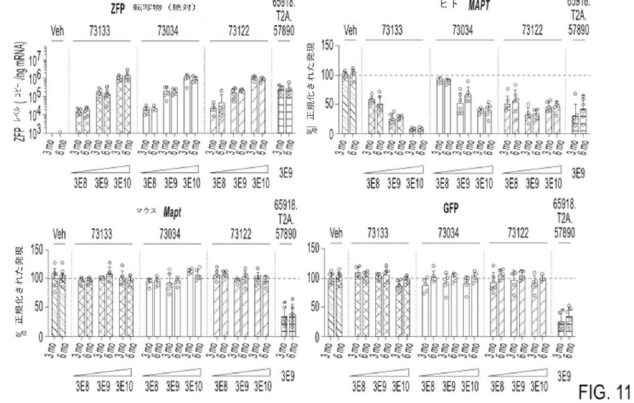
【図 1 1 - 2】



【図 1 2】



【図 1 3 - 1】



10

20

30

40

50

【圖 14】

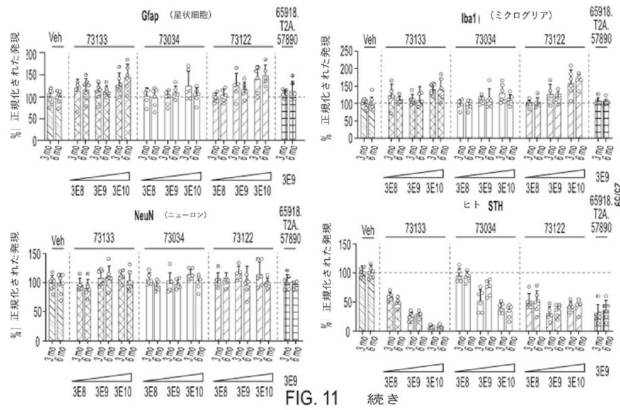


FIG. 11

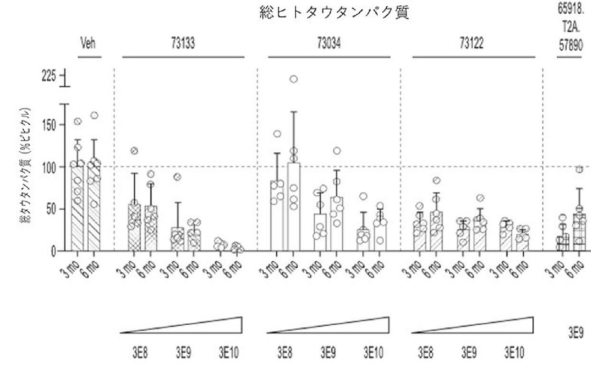


FIG. 12

【圖 16-1】

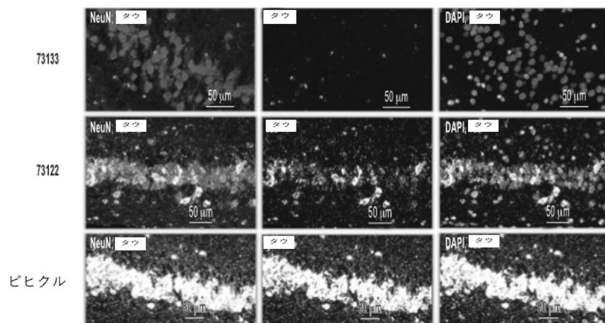


FIG. 13

ZFP ID	標的配列 (大文字)	各フィンガー内のDNA認識ヘリックスアミノ酸配列											
		F1	L1	F2	L2	F3	L3	F4	L4	F5	L5	F6	L6
5208	agGGGCGGCACGCCag (37)	RSAADLT (89)	0c	QSDGLT (119)	0c	RSDLSL (154)	0f	RSALSL (104)	Clik				
5209	cCTGTGGTCGTGATGATGCCca (38)	RSAGTL (90)	0f	TSANSL (122)	1c	TSGNLT (115)	0f	HRTSLT (168)	0c	RSHSLR (179)	0f	HPARKR (186)	Clik
5264	cgcACAGAAGGCGAGga (39)	RSNNLAR (91)	0f	DSSHAR (123)	0c	QSNLAR (111)	0f	QSNWTR (169)	Clik				
5780	tgtGTGTGGatGTGGTGggg (40)	LASHITL (92)	0f	RPTLSL (124)	0c	RSDVLE (155)	0f	KHSTRAV (170)	0c	RSDVLE (155)	0f	RLYTLK (187)	Clik
7124	gtTCCTTTCCCGCCGct (41)	RSGLTL (93)	0a	DGNLAR (125)	0f	RSPDILP (156)	0c	RSDLSL (94)	0f	DRSMTL (126)	Clik		
7126	gcCGCAGCGGTTCCTGTgg (42)	RSDLSL (94)	0f	URPSDT (126)	0c	RQDLTL (157)	0f	RPSDLR (93)	0c	DQSLRA (125)	0f	RBSGLK (193)	
7125	gcGGCGTGACCGACGCGcc (43)	RSDDLTL (95)	0f	MSVQLR (127)	0c	QAHLRT (96)	0f	DRSLTL (128)	0f	QSSVLR (105)	0f	DRSHLR (123)	Clik
7127	caGGCGGGGGCTGACCGAg (44)	QAHLRL (96)	0f	DRSLTL (128)	0c	QSDSLR (105)	0f	DRSHLR (123)	0c	YYGYVT (180)	0f	DRSLTL (123)	Clik
7149	cgcCCGCGGCGGAgGCGTCgc (45)	DSYVNT (97)	0f	RBSGLR (93)	1c	RSDNLV (158)	0f	RSMAWT (171)	0c	ASDNLA (91)	0f	DRSVLR (188)	Clik
7150	agGCGGAGCGGCGCGkac (46)	QSJLSL (98)	0a	RSADTL (89)	0f	QSDGLT (119)	0c	QMAHKT (99)	0f	RPSDLR (93)	Clik		
7159	gcGGCGAagCGCGAGCGcg (47)	RSGLTL (95)	0f	QAMTLR (129)	0c	QMAHKT (99)	0f	RPSDLR (93)	1c	QSDGLT (119)	0f	TQGVLR (151)	Clik
7160	ggGCGGCGAGGCGCGAgc (48)	QMAHKT (99)	0f	RSADR (130)	0c	RENLSA (159)	0f	RENDNR (172)	0a	RSDTLR (95)	Clik		
7162	cgcGGCGGCGCGCGCGGcag (49)	MSCDGA (100)	0f	RSMDLR (131)	0c	DRSLTL (109)	0f	QSDGLT (119)	0c	DRSLTL (112)	0f	DRSHLR (123)	Clik
7164	gtGACTGCGAGGCGCGcgc (50)	RSADTL (89)	0f	DRSHLR (123)	0c	RSANLT (160)	0a	SSGHLP (102)	0f	DRSLTL (128)	Clik		
7163	gtGGCGGTGATCGAGgggcgc (51)	DYSHTL (101)	0f	MQNVLS (132)	0c	SSGHLP (102)	0f	DRSLTL (128)	0c	TGSLSL (103)	0f	DRSHLR (123)	Clik
7165	gtTGGCGGTGAGTCAgggcCgc (52)	RSGLTL (101)	0f	MQNVLS (132)	0c	SSGHLP (102)	0f	DRSLTL (128)	1c	RSDLSL (154)	0f	RMQRER (189)	Clik
7167	tgtGGTGGCGGtGCTGGAGgg (53)	RSNNLAR (91)	0f	FRDLYK (133)	0c	DRNSLR (161)	0f	LXHLTL (139)	0c	DRSLTL (109)	0f	LXHLTL (139)	Clik
7155	tgtGTGGTGGCGGtGATCGcga (54)	SSGHLP (102)	0f	DRSLTL (128)	0c	TGHSLS (103)	0f	DRSHLR (123)	0c	LHHILT (92)	0f	RFTPLK (124)	

FIG. 14

【図 16-2】

ZP ID	標的配列 (大文字)	各フィンガー内のDNA認識ヘリックスアミ / 配列											
		F1	L1	F2	L2	F3	L3	F4	L4	F5	L5	F6	L6
71352	ctGGTGGGCGGCTGATCGGga (55)	SSGHLT (102)	0f	DRSLTL (128)	0c	TSGHLR (103)	0f	DRSLTL (123)	1c	RSALSR (104)	0f	TGSLR (103)	C1
71357	cgAGGATGGTGGGCGGGGCGga (56)	TSGHLR (103)	0f	DRSLTL (123)	0c	1ARHLLT (92)	0f	RFTLSL (124)	0c	DWMLSQ (181)	0f	RSNLT (160)	C1
71364	tgGTGGCGGAGCTGTGGGTg (57)	1ARHLLT (92)	0f	RFTLSL (124)	0c	RSVLSS (155)	0f	KSTRTV (170)	0c	RSVLSS (162)	0f	HSAIRV (190)	C1
71366	ttGGGTGGCGGAGCTGGGGGCGga (58)	RSALSR (104)	0f	TSGHLR (103)	0c	QSGLSR (105)	0f	QSGLSR (98)	0c	ERGLTL (90)	0f	TGSLTL (135)	C1
71370	ctGCTGTGTGTGGCGGAGTg (59)	QSGLSR (105)	0f	QSGLSR (98)	0c	ERGLTL (90)	0f	TGSLTL (135)	0c	TGSLR (107)	0f	HSSDLR (137)	C1
71373	gcGCTGTGTGTGGGCGGGGCGga (60)	QSGLTL (106)	0f	CPKRCV (134)	0c	1ARHLLT (92)	0f	HSAIRV (136)	0c	QSGLSR (105)	0f	HSTRTV (173)	C1
71374	gcGGCGTGTCTGTGTGGCGg (61)	ERGLTL (90)	0f	TGSLTL (135)	0c	TGSLSR (107)	0f	HSSDLR (137)	0c	QSGLSR (105)	0f	DRSLTL (123)	C1
71377	gcAGGGCGGAGCTGTGTGTGTg (62)	1ARHLLT (92)	0f	HSAIRV (136)	0c	QSGLSR (105)	0f	HSTRTV (173)	0c	DRSLTL (109)	0f	NSNRLT (191)	C1
71378	ggTGGCAAGCGGCTGTGTGTg (63)	TGSLSR (107)	0f	HSSDLR (137)	0c	QSGLSR (105)	0f	DRSLTL (123)	1c	RSVLST (163)	0f	FBSLSL (192)	C1
71385	agAAGGTGGCGGCTGACGCGga (64)	RSGLSR (108)	0f	QSATRT (138)	0c	RSVLSS (162)	0f	RSGLSL (174)	1c	RSGLSL (163)	0f	RWNKRT (175)	C1
71388	cgCGCAAGCTGGCGGTGGCGg (65)	DRSLTL (109)	0f	1ARHLLT (139)	1c	RSALSR (104)	0f	TSGHLR (103)	0c	QSGLTL (111)	0f	QSGLTL (137)	C1
71391	ggCGCGAAGAGCTGGCGGTGg (66)	1ARHLLT (92)	0f	MACVRA (140)	1c	RSGLSL (163)	0f	RWNKRT (175)	0c	RSVLST (158)	0f	RSNRT (171)	C1
71383	gtGGGGGCGGAGGTGGGCGg (67)	RSALSR (104)	0f	TSGHLR (103)	0c	QSGLTL (111)	0f	QSGLTL (119)	1c	DRSLSR (112)	0f	DRSLTL (123)	C1
71395	gtGTTGGCGGCGGAGGAGGg (68)	RSGLST (110)	0f	QNAHRT (141)	0c	DRSLSR (112)	0f	DRSLTL (123)	0c	DRSLTL (109)	0f	1ARHLLT (139)	C1
71387	gcGTGTGGCGGCTGCACAGg (69)	QSGLTL (111)	0f	QSGLTL (119)	1c	DRSLSR (112)	0f	DRSLTL (123)	0c	1ARHLLT (92)	0f	HQKRDH (142)	C1
71398	gtGGCTGTGTGTGGCGGGGCGga (70)	DRSLSR (112)	0f	DRSLTL (123)	0c	DRSLTL (109)	0f	1ARHLLT (139)	0c	NSCRSL (164)	0f	DSHRT (101)	C1
71389	ggTGGCTGTGTGGCGGGCGCGg (71)	DRSLTL (112)	0f	DRSLTL (123)	0c	DRSLTL (109)	0f	1ARHLLT (139)	1c	RSVLSS (155)	0f	RWNKRT (193)	C1
71400	aaGGGTGTGTGTGGCGGGGCGg (72)	DRSLSR (112)	0f	DRSLTL (123)	0c	1ARHLLT (92)	0f	HQKRDH (142)	0c	DRSLTL (109)	0f	1ARHLLT (139)	C1

FIG. 14 続き

【図 16-3】

ZFP ID	標的配列 (大文字)	各フィンガー内のDNA認識ヘルックス/アミノ酸配列											
		F1	L1	F2	L2	F3	L3	F4	L4	F5	L5	F6	L6
71401	gaGAGGTGCTGTGGTGGGcg (73)	DRSHLTR	0f	LQHLTR	0c	MRSGRSA	0f	DSRHTR	0c	TSQHSLR	0f	QSGNLAR	0f
71402	gaGAGAGATGCTGTGGTggy (74)	LRLHLTR	0f	HKYHRDA	0c	DRSHLTR	0f	LQHLTR	0c	QSGNLAR	0f	QSGHSLR	0f
71414	ggGAGGGGgAGGACGCGHgg (75)	DGHLAR	0f	SPQCRVH	0c	DRSLNR	0f	TSANLSR	1c	RGHSLR	0f	DRSLNR	0f
71420	gaGGGAGGAGGAGGAGGAGca (76)	QSGHLAR	0f	QLTHLMS	0c	RGHSLR	0f	DRSLNR	0c	RSANLAR	0f	DRHSLAR	0f
71421	ccTGTGTCTATCATCaggt (77)	RSNMLSE	0f	TSNHRKT	0c	DRSLNR	0f	DSSARNT	0a	RNDGRTR	0f	0f	0f
71424	ctGTGACTACTGagTAAGGgc (78)	RSNHLTR	0f	QSANLTR	1c	RSNMLSE	0f	TSNHRKT	0c	DRSLNR	0f	DSSARNT	0f
71437	ggtTAAGTCGCGGCGcTCGGHatt (79)	QSGHLAR	0f	DSSGRHK	1c	RSNMLSE	0f	RNDGRTR	0f	RGADLTR	0f	QSANLTR	0f
71447	cgSAGCGCGGAGCGAGHtTt (80)	TSNMLTR	0f	QQWTLTM	0c	RSNMLTR	0a	DRSHLTR	0f	DRNMLTR	0f	0f	0f
71448	agCGGAGGCGGAGGCGAGTt	TSNMLTR	0f	QQWTLTM	0c	RSNMLAR	0f	DRSHLAR	0c	DRNMLTR	0f	DAFTRTR	0f
71453	gtGCACAGCGGAGCGGCGGgc (82)	RSNMLAR	0f	DRSHLAR	1c	DRSHLTR	0f	DRSHLAR	1c	RSNMLSE	0f	QWATRTX	0f
71459	ggGGCGCGGCGCGAGGGGTGca (83)	RSNLSLA	0f	RSNHLTR	0c	QSGDLTR	0f	TQGLVLR	0c	DRSHSLR	0f	DRHSLAR	0f
71468	gcGAGGGGGGCGCGCGCAGgggt (84)	RSNLSLK	0f	QWATRTX	0c	DRSHSLR	0f	DRSHLAR	1c	RGHSLR	0f	TSANLSR	0f
71470	ggGGCGAgggGGCGGCGGChgg (85)	QSGDLTR	0f	TQGLVLR	0c	DRSHSLR	0f	DRSHLAR	1c	RSNMLAR	0f	DRHSLAR	0f
71472	ggGAGGCGGAGGGCGGCGGgc (86)	DRSHSLR	0f	DRSHLAR	0c	RGHSLR	0f	TSANLSR	0f	DSRHTRT	0f	QWATRTX	0f
71485	gcCGCGGCGCTGTGCGGGGcc (87)	RSNLSLN	0f	RSNDRHK	0c	RSNLSLT	0f	TSNMLTR	0f	RSNHLAR	0f	DRSLNR	0f
71503	gcCAGGGCGGCTGGAAGGga (88)	RSNLSLN	0f	TSSSRLN	0c	RSNLSLV	0f	DSRHTRT	0f	DSRHTRT	0f	AKWNLAR	0f

FIG. 14 続き

【図 17-1】

ZFP ID	アミノ酸配列 (ヘキサース,  デモンランタンカラー)
5268 (197)	MAPEKKRKYVPAAMARPPQRCIRNMVFS RSADLT LRHTRHTGKFFACDIOGRKFA QSGDLTR KTHTGSGKPPQRCIRNMVFS RSDLSE LRHTGKFFACDIOGRKFA RSASLR KTWHLKSLDAAAGSGDAKSLTAMSKLVTFKDFVDFTEBEKKLLDTAQIYVNMVLEKNVLSGLQTLTFPVILRLKEGEPWLVREIHQHTHPTGSAFEIKSSVRS
5269 (198)	MAPEKKRKYVPAAMARPPQRCIRNMVFS ESGTLAR LRHTRHTGKFFACDIOGRKFA TSANISLR KTHTHRAPIKFPQRCIRNMVFS TSQDLR KTHTHTGKFFACDIOGRKFA KTSLTSL HTHTGSGKPPQRCIRNMVFS RSLSLLR LRHTGKFFACDIOGRKFA HPSAKRRK HTIHLRQALARGSGDAKSLTAMSKLVTFKDFVDFTEBEKKLLDTAQIYVNMVLEKNVLSGLQTLTFPVILRLKEGEPWLVREIHQHTHPTGSAFEIKSSVRS
5264 (199)	MAPEKKRKYVPAAMARPPQRCIRNMVFS RSDLNLR LRHTRHTGKFFACDIOGRKFA DRSHLAR LRKTHTGSGKPPQRCIRNMVFS QSNLNL LRHTGKFFACDIOGRKFA QSNTR IKHTWHLKSLDAAAGSGDAKSLTAMSKLVTFKDFVDFTEBEKKLLDTAQIYVNMVLEKNVLSGLQTLTFPVILRLKEGEPWLVREIHQHTHPTGSAFEIKSSVRS
5780 (200)	MAPEKKRKYVPAAMARPPQRCIRNMVFS LRHLHTR LRHTRHTGKFFACDIOGRKFA RFRTLSK KTHTGSGKPPQRCIRNMVFS RSDLSE LRHTGKFFACDIOGRKFA KSTSVTR KTHTGSGKPPQRCIRNMVFS RSDLSE LRHTGKFFACDIOGRKFA FLTHLK KTWHLKSLDAAAGSGDAKSLTAMSKLVTFKDFVDFTEBEKKLLDTAQIYVNMVLEKNVLSGLQTLTFPVILRLKEGEPWLVREIHQHTHPTGSAFEIKSSVRS
7124 (201)	MAPEKKRKYVPAAMARPPQRCIRNMVFS RSDLKLR LRHTRHTGKFFACDIOGRKFA QGNILAR LRHTGKFFACDIOGRKFA KDRIK KTHTGSGKPPQRCIRNMVFS RSDLISLR LRHTGKFFACDIOGRKFA DRDRTG KTWHLKSLDAAAGSGDAKSLTAMSKLVTFKDFVDFTEBEKKLLDTAQIYVNMVLEKNVLSGLQTLTFPVILRLKEGEPWLVREIHQHTHPTGSAFEIKSSVRS

FIG. 15

【図 17-2】

71218 (202)	MAPKKKKVGVPAAMAFPPQRCIMGNFS RSDSLKR IRHRTHTGKFPACIDGKFFA DSRSTRT KTHITGSKQFPCIRCMNFS SRQ/RTT IR THITGKFPACIDGKFFA RSDSLKR THITGSKQFPPQRCIMGNF QDNLIR IRHRTHTGKFPACIDGKFFA RSDLKR IRTHILRQDAAFGS GDAKSLTAWGRTLVTFKDVVDFTEEMKLITAAQIVYVNNVLENYKLVSLGVLQKPDVILRKGEGEFLVERIEIQTHTPOSETAFIKSS VRS
71225 (203)	MAPKKKKVGVPAAMAFPPQRCIMGNFS RSDDLTH IRHRTHTGKFPACIDGKFFA MSGFL IRHITGSKQFPCIRCMNFS QAHSLT IR THITGKFPACIDGKFFA RSDDLTH IRHITGSKQFPPQRCIMGNF QSDSLIR IRHRTHTGKFPACIDGKFFA ADSLIR IRTHILRQDAAFGS GDAKSLTAWGRTLVTFKDVVDFTEEMKLITAAQIVYVNNVLENYKLVSLGVLQKPDVILRKGEGEFLVERIEIQTHTPOSETAFIKSS VRS
71227 (204)	MAPKKKKVGVPAAMAFPPQRCIMGNFS QAHSLT IRHRTHTGKFPACIDGKFFA DSRLNLT IRHITGSKQFPCIRCMNFS QSDSLIR IR THITGKFPACIDGKFFA QDLSHILR IRHITGSKQFPPQRCIMGNF TDYGRIT IRHRTHTGKFPACIDGKFFA ADSLIR IRTHILRQDAAFGS GDAKSLTAWGRTLVTFKDVVDFTEEMKLITAAQIVYVNNVLENYKLVSLGVLQKPDVILRKGEGEFLVERIEIQTHTPOSETAFIKSS VRS

FIG. 15 続き

【図 17-3】

[illegible]

FIG. 15 続き

【図 17-4】

71341 (210)	MAPKKKPPQVPAAMARPPQPCIMNMFSDSSGLTWTHTGKFFACDIOCKRKFQDSHLHRTKWTGSCWKPFCQKCHKFAFASNLTRHTK ITGKGGPACIOCKRFPADSNLTHTKHTGKFFACDIOCKRKFQDSHLHRTKWTGSCWKPFCQKCHKFAFASNLTRHTK KILDTAQQTIVYNNMLENYKILSVLSQGLTQFVILILEKGEKPEWLVERIHQTHPDSFETAFKISSVS
71343 (211)	MAPKKKPPQVPAAMARPPQPCIMNMFSDSSHTKWTHTGKFFACDIOCKRKFQMWYLSHRTKWTGSCWKPFCQKCHKFAFASNLTRHTK ITGKGGPACIOCKRFPADSNLTHTKHTGKFFACDIOCKRKFQDSHLHRTKWTGSCWKPFCQKCHKFAFASNLTRHTK GDASLSTAMGRITVKFQVFDTRERKILDTAQQTIVYNNMLENYKILSVLSQGLTQFVILILEKGEKPEWLVERIHQTHPDSFETAFKISSVS
71345 (212)	MAPKKKPPQVPAAMARPPQPCIMNMFSDSSHTKWTHTGKFFACDIOCKRKFQMWYLSHRTKWTGSCWKPFCQKCHKFAFASNLTRHTK ITGKGGPACIOCKRFPADSNLTHTKHTHPAPFPQFCQKCHKFAFASNLDSLSEHTHTGKFFACDIOCKRKFQMWYKRNKILHJAGDA AGSSGGDASLSTAMGRITVKFQVFDTRERKILDTAQQTIVYNNMLENYKILSVLSQGLTQFVILILEKGEKPEWLVERIHQTHPDSFETAFKISSVS

FIG. 15 続き

10

【図 17-5】

[illegible]

FIG. 15 続き

【圖 17-6】

71368	MAKKKKRVVPMAMAEFPQCRICWNRFSR LSHRRIR THIEKGFACDCKRFA TGSHLSR IRIHTIGQMPYCIKCRKMR QSSDLSR IR THIEKGFACDCKRFA QSSGSLR IRTHIEKGFQFFPFCIR EGOTLAR IRTHIEKGFACDCKRFA TGSGSLR IRTHIEKGLAKRGRS GGDARSLTAMSRITVFKDVFDPTRBEKLLIQTQVYRNVMNKLVMYLSQVLTQFVILERGESEPNWIR:HQETHPDSATFATKSS
71370	MAKKKKRVVPMAMAEFPQCRICWNR QSSDLSR IRTHIEKGFACDCKRFA QSSGSLR IRIHTIGQMPYCIKCRKMR EGOTLAR IR THIEKGFACDCKRFA TGSGSLR IRTHIEKGFQFFPFCIR EGOTLAR IRTHIEKGFACDCKRFA SSDLSR IRTHIEKGLAKRGRS GGDARSLTAMSRITVFKDVFDPTRBEKLLIQTQVYRNVMNKLVMYLSQVLTQFVILERGESEPNWIR:HQETHPDSATFATKSS

FIG. 15 続き

20

【圖 17-7】

ZFP ID	イ/エ/短編リ(ハリスス、	リサナ	ドメイン関リナ
71373 (226)	MAPKKRKVGVPAAARPPQICRMNFSSQSHLRIRIRITGKFPFACICGRFAPCPCKRNTKITGSGFFQPCICRMNFRSLHTRIRIRITGKFPFACICGRFASRASKRIRITGSGFFQPCICRMNFRSSQLDSLRIRIRITGSGFFQPCICGRFHSTNRIRIRIRLHGAFAAGSGDASKTANSTLITKVFQVFDRETNKLITAQIIVRWNNLHNLVSLGQLITFVILILKGEQEPWLYVERIRHTPDSOTAFELSSVRS		
71374 (231)	MAPKKRKVGVPAAARPPQICRMNFSSERGLRIRIRITGKFPFACICGRFATSGSLTRITKITGSGFFQPCICRMNFRTSGSLSRIRIRITGKFPFACICGRFASSSDLRIRITGSGFFQPCICRMNFRSSQLDSLRIRIRITGSGFFQPCICGRFHSLNRIRIRIRLHGAFAAGSGDASKTANSTLITKVFQVFDRETNKLITAQIIVRWNNLHNLVSLGQLITFVILILKGEQEPWLYVERIRHTPDSOTAFELSSVRS		
71375 (232)	MAPKKRKVGVPAAARPPQICRMNFSSRLHTRIRIRITGKFPFACICGRFAPSRASKRNTKITGSGFFQPCICRMNFRSSQLDSLRIRIRITGKFPFACICGRFASRHNTRIRITGSGFFQPCICRMNFRSSQLDSLRIRIRITGSGFFQPCICGRFASNLNIRIRIRLHGAFAAGSGDASKTANSTLITKVFQVFDRETNKLITAQIIVRWNNLHNLVSLGQLITFVILILKGEQEPWLYVERIRHTPDSOTAFELSSVRS		
71378 (237)	MAPKKRKVGVPAAARPPQICRMNFSSGSLSRIRIRITGKFPFACICGRFASSSDLRNTKITGSGFFQPCICRMNFRSSQLDSLRIRIRITGKFPFACICGRFASRSLRIRIRITGFPFIPFFQPCICRIRIRISDNLSTIRIRITGSGFFQPCICRIRIRFASCLSLIRIRIRLHGAFAAGSGDASKTANSTLITKVFQVFDRETNKLITAQIIVRWNNLHNLVSLGQLITFVILILKGEQEPWLYVERIRHTPDSOTAFELSSVRS		
71385 (244)	MAPKKRKVGVPAAARPPQICRMNFSSDLSLIRIRITGKFPFACICGRFASQATKTKITKITGSGFFQPCICRMNFRSDVLSKIRIRITGKFPFACICGRFASDRLRIRIRITGFPFIPFFQPCICRIRIRIRGCLSLIRIRITGSGFFQPCICRIRIRNDNRNTIRIRIRLHGAFAAGSGDASKTANSTLITKVFQVFDRETNKLITAQIIVRWNNLHNLVSLGQLITFVILILKGEQEPWLYVERIRHTPDSOTAFELSSVRS		

FIG. 15 続き

【図 17-8】

[illegible]

FIG. 15 続き

30

40

50

【図 18-1】

ZP ID	標的配列 (大文字)	各フィンガー内のDNA認識-リッスアミノ酸配列											
		F1	L1	F2	L2	F3	L3	F4	L4	F5	L5	F6	L6
69818	cgCGCAGAGTGGcGCGGGg (249)	*DSHLTR (250)	0c	LAHLTR (139)	1c	RSASLR (104)	0c	*SGHLR (103)	0c	*QSNLR (262)	0c	*QSGLTR (119)	0c
73015	gcAGCGGGCGTCTGCTTGGTg (62)	*LAHLTR (251)	0c	HSASRR (136)	0c	*QSGLSR (105)	0c	*RSTNR (173)	0c	*DSHLTR (109)	0c	*NSRLNR (191)	0c
73016	gcAGCGGGCGTCTGCTTGGTg (62)	LAHLTR (92)	0c	HSASRR (136)	0c	*QSGLSR (257)	0c	*RSTNR (173)	0c	*DSHLTR (109)	0c	*NSRLNR (191)	0c
73017	gcAGCGGGCGTCTGCTTGGTg (62)	LAHLTR (92)	0c	HSASRR (136)	0c	*QSGLSR (105)	0c	*RSTNR (173)	0c	*DSHLTR (250)	0c	*NSRLNR (191)	0c
73018	gcAGCGGGCGTCTGCTTGGTg (62)	*LAHLTR (251)	0c	HSASRR (136)	0c	*QSGLSR (257)	0c	*RSTNR (173)	0c	*DSHLTR (109)	0c	*NSRLNR (191)	0c
73019	gcAGCGGGCGTCTGCTTGGTg (62)	*LAHLTR (251)	0c	HSASRR (136)	0c	*QSGLSR (105)	0c	*RSTNR (173)	0c	*DSHLTR (250)	0c	*NSRLNR (191)	0c
73020	gcAGCGGGCGTCTGCTTGGTg (62)	LAHLTR (92)	0c	HSASRR (136)	0c	*QSGLSR (257)	0c	*RSTNR (173)	0c	*DSHLTR (250)	0c	*NSRLNR (191)	0c
73021	gcAGCGGGCGTCTGCTTGGTg (62)	*LAHLTR (251)	0c	HSASRR (136)	0c	*QSGLSR (257)	0c	*RSTNR (173)	0c	*DSHLTR (250)	0c	*NSRLNR (191)	0c
73029	agAAGGTgGCGGTGGCAGCGg (64)	*RSDLSR (252)	0c	QSATRY (139)	0c	RSVLSR (162)	0c	*RSDIRX (174)	1c	*RQDLSL (162)	0c	*RNDKRT (175)	0c
73030	agAAGGTgGCGGTGGCAGCGg (64)	RSDLSR (108)	0c	QSATRY (139)	0c	*RSDVLS (258)	0c	*RSDIRX (174)	1c	*RQDLSL (162)	0c	*RNDKRT (175)	0c
73031	agAAGGTgGCGGTGGCAGCGg (64)	RSDLSR (108)	0c	QSATRY (139)	0c	RSVLSR (162)	0c	*RSDIRX (174)	1c	*RQDLSL (263)	0c	*RNDKRT (175)	0c
73032	agAAGGTgGCGGTGGCAGCGg (64)	*RSDLSR (252)	0c	QSATRY (139)	0c	*RSDVLS (258)	0c	*RSDIRX (174)	1c	*RQDLSL (162)	0c	*RNDKRT (175)	0c
73034	agAAGGTgGCGGTGGCAGCGg (64)	RSDLSR (108)	0c	QSATRY (139)	0c	*RSDVLS (258)	0c	*RSDIRX (174)	1c	*RQDLSL (263)	0c	*RNDKRT (175)	0c
73035	agAAGGTgGCGGTGGCAGCGg (64)	*RSDLSR (252)	0c	QSATRY (139)	0c	*RSDVLS (258)	0c	*RSDIRX (174)	1c	*RQDLSL (263)	0c	*RNDKRT (175)	0c
73120	ccTCTGTGCATATCGTg (171)	*RSDVLS (253)	0c	TSNRKT (145)	0c	*DSHLTR (161)	0c	*DSASRT (176)	0a	*RSDIRX (184)	0c		0c
73121	ccTCTGTGCATATCGTg (171)	RSDVLS (113)	0c	TSNRKT (145)	0c	*DSHLTR (259)	0c	*DSASRT (176)	0a	*RSDIRX (184)	0c		0c
73122	ccTCTGTGCATATCGTg (171)	RSDVLS (113)	0c	TSNRKT (145)	0c	*DSHLTR (161)	0c	*DSASRT (176)	0a	*RSDIRX (264)	0c		0c
73123	ccTCTGTGCATATCGTg (171)	*RSDVLS (253)	0c	TSNRKT (145)	0c	*DSHLTR (259)	0c	*DSASRT (176)	0a	*RSDIRX (184)	0c		0c

FIG. 16

【図 18-2】

ZFP ID	標的配列 (大文字)	F1	L1	F2	L2	F3	L3	F4	L4	F5	L5	F6	L6
73124	ccTCTGTGGACATCAgT (17)	*RSDWLS	0c	*TSNRKT	0c	*DSWLSR	0c	*RSNRKT	0a	*RNSRTR		C1k	
73125	ccTCTGTGGACATCAgT (17)	RSDWLS	0c	*TSNRKT	0c	*DSWLSR	0c	*RSNRKT	0a	*RNSRTR		C1k	
73126	ccTCTGTGGACATCAgT (17)	*RSDWLS	0c	*TSNRKT	0c	*DSWLSR	0c	*RSNRKT	0a	*RNSRTR		C1k	
73127	ctGTGACATCAcGgTAAAGCcc (78)	*RSADLT	0c	*QSNRTR	1c	*RSDWLS	0c	*TSNRKT	0c	*DSWLSR	0c	*DSASRT	C1k
73128	ctGTGACATCAcGgTAAAGCcc (78)	RADLT	0c	*QSNRTR	1c	*RSDWLS	0c	*TSNRKT	0c	*DSWLSR	0c	*DSASRT	C1k
73129	ctGTGACATCAcGgTAAAGCcc (78)	*RSADLT	0c	*QSNRTR	1c	*RSDWLS	0c	*TSNRKT	0c	*DSWLSR	0c	*DSASRT	C1k
73130	ctGTGACATCAcGgTAAAGCcc (78)	RADLT	0c	*QSNRTR	1c	*RSDWLS	0c	*TSNRKT	0c	*DSWLSR	0c	*DSASRT	C1k
73131	ctGTGACATCAcGgTAAAGCcc (78)	*RSADLT	0c	*QSNRTR	1c	*RSDWLS	0c	*TSNRKT	0c	*DSWLSR	0c	*DSASRT	C1k
73132	ctGTGACATCAcGgTAAAGCcc (78)	RADLT	0c	*QSNRTR	1c	*RSDWLS	0c	*TSNRKT	0c	*DSWLSR	0c	*DSASRT	C1k
73133	gcGCCGGCAGCGGTGGGGcc (87)	*RSDHLS	0c	*RSDGRK	0c	*RSDHLS	0c	*TSNRKT	0c	*RSHLSR	0c	*RDSLSR	C1k
73134	gcGCCGGCAGCGGTGGGGcc (87)	RSDHLS	0c	*RSDGRK	0c	*RSDHLS	0c	*TSNRKT	0c	*RSHLSR	0c	*RDSLSR	C1k
73135	gcGCCGGCAGCGGTGGGGcc (87)	*RSDHLS	0c	*RSDGRK	0c	*RSDHLS	0c	*TSNRKT	0c	*RSHLSR	0c	*RDSLSR	C1k
73136	gcGCCGGCAGCGGTGGGGcc (87)	RSDHLS	0c	*RSDGRK	0c	*RSDHLS	0c	*TSNRKT	0c	*RSHLSR	0c	*RDSLSR	C1k
73137	gcGCCGGCAGCGGTGGGGcc (87)	*RSDHLS	0c	*RSDGRK	0c	*RSDHLS	0c	*TSNRKT	0c	*RSHLSR	0c	*RDSLSR	C1k
73138	gcGCCGGCAGCGGTGGGGcc (87)	RSDHLS	0c	*RSDGRK	0c	*RSDHLS	0c	*TSNRKT	0c	*RSHLSR	0c	*RDSLSR	C1k
73139	gcGCCGGCAGCGGTGGGGcc (87)	*RSDHLS	0c	*RSDGRK	0c	*RSDHLS	0c	*TSNRKT	0c	*RSHLSR	0c	*RDSLSR	C1k
73140	gcGCCGGCAGCGGTGGGGcc (87)	RSDHLS	0c	*RSDGRK	0c	*RSDHLS	0c	*TSNRKT	0c	*RSHLSR	0c	*RDSLSR	C1k
73141	gcGCCGGCAGCGGTGGGGcc (87)	*RSDHLS	0c	*RSDGRK	0c	*RSDHLS	0c	*TSNRKT	0c	*RSHLSR	0c	*RDSLSR	C1k
73142	gcGCCGGCAGCGGTGGGGcc (87)	RSDHLS	0c	*RSDGRK	0c	*RSDHLS	0c	*TSNRKT	0c	*RSHLSR	0c	*RDSLSR	C1k
73143	gcGCCGGCAGCGGTGGGGcc (87)	*RSDHLS	0c	*RSDGRK	0c	*RSDHLS	0c	*TSNRKT	0c	*RSHLSR	0c	*RDSLSR	C1k
73144	gcGCCGGCAGCGGTGGGGcc (87)	RSDHLS	0c	*RSDGRK	0c	*RSDHLS	0c	*TSNRKT	0c	*RSHLSR	0c	*RDSLSR	C1k
73145	gcGCCGGCAGCGGTGGGGcc (87)	*RSDHLS	0c	*RSDGRK	0c	*RSDHLS	0c	*TSNRKT	0c	*RSHLSR	0c	*RDSLSR	C1k
73146	gcGCCGGCAGCGGTGGGGcc (87)	RSDHLS	0c	*RSDGRK	0c	*RSDHLS	0c	*TSNRKT	0c	*RSHLSR	0c	*RDSLSR	C1k
73147	gcCAGGGCGCGCTGGAAGGga (88)	*RSDWLS	0c	*TSNRKT	0c	*RSDWLS	0c	*DSNRTR	0c	*DSNRTR	0c	*AKNOLA	C1k
73148	gcCAGGGCGCGCTGGAAGGga (88)	RSDWLS	0c	*TSNRKT	0c	*RSDWLS	0c	*DSNRTR	0c	*DSNRTR	0c	*AKNOLA	C1k

FIG. 16 続き

【図 18-3】

ZFP ID	標的配列 (大文字)	各フィンガー内のDNA認識ヘリックスアミノ酸配列											
		F1	L1	F2	L2	F3	L3	F4	L4	F5	L5	F6	L6
73189	gcCAGGGCGGGCTGGAAAGGga (88)	*RSDLSLN (121)	0f	*TSSSRIN (153)	0c	*RSDLSLV (167)	0f	*DSHSRTR (101)	0c	*DSSSRTR (266)	0f	*AKNLDL (196)	C1
73200	gcCAGGGCGGGCTGGAAAGGga (88)	*RSDLSLN (256)	0f	*TSSSRIN (153)	0c	*RSDLSLV (261)	0f	*DSHSRTR (101)	0c	*DSSSRTR (101)	0f	*AKNLDL (196)	C1
73201	gcCAGGGCGGGCTGGAAAGGga (88)	*RSDLSLN (256)	0f	*TSSSRIN (153)	0c	*RSDLSLV (167)	0f	*DSHSRTR (101)	0c	*DSSSRTR (266)	0f	*AKNLDL (196)	C1
73202	gcCAGGGCGGGCTGGAAAGGga (88)	*RSDLSLN (121)	0f	*TSSSRIN (153)	0c	*RSDLSLV (261)	0f	*DSHSRTR (101)	0c	*DSSSRTR (266)	0f	*AKNLDL (196)	C1
73203	gcCAGGGCGGGCTGGAAAGGga (88)	*RSDLSLN (256)	0f	*TSSSRIN (153)	0c	*RSDLSLV (261)	0f	*DSHSRTR (101)	0c	*DSSSRTR (266)	0f	*AKNLDL (196)	C1

FIG. 16 続き

【図 19 - 1】

[illegible]

FIG. 17

【図 19-8】

73191 (294)	MAPKKRKVGVFAAMARFPQCRHWNFT RD SLHSLIRTHIGKTFACDGGKGFASDRDRAKTRIGTGSQKFFQCRHNF RD SLHSLIRTHIGTGGEGEATGAC TS MSMTIRITGTSQFFQCR TS SAISLSESGQLTFFPVILKESGFWLVEIKITGTFDQETATEISLTAAGSSGSDAKLTAKNSLTITFQVDFVTSBEMLLQVIAQVNWLENKYNVSGSGLTFFPVILKESGFWLVEIKITGTFDQETATEISLTAAGSSGSD
73192 (295)	MAPKKRKVGVFAAMARFPQCRHWNFT RD SLHSLIRTHIGKTFACDGGKGFASDRDRAKTRIGTGSQKFFQCRHNF RD SLHSLIRTHIGTGGEGEATGAC TS MSMTIRITGTSQFFQCR TS SAISLSESGQLTFFPVILKESGFWLVEIKITGTFDQETATEISLTAAGSSGSDAKLTAKNSLTITFQVDFVTSBEMLLQVIAQVNWLENKYNVSGSGLTFFPVILKESGFWLVEIKITGTFDQETATEISLTAAGSSGSD

FIG. 17 続き

【圖 19-9】

ZFP ID	アミ/配列 (ハテナミス)	R(4)Q (リクワ)	ドメイン(ジャンカ)
73193 (256)	MAPKKKKVYPPAAMAPFCQIRNQIFSSDLSLNIHTHTGKFFACDIGKRFASDDKKHKTGTSQKFFQCRINQIFSSDLSLHITHT HTGKFFACDIGKRFASDLSLHITHTGTSQKFFQCRINQIFSSDLSLHITHTGKFFACDIGKRFASDLSLHITHTHLOKAAAGSGG DKSLTANSRTLVFKQVVDITSEKMLDTAQIYVNMWMLNVLSQLTQFVFLIRLKEGGEPLVRSIHGTPOSETAFETKYSVS		
73194 (257)	MAPKKKKVYPPAAMAPFCQIRNQIFSSDLSLNIHTHTGKFFACDIGKRFASDDKKHKTGTSQKFFQCRINQIFSSDLSLHITHT HTGKFFACDIGKRFASDLSLHITHTGTSQKFFQCRINQIFSSDLSLHITHTGKFFACDIGKRFASDLSLHITHTHLOKAAAGSGG DKSLTANSRTLVFKQVVDITSEKMLDTAQIYVNMWMLNVLSQLTQFVFLIRLKEGGEPLVRSIHGTPOSETAFETKYSVS		
73195 (258)	MAPKKKKVYPPAAMAPFCQIRNQIFSSDLSLNIHTHTGKFFACDIGKRFASDDKKHKTGTSQKFFQCRINQIFSSDLSLHITHT HTGKFFACDIGKRFASDLSLHITHTGTSQKFFQCRINQIFSSDLSLHITHTGKFFACDIGKRFASDLSLHITHTHLOKAAAGSGG DKSLTANSRTLVFKQVVDITSEKMLDTAQIYVNMWMLNVLSQLTQFVFLIRLKEGGEPLVRSIHGTPOSETAFETKYSVS		
73196 (259)	MAPKKKKVYPPAAMAPFCQIRNQIFSSDLSLNIHTHTGKFFACDIGKRFASDDKKHKTGTSQKFFQCRINQIFSSDLSLHITHT HTGKFFACDIGKRFASDLSLHITHTGTSQKFFQCRINQIFSSDLSLHITHTGKFFACDIGKRFASDLSLHITHTHLOKAAAGSGG DKSLTANSRTLVFKQVVDITSEKMLDTAQIYVNMWMLNVLSQLTQFVFLIRLKEGGEPLVRSIHGTPOSETAFETKYSVS		
73197 (300)	MAPKKKKVYPPAAMAPFCQIRNQIFSSDLSLNIHTHTGKFFACDIGKRFASDDKKHKTGTSQKFFQCRINQIFSSDLSLHITHT HTGKFFACDIGKRFASDLSLHITHTGTSQKFFQCRINQIFSSDLSLHITHTGKFFACDIGKRFASDLSLHITHTHLOKAAAGSGG DKSLTANSRTLVFKQVVDITSEKMLDTAQIYVNMWMLNVLSQLTQFVFLIRLKEGGEPLVRSIHGTPOSETAFETKYSVS		

FIG. 17 続き

10

【図 19 - 10】

7196 (301)	MAPKKKKRVGPPAAMERFPQICRMHNSRSDLNLSIRITHTGKFFACDGRKATTSSSRIHFKITHTGSKFFVCYRCQQNRRSDLASVHIRT HTEGKFFACDGRKATDSSSRHTHTHTHTGSKFFVCYRCQQDSSSRHTHTHTGKFFACDGRKATADDLAAMHTHTLQARASSSG DAKSLTWSGLTFFKQVPTFKEENKLLDQCYIVNWMENYVNLISGQYTHPTFVILKEGPEWLVREIHQETPSTETAITSYSSVS
7199 (302)	MAPKKKKRVGPPAAMERFPQICRMHNSRSDLNLSIRITHTGKFFACDGRKATTSSSRIHFKITHTGSKFFVCYRCQQNRRSDLASVHIRT HTEGKFFACDGRKATDSSSRHTHTHTGSKFFVCYRCQQDSSSRHTHTHTGKFFACDGRKATADDLAAMHTHTLQARASSSG DAKSLTWSGLTFFKQVPTFKEENKLLDQCYIVNWMENYVNLISGQYTHPTFVILKEGPEWLVREIHQETPSTETAITSYSSVS

FIG. 17 続き

【図 19 - 11】

[illegible]

FIG. 17 続き

20

【図 19-12】

[illegible]

FIG. 17 続き

【配列表】

2023511908000001.app

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/014780

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/47 A61P25/28 ADD.		
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) C07K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018/153921 A1 (LEDEBOER ANNMARIE [US] ET AL) 7 June 2018 (2018-06-07)	1,5,6, 10-27
Y	par.14-17, 31, 125, 184, 185, Tbl.1, 2, par.24, 35, 147, 148, 166	7-9
X	ZEITLER BRYAN J. ET AL: "Sustained Tau Reduction via Zinc Finger Protein Transcription Factors as a Potential Next-Generation Therapy for Alzheimer's Disease and Other Tauopathies", ASGCT 20TH ANNUAL MEETING, 10 May 2017 (2017-05-10), XP055800066, Retrieved from the Internet: URL:https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/4399/presentation/1333> [retrieved on 2021-04-03]	1-5, 10-15, 17,23-27
Y	abstract	7-9
----- -/--		
☒ 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 "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 30 April 2021		Date of mailing of the international search report 08/07/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bonello, Steve

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/014780

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2017/011556 A1 (MASSACHUSETTS GEN HOSPITAL [US]) 19 January 2017 (2017-01-19) Par.189	7-9
Y	----- MARIE-LAURE CAILLET-BOUDIN ET AL: "Regulation of human MAPT gene expression", MOLECULAR NEURODEGENERATION, BIOMED CENTRAL LTD, LO, vol. 10, no. 1, 14 July 2015 (2015-07-14), pages 1-14, XP021227997, ISSN: 1750-1326, DOI: 10.1186/S13024-015-0025-8 par.6 col.1 par.4 - p.7 col.2 par.2, p.4 Fig.2 -----	7-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/014780

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:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/014780

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.:
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:

see additional sheet

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 an 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

1-27(partially)

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.

International Application No. PCT/ US2021/ 014780

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-27(partially)

Directed towards a fusion protein comprising a zinc finger protein (ZFP) domain and a repressor domain, wherein the ZFP domain binds to a target region of a human microtubule-associated protein tau (MAPT) gene, wherein the fusion protein consists of SEQ ID NO. 197 (ZFP ID 52288, comprising finger domains identified by SEQ ID NO's 89 (F1), 119 (F2), 154 (F3) and 104 (F4); see Fig.14, 15)

2-91. claims: 1-27(partially)

Directed towards a fusion protein comprising a zinc finger protein (ZFP) domain and a repressor domain, wherein the ZFP domain binds to a target region of a human microtubule-associated protein tau (MAPT) gene, wherein the fusion protein consists of SEQ ID NO. 198 - 248, 267-307, respectively.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/014780

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2018153921	A1	07-06-2018	AU 2017367722 A1 30-05-2019
			BR 112019010014 A2 20-08-2019
			CA 3043635 A1 07-06-2018
			CN 110214184 A 06-09-2019
			EP 3548616 A1 09-10-2019
			JP 2020500526 A 16-01-2020
			KR 20190085529 A 18-07-2019
			RU 2019120040 A 11-01-2021
			US 2018153921 A1 07-06-2018
			WO 2018102665 A1 07-06-2018

WO 2017011556	A1	19-01-2017	US 2020079825 A1 12-03-2020
			WO 2017011556 A1 19-01-2017

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)

C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
C 0 7 K	14/435 (2006.01)	C 0 7 K	14/435
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12
C 1 2 N	5/073(2010.01)	C 1 2 N	5/073

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,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,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,N
G,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

弁理士 白江 雄介

(72)発明者 ザイトラー, ブライアン

アメリカ合衆国 9 4 0 0 5 カリフォルニア州ブリズベーン、マリーナ・ブルバード 7 0 0 0、サ
ンガモ・セラピューティクス・インコーポレイテッド内

(72)発明者 ハタミ, アサ

アメリカ合衆国 9 4 0 0 5 カリフォルニア州ブリズベーン、マリーナ・ブルバード 7 0 0 0、サ
ンガモ・セラピューティクス・インコーポレイテッド内

(72)発明者 ジャン, レイ

アメリカ合衆国 9 4 0 0 5 カリフォルニア州ブリズベーン、マリーナ・ブルバード 7 0 0 0、サ
ンガモ・セラピューティクス・インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01 AC14 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 CA53 DC50
MA55 MA65 MA66 NA14 ZA02 ZA15 ZA16
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA55 MA65 MA66 NA14 ZA02
ZA15 ZA16
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA55 MA65 MA66 NA14 ZA02 ZA15
ZA16
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA40 EA20 EA50 FA74