

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7706380号
(P7706380)

(45)発行日 令和7年7月11日(2025.7.11)

(24)登録日 令和7年7月3日(2025.7.3)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A
A 0 1 K 67/0275(2024.01)	A 0 1 K 67/0275
A 6 1 K 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/00
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68

請求項の数 28 (全92頁)

(21)出願番号	特願2021-576589(P2021-576589)	(73)特許権者	597160510 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. アメリカ合衆国10591-6707 ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード777番
(86)(22)出願日	令和2年6月26日(2020.6.26)	(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(65)公表番号	特表2022-539517(P2022-539517 A)	(74)代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(43)公表日	令和4年9月12日(2022.9.12)	(74)代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(86)国際出願番号	PCT/US2020/039877	(74)代理人	100181641
(87)国際公開番号	WO2020/264339		
(87)国際公開日	令和2年12月30日(2020.12.30)		
審査請求日	令和5年6月26日(2023.6.26)		
(31)優先権主張番号	62/867,785		
(32)優先日	令和1年6月27日(2019.6.27)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 TDP - 43タンパク症のモデル化

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

齧歯類細胞であって、

(i) 一方の染色体上の、内在性TARDBP遺伝子座での、変異型TDP - 43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子であって、

前記変異型TDP - 43ポリペプチドをコードする前記変異させたTARDBP遺伝子が内在性TARDBP遺伝子を置換し、

前記変異型TDP - 43ポリペプチドが、野生型TDP - 43ポリペプチドに見いだされる核局在化シグナル(NLS)、RNA認識モチーフ1(RRM1)、RNA認識モチーフ2(RRM2)、推定核外輸送シグナル(NES)、プリオン様ドメイン(PLD)

、またはそれらの組み合わせを含む機能的構造ドメインを欠き、且つ

前記齧歯類細胞が前記変異型TDP - 43ポリペプチドを発現する、

変異させたTARDBP遺伝子、および

(ii) 他方の相同染色体上の、前記内在性TARDBP遺伝子座での、条件付きノックアウト突然変異を含むTARDBP遺伝子であって、

前記条件付きノックアウト突然変異を含む前記TARDBP遺伝子が内在性TARDBP遺伝子を置換する、

条件付きノックアウト突然変異を含むTARDBP遺伝子を含み、

前記齧歯類細胞がラット細胞またはマウス細胞である、

齧歯類細胞。

【請求項 2】

前記野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドが、配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 5 に記載の配列を含む、請求項 1 に記載の齧歯類細胞。

【請求項 3】

(a) 前記変異させた T A R D B P 遺伝子が、前記齧歯類細胞の変異させた T A R D B P 遺伝子であるか、または

(b) 前記変異させた T A R D B P 遺伝子が、変異させたヒト T A R D B P 遺伝子である、請求項 1 または請求項 2 に記載の齧歯類細胞。

【請求項 4】

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが以下：

- (a) 前記 N L S におけるアミノ酸の点突然変異、
- (b) 前記 R R M 1 におけるアミノ酸の点突然変異、
- (c) 前記 R R M 2 におけるアミノ酸の点突然変異、
- (d) 前記 N E S の少なくとも一部の欠失、及び
- (e) 前記 P L D の少なくとも一部の欠失

の 1 以上に起因して機能的構造ドメインを欠く、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の齧歯類細胞。

【請求項 5】

(a) 前記 N L S におけるアミノ酸の前記点突然変異が、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドに対して K 8 2 A、K 8 3 A、R 8 4 A、K 9 5 A、K 9 7 A、K 9 8 A、またはそれらの組み合わせを含む、

(b) 前記 R R M 1 における点突然変異が、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドに対して F 1 4 7 L 及び/もしくは F 1 4 9 L を含む、

(c) 前記 R R M 2 における点突然変異が、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドに対して F 1 9 4 L 及び/もしくは F 2 2 9 L を含む、

(d) 前記 N E S の少なくとも一部の前記欠失が、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドの 2 3 9 位と 2 5 0 位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含む、且つ

(e) 前記 P L D の少なくとも一部の前記欠失が、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドの 2 7 4 位と 4 1 4 位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含む、

請求項 4 に記載の齧歯類細胞。

【請求項 6】

(a) 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドに対して K 8 2 A、K 8 3 A、R 8 4 A、K 9 5 A、K 9 7 A、及び K 9 8 A 点突然変異を含む、

(b) 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドの 2 7 4 位から 4 1 4 位にて及びその間のアミノ酸で前記 P L D を欠く、

(c) 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドに対して F 1 4 7 L 及び F 1 4 9 L 点突然変異を含む、

(d) 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドに対して F 1 9 4 L 及び F 2 2 9 L 点突然変異を含む、ならびに/または

(e) 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドの 2 3 9 位から 2 5 0 位にて及びその間のアミノ酸で前記 N E S を欠く、

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の齧歯類細胞。

【請求項 7】

前記条件付きノックアウト突然変異が部位特異的組換え認識配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の齧歯類細胞。

【請求項 8】

前記条件付きノックアウト突然変異が l o x p 配列を含む、請求項 7 に記載の齧歯類細胞。

【請求項 9】

前記部位特異的組換え認識配列が、前記 T A R D B P 遺伝子のエクソン 3 に隣接する l o

10

20

30

40

50

x p 配列を含む、請求項 8 に記載の齧歯類細胞。

【請求項 10】

前記齧歯類細胞が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現しない、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の齧歯類細胞。

【請求項 11】

(a) 対照齧歯類細胞における野生型 T A R D B P 遺伝子の m R N A 転写物レベルに匹敵する前記変異させた T A R D B P 遺伝子の m R N A 転写物レベル、

(b) 対照齧歯類細胞における野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドのレベルと比べて前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドのレベルの増加、

(c) 前記齧歯類細胞の核よりも細胞質に高濃度で見られる前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド、

10

(d) 野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドと比べて不溶性が増した前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド、

(e) 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを含む細胞質凝集体、

(f) 隠れエクソンのスプライシングの増加、及び/または

(g) 選択的スプライシングを受けた T D P - 4 3 形態のレベルの低下、

を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の齧歯類細胞。

【請求項 12】

前記齧歯類細胞が胚性幹 (E S) 細胞、原始外胚葉細胞、または胚性幹細胞由来運動ニューロン (E S M N) である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の齧歯類細胞。

20

【請求項 13】

前記齧歯類細胞がマウス細胞である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の齧歯類細胞。

【請求項 14】

前記齧歯類細胞が試験管内で培養される、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の齧歯類細胞。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の齧歯類細胞を含む齧歯類組織または組成物であって、前記組成物が培地をさらに含む、齧歯類組織または組成物。

【請求項 16】

変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する齧歯類または齧歯類細胞を作製する方法であって、

30

(a) 一方の染色体上の、内在性 T A R D B P 遺伝子座での、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子であって、

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子が、前記内在性 T A R D B P 遺伝子座の内在性 T A R D B P 遺伝子を置換し、

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドと比べて、核局在化シグナル (N L S)、RNA 認識モチーフ 1 (R R M 1)、RNA 認識モチーフ 2 (R R M 2)、推定核外輸送シグナル (N E S)、プリオン様ドメイン (P L D)、またはそれらの組み合わせを含む機能的構造ドメインを欠く、

変異させた T A R D B P 遺伝子、ならびに

40

(b) 他方の相同染色体上の、前記内在性 T A R D B P 遺伝子座での、条件付きノックアウト突然変異を含む T A R D B P 遺伝子

を含むように、前記齧歯類または前記齧歯類細胞のゲノムを操作することを含み、

前記齧歯類がラットもしくはマウスであるか、または前記齧歯類細胞がラット細胞もしくはマウス細胞である、

前記方法。

【請求項 17】

前記野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドが配列番号 1、配列番号 3 もしくは配列番号 5 に記載の配列を含む、および/または前記操作することは、前記内在性 T A R D B P 遺伝子を、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子

50

で置換することを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記操作することが、前記内在性 T A R D B P 遺伝子を、前記条件付きノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子で置換することを含む、および/または前記条件付きノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子の発現を排除する条件で前記齧歯類細胞を培養することを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

疾患の治療のための治療候補薬剤を特定する方法であって、

(a) 請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の齧歯類細胞、あるいは、請求項 15 に記載の齧歯類組織または組成物を前記治療候補薬剤と接触させることと、

(b) 前記齧歯類細胞または齧歯類組織の表現型及び/または T D P - 43 生物活性を評価することと、

(c) 野生型 T D P - 43 ポリペプチドを発現する対照の齧歯類細胞または齧歯類組織の表現型及び/または T D P - 43 生物活性に匹敵する表現型及び/または T D P - 43 生物活性を前記齧歯類細胞または前記齧歯類組織に取り戻す前記治療候補薬剤を特定することを含む、前記方法。

【請求項 20】

前記齧歯類細胞または前記齧歯類組織の前記表現型及び/または T D P - 43 生物活性を評価することが、細胞培養、蛍光原位ハイブリッド形成、ウエスタンブロット分析、またはそれらの組み合わせを使用して行われる、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記齧歯類細胞の前記表現型を評価することが、(i) 遺伝子操作された E S 細胞、それに由来する原始外胚葉、それに由来する運動ニューロン、もしくはそれに由来する非ヒト動物の生存能力を測定すること、および/または(i i) 前記変異型 T D P - 43 ポリペプチドの細胞での位置を決定することを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

前記変異型 T D P - 43 ポリペプチドの前記生物活性を評価することが、(i) T D P - 43 によって調節される隠れエクソンを含む遺伝子のスプライス産物を測定すること、ならびに/または(i i) 選択的スプライシングを受けた T D P - 43 ポリペプチドのレベルを測定することを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

T D P - 43 構造ドメインの生物学的機能を評価する方法であって、

(a) (i) 一方の染色体上の、内在性 T A R D B P 遺伝子座での、変異型 T D P - 43 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子であって、

前記変異型 T D P - 43 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子が内在性 T A R D B P 遺伝子を置換し、

前記変異型 T D P - 43 ポリペプチドが、野生型 T D P - 43 ポリペプチドに見いだされる核局在化シグナル(N L S)、RNA 認識モチーフ 1 (R R M 1)、RNA 認識モチーフ 2 (R R M 2)、推定核外輸送シグナル(N E S)、プリオン様ドメイン(P L D)、またはそれらの組み合わせを含む機能的構造ドメインを欠く、

変異させた T A R D B P 遺伝子、および

(i i) 他方の相同染色体上の、前記内在性 T A R D B P 遺伝子座での、条件付きノックアウト突然変異を含む T A R D B P 遺伝子であって、

前記条件付きノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子が内在性 T A R D B P 遺伝子を置換する、

T A R D B P 遺伝子

を含むように齧歯類胚性幹(E S)細胞を操作することであって、前記齧歯類 E S 細胞がラット E S 細胞またはマウス E S 細胞であることと、

(b) 前記遺伝子操作された齧歯類 E S 細胞、それに由来する原始外胚葉、それに由来する運動ニューロン、もしくはそれに由来する齧歯類の表現型及び/または T D P - 43 生

10

20

30

40

50

物活性を評価することと
を含む、前記方法。

【請求項 24】

(a) に続いて、前記方法が、前記遺伝子操作された齧歯類 ES 細胞を試験管内で分化させること、及び/または前記遺伝子操作された齧歯類 ES 細胞から遺伝子操作された齧歯類を取得することをさらに含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記遺伝子操作された齧歯類 ES 細胞、それに由来する原始外胚葉、それに由来する運動ニューロン、もしくはそれに由来する齧歯類の前記表現型及び/または TDP - 43 生物活性を評価することが、細胞培養、蛍光原位置ハイブリッド形成、ウエスタンブロット分析、またはそれらの組み合わせを使用して行われる、請求項 23 に記載の方法。

10

【請求項 26】

前記遺伝子操作された齧歯類 ES 細胞、それに由来する原始外胚葉、それに由来する運動ニューロン、もしくはそれに由来する齧歯類の前記表現型を評価することが、(i) 前記遺伝子操作された齧歯類 ES 細胞、それに由来する原始外胚葉、それに由来する運動ニューロン、もしくはそれに由来する齧歯類の生存能力を測定すること、および/または(ii) 前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドの細胞での位置を決定することを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドの前記生物活性を評価することが、(i) TDP - 43 によって調節される隠れエクソンを含む遺伝子のスプライス産物を測定すること、ならびに/または(ii) 選択的スプライシングを受けた TDP - 43 ポリペプチドのレベルを測定することを含む、請求項 23 に記載の方法。

20

【請求項 28】

TDP - 43 によって調節される隠れエクソンを含む前記遺伝子が、Cre^m、F^{yx}d²、C¹f¹またはこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 22 または請求項 27 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

関連出願の相互参照

本出願は、その開示が参照によって全体として本明細書に組み込まれる米国仮出願第 62 / 867, 785 号 (2019 年 6 月 27 日に提出) の、米国特許法第 119 条 (3) に基づく利益を主張する。

【0002】

EF S ウェブ経由でテキストファイルとして提出された配列表への参照

ファイル 10312WO01__ST25 .txt に記述された配列表は 35 キロバイトであり、2020 年 6 月 25 日に作成され、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0003】

技術分野

40

本明細書に記載されているのは、TDP - 43 及びそのドメイン、それらについての非ヒト動物及び非ヒト動物細胞、ならびにそれらについての核酸の生物学的役割 (複数可) を評価する方法である。そのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞または核酸を含む TDP - 43 タンパク症のモデル、及びそれらを使用する方法も提供される。

【背景技術】

【0004】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動ニューロンに影響を及ぼし、四肢麻痺と横隔膜筋の障害の結果として最終的な死を引き起こす壊滅的な神経変性疾患である。ALS 患者組織の死後検査におけるほぼ普遍的な病理学的所見は、細胞質封入体における TDP - 43 (トランスアクティブ応答 DNA 結合タンパク質 43 kDa) の蓄積である。

50

【 0 0 0 5 】

TDP - 43は、核局在化シグナル(NLS)ドメインと、2つのRNA認識モチーフ(RRM1及びRRM2)と、推定核外輸送シグナル(NES)ドメインと、グリシンが豊富なプリオン様ドメイン(PLD)とを有することを特徴とする。異種核リボ核タンパク質(hnRNP)ファミリーのメンバーと同様に、TDP - 43は、すべての哺乳類細胞の生存と動物の正常な発育に必要な主に核RNA結合タンパク質である。核から細胞質へのTDP - 43の再分布と不溶性凝集体におけるその蓄積は、ALS疾患の2つの重要な診断上の特徴である。

【 0 0 0 6 】

TDP - 43の細胞質内蓄積はALSに関連しているが、TDP - 43の各構造ドメインとTDP - 43の生物学的機能(複数可)との関係は明らかではない。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

本明細書で提供されているのは、胚性幹(ES)細胞、それから培養される組織(例えば、原始外胚葉、胚様体、運動ニューロン)、及び機能的構造ドメインを欠く変異型TDP - 43ポリペプチドを発現している、且つALSのような表現型を呈してもよいそれに由来する非ヒト動物である。それを作成し、且つ使用するための組成物及び方法も提供される。機能的構造ドメインを欠く変異型TDP - 43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子及び機能的構造ドメインを欠く変異型TDP - 43ポリペプチドも提供される。提供されるのはまた、TARDBP発現の自己調節を復元してもよい例示的な治療用オリゴヌクレオチド、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

20

【 0 0 0 8 】

本明細書に記載されているのは、変異型TDP - 43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子を含む非ヒト動物(例えば、齧歯類(例えば、ラットまたはマウス))及び非ヒト動物細胞(例えば、胚性幹(ES)細胞、胚様体、胚性幹細胞由来運動ニューロン(ESMN)など)であり、その際、変異させたTARDBP遺伝子は、変異型TDP - 43が突然変異(例えば、点突然変異、置換、置き換え、挿入、欠失などの1以上)を別にすれば対応する野生型TDP - 43ポリペプチドのアミノ酸配列を含むように突然変異を含む野生型TARDBP遺伝子のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、野生型TARDBP遺伝子は、配列番号2(その縮重変異体を含む)、配列番号4(その縮重変異体を含む)、または配列番号6(その縮重変異体を含む)に示される配列を含み、それらはそれぞれ、配列番号1、配列番号3、または配列番号5として示されるアミノ酸配列を含む野生型TDP - 43ポリペプチドをコードする。

30

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態では、変異型TDP - 43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子は、非ヒト動物または非ヒト動物細胞の内在性TARDBP遺伝子座にて内在性TARDBP遺伝子に取って代わる。いくつかの実施形態では、非ヒト動物細胞または非ヒト動物は、変異型TDP - 43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子についてヘテロ接合性である。例えば、いくつかの実施形態では、非ヒト動物または非ヒト動物細胞はさらに、本明細書に記載されているような変異させたTARDBP遺伝子に加えて、(a)野生型TARDBP遺伝子または(b)ノックアウト突然変異、例えば、条件付きノックアウト突然変異を含むTARDBP遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、条件付きノックアウト突然変異は、部位特異的組換え認識配列、例えば、loxP配列を含み、任意で、部位特異的組換え認識配列(例えば、loxP配列)はコーディングエクソン、例えば、エクソン3に隣接する。いくつかの実施形態では、ノックアウト突然変異を含むTARDBP遺伝子はTARDBP遺伝子の欠失したエクソン3に隣接するloxP配列を含む。いくつかの実施形態では、ノックアウト突然変異はTDP - 43ペプチドの全コード配列の欠失を含む。

40

【 0 0 1 0 】

50

いくつかの実施形態では、非ヒト動物または非ヒト動物細胞は、(i) 内在性 T A R D B P 遺伝子座にて内在性 T A R D B P 遺伝子の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子による置換を含み、且つ(ii) 相同染色体の他方の内在性 T A R D B P 遺伝子座にてノックアウト突然変異を含む T A R D B P 遺伝子または野生型 T A R D B P 遺伝子のいずれかを含む。

【0011】

いくつかの実施形態では、非ヒト動物または非ヒト動物細胞は、内在性 T A R D B P 遺伝子座にて条件付きノックアウト突然変異を含む T A R D B P 遺伝子を含み、且つ相同染色体の他方の内在性 T A R D B P 遺伝子座にて T A R D B P コード配列全体の欠失を含む T A R D B P 遺伝子を含む。

【0012】

いくつかの実施形態では、非ヒト動物細胞または非ヒト動物は、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子についてホモ接合性である。

【0013】

いくつかの実施形態では、非ヒト動物または非ヒト動物細胞は、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現しない。

【0014】

いくつかの実施形態では、非ヒト動物または非ヒト動物細胞は、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する。

【0015】

いくつかの実施形態では、先行請求項のいずれか1項に記載の非ヒト動物または非ヒト動物細胞は、対照細胞における野生型 T A R D B P 遺伝子の mRNA 転写レベルに匹敵する、変異させた T A R D B P 遺伝子の mRNA 転写レベルを含み、対照細胞における野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドのレベルと比べて増加したレベルの変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを含み、例えば運動ニューロンの核よりも細胞質にて見られるさらに高い濃度の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを含み、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを含む野生型 T D P - 4 3 ポリペプチド細胞質凝集体と比べて不溶性が増した変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを含み、隠れエクソンのスプライシングの増加、及び/または選択的スプライシングを受けた T D P - 4 3 型のレベルの低下を含む。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、前脛骨筋のような主に速筋で構成される筋肉組織の脱神経、及び/または肋間筋のような主に遅筋で構成される筋肉組織の正常な神経支配を示す。

【0016】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているような非ヒト動物細胞は試験管内で培養される。本明細書に記載されているのはまた、本明細書に記載されている非ヒト動物細胞を含む非ヒト動物組織である。

【0017】

いくつかの実施形態では、非ヒト動物組織及び/または非ヒト動物細胞は組成物に含まれる。

【0018】

いくつかの実施形態では、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドと比べて機能的構造ドメインを欠き、非ヒト動物または非ヒト動物細胞は変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現し、任意で、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドは配列番号1、配列番号3、または配列番号5として示される配列を含む。

【0019】

いくつかの実施形態では、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは、核局在化シグナル(NLS)、RNA認識モチーフ1(RRM1)、RNA認識モチーフ2(RRM2)、推定核外輸送シグナル(E)、プリオン様ドメイン(PLD)、またはそれらの組み合わせから成る群から選択される機能的構造ドメインを欠いている。いくつかの実施形態では、変異させた T A R D B P 遺伝子は、突然変異、例えば、点突然変異、置換、挿入、欠失、またはそれらの組み合わせを含む、非ヒト動物の T A R D B P 遺伝子である。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態では、非ヒト動物のTARD BP遺伝子は配列番号2または配列番号4として示されている。いくつかの実施形態では、変異させたTARD BP遺伝子は、突然変異、例えば、点突然変異、置換、挿入、欠失、またはそれらの組み合わせを含むヒトのTARD BP遺伝子である。いくつかの実施形態では、変異させたTARD BP。いくつかの実施形態では、ヒトのTARD BP遺伝子は配列番号5として示されている。

【0020】

いくつかの実施形態では、変異型TDP43ポリペプチドは、以下(a)NLSにおけるアミノ酸の点突然変異、(b)RRM1におけるアミノ酸の点突然変異、(c)RRM2におけるアミノ酸の点突然変異、(d)核外輸送シグナルの少なくとも一部の欠失、及び(e)プリオン様ドメインの少なくとも一部の欠失のうち1以上に起因して機能的構造ドメインを欠いている。例えば、いくつかの実施形態では、変異型TDP-43ポリペプチドは、さらに(a)NLSにおけるアミノ酸の点突然変異、(b)RRM1におけるアミノ酸の点突然変異、(c)RRM2におけるアミノ酸の点突然変異、(d)核外輸送シグナルの少なくとも一部の欠失、及び(e)プリオン様ドメインの少なくとも一部の欠失を含む配列番号1、配列番号3、または配列番号5として示される配列を含む。いくつかの実施形態では、(a)NLSにおけるアミノ酸の点突然変異はK82A、K83A、R84A、K95A、K97A、K98Aまたはそれらの組み合わせを含み、(b)RRM1における点突然変異はF147L及び/またはF149Lを含み、(c)RRM2における点突然変異はF194L及び/またはF229Lを含み、(d)核外輸送シグナル欠失の少なくとも一部の欠失は野生型TDP-43ポリペプチドの239位と250位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含み、且つ(E)プリオン様ドメインの少なくとも一部の欠失は野生型TDP-43ポリペプチドの274位と414位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含む。いくつかの実施形態では、変異型TDP-43ポリペプチドは、野生型TDP-43ポリペプチドと比べてK82A、K83A、R84A、K95A、K97A、及び/またはK98Aを含み、任意で、野生型TDP-43ポリペプチドは、配列番号1、配列番号3または配列番号5として示される配列を含む。いくつかの実施形態では、変異型TDP-43ポリペプチドは野生型TDP-43ポリペプチドの274位から414位のアミノ酸でプリオン様ドメインを欠き、任意で、野生型TDP-43ポリペプチドは、配列番号1、配列番号3、または配列番号5として示される配列を含む。いくつかの実施形態では、変異型TDP-43ポリペプチドは野生型TDP-43ポリペプチドと比べてF147L及びF149Lを含み、任意で、野生型TDP-43ポリペプチドは、配列番号1、配列番号3または配列番号5として示される配列を含む。いくつかの実施形態では、変異型TDP-43ポリペプチドは野生型TDP-43ポリペプチドと比べてF194L及びF229Lを含み、任意で、野生型TDP-43ポリペプチドは配列番号1、配列番号3または配列番号5として示される配列を含む。いくつかの実施形態では、変異型TDP-43ポリペプチドは、野生型TDP-43ポリペプチドと比べて239位から250位のアミノ酸で核外輸送シグナルを欠き、任意で、野生型TDP-43ポリペプチドは配列番号1、配列番号3、または配列番号5として示される配列を含む。

【0021】

本明細書に記載されている変異型TDP-43ポリペプチド及びそれをコードする核酸分子も提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているような変異型TDP-43ポリペプチドをコードする核酸分子はさらに、5'から3'に向かって：5'相同性アームと、変異型TDP-43ポリペプチドをコードする核酸配列と、3'相同性アームとを含み、その際、核酸は齧歯類細胞において相同組換えを受ける。いくつかの実施形態では、核酸が内在性ラットTARD BP遺伝子座にて相同組換えを受け、変異型TDP-43ポリペプチドをコードする核酸配列が内在性TARD BPコード配列に取って代わるように、5'及び3'の相同性アームはラットの配列に相同である。いくつかの実施形態では、核酸が内在性マウスTARD BP遺伝子座にて相同組換えを受け、変異型TDP-43ポリペプチドをコードする核酸配列が内在性TARD BPコード配列を置き換えるように、5'及び3'の相同性アームはマウスの配列に相同である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

本明細書に記載されているのはまた、本明細書に記載されている非ヒト動物及び非ヒト動物細胞を作製するための方法である。いくつかの実施形態では、該方法は、変異 T D P 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を含むように非ヒト動物または非ヒト動物細胞のゲノムを操作することを含み、その際、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは野生型 T D P - 4 3 と比べて機能的構造ドメインを欠き、任意で、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 5 として示される配列を含む。いくつかの実施形態では、操作することは内在性 T A R D B P 遺伝子を、本明細書に記載されているような変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子で置き換えることを含む。いくつかの実施形態では、操作することはさらに、内在性 T A R D B P 遺伝子を、ノックアウト突然変異、例えば、条件付きノックアウト突然変異を含む T A R D B P 遺伝子で置き換えることを含む。いくつかの実施形態では、該方法はさらに、ノックアウト突然変異を含む T A R D B P 遺伝子の発現を排除する条件で細胞を培養することを含む。

10

【 0 0 2 3 】

本明細書に記載されているのはまた、非ヒト動物、非ヒト動物細胞、非ヒト動物組織、及び組成物を使用する方法である。いくつかの実施形態では、非ヒト動物、非ヒト動物細胞、非ヒト動物組織、及び組成物は、方法、例えば、疾患の治療のための治療候補を特定する方法及び/または T D P - 4 3 構造ドメインの生物学的機能を評価する方法にて使用される。治療候補を特定するいくつかの実施形態では、方法は、(a) 非本明細書に記載されているようなヒト動物、非ヒト動物細胞、非ヒト動物、または非ヒト動物細胞または組織を含む組成物(例えば、試験管内培養)を候補薬剤と接触させることと、(b) 非ヒト動物、非ヒト細胞または組織の表現型及び/または T D P - 4 3 生物活性を評価することと、(c) 野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現している対照の細胞または組織の表現型及び/または T D P - 4 3 生物活性に匹敵する表現型及び/または T D P - 4 3 生物活性を非ヒト動物、非ヒト細胞または組織に復元させる候補薬剤を特定することとを含む。

20

【 0 0 2 4 】

T D P - 4 の生物学的機能を評価するいくつかの実施形態では、方法は、(a) 核局在化シグナル(N L S)、第 1 の R N A 認識モチーフ(R R M 1)、第 1 の R N A 認識モチーフ(R R M 2)、推定核外輸送シグナル(E)、プリオン様ドメイン(P L D)、及びそれらの組み合わせから成る群から選択される機能的構造ドメインを欠く変異型 T D P 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を含むように胚性幹(E S)細胞を操作することと、(b) 任意で、操作された E S 細胞を試験管内で分化させ、及び/または操作された E S 細胞から遺伝子操作された非ヒト動物を取得することと、(c) 遺伝子操作された E S 細胞、それに由来する原始外胚葉、それに由来する運動ニューロン、またはそれに由来する非ヒト動物の表現型及び/または T D P - 4 3 生物活性を評価することとを含む。いくつかの実施形態では、表現型が、細胞培養、蛍光原位置ハイブリッド形成、ウエスタンブロット分析、またはそれらの組み合わせによって評価される、請求項 3 9 または請求項 4 0 に記載の方法。いくつかの実施形態では、表現型を評価することは、遺伝子操作された E S 細胞、それに由来する原始外胚葉、それに由来する運動ニューロン、またはそれに由来する非ヒト動物の生存能力を測定することを含む。いくつかの実施形態では、表現型を評価することは、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドの細胞での位置を決定することを含む。いくつかの実施形態では、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドの生物活性を評価することは、T D P - 4 3 によって調節される隠れエクソンを含む遺伝子のスプライス産物を測定することを含む。いくつかの実施形態では、T D P - 4 3 によって調節される隠れエクソンを含む遺伝子は、C r e m、F y x d 2、C l f 1 を含む。いくつかの実施形態では、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドの生物活性は選択的スプライシングを受けた T D P - 4 3 のレベルを測定することを含む。

30

40

【 0 0 2 5 】

本明細書に記載されているのはまた、T D P - 4 3 タンパク症を治療する際の候補薬剤

50

として有用であってもよいオリゴヌクレオチド（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、*siRNA*、*CRISPR/Cas*システムなど）である。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5'及び3'の選択的スプライス部位間のTDP-43 mRNA配列を標的とするギャップマーモチーフを含む。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5'及び3'の選択的スプライス部位間のTDP-43 mRNA配列を標的とするギャップマーモチーフを含み、その際、5'選択的スプライス部位は、(a)染色体4:148,618,647;(b)染色体4:148,618,665;及び(c)染色体4:148,618,674から成る群から選択されるTARDBPゲノム位置に相関し、3'選択的スプライス部位は染色体4:148,617,705のTARDBPゲノム位置と相関する。いくつかの*siRNA*の実施形態では、*siRNA*は5'及び3'の選択的スプライス部位の間のTDP-43 mRNA配列を標的とする配列を含む。いくつかの実施形態では、配列を含む*siRNA*は、5'及び3'の選択的スプライス部位間のTDP-43 mRNA配列を標的とし、その際、5'選択的スプライス部位は、(a)第4染色体:148,618,647;(b)第4染色体:148,618,665;(c)第4染色体:148,618,674から成る群から選択されるTARDBPゲノム位置に相関し、3'選択的スプライス部位は第4染色体:148,617,705のTARDBPゲノム位置に相関する。いくつかの*CRISPR/Cas*システムの実施形態では、システムはCas9タンパク質及び少なくとも1つのgRNAを含み、gRNAはTDP-43 mRNAの5'選択的スプライス部位またはその近傍及び/または3'選択的スプライス部位またはその近傍の配列を認識する。いくつかの実施形態では、*CRISPR/Cas*システムはCas9タンパク質及び少なくとも1つのgRNAを含み、その際、gRNAは、(a)第4染色体:148,618,647;(b)第4染色体:148,618,665;(c)第4染色体:148,618,674、(d)第4染色体:148,617,705及びそれらの組み合わせから成る群から選択されるTARDBPゲノム位置のまたはその近傍の配列を認識する。

【0026】

本特許または出願書類はカラーで作成された少なくとも1つの図面を含有する。カラー図面（複数可）付きの本特許または本特許出願公開の写しは請求及び必要手数料の支払いに応じて米国特許庁より提供されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】TDP-43、核局在化シグナル(NLS;アミノ酸82~98)の相対位置、2つのRNA認識モチーフ(RRM1;アミノ酸106~176、及びRRM2;アミノ酸191~262)の相対位置、推定核外輸送シグナル(E;アミノ酸239~248)の相対位置、プリオン様ドメイン(PLD;アミノ酸274~414)の相対位置、ALSに関連するアミノ酸置換変異、及びALSに関連するC末端断片の説明（正確な縮尺ではない）を提供する図である。星印はALSの有無にかかわらずFTD症状に関連する突然変異を強調する。A90V、S92L、N267S、G287S、G294V、G368S、S375G、A382T、I383V、N390S、及びN390Dの突然変異は健康な人でも観察されている。

【図2-1】ATG開始コドンで始まる、エクソン1~6（長方形）、非翻訳領域（塗りつぶされていない長方形）、及び翻訳領域（塗りつぶされた長方形）を示す、マウスTARDBPゲノム構造の図（正確な縮尺ではない）を提供する図である。

【図2-2】マウス(m)TDP-43及びヒト(h)TDP-43ポリペプチドのアミノ酸配列比較、ポリペプチドのアミノ酸位置、及びmTDP-43配列及びhTDP-43配列の下のコンセンサス配列を提供する図である。一般に、配列比較内の四角で囲まれた領域は、核局在化シグナル(NLS:アミノ酸82-98)、RNA認識モチーフ1(RRM1:アミノ酸106-176)、RNA認識モチーフ2(RRM2:アミノ酸191-262)、推定上の核外輸送シグナル(E:アミノ酸239-248)、及びグリシンに富むプリオン様ドメイン(PLD:アミノ酸274-414)を示す。マウスT

D P - 4 3 とヒト T D P - 4 3 の間のアミノ酸のミスマッチも四角で囲まれ、コンセンサス配列におけるダッシュで示される。エクソン接合部は示された接合部にて連結されたエクソン (E X) を示す垂直線としても示される。アミノ酸 2 8 6 と 2 8 7 の間の垂直線は選択的 5 ' - スプライス部位を提供する (図 1 1 A を参照のこと) 。

【図 3 - 1】2 つの例示的な T A R D B P ヌル対立遺伝子の図解 (正確な縮尺ではない) を提供する : (1) c r e が介在する組換えの際にエクソン 3 を除去した後、今後「 - 」とされる l o x P 部位特異的組換え認識部位 (三角形) に隣接するエクソン 3 を含む条件付きノックアウト対立遺伝子、及び (2) 今後「 C D S 」と呼ばれる T A R D B P コード配列全体の欠失を含む T A R D B P ヌル対立遺伝子。エクソン 1 ~ 6 (長方形) 、非翻訳領域 (塗りつぶされていない長方形) 、翻訳領域 (塗りつぶされた長方形) 、及び開始 A T G と停止 T G A のコドンの相対位置が示されている。

10

【図 3 - 2】種々の形態の変異させた T A R D B P 遺伝子によってコードされる非限定的変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドの例示的な描写 (正確な縮尺ではない) を提供する図である。具体的には、これらの例と関連する図全体を通して : 「 W T 」は野生型 T A R D B P 遺伝子を指し、「 l o x P - E x 3 l o x P 」は、l o x P が導入されたエクソン 3 を含む変異させた T A R D B P 遺伝子を指し、「 - 」は、l o x P - E x 3 l o x P の c r e が介在する組換えの際に野生型 T A R D B P 遺伝子のエクソン 3 の配列を含むヌクレオチド配列を欠く変異させた T A R D B P 遺伝子を指し、「 C D S 」とは、T A R D B P の全コード配列を欠く変異させた T A R D B P 遺伝子を指し、「 N L S 」は、以下の点突然変異 K 8 2 A K 8 3 A、R 8 4 A、K 9 5 A、K 9 7 A、及び K 9 8 A を含む変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を指し、「 R R M 1 」は、以下の点突然変異 : F 1 4 7 L 及び F 1 4 9 L を含む変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を指し、「 R R M 2 」は、以下の点突然変異 : F 1 9 4 L 及び F 2 2 9 L を含む変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を指し、「 E 」は、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドのアミノ酸 2 3 9 ~ 2 5 0 を欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を指し、及び「 P L D 」は、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドのアミノ酸 2 7 4 ~ 4 1 4 を欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を指す。 E 及び P L D の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドの場合、斜線は欠失させた領域を表す。

20

30

【図 4】胚性幹 (E S) 細胞を運動ニューロンに分化させるのに使用されるプロトコールを示す図である。示されているのはまた、E S 細胞の段階でのエクソン 3 の C r e が介在する欠失 (-) の後、生存能力を維持し、原始外胚葉 (P E) 段階に到達し、及び / または運動ニューロン (M N) 段階に到達することが示された、変異させた T A R D B P 遺伝子を含む E S 細胞の能力である。

【図 5】胚性幹細胞由来の運動ニューロン (E S M N) の生存能力を評価するのに使用されるプロトコールを示す図である。示されているのはまた、条件付きノックアウト対立遺伝子 (-) の活性化後に示されるような、変異させた T A R D B P 遺伝子を含む E S M N の生存能力に関する結果である。

【図 6 - 1】T D P - 4 3 の N 末端 (- T D P - 4 3 N - t e r m) を認識する抗 T D P - 4 3 抗体また T D P - 4 3 の C 末端 (- T D P - 4 3 C - t e r m) を認識する抗 T D P - 4 3 抗体によって認識される T D P - 4 3 の領域の正確な縮尺ではない描写を提供する。

40

【図 6 - 2】図 6 A に示されているような T D P - 4 3 の N 末端 (T D P - 4 3 N - t e r m) または T D P - 4 3 の C 末端 (T D P - 4 3 C - t e r m) を認識する抗体で染色した細胞の細胞質及び核の画分のウェスタンブロットを提供する。エクソン 3 (-) の C r e が介在する欠失は、E S 細胞段階で発生し、細胞を図 4 に示すプロトコールに従って E S 培地、A D F N K 培地、レチノイン酸とソニックヘッジホッグを含む A D F N K 培地、及び E S M N 培地で培養し、幹細胞由来の運動ニューロン (E S M N) を作り出した。細胞質及び核の画分は、T D P - 4 3 W T / - 操作 E S M N、 N L S / - 操作 E

50

S MN、 E / - 操作 E S MN、 P L D / - 操作 E S MN、または死にかけている R R M 1 / - 操作細胞から単離した。対照 T D P - 4 3 W T / - E S MN ()、 N L S / - 操作 E S MN ()、 R R M 1 / - 操作細胞 ()、または P L D / - 操作 E S MN () の細胞質と核の T D P - 4 3 の比率を示すグラフも提供される。

【図 7】示されるような変異させた T A R D B P 遺伝子を含む操作された胚性幹細胞由来運動ニューロン (E S MN) の 4 0 倍の倍率での蛍光原位置ハイブリッド形成の画像を提供する。 E S 細胞段階で変異させた T A R D B P 遺伝子のエクソン 3 を取り除き (-)、細胞を図 4 に示すプロトコールに従って E S 培地、 A D F N K 培地、レチノイン酸とソニックヘッジホッグを含む A D F N K 培地、及び E S MN 培地で培養し、幹細胞由来の運動ニューロン (E S MN) を作り出した後、画像を捕捉した。 T D P - 4 3 の C 末端 (T D P - 4 3 C - t e r m ; 上のパネル) を認識する抗体または抗 M A P 2 抗体と D A P I (下のパネル) で細胞を染色した。

10

【図 8】示されるような変異させた T A R D B P 遺伝子を含む操作された胚性幹細胞由来運動ニューロン (E S MN) の 4 0 倍の倍率での蛍光原位置ハイブリッド形成の画像を提供する。 E S 細胞段階で変異させた T A R D B P 遺伝子のエクソン 3 を取り除き (-)、細胞を図 4 に示すプロトコールに従って E S 培地、 A D F N K 培地、レチノイン酸とソニックヘッジホッグを含む A D F N K 培地、及び E S MN 培地で培養し、胚性幹細胞由来の運動ニューロン (E S MN) を作り出した後、画像を捕捉した。 T D P - 4 3 の N 末端 (T D P - 4 3 N - t e r m ; 上のパネル) を認識する抗体または抗 M A P 2 抗体と D A P I (下のパネル) で細胞を染色した。

20

【図 9 - 1】細胞のサルコシル可溶性画分及びサルコシル不溶性画分の、抗 T D P - 4 3 抗体で染色したウエスタンブロットを提供する。エクソン 3 (-) の C r e が介在する欠失は E S 細胞段階で発生し、細胞を図 4 に示すプロトコールに従って E S 培地、 A D F N K 培地、レチノイン酸とソニックヘッジホッグを含む A D F N K 培地、及び E S MN 培地で培養し、胚性幹細胞由来の運動ニューロン (E S MN) を作り出した。サルコシル可溶性画分及びサルコシル不溶性画分は、 T D P - 4 3 W T / - 操作 E S MN、 N L S / - 操作 E S MN、 E / - 操作 E S MN、 P L D / - 操作 E S MN、または R R M 1 / - 操作細胞から単離した。これらの E S MN によって発現される不溶性 / 可溶性 T D P - 4 3 の比率を提供するグラフも提供する。

【図 9 - 2】 T D P - 4 3 の m R N A (左パネル ; y 軸) またはタンパク質 (右パネル ; y 軸) の発現レベルを示すグラフを提供する。エクソン 3 (-) の C r e が介在する欠失は E S 細胞段階で発生し、細胞を図 4 に示すプロトコールに従って E S 培地、 A D F N K 培地、レチノイン酸とソニックヘッジホッグを含む A D F N K 培地、及び E S MN 培地で培養し、胚性幹細胞由来の運動ニューロン (E S MN) を作り出した。 N L S / - 操作 E S MN、 E / - 操作 E S MN、 P L D / - 操作 E S MN、または死にかけている R R M 1 / - 操作細胞の m R N A レベルを対照 (T D P - 4 3 W T / - 操作 E S MN (W T / -)) と比較する。

30

【図 9 - 3】細胞溶解物の抗 T D P - 4 3 抗体または抗 G A P D H 抗体で染色したウエスタンブロットを提供する。エクソン 3 (-) の C r e が介在する欠失は E S 細胞段階で発生し、細胞を図 4 に示すプロトコールに従って E S 培地、 A D F N K 培地、レチノイン酸とソニックヘッジホッグを含む A D F N K 培地、及び E S MN 培地で培養し、胚性幹細胞由来の運動ニューロン (E S MN) を作り出した。細胞溶解物は、最大 1 6 時間までのシクロヘキシミド (C H X +) 処理後、 T D P - 4 3 W T / - 操作 E S MN、 N L S / - 操作 E S MN、 E / - 操作 E S MN、 P L D / - 操作 E S MN、または死にかけている R R M 1 / - 操作細胞から単離した。シクロヘキシミド処理 (x 軸 ; 時間) 後の対照の T D P - 4 3 W T / - 操作 E S MN ()、 N L S / - 操作 E S MN ()、 R R M 1 / - 操作細胞 ()、または P L D / - 操作 E S MN () によって発現される T D P - 4 3 タンパク質 (y 軸) の % を提供するグラフも提供される。

40

【図 1 0】 T D P - 4 3 によって調節されると考えられる 3 つの遺伝子である C r e m、 F y x d 2、及び C l f 1 で発生する正常なエクソン及び隠れエクソンのスプライシング

50

の説明（正確な縮尺ではない）、ならびに正常なスプライシング産物（塗りつぶされたバー）の及び異常なスプライシング産物（パターン化されたバーと塗りつぶされていないバー）のレベルを示すグラフを提供する。エクソン3（-）のCreが介在する欠失はES細胞段階で発生し、細胞を図4に示すプロトコールに従ってES培地、ADFNK培地、レチノイン酸とソニックヘッジホッグを含むADFNK培地、及びESMN培地で培養し、胚性幹細胞由来の運動ニューロン（ESMN）を作り出した。NLS/-操作ESMN、E/-操作ESMN、PLD/-操作ESMN、またはRRM1/-操作細胞と対照（TDP-43WT/-）によるCre^m、Fyx^{d2}、及びClf1の隠れエクソンスプライシングのレベルを示す。

【図11-1】TDP-43遺伝子で発生する正常な及び選択的なスプライシング事象の説明（正確な縮尺ではない）を提供する図である。

10

【図11-2】選択的なスプライシングを受けたTDP-43 mRNAのレベルを示すグラフを提供する。エクソン3（-）のCreが介在する欠失はES細胞段階で発生し、細胞を図4に示すプロトコールに従ってADFNK培地、レチノイン酸とソニックヘッジホッグを含むADFNK培地、及びESMN培地で培養し、胚性幹細胞由来の運動ニューロン（ESMN）を作り出した。未操作ES細胞（WT/WT）、NLS/-操作ESMN、E/-操作ESMN、PLD/-操作ESMN、または死にかけているRRM1/-操作細胞による選択的なスプライシングを受けたTDP-43 mRNAのレベルを示す。

【図12】TDP-43^{-/-}ES細胞、TDP-43^{NLS/-}操作ES細胞、TDP-43^{PLD/-}操作ES細胞、TDP-43^{NLS/WT}操作ES細胞、TDP-43^{PLD/WT}操作ES細胞、TDP-43^{WT/-}操作ES細胞、TDP-43^{loxP-Ex3-loxP/WT}操作ES細胞、または野生型TDP-43^{WT/WT}ES細胞を注入した8細胞胚の受精後の生存時間を示すグラフを提供する。E3.5（胎生期3.5日）、E10.5（胎生期10.5日）、E15.5（胎生期15.5日）、P0（出生後0日）。

20

【図13-1】16週齢のマウス（n=2）から単離された脊髄組織から単離された運動ニューロンのウエスタンブロットを提供する。調べたマウスは、(i)内在性TARDBP遺伝子座から：loxPが導入されたエクソン3（loxP-Ex3-loxP）を含む変異させたTARDBP遺伝子、NLSのノックアウト突然変異（NLS）を含む変異させたTARDBP遺伝子、またはプリオン様ドメインの欠失（PLD）を含む変異させたTARDBP遺伝子と、(ii)相同染色体上の他方のTARDBP遺伝子座にある野生型（WT）TARDBP遺伝子とを発現した。TDP-43のN末端またはTDP-43のC末端を認識するそれぞれの-TDP-43N-term抗体または-TDP-43C-term抗体で染色した運動ニューロンの細胞質及び核の画分を示す（例えば、図6Aを参照）。loxP-Ex3-loxP/WTマウス（ ）、NLS/WTマウス（ ）、またはPLD/WTマウス（ ）から単離された脊髄組織の細胞質の核に対するTDP-43の比率を示すグラフも提供される。

30

【図13-2】16週齢のマウス（n=2）から単離された脊髄組織から単離された運動ニューロンのウエスタンブロットを提供する。調べたマウスは、(i)内在性TARDBP遺伝子座から：loxPが導入されたエクソン3（loxP-Ex3-loxP）を含む変異させたTARDBP遺伝子、NLSのノックアウト突然変異（NLS）を含む変異させたTARDBP遺伝子、またはプリオン様ドメインの欠失（PLD）を含む変異させたTARDBP遺伝子と、(ii)相同染色体上の他方のTARDBP遺伝子座にある野生型（WT）TARDBP遺伝子とを発現した。16週齢のマウスで単離され、リン酸化されたTDP-43を認識する抗体で染色した脊髄組織の細胞質及び核の画分のウエスタンブロットを提供する。

40

【図13-3】16週齢のマウス（n=2）から単離された脊髄組織から単離された運動ニューロンのウエスタンブロットを提供する。調べたマウスは、(i)内在性TARDBP遺伝子座から：loxPが導入されたエクソン3（loxP-Ex3-loxP）を含

50

む変異させたTARDBP遺伝子、NLSのノックアウト突然変異(NLS)を含む変異させたTARDBP遺伝子、またはプリオン様ドメインの欠失(PLD)を含む変異させたTARDBP遺伝子と、(ii)相同染色体上の他方のTARDBP遺伝子座にある野生型(WT)TARDBP遺伝子とを発現した。TDP-43のN末端またはTDP-43のC末端を認識するそれぞれの-TDP-43N-term抗体(例えば、図6Aを参照)または-TDP-43C-term抗体(例えば、図6Aを参照)で染色した細胞のサルコシル可溶性及びサルコシル不溶性の画分のウエスタンブロットを提供する。

【図14】16週齢のマウスから単離された脊髄組織から単離された運動ニューロンの40倍の倍率での蛍光原位置ハイブリッド形成の画像を提供する。調べたマウスは、(i)内在性TARDBP遺伝子座から:loxPが導入されたエクソン3(loxp-Ex3-loxp)を含む変異させたTARDBP遺伝子、NLSのノックアウト突然変異(NLS)を含む変異させたTARDBP遺伝子、またはプリオン様ドメインの欠失(PLD)を含む変異させたTARDBP遺伝子と、(ii)相同染色体上の他方のTARDBP遺伝子座にある野生型(WT)TARDBP遺伝子とを発現した。TDP-43のN末端(TDP-43N-term;上のパネル)を認識する抗体または抗chAT抗体及び抗NeuN抗体(下のパネル)で細胞を染色した。示されているのはまた、野生型TDP-43のみ()、変異型NLS TDP-43ポリペプチドと野生型TDP-43ポリペプチド()、変異型NLS TDP-43ポリペプチドと野生型TDP-43ポリペプチドの双方()、または変異型PLD TDP-43ポリペプチドと野生型TDP-43ポリペプチドの双方()を発現している動物にて細胞質凝集体を示す運動ニューロンの百分率を示すグラフである。

【図15-1】16週齢のマウスから単離された前脛骨筋組織または肋間筋組織の10倍または40倍の倍率での蛍光原位置ハイブリッド形成の画像を提供する。組織を、シナプトフィジン、ブンガロトキシンを認識する抗体、及び/またはDAPIで染色した。矢印は脱神経された神経筋接合部を示し、星印は部分的に神経支配された神経筋接合部を示す。

【図15-2】loxP-Ex3-loxp/WTマウス()、NLS/WTマウス()、またはPLD/WTマウス()から単離された前脛骨(TA)筋組織または肋間筋における神経支配された神経筋接合部の割合(NMJs; y軸)を提供するグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0028】

概要

【0029】

TDP-43は主に、RNAの転写、スプライシング、輸送、及び安定性を含むRNAのプロセッシング及び代謝で機能する核内RNA/DNA結合タンパク質である。TDP-43のRNA結合特性は、それ自体のmRNAにおける3'UTR配列への結合を介して介在するその自己調節活性に不可欠であると思われる。Ayala et al. (2011), EMBO J. 30:277-88. 細胞ストレスに続いて、TDP-43は細胞質ストレス顆粒に局在し、ストレス顆粒形成で役割を担ってもよい。TDP-43はその核内の通常的位置から細胞質に誤って局在し、そこで凝集する。凝集したTDP-43はコピキチン化され、過剰リン酸化され、及び切り詰められる。さらに、細胞質でのTDP-43凝集はALSのほぼすべての症例の構成要素である。Becker et al. (2017), Nature, 544:367-371. ALS症例の97%は細胞質TDP-43凝集体の死後の病理を示す。同じ病変は散発性前頭側頭葉変性症(FTLDU)の約45%に見られる。TDP-43は、FTLDUのコピキチン陽性、タウ陰性の封入体、運動ニューロン疾患を伴うFTLD(FTDMND)、及びALS/MND(ALS10)の主要な病理学的タンパク質として最初に特定され、これらの障害は、現在、TDP-43タンパク質症のさまざまな臨床症状を表すと見なされている。Gitcho et al. (2009), Acta Neuropath. 118:633-645. TARDBPB突然変異は家族性ALS患者の約3%で発生し、散発性疾患の患者の約1.5%で

発生する。Lattante et al. (2013), Hum. Mutat. 34: 812-26. TARDBP 遺伝子の種々の突然変異は、症例の1%未満でALSに関連している。図1を参照のこと。図1に示すように、ALSに関連するTARDBP 遺伝子の大部分の突然変異はプリオン様ドメイン(PLD)に見いだされる。したがって、TDP-43が担うすべての機能を理解することはALS、FLTDU、FLTD等のような神経病理学におけるその役割を解明する可能性がある。

【0030】

TDP-43が細胞及び生物の生命に不可欠であることは明らかである。TDP-43の枯渇は胚の致死性をもたらす。したがって、初期モデルはTDP-43の過剰発現またはその変異型、またはTDP-43の欠失に依存した。ALS病理におけるTDP-43の役割を評価する種々のモデルが作り出されてきた。Tsao et al. (2012), Brain Res. 1462: 26-39にて概説されている。

10

【0031】

例えば、TDP-43のA315T変異型を過剰発現するトランスジェニックマウスは、約3~4ヵ月齢で進行性の異常を発症し、5ヵ月齢で死亡した。Wegorzewska et al. (2009), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106: 18809-814. 異常はこれらの変異型マウスの脳と脊髄におけるTDP-43C末端断片の存在と相関していたが、細胞質TDP-43凝集体は検出されなかった。これらの観察はWegorzewska et alがTDP-43関連神経変性に対するニューロンの脆弱性は、毒性凝集ではなく、DNA/RNA結合タンパク質機能の変化に関連していることを示唆するように導いた。Wegorzewska et al. (2009)、前出。対照的に、TDP-43の過剰発現を含む2つの独立した研究では、トランスジェニックマウスは細胞質凝集と相関する進行性運動機能障害を含む神経変性特質を示した。Tsai et al. (2010), J. Exp. Med. 207: 1661-1673及びWils et al. (2010), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107: 3858-63)。

20

【0032】

機能喪失研究では、条件付きノックアウト突然変異を使用したTDP-43の遍在的な欠失はマウスが代謝表現型と早死を示す原因となった。Chiang et al. (2010), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107: 16320-324. マウス胚性幹細胞におけるTDP-43の枯渇は、特定の遺伝子の隠れエクソンのmRNAへのスプライシング、mRNAの翻訳の妨害、非センスが介在するmRNA分解の促進をもたらした。Ling et al. (2015), Science, 349: 650-655. ALS/FTD患者の死後の脳組織は隠れエクソンスプライシングの抑制障害を示すので、この研究は、TDP-43が通常、隠れエクソンのスプライシングを抑制し、イントロンの完全性を維持するように作用し、TDP-43スプライシング欠陥が特定の神経変性疾患におけるTDP-43タンパク症に寄与してもよいことを示唆している。Ling et al. (2015)、前出。TDP-43のN末端(例えば、NLS)の点突然変異は、核におけるTDP-43オリゴマー化の不安定化と隠れスプライシング調節の喪失をもたらすので、N末端によって駆動されるTDP-43の頭部から尾部へのオリゴマー化は、凝集しやすいC末端ドメイン(例えば、PLD)を分離するように作用し、したがって、病的凝集体の形成を防ぐことが仮定される。Afroz et al. (2017), Nature Communications, 8: 45.

30

40

【0033】

ALSでは、最初に現れる病的特徴の1つは軸索が神経筋接合部から収縮し、筋肉が脱神経されることである。この脱神経は進行し続け、運動ニューロン細胞体の喪失と筋萎縮をもたらす。脱神経は、軸索神経支配のシナプス前マーカー: VACHT、シナプス小胞タンパク質2(SV2)、シナプトフィジン、及びニューロフィラメントの喪失によって観察されてもよい。運動終板は残るが、最終的には断片化し、消失する。最近、疾患に関連する突然変異を含むノックインTARDBP 遺伝子がホモ接合性であるマウスにて用量

50

依存的な脱神経が示された。E b s t e i n , (2 0 1 9) , C e l l R e p o r t s , 2 6 : 3 6 4 - 3 7 3 .

【 0 0 3 4 】

T D P - 4 3 枯渴の胚性致死にもかかわらず、本発明者らはここに機能的構造ドメインを欠くT D P - 4 3 変異型を発現する胚性幹 (E S) 細胞が生存し続け、運動ニューロン (E S M N) に分化してもよいことを示す。図 4 ~ 5 を参照のこと。これらの観察は、本明細書に記載されているようなE SまたはE S M Nが以下の変異型T D P - 4 3 ポリペプチドを発現するという点で独特である：

(1) 機能的構造ドメインを欠く、例えば、機能的N L Sを欠く、機能的R R M 1を欠く、機能的R R M 2を欠く、機能的Eを欠く、または機能的P L Dを欠く、且つ

(2) 内在性転写プロモーター及びプレm R N A スプライシングシグナルから正常レベルで発現される。例えば、図 2 及び図 9 を参照のこと。

本明細書に記載されているE S及びE S M Nを使用して、R R M 1がE S細胞及びそれに由来する運動ニューロンの生存に必要であることが示されている。図 4 ~ 5 を参照のこと。さらに、(1) 機能的N L Sまたは機能的P L Dを欠く、且つ(2) 内在性遺伝子座からの正常レベルでの変異型T D P - 4 3 ポリペプチドの発現はE S M NにおけるA L S疾患の2つの特徴：

(i) 核から細胞質へのT D P - 4 3 の再分布、及び

(i i) 細胞質封入体への蓄積を再現する。図 6 ~ 8 を参照のこと。

【 0 0 3 5 】

P L D 変異型、すなわち機能的なN L Sを含むが、P L Dを欠くT D P - 4 3 ポリペプチドが細胞質にて凝集することは驚くべきことである。例えば、A f r o z e t a l . (2 0 1 7) 、前出を参照のこと。特に、P L D変異型によって形成された点状の封入体は、N L S変異型、すなわち機能的なN L Sを欠き、P L Dを含むT D P - 4 3 ポリペプチドによって形成された封入体よりも豊富ではなく、質的に異なると思われる。さらに、P L DまたはN L Sを発現するE S M NのA L S様表現型は、スプライス事象は通常野生型T D P - 4 3 によって調節される、遺伝子の隠れエクソンスプライシングの抑制の減少と相関する。図 9 。示されているのはまた、E S M NにおけるP L Dまたは

N L Sの変異させたT A R D B P 遺伝子の発現と、P L Dドメイン、またはその一部及び終止コドンコードする配列を欠く選択的スプライシングを受けたT D P - 4 3 のm R N A をもたらす3 ' 非翻訳領域イントロンが関与する選択的スプライシング事象の減少との間にて相関関係である。図 1 0 ; A v e n d a n o - V a z q u e z e t a l . (2 0 1 2) , G e n e s & D e v . 2 6 : 1 6 7 9 - 8 4 ; A y a l a , Y M . e t a l . (2 0 1 1) , E M B O J . 3 0 : 2 7 7 7 - 2 8 8 も参照のこと。この後者の観察は、正常なスプライス事象に起因する野生型またはA L S関連の配列のみを枯渴させることが、P L D突然変異に関連するA L Sの治療に治療上役立ってもよいことを示唆している。

【 0 0 3 6 】

内在性遺伝子座から野生型T A R D B P 遺伝子及びP L DまたはN L Sの変異させたT A R D B P 遺伝子が発現しているマウスもT D P - 4 3 タンパク症の特徴を示した。野生型タンパク質のみしか発現していない動物と比べて核から細胞質へのT D P - 4 3 の誤った局在、細胞質T D P - 4 3 のリン酸化、及びT D P - 4 3 の細胞質凝集の増加が、変異型P L DまたはN L SのT D P - 4 3 ポリペプチドを発現している動物の脊髄運動ニューロンで観察された(図 1 3 A ~ 1 3 B、及び1 4)。機能的なN L Sを欠くT D P - 4 3 変異型は不溶性だったが、P L Dを欠くT D P - 4 3 変異型は不溶性ではなかった(図 1 3 C)。さらに、変異型P L DまたはN L SのT D P - 4 3 タンパク質を発現しているこれらのマウスでは、主に速筋線維で構成される筋肉の脱神経が観察されたが、主に遅筋線維で構成される筋肉の脱神経は観察されなかった(図 1 5 A ~ B)。

【 0 0 3 7 】

本明細書で提供されている発見は、生存可能な胚性幹 (E S) 細胞、及びそれに由来する組織及び非ヒト動物 (例えば、それに由来する原始外胚葉、運動ニューロン (E S M N

10

20

30

40

50

))におけるTDP - 43突然変異を評価する方法だけでなく、機能的構造ドメインを欠く変異型TDP - 43ポリペプチドを発現するES細胞、ESMN細胞、及び非ヒト動物も提供する。機能的構造ドメインを欠く変異型TDP - 43ポリペプチドを発現しているES細胞、ESMN細胞、非ヒト動物(例、齧歯類、例、ラット及びマウス)は、それぞれTDP - 43タンパク症の試験管内または生体内のモデルとして、例えば、そのための治療候補を特定する方法にて使用されてもよい。

【0038】

TARDBP遺伝子及びTDP - 43ポリペプチド

【0039】

TARDBP遺伝子は、TARDNA結合タンパク質、TARDBP、43 - KD、及びTDP43、及びTDP - 43とも呼ばれるTDP - 43ポリペプチドをコードする。さまざまな種の野生型TARDBP遺伝子の核酸配列及びそれからコードされる野生型TDP - 43ポリペプチドは当該技術分野で周知である。例えば、野生型TARDBP遺伝子及び野生型TDP - 43ポリペプチドのそれぞれの核酸及びアミノ酸の配列は、米国国立医学図書館(NIH)国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)遺伝子データベースで見いだされてもよい。例えば、www.ncbi.nlm.nih.gov/genes/?term=TARDBPのウェブサイトを参照のこと。いくつかの実施形態では、野生型マウスのTARDBP遺伝子は、GenBank受入番号NP_663531(配列番号1)として示されるアミノ酸配列を含む野生型マウスTDP - 43ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、または保存的なアミノ酸置換のためにそれとは異なるその変異体を含む。いくつかの実施形態では、野生型マウスTARDBP遺伝子は、GenBank受入番号NM_145556.4(配列番号2)として示される核酸配列を含み、または遺伝子コードの縮重及び/または保存的なコドン置換のためにそれとは異なるその変異体を含む。いくつかの実施形態では、野生型ラットTARDBP遺伝子は、GenBank受入番号NP_001011979(配列番号3)として示されるアミノ酸配列を含む野生型ラットTDP - 43ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、または保存的なアミノ酸置換のためにそれとは異なるその変異体を含む。いくつかの実施形態では、野生型ラットTARDBP遺伝子は、GenBank受入番号NM_001011979.2(配列番号4)として示される核酸配列を含み、または遺伝子コードの縮重及び/または保存的なコドン置換のためにそれとは異なるその変異体を含む。いくつかの実施形態では、野生型ヒトTARDBP遺伝子はGenBank受入番号NP_031401.1(配列番号5)として示されるアミノ酸、または保存的なアミノ酸置換のためにそれとは異なるその変異体を含むTDP - 43ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、野生型ヒトTARDBP遺伝子はGenBank受入番号NM_007375.3(配列番号6)として示される核酸配列、または遺伝子コードの縮重及び/または保存的なコドン置換のためにそれとは異なるその変異体を含む。

【0040】

本明細書に記載されているのは変異させたTARDBP遺伝子である。変異させたTARDBP遺伝子はノックアウト突然変異を含んでもよい。変異させたTARDBP遺伝子は、変異型TDP - 43ポリペプチドをコードしてもよく、その際、変異型TDP - 43ポリペプチドは機能的構造ドメインを欠いている。例えば、変異させたTARDBP遺伝子は、点突然変異、構造ドメインの一部または全部の範囲内での挿入、及び/または一部または全部の欠失を含むTDP - 43構造ドメインをコードするヌクレオチド配列を含んでもよく、その際、点突然変異、挿入、及び/または欠失は、構造ドメインの機能喪失をもたらす、且つ、突然変異のために機能的構造ドメインを欠く変異型TDP - 43ポリペプチドにもかかわらず、変異させたTARDBP遺伝子は依然としてTDP - 43ポリペプチドをコードする。ポリペプチドは変異型TDP - 43ポリペプチドと呼ばれてもよく、その際、それは少なくとも1つの野生型TDP - 43構造ドメインまたはその変異体を含む、及び/またはそれは抗TDP - 43抗体またはその抗原結合部分によって特異的に結合される。同様に、変異させたTARDBP遺伝子は、変異させたTARDBP遺伝子

10

20

30

40

50

が変異型 TDP - 43 ポリペプチド、例えば、少なくとも 1 つの野生型 TDP - 43 構造ドメインまたはその変異体を含む、及び/または抗 TDP - 43 抗体またはその抗原結合部分によって特異的に結合されてもよいポリペプチドをコードするように分類されてもよい。

【0041】

TDP - 43 構造ドメインは、核局在化シグナル (NLS)、2 つの RNA 認識モチーフ (RRM1 及び RRM2)、推定核外輸送シグナル (E)、及びグリシンに富むプリオン様ドメイン (PLD) として特定されている。図 1 及び 2 を参照のこと。野生型 TDP - 43 ポリペプチドは、アミノ酸 82 ~ 99 にて TDP - 43 の NLS、アミノ酸 106 ~ 176 にて TDP - 43 の RRM1、アミノ酸 191 ~ 262 にて TDP - 43 の RRM2、アミノ酸 239 ~ 248 にて TDP - 43 の E、及びアミノ酸 274 ~ 414 にて TDP - 43 の PLD を含む。

【0042】

従来の NLS 配列は、塩基性アミノ酸の区間、主にリジン (K) 及びアルギニン (R) 残基を含み、二分割 NLS は、約 10 ~ 13 のアミノ酸を含むリンカー領域によって分離されたこれらの塩基性アミノ酸の 2 つのクラスターを含む。従来の NLS の塩基性アミノ酸配列のアミノ酸の置換及び/または欠失は従来の NLS の機能を無効にしてもよい。McLane and Corbett, (2009), IUBMB Life, 61: 697 - 706. TDP - 43 の NLS は、82、83、84、95、97、及び 98 位にてリジン残基及びアルギニン残基を含む。82、83、84、95、97、及び/または 98 位にてアミノ酸の置換及び/または欠失を含むように修飾された野生型 TDP - 43 ポリペプチドは機能的 NLS を欠いてもよい。機能的 NLS を欠く変異型 TDP - 43 ポリペプチドは、82、83、84、95、97、及び/または 98 位にてアミノ酸の置換及び/または欠失を含むように修飾された配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。機能的 NLS を欠く変異型 TDP - 43 ポリペプチドは、82、83、84、95、97、及び/または 98 位にてアミノ酸の置換及び/または欠失を含むように修飾された配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。機能的 NLS を欠く変異型 TDP - 43 ポリペプチドは、82、83、84、95、97、及び/または 98 位にてアミノ酸の置換及び/または欠失を含むように修飾された配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。したがって、機能的 TDP - 43 の NLS を欠く変異型 TDP - 43 タンパク質をコードする変異させた TARD BP 遺伝子は、(i) 82、83、84、95、97、及び/または 98 及びそれらの組み合わせから成る群から選択される位置にてアミノ酸置換を、及び/または (ii) 82 位と 98 位での及びその間のアミノ酸の欠失を含むように修飾された配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 5 として示される配列を含む TDP - 43 ポリペプチドをコードする配列を含んでもよい。機能的な TDP - 43 の NLS を欠く変異型 TDP - 43 タンパク質をコードする変異させた TARD BP 遺伝子は、K82A K83A、R84A、K95A、K97A、K98A またはそれらの組み合わせから成る群から選択されるアミノ酸置換を含むように修飾された配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 5 として示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。機能的な TDP - 43 の NLS を欠く変異型 TDP - 43 タンパク質をコードする変異させた TARD BP 遺伝子は、以下のアミノ酸置換：K82A K83A、R84A、K95A、K97A、及び K98A を含むように修飾された配列番号 1、配列番号 3 または配列番号 5 として示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。

【0043】

典型的な RRM による RNA 結合はふつう、典型的な RRM の 4 本鎖逆平行 シートの表面と一本鎖 RNA との間で行われる接触によって達成される。Melamed et al. (2013), RNA, 19: 1537 - 1551. 中央の 2 つの鎖における 2 つの高度に保存されたモチーフ、RNP1 (コンセンサス K/R - G - F/Y - G/A - F/Y - V/I/L - X - F/Y、X は任意のアミノ酸) と RNP2 (コンセンサス I/V

/ L - F / Y - I / V / L - X - N - L、Xは任意のアミノ酸)はRNA結合の主要なメディエーターである。Melamed et al. (2013)、前出。

【0044】

野生型TDP-43ポリペプチドのアミノ酸106位~176位に位置するTDP-43のRRM1は、アミノ酸106位~111位に位置するRNP2コンセンサス配列(LIVLGL;配列番号7)及びアミノ酸145位~152位に位置するRNP1コンセンサス配列(KGFGFVRF;配列番号8)を含む。以前、W113、T115、F147、F149、D169、R171、及びN179は核酸結合の重要な残基として特定された。(i)113、115、147、149、169、171、179及びそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される位置でのアミノ酸置換、(ii)106~176位にて及びその間での任意のアミノ酸の欠失または置換、(iii)106~111位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、(iv)145~152位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、または(v)(i)~(iv)の任意の組み合わせを含むように修飾された野生型TDP-43ポリペプチドは機能的なRRM1を欠いてもよい。機能的なRRM1を欠く変異型TDP-43ポリペプチドは、(i)113、115、147、149、169、171、179及びそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される位置でのアミノ酸置換、(ii)106~176位にて及びその間での任意のアミノ酸の欠失または置換、(iii)106~111位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、(iv)145~152位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、または(v)(i)~(iv)の任意の組み合わせを含むように修飾された配列番号1として示される配列を含んでもよい。機能的なRRM1を欠く変異型TDP-43ポリペプチドは、(i)113、115、147、149、169、171、179及びそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される位置でのアミノ酸置換、(ii)106~176位にて及びその間での任意のアミノ酸の欠失または置換、(iii)106~111位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、(iv)145~152位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、または(v)(i)~(iv)の任意の組み合わせを含むように修飾された配列番号3として示される配列を含んでもよい。機能的なRRM1を欠く変異型TDP-43ポリペプチドは、(i)113、115、147、149、169、171、179及びそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される位置でのアミノ酸置換、(ii)106~176位にて及びその間での任意のアミノ酸の欠失または置換、(iii)106~111位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、(iv)145~152位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、または(v)(i)~(iv)の任意の組み合わせを含むように修飾された配列番号5として示される配列を含んでもよい。したがって、機能的なRRM1を欠く変異型TDP-43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子は、(i)113、115、147、149、169、171、179及びそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される位置でのアミノ酸置換、(ii)106~176位にて及びその間での任意のアミノ酸の欠失または置換、(iii)106~111位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、(iv)145~152位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、または(v)(i)~(iv)の任意の組み合わせを含むように修飾された配列番号1、配列番号3、または配列番号5として示されるアミノ酸配列を含むTDP-43ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。機能的RRM1を欠く変異型TDP-43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子は、F147L及び/またはF149Lの突然変異を含むように修飾された配列番号1、配列番号3、または配列番号5として示されるアミノ酸配列を含むTDP-43ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。機能的RRM1を欠く変異型TDP-43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子は、以下のアミノ酸置換 F147L及び/またはF149Lを含むように修飾された配列番号1、配列番号3、または配列番号5として示されるアミノ酸配列を含むTDP-43ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドのアミノ酸 1 9 1 位 ~ 2 6 2 位に位置する T D P - 4 3 の R R M 2 は、アミノ酸 1 9 3 位 ~ 1 9 8 位に位置する R N P 2 コンセンサ配列 (V F V G R C ; 配列番号 9) 及びアミノ酸 2 2 7 位 ~ 2 3 3 位に位置する R N P 1 コンセンサ配列 (R A F A F V T ; 配列番号 1 0) を含む。 F 1 9 4 及び F 2 2 9 は核酸結合の重要な残基と見なされてもよい。(i) 1 9 4 及び / または 2 2 9 から成る群から選択される位置でのアミノ酸置換、(i i) 1 9 3 ~ 1 9 8 位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、(i i i) 2 2 7 ~ 2 3 3 位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、(i v) 1 9 1 ~ 2 6 2 位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、または (v) (i) ~ (i v) の任意の組み合わせを含むように修飾された野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドは機能的な R R M 2 を欠いてもよい。機能的な R R M 2 を欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは、(i) 1 9 4 及び / または 2 2 9 から成る群から選択される位置でのアミノ酸置換、(i i) 1 9 3 ~ 1 9 8 位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、(i i i) 2 2 7 ~ 2 3 3 位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、(i v) 1 9 1 ~ 2 6 2 位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、または (v) (i) ~ (i v) の任意の組み合わせを含むように修飾された配列番号 1 として示される配列を含んでもよい。機能的な R R M 2 を欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは、(i) 1 9 4 及び / または 2 2 9 から成る群から選択される位置でのアミノ酸置換、(i i) 1 9 3 ~ 1 9 8 位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、(i i i) 2 2 7 ~ 2 3 3 位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、(i v) 1 9 1 ~ 2 6 2 位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、または (v) (i) ~ (i v) の任意の組み合わせを含むように修飾された配列番号 3 として示される配列を含んでもよい。機能的な R R M 2 を欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは、(i) 1 9 4 及び / または 2 2 9 から成る群から選択される位置でのアミノ酸置換、(i i) 1 9 3 ~ 1 9 8 位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、(i i i) 2 2 7 ~ 2 3 3 位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、(i v) 1 9 1 ~ 2 6 2 位にて及びその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、または (v) (i) ~ (i v) の任意の組み合わせを含むように修飾された配列番号 5 として示される配列を含んでもよい。したがって、機能的 R R M 2 を欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子は、(i) 野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドの 1 9 4 位及び / または 2 2 9 位でのアミノ酸置換、(i i) 1 9 1 位 ~ 2 6 2 位でのまたはその間の任意のアミノ酸の欠失または置換、または (i i i) (i) と (i i) の双方を含むように修飾された配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 5 として示されるアミノ酸配列を含む T D P - 4 3 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。機能的 R R M 2 を欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子は、F 1 9 4 L 及び / または F 2 2 9 L の突然変異を含むように修飾された配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 5 として示されるアミノ酸配列を含む T D P - 4 3 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。機能的 R R M 2 を欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子は、F 1 9 4 L 及び F 2 2 9 L の突然変異を含むように修飾された配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 5 として示されるアミノ酸配列を含む T D P - 4 3 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。

【 0 0 4 6 】

野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドの核外輸送シグナルはアミノ酸 2 3 9 位 ~ 2 4 8 位に位置してもよい。機能的な核外輸送シグナルを欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは、2 3 6 ~ 2 5 1 位にて及びその間で任意のアミノ酸の欠失を含むように修飾された配列番号 1 として示されるアミノ酸配列を含んでもよい。核外輸送シグナルを欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは、少なくともアミノ酸 2 3 9 ~ 2 5 0 の欠失を含むように修飾された配列番号 1 として示されるアミノ酸配列を含んでもよい。核外輸送シグナルを欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは、2 3 6 位 ~ 2 5 1 位にて及びその間で任意のアミノ酸の

10

20

30

40

50

欠失を含むように修飾された配列番号3として示されるアミノ酸配列を含んでもよい。核外輸送シグナルを欠く変異型TDP-43ポリペプチドは、少なくともアミノ酸239~250の欠失を含むように修飾された配列番号3として示されるアミノ酸配列を含んでもよい。核外輸送シグナルを欠く変異型TDP-43ポリペプチドは、236~251位にて及びその間で任意のアミノ酸の欠失を含むように修飾された配列番号5として示されるアミノ酸配列を含んでもよい。核外輸送シグナルを欠く変異型TDP-43ポリペプチドは、少なくともアミノ酸239~250の欠失を含むように修飾された配列番号5として示されるアミノ酸配列を含んでもよい。したがって、機能的な核外輸送シグナルを欠く変異型TDP-43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子は、236~251にて及びその間でアミノ酸の欠失、例えば、239~250にて及びその間でアミノ酸の欠失を含むように修飾された配列番号1、配列番号3、または配列番号5として示されるアミノ酸配列を含むTDP-43ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。

10

【0047】

野生型TDP-43ポリペプチドのプリオン様ドメイン(PLD)はアミノ酸274~414に位置してもよい。機能的PLDを欠く変異型TDP-43ポリペプチドは、274~414位にて及びその間で少なくとも1つまたはすべてのアミノ酸の欠失を含むように修飾された配列番号1として示されるアミノ酸配列を含んでもよい。機能的PLDを欠く変異型TDP-43ポリペプチドは、274~414位にて及びその間で少なくとも1つまたはすべてのアミノ酸の欠失を含むように修飾された配列番号3として示されるアミノ酸配列を含んでもよい。機能的PLDを欠く変異型TDP-43ポリペプチドは、274~414位にて及びその間で少なくとも1つまたはすべてのアミノ酸の欠失を含むように修飾された配列番号5として示されるアミノ酸配列を含んでもよい。したがって、変異型TDP-43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子は、274~414位にて及びその間で少なくとも1つまたはすべてのアミノ酸の欠失を含むように修飾された配列番号1、配列番号3、または配列番号5として示されるアミノ酸配列を含むTDP-43ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。

20

【0048】

変異させたTARDBP遺伝子は図3Aに示す構造を含んでもよい。変異させたTARDBP遺伝子は図3Aに示す変異型TDP-43ポリペプチドをコードしてもよい。

30

【0049】

変異型TARDBP遺伝子を含み、発現する細胞及び非ヒト動物の作製方法

【0050】

上記で概説したように、例えば、変異させたTARDBP遺伝子を含む細胞を作製するために、及び/またはTDP-43構造ドメインの生物学的機能を評価するために、TARDBP遺伝子座の標的遺伝子操作を可能にする方法及び組成物が本明細書で提供されている。さらに、追加の標的遺伝子操作を行うことができることが認識されている。これらの標的遺伝子操作を可能にするそのようなシステムは、種々の構成要素を採用することができ、参照を容易にするために、本明細書では、「標的ゲノム統合システム」という用語は一般的に、統合事象に必要なすべての構成要素(すなわち、種々のヌクレアーゼ剤、認識部位、挿入DNAポリヌクレオチド、標的指向化ベクター、標的ゲノム遺伝子座等)を含む。

40

【0051】

変異型TDP-43ポリペプチドを発現する非ヒト動物細胞を作製する方法及び/またはTDP-43構造ドメインの生物学的機能を評価するための方法は、変異させたTARDBP遺伝子を含むように細胞のゲノムを操作することを含んでもよい。変異させたTARDBP遺伝子は変異型TDP-43ポリペプチドをコードしてもよく、その際、変異型TDP-43ポリペプチドは機能的構造ドメインを欠く。

【0052】

変異型TDP-43ポリペプチドを発現する非ヒト動物細胞を作製する方法及び/また

50

はTDP-43構造ドメインの生物学的機能を評価するための方法は、変異させたTARDBP遺伝子を含むように細胞のゲノムを操作することを含んでもよく、その際、変異させたTARDBP遺伝子はノックアウト突然変異を含む。

【0053】

本明細書で提供されている方法は、標的ゲノム統合システムの種々の構成要素を含む1以上のポリヌクレオチドまたはポリペプチド構築物を細胞に導入することを含む。「導入すること」は、配列が細胞の内部にアクセスできるように配列（ポリペプチドまたはポリヌクレオチド）を細胞に提示することを意味する。本明細書で提供されている方法は、標的ゲノム統合システムの任意の構成要素を細胞に導入するための特定の 방법에依存せず、ポリヌクレオチドが少なくとも1つの細胞の内部にアクセスできるということだけである。ポリヌクレオチドを種々の細胞型に導入する方法は当該技術分野で既知であり、安定的形質移入法、一過性形質移入法、及びウイルスが介在する方法が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0054】

いくつかの実施形態では、方法及び組成物で採用される細胞はそれらのゲノムに安定して組み込まれるDNA構築物を有する。「安定して組み込まれる」または「安定して導入される」とは、ヌクレオチド配列が細胞のゲノムに組み込まれ、その子孫によって受け継がれることができるように、ポリヌクレオチドを細胞に導入することを意味する。DNA構築物または標的ゲノム統合システムの種々の構成要素の安定した組み込みに任意のプロトコールが使用されてもよい。

20

【0055】

形質移入プロトコールならびにポリペプチドまたはポリヌクレオチドの配列を細胞に導入するためのプロトコールはさまざまであってもよい。非限定的な形質移入法には、リポソーム；ナノ粒子；リン酸カルシウム（Graham et al. (1973). *Virology*, 52(2): 456-67, Bacchetti et al. (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74(4): 1590-4 and, Kriegler, M (1991). *Transfer and Expression: A Laboratory Manual*. New York: W. H. Freeman and Company. pp. 96-97)；デンドリマー；またはDEAEデキストランもしくはポリエチレンイミンのようなカチオンポリマーの使用を含む化学系の形質移入法が挙げられる。非化学的方法には、電気穿孔法、ソノポレーション、及び光学形質移入が挙げられる。粒子に基づく形質移入には、遺伝子銃の使用、磁石支援形質移入が挙げられる（Bertram, J. (2006), *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7, 277-28)。ウイルスによる方法も形質移入に使用することができる。

30

【0056】

変異させたTARDBP遺伝子を含む細胞は、本明細書で開示されている種々の方法を使用して生成することができる。操作することは、内在性TARDBP遺伝子を、変異型TDP-43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子で置き換えること、及び/または内在性TARDBP遺伝子を、条件付きノックアウト突然変異のようなノックアウト突然変異を含むTARDBP遺伝子で置き換えることを含んでもよい。操作することは、ノックアウト突然変異を含むTARDBP遺伝子の発現を排除する条件で細胞を培養することを含んでもよい。TARDBP遺伝子の発現を排除してもよい条件には、リコンビナーゼタンパク質、例えば、cre-リコンビナーゼの発現が含まれてもよい。

40

【0057】

そのような操作方法は、(1)本明細書で開示されている方法を用いて非ヒト動物の多能性細胞の目的の標的TARDBPゲノム遺伝子座に変異させたTARDBP遺伝子を組み込み、該標的TARDBPゲノム遺伝子座にて変異させたTARDBP遺伝子を含む遺伝子操作された多能性細胞を生成することと；(2)標的TARDBPゲノム遺伝子座に変異させたTARDBP遺伝子を有する遺伝子操作された多能性細胞を選択することとを

50

含んでもよい。(3) 遺伝子操作された多能性細胞を、例えば、桑実胚前の段階で非ヒト動物の宿主胚に導入することと；(4) 遺伝子操作された多能性細胞を含む宿主胚を代理母に着床させて、遺伝子操作された多能性細胞に由来するF0世代を生成することによってさらに動物が生成されてもよい。非ヒト動物は、非ヒト哺乳動物、齧歯類、マウス、ラット、ハムスター、サル、農業用哺乳動物または家畜、または魚または鳥であることができる。

【0058】

多能性細胞は、ヒトES細胞、非ヒトES細胞、齧歯類ES細胞、マウスES細胞、ラットES細胞、ハムスターES細胞、サルES細胞、農業用哺乳類ES細胞、または家畜化された哺乳類ES細胞であることができる。他の実施形態では、多能性細胞は非ヒト細胞、哺乳類細胞、ヒト細胞、非ヒト哺乳類細胞、ヒト多能性細胞、ヒトES細胞、ヒト成人幹細胞、発達が制限されたヒト前駆細胞、ヒトiPS細胞、齧歯類細胞、ラット細胞、マウス細胞、ハムスター細胞である。一実施形態では、標的にされた遺伝子操作は変異させたTARDBP遺伝子をもたらす。

10

【0059】

マウス多能性細胞、全能性細胞、または宿主胚は、例えば、近交系、交雑系、及び非近交系を含む任意のマウス系統に由来することができる。マウス系統の例には、129系統、C57BL系統(例えば、C57BL/6系統)、129とC57BL/6の交雑(例えば、50%129及び50%C57BL/6)、BALB/c系統、及びSwiss Webster系統が挙げられる。129系統の例には、129P1、129P2、129P3、129X1、129S1(例、129S1/SV、129S1/SvIm)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6(129/SvEvTac)、129S7、129S8、及び129T2が挙げられる(例えば、Festing et al. (1999), Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome, 10:836を参照のこと)。C57BL系統の例には、C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr、及びC57BL/01aが挙げられる。マウスは、前述の129系統(例えば、129S6(129/SvEvTac)系統)と前述のC57BL/6系統の交雑、1以上の前述の129系統の交雑、または1以上の前述のC57BL系統の交雑であることができる。マウスは129系統を除く系統に由来することもできる。

20

30

【0060】

ラットの多能性細胞、全能性細胞、または宿主胚は、例えば、近交系、交雑系、及び非近交系を含む任意のラット系統に由来することができる。ラット系統の例には、ACIラット系統、Dark Agouti(DA)ラット系統、Wistarラット系統、LEAラット系統、Sprague Dawley(SD)ラット系統、またはFisher F344やFisher F6のようなFischerラット系統が挙げられる。ラットの多能性細胞、全能性細胞、または宿主胚はまた、上記の2以上の系統の交雑に由来する系統から得ることもできる。例えば、ラット多能性細胞、全能性細胞、または宿主胚はDA系統及びACI系統から選択される系統に由来することができる。ACIラット系統は白い腹と足、及びRT1^{av}1ハプロタイプと共に黒アグーチを有することを特徴とする。このような系統は、Harkan Laboratoriesを含む種々の供給源から入手できる。ACIラット由来のラットES細胞株の例はACI.G1ラットES細胞である。Dark Agouti(DA)ラット系統は、アグーチ被毛とRT1^{av}1ハプロタイプを有することを特徴とする。そのようなラットは、Charles River及びHarlan Laboratoriesを含む種々の供給源から入手できる。DAラット由来のラットES細胞株の例は、DA.2BラットES細胞株またはDA.2CラットES細胞株である。ラット系統の他の例は、例えば、US2014/0235933、US2014/0310828、及びUS2014/0309487に提供されており、それ

40

50

らのそれぞれは、すべての目的のためにその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。
【0061】

例えば、生殖細胞系列伝達性のラットES細胞は、N2サブプリメント、B27サブプリメント、約50U/mL～約150U/mLの白血病抑制因子(LIF)及びMEK阻害剤とGSK3阻害剤からなる阻害剤の組み合わせを含む培地にてフィーダー細胞層上で単離されたラットES細胞を培養することによって得ることができ、その際、フィーダー細胞層はLIFを発現するように操作されておらず、ラットES細胞は：(i)選択マーカーを含む異種ポリヌクレオチドのラットES細胞のゲノムへの少なくとも1回の挿入を含む標的遺伝子操作を含むように操作されており、生殖細胞系列を介して標的遺伝子操作を伝達することができ；(ii)正常な核型を有し；(iii)c-Mycの発現を欠き；且つ(iv)培養物中に球状の浮遊コロニーを形成する(例えば、それぞれが参照によってその全体が組み込まれる、US 2014-0235933 A1及びUS 2014-0310828 A1を参照のこと)。ラット胚性幹細胞の派生及び標的操作の他の例は、例えば、Yamamoto et al. ("Derivation of rat embryonic stem cells and generation of protease-activated receptor-2 knockout rats," Transgenic Res. 21:743-755, 2012)及びKwamata and Ochiya ("Generation of genetically modified rats from embryonic stem cells," Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107(32):14223-14228, 2010)に提供されている。

10

20

【0062】

核移植技術も非ヒト動物を生成するのに使用することができる。簡単に言えば、核移植の方法には、(1)卵母細胞を除核すること；(2)脱核した卵母細胞と結合するドナー細胞または核を単離すること；(3)細胞または核を脱核した卵母細胞に挿入して再構成された細胞を形成すること；(4)再構成された細胞を動物の子宮に移植して胚を形成すること；及び(5)胚の発生を可能にすることという工程が含まれる。そのような方法では、卵母細胞は一般に死亡した動物から採取されるが、生きている動物の卵管及び/または卵巣からも分離されてもよい。卵母細胞は、除核の前に当業者に知られている種々の培地で成熟させることができる。卵母細胞の除核は当業者に周知の多くの方法で実施することができる。脱核した卵母細胞にドナーの細胞または核を挿入して再構成細胞を形成することはふつう、融合前に透明帯の下にドナー細胞を微量注入することによる。融合は、接触/融合面を横切るDC電気パルスの印加(電気融合)によって、ポリエチレングリコールのような融合促進化学物質への細胞の曝露によって、またはセンダイウイルスのような不活化ウイルスによって誘導されてもよい。再構成された細胞は通常、核ドナー及びレシピエント卵母細胞の融合の前に、最中に、及び/または後に電氣的及び/または非電氣的手段によって活性化される。活性化の方法には、電気パルス、化学的に誘導されるショック、精子による侵入、卵母細胞における二価カチオンのレベルの上昇、及び卵母細胞における細胞タンパク質のリン酸化の減少(キナーゼ阻害剤による)が挙げられる。活性化された再構成された細胞、または胚は通常、当業者に周知の培地で培養され、次いで、動物の子宮に移される。例えば、US 20080092249、WO/1999/005266 A2、US 20040177390、WO/2008/017234 A1、及び米国特許第7,612,250号を参照のこと、これらのそれぞれは参照によって本明細書に組み込まれる。

30

40

【0063】

(a)本明細書に記載されている種々の方法を用いて原核細胞にて非ヒト動物の標的ゲノムTARDBP遺伝子座を操作することと；(b)標的ゲノム遺伝子座にて遺伝子操作を含む操作された原核細胞を選択することと；(c)操作された原核細胞のゲノムから遺伝子操作された標的指向化ベクターを単離することと；(d)非ヒト動物の多能性細胞に遺伝子操作された標的指向化ベクターを導入して、標的TARDBPゲノム遺伝子座に挿

50

入核酸を含む遺伝子操作された多能性細胞を生成することと；(e) 遺伝子操作された多能性細胞を選択することと；(f) 桑実胚前の段階で、遺伝子操作された多能性細胞を非ヒト動物の宿主胚に導入することと；(g) 遺伝子操作された多能性細胞を含む宿主胚を代理母に移植して、遺伝子操作された多能性細胞に由来するF0世代を生成することとを含む、生殖細胞系列に本明細書に記載されている1以上の遺伝子操作を含む非ヒト動物を作製するための他の方法が提供される。そのような方法では、標的指向化ベクターは大きな標的指向化ベクターを含むことができる。非ヒト動物は、非ヒト哺乳動物、齧歯類、マウス、ラット、ハムスター、サル、農業用哺乳動物または家畜哺乳動物であることができる。多能性細胞は、ヒトES細胞、非ヒトES細胞、齧歯類ES細胞、マウスES細胞、ラットES細胞、ハムスターES細胞、サルES細胞、農業用哺乳類ES細胞、または家畜哺乳類ES細胞であることができる。他の実施形態では、多能性細胞は、非ヒト細胞、哺乳類細胞、ヒト細胞、非ヒト哺乳類細胞、ヒト多能性細胞、ヒトES細胞、ヒト成人幹細胞、発達が制限されたヒト前駆細胞、ヒトiPS細胞、ヒト細胞、齧歯類細胞、ラット細胞、マウス細胞、ハムスター細胞である。一実施形態では、標的にされた遺伝子操作は、変異させたTARDBP遺伝子、例えば、機能的構造ドメインを欠く変異型TDP-43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子及び/またはロックアウト突然変異を含む変異させたTARDBP遺伝子をもたらす。

【0064】

さらなる方法では、単離工程(c)は、(c1) 遺伝子操作された標的指向化ベクター(すなわち、遺伝子操作されたLTVEC)を線形化することをさらに含む。その上さらなる実施形態では、導入工程(d)はさらに、(d1) 多能性細胞にヌクレアーゼ剤を導入して相同組換えを促進することを含む。一実施形態では、選択工程(b)及び/または(e)は、本明細書に記載されているように選択可能な薬剤を原核細胞または多能性細胞に適用することによって実行される。一実施形態では、選択工程(b)及び/または(e)は、本明細書に記載されているような対立遺伝子操作(MOA)アッセイを介して実行される。

【0065】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている標的ゲノム遺伝子座の種々の遺伝子操作は、VELOCI GENE(登録商標)遺伝子工学技術(例えば、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第6,586,251号及びValenzuela, D. M. et al. (2003)、Nature Biotechnology, 21(6): 652-659を参照のこと)を用いた細菌人工染色体(BAC)DNAに由来するLTVECを用いた細菌細胞における一連の相同組換え反応(BHR)によって実行することができる。

【0066】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているような種々の遺伝子操作を含む標的にされた多能性細胞及び/または全能性細胞は、挿入ドナー細胞として使用され、VELOCI MOUSE(登録商標)法(例えば、すべて参照によってその全体が本明細書に組み込まれるUS7,576,259、US7,659,442、US7,294,754、及びUS2008-0078000A1を参照のこと)を介して対応する生物、例えば、8細胞期マウス胚から前桑実胚期に導入される。遺伝子操作された多能性細胞及び/または全能性細胞を含む非ヒト動物胚は胚盤胞期までインキュベートし、次に代理母に着床させてF0世代を生成する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているような種々の遺伝子操作を含む標的にされた哺乳動物ES細胞は胚盤胞期胚に導入される。遺伝子操作されたゲノム遺伝子座(すなわち、TARDBP遺伝子座)を持つ非ヒト動物は、本明細書に記載されているような対立遺伝子の操作(MOA)アッセイを介して特定することができる。遺伝子操作された多能性及び/または全能性細胞に由来する得られたF0世代の非ヒト動物を野生型の非ヒト動物と交配してF1世代の子孫を得る。特定のプライマー及び/またはプローブによる遺伝子型決定に続いて、遺伝子操作されたゲノム遺伝子座についてヘテロ接合性であるF1非ヒト動物を互いに交配して、遺伝子操作されたゲ

10

20

30

40

50

ノム遺伝子座についてホモ接合性である F 2 世代の非ヒト動物の子孫を作り出す。

【 0 0 6 7 】

一実施形態では、変異させた T R A D B P 遺伝子を含む細胞を作製する方法が提供される。(a) 多能性細胞を、変異させた T A R D B P 遺伝子または 5 ' 及び 3 ' の相同性アームに隣接するその変異させた部分を含む標的指向化構築物と接触させることを含むそのような方法 ; その際、標的指向化構築物は、細胞のゲノム内の T A R D B P 遺伝子座との相同組換えを受けて操作された多能性細胞を形成する。非ヒト動物を作製する方法はさらに、(b) 操作された多能性細胞を宿主胚に導入することと ; (c) 代理母にて宿主胚を妊娠させることを含み、その際、代理母は操作された T A R D B P 遺伝子座を含む子孫を生み出し、前記遺伝子操作は、機能的構造ドメインを欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをもたらす。

10

【 0 0 6 8 】

いくつかの実施形態では、変異させた T A R D B P 遺伝子を含む細胞は、変異させた T A R D B P 遺伝子を含むように E S 細胞を操作し、分化培地にて E S 細胞を試験管内で培養することによって作製されてもよい。いくつかの実施形態では、E S 細胞を試験管内で培養することは、E S 細胞を原始外胚葉細胞または胚性幹細胞由来運動ニューロン (E S M N) に分化させることを含む。

【 0 0 6 9 】

細胞及び動物

【 0 0 7 0 】

本明細書で開示されている細胞 (非ヒト動物組織または非ヒト動物内に含まれてもよい) は、本明細書で開示されているような変異させた T A R D B P 遺伝子を含む任意の種類の細胞であってもよい。細胞は、変異させた非ヒト動物の T A R D B P 遺伝子 (例えば、非ヒト動物の変異させた T A R D B P 遺伝子) または変異させたヒト T A R D B P 遺伝子を含んでもよい。

20

【 0 0 7 1 】

細胞は、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を含んでもよく、その際、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは機能的構造ドメインを欠き、細胞は変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する。例えば、細胞は、核局在化シグナル (N L S) 、 R N A 認識モチーフ 1 (R R M 1) 、 R N A 認識モチーフ 2 (R R M 2) 、推定核外輸送シグナル (E) 、プリオン様ドメイン (P L D) 、またはそれらの組み合わせを含む機能的構造ドメインを欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を含んでもよい。細胞は、以下 : (a) N L S におけるアミノ酸の点突然変異 (例えば、K 8 2 A K 8 3 A 、 R 8 4 A 、 K 9 5 A 、 K 9 7 A 、 K 9 8 A またはそれらの組み合わせ) 、 (b) R R M 1 のアミノ酸の点突然変異 (例えば、F 1 4 7 L 及び / または F 1 4 9 L) (c) R R M 2 のアミノ酸の点突然変異 (F 1 9 4 L 及び / または F 2 2 9 L) 、 (d) 核外輸送シグナルの少なくとも一部の欠失 (例えば、野生型 T D P - 4 3 タンパク質の 2 3 9 位と 2 5 0 位での及びその間のアミノ酸の欠失) 、及び (e) プリオン様ドメインの少なくとも一部の欠失 (例えば、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドの 2 7 4 位及び 4 1 4 位での及びその間のアミノ酸の欠失) の 1 以上に起因して機能的構造ドメインを欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を含んでもよい。細胞は、以下の突然変異 : K 8 2 A K 8 3 A 、 R 8 4 A 、 K 9 5 A 、 K 9 7 A 、 及び K 9 8 A を含む変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を含んでもよく、その際、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは機能的 N L S を欠く。細胞は、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドの 2 7 4 位から 4 1 4 位のアミノ酸で欠失を含む変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を含んでもよく、その際、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは機能的 P L D を欠く。細胞は、点突然変異 F 1 4 7 L 及び F 1 4 9 L を含む変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を含んでもよく、その際、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは機能的 R R M 1 を欠く。細胞は、点突然変異 F 1 9 4

30

40

50

L及びF 2 2 9 Lを含む変異型T D P - 4 3ポリペプチドをコードする変異させたT A R D B P遺伝子を含んでもよく、その際、変異型T D P - 4 3ポリペプチドは機能的R R M 2を欠く。細胞は、野生型T D P - 4 3ポリペプチドの2 3 9位から2 5 0位のアミノ酸で核外輸送シグナルの欠失を含む変異型T D P - 4 3ポリペプチドをコードする変異させたT A R D B P遺伝子を含んでもよく、その際、変異型T D P - 4 3ポリペプチドは機能的Eを欠く。

【 0 0 7 2 】

細胞は、T A R D B P遺伝子の全コード配列のノックアウト突然変異、例えば、条件付きノックアウト突然変異、欠失などを含む変異させたT A R D B P遺伝子を含んでもよい。細胞は、条件付きノックアウト突然変異を含む変異させたT A R D B P遺伝子を含んでもよく、例えば、変異させたT A R D B P遺伝子は、部位特異的組換え認識配列、例えば、1 0 x p配列を含んでもよい。細胞はT D P - 4 3コード配列を含むエクソン、例えば、エクソン3に隣接する1 0 x p配列を含む変異させたT A R D B P遺伝子を含んでもよい。細胞は1 0 x p配列を含み、且つT D P - 4 3コード配列、例えば、エクソン3を欠く変異させたT A R D B P遺伝子を含んでもよい。細胞はT D P - 4 3コード配列全体を欠く変異させたT A R D B P遺伝子、例えば、T D P - 4 3ポリペプチドのコード配列全体の欠失を含む変異させたT A R D B P遺伝子を含んでもよい。

10

【 0 0 7 3 】

いくつかの実施形態では、細胞は例えば、その生殖細胞系列ゲノムにて内在性のT A R D B P遺伝子座に挿入された変異させたT R A D B P遺伝子を含んでもよい。いくつかの実施形態では、細胞は、変異させたT A R D B P遺伝子、例えば、ノックアウト突然変異を含む変異させたT A R D B P遺伝子、及び/または内在性T A R D B P遺伝子座にて内在性T A R D B P遺伝子を置換する変異型T D P - 4 3ポリペプチドをコードする変異させたT A R D B P遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、変異させたT A R D B P遺伝子は内在性T A R D B Pプロモーター及び/または調節要素に作動可能に連結される。

20

【 0 0 7 4 】

細胞は変異させたT A R D B P遺伝子に対してヘテロ接合性またはホモ接合性であってもよい。二倍体生物には2つの対立遺伝子を有し、相同染色体の対の各遺伝子座で1つの対立遺伝子を有する。対立遺伝子の各対は特定の遺伝子座の遺伝子型を表す。遺伝子型は、特定の遺伝子座に2つの同一の対立遺伝子がある場合はホモ接合性であり、2つの対立遺伝子が異なる場合はヘテロ接合性であると説明される。

30

【 0 0 7 5 】

細胞は、(i) 内在性T A R D B P遺伝子座にて、変異型T D P - 4 3ポリペプチドをコードする変異させたT A R D B P遺伝子によって内在性T A R D B P遺伝子を置換すること、及び(i i) 相同染色体の他方の内在性T A R D B P遺伝子座にて、ノックアウト突然変異を含む変異させたT A R D B P遺伝子を含んでもよい。

【 0 0 7 6 】

変異させたT A R D B P遺伝子を含む細胞はそこからコードされる変異型T D P - 4 3ポリペプチドを発現してもよい。変異させたT A R D B P遺伝子を含み、そこからコードされる変異型T D P - 4 3ポリペプチドを発現する細胞は、野生型T D B - 4 3ポリペプチドを発現してもよいし、または発現しなくてもよい。

40

【 0 0 7 7 】

変異させたT A R D B P遺伝子を含む細胞は、そこからコードされる変異型T D P - 4 3ポリペプチドを発現してもよく、以下(i) 対照細胞における野生型T A R D B P遺伝子のm R N A転写レベルに匹敵するレベルの変異させたT A R D B P遺伝子のm R N A転写物のレベル、(i i) 対照細胞における野生型T D P - 4 3ポリペプチドのレベルと比べて変異型T D P - 4 3ポリペプチドのレベルの上昇、(i i i) 変異型T D P - 4 3ポリペプチドは細胞の核よりも細胞質にて高い濃度で見いだされる、(i v) 変異型T D P - 4 3ポリペプチドは野生型T D P - 4 3ポリペプチドと比べて不溶性の増加を示す、(v) 変異型T D P - 4 3ポリペプチドを含む細胞質凝集体、(v i) 野生型T D P - 4 3

50

を発現する細胞と比べて遺伝子の隠れエクソンのスプライシングの増加、(vii) TDP-43のPLDをコードする配列を欠く選択的スプライシングを受けたTDP-43 mRNAのレベルの減少；の1以上を特徴としてもよい。

【0078】

細胞は、試験管内で培養されてもよく、生体外または生体内で調べられてもよい。例えば、細胞は動物内で生体内にあることができる。

【0079】

細胞は、例えば、真菌細胞（例えば、酵母）、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、及びヒト細胞を含む真核細胞であってもよい。「動物」という用語は、例えば、哺乳類、魚類、爬虫類、両生類、鳥類、及び虫類を含む、動物界の任意のメンバーを含む。哺乳動物細胞は、例えば、非ヒト哺乳動物細胞、齧歯類細胞、ラット細胞、マウス細胞、またはハムスター細胞であることができる。他の非ヒト哺乳動物には、例えば、非ヒト霊長類、サル、類人猿、オランウータン、ネコ、イヌ、ウサギ、ウマ、雄ウシ、シカ、バイソン、ヒツジ、家畜（例えば、雌ウシ、去勢雄ウシ等のようなウシ種；ヒツジ、ヤギ等のようなヒツジ種；及びブタ及び雄ブタ等のようなブタ種）が挙げられる。鳥類には、例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、ダチョウ、ガチョウ、アヒルなどが挙げられる。家畜や農業用動物も含まれる。「非ヒト動物」という用語はヒトを除外する。いくつかの実施形態では、動物はヒト、またはマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、及びサルやチンパンジーを含むが、これらに限定されない非ヒト霊長類を含むが、これらに限定されない非ヒト動物であることができる。いくつかの実施形態では、非ヒト動物細胞は、齧歯類細胞、例えば、ラット細胞またはマウス細胞である。

【0080】

非ヒト動物は任意の遺伝的背景に由来することができる。例えば、好適なマウスは、129系統、C57BL/6系統、129とC57BL/6の交雑、BALB/c系統、またはSwiss Webster系統に由来することができる。いくつかの実施形態では、129系統には、129P1、129P2、129P3、129X1、129S1（例えば、129S1/SV、129S1/Sv1m）、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6（129/SvEvTac）、129S7、129S8、129T1、及び129T2が挙げられる。例えば、すべての目的のためにその全体が参照によって本明細書に組み込まれるFesting et al. (1999), Mammalian Genome, 10:836を参照のこと。C57BL系統の例には、C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaL_wN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6Nj、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr、及びC57BL/Olaが挙げられる。好適なマウスはまた、前述の129系統と前述のC57BL/6系統（例えば、50%129及び50%C57BL/6）の交雑に由来することもできる。同様に、好適なマウスは、前述の129系統の交雑または前述のBL/6系統の交雑（例えば、129S6（129/SvEvTac）系統）に由来することができる。

【0081】

同様に、ラットは、例えば、ACIラット系統、Dark Agouti (DA)ラット系統、Wistarラット系統、LEAラット系統、Sprague Dawley (SD)ラット系統、またはFisher F344やFisher F6のようなFischerラット系統を含むラット系統に由来することができる。ラットはまた、上記の2以上の系統の交雑に由来する系統から得ることもできる。例えば、好適なラットはDA系統またはACI系統に由来することができる。ACIラット系統は、白い腹と足、及びRT1^{av1}ハプロタイプを持つ黒いアグーチを持っていることを特徴とする。このような系統はHarkan Laboratoriesを含む種々の供給源から入手できる。Dark Agouti (DA)ラット系統は、アグーチ被毛とRT1^{av1}ハプロタイプを有することを特徴とする。そのようなラットは、Charles River及びHarlan Laboratoriesを含む種々の供給源から入手できる。いくつかの好適なラットは

近交系ラット系統に由来することができる。例えば、すべての目的のためにその全体が参照によって本明細書に組み込まれる、US 2014/0235933号を参照のこと。

【0082】

細胞はまた、任意のタイプの未分化状態または分化状態であることもできる。例えば、細胞は、全能性細胞、多能性細胞（例えば、ヒト多能性細胞、またはマウス胚性幹（ES）細胞またはラットES細胞のような非ヒト多能性細胞）、または非多能性細胞であってもよい。全能性細胞には、任意の細胞型を生じさせることができる未分化細胞が含まれ、多能性細胞には、複数の分化細胞型に発達する能力を有する未分化細胞が含まれる。そのような多能性及び/または全能性細胞は、例えば、ES細胞または人工多能性幹（iPS）細胞のようなES様細胞であることができる。ES細胞には、胚への導入時に発生中の胚の任意の組織に寄与することができる胚由来の全能性細胞または多能性細胞が含まれる。ES細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来することができ、3つの脊椎動物の胚葉（内胚葉、外胚葉、及び中胚葉）のいずれかの細胞に分化することができる。

10

【0083】

細胞はまた、ES細胞に由来してもよい。例えば、細胞は、ニューロン細胞（例えば、ES細胞由来運動ニューロン（ESMN））、原始外胚葉様細胞、胚様体細胞などであることができる。

【0084】

本明細書で提供されている細胞はまた、生殖細胞（例えば、精子または卵母細胞）であることもできる。細胞は、有糸分裂能力のある細胞または有糸分裂で不活性な細胞、減数分裂で有能な細胞または減数分裂で不活性な細胞であることができる。同様に、細胞はまた、初代体細胞または初代体細胞ではない細胞であることもできる。体細胞には、配偶子、生殖細胞、配偶子細胞、または未分化幹細胞ではない任意の細胞が含まれる。

20

【0085】

本明細書で提供されている好適な細胞には初代細胞も含まれる。初代細胞には、生物、臓器、または組織から直接単離されている細胞または細胞の培養物が含まれる。初代細胞には形質転換されず、不死でもない細胞が含まれる。初代細胞には、組織培養で以前に継代されていない、または組織培養で以前に継代されているが、組織培養で無期限に継代することができない生物、臓器、または組織から得られる任意の細胞が含まれる。

【0086】

本明細書で提供されている他の好適な細胞には不死化細胞が含まれる。不死化細胞には、通常無期限に増殖しないが、突然変異または変化のせいで正常な細胞老化を回避し、代わりに分裂を受け続けることができる多細胞生物由来の細胞が含まれる。このような突然変異または変化は、天然に生じることができ、または意図的に誘導され得る。多数の種類の不死化細胞が周知である。不死化細胞または初代細胞には、組換え遺伝子または組換えタンパク質を培養するまたは発現させるのに通常使用される細胞が含まれる。

30

【0087】

本明細書で提供されている細胞にはまた、1細胞期の胚（すなわち、受精した卵母細胞または接合子）も含まれる。そのような1細胞期の胚は、任意の遺伝的背景（例えば、マウスについてはBALB/c、C57BL/6、129、またはそれらの組み合わせ）に由来することができ、新鮮であることができ、または凍結することができ、且つ自然繁殖または体外受精に由来することができる。

40

【0088】

変異型TDP-43ポリペプチドを発現するシステムを採用する方法

【0089】

変異させたTARDBP遺伝子を含み、本明細書に記載されているようにそこからコードされる機能的構造ドメインを欠く変異型TDP-43ポリペプチドを発現する細胞及び非ヒト動物（及びそのような細胞を含む組織または動物）は、TDP-43構造ドメインの機能及び/またはTDP-43タンパク症を研究するためのモデルを提供する。例えば、変異させたTARDBP遺伝子を含み、機能的構造ドメインを欠くそれからコードされ

50

る変異型 TDP - 43 ポリペプチドを発現する細胞または非ヒト動物は TDP - 43 タンパク症に特徴的な表現型を示してもよい。いくつかの実施形態では、例えば、(a) 変異させた TARDDBP 遺伝子を含み、機能的構造ドメインを欠くそれからコードされる変異型 TDP - 43 ポリペプチドを発現する胚性幹細胞由来運動ニューロン (ESMN)、及び/または (b) 内在性 TARDDBP 遺伝子座にて内在性 TARDDBP 遺伝子の変異させた TARDDBP 遺伝子による置換を含み、そこから変異型 TDP - 43 ポリペプチドを発現する非ヒト動物から単離された、細胞は、以下 (i) 対照細胞における野生型 TARDDBP 遺伝子の mRNA 転写レベルのレベルに匹敵する変異させた TARDDBP 遺伝子の mRNA 転写物のレベル、(ii) 対照細胞における野生型 TDP - 43 ポリペプチドのレベルと比べて変異型 TDP - 43 ポリペプチドのレベルの上昇、(iii) 変異型 TDP - 43 ポリペプチドは細胞の核よりも細胞質に高濃度で見いだされる、(iv) 変異型 TDP - 43 ポリペプチドは野生型 TDP - 43 ポリペプチドと比べて不溶性の増加を示す、(v) 変異 TDP - 43 ポリペプチドを含む細胞質凝集体、(vi) 野生型 TDP - 43 を発現する細胞と比べて遺伝子の隠れエクソンのスプライシングの増加、(vii) TDP - 43 の PLD をコードする配列を欠く選択的スプライシングを受けた TDP - 43 mRNA のレベルの低下、の 1 以上を特徴としてもよい。

10

【0090】

したがって、変異させた TARDDBP 遺伝子を含み、本明細書に記載されているようにそこからコードされる機能的構造ドメインを欠く変異型 TDP - 43 ポリペプチドを発現する細胞 (及びそのような細胞を含む組織または動物) は、TDP - 43 タンパク症の 1 以上の症状の阻害 (例えば、変異型 TDP - 43 ポリペプチドの細胞質蓄積) を治療する、予防する及び/または抑制するための治療候補薬剤を特定するためのシステム、及び/または野生型 TDP - 43 ポリペプチドの生物学的機能を復元する (例えば、隠れエクソンスプライシングの抑制及び/または TDP - 43 mRNA の選択的スプライシングのレベルを上げる) ためのシステムを提供する。いくつかの実施形態では、治療剤の効果は、変異させた TARDDBP 遺伝子を含み、そこからコードされる機能的構造ドメインを欠く変異型 TDP - 43 ポリペプチドを発現している細胞を治療候補薬剤と接触させることによって判定される。接触は試験管内で実行されてもよい。接触は動物に治療候補薬剤を投与することを含んでもよい。

20

【0091】

いくつかの実施形態では、アッセイを実施することは、薬物と接触した細胞または動物の表現型及び/または遺伝子型に対する効果を判定することを含む。いくつかの実施形態では、アッセイを実施することは、薬物のロット間の変動性を決定することを含む (いくつかの実施形態では、アッセイを実施することは、投与された薬物と接触した本明細書に記載されている細胞または動物に対する効果と対照細胞または対照動物 (例えば、野生型 TDP - 43 を発現する) との間の差異を判定することを含む)。

30

【0092】

薬物の薬物動態特性を評価するために非ヒト動物で (またはそこから単離された細胞にて及び/またはそれを使用して) 測定されてもよい例示的なパラメーターには、凝集、自食作用、細胞分裂、細胞死、補体介在性の溶血、DNA 完全性、薬物特異的抗体力価、薬物代謝、遺伝子発現アレイ、代謝活性、ミトコンドリア活性、酸化ストレス、食作用、タンパク質生合成、タンパク質分解、タンパク質分泌、ストレス応答、標的組織薬物濃度、非標的組織薬物濃度、転写活性などが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0093】

完全長 TDP - 43 mRNA を選択的に減らすためのオリゴヌクレオチド

【0094】

図 11A は、完全長の TDP - 43 のプレ - mRNA と、その 3' 末端で発生する正常な (上部パネル) 及び選択的な (下部パネル) のスプライス事象を説明する。示されているように、エクソン 6 は、正常なスプライス事象で形成された完全長 TDP - 43 タンパク質のプリオン様ドメイン (PLD) をコードし、そのコード配列は PLD の末端で終結す

50

る。2つの新しいエクソン(7及び8)は、エクソン6内の少なくとも3つの選択的5'-スプライス部位の1つから下流の選択的3'-スプライス部位まででの、例えば、新しいエクソン7に隣接する選択的スプライシング事象によって形成される。選択的エクソン7から選択的エクソン8までの第2の選択的スプライシング事象の証拠がある。

【0095】

マウスでは、本明細書に記載されているエクソン6内またはエクソン6の先頭にある選択的5'-スプライス部位は以下の位置:(a)第4染色体:148,618,647;(b)第4染色体:148,618,665;(c)第4染色体:148,618,674にマッピングされる。エクソン7の選択的3'-スプライス部位は第4染色体の位置:148,617,705にマッピングされる。エクソン7からエクソン8までの第2の選択的スプライシング事象は第4染色体:148,617,566から第4染色体:148,616,844で発生する。当業者は、他のTARDBP遺伝子、例えば、ヒトTARDBP遺伝子における同様の選択的5'及び3'スプライス部位を決定することができるであろう。

10

【0096】

エクソン6内の選択的5'-スプライス部位から下流の選択的3'-スプライス部位までの選択的スプライシングは、PLDコード配列のほとんどがPLDを欠くTDP-43ポリペプチドをコードする配列で置き換えられたmRNAを生成すると予測される。例えば、(a)第4染色体:148,618,647;(b)第4染色体:148,618,665;及び(c)第4染色体:148,618,674のいずれか1つから第4染色体:148,617,705(及びヒトTARDBP遺伝子のいずれかの対応する位置)までの選択的スプライシングは、PLDコード配列のほとんどが、PLDが18アミノ酸に置き換えられているPLDを欠くTDP-43の切り詰めた形態をコードすると予測される選択的mRNAで置き換えられたmRNAを作り出してもよい。オープンリーディングフレームはエクソン7の5'-スプライス部位の上流にてエクソン7で停止するので、この第2の選択的スプライシング事象は新しい形態のTDP-43タンパク質を作り出さない。

20

【0097】

PLDを欠くTDP-43が特に運動ニューロンにて生存能力を支えることができるという観察結果、及びPLDまたはNLSの変異させたTARDBP遺伝子を発現している細胞におけるこの選択的スプライシングを受けたTDP-43 mRNAのレベルの低下は、それらのALS様の表現型と共に、この選択的スプライシングを受けたTDP-43 mRNA及びその翻訳された切り詰め産物がTDP-43タンパク症に寄与しなくてもよく、且つTDP-43タンパク症に対して予防的であってもよいことを示唆している。PLDを含有するタンパク質の形態をコードするTDP-43のmRNAアイソフォームを除去するまたは不活性化するように設計されたsiRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び/またはCRISPR/Cas9システムの適用は、PLDがない切り詰められたTDP-43タンパク質を生じる選択的スプライシングを受けたmRNAを温存する一方で病的凝集を起こしやすいTDP-43の変異体を枯渇させてもよい。TDP-43の切り詰め形態は、細胞の生命、特に運動ニューロンの生存能力をさらに支える一方で、病的凝集に耐性であってもよい。

30

40

【0098】

したがって、治療戦略は、PLDをコードする配列を含むそれらのTDP-43 mRNA配列、例えば、エクソン6内の選択的スプライス部位に続くゲノム配列によってコードされる配列を含むそれらのmRNAのみを標的とする活性アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)またはsiRNAを見つけることから成る。非限定的な例として、ASOまたはsiRNAはPLDドメインをスプライシングで取り除く選択的5'スプライス部位をコードするコドン(複数可)の後にTARDBP遺伝子から転写された配列を含むmRNAを標的としてもよい。TDP-43 mRNAのこの領域を標的とするように設計されたASOまたはsiRNAは、PLDを含むTDP-43ポリペプチドをコードする完全長TDP-43 mRNAのみを認識する一方で、PLDを欠く、切り詰められ、保護

50

された可能性がある TDP - 43 ポリペプチドをコードする選択的スプライシングを受けた TDP - 43 mRNA を温存する。言い換えれば、そのような ASO または siRNA は、選択的スプライシングを受けた TDP - 43 mRNA の分解を認識するまたは増強することができるはずがない。ASO または siRNA は、TDP - 43 ポリペプチドのアミノ酸 287 ~ 414 またはエクソン 7 の 3' 選択的スプライス部位の上流にある任意の 3' 非翻訳領域をコードする TDP - 43 mRNA 配列を標的としてもよい。ASO は RNA 分解酵素 H が介在する切断による、例えば、-5 - 10 - 5 ギャップマーを介した mRNA の分解を促進してもよい。siRNA は、RNA 干渉による mRNA の分解及びまたはタンパク質合成を促進してもよい。

【0099】

別の治療戦略は、TARDBP 遺伝子のエクソン 6 内の選択的 5' スプライス部位及び下流の 3' スプライス部位、例えば、エクソン 7 にまたがるゲノム配列を選択的に標的にして欠失させるための CRISPR / Cas システムの適用である。このようにして、PLD を欠く切り詰められた TDP - 43 ポリペプチドをコードする mRNA のみが転写されてもよい。

【0100】

A. アンチセンスオリゴヌクレオチド及び siRNA

【0101】

プレ mRNA 内の配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) 及び低分子干渉 RNA (siRNA) は望ましくないアイソフォームの分解を増強してもよい。本明細書で設計されるように、ASO または siRNA は、選択的スプライシングを受けた TDP - 43 mRNA を温存しながら、PLD をコードする TDP - 43 mRNA を破壊するのに使用されてもよい。完全長 TDP - 43 mRNA のみのレベルを低下させるために、ASO または siRNA は、エクソン 6 内の選択的 5' スプライス部位から (ii) 下流の選択的 3' スプライス部位までの間の配列を含む TDP - 43 mRNA、例えば、TDP - 43 ポリペプチドのアミノ酸 287 ~ 414 をコードする配列及び / または選択的スプライス部位の上流の任意の 3' 非翻訳領域を含む TDP - 43 mRNA を標的としてもよい。図 11A を参照のこと。いくつかの実施形態では、エクソン 6 内の選択的 5' スプライス部位は、(a) マウス第 4 染色体 : 148, 618, 647; (b) マウス第 4 染色体 : 148, 618, 665; (c) マウス第 4 染色体 : 148, 618, 674、及び (d) ヒト TARDBP 遺伝子のいずれかの対応する位置から成る群から選択される TARDBP ゲノム位置に相関する。いくつかの実施形態では、下流の選択的 3' スプライス部位はマウス染色体 4 : 148, 617, 705 またはヒト TARDBP 遺伝子の対応する位置に相関する。

【0102】

PLD をコードする TDP - 43 mRNA を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは siRNA は、強化された阻害活性、標的核酸に対する結合親和性の増大、または生体内ヌクレアーゼによる分解に対する耐性のような特性をアンチセンスオリゴヌクレオチドに付与するためにパターンまたはモチーフで配置された化学修飾サブユニットを有してもよい。

【0103】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは通常、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の増大、細胞取り込みの増加、標的核酸に対する結合親和性の増大、及び / または阻害活性の上昇を付与するように修飾された少なくとも 1 つの領域を含有する。アンチセンスオリゴヌクレオチドの第 2 の領域は任意で、RNA : DNA 二重鎖の RNA 鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼ RNA 分解酵素 H の基質として役立つともよい。

【0104】

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは均一な糖修飾オリゴヌクレオチドである。アンチセンスオリゴヌクレオチドはギャップマーモチーフを含んでもよい。ギャップマーでは、RNA 分解酵素 H の切断を支援する複数のヌクレオチドを有する

10

20

30

40

50

内側領域が、内側領域のヌクレオシドとは化学的に異なる複数のヌクレオチドを有する外側領域の間に配置される。ギャップマーモチーフを有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの場合、ギャップセグメントは一般にエンドヌクレアーゼ切断の基質として役立つ一方で、ウイングセグメントは修飾ヌクレオシドを含む。特定の実施形態では、ギャップマーの領域は各別個の領域を含む糖部分の種類によって区別される。ギャップマーの領域を区別するのに使用される糖部分の種類には、いくつかの実施形態では、 β -D-リボヌクレオシド、 β -D-デオキシリボヌクレオシド、2'-修飾ヌクレオシド(そのような2'-修飾ヌクレオシドには、とりわけ2'-MOEや2'-O-CH₃が挙げられてもよい)、及び二環式糖修飾ヌクレオシドが挙げられてもよい。特定の実施形態では、ウイングは、例えば、2'-MOEを含むいくつかの修飾糖部分を含んでもよい。特定の実施形態では、ウイングはいくつかの修飾糖部分と無修飾糖部分を含んでもよい。特定の実施形態では、ウイングには2'-MOEヌクレオシド及び2'-デオキシヌクレオシドの種々の組み合わせが含まれてもよい。

10

【0105】

異なる領域はそれぞれ均一な糖部分、変異体、または交互の糖部分を含んでもよい。ウイング-ギャップ-ウイングのモチーフは「X-Y-Z」と記載されることが多く、その際、「X」は5'-ウイングの長さを表し、「Y」はギャップの長さを表し、「Z」は3'-ウイングの長さを表す。「X」及び「Z」は均一糖部分、変異体糖部分、または交互の糖部分を含んでもよい。特定の実施形態では、「X」及び「Y」は1以上の2'-デオキシヌクレオシドを含んでもよい。「Y」は2'-デオキシヌクレオシドを含んでもよい。本明細書で使用されるとき「X-Y-Z」と記述されるギャップマーは、ギャップが5'-ウイング及び3'-ウイングのそれぞれと直接隣接して配置されるような構成を有する。したがって、5'-ウイングとギャップの間にも、ギャップと3'-ウイングの間にも介在するヌクレオチドは存在しない。本明細書に記載されているアンチセンス化合物はいずれもギャップマーモチーフを有することができる。特定の実施形態では、「X」及び「Z」が同じであり、他の実施形態では、それらは異なる。特定の実施形態では、「Y」は8~15の間のヌクレオシドである。X、Y、またはZは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30またはそれ以上のヌクレオシドのいずれかであることができる。したがって、本明細書に記載されているギャップマーには、例えば、5-10-5、5-10-4、4-10-4、4-10-3、3-10-3、2-10-2、5-9-5、5-9-4、4-9-5、5-8-5、5-8-4、4-8-5、5-7-5、4-7-5、5-7-4、または4-7-4が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0106】

PLDをコードするTDP-43 mRNA配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは5-10-5ギャップマーモチーフを持ってよい。

【0107】

PLDをコードするTDP-43 mRNA配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドはギャップが狭くなったモチーフを含んでもよい。TDP-43 mRNAを標的とするギャップが狭くなったアンチセンスオリゴヌクレオチドは5、4、3、2、または1の化学的に修飾されたヌクレオシドのウイングセグメントのすぐ隣及びその間に位置する9、8、7、または6の2'-デオキシヌクレオチドのギャップセグメントを有してもよい。化学的に修飾されたヌクレオシドは二環式糖を含んでもよい。二環式糖はnが1または2である4'-(CH₂)_n-O-2'架橋;及び4'-CH₂-O-CH₂-2'の中から選択される4'から2'への架橋を含んでもよい。二環式糖は4'-CH(CH₃)-O-2'架橋を含んでもよい。化学修飾は、非二環式2'修飾糖部分、例えば、2'-O-メチルエチル基または2'-O-メチル基を含んでもよい。いくつかの実施形態では、選択的5'スプライス部位がエクソン6内にあり、例えば、選択的な5'スプライス部位が(a)マウス第4染色体:148,618,647;(b)マウス第4染色体:148,618,665;(c)マウス第4染色体:148,618,674、及び(d)ヒトTARDBP

40

50

遺伝子のいずれかの対応する位置から成る群から選択される T A R D B P ゲノム位置と相関し、且つ選択的 3' スプライス部位が第 4 染色体：1 4 8, 6 1 7, 7 0 5 の T A R D B P ゲノム位置と相関する、選択的な 5' 及び 3' スプライス部位の間の T D P - 4 3 m R N A 配列を標的とするギャップマーモチーフを含むアンチセンスオリゴヌクレオチド。いくつかの実施形態では、s i R N A は選択的 5' スプライス部位と選択的 3' スプライス部位の間で T D P - 4 3 m R N A 配列を標的とする配列を含み、その際、選択的 5' スプライス部位はエクソン 6 内にあり、例えば、選択的 5' スプライス部位は、(a) マウス第 4 染色体：1 4 8, 6 1 8, 6 4 7 ; (b) マウス第 4 染色体：1 4 8, 6 1 8, 6 6 5 ; (c) マウス第 4 染色体：1 4 8, 6 1 8, 6 7 4、及び (d) ヒト T A R D B P 遺伝子のいずれかの対応する位置からなる群から選択される T A R D B P ゲノム位置と相関し、且つ選択的 3' スプライス部位は第 4 染色体：1 4 8, 6 1 7, 7 0 5 の T A R D B P ゲノム位置と相関する。

10

【 0 1 0 8 】

P L D をコードする T D P - 4 3 m R N A 配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは s i R N A は均一に修飾されてもよい。特定の実施形態では、各ヌクレオシドは化学修飾される。特定の実施形態では、化学修飾は非二環式 2' 修飾糖部分を含む。特定の実施形態では、2' - 修飾糖部分は 2' - O - メトキシエチル基を含む。特定の実施形態では、2' - 修飾糖部分は 2' - O - メチル基を含む。

【 0 1 0 9 】

A S O または s i R N A はまた、得られた A S O または s i R N A の活性、細胞分布または細胞取り込みを増強する 1 以上の部分または抱合体に共有結合させてもよい。典型的な抱合基にはコレステロール部分及び脂質部分が挙げられる。追加の抱合基には、炭水化物、リン脂質、ピオチン、フェナジン、葉酸塩、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン及び色素が含まれる。

20

【 0 1 1 0 】

A S O または s i R N A はまた、一般に一方または双方の末端に結合される 1 以上の安定化基を有するように修飾されてもよい。安定化基に含まれるのはキャップ構造である。これらの末端修飾は、末端核酸を有する A S O または s i R N A をエキソヌクレアーゼ分解から保護し、細胞内での送達及び/または局在化に役立つことができる。キャップは、5' 末端 (5' キャップ) または 3' 末端 (3' キャップ) に存在することができる、または双方の末端に存在することができる。キャップ構造は周知であり、例えば、逆デオキシ脱塩基キャップが含まれる。

【 0 1 1 1 】

A S O または s i R N A は、標的核酸 (例えば、T D P - 4 3 プレ - m R N A) に結合する且つ所望の効果を有するのに好適な任意の長さであってもよい。例えば、A S O は、長さ約 1 2 ~ 約 3 0、約 1 2 ~ 約 2 4、約 1 3 ~ 約 2 3、約 1 4 ~ 約 2 2、約 1 5 ~ 約 2 1、約 1 6 ~ 約 2 0、約 1 7 ~ 約 1 9、または約 1 8 のヌクレオシドであることができる。別の例として、A S O は約 8 ~ 約 8 0、約 1 2 ~ 約 5 0、約 1 5 ~ 約 3 0、約 1 8 ~ 約 2 4、約 1 9 ~ 約 2 2、または約 2 0 の連結ヌクレオシドであることができる。あるいは、A S O は長さ約 8、約 9、約 1 0、約 1 1、約 1 2、約 1 3、約 1 4、約 1 5、約 1 6、約 1 7、約 1 8、約 1 9、約 2 0、約 2 1、約 2 2、約 2 3、約 2 4、約 2 5、約 2 6、約 2 7、約 2 8、約 2 9、約 3 0、約 3 1、約 3 2、約 3 3、約 3 4、約 3 5、約 3 6、約 3 7、約 3 8、約 3 9、約 4 0、約 4 1、約 4 2、約 4 3、約 4 4、約 4 5、約 4 6、約 4 7、約 4 8、約 4 9、約 5 0、約 5 1、約 5 2、約 5 3、約 5 4、約 5 5、約 5 6、約 5 7、約 5 8、約 5 9、約 6 0、約 6 1、約 6 2、約 6 3、約 6 4、約 6 5、約 6 6、約 6 7、約 6 8、約 6 9、約 7 0、約 7 1、約 7 2、約 7 3、約 7 4、約 7 5、約 7 6、約 7 7、約 7 8、約 7 9、または約 8 0 の連結されたヌクレオシドであることができる。例えば、A S O は、約 1 5、約 1 6、約 1 7、約 1 8、約 1 9、約 2 0、約 2 1、約 2 2、約 2 3、約 2 4、または約 2 5 の連結されたヌクレオシドから成ることができる。具体的な例では、A S O は約 1 5 ~ 約 2 5 の連結されたヌクレオシドであることができる。

40

50

【 0 1 1 2 】

A S Oまたはs i R N Aは、標的核酸（例えば、T D P - 4 3 プレ m R N A、例えば、P L Dをコードするm R N A配列）に相補性であることができ、及び/または特異的にハイブリッド形成することができる。A S Oの十分な数の核酸塩基が標的核酸の対応する核酸塩基と水素結合することができるので所望の効果が生じる場合、A S Oと標的核酸とは互いに相補性である。特異的にハイブリッド形成可能などは、特異的結合が所望される条件下で（例えば、生理学的条件下で）非標的核酸にほとんどまたはまったく影響を及ぼさない一方で、所望の効果を引き起こすのに十分な程度のA S Oと標的核酸との間で相補性を有するA S Oを指す。

【 0 1 1 3 】

一部のA S Oまたはs i R N AはT D P - 4 3 プレ - m R N Aの等しい長さ部分に対して少なくとも少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%相補性である。あるいは、A S OはT D P - 4 3 プレ m R N Aの等しい長さ部分に対して約100%相補性であることができる。標的核酸とのA S Oの相補性パーセントは常法を使って決定することができる。例えば、A S Oの20核酸塩基中18核酸塩基が標的領域に相補性であるので特異的にハイブリッド形成するA S Oは90パーセントの相補性を示す。標的核酸の領域に対するA S Oの相補性パーセントはB L A S Tプログラム（基本局所配列比較検索ツール）、及び周知であるP o w e r B L A S Tプログラム（例えば、A l t s c h u l s r , J . M o l . B i o l . , 1 9 9 0 , 2 1 5 , 4 0 3 - 4 1 0、Z h a n g a n d M a d d e n , G e n o m e R e s . , 1 9 9 7 , 7 , 6 4 9 - 6 5 6を参照のこと）を使用して日常的に決定することができる。相同性パーセント、配列同一性パーセントまたは相補性パーセントは、例えばS m i t h及びW a t e r m a nのアルゴリズム（A d v . A p p l . M a t h . , 1 9 8 1 , 2 , 4 8 2 - 4 8 9）を使用するG a pプログラム（W i s c o n s i n S e q u e n c e A n a l y s i s P a c k a g e , V e r s i o n 8 f o r U n i x（登録商標）、G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , U n i v e r s i t y R e s e a r c h P a r k , M a d i s o n W i s .）によって、デフォルト設定を使用して決定することができる。

【 0 1 1 4 】

A S Oまたはs i R N Aが標的核酸と特異的にハイブリッド形成し続けることができるという条件で、A S Oまたはs i R N AとT D P - 4 3 プレ m R N Aとの間の非相補性の核酸塩基は認容されてもよい。さらに、A S Oまたはs i R N Aは、介在セグメントまたは隣接セグメントがハイブリッド形成事象（例えば、ループ構造、ミスマッチ、またはヘアピン構造）に関与しないようにT D P - 4 3 プレ - m R N Aの1以上のセグメントにわたってハイブリッド形成してもよい。非相補性核酸塩基の位置はA S Oまたはs i R N Aの5'末端または3'末端であってもよい。あるいは、非相補性の核酸塩基（単数）または核酸塩基（複数）はA S Oまたはs i R N Aの内部位置にあってもよい。2以上の非相補性核酸塩基が存在する場合、それらは連続して（すなわち連結されて）いてもよいし、または不連続であってもよい。

【 0 1 1 5 】

B . T D P - 4 3 の P L D を コードするゲノム配列の欠失

【 0 1 1 6 】

本明細書に示されるように、細胞は機能的なP L Dを欠く変異型T D P - 4 3 ポリペプチドのみを発現しているにもかかわらず、生存し続ける。本明細書に記載されているのはまた、クラスター化された規則的に散在する短いパンドロームリピート（C R I S P R）/ C R I S P R 関連（C a s）システム、またはC R I S P R / C a s システムの1以上の構成要素であり、それを使用して細胞、例えば、胚性幹細胞から、本明細書に記載さ

10

20

30

40

50

れているような内在性 T A R D B P 遺伝子座のタンパク質様ドメイン（またはその一部）を欠失させてもよい。C R I S P R / C a s システムは、細胞、例えば胚性幹細胞から、エクソン 6 の短い形態の 5' スプライス部位でのまたはその近傍での、及びエクソン 7 の 3' スプライス部位でのまたはその近傍でのゲノム配列を欠失させてもよい。そのような構成要素には、例えば、C a s タンパク質及び/またはガイド RNA (g R N A) が挙げられ、g R N A は 2 つの別個の RNA 分子、例えば、ターゲッター RNA (例えば、C R I S P R RNA (c r R N A) 及びアクチベーター RNA (例えば、t r a c r R N A) ; または単一のガイド RNA (例えば、単一分子 g R N A (s g R N A)) を含んでもよい。いくつかの実施形態では、C R I S P R / C a s システムは C a s 9 タンパク質及び少なくとも 1 つの g R N A を含み、その際、g R N A は、(a) 第 4 染色体 : 1 4 8 , 6 1 8 , 6 4 7 ; (b) 第 4 染色体 : 1 4 8 , 6 1 8 , 6 6 5 ; (c) 第 4 染色体 : 1 4 8 , 6 1 8 , 6 7 4、(d) 第 4 染色体 : 1 4 8 , 6 1 7 , 7 0 5 及びそれらの組み合わせから成る群から選択される T A R D B P ゲノム位置のまたはその近傍の配列を認識する。

【 0 1 1 7 】

C R I S P R / C a s システムは C a s 遺伝子の発現に関与する、または C a s 遺伝子の活性を誘導する転写物及び他の要素を含む。C R I S P R / C a s システムは I 型、I I 型、または I I I 型のシステムであることができる。あるいは、C R I S P R / C a s システムは V 型のシステム (例えば、亜型 V - A または亜型 V - B) であることができる。本明細書に記載されている内在性 T A R D B P 遺伝子座における T D P - 4 3 のプリオン様ドメイン (またはその一部) をコードする配列、または 5' 選択的スプライス部位 (例えば、アミノ酸 2 8 8 をコードする配列) と 3' 選択的スプライス部位 (例えば、選択的エクソン 7 に隣接する) の間の配列は、核酸の部位特異的切断のために C R I S P R 複合体 (C a s タンパク質と複合体を形成したガイド RNA (g R N A) を含む) を利用することによって欠失させてもよい。

【 0 1 1 8 】

本明細書に記載されている C R I S P R / C a s システムは C a s タンパク質 (例えば、C a s 1、C a s 1 B、C a s 2、C a s 3、C a s 4、C a s 5、C a s 5 e (C a s D)、C a s 6、C a s 6 e、C a s 6 f、C a s 7、C a s 8 a 1、C a s 8 a 2、C a s 8 b、C a s 8 c、C a s 9 (C s n 1 または C s x 1 2)、C a s 1 0、C a s 1 0 d、C a s F、C a s G、C a s H、C s y 1、C s y 2、C s y 3、C s e 1 (C a s A)、C s e 2 (C a s B)、C s e 3 (C a s E)、C s e 4 (C a s C)、C s c 1、C s c 2、C s a 5、C s n 2、C s m 2、C s m 3、C s m 4、C s m 5、C s m 6、C m r 1、C m r 3、C m r 4、C m r 5、C m r 6、C s b 1、C s b 2、C s b 3、C s x 1 7、C s x 1 4、C s x 1 0、C s x 1 6、C s a X、C s x 3、C s x 1、C s x 1 5、C s f 1、C s f 2、C s f 3、C s f 4、C u 1 9 6 6、及びその相同体または改変体) 及び/またはガイド RNA (g R N A) 認識配列を標的とする 1 以上の g R N A を含んでもよい。本明細書に記載されているような C R I S P R / C a s システムは、C a s タンパク質をコードする核酸 (例えば、プロモーターに作動可能に連結されてもよい) 及び/または g R N A をコードする DNA を含む少なくとも 1 つの発現構築物をさらに含んでもよい。

【 0 1 1 9 】

C a s タンパク質による T A R D B P 遺伝子の部位特異的な結合及び切断は、標的 DNA における (i) g R N A と標的 DNA との間の塩基対の相補性及び (i i) プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) と呼ばれる短いモチーフの双方によって決定される位置で発生することができる。P A M はガイド RNA 認識配列に隣接することができる。任意で、ガイド RNA 認識配列を 3' 末端で P A M に隣接させることができる。あるいは、ガイド RNA 認識配列を 5' 末端で P A M に隣接させることができる。例えば、C a s タンパク質の切断部位は P A M 配列の上流または下流における約 1 ~ 約 1 0、または約 2 ~ 約 5 の塩基対 (例えば 3 塩基対) であることができる。場合によっては (例えば、S . p y o g e n e s 由来の C a s 9 または密接に関連する C a s 9 を使用する場合)、非相補鎖の P A

M配列は5' - N₁ G G - 3' であることができ、式中、N₁は任意のDNAヌクレオチドであり、標的DNAの非相補鎖のガイドRNA認識配列の直近の3'側である。したがって、相補鎖のPAM配列は5' - C C N₂ - 3' であり、式中、N₂は任意のDNAヌクレオチドであり、標的DNAの相補鎖のガイドRNA認識配列の直近の5'側である。いくつかのそのような場合には、N₁とN₂は相補性であることができ、N₁ - N₂塩基対は任意の塩基対であることができる(例えば、N₁ = C及びN₂ = G; N₁ = G及びN₂ = C; N₁ = A及びN₂ = T; またはN₁ = T、及びN₂ = A)。S. aureus由来のCas9の場合、PAMはNNGRRTまたはNNGRRであることができ、式中、NはA、G、C、またはTであることができ、RはGまたはAであることができる。

【0120】

本明細書で開示されているように、ガイドRNAは任意の形態で提供されてもよい。いくつかの実施形態では、gRNAは2つの分子(別個のcrRNA及びtracrRNA)または1つの分子(sgRNA)のいずれかのRNAの形態で、及び任意でCasタンパク質との複合体の形態で提供され得る。gRNAはまた、gRNAをコードするDNAの形態で提供されることもできる。いくつかの実施形態では、gRNAをコードするDNAは、単一のRNA分子(sgRNA)または別個のRNA分子(例えば、別個のcrRNA及びtracrRNA)をコードすることができる(その際、別個のRNA分子は、1つのDNA分子として、またはそれぞれcrRNAとtracrRNAをコードする別個のDNA分子として提供されてもよい)。

【0121】

一実施形態では、本明細書に記載されているCRISPR/Casシステムは、Cas9タンパク質、またはII型CRISPR/CasシステムからのCas9に由来するタンパク質、及び/または少なくとも1つのgRNAを含み、その際、少なくとも1つのgRNAはcrRNA及び/またはtracrRNAをコードするDNAによってコードされる。

【0122】

標的にされた遺伝子操作は、細胞をCasタンパク質及び標的ゲノム遺伝子座内の1以上のガイドRNA認識配列とハイブリッド形成する1以上のガイドRNAと接触させることによって生成することができる。1以上のガイドRNAの少なくとも1つは、Casタンパク質と複合体を形成し、1以上のガイドRNA認識配列の少なくとも1つに誘導することができる。Casタンパク質は1以上のガイドRNA認識配列の少なくとも1つ内の標的ゲノム遺伝子座を切断することができる。Casタンパク質による切断は、二本鎖切断または一本鎖切断(例えば、Casタンパク質がニックアーゼである場合)を作り出すことができる。次に、二本鎖切断または一本鎖切断によって生成された末端配列は組換えを受けることができる。

【0123】

C. オリゴヌクレオチドを導入するための方法

【0124】

オリゴヌクレオチドの細胞への導入を可能にするために、種々の方法及び組成物が本明細書で提供されている。オリゴヌクレオチドを種々の細胞型に導入する方法は公知であり、それらには、例えば、安定的形質移入法、一過性形質移入法、及びウイルス介在性の方法が挙げられる。

【0125】

形質移入プロトコール、と同様にオリゴヌクレオチドを細胞に導入するためのプロトコールは様々であってもよい。非限定的な形質移入法には、リポソーム; ナノ粒子; リン酸カルシウム(Graham et al. (1973), Virology, 52(2): 45-467, Bacchetti et al. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74(4): 1590-1594, 及びKriegler, M(1991), Transfer and Expression: A Laboratory Manual. New York: W.H. Freeman and Comp

10

20

30

40

50

any . pp . 96 - 97) ; デンドリマー ; または D E A E - デキストランもしくはポリエチレンイミンのようなカチオン性ポリマーを使用した化学系の形質移入法が挙げられる。非化学的方法には電気穿孔法、ソノポレーション、及び光学形質移入が挙げられる。粒子に基づく形質移入方法には遺伝子銃の使用、または磁石補助型形質移入が挙げられる (Bertram , (2006) , Current Pharmaceutical Biotechnology , 7 , 277 - 28) 。ウイルスによる方法も形質移入に使用することができる。

【 0 1 2 6 】

細胞へのオリゴヌクレオチドの導入には、電気穿孔法、細胞質内注射、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルスによるウイルス感染、形質移入、脂質を介した形質移入、またはヌクレオフエクシオンが介在することができる。ヌクレオフエクシオンは、核酸基質を細胞質だけでなく核膜を介して核内に送達できるようにする改良された電気穿孔法である。加えて、本明細書で開示されている方法におけるヌクレオフエクシオンの使用は通常、いつもの電気穿孔法よりもはるかに少ない細胞しか必要としない (例えば、いつもの電気穿孔法による 700 万と比べてたった約 200 万) 。一例では、ヌクレオフエクシオンは、LONZA (登録商標) NUCLEOFECTOR (商標) システムを使用して行われる。

10

【 0 1 2 7 】

細胞へのオリゴヌクレオチドの導入は微量注入によって達成することもできる。接合子 (すなわち、1細胞期の胚) では、微量注入は母体及び / または父方の前核または細胞質に行うことができる。微量注入が1つの前核のみに行われる場合は、サイズが大きいため父方の前核が好ましい。微量注入を実行する方法は周知である。例えば、Nagy et al . (Nagy A , Gertsenstein M , Vintersten K , Behringer R . , 2003 , Manipulating the Mouse Embryo , Cold Spring Harbor , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press) を参照のこと ; Meyer et al . (2010) , Proc . Natl . Acad . Sci . USA . 107 : 15022 - 15026 及び Meyer et al . (2012) , Proc . Natl . Acad . Sci . USA . 109 : 9354 - 9359 も参照のこと。

20

【 0 1 2 8 】

オリゴヌクレオチドを細胞に導入するための他の方法には、例えば、ベクター送達、粒子が介在する送達、エクソソームが介在する送達、脂質ナノ粒子が介在する送達、細胞透過性ペプチドが介在する送達、または埋め込み型デバイスが介在する送達が挙げられる。具体例として、オリゴヌクレオチドを、ポリ (乳酸) (PLA) ミクロスフェア、ポリ (D , L - 乳酸 - コグリコール酸) (PLGA) ミクロスフェア、リポソーム、ミセル、逆ミセル、脂質コクリエート、または脂質微小管のような担体にて細胞または非ヒト動物に導入することができる。

30

【 0 1 2 9 】

オリゴヌクレオチドの導入は、AAVが介在する送達またはレンチウイルスが介在する送達のようなウイルスが介在する送達によっても達成することができる。他の例示的なウイルス / ウイルスベクターには、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、及び単純ヘルペスウイルスが挙げられる。ウイルスは、分裂細胞、非分裂細胞、または分裂細胞と非分裂細胞の双方に感染することができる。ウイルスは宿主ゲノムに統合することができ、または代わりに宿主ゲノムに統合されない。そのようなウイルスは、低下した免疫を有するように操作することもできる。ウイルスは、複製能力があることができ、または複製に欠陥があることができる (例えば、ビリオン複製及び / またはパッケージングの追加ラウンドに必要な1以上の遺伝子に欠陥がある) 。ウイルスは、一過性の発現、長期的な発現 (例えば、少なくとも1週間、2週間、1ヵ月、2ヵ月、または3ヵ月) 、または永続的な発現を引き起こすことができる。例示的なウイルス力価 (例えば、AAV力価) には、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、及び 10^{16}

40

50

ベクターゲノム / mL が含まれる。

【0130】

ssDNA AAVゲノムは、2つのオープンリーディングフレーム、RepとCapから成り、相補DNA鎖の合成を可能にする2つの逆方向末端反復配列が隣接している。AAV伝達プラスミドを構築する場合、導入遺伝子は2つのITRの間に配置され、RepとCapはトランスで供給され得る。RepとCapに加えて、AAVはアデノウイルスからの遺伝子を含有するヘルパープラスミドを必要とすることができる。これらの遺伝子(E4、E2a、及びVA)はAAV複製に介在した。例えば、伝達プラスミド、Rep/Cap、及びヘルパープラスミドでアデノウイルス遺伝子E1+を含有するHEK293細胞に形質移入して、感染性AAV粒子を作り出すことができる。あるいは、Rep、Cap、及びアデノウイルスヘルパー遺伝子を組み合わせることで単一のプラスミドにしてもよい。同様のパッケージング細胞及び方法はレトロウイルスのような他のウイルスにも使用することができる。

10

【0131】

AAVの複数の血清型が確認されている。これらの血清型はそれらが感染する細胞の種類(すなわち、それらの向性)で異なり、特定の細胞型の優先的な形質導入を可能にする。CNS組織の血清型にはAAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV8、及びAAV9が挙げられる。心臓組織の血清型には、AAV1、AAV8、及びAAV9が挙げられる。腎臓組織の血清型にはAAV2が挙げられる。肺組織の血清型には、AAV4、AAV5、AAV6、及びAAV9が挙げられる。膵臓組織の血清型にはAAV8が挙げられる。光受容細胞の血清型にはAAV2、AAV5、及びAAV8が挙げられる。網膜色素上皮組織の血清型にはAAV1、AAV2、AAV4、AAV5、及びAAV8が挙げられる。骨格筋組織の血清型にはAAV1、AAV6、AAV7、AAV8、及びAAV9が挙げられる。肝臓組織の血清型にはAAV7、AAV8、及びAAV9、特にAAV8が挙げられる。

20

【0132】

向性は、キャプシドと異なるウイルス血清型からのゲノムとの混合であるシュードタイプ化によってさらに洗練することができる。例えば、AAV2/5は、血清型5のキャプシドにパッケージされた血清型2のゲノムを含有するウイルスを示す。シュードタイプ化ウイルスを使用すると、形質導入効率が改善することができ、同様に向性を変化させることができる。異なる血清型に由来するハイブリッドキャプシドを使用して、ウイルスの向性を変化させることもできる。例えば、AAV-DJは8の血清型のハイブリッドキャプシドを含有し、生体内で幅広い細胞型にわたって高い感染力を示す。AAV-DJ8は、AAV-DJの特性を表示するが、脳への取り込みが強化された別の例である。AAV血清型は突然変異を介しても改変することができる。AAV2の変異修飾の例にはY444F、Y500F、Y730F、及びS662Vが挙げられる。AAV3の変異修飾の例には、Y705F、Y731F、及びT492Vが挙げられる。AAV6の変異修飾の例にはS663V及びT492Vが挙げられる。他のシュードタイプ化された/修飾されたAAV変異体にはAAV2/1、AAV2/6、AAV2/7、AAV2/8、AAV2/9、AAV2.5、AAV8.2、及びAAV/SASTGが挙げられる。

30

40

【0133】

導入遺伝子の発現を加速するために、自己相補性AAV(scAAV)変異体を使用することができる。AAVは細胞のDNA複製機構に依存してAAVの一本鎖DNAゲノムの相補鎖を合成するので、導入遺伝子の発現が遅延してもよい。この遅延に対処するために、感染時に自発的にアニーリングすることができる相補性配列を含有するscAAVを使用することができ、宿主細胞のDNA合成の必要性を排除する。しかしながら、一本鎖AAV(ssAAV)ベクターも使用することができる。

【0134】

オリゴヌクレオチドの導入は脂質ナノ粒子(LNP)が介在する送達によっても達成することができる。脂質製剤は細胞への取り込みを改善する一方で、生体分子を分解から保

50

護することができる。脂質ナノ粒子は分子間力によって互いに物理的に結合した複数の脂質分子を含む粒子である。これらには、ミクロスフェア（単層及び多層ベシクル、例えばリポソームを含む）、エマルジョン中の分散相、ミセル、または懸濁液中の内相が含まれる。そのような脂質ナノ粒子は、送達のために1以上のオリゴヌクレオチドをカプセル化するのに使用することができる。カチオン性脂質を含有する製剤は核酸のようなポリアニオンを送達するのに有用である。含めることができる他の脂質は、中性脂質（すなわち、非荷電または双性イオン脂質）、アニオン性脂質、形質移入を強化するヘルパー脂質、及びナノ粒子が生体内で存在できる時間を長くするステルス脂質である。好適なカチオン性脂質、中性脂質、アニオン性脂質、ヘルパー脂質、及びステルス脂質の例はW O 2 0 1 6 / 0 1 0 8 4 0 A 1に見いだすことができ、すべての目的のためにその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

10

【0135】

生体内での投与は、例えば、非経口、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、くも膜下腔内、腹腔内、局所、鼻腔内、または筋肉内を含む任意の好適な経路によることができる。全身投与様式には、例えば、経口経路及び非経口経路が含まれる。非経口経路の例には、静脈内、動脈内、骨内、筋肉内、皮内、皮下、鼻腔内、及び腹腔内の経路が挙げられる。具体的な例は静脈内注入である。鼻腔内注入及び硝子体内注射は他の特定の例である。局所投与様式には、例えば、髄腔内、脳室内、実質内（例えば、線条体への局所的な実質内送達（例えば、尾状または被殻へ）、大脳皮質、中心前回、海馬（例えば、歯状回またはC A 3領域）、側頭皮質、扁桃体、前頭皮質、視床、小脳、髄質、視床下部、蓋、被蓋、または黒質）、眼内、眼窩内、結膜下、硝子体内、網膜下、及び経強膜の経路が挙げられる。（全身性アプローチと比べて）有意に少量の成分は、全身性（例えば、静脈内）に投与された場合と比べて、局所性（例えば、実質内または硝子体内）に投与された場合に効果を発揮してもよい。局所投与様式はまた、治療有効量の成分が全身投与されるときに起こってもよい潜在的に毒性の副作用の発生を低減してもよく、または排除してもよい。

20

【0136】

細胞培養における試薬（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）の取り込みを促進するための1つの一般的な方法は、核酸を形質移入するためのカチオン性脂質の使用を含む。カチオン性脂質を負に帯電した核酸と混合すると、細胞膜を通過して活性核酸を細胞の細胞質に放出することができる複合体が得られる。試薬（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）を細胞に電気穿孔法で入れることも可能である。この方法は、脂質によって容易に形質移入することができない細胞株に非常に効果的で且つ有用である。

30

【0137】

細胞が生体内にある場合（例えば、動物において）、動物への投与は任意の好適な手段によって行うことができる。例えば、投与は、腹腔内、静脈内、及び皮下のような非経口投与経路を含むことができる。非経口投与とは注入または輸液を介する投与を意味する。非経口投与には、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、動脈内投与、腹腔内投与、または頭蓋内投与（例えば、髄腔内もしくは脳室内投与）が挙げられる。

【0138】

いくつかの方法では、投与は、導入される試薬がニューロンまたは神経系に到達するような手段によるものである。これは、例えば、末梢送達または神経系への直接送達によって達成することができる。例えば、Evers et al. (2015), Adv. Drug Deliv. Res. 87: 90-103（あらゆる目的でその全体が参照によって本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

40

【0139】

試薬（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）が神経系に到達するためには、それらは最初に、血液脳関門または血液脊髄関門で構成される血管関門を通過しなければならない。血管関門を通過するのに使用することができる1つのメカニズムは受容体が介在するエンドサイトーシスである。使用することができる別のメカニズムは、細胞透過性ペプチド（CPP）に基づいた送達システムである。異なるCPPは、細胞の種類とカーゴに

50

依存する別個の細胞転位経路を使用する。例えば、アルギニンに富むC P Pでタグ付けされた全身送達されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは血液脳関門を通過することができる。使用することができる別の送達メカニズムは、タンパク質と核酸の移動を介して細胞間のコミュニケーションに介在することが知られている細胞外小胞であるエクソソームである。例えば、狂犬病ウイルス糖タンパク質(R V G)に由来する短いウイルスペプチドで形質導入されたエクソソームのI V注射は、血液脳関門を通過して脳に送達され得る。

【0140】

脳脊髄液への直接注入を介して血管関門を迂回する技術も利用できる。例えば、試薬(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド)を脳室内(I C V)に注入することができ、その後、試薬(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド)は、実質に入るために脳室系を満たす上皮細胞層を通過しなければならない。髄腔内(I T)送達とは、脊髄のクモ膜下腔への試薬(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド)の送達を意味する。ここから、試薬(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド)は実質に入るには軟膜を通過する必要がある。試薬(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド)は、埋め込まれたりレーザーに接続されている出口カテーテルを介してI C TまたはI Tで送達することができる。薬物はレーザーに注入され、C S Fに直接送達される。鼻腔内投与は使用することができる代替の送達経路である。

【0141】

本発明の範囲は、本明細書に添付された特許請求の範囲によって定義され、本明細書に記載されている特定の実施形態によって限定されない；本開示を読む当業者は、そのような記載された実施形態と同等であってもよい、そうでなければクレーム内であってもよい種々の修正に気付くであろう。一般に、用語は、特に明記しない限り、当該技術分野で理解されている意味に従う。本明細書の範囲内で引用された参考文献、またはその関連部分はその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0142】

請求項要素を修飾するための特許請求の範囲での「第1」、「第2」、「第3」のような序数用語の使用は、それ自体では、ある請求項要素の別の請求項要素に対する優先順位、優位順位、または順序、または方法の動作が実行される時間的順序を意味するものではないが、特定の名称を有する1つの請求項要素を同じ名称(序数用語の使用を別にして)を有する別の要素から区別して請求項要素を区別するためのラベルとして単に使用される。

【0143】

明細書及び特許請求の範囲の冠詞「a」及び「an」は、特に反対に明確に示されていない限り、複数の指示対象を含むと理解されるべきである。群の1以上のメンバーの間に「または」を含む請求項または記載は、その反対が示される、または別途文脈から明白でない限り、1つ、1を超える、または全ての群メンバーが所与の製品または過程において存在する、採用される、または別途関連していれば、満たされると見なされる。本発明は、群の正確に1つのメンバーが、所与の製品または過程において存在する、採用される、または別途関連している実施形態を含む。本発明は、1を超える、または全ての群メンバーが、所与の製品または過程において存在する、採用される、または別途それらに関連している実施形態も含む。さらに、本発明は、列挙された請求項の1以上からの1以上の限定、要素、条項、記述用語等が、別段の指示がない限り、または当業者に矛盾または不一致が生じることが明らかでない限り、同じ基本請求項(または関連する場合は他の請求項)に依存する別の請求項に導入されるすべての変形、組み合わせ、及び順列を包含することを理解すべきである。要素が一覧(例えば、Markush群形式または類似の形式で)として提示された場合、要素の各亜群も開示され、いずれの要素(複数可)もこの群から除去され得ることが理解されるべきである。一般的に、本発明、または本発明の態様が特定の要素、特徴等を含むとして言及している場合、本発明の実施形態または本発明の態様は、そのような要素、特徴等から成る、または本質的に成ることが理解されるべきである。簡潔さを目的として、それらの実施形態はあらゆる場合に、本明細書で文字どおり具体的に記述されているわけではない。特定の除外が明細書に記載されているかどうかに関

10

20

30

40

50

係なく、本発明の任意の実施形態または態様を特許請求の範囲から明示的に除外できることも理解すべきである。

【0144】

「対照」は、結果が比較される標準であるという「対照」の当該技術分野で理解された意味を含む。通常、対照は、変数についての結論を出すためにそのような変数を分離することによって実験における完全性を増強するのに使用される。いくつかの実施形態では、対照は、比較基準を提供するための試験反応またはアッセイと同時に実施される反応またはアッセイである。「対照」は「対照動物」も含む。「対照動物」は本明細書に記載されている改変、本明細書に記載されている異なる改変、または改変なし（すなわち、野生型動物）を有してもよい。1つの実験では、「試験」（すなわち、調べられる変数）が適用される。第2の実験では、「対照」、調べられる変数は適用されない。いくつかの実施形態では、対照は、既存対照（すなわち、既に実施された試験もしくはアッセイ、または既に知られている量もしくは結果の）である。いくつかの実施形態では、対照は、印刷されたまたは別の方法で保存された記録である、またはそれを含む。対照は、正の対照または負の対照であってもよい。

10

【0145】

「決定すること」、「測定すること」、「評価すること」、「評価すること」、「アッセイすること」及び「分析すること」は、任意の形態の測定を含み、要素が存在するかどうかを決定することを含む。これらの用語には、定量的及び/または定性的な決定の双方が含まれる。アッセイは相対的であってもよいし、または絶対的であってもよい。「存在について分析すること」は、存在するものの量を決定すること、及び/またはそれが存在するか存在しないかを決定することであることができる。

20

【0146】

本明細書で相互交換可能に使用される「核酸」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはそれらの類似体または修飾型を含む、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を含む。それらには、一本鎖、二本鎖、及び多本鎖のDNAまたはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、及びプリン塩基、ピリミジン塩基、または他の天然の、化学修飾された、生化学修飾された、非天然の、または誘導体化されたヌクレオチド塩基が含まれる。

【0147】

本明細書で相互交換可能に使用される「タンパク質」、「ポリペプチド」、及び「ペプチド」という用語は、コード化された及びコード化されないアミノ酸及び化学的または生化学的に修飾されたまたは誘導体化されたアミノ酸を含む、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を含む。この用語はまた、修飾されたペプチド骨格を有するポリペプチドのような修飾されているポリマーも含む。「ドメイン」という用語は、特定の機能または構造を有するタンパク質またはポリペプチドの任意の部分を指す。特に明記しない限り、本明細書で言及される任意の構造ドメインはTDP-43構造ドメインを指す。

30

【0148】

「野生型」という用語には、正常の（変異型、病気、変化などとは対照的な）状態または状況で見られるような構造及び/または活性を有する実体が含まれる。野生型の遺伝子及びポリペプチドは、複数の異なる形態（例えば、対立遺伝子）で存在することが多い。

40

【0149】

「内在性」という用語は、細胞内または動物内で自然に見いだされる、または存在する位置、核酸またはアミノ酸の配列を指す。例えば、非ヒト動物の内在性TARDBP配列は、非ヒト動物の内在性TARDBP遺伝子座で自然に存在する野生型TARDBP配列を指す。

【0150】

「遺伝子座」という用語は、遺伝子（または重要な配列）、DNA配列、ポリペプチドをコードする配列の特定の位置、または生物のゲノムの染色体上の位置を指す。例えば、「TARDBP遺伝子座」は、TARDBP遺伝子、TARDBPのDNA配列、TAR

50

D B P 2 をコードする配列の特定の位置、またはどこにそのような配列が存在するかを特定されている生物のゲノムの染色体上の T A R D B P 位置を指してもよい。「T A R D B P 遺伝子座」は、例えば、エンハンサー、プロモーター、5' 及び / または 3' の非翻訳領域 (U T R)、またはそれらの組み合わせを含む、T A R D B P 遺伝子の調節要素を含んでもよい。

【 0 1 5 1 】

「遺伝子」という用語は、産物 (例えば、RNA 産物及び / またはポリペプチド産物) をコードする染色体における DNA 配列を指し、遺伝子が完全長 mRNA (5' 及び 3' 非翻訳配列を含む) に対応するように非コードイントロンによって中断されるコード領域と 5' 及び 3' 末端の双方でコード領域に隣接して位置する配列を含む。遺伝子の他の非コード配列には、調節配列 (例えば、プロモーター、エンハンサー、及び転写因子結合部位)、ポリアデニル化シグナル、内部リボソーム進入部位、サイレンサー隔離配列、及びマトリックス結合領域が含まれる。これらの配列は、遺伝子のコード領域に近くてもよく (例えば、10 kb 以内)、または離れた部位にあってもよく、それらは、遺伝子の転写及び翻訳のレベルまたは速度に影響を与える。

10

【 0 1 5 2 】

「対立遺伝子」という用語は遺伝子の変異形態を指す。いくつかの遺伝子は、染色体上の同じ位置、または遺伝子座に位置する種々の異なる形態を有する。二倍体生物は 2 つの対立遺伝子を有し、それぞれが相同染色体の内在性遺伝子座にある。対立遺伝子の各対は特定の遺伝子座の遺伝子型を表す。遺伝子型は、特定の遺伝子座に 2 つの同一の対立遺伝子がある場合はホモ接合性であり、2 つの対立遺伝子が異なる場合はヘテロ接合性であると記載される。

20

【 0 1 5 3 】

「作動可能に連結された」は、記載されている構成要素がその意図される様式で機能することを可能にする関係にある並置を含む。コード配列に「作動可能に連結された」制御配列は、コード配列の発現が制御配列と適合する条件下で達成されるような方法で連結される。「作動可能に連結された」配列は、目的の遺伝子と連続する発現制御配列、及び目的の遺伝子を制御するためにトランスでまたは遠隔で作用する発現制御配列の双方を含む。「発現制御配列」という用語は、それらが連結しているコード配列の発現及びプロセシングに影響を及ぼすのに必要なポリヌクレオチド配列を含む。発現制御配列は、適切な転写開始配列、終結配列、プロモーター及びエンハンサー配列; スプライシングシグナル及びポリアデニル化シグナルのような効率的な RNA プロセシングシグナル; 細胞質 mRNA を安定させる配列; 翻訳効率を高める配列 (例えば、K o z a k コンセンサス配列); タンパク質の安定性を高める配列; ならびに所望であれば、タンパク質の分泌を高める配列を含む。そのような制御配列の性質は宿主生物に応じて異なる。例えば、原核生物ではそのような制御配列は一般にプロモーター、リボソーム結合部位、及び転写終結配列を含む一方で、真核生物では通常、そのような制御配列はプロモーター及び転写終結配列を含む。「制御配列」という用語は、その存在が発現及びプロセシングに必須である構成要素を含むことが意図され、その存在が有利である、例えば、リーダー配列及び融合パートナー配列である追加の構成要素も含むことができる。

30

40

【 0 1 5 4 】

「表現型」には、細胞もしくは生物によって示される形質、または形質のクラスまたはセットが含まれる。いくつかの実施形態では、特定の表現型は特定の対立遺伝子または遺伝子型と相関してもよい。いくつかの実施形態では、表現型は離散的であってもよく; いくつかの実施形態では、表現型は連続的であってもよい。表現型は細胞の生存能力または細胞適応度を含んでもよい。表現型は、タンパク質、例えば、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドの発現レベル、細胞局在性及び / または溶解性 / 安定性のプロファイルを含んでもよく、これらの表現型のそれぞれは、ウエスタンブロット分析、蛍光原位置ハイブリッド形成、定性的 R T - P C R 等のような周知の方法を用いて決定されてもよい。

【 0 1 5 5 】

50

「プロモーター」は、特定のポリヌクレオチド配列の適切な転写開始部位でRNA合成を開始するようにRNAポリメラーゼIIに指示することができるTATAボックスをふつう含むDNAの調節領域である。プロモーターは転写開始速度に影響を与える他の領域をさらに含んでもよい。本明細書で開示されているプロモーター配列は作動可能に連結されたポリヌクレオチドの転写を調節する。プロモーターは、本明細書で開示されている1以上の細胞型（例えば、真核細胞、非ヒト哺乳動物細胞、ヒト細胞、齧歯類細胞、多能性細胞、一細胞期胚、分化した細胞またはそれらの組み合わせ）において活性があることができる。プロモーターは、例えば、構成的に活性があるプロモーター、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、時間的に制限されたプロモーター（例えば、発生上調節されるプロモーター）、または空間的に制限されたプロモーター（例えば、細胞特異的または組織特異的プロモーター）であることができる。プロモーターの例は、例えば、WO2013/176772に見いだすことができ、あらゆる目的のためにその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

10

【0156】

「参照」には、対象の薬剤、細胞、動物、コホート、個体、集団、試料、配列または値が比較される標準または対照の薬剤、細胞、動物、コホート、個体、集団、試料、配列、または値が含まれる。いくつかの実施形態では、参照の薬剤、細胞、動物、コホート、個体、集団、試料、配列または値は、対象の薬剤、細胞、動物、コホート、個体、集団、試料、配列、または値の試験または決定と実質的に同時に試験され、及び/または決定される。いくつかの実施形態では、参照の薬剤、細胞、動物、コホート、個体、集団、試料、配列または値は、歴史的参照であり、任意で有形媒体に具体化される。いくつかの実施形態では、参照は対照を指してもよい。「参照」には「参照細胞」も含まれる。「参照細胞」は、本明細書に記載されている修飾、本明細書に記載されているように異なる修飾、または修飾なし（すなわち、野生型細胞）を有してもよい。通常、当業者によって理解されるように、参照の薬剤、細胞、動物、コホート、個体、集団、試料、配列または値は、対象の薬剤、動物（例えば、哺乳類）、コホート、個人、母集団、試料、配列、または値を決定するまたは特徴付けるために利用される条件に匹敵する条件下で決定される、または特徴付けられる。

20

【0157】

「変異体」という用語は、参照ヌクレオチド配列とは異なるヌクレオチド配列（例えば、1つのヌクレオチドによって）、または参照アミノ酸配列とは異なるが（例えば、1つのアミノ酸によって）、参照配列の生物学的機能を保持しているタンパク質配列を指す。いくつかの実施形態では、変異体は、遺伝子コードの縮重及び/または保存的コドン/アミノ酸置換のせいで参照配列とは異なる。

30

【0158】

2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列との関係における「配列同一性」または「同一性」という用語は、特定の比較ウィンドウにわたって最大一致するように配列比較したときに同じである、その2つの配列における残基に言及する。タンパク質に関して配列同一性の百分率を使用する場合、同一ではない残基の位置は、保存的なアミノ酸置換によって異なることが多く、アミノ酸残基は、類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を持つ他のアミノ酸残基に置換されるので、分子の機能特性を変えない。配列が保存的置換で異なる場合、配列同一性パーセントは置換の保存的な性質によって補正するように上方調整されてもよい。そのような保守的な置換によって異なる配列は、「配列類似性」または「類似性」を有すると言われる。この調整を行うための手段は周知である。通常、これには、完全なミスマッチではなく部分的なミスマッチとして保守的な置換をスコア化することが含まれ、それによって配列同一性の百分率が増加する。したがって、例えば、同一のアミノ酸に1のスコアが与えられ、非保存的置換にゼロのスコアが与えられる場合、保存的置換にはゼロから1の間のスコアが与えられる。保存的置換のスコア化は、例えば、プログラムPC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California) に実装されているように計算される。

40

50

【 0 1 5 9 】

「配列同一性の百分率」は、比較ウィンドウにわたって2つの最適に整列させた配列を比較することによって決定される値（完全に一致する残基の最大数）を含み、その際、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド配列の部分は、2つの配列の最適な配列比較のための参照配列（付加または欠失を含まない）と比べて付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含んでもよい。百分率は、双方の配列で一致する核酸塩基またはアミノ酸残基が存在する位置の数を決定して一致する位置の数を得ることと、一致した位置の数を比較のウィンドウにおける位置の総数で割ることと、結果に100を乗じて配列同一性の百分率を得ることによって算出される。特に明記されていない限り（例えば、短い方の配列には連結された異種配列が含まれる）、比較ウィンドウは比較される2つの配列のうち短い方の完全長である。

10

【 0 1 6 0 】

特に明記しない限り、配列の同一性/類似性の値には、以下のパラメーター：50のGAP加重及び3の長さ加重を用いたヌクレオチド配列についての%同一性及び%類似性、及びnws gap dna . cmpスコア化マトリックス；2のGAP加重及び3の長さ加重を用いたアミノ酸配列についての%同一性及び%類似性、及びBLOSUM62スコア化マトリックス；またはその同等のプログラムを用いたGAPバージョン10を使用して取得した値が含まれる。「同等のプログラム」には、問題の任意の2つの配列について、GAPバージョン10によって生成された対応する配列比較と比較した場合に、同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の一致と同一のパーセント配列同一性を有する配列比較を生成する任意の配列比較プログラムが含まれる。

20

【 0 1 6 1 】

「保存的アミノ酸置換」という用語は、配列に通常存在するアミノ酸を、類似のサイズ、電荷、または極性を持つ異なるアミノ酸で置換することを指す。保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、またはロイシンのような非極性（疎水性）残基の別の非極性残基への置換が挙げられる。同様に、保存的置換の例には、アルギニンとリジンの間、グルタミンとアスパラギンの間、またはグリシンとセリンの間のような、ある極性（親水性）残基の別の残基への置換が挙げられる。さらに、リシン、アルギニン、またはヒスチジンのような塩基性残基を別の残基に置換すること、またはアスパラギン酸またはグルタミン酸のようなある酸性残基を別の酸性残基に置換することは、保存的置換の追加の例である。非保存的置換の例には、システイン、グルタミン、グルタミン酸またはリジンのような極性（親水性）残基のイソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、またはメチオニンのような非極性（疎水性）アミノ酸残基による置換、及び/または非極性残基の極性残基による置換が挙げられる。典型的なアミノ酸の分類は以下の表1に要約されている。

30

表1 . アミノ酸の分類。

40

50

【表 1】

アラニン	Ala	A	非極性	中性	1.8
アルギニン	Arg	R	極性	正	-4.5
アスパラギン	Asn	N	極性	中性	-3.5
アスパラギン酸 (Asp)	Asp	D	極性	負	-3.5
システイン	Cys	C	非極性	中性	2.5
グルタミン酸	Glu	E	極性	負	-3.5
グルタミン	Gln	Q	極性	中性	-3.5
グリシン	Gly	G	非極性	中性	-0.4
ヒスチジン	His	H	極性	正	-3.2
イソロイシン	Ile	I	非極性	中性	4.5
ロイシン	Leu	L	非極性	中性	3.8
リジン	Lys	K	極性	正	-3.9
メチオニン	Met	M	非極性	中性	1.9
フェニルアラニン	Phe	F	非極性	中性	2.8
プロリン	Pro	P	非極性	中性	-1.6
セリン	Ser	S	極性	中性	-0.8
スレオニン	Thr	T	極性	中性	-0.7
トリプトファン	Trp	W	非極性	中性	-0.9
チロシン	Tyr	Y	極性	中性	-1.3
バリン	Val	V	非極性	中性	4.2

10

20

【0162】

「試験管内」という用語は、人工的環境（例えば、試験管）、及び人工的環境内で生じるプロセスまたは反応を含む。「生体内」という用語は、自然環境（例えば、細胞または生物または生体）及び自然環境内で生じるプロセスまたは反応を含む。「生体外」という用語は、個体の体から取り除かれた細胞、及びそのような細胞内で生じるプロセスまたは反応を含む。

30

【0163】

非限定的な例示的な実施形態には以下が含まれる。

実施形態 1 . 変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を含む非ヒト動物細胞であって、

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは、野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドに見られる機能的構造ドメインを欠き、

前記非ヒト動物または非ヒト動物細胞は、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現し、任意で、前記野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 5 として示される配列を含む、前記非ヒト動物細胞。

40

【0164】

実施形態 2 . 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが、核局在化シグナル (N L S)、RNA 認識モチーフ 1 (R R M 1)、RNA 認識モチーフ 2 (R R M 2)、推定核外輸送シグナル (E)、プリオン様ドメイン (P L D)、またはそれらの組み合わせを含む機能的構造ドメインを欠く、実施形態 1 に記載の非ヒト動物細胞。

【0165】

実施形態 3 . 前記非ヒト動物細胞が胚性幹 (E S) 細胞、胚様体、または胚性幹細胞由来運動ニューロン (E S M N) である、実施形態 1 または実施形態 2 に記載の非ヒト動物細胞。

【0166】

実施形態 4 . 前記変異させた T A R D B P 遺伝子が前記非ヒト動物の変異させた T A R

50

D B P 遺伝子である、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。

【 0 1 6 7 】

実施形態 5 . 前記変異させた T A R D B P 遺伝子の変異させたヒト T A R D B P 遺伝子である、実施形態 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。

【 0 1 6 8 】

実施形態 6 . 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが以下 :

- (a) 前記 N L S におけるアミノ酸の点突然変異、
- (b) 前記 R R M 1 におけるアミノ酸の点突然変異、
- (c) 前記 R R M 2 におけるアミノ酸の点突然変異、
- (d) 前記核外輸送シグナルの少なくとも一部の欠失、及び
- (e) 前記プリオン様ドメインの少なくとも一部の欠失、の 1 以上に起因して機能的構造ドメインを欠く、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。

10

【 0 1 6 9 】

実施形態 7 .

- (a) 前記 N L S におけるアミノ酸の前記点突然変異が K 8 2 A K 8 3 A、R 8 4 A、K 9 5 A、K 9 7 A、K 9 8 A、またはそれらの組み合わせを含み、
- (b) R R M 1 における前記点突然変異が F 1 4 7 L 及び / または F 1 4 9 L を含み、
- (c) R R M 2 における前記点突然変異が F 1 9 4 L 及び / または F 2 2 9 L を含み、
- (d) 前記核外輸送シグナル欠失の少なくとも一部の前記欠失が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドの 2 3 9 位と 2 5 0 位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含み、且つ
- (e) 前記プリオン様ドメインの少なくとも一部の前記欠失が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドの 2 7 4 位と 4 1 4 位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含む、実施形態 6 に記載の非ヒト動物細胞。

20

【 0 1 7 0 】

実施形態 8 . 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが K 8 2 A K 8 3 A、R 8 4 A、K 9 5 A、K 9 7 A、及び K 9 8 A を含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。

【 0 1 7 1 】

実施形態 9 . 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが野生型ポリペプチドの 2 7 4 位から 4 1 4 位のアミノ酸で前記プリオン様ドメインを欠く、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。

30

【 0 1 7 2 】

実施形態 1 0 . 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが F 1 4 7 L 及び F 1 4 9 L を含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。

【 0 1 7 3 】

実施形態 1 1 . 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが F 1 9 4 L 及び F 2 2 9 L を含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。

【 0 1 7 4 】

実施形態 1 2 . 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが 2 3 9 位から 2 5 0 位のアミノ酸で前記核外輸送シグナルを欠く、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。

40

【 0 1 7 5 】

実施形態 1 3 . 変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子が内在性 T A R D B P 遺伝子座にて内在性 T A R D B P 遺伝子に取って代わる、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。

【 0 1 7 6 】

実施形態 1 4 . 前記非ヒト動物細胞が、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子についてヘテロ接合性である、実施形態 1 3 に記載の非ヒト動物細胞。

【 0 1 7 7 】

実施形態 1 5 . 前記非ヒト動物細胞が、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする

50

前記変異させた T A R D B P 遺伝子についてホモ接合性である、実施形態 1 3 に記載の非ヒト動物細胞。

【 0 1 7 8 】

実施形態 1 6 . 前記非ヒト動物細胞がさらに、ノックアウト突然変異を含む T A R D B P 遺伝子を含む、実施形態 1 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。

【 0 1 7 9 】

実施形態 1 7 . 前記ノックアウト突然変異が条件付きノックアウト突然変異を含む、実施形態 1 6 に記載の非ヒト動物細胞。

【 0 1 8 0 】

実施形態 1 8 . 前記ノックアウト突然変異が部位特異的組換え認識配列を含む、実施形態 1 6 または実施形態 1 7 に記載の非ヒト動物細胞。

10

【 0 1 8 1 】

実施形態 1 9 . 前記ノックアウト突然変異が l o x p 配列を含む、実施形態 1 6 ~ 1 8 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。

【 0 1 8 2 】

実施形態 2 0 . 前記 l o x p 配列がノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子のエクソン 3 に隣接する、実施形態 1 9 に記載の非ヒト動物細胞。

【 0 1 8 3 】

実施形態 2 1 . 前記ノックアウト突然変異が、T D P - 4 3 ペプチドのコード配列全体の欠失を含む、実施形態 1 6 に記載の非ヒト動物細胞。

20

【 0 1 8 4 】

実施形態 2 2 . 前記非ヒト動物細胞が前記操作された T A R D B P 遺伝子座についてヘテロ接合性であり、且つ

(i) 一方の染色体にて内在性 T A R D B P 遺伝子座での内在性 T A R D B P 遺伝子の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子による置換、及び

(i i) 他方の相同染色体にて前記内在性 T A R D B P 遺伝子座での前記ノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子または野生型 T A R D B P 遺伝子のいずれか、を含む、実施形態 1 6 ~ 2 1 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。

【 0 1 8 5 】

30

実施形態 2 3 . 前記非ヒト動物細胞が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現しない、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。

【 0 1 8 6 】

実施形態 2 4 . 前記非ヒト動物細胞が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する、1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。

【 0 1 8 7 】

実施形態 2 5 .

(i) 対照細胞における野生型 T A R D B P 遺伝子の m R N A 転写物レベルに匹敵する前記変異させた T A R D B P 遺伝子の m R N A 転写物レベル、

(i i) 対照細胞における野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドのレベルと比べて前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドのレベルの増加、

40

(i i i) 例えば、運動ニューロンの核よりも細胞質に高濃度で見られる変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド、

(i v) 野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドと比べて不溶性が増した変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド、

(v) 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを含む細胞質凝集体、

(v i) 隠れエクソンのスプライシングの増加、及び/または

(v i i) 選択的スプライシングを受けた T D P - 4 3 形態のレベルの低下、を含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。

【 0 1 8 8 】

50

実施形態 26 . (i) 一方の染色体にて内在性 T A R D B P 遺伝子座での T A R D B P 遺伝子の条件付きノックアウト突然変異と、(i i) 他方の相同染色体にて前記内在性 T A R D B P 遺伝子座での T A R D B P コード配列全体の欠失と、を含む、非ヒト動物細胞。
【 0 1 8 9 】

実施形態 27 . 前記細胞が胚性幹 (E S) 細胞、原始外胚葉細胞、または運動ニューロン (E S M N) に由来する運動ニューロンである、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。
【 0 1 9 0 】

実施形態 28 . 前記非ヒト動物細胞が齧歯類細胞である、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。
【 0 1 9 1 】

実施形態 29 . 前記非ヒト動物細胞がラット細胞である、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。
【 0 1 9 2 】

実施形態 30 . 前記非ヒト動物細胞がマウス細胞である、実施形態 1 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。
【 0 1 9 3 】

実施形態 31 . 前記非ヒト動物細胞が試験管内で培養される、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞。
【 0 1 9 4 】

実施形態 32 . 先行実施形態のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞を含む非ヒト動物組織。
【 0 1 9 5 】

実施形態 33 . 先行実施形態のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞または組織を含む組成物。
【 0 1 9 6 】

実施形態 34 . 変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する非ヒト動物または非ヒト動物細胞を作製する方法であって、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を含むように前記非ヒト動物または非ヒト動物細胞のゲノムを操作することを含み、その際、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは野生型 T D P - 4 3 と比べて機能的構造ドメインを欠き、任意で、前記野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 5 として示される配列を含む、前記方法。
【 0 1 9 7 】

実施形態 35 . 操作することが、内在性 T A R D B P 遺伝子を、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子で置き換えることを含む、実施形態 34 に記載の方法。
【 0 1 9 8 】

実施形態 36 . 操作することがさらに、内在性 T A R D B P 遺伝子を、ノックアウト突然変異を含む T A R D B P 遺伝子で置き換えることを含む、実施形態 34 または実施形態 35 に記載の方法。
【 0 1 9 9 】

実施形態 37 . 前記ノックアウト突然変異が条件付きノックアウト突然変異を含む、実施形態 36 に記載の方法。
【 0 2 0 0 】

実施形態 38 . さらに、ノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子の発現を排除する条件で前記細胞を培養することを含む、実施形態 37 に記載の方法。
【 0 2 0 1 】

実施形態 39 . 疾患の治療のための治療候補を特定する方法であって、(a) 実施形態 1 ~ 31 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物細胞もしくは組織、または実施形態 32 に記載の組成物を候補薬剤と接触させることと、

10

20

30

40

50

(b) 前記非ヒト細胞または組織の表現型及び/またはTDP-43生物活性を評価することと、

(c) 野生型TDP-43ポリペプチドを発現する対照の細胞または組織の表現型及び/またはTDP-43生物活性に匹敵する表現型及び/またはTDP-43生物活性を非ヒト細胞または組織に取り戻す前記候補薬剤を特定することと、を含む、前記方法。

【0202】

実施形態40. TDP-43構造ドメインの生物学的機能を評価する方法であって、
(a) 核局在化シグナル(NLS)、第1のRNA認識モチーフ(RRM1)、第1のRNA認識モチーフ(RRM2)、推定核外輸送シグナル(E)、プリオン様ドメイン(PLD)、及びそれらの組み合わせから成る群から選択される機能的構造ドメインを欠く変異型TDP-43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子を含むように胚性幹(ES)細胞を操作することと、

(b) 任意で、前記操作されたES細胞を試験管内で分化させることと、及び/または前記操作されたES細胞から遺伝子操作された非ヒト動物を取得することと、

(c) 前記遺伝子操作されたES細胞、それに由来する原始外胚葉、それに由来する運動ニューロン、またはそれに由来する非ヒト動物の表現型及び/またはTDP-43生物活性を評価することと、を含む、前記方法。

【0203】

実施形態41. 前記表現型が、細胞培養、蛍光原位置ハイブリッド形成、ウエスタンブロット分析、またはそれらの組み合わせによって評価される、実施形態39または実施形態40に記載の方法。

【0204】

実施形態42. 前記表現型を評価することが、前記遺伝子操作されたES細胞、それに由来する原始外胚葉、それに由来する運動ニューロン、またはそれに由来する非ヒト動物の生存能力を測定することを含む、実施形態39~41のいずれか1つに記載の方法。

【0205】

実施形態43. 前記表現型を評価することが、前記変異型TDP-43ポリペプチドの細胞での位置を決定することを含む、実施形態39~42のいずれか1つに記載の方法。

【0206】

実施形態44. 前記変異型TDP-43ポリペプチドの前記生物活性を評価することが、TDP-43によって調節される隠れエクソンを含む遺伝子のスプライス産物を測定することを含む、実施形態39~43のいずれか1つに記載の方法。

【0207】

実施形態45. TDP-43によって調節される隠れエクソンを含む前記遺伝子がCre、Fxd2、Clf1を含む、実施形態44に記載の方法。

【0208】

実施形態46. 前記変異型TDP-43ポリペプチドの前記生物活性を評価することが、選択的スプライシングを受けたTDP-43のレベルを測定することを含む、実施形態39~45のいずれか1つに記載の方法。

【0209】

実施形態47. TDP-43ポリペプチドのPLDをコードし、及び/またはエクソン6の下流とエクソン7の上流の非翻訳配列を含むTDP-43 mRNA配列を標的とするギャップモチーフを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、

任意で、前記TDP-mRNAがエクソン6内の選択的5'スプライス部位と下流の選択的3'スプライス部位との間の配列を含み、

任意で、前記選択的5'スプライス部位が、(a) マウス第4染色体: 148, 618, 647; (b) マウス第4染色体: 148, 618, 665; (c) マウス第4染色体: 148, 618, 674、及び(d) ヒトTARDBP遺伝子のいずれかの対応する位置から成る群から選択されるTARDBPゲノム位置に相関し、及び/または前記選択的3'スプライス部位が第4染色体: 148, 617, 705のTARDBPゲノム位置と相関す

10

20

30

40

50

る、前記アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0210】

実施形態48．TDP-43ポリペプチドのPLDをコードし、及び/またはエクソン6の下流とエクソン7の上流の非翻訳配列を含むTDP-43 mRNA配列を標的とする配列を含むsiRNAであって、任意で、前記TDP-mRNA配列がエクソン6内の選択的5'スプライス部位と下流の選択的3'スプライス部位との間にあり、任意で、前記選択的5'スプライス部位が、(a)マウス第4染色体：148, 618, 647；(b)マウス第4染色体：148, 618, 665；(c)マウス第4染色体：148, 618, 674、及び(d)ヒトTARDBP遺伝子のいずれかの対応する位置から成る群から選択されるTARDBPゲノム位置に相関し、及び/または前記選択的3'スプライス部位が第4染色体：148, 617, 705のTARDBPゲノム位置と相関する、前記siRNA。

10

【0211】

実施形態49．Cas9タンパク質と少なくとも1つのgRNAとを含むCRISPR/Casシステムであって、前記gRNAが、PLDを欠く切り詰めたTDP-43ポリペプチドをコードする選択的mRNAをもたらす選択的スプライス部位をコードする配列でのまたはその近傍の配列を認識し、任意で、選択的スプライス部位はエクソン6内の選択的5'スプライス部位と下流の選択的3'スプライス部位とを含み、任意で、前記選択的5'スプライス部位は、(a)マウス第4染色体：148, 618, 647；(b)マウス第4染色体：148, 618, 665；(c)マウス第4染色体：148, 618, 674、及び(d)ヒトTARDBP遺伝子のいずれかの対応する位置から成る群から選択されるTARDBPゲノム位置と相関し、及び/または前記選択的3'スプライス部位は第4染色体：148, 617, 705のTARDBPゲノム位置と相関する、前記CRISPR/Casシステム。

20

【0212】

実施形態50．実施形態2に記載の胚性幹細胞を含む、非ヒト動物。

【0213】

実施形態51．変異型TDP-43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子を含む非ヒト動物であって、前記変異型TDP-43ポリペプチドは野生型TDP-43ポリペプチドと比べて機能的構造ドメインを欠き、且つ前記非ヒト動物は前記変異型TDP-43ポリペプチドを発現する、任意で、前記野生型TDP-43ポリペプチドは配列番号1、配列番号3、または配列番号5として示される配列を含む、前記非ヒト動物。

30

【0214】

実施形態52．前記変異型TDP-43ポリペプチドが、核局在化シグナル(NLS)、RNA認識モチーフ1(RRM1)、RNA認識モチーフ2(RRM2)、推定核外輸送シグナル(E)、プリオン様ドメイン(PLD)、またはそれらの組み合わせを含む機能的構造ドメインを欠く、実施形態51に記載の非ヒト動物。

40

【0215】

実施形態53．前記変異させたTARDBP遺伝子が前記非ヒト動物の変異させたTARDBP遺伝子である、実施形態51または実施形態52に記載の非ヒト動物。

【0216】

実施形態54．前記変異させたTARDBP遺伝子が変異させたヒトTARDBP遺伝子である、実施形態51～53のいずれか1つに記載の非ヒト動物。

【0217】

実施形態55．前記変異型TDP-43ポリペプチドが以下：

(a)前記NLSにおけるアミノ酸の点突然変異、

50

- (b) 前記 R R M 1 におけるアミノ酸の点突然変異、
- (c) 前記 R R M 2 におけるアミノ酸の点突然変異、
- (d) 前記核外輸送シグナルの少なくとも一部の欠失、及び
- (e) 前記プリオン様ドメインの少なくとも一部の欠失、の 1 以上に起因して機能的構造ドメインを欠く、実施形態 5 1 ~ 5 4 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

【0218】

実施形態 5 6 .

- (a) 前記 N L S におけるアミノ酸の前記点突然変異が、K 8 2 A K 8 3 A、R 8 4 A、K 9 5 A、K 9 7 A、K 9 8 A、またはそれらの組み合わせを含み、
- (b) R R M 1 における前記点突然変異が F 1 4 7 L 及び / または F 1 4 9 L を含み、
- (c) R R M 2 における前記点突然変異が F 1 9 4 L 及び / または F 2 2 9 L を含み、
- (d) 前記核外輸送シグナル欠失の少なくとも一部の前記欠失が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドの 2 3 9 位と 2 5 0 位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含み、且つ
- (e) 前記プリオン様ドメインの少なくとも一部の前記欠失が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドの 2 7 4 位と 4 1 4 位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含む、実施形態 5 5 に記載の非ヒト動物。

10

【0219】

実施形態 5 7 . 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが K 8 2 A K 8 3 A、R 8 4 A、K 9 5 A、K 9 7 A、及び K 9 8 A を含む、実施形態 5 1 ~ 5 6 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

20

【0220】

実施形態 5 8 . 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが野生型ポリペプチドの 2 7 4 位から 4 1 4 位のアミノ酸で前記プリオン様ドメインを欠く、実施形態 5 1 ~ 5 7 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

【0221】

実施形態 5 9 . 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが F 1 4 7 L 及び F 1 4 9 L を含む、実施形態 5 1 ~ 5 8 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

【0222】

実施形態 6 0 . 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが F 1 9 4 L 及び F 2 2 9 L を含む、実施形態 5 1 ~ 5 9 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

30

【0223】

実施形態 6 1 . 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが 2 3 9 位から 2 5 0 位のアミノ酸で前記核外輸送シグナルを欠く、実施形態 5 1 ~ 6 0 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

【0224】

実施形態 6 2 . 変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子が内在性 T A R D B P 遺伝子座にて内在性 T A R D B P 遺伝子に取って代わる、実施形態 5 1 ~ 6 1 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

【0225】

実施形態 6 3 . 前記非ヒト動物が、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子についてヘテロ接合性である、実施形態 6 2 に記載の非ヒト動物。

40

【0226】

実施形態 6 4 . 前記非ヒト動物がさらに、ノックアウト突然変異を含む T A R D B P 遺伝子を含む、実施形態 5 1 ~ 6 3 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

【0227】

実施形態 6 5 . 前記ノックアウト突然変異が条件付きノックアウト突然変異を含む、実施形態 6 4 に記載の非ヒト動物。

【0228】

実施形態 6 6 . 前記ノックアウト突然変異が部位特異的組換え認識配列を含む、実施形

50

態 6 4 または実施形態 6 5 に記載の非ヒト動物。

【 0 2 2 9 】

実施形態 6 7 . 前記ノックアウト突然変異が 1 o x p 配列を含む、実施形態 6 4 ~ 6 6 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

【 0 2 3 0 】

実施形態 6 8 . 前記 1 o x p 配列がノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子のエクソン 3 に隣接する、実施形態 6 7 に記載の非ヒト動物。

【 0 2 3 1 】

実施形態 6 9 . 前記ノックアウト突然変異が T D P - 4 3 ペプチドのコード配列全体の欠失を含む、実施形態 6 4 に記載の非ヒト動物。

【 0 2 3 2 】

実施形態 7 0 . 前記非ヒト動物が前記操作された T A R D B P 遺伝子座についてヘテロ接合性であり、且つ

(i) 一方の染色体にて内在性 T A R D B P 遺伝子座での内在性 T A R D B P 遺伝子の、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子による置換、及び

(i i) 他方の相同染色体にて前記内在性 T A R D B P 遺伝子座での、前記ノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子または野生型 T A R D B P 遺伝子のいずれか、を含む、実施形態 6 4 ~ 6 9 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

【 0 2 3 3 】

実施形態 7 1 . 前記非ヒト動物が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する、実施形態 5 0 ~ 7 0 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

【 0 2 3 4 】

実施形態 7 2 .

(i) 対照動物における野生型 T A R D B P 遺伝子の m R N A 転写物レベルに匹敵する前記変異させた T A R D B P 遺伝子の m R N A 転写物レベル、

(i i) 対照動物における野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドのレベルと比べて前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドのレベルの増加、

(i i i) 例えば、運動ニューロンの核よりも細胞質に高濃度で見られる変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド、

(i v) 野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドと比べて不溶性が増した変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド、

(v) 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを含む細胞質凝集体、

(v i) 隠れエクソンのスプライシングの増加、

(v i i) 選択的スプライシングを受けた T D P - 4 3 形態のレベルの低下、

(v i i i) 前脛骨筋のような主に速筋で構成される筋肉組織の脱神経、及び/または

(i x) 肋間筋のような主に遅筋で構成される筋肉組織の正常な神経支配、を含む、実施形態 5 0 ~ 7 1 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

【 0 2 3 5 】

実施形態 7 3 . 内在性 T R A D B P 遺伝子座にて条件付きノックアウト突然変異を含む T A R D B P 遺伝子を含み、且つ相同染色体の他方の内在性 T A R D B P 遺伝子座にて、T A R D B P コード配列全体の欠失を含む T A R D B P 遺伝子を含む、非ヒト動物。

【 0 2 3 6 】

実施形態 7 4 . 前記非ヒト動物が齧歯動物である、実施形態 5 0 ~ 7 3 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

【 0 2 3 7 】

実施形態 7 5 . 前記非ヒト動物がラットである、実施形態 5 0 ~ 7 4 のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

【 0 2 3 8 】

実施形態 7 6 . 前記非ヒト動物がマウスである、実施形態 5 0 ~ 7 4 のいずれか 1 つに

10

20

30

40

50

記載の非ヒト動物。

【0239】

実施形態77. 疾患の治療のための治療候補を特定する方法であって、

(a) 実施形態50～76のいずれか1つに記載の非ヒト動物を候補薬剤と接触させることと、

(b) 前記非ヒト動物の表現型及び/またはTDP-43生物活性を評価することと、

(c) 前記非ヒトが表現型及び/またはTDP-43生物活性を取り戻す前記候補薬剤を特定することを含む、前記方法。

【0240】

実施形態78. 変異型TDP-43ポリペプチドであって、以下：

(a) NLSにおけるアミノ酸の点突然変異、

(b) RRM1におけるアミノ酸の点突然変異、

(c) RRM2におけるアミノ酸の点突然変異、

(d) 核外輸送シグナルの少なくとも一部の欠失、及び

(e) プリオン様ドメインの少なくとも一部の欠失、の1以上を含むように修飾された配列番号1、3、または5として示される配列を含む、前記変異型TDP-43ポリペプチド。

【0241】

実施形態79.

(a) 前記NLSにおけるアミノ酸の前記点突然変異が、K82A、K83A、R84A、K95A、K97A、K98A、またはそれらの組み合わせを含み、

(b) RRM1における前記点突然変異がF147L及び/またはF149Lを含み、

(c) RRM2における前記点突然変異がF194L及び/またはF229Lを含み、

(d) 前記核外輸送シグナル欠失の少なくとも一部の前記欠失が、野生型TDP-43ポリペプチドの239位と250位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含み、且つ

(e) 前記プリオン様ドメインの少なくとも一部の前記欠失が、野生型TDP-43ポリペプチドの274位と414位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含む、実施形態78に記載の変異型TDP-43ポリペプチド。

【0242】

実施形態80. K82A突然変異、K83A突然変異、R84A突然変異、K95A突然変異、K97A突然変異、及び/またはK98A突然変異を含む、実施形態78または実施形態79に記載の変異型TDP-43ポリペプチド。

【0243】

実施形態81. 野生型ポリペプチドの274位から414位のアミノ酸で前記プリオン様ドメインの欠失を含む、実施形態78～80のいずれか1つに記載の変異型TDP-43ポリペプチド。

【0244】

実施形態82. 前記変異型TDP-43ポリペプチドがF147L突然変異及び/またはF149L突然変異を含む、実施形態78～81のいずれか1つに記載の変異型TDP-43ポリペプチド。

【0245】

実施形態83. 前記変異型TDP-43ポリペプチドがF194L突然変異及び/またはF229L突然変異を含む、実施形態78～82のいずれか1つに記載の変異型TDP-43ポリペプチド。

【0246】

実施形態84. 前記変異型TDP-43ポリペプチドが239位から250位のアミノ酸で前記核外輸送シグナルを欠く、実施形態78～83のいずれか1つに記載の変異型TDP-43ポリペプチド。

【0247】

実施形態85. 実施形態78～84のいずれか1つに記載の変異型TDP-43ポリペ

10

20

30

40

50

プチドをコードする核酸配列を含む、核酸。

【0248】

実施形態86．さらに、5'から3'に向かって：5'相同性アームと、前記変異型TDP-43ポリペプチドをコードする前記核酸配列と、3'相同性アームとを含み、前記核酸が齧歯類細胞にて相同組換えを受ける、実施形態85に記載の核酸。

【0249】

実施形態87．前記核酸が内在性ラットTARDBP遺伝子座にて相同組換えを受け、前記変異型TDP-43ポリペプチドをコードする前記核酸配列が前記内在性TARDBPコード配列を置き換えるように前記5'及び3'の相同性アームがラット配列に相同である、実施形態86に記載の核酸。

10

【0250】

実施形態88．前記核酸が内在性マウスTARDBP遺伝子座にて相同組換えを受け、前記変異型TDP-43ポリペプチドをコードする前記核酸配列が前記内在性TARDBPコード配列を置き換えるように前記5'及び3'の相同性アームがマウス配列に相同である、実施形態86に記載の核酸。

【0251】

実施形態89．細胞にてPLDを欠く切り詰めたTDP-43をコードする選択的TDP-43 mRNAを温存しながら、PLDを含むTDP-43ポリペプチドをコードするTDP-43 mRNAを選択的に減少させる方法であって、

(i) TDP-43ポリペプチドのPLDをコードし、及び/またはエクソン6の下流及びエクソン7の上流の非翻訳配列を含むTDP-43 mRNA配列を標的とするギャップマーモチーフを含むアンチセンスオリゴヌクレオチド、

20

(ii) TDP-43ポリペプチドのPLDをコードし、及び/またはエクソン6の下流及びエクソン7の上流の非翻訳配列を含むTDP-43 mRNA配列を標的とする配列を含むsiRNA、及び/または

(iii) PLDを欠く切り詰め型TDP-43ポリペプチドをコードする選択的mRNAをもたらす選択的スプライス部位をコードする配列でのまたはその近傍の配列を、gRNAが認識する、Cas9タンパク質と少なくとも1つの前記gRNAとを含むCRISPR/Casシステム、を前記細胞に導入することを含む、前記方法。

【0252】

30

実施形態90．

(i) 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが実施形態47のASOであり、

(ii) 前記siRNAが実施形態48のsiRNAであり、及び/または

(iii) 前記CRISPR/Casシステムが実施形態49のCRISPR/Casシステムである、実施形態89に記載の方法。

【0253】

実施形態91．前記細胞が生体内に存在する、実施形態89または90に記載の方法。配列の簡単な説明

40

50

【表 4 - 1】

配列番号	説明
1	NP_663531-野生型マウスTDP-43 (タンパク質)
2	NM_145556. 4-野生型マウスTARDBPのコード配列 (DNA)
3	NP_001011979-野生型ラットTDP-43 (タンパク質)
4	NM_001011979. 2-野生型ラットTARDBPのコード配列 (DNA)
5	NP_031401. 1-野生型ヒトTDP-43 (タンパク質)
6	NM_007375. 3-野生型ヒトTARDBPのコード配列 (DNA)
7	RRM1 RNP2のコンセンサス配列 (タンパク質)
8	RRM1 RNP1のコンセンサス配列 (タンパク質)
9	RRM1 RNP2のコンセンサス配列 (タンパク質)
10	RRM1 RNP1のコンセンサス配列 (タンパク質)
11	TDP-43 Ex3-Ex4アッセイの順行プライマー (DNA)
12	TDP-43 Ex3-Ex4アッセイの逆行プライマー (DNA)
13	TDP-43 Ex3-Ex4のプローブ (DNA)
14	Cre m Ex1-EX2アッセイの順行プライマー (DNA)
15	Cre m Ex1-Ex2アッセイの逆行プライマー (DNA)
16	Cre m Ex1-EX2のプローブ (DNA)
17	Cre m Ex1-隠れアッセイの順行プライマー (DNA)
18	Cre m Ex1-隠れアッセイの逆行プライマー (DNA)
19	Cre m Ex1-隠れプローブ (DNA)
20	Cre m 隠れ-EX2アッセイの順行プライマー (DNA)
21	Cre m 隠れ-EX2アッセイの逆行プライマー (DNA)
22	Cre m 隠れ-EX2のプローブ (DNA)
23	Fy x d 2 Ex 3 - Ex 4アッセイの順行プライマー (DNA)
24	Fy x e d Ex 3 - Ex 4アッセイの逆行プライマー (DNA)
25	Fy x e d Ex 3 - Ex 4のプローブ (DNA)
26	Fy x e d Ex 3 - 隠れアッセイの順行プライマー (DNA)
27	Fy x e d Ex 3 - 隠れアッセイの逆行プライマー (DNA)
28	Fy x e d Ex 3 - 隠れのプローブ (DNA)
29	Fy x e d 隠れ - Ex 4アッセイの順行プライマー (DNA)
30	Fy x e d 隠れ - Ex 4アッセイの逆行プライマー (DNA)
31	Fy x e d 隠れ - Ex 4のプローブ (DNA)
32	Cre m Ex 1 - Ex 2アッセイの順行プライマー (DNA)

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

33	C r e m E x 1 - E x 2 アッセイの逆行プライマー (DNA)
34	C r l F 1 E x 1 - E x 2 のプローブ (DNA)
35	C r l F 1 E x 1 - 隠れアッセイの順行プライマー (DNA)
36	C r l F 1 E x 1 - 隠れアッセイの逆行プライマー (DNA)
37	C r l F 1 E x 1 - 隠れプローブ (DNA)
38	C r l F 1 隠れ - E X 2 アッセイの順行プライマー (DNA)
39	C r l F 1 隠れ - E X 2 アッセイの逆行プライマー (DNA)
40	C r l F 1 隠れ - E X 2 のプローブ (DNA)
41	T D P - 4 3 E x 6 - E x 7 アッセイの順行プライマー (DNA)
42	T D P - 4 3 E x 6 - E x 7 アッセイの逆行プライマー (DNA)
43	T D P - 4 3 E x 6 - E x 7 のプローブ (DNA)

10

【実施例】

【0254】

以下の実施例は、例証目的のためのみに提供されており、本発明の範囲を限定するようには意図されていない。

20

【0255】

実施例 1：変異させた T A R D B P 遺伝子を発現する胚性幹細胞の生成

T D P - 4 3 は生存能力に不可欠であるので、第 1 の内在性対立遺伝子由来の野生型 T D P - 4 3 が状態の活性化まで E S 細胞の生存能力を持続させ、その活性化後、第 2 の対立遺伝子から発現される変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドの効果が確かめられてもよいように、第 1 の内在性 T D P - 4 3 対立遺伝子における条件付きノックアウトと他方の第 2 の内在性 T D P - 4 3 対立遺伝子における変異とを含む胚性幹 (E S) 細胞が生成されてもよい。

【0256】

種々の T D P - 4 3 構造ドメインが担う生物学的、生化学的、及び/または病原性の役割を評価するために、(i) 内在性 T A R D B P 遺伝子座にて条件付きノックアウト突然変異と、(i i) 相同染色体上の他方の T A R D B P 遺伝子座にて、5 つの構造ドメイン

30

核局在化シグナル (N L S)、R N A 認識モチーフ 1 (R R M 1)、R N A 認識モチーフ 2 (R R M 2)、推定核外輸送シグナル (E)、またはプリオン様ドメイン (P L D)

のうち 1 つが機能を無効すると予測される方法で変更された、または欠失させられた変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子と、を含むようにマウス E S 細胞を操作した。図 3 を参照のこと。変異させた T A R D B P 遺伝子 (複数可) を内部に持ち、且つ機能的な N L S、R R M 1、R R M 2、E または P L D を欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する細胞の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドの (1) 表現型及び (2) 生物活性の双方をそれぞれ実施例 2 及び 3 に記載されているように分析した。

40

【0257】

条件付き対立遺伝子は、T D P - 4 3 エクソン 3 の欠失が機能的タンパク質を生成しないことを示す以前に発表された研究に基づいて設計した。Chiang et al. (2010), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107: 16320 - 324. 内在性マウス T A R D B P 遺伝子のエクソン 3 は l o x P 部位にて l o x P が導入された。Cre が介在する組換えの後、ゲノム座標 chr 4 : 147995844 - 147996841 の欠失が達成された。l o x P が導入されたエクソン 3 を含む E S 細胞をさらに、本明細書に記載されているように変異させた T A R D B P 遺伝子で操作した。対照として、一方の対立遺伝子での条件付きノックアウト突然変異と、他方の対立遺伝子での

50

第2エクソンの開始コドンから終止コドンまでの欠失(ゲノム座標chr4:147992370-147999471)とによって操作されたマウスES細胞も作り出した。

【0258】

実施例2:変異させたTARDBP遺伝子を発現する細胞の表現型分析

実施例1で生成された胚性幹(ES)細胞、それに由来する原始外胚葉、またはそれに由来する運動ニューロン(ESMN)の表現型を、細胞の生存能力及び変異型TDP-43ポリペプチドの局在化と安定性を評価することによって分析した。

【0259】

特に、機能的なNLSまたは機能的なPLDを欠く変異型TDP-43ポリペプチドを発現しているES細胞は生存可能だった;ただし、機能的なPLDを欠く変異型TDP-43ポリペプチドを発現している細胞は適応度が低下していると思われた。図4。機能的なRRM1またはRRM2を欠く変異型TDP-43ポリペプチドを発現しているES細胞もESMNも生存し続けなかった。図4及び5。

10

【0260】

機能的なNLSを欠く変異型TDP-43ポリペプチドはESMNの核から細胞質に再分布し、変異型TDP-43はALS病理を連想させる多くの大きな凝集体様封入体に蓄積した。図6~8。機能的なNLSの欠如は、核染色の喪失を伴う、変異型TDP-43ポリペプチドの広範な細胞質凝集を引き起こした。図7~8。機能的PLDを欠く変異型TDP-43ポリペプチドもESMNの細胞質に再分布し、機能的NLSを欠く変異型TDP-43ポリペプチドによって生成されるものよりも豊富でない質的に異なるように見える点状封入体に蓄積した。図6~8。PLDの欠失は、核染色は保持されたものの、変異型TDP-43ポリペプチドの細胞質への最大の誤った局在を引き起こした。図7~8。

20

【0261】

機能的なNLSまたはPLDを欠く変異型TDP-43ポリペプチドは変異型TDP-44の溶解度の増加を示した。図9A。機能的EまたはRRM1を欠く変異型TDP-43ポリペプチドの溶解度は、野生型TDP-43ポリペプチドと比べて変化しなかった。図9A。変異型TDP-43ポリペプチドのいずれについてもmRNA発現レベルに差はなかったが、機能的なNLS、PLD、またはRRM1を欠く変異型TDP-43ポリペプチドではタンパク質レベルの増加が見られた。図9B。これらの変異型TDP-43ポリペプチドのmRNA発現レベルは野生型TDP-43の発現レベルに匹敵するので、タンパク質レベルの上昇は変異型TDP-43ポリペプチドの安定性の向上による可能性があった。図9C。

30

【0262】

機能的構造ドメインを欠く変異型TDP-43ポリペプチドを発現する細胞の表現型を分析するのに使用される材料及び方法を以下に記載する。

【0263】

細胞培養

【0264】

細胞によって発現されるタンパク質の唯一の形態としての変異型TDP-43タンパク質の、胚性幹(ES)細胞及びそれらに由来する運動ニューロン(ESMN)の生存能力を支援する能力を培養での分化によって調べた。ES細胞を胚性幹細胞培地(ESM;DMEM+15%ウシ胎児血清+ペニシリン/ストレプトマイシン+グルタミン+非必須アミノ酸+ヌクレオシド+β-メルカプトエタノール+ピルビン酸ナトリウム+LIF)で2日間培養したが、その間、培地を毎日交換した。トリプシン処理の1時間前に、ES培地を7mLのADFNK培地(高度なDMEM/F12+神経基礎培地+10%ノックアウト血清+ペニシリン/ストレプトマイシン+グルタミン+β-メルカプトエタノール)に交換した。ADFNK培地を吸引し、ESCを0.05%トリプシン-EDTAでトリプシン処理した。ペレットにした細胞を12mLのADFNKに再懸濁させ、懸濁液中で2日間増殖させた。細胞を、レチノイン酸(RA)、スムーズドアゴニスト、及びプルモルファミンで補完したADFNKにてさらに4日間培養し、手足のような運動ニューロ

40

50

ン (E S M N) を得た。解離させた運動ニューロンを、胚性幹細胞由来運動ニューロン培地 (E S M N ; 神経基礎培地 + 2 % ウマ血清 + B 2 7 + グルタミン + ペニシリン / ストレプトマイシン + β -メルカプトエタノール + 1 0 n g / m L の G D N F 、 B D N F 、 C N T F) のプレートに入れ、成熟させた。E S 細胞段階 (図 4 、 6 ~ 9) またはプレートに入れた 7 日後 (図 5) に電気穿孔を介して送達された C r e リコンビナーゼを使用して条件付きノックアウト対立遺伝子を活性化した。

【 0 2 6 5 】

変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドの細胞内局在

【 0 2 6 6 】

T D P - 4 3 ポリペプチドの N 末端を認識する抗体 (α -T D P - 4 3 N - t e r m) と T D P - 4 3 ポリペプチドの C 末端プリオン様ドメインを認識する抗体 (α -T D P - 4 3 C - t e r m) (P r o t e i n t e c h , R o s e m o n t , I L) を使用して T D P - 4 3 変異体の細胞内局在を分析した。可溶性細胞質タンパク質抽出物は、E S 細胞由来の MN をプロテアーゼ及びホスファターゼの阻害剤 (R o c h e) で補完した氷冷溶解緩衝液 (1 0 m M の K C l 、 1 0 m M の T r i s - H C l 、 p H 7 . 4 、 1 m M の M g C l 2 、 1 m M の D T T 、 0 . 0 1 % N P - 4 0) にて氷上で 1 0 分間インキュベートすることによって調製した。次に、細胞を 2 7 ゲージの注射器に 5 回通した。4 にて 4 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離した後、可溶性細胞質抽出物を含むタンパク質上清を回収した。不溶性核タンパク質抽出物は、プロテアーゼとホスファターゼで補完した等量の R B S S - 1 0 0 緩衝液 (1 0 m M の T r i s - H C l 、 p H 7 . 4 、 2 . 5 m M の M g C l 2 、 1 0 0 m M の N a C l 、 0 . 1 % N P - 4 0) にペレットを再懸濁させることによって調製した。等量の 2 \times S D S 試料緩衝液を各画分に加え、試料を 9 0 に加熱した。次に、等量の各画分を 1 4 % S D S ゲルに載せ、2 2 5 V で 5 0 分間電気泳動した後、 α -T D P - 4 3 - N - t e r m 抗体または α -T D P - 4 3 - C - t e r m 抗体を使用して T D P - 4 3 のウエスタンブロッティングを行ったが、その後者は P L D 欠失変異型を認識しない。デンストメトリーは I m a g e J を使用して実行した。図 6 B 。細胞質 / 核の T D P - 4 3 の比率をプロットし、G r a p h P a d f o r P r i s m を使用して統計的に分析した。図 6 B ; 図 9 B 、右パネル。

【 0 2 6 7 】

蛍光原位置ハイブリッド形成 (F I S H)

【 0 2 6 8 】

E S 細胞由来の MN をポリオルニチン / ラミニンでコーティングしたカバースリップに置き、7 日間培養した。カバースリップを氷冷 4 % P F A にて 1 5 分間浸漬固定し、1 \times P B S で洗浄した。細胞は、0 . 2 % T r i t o n X - 1 0 0 (T B S - T) を含む T r i s 緩衝生理食塩水 (p H 7 . 4) で希釈した 5 % 正常ロバ血清でブロックし、5 % の正常なロバ血清と共に T B S - T で希釈した一次抗血清 (T D P - 4 3 C - t e r m 及び M A P 2) にて 4 で一晩インキュベートした。T B S - T で洗浄した後、A l e x a 4 8 8 及び A l e x a 5 6 8 (1 : 1 , 0 0 0 ; L i f e T e c h n o l o g i e s , C a r l s b a d , C A , U S A) に結合した種特異的二次抗体とともに細胞を室温で 1 時間インキュベートした。T B S - T で洗浄した後、染色した組織カバースリップを F l o u r o m o u n t (S o u t h e r n B i o t e c h , B i r m i n g h a m , A L , U S A) の顕微鏡スライドにて標本化し、L e i c a 7 1 0 L S M 共焦点顕微鏡を使用して 4 0 倍の倍率で画像化した。図 7 及び図 8 。

【 0 2 6 9 】

変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドの溶解度

【 0 2 7 0 】

このプロトコールは、J o e t a l . (2 0 1 4) , N a t u r e C o m m u n i c a t i o n s , 5 : 3 4 9 6 から採用された。5 0 m M の N - エチルマレイミド (N E M) 、 1 m M の N a F 、 1 m M の N a 3 V O 4 、 1 m M の P M S F 及び各 1 0 u g / m L の アプロチニン、ロイペプチン、及びペプスタチンを含有する 5 0 0 u l の氷冷可溶性緩

10

20

30

40

50

衝液 (0.1 M の M E S (pH 7)、1 m M の E D T A、0.5 m M の M g S O 4、1 M のスクロース)。細胞は 21 ゲージの針を 3 ~ 5 回通過させた後、23 ゲージの針を 3 ~ 5 回通過させた。次に、等量のホモジネートを各試料から回収し、50,000 × g にて 20 分間 4 で遠心分離し、残りを -80 で保存した。上清を除去し、各ペレットを、1% N - ラウロイルサルコシン (Sarkosyl) 及びプロテアーゼ阻害剤 (1 m M の P M S F、50 m M の N E M、及び各 10 μg / m L のアプロチニン、ロイペプチン、ペプスタチン) を含有する 700 μl の R A B 緩衝液 (100 m M の M E S (pH 6.8)、10% スクロース、2 m M の E G T A、0.5 m M の M g S O 4、500 m M の N a C l、1 m M の M g C l 2、10 m M の N a H 2 P O 4、20 m M の N a F) に再懸濁させ、R T で 1 分間ボルテックスし、転倒回転しながら 4 で一晩インキュベートした。次に、試料を 200,000 × g で 12 にて 30 分間遠心分離し、上清をサルコシル可溶性画分として回収した。ペレットを 700 μl の R A B 緩衝液に再懸濁させ、26 ゲージの針に 3 ~ 5 回通してペレットを完全に分散させ、サルコシル不溶性画分を作成した。次に、サルコシル可溶性及び不溶性の画分の等量を等分し、等量の 2 × S D S 試料緩衝液をそれぞれに加えた。試料を 90 に加熱した。次に、等量の各画分を 14% S D S ゲルに載せ、225 V で 50 分間電気泳動した後、T D P - 43 のウエスタンブロッティングを行った。デンストメトリーは Image J を使用して実行した。図 9 A。可溶性：不溶性の T D P - 43 の比率をプロットし、GraphPad for Prism を使用して統計的に分析した。図 9 A。

10

【0271】

20

変異型 T D P - 43 ポリペプチドの発現レベル

【0272】

T D P - 43 変異型の発現レベルは、本明細書に記載されているようなウエスタンブロット分析によって分析した。この実施例におけるメッセンジャー R N A レベルは、定量的ポリメラーゼ連鎖反応によって実行された。

【0273】

各試料からの全 R N A を抽出し、通常のエクソン 4 とエクソン 5 の接合部にまたがるプライマーと、マウス T D P - 43 遺伝子座の領域を検出するプローブを使用して逆転写した。D R O S H A の q P C R は容易に入手できるキットのプローブとプライマーを使用して実行した。

30

【0274】

具体的には、R N A は実施例 1 に記載されているように胚性幹細胞由来の運動ニューロン (E S M N) から単離された。

【0275】

製造元のプロトコール (Zymo Research) に従って Direct-zol R N A MiniPrep plus キットを使用して全 R N A を単離した。製造元のプロトコール (Invitrogen) に従って Turbo DNA-free キットを使用して DNA 分解酵素で全 R N A を処理し、20 ng / μl に希釈した。逆転写 (R T) 及び P C R は Quantitect プローブ R T - P C R キット (Qiagen) を使用した一工程反応で実行した。q R T - P C R 反応は、2 μl の R N A と、R T - P C R マスターミックス、ROX 色素、R T ミックス、及び 20 × 遺伝子特異的プライマー・プローブのミックスを含有する 8 μl の混合物とを含有して最終容量を 10 μl にした。

40

【0276】

特に言及されない限り、最終的なプライマーとプローブの濃度はそれぞれ 0.5 μM と 0.25 μM だった。q R T - P C R は V i i A (商標) 7リアルタイム P C R 検出システム (ThermoFisher) で実行した。P C R 反応は光学 384 ウェルプレートにおいて 45 で 10 分間その後の 95 で 10 分間の R T 工程と、95 で 5 秒間、60 で 30 秒間を 45 サイクルの 2 工程サイクリングにて 4 つ組で行った。分析 (パンアッセイ) で使用したプライマーとプローブの配列を以下の表 2 に提供する。

表 2

50

【表 2】

分析	順行プライマー (配列番号)	逆行プライマー (配列番号)	プローブ (配列番号)
TDP-43			
Ex3-Ex4	TGTGACTGT AAACTTCCC AACT (配列番号11)	CTCTTCAG CAGTCATG TCCTC (配列番号12)	AAGCCCAGA CGAGCCTTT GAGAAG (配列番号13)

10

【0277】

変異型 TDP-43 ポリペプチドの溶解度

【0278】

ES細胞コロニーを2日後に解離し、それをADFNK培地で培養した。培地を2日目に交換し、レチノイン酸(100nM~2μM)(Sigma)及びソニックヘッジホッグ(Shh-N;300nM)(Curis Inc.)で補完し、胚様体(EB)を4日間培養した。4日目の胚様体をシクロヘキシミド(100μg/mL)で処理して新しいタンパク質合成を阻止した。培地は4時間ごとに交換し、新鮮なシクロヘキシミドを加えた。示された時点で細胞溶解物を回収し、TDP-43抗体及びGAPDH抗体を用いた免疫ブロッティングによって分析した。図9C。

20

実施例3：TDP-43変異型によるTDP-43生物活性の分析

【0279】

隠れエクソンはGUに富むTDP-43結合部位を有することが多く、TDP-43は隠れエクソンの認識を抑制し、それによって正常なスプライシングを促進することが示されている。TDP-43が失われると、調節された遺伝子の正常なmRNA及びタンパク質レベルが失われる。TDP-43はまた、TDP-43レベルを維持するために負のフィードバック自己調節ループとして自身の転写産物の3'末端にも結合する。機能的構造ドメインを欠く変異型TDP-43ポリペプチドの生物活性を、隠れエクソンのスプライシングを抑制し続ける変異型TDP-43ポリペプチドの能力を評価することによって調べ、及び/またはその自己調節ループへの参加を調べた。

30

【0280】

野生型TARDBP遺伝子または機能的なRRM1、NLS、またはPLDを欠く変異型TDP-43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子についてヘテロ接合性のESMNを、そのスプライシングが野生型TDP-43によって抑制されることが知られている隠れエクソンを含む3つの遺伝子：Crem、Fyx d2、及びClf1の発現産物について分析した。図10。正常なスプライシングを受けたCrem、Fyx d2、及びClf1の産物は、機能的なRRM1、NLS、またはPLDを欠く変異型TDP-43ポリペプチドを発現するすべてのESMNで見られ、正常なスプライス産物は野生型TDP-43ポリペプチドを発現するESMNと同等の量で見られた。図10しかしながら、隠れエクソンのスプライシングは、野生型TDP-43ポリペプチドを発現しているESMNと比べて、機能的なRRM1、NLS、またはPLDを欠く変異型TDP-43ポリペプチドを発現しているESMNで増加した。図10。このデータは、機能的なRRM1、NLS、またはPLDを欠く変異型TDP-43ポリペプチドが、Crem、Fyx d2、及びClf1遺伝子の隠れエクソンのスプライシングを抑制できないことを示唆している。図10。

40

【0281】

野生型TARDBP遺伝子または機能的なNLS、RRM1、RRM2、E、またはPLDを欠く変異型TDP-43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子についてヘテロ接合性のESMNを、選択的スプライシングを受けたTDP-43 mRNAのレベルについて分析した。図11B。野生型TDP-43ポリペプチドを発現して

50

いる対照 E S M N と比べて、機能的な N L S、R R M 1、E、または P L D を欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現している E S M N は、選択的スプライシングを受けた T D P - 4 3 m R N A のレベルの低下を示した。図 1 1 B。機能的 E を欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現している E S M N は、同等レベルの選択的スプライシングを受けた T D P - 4 3 m R N A を示した。図 1 1 B。このデータは、機能的な N L S または P L D を欠く T D P - 4 3 変異型を発現している E S M N が A L S 表現型を示すことを示す実施例 2 で提供されたデータと併せて (図 5)、選択的スプライシングを受けた T D P - 4 3 m R N A を温存しながら正常なスプライシングを受けた T D P - 4 3 m R N A のレベルを低下させる戦略は T D P - 4 3 関連の病状にとっての治療法であってもよいことを示唆している。

10

【 0 2 8 2 】

機能的構造ドメインを欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する細胞の表現型を分析するのに使用される材料及び方法を以下に記載する。

【 0 2 8 3 】

定量的ポリメラーゼ連鎖反応

【 0 2 8 4 】

各試料からの全 R N A を抽出し、スプライシング領域に隣接するプライマーと、調査される遺伝子の遺伝子座 (C r e m、F x y d 2、C l f 1、T D P - 4 3) の領域を検出するプローブとを使用して逆転写した。調査された C r e m、F x y d 2、及び C l f 1 の遺伝子についての検出可能な領域には、調査された各遺伝子の正常なエクソンと隠れエクソンのマウス配列の接合部にまたがる領域が含まれた。調査された T D P - 4 3 領域についての検出可能な領域には、選択的スプライシング領域にまたがる領域が含まれた。D R O S H A の q P C R は容易に利用できるキットのプローブとプライマーを使用して実行された。

20

【 0 2 8 5 】

具体的には、実施例 2 に記載されているように分化した胚性幹細胞由来運動ニューロン (E S M N) から R N A を単離した。製造元のプロトコール (Z y m o R e s e a r c h) に従って D i r e c t - z o l R N A M i n i p r e p p l u s キットを使用して全 R N A を単離した。製造元のプロトコール (I n v i t r o g e n) に従って T u r b o D N A - f r e e キットを使用して D N A 分解酵素で全 R N A を処理し、2 0 n g / μ l に希釈した。逆転写 (R T) 及び P C R は Q u a n t i t e c t プローブ R T - P C R キット (Q i a g e n) を使用した一工程反応で実行した。q R T - P C R 反応は、2 μ L の R N A と、R T - P C R マスターミックス、R O X 色素、R T ミックス、及び 2 0 \times 遺伝子特異的プライマー・プローブのミックスを含有する 8 μ L の混合物とを含有して最終容量を 1 0 μ L にした。

30

【 0 2 8 6 】

特に言及されない限り、最終的なプライマーとプローブの濃度は、それぞれ 0 . 5 μ M と 0 . 2 5 μ M だった。q R T - P C R は V i i A (商標) 7 リアルタイム P C R 検出システム (T h e r m o F i s h e r) で実行した。P C R 反応は光学 3 8 4 ウェルプレートにおいて 4 5 で 1 0 分間その後の 9 5 で 1 0 分間の R T 工程と、9 5 で 5 秒間、6 0 で 3 0 秒間を 5 0 サイクルの 2 工程サイクリングにて 4 つ組で行った。

40

【 0 2 8 7 】

C r e m のエクソン 1 からエクソン 2 への生産的な C r e m スプライシングを評価するための q R T - P C R は、配列番号 1 4 及び配列番号 1 5 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマー、及び配列番号 1 6 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマーによって実施した。C r e m のエクソン 1 から隠れエクソンまでのスプライシングは、配列番号 1 7 及び配列番号 1 8 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマー、及び配列番号 1 9 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマーを用いて評価した。C r e m の隠れエクソンからエクソン 2 までのスプライシングは、配列番号 2 0 及び配列番号 2 1 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマー、及び配列番号 2 2 として示され

50

るヌクレオチド配列を含むプライマーを用いて評価した。

【 0 2 8 8 】

エクソン 3 からエクソン 4 までの生産的な F y x d 2 のスプライシングを評価するための q R T - P C R は、配列番号 2 3 及び配列番号 2 4 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマー、及び配列番号 2 5 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマーによって実施した。F y x d 2 のエクソン 3 から隠れエクソンまでのスプライシングは、配列番号 2 6 及び配列番号 2 7 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマー、及び配列番号 2 8 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマーによって評価した。F y x d 2 隠れエクソンからエクソン 4 までのスプライシングは、配列番号 2 9 及び配列番号 3 0 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマー、及び配列番号 3 1 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマーによって評価した。

10

【 0 2 8 9 】

生産的な C r l f 1 スプライス産物の q R T - P C R は、配列番号 3 2 及び配列番号 3 3 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマー、及び配列番号 3 4 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマーによって実施した。C r l f 1 のエクソン 1 から隠れエクソンまでのスプライシングは、配列番号 3 5 及び配列番号 3 6 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマー、及び配列番号 3 7 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマーを用いて評価した。C r l f 1 の隠れエクソンからエクソン 2 までのスプライシングは、配列番号 3 8 及び配列番号 3 9 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマー、及び配列番号 4 0 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマーを用いて評価した。

20

【 0 2 9 0 】

P L D ドメインをコードする配列を欠く選択的スプライシングを受けた T D P - 4 3 m R N A を、配列番号 4 1 及び配列番号 4 2 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマー、及び配列番号 4 3 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマーを使用して評価した。

【 0 2 9 1 】

この実施例の各 q P C R 分析（正常なスプライシング及び隠れスプライシング）で使用されるプライマー及びプローブの配列を以下の表 3 に提供する。

表 3

30

40

50

【表 3 - 1】

分析	順方向プライマー (配列番号)	逆方向プライマー (配列番号)	プローブ (配列番号)
C r e m			
Ex 1 - EX 2	TGGCTGTAA CTGGAGATG AAAC (配列番号14)	CCTTGTGGC AAAGCAGTA GTA (配列番号15)	ACATGCCAA CTTACCAGA TCCGAGC (配列番号16)
Ex 1 - 隠れ	TGGCTGTAA CTGGAGATG AAAC (配列番号17)	GGAAGAGAA GCAACTCCT CAA (配列番号18)	ACACACACA CACACACAC ACACAC (配列番号19)
隠れ - EX 2	CATGGGTTC CAAAGGATC AAAC (配列番号20)	TGTGGCAAA GCAGTAGTA GG (配列番号21)	ACATGCCAA CTTACCAGA TCCGAGC (配列番号22)
F y x d 2			
Ex 3 - Ex 4	ACTATGAAA CCGTCCGCA AA (配列番号23)	CCCACAGCG GAACCTTT (配列番号24)	CGTGGGCCT CCTCATCAT TCTCAG (配列番号25)
Ex 3 - 隠れ	ACTATGAAA CCGTCCGCA AA (配列番号26)	CCTCTTTGC TTCACCAA TGTC (配列番号27)	CGTGGGCCT CCTCATCAT TCTCAG (配列番号28)
隠れ - Ex 4	TTCTGGAAT TCCCACACA CTC (配列番号29)	CCCACAGCG GAACCTTT (配列番号30)	CTCTGAATG AAAGCTGGG CTCTTGGA (配列番号31)
C r l F 1			
Ex 1 - EX 2	CTGTCCTCG CTGTGGTC (配列番号32)	GGAGGAGCC GATGAGAAG (配列番号33)	TCTGTTGCT CTGTGTCCT CGGG (配列番号34)
Ex 1 - 隠れ	GTCGCCTCT GTTGCTCTG (配列番号35)	TCCATCCAT TCATCCATC CATC (配列番号36)	ACCTCAGT TCCTGGCA TATTG (配列番号37)
隠れ - EX 2	GAGACCTCA GAGA ACTGA	CCAGGTGTG TCTCCATGT	TTCTCATC GGCTCCTC

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

	ATGG (配列番号 38)	ATAG (配列番号 39)	CCTGCAAG (配列番号 40)
TDP-43			
EX6-EX7	GCTGAACCT AAGCATAAT AGCAATAG (配列番号 41)	GGATGAGAA AGCATGTAG ACAG (配列番号 42)	TGGAAGAA GCACTTCA TTGAAAGT AGTGC (配列番号 43)

10

【0292】

実施例 4：変異させた TDP-43 タンパク質を発現するマウスの作製

TDP-43 の欠失は胚致死をもたらすが、内在性 TARDDBP 遺伝子座から変異型 NLS TDP-43 遺伝子または変異型 PLD TDP-43 遺伝子のみを発現する胚性幹細胞は生存可能であり、試験管内で運動ニューロンに分化してもよい。このデータは、内在性 TARDDBP 遺伝子座から機能的構造ドメインを欠く変異型 TDP-43 ポリペプチドを発現する胚性幹細胞が生存可能であってもよく、且つ TDP-43 タンパク症の動物モデルを作り出すのに有用であってもよい可能性を高めている。例えば、そのような胚性幹細胞は、正常な及び病的な生物プロセスにおける TDP-43 構造ドメインの役割を調べるために、機能的構造ドメインを欠く変異型 TDP-43 タンパク質を発現する非ヒト動物、例えばマウスを生成するのに使用されてもよい。

20

【0293】

機能的な NLS または PLD のドメインを欠く変異型 TDP-43 タンパク質を発現する胚または動物を作成するには、VelociMouse (登録商標) 法 (Dechiara, T.M., (2009), Methods Mol. Biol. 530: 311-324; Poueymirou et al. (2007), Nat. Biotechnol. 25: 91-99) を使用したが、その際、(i) 内在性 TARDDBP 遺伝子座にて、条件付きで loxP が導入されたエクソン 3 (loxP-Ex3-loxP)、loxP が導入されたエクソン 3 の Cre が介在する欠失の際のヌル対立遺伝子 (-)、NLS のノックアウト突然変異 (NLS)、プリオン様ドメインの欠失 (PLD) を含む TARDDBP 遺伝子、または野生型 TARDDBP 遺伝子 (WT) を含む (図 3A を参照)、且つ (ii) 相同染色体上の他方の TARDDBP 遺伝子座にて、野生型 (WT) TARDDBP 遺伝子、または loxP が導入されたエクソン 3 の Cre が介在する欠失の際のヌル対立遺伝子 (-) を含む、標的にされた ES 細胞を密ではない 8 細胞期の Swiss Webster の胚に注入した。受精後の胚の生存率を調べ、生きて生まれる F0 世代のマウスを生産する能力を評価した。

30

【0294】

以前の実験と一致して、機能的な TDP-43 タンパク質 (TDP-43^{-/-}) を欠く胚は生存できず、E3.5 期 (図 12) を超えて生存しなかった。同様に、機能的な NLS を欠く TDP-43 タンパク質 (TDP-43^{NLS/-}) のみを発現する胚または機能的な PLD を欠く TDP-43 タンパク質 (TDP-43^{PLD/-}) のみを発現する胚はさらに長く生存はしたものの、生存能力はなかった (図 12)。TARDDBP 遺伝子座の一方の対立遺伝子からの野生型 TDP-43 タンパク質の発現は、染色体の他方の対立遺伝子から機能的な NLS を欠く TDP-43 タンパク質 (TDP-43^{NLS/-}) または機能的な PLD を欠く TDP-43 タンパク質 (TDP-43^{PLD/-}) を発現している胚を救済した (図 12)。

40

【0295】

生きて生まれた F0 世代のマウスは、(i) 内在性 TARDDBP 遺伝子座にて、野生型遺伝子 (WT)、loxP が導入されたエクソン 3 の Cre が介在する欠失、loxP が

50

導入されたエクソン3 (10xP - Ex3 - 10xP)、NLSのノックアウト突然変異 (NLS)、プリオン様ドメインの欠失 (PLD) を含むTARDBP遺伝子を含み (図3Aを参照)、且つ (iii) 相同染色体上の他方のTARDBP遺伝子座にて、野生型 (WT) TARDBP遺伝子を含むES細胞を注入した8細胞期のSwiss Websterの胚から首尾よく生産された。

【0296】

実施例4：機能的構造ドメインを欠く変異型TDP - 43ポリペプチドを発現するマウスの表現型分析

実施例3で生成された動物の表現型は、該動物から単離された脊髄組織または運動ニューロンにおけるTDP - 43ポリペプチドの局在化、リン酸化状態、及び溶解度を評価することによって分析した。さらに、動物の筋肉の脱神経または神経支配も決定した。

【0297】

16週齢のマウスの脊髄に由来する運動ニューロンの細胞質画分及び核画分を、以下：(1) 野生型TDP - 43タンパク質のN末端を認識するので野生型TDP - 43、NLS TDP - 43、及び PLD TDP - 43に結合する抗体、(2) 野生型TDP - 43タンパク質のC末端を認識するので野生型TDP - 43及び NLS TDP - 43に結合するが、PLD TDP - 43に結合しない抗体、または(3) TDP - 43をリン酸化された形で認識する抗体、を用いたウエスタンブロット分析によって評価した。

【0298】

図13A ~ 13Cに示すように、野生型及び NLS変異型のTDP - 43タンパク質は約43Kdの予想サイズで検出され、PLD変異型は約30Kdの予想サイズで検出された。実施例2で分析されたESMNと同様に、機能的NLSまたはPLDを欠く変異型TDP - 43ポリペプチドは、野生型TDP - 43タンパク質の存在下でさえ、脊髄組織の核から細胞質に再分布した。図13A。約43Kdのリン酸化TDP - 43ポリペプチドが、変異型 NLSまたは PLDポリペプチドを発現しているマウスの脊髄に由来する運動ニューロンの細胞質で検出されたが、野生型TDP - 43ポリペプチドのみを発現しているマウスでは検出されなかった。図13B。運動ニューロンの核におけるリン酸化TDP - 43は調べたすべての試料で検出されないままだった。図13B。リン酸化部位はアミノ酸の409位 / 410位にあるので、機能的なPLDを欠くリン酸化TDP - 43ポリペプチドが検出されなかったことは驚くべきことではない。図13B。NLSドメインにて機能的突然変異を含む NLS変異型TDP - 43タンパク質を発現している16週齢のマウスの脊髄の運動ニューロンは全体的に不溶性TDP - 43タンパク質のレベルの上昇を示した。図13C。PLD変異型TDP - 43タンパク質を発現しているマウスではTDP - 43タンパク質の溶解度に上昇があるとは思われなかった。不溶性画分に PLD変異型が検出されなかったので、PLD変異型は可溶性だと思われる。図13C。

【0299】

NLSドメインにて機能的突然変異を含む NLS変異型TDP - 43タンパク質または機能的PLDを欠く PLD TDP - 43変異タンパク質を発現しているマウスの運動ニューロンのサブセットは、広範な細胞質TDP - 43凝集を示した。図14。細胞質凝集は、機能的なNLSを欠く変異型TDP - 43ポリペプチドを発現しているマウスと比べて、PLD変異型タンパク質を発現しているマウスの運動ニューロンで検出される頻度が低かった。図14。

【0300】

脱神経はALSに現れる最初の病理学的特徴の1つであるので、主に速筋線維 (前脛骨筋) または遅筋線維 (肋間筋) を含む筋肉を脱神経について分析した。TDP - 43の誤った局在は、部分的に神経支配された終板 (*) と、主に速筋線維を含むが、遅筋線維を含まない筋肉の脱神経 (矢印) をもたらした。図15A ~ 15B。

【0301】

本明細書に示されるデータは、本明細書に記載されている動物がALSの貴重な疾患モ

10

20

30

40

50

デルであってもよいことを示唆している。典型的なALS患者では、遠位の高速疲労性（FF）運動単位が最も早く影響を受け、運動ニューロンが失われる前に筋肉の神経原性変化を観察することができる。同様に、最も広く使用されている「ALS」モデルであるSOD1 G93Aマウスの運動ニューロン喪失も、FF運動単位の早期かつ優先的な関与を伴う骨格筋の脱神経が先行する。対照的に、肋間筋や横隔膜など、主に遅筋線維によって神経支配されている近位筋は一般に、最後まで温存され且つこれらの筋肉の脱神経は致命的である。疾患が進行するにつれて、肋間筋の脱神経が予想されてもよい。

【0302】

(a) 機能的なNLSまたはPLDを欠く変異型TDP-43ポリペプチドと(b)野生型TDP-43ポリペプチド、との双方を発現するマウスの表現型を分析するのに使用される材料と方法を以下に記載する。

10

【0303】

変異型TDP-43ポリペプチドの細胞内局在及びリン酸化の検出

【0304】

TDP-43ポリペプチドのN末端を認識する抗体（-TDP-43N-term）とTDP-43ポリペプチドのC末端プリオン様ドメインを認識する抗体（-TDP-43C-term）（Proteintech, Rosemont, IL）を使用してTDP-43変異型の細胞内局在を分析した。可溶性細胞質タンパク質抽出物は、脊髄全組織をプロテアーゼ及びホスファターゼの阻害剤（Roche）で補完した氷溶解緩衝液（10mMのKCl、10mMのTris-HCl、pH7.4、1mMのMgCl₂、1mMのDTT、0.01%NP-40）にて氷上で10分間インキュベートすることによって調製した。次に、細胞を27ゲージの注射器に5回通した。4にて4000rpmで5分間遠心分離した後、可溶性細胞質抽出物を含むタンパク質上清を回収した。不溶性核タンパク質抽出物は、プロテアーゼとホスファターゼで補完した等量のRBS-100緩衝液（10mMのTris-HCl、pH7.4、2.5mMのMgCl₂、100mMのNaCl、0.1%NP-40）にペレットを再懸濁させることによって調製した。等量の2xSDS試料緩衝液を各画分に加え、試料を90に加熱した。次に、等量の各画分を14%SDSゲル上に載せ、225Vで50分間電気泳動した後、-TDP-43-N-term抗体（図13A）、-TDP-43-C-term抗体（図13A）、またはアミノ酸409/410にてTDP-43のリン酸化を検出する-ホスホTDP-43抗体（図13B）（Cosmo Bio USA; カタログ番号CAC-TIP-PTD-M01）を使用してTDP-43のウエスタンブロッティングを行った。-TDP-43-C-term抗体も-ホスホTDP-43抗体もPLD欠失変異型を認識しない。デンストメトリーはImageJを使用して実行した（図13A及び13B）。細胞質/核のTDP-43の比率をプロットし、GraphPad for Prismを使用して統計的に分析した（図13A、下のパネル）。

20

30

【0305】

蛍光原位ハイブリッド形成（FISH）

【0306】

脊髄を脊柱から分離し、4%PFAで一晩（またはFUS免疫染色の場合は1時間）浸漬固定し、1xPBSで洗浄した。脊髄セグメントを4%低融点アガロース（Promega）に埋め込み、ピプラトーム（Leica VT1000S）を使用して連続横断面（70μM）を切断し、浮遊処理した。浮遊脊髄切片を、0.2%TritonX-100（TBS-T）を伴うTris緩衝生理食塩水（pH7.4）で希釈した5%正常口バ血清でブロックし、5%正常口バ血清を伴うTBS-Tで希釈した一次抗血清にて室温で一晩インキュベートした。使用される一次抗体は：ChAT（1:250）EMD Millipore Cat AB144P; TDP-43（1:10,000）Proteintech 10782-2-AP及びNeuN（1:500）EMD Millipore MAB377である。TBS-Tで洗浄した後、組織切片をAlexa 488、555、647（1:1,000; Life Technologies, Carlsbad,

40

50

CA, USA)、Cy3またはCy5(希釈率1:500; Jackson Immuno research Labs, West Grove, PA, USA)に結合した種特異的二次抗体とともに室温で4時間インキュベートした。TBS-Tで洗浄した後、染色した組織切片をFluoromount G(Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)の顕微鏡スライドにて標本化し、LSM510共焦点顕微鏡を使用して40倍の倍率と1.5ズームで画像化した。(図14)

【0307】

変異型TDP-43ポリペプチドの溶解度

【0308】

このプロトコールは、Jo et al.(2014), Nature Communications, 5:3496から採用された。50mMのN-エチルマレイミド(NEM)、1mMのNaF、1mMのNa3VO4、1mMのPMSF及び各10ug/mLのアプロチニン、ロイペプチン、及びペプスタチンを含む500uLの氷冷可溶性緩衝液(0.1MのMES(pH7)、1mMのEDTA、0.5mMのMgSO4、1Mのスクロース)。16週齢のマウスの脊髄組織の細胞を21ゲージの針に3~5回通し、続いて23ゲージの針に3~5回通して溶解した。次に、等量のホモジネートを各試料から回収し、50,000xgにて20分間4で遠心分離し、残りを-80で保存した。上清を除去し、各ペレットを、1%N-ラウロイルサルコシン(Sarkosyl)及びプロテアーゼ阻害剤(1mMのPMSF、50mMのNEM、及び各10ug/mLのアプロチニン、ロイペプチン、ペプスタチン)を含む700uLのRAB緩衝液(100mMのMES(pH6.8)、10%スクロース、2mMのEGTA、0.5mMのMgSO4、500mMのNaCl、1mMのMgCl2、10mMのNaH2PO4、20mMのNaF)に再懸濁させ、RTで1分間ボルテックスし、転倒回転しながら4で一晩インキュベートした。次に、試料を200,000xgで12にて30分間遠心分離し、上清をサルコシル可溶性画分として回収した。ペレットを700uLのRAB緩衝液に再懸濁させ、26ゲージの針に3~5回通してペレットを完全に分散させ、サルコシル不溶性画分を作成した。次に、サルコシル可溶性及び不溶性の画分の等量を等分し、等量の2xSDS試料緩衝液をそれぞれに加えた。試料を90に加熱した。次に、等量の各画分を14%SDSゲルに載せ、225Vで50分間電気泳動した後、TDP-43のウエスタンブロッティングを行った。デンシトメトリーはImageJを使用して実行した(図13C)。可溶性:不溶性のTDP-43の比率をプロットし、GraphPad for Prismを使用して統計的に分析した。(図13C)。

【0309】

脱神経試験

【0310】

筋肉分析のために、前脛骨筋(TA)と肋間筋を切断し、4%PFAに浸して2時間後固定し、1xリン酸緩衝生理食塩水、pH7.4(PBS)で洗浄した。次に、筋肉をショ糖の勾配(0.1Mリン酸緩衝液、pH7.4にて10%-20%-30%のショ糖)で平衡化し、O.C.T.コンパウンド(Sakura, Torrance, CA)に包埋し、-20で凍結した。凍結ミクロトーム(Leica CM 3050S)を使用して連続切片(厚さ30um)を切断した。筋肉の凍結切片(30um)をシナプトフィジン(invitrogen)に対する抗体で染色してシナプス前終末を特定し、Alexa488結合-BTX(invitrogen)でシナプス後アセチルコリン受容体を検出した。x10及びx40の対物レンズを用いたZeiss Pascal LSM510共焦点顕微鏡を使用して画像を取得した。NMJ神経支配百分率(%)は、VACHTシグナルと-BTXシグナルとの間の重複領域の総数(神経支配された終板の総数)を領域-BTXシグナルの数(終板の総数)で割ることによって決定した。

(項目1)

変異型TDP-43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子を含む非ヒト動物細胞であって、

10

20

30

40

50

前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドが、野生型 TDP - 43 ポリペプチドに見いだされる核局在化シグナル (NLS)、RNA 認識モチーフ 1 (RRM1)、RNA 認識モチーフ 2 (RRM2)、推定核外輸送シグナル (E)、プリオン様ドメイン (PLD)、またはそれらの組み合わせを含む機能的構造ドメインを欠き、且つ

前記非ヒト動物細胞は前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドを発現し、任意で、前記野生型 TDP - 43 ポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 5 として示される配列を含む、前記非ヒト動物細胞。

(項目 2)

前記非ヒト動物細胞が胚性幹 (ES) 細胞、胚様体、または胚性幹細胞由来運動ニューロン (ESMN) である、項目 1 に記載の非ヒト動物細胞。

10

(項目 3)

前記変異させた TARDP 遺伝子が前記非ヒト動物の変異させた TARDP 遺伝子である、項目 1 または項目 2 に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 4)

前記変異させた TARDP 遺伝子が変異させたヒト TARDP 遺伝子である、項目 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 5)

前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドが以下：

- (a) 前記 NLS におけるアミノ酸の点突然変異、
- (b) 前記 RRM1 におけるアミノ酸の点突然変異、
- (c) 前記 RRM2 におけるアミノ酸の点突然変異、
- (d) 前記核外輸送シグナルの少なくとも一部の欠失、及び
- (e) 前記プリオン様ドメインの少なくとも一部の欠失、の 1 以上に起因して機能的構造ドメインを欠く、先行項目のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

20

(項目 6)

- (a) 前記 NLS におけるアミノ酸の前記点突然変異が K82A、K83A、R84A、K95A、K97A、K98A、またはそれらの組み合わせを含み、
- (b) RRM1 における前記点突然変異が F147L 及び/または F149L を含み、
- (c) RRM2 における前記点突然変異が F194L 及び/または F229L を含み、
- (d) 前記核外輸送シグナル欠失の少なくとも一部の前記欠失が野生型 TDP - 43 ポリペプチドの 239 位と 250 位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含み、且つ
- (e) 前記プリオン様ドメインの少なくとも一部の前記欠失が野生型 TDP - 43 ポリペプチドの 274 位と 414 位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含む、項目 5 に記載の非ヒト動物細胞。

30

(項目 7)

前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドが K82A、K83A、R84A、K95A、K97A、及び K98A を含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 8)

前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドが野生型ポリペプチドの 274 位から 414 位のアミノ酸で前記プリオン様ドメインを欠く、先行項目のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

40

(項目 9)

前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドが F147L 及び F149L を含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 10)

前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドが F194L 及び F229L を含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 11)

前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドが 239 位から 250 位のアミノ酸で前記核外輸送シグナルを欠く、先行項目のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

50

(項目 1 2)

変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子が内在性 T A R D B P 遺伝子座にて内在性 T A R D B P 遺伝子に取って代わる、先行項目のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 1 3)

前記非ヒト動物細胞が、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子についてヘテロ接合性である、項目 1 3 に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 1 4)

前記非ヒト動物細胞が、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子についてホモ接合性である、項目 1 3 に記載の非ヒト動物細胞。

10

(項目 1 5)

前記非ヒト動物細胞がさらに、ノックアウト突然変異を含む T A R D B P 遺伝子を含む、項目 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 1 6)

前記ノックアウト突然変異が条件付きノックアウト突然変異を含む、項目 1 6 に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 1 7)

前記ノックアウト突然変異が部位特異的組換え認識配列を含む、項目 1 5 または項目 1 6 に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 1 8)

前記ノックアウト突然変異が l o x p 配列を含む、項目 1 5 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

20

(項目 1 9)

前記 l o x p 配列がノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子のエクソン 3 に隣接する、項目 1 8 に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 2 0)

前記ノックアウト突然変異が、T D P - 4 3 ペプチドのコード配列全体の欠失を含む、項目 1 6 に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 2 1)

前記非ヒト動物細胞が前記操作された T A R D B P 遺伝子座についてヘテロ接合性であり、且つ

30

(i) 一方の染色体にて内在性 T A R D B P 遺伝子座での内在性 T A R D B P 遺伝子の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子による置換、及び

(i i) 他方の相同染色体にて前記内在性 T A R D B P 遺伝子座での前記ノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子または野生型 T A R D B P 遺伝子のいずれかを含む、項目 1 5 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 2 2)

前記非ヒト動物細胞が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現しない、先行項目のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

40

(項目 2 3)

前記非ヒト動物細胞が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する、項目 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 2 4)

(i) 対照細胞における野生型 T A R D B P 遺伝子の m R N A 転写物レベルに匹敵する前記変異させた T A R D B P 遺伝子の m R N A 転写物レベル、

(i i) 対照細胞における野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドのレベルと比べて前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドのレベルの増加、

(i i i) 例えば、運動ニューロンの核よりも細胞質に高濃度で見られる変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド、

50

(i v) 野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドと比べて不溶性が増した変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド、

(v) 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを含む細胞質凝集体、

(v i) 隠れエクソンのスプライシングの増加、及び/または

(v i i) 選択的スプライシングを受けた T D P - 4 3 形態のレベルの低下、を含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 2 5)

(i) 一方の染色体にて内在性 T A R D B P 遺伝子座での T A R D B P 遺伝子の条件付きノックアウト突然変異と、

(i i) 他方の相同染色体にて前記内在性 T A R D B P 遺伝子座での T A R D B P コード配列全体の欠失と、を含む非ヒト動物細胞。

10

(項目 2 6)

前記細胞が胚性幹 (E S) 細胞、原始外胚葉細胞、または運動ニューロン (E S M N) に由来する運動ニューロンである、先行項目のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 2 7)

前記非ヒト動物細胞が齧歯類細胞である、先行項目のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 2 8)

前記非ヒト動物細胞がラット細胞である、先行項目のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

20

(項目 2 9)

前記非ヒト動物細胞がマウス細胞である、項目 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 3 0)

前記非ヒト動物細胞が試験管内で培養される、先行項目のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 3 1)

先行項目のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞を含む非ヒト動物組織。

(項目 3 2)

先行項目のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞または組織を含む組成物。

30

(項目 3 3)

変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する非ヒト動物または非ヒト動物細胞を作製する方法であって、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を含むように前記非ヒト動物または非ヒト動物細胞のゲノムを操作することを含み、その際、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは野生型 T D P - 4 3 と比べて機能的構造ドメインを欠き、任意で、前記野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 5 として示される配列を含む、前記方法。

(項目 3 4)

操作することが、内在性 T A R D B P 遺伝子を、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子で置き換えることを含む、項目 3 3 に記載の方法。

40

(項目 3 5)

操作することがさらに、内在性 T A R D B P 遺伝子を、ノックアウト突然変異を含む T A R D B P 遺伝子で置き換えることを含む、項目 3 3 または項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記ノックアウト突然変異が条件付きノックアウト突然変異を含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 7)

さらに、ノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子の発現を排除する条件で前記細胞を培養することを含む、項目 3 6 に記載の方法。

50

(項目 3 8)

疾患の治療のための治療候補を特定する方法であって、

(a) 項目 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞もしくは組織、または項目 3 2 に記載の組成物を候補薬剤と接触させることと、

(b) 前記非ヒト細胞または組織の表現型及び / または T D P - 4 3 生物活性を評価することと、

(c) 野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する対照の細胞または組織の表現型及び / または T D P - 4 3 生物活性に匹敵する表現型及び / または T D P - 4 3 生物活性を前記非ヒト細胞または組織に取り戻す前記候補薬剤を特定することと、を含む、前記方法。

(項目 3 9)

T D P - 4 3 構造ドメインの生物学的機能を評価する方法であって、

(a) 核局在化シグナル (N L S)、第 1 の R N A 認識モチーフ (R R M 1)、第 1 の R N A 認識モチーフ (R R M 2)、推定核外輸送シグナル (E)、プリオン様ドメイン (P L D)、及びそれらの組み合わせから成る群から選択される機能的構造ドメインを欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を含むように胚性幹 (E S) 細胞を操作することと、

(b) 任意で、前記操作された E S 細胞を試験管内で分化させること、及び / または前記操作された E S 細胞から遺伝子操作された非ヒト動物を取得することと、

(c) 前記遺伝子操作された E S 細胞、それに由来する原始外胚葉、それに由来する運動ニューロン、またはそれに由来する非ヒト動物の表現型及び / または T D P - 4 3 生物活性を評価することと、を含む、前記方法。

(項目 4 0)

前記表現型が、細胞培養、蛍光原位置ハイブリッド形成、ウエスタンブロット分析、またはそれらの組み合わせによって評価される、項目 3 8 または項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記表現型を評価することが、前記遺伝子操作された E S 細胞、それに由来する原始外胚葉、それに由来する運動ニューロン、またはそれに由来する非ヒト動物の生存能力を測定することを含む、項目 3 8 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 2)

前記表現型を評価することが、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドの細胞での位置を決定することを含む、項目 3 8 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 3)

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドの前記生物活性を評価することが、T D P - 4 3 によって調節される隠れエクソンを含む遺伝子のスプライス産物を測定することを含む、項目 3 8 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 4)

T D P - 4 3 によって調節される隠れエクソンを含む前記遺伝子が C r e m、F y x d 2、C l f 1 を含む、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 4 5)

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドの前記生物活性を評価することが、選択的スプライシングを受けた T D P - 4 3 のレベルを測定することを含む、項目 3 8 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 6)

T D P - 4 3 ポリペプチドの P L D をコードし、及び / またはエクソン 6 の下流とエクソン 7 の上流の非翻訳配列を含む T D P - 4 3 m R N A 配列を標的とするギャップマーモチーフを含む、アンチセンスオリゴヌクレオチド。

(項目 4 7)

T D P - 4 3 ポリペプチドの P L D をコードし、及び / またはエクソン 6 の下流とエクソン 7 の上流の非翻訳配列を含む T D P - 4 3 m R N A 配列を標的とする配列を含む、s i R N A。

10

20

30

40

50

(項目 48)

Cas9タンパク質と少なくとも1つのgRNAとを含むCRISPR/Casシステムであって、前記gRNAがPLDを欠く切り詰めたTDP-43ポリペプチドをコードする選択的mRNAをもたらす選択的スプライス部位をコードする配列でのまたはその近傍の配列を認識する、前記CRISPR/Casシステム。

(項目 49)

項目2に記載の胚性幹細胞を含む、非ヒト動物。

(項目 50)

変異型TDP-43ポリペプチドをコードする変異させたTARDBP遺伝子を含む非ヒト動物であって、
前記変異型TDP-43ポリペプチドが、野生型TDP-43ポリペプチドに見いだされる核局在化シグナル(NLS)、RNA認識モチーフ1(RRM1)、RNA認識モチーフ2(RRM2)、推定核外輸送シグナル(E)、プリオン様ドメイン(PLD)、またはそれらの組み合わせを含む機能的構造ドメインを欠き、且つ任意で、前記野生型TDP-43ポリペプチドが配列番号1、配列番号3、または配列番号5として示される配列を含む、前記非ヒト動物。

10

(項目 51)

前記変異させたTARDBP遺伝子が前記非ヒト動物の変異させたTARDBP遺伝子である、項目50に記載の非ヒト動物。

(項目 52)

前記変異させたTARDBP遺伝子が変異させたヒトTARDBP遺伝子である、項目50または項目51に記載の非ヒト動物。

20

(項目 53)

前記変異型TDP-43ポリペプチドが以下：

- (a) 前記NLSにおけるアミノ酸の点突然変異、
- (b) 前記RRM1におけるアミノ酸の点突然変異、
- (c) 前記RRM2におけるアミノ酸の点突然変異、
- (d) 前記核外輸送シグナルの少なくとも一部の欠失、及び
- (e) 前記プリオン様ドメインの少なくとも一部の欠失、の1以上に起因して機能的構造ドメインを欠く、項目50～52のいずれか1項に記載の非ヒト動物。

30

(項目 54)

- (a) 前記NLSにおけるアミノ酸の前記点突然変異がK82A、K83A、R84A、K95A、K97A、K98A、またはそれらの組み合わせを含み、
- (b) RRM1における前記点突然変異がF147L及び/またはF149Lを含み、
- (c) RRM2における前記点突然変異がF194L及び/またはF229Lを含み、
- (d) 前記核外輸送シグナル欠失の少なくとも一部の前記欠失が野生型TDP-43ポリペプチドの239位と250位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含み、且つ
- (e) 前記プリオン様ドメインの少なくとも一部の前記欠失が野生型TDP-43ポリペプチドの274位と414位にて及びその間でアミノ酸の欠失、を含む、項目53に記載の非ヒト動物。

40

(項目 55)

前記変異型TDP-43ポリペプチドがK82A、K83A、R84A、K95A、K97A、及びK98Aを含む、項目50～54のいずれか1項に記載の非ヒト動物。

(項目 56)

前記変異型TDP-43ポリペプチドが野生型ポリペプチドの274位から414位のアミノ酸で前記プリオン様ドメインを欠く、項目50～55のいずれか1項に記載の非ヒト動物。

(項目 57)

前記変異型TDP-43ポリペプチドがF147L及びF149Lを含む、項目50～56のいずれか1項に記載の非ヒト動物。

50

(項目 5 8)

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが F 1 9 4 L 及び F 2 2 9 L を含む、項目 5 0 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 5 9)

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが 2 3 9 位から 2 5 0 位のアミノ酸で前記核外輸送シグナルを欠く、項目 5 0 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 6 0)

変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子が内在性 T A R D B P 遺伝子座にて内在性 T A R D B P 遺伝子に取って代わる、項目 5 0 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

10

(項目 6 1)

前記非ヒト動物が、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子についてヘテロ接合性である、項目 6 0 に記載の非ヒト動物。

(項目 6 2)

前記非ヒト動物がさらに、ノックアウト突然変異を含む T A R D B P 遺伝子を含む、項目 5 0 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 6 3)

前記ノックアウト突然変異が条件付きノックアウト突然変異を含む、項目 6 2 に記載の非ヒト動物。

(項目 6 4)

前記ノックアウト突然変異が部位特異的組換え認識配列を含む、項目 6 2 または項目 6 3 に記載の非ヒト動物。

20

(項目 6 5)

前記ノックアウト突然変異が 1 o x p 配列を含む、項目 6 2 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 6 6)

前記 1 o x p 配列がノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子のエクソン 3 に隣接する、項目 6 5 に記載の非ヒト動物。

(項目 6 7)

前記ノックアウト突然変異が T D P - 4 3 ペプチドのコード配列全体の欠失を含む、項目 6 2 に記載の非ヒト動物。

30

(項目 6 8)

前記非ヒト動物が前記操作された T A R D B P 遺伝子座についてヘテロ接合性であり、且つ

(i) 一方の染色体にて内在性 T A R D B P 遺伝子座での内在性 T A R D B P 遺伝子の、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子による置換、及び

(i i) 他方の相同染色体にて前記内在性 T A R D B P 遺伝子座での、前記ノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子または野生型 T A R D B P 遺伝子のいずれか、を含む、項目 6 2 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

40

(項目 6 9)

前記非ヒト動物が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する、項目 4 9 ~ 6 8 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 7 0)

(i) 対照動物における野生型 T A R D B P 遺伝子の m R N A 転写物レベルに匹敵する前記変異させた T A R D B P 遺伝子の m R N A 転写物レベル、

(i i) 対照動物における野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドのレベルと比べて前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドのレベルの増加、

(i i i) 例えば、運動ニューロンの核よりも細胞質に高濃度で見られる変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド、

50

(i v) 野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドと比べて不溶性が増した変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド、

(v) 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを含む細胞質凝集体、

(v i) 隠れエクソンのスプライシングの増加、

(v i i) 選択的スプライシングを受けた T D P - 4 3 形態のレベルの低下、

(v i i i) 前脛骨筋のような主に速筋で構成される筋肉組織の脱神経、及び/または

(i x) 肋間筋のような主に遅筋で構成される筋肉組織の正常な神経支配、を含む、項目 4 9 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 7 1)

(i) 一方の染色体にて内在性 T A R D B P 遺伝子座での前記 T A R D B P 遺伝子の条件付きノックアウト突然変異、及び (i i) 他方の相同染色体にて前記内在性 T A R D B P 遺伝子座での T A R D B P コード配列全体の欠失、を含む、非ヒト動物。

10

(項目 7 2)

前記非ヒト動物が齧歯動物である、項目 4 9 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 7 3)

前記非ヒト動物がラットである、項目 4 9 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。(

項目 7 4)

前記非ヒト動物がマウスである、項目 4 9 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。(

項目 7 5)

疾患の治療のための治療候補を特定する方法であって、

20

(a) 項目 4 9 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物を候補薬剤と接触させることと、

(b) 前記非ヒト動物の表現型及び/または T D P - 4 3 生物活性を評価することと、

(c) 前記非ヒトが表現型及び/または T D P - 4 3 生物活性を取り戻す前記候補薬剤を特定することと、を含む、前記方法。

(項目 7 6)

変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドであって、以下：

(a) N L S におけるアミノ酸の点突然変異、

(b) R R M 1 におけるアミノ酸の点突然変異、

(c) R R M 2 におけるアミノ酸の点突然変異、

(d) 核外輸送シグナルの少なくとも一部の欠失、及び

30

(e) プリオン様ドメインの少なくとも一部の欠失、の 1 以上を含むように修飾された配列番号 1、3、または 5 として示される配列を含む、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド。

(項目 7 7)

(a) 前記 N L S におけるアミノ酸の前記点突然変異が K 8 2 A、K 8 3 A、R 8 4 A、K 9 5 A、K 9 7 A、K 9 8 A、またはそれらの組み合わせを含み、

(b) R R M 1 における前記点突然変異が F 1 4 7 L 及び/または F 1 4 9 L を含み、

(c) R R M 2 における前記点突然変異が F 1 9 4 L 及び/または F 2 2 9 L を含み、

(d) 前記核外輸送シグナル欠失の少なくとも一部の前記欠失が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドの 2 3 9 位と 2 5 0 位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含み、且つ

40

(e) 前記プリオン様ドメインの少なくとも一部の前記欠失が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドの 2 7 4 位と 4 1 4 位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含む、項目 7 6 に記載の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド。

(項目 7 8)

K 8 2 A 突然変異、K 8 3 A 突然変異、R 8 4 A 突然変異、K 9 5 A 突然変異、K 9 7 A 突然変異、及び/または K 9 8 A 突然変異を含む、項目 7 6 または項目 7 7 に記載の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド。

(項目 7 9)

野生型ポリペプチドの 2 7 4 位から 4 1 4 位のアミノ酸で前記プリオン様ドメインの欠失を含む、項目 7 6 ~ 7 8 のいずれか 1 項に記載の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド。

50

(項目 8 0)

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが F 1 4 7 L 突然変異及び/または F 1 4 9 L 突然変異を含む、項目 7 6 ~ 7 9 のいずれか 1 項に記載の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド。

(項目 8 1)

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが F 1 9 4 L 突然変異及び/または F 2 2 9 L 突然変異を含む、項目 7 6 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド。

(項目 8 2)

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが 2 3 9 位から 2 5 0 位のアミノ酸で前記核外輸送シグナルを欠く、項目 7 6 ~ 8 1 のいずれか 1 項に記載の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド。

10

(項目 8 3)

項目 7 6 ~ 8 2 のいずれか 1 項に記載の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸。

(項目 8 4)

さらに、5'から3'に向かって: 5' 相溶性アームと、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記核酸配列と、3' 相溶性アームとを含み、前記核酸が齧歯類細胞にて相同組換えを受ける、項目 8 3 に記載の核酸。

(項目 8 5)

前記核酸が内在性ラット T A R D B P 遺伝子座にて相同組換えを受け、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記核酸配列が前記内在性 T A R D B P コード配列を置き換えるように前記 5' 及び 3' の相溶性アームがラット配列に相同である、項目 8 4 に記載の核酸。

20

(項目 8 6)

前記核酸が内在性マウス T A R D B P 遺伝子座にて相同組換えを受け、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記核酸配列が前記内在性 T A R D B P コード配列を置き換えるように前記 5' 及び 3' の相溶性アームがマウス配列に相同である、項目 8 4 に記載の核酸。

(項目 8 7)

細胞にて P L D を欠く切り詰めた T D P - 4 3 をコードする選択的 T D P - 4 3 m R N A を温存しながら、P L D を含む T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする T D P - 4 3 m R N A を選択的に減少させる方法であって、

30

(i) T D P - 4 3 ポリペプチドの P L D をコードし、及び/またはエクソン 6 の下流及びエクソン 7 の上流の非翻訳配列を含む T D P - 4 3 m R N A 配列を標的とするギャップマーモチーフを含むアンチセンスオリゴヌクレオチド、

(i i) T D P - 4 3 ポリペプチドの P L D をコードし、及び/またはエクソン 6 の下流及びエクソン 7 の上流の非翻訳配列を含む T D P - 4 3 m R N A 配列を標的とする配列を含む s i R N A、及び/または

(i i i) P L D を欠く切り詰め型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする選択的 m R N A をもたらず選択的スプライス部位をコードする配列でのまたはその近傍の配列を、g R N A が認識する、C a s 9 タンパク質と少なくとも 1 つの前記 g R N A とを含む C R I S P R / C a s システム、を前記細胞に導入することを含む、前記方法。

40

(項目 8 8)

本特許出願にて最初に記載され、開示され、または図示された主題が包含する任意の実施形態または任意の適用可能な項目カテゴリー、例えば、製品、プロセス、または使用によって特徴付けられる、変異型 T D P - 4 3 を発現する非ヒト動物、非ヒト動物を作製する方法、非ヒト動物を作製する前記方法で使用するための核酸、非ヒト動物を作製する前記方法で使用するための細胞、そのように作製された前記非ヒト動物の使用、及び前記非ヒト動物に由来する細胞及び/または変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する細胞、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド及び変異型ポリペプチドをコードする核酸、アンチセンスオリゴヌクレオチド、または s i R N A、C R I S P R / C a s システム。

50

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目 A 1)

変異型 TDP - 43 ポリペプチドをコードする変異させた TARDBP 遺伝子を含む非ヒト動物細胞であって、

前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドが、野生型 TDP - 43 ポリペプチドに見いだされる核局在化シグナル (NLS)、RNA 認識モチーフ 1 (RRM1)、RNA 認識モチーフ 2 (RRM2)、推定核外輸送シグナル (E)、プリオン様ドメイン (PLD)、またはそれらの組み合わせを含む機能的構造ドメインを欠き、且つ

前記非ヒト動物細胞は前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドを発現し、

任意で、前記野生型 TDP - 43 ポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 5 として示される配列を含む、前記非ヒト動物細胞。

10

(項目 A 2)

前記非ヒト動物細胞が胚性幹 (ES) 細胞、胚様体、または胚性幹細胞由来運動ニューロン (ESMN) である、項目 A 1 に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 3)

前記変異させた TARDBP 遺伝子が前記非ヒト動物の変異させた TARDBP 遺伝子である、項目 A 1 または項目 A 2 に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 4)

前記変異させた TARDBP 遺伝子が変異させたヒト TARDBP 遺伝子である、項目 A 1 ~ A 2 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

20

(項目 A 5)

前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドが以下：

(a) 前記 NLS におけるアミノ酸の点突然変異、

(b) 前記 RRM1 におけるアミノ酸の点突然変異、

(c) 前記 RRM2 におけるアミノ酸の点突然変異、

(d) 前記核外輸送シグナルの少なくとも一部の欠失、及び

(e) 前記プリオン様ドメインの少なくとも一部の欠失、の 1 以上に起因して機能的構造ドメインを欠く、先行項目 A のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 6)

(a) 前記 NLS におけるアミノ酸の前記点突然変異が K82A、K83A、R84A、K95A、K97A、K98A、またはそれらの組み合わせを含み、

(b) RRM1 における前記点突然変異が F147L 及び / または F149L を含み、

(c) RRM2 における前記点突然変異が F194L 及び / または F229L を含み、

(d) 前記核外輸送シグナル欠失の少なくとも一部の前記欠失が野生型 TDP - 43 ポリペプチドの 239 位と 250 位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含み、且つ

(e) 前記プリオン様ドメインの少なくとも一部の前記欠失が野生型 TDP - 43 ポリペプチドの 274 位と 414 位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含む、項目 A 5 に記載の非ヒト動物細胞。

30

(項目 A 7)

前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドが K82A、K83A、R84A、K95A、K97A、及び K98A を含む、先行項目 A のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

40

(項目 A 8)

前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドが野生型ポリペプチドの 274 位から 414 位のアミノ酸で前記プリオン様ドメインを欠く、先行項目 A のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 9)

前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドが F147L 及び F149L を含む、先行項目 A のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 10)

前記変異型 TDP - 43 ポリペプチドが F194L 及び F229L を含む、先行項目 A

50

のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 1 1)

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが 2 3 9 位から 2 5 0 位のアミノ酸で前記核外輸送シグナルを欠く、先行項目 A のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 1 2)

変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子が内在性 T A R D B P 遺伝子座にて内在性 T A R D B P 遺伝子に取って代わる、先行項目 A のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 1 3)

前記非ヒト動物細胞が、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子についてヘテロ接合性である、項目 A 1 3 に記載の非ヒト動物細胞。

10

(項目 A 1 4)

前記非ヒト動物細胞が、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子についてホモ接合性である、項目 A 1 3 に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 1 5)

前記非ヒト動物細胞がさらに、ノックアウト突然変異を含む T A R D B P 遺伝子を含む、項目 A 1 ~ A 1 3 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 1 6)

前記ノックアウト突然変異が条件付きノックアウト突然変異を含む、項目 A 1 6 に記載の非ヒト動物細胞。

20

(項目 A 1 7)

前記ノックアウト突然変異が部位特異的組換え認識配列を含む、項目 A 1 5 または項目 A 1 6 に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 1 8)

前記ノックアウト突然変異が 1 o x p 配列を含む、項目 A 1 5 ~ A 1 7 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 1 9)

前記 1 o x p 配列がノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子のエクソン 3 に隣接する、項目 A 1 8 に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 2 0)

前記ノックアウト突然変異が、T D P - 4 3 ペプチドのコード配列全体の欠失を含む、項目 A 1 6 に記載の非ヒト動物細胞。

30

(項目 A 2 1)

前記非ヒト動物細胞が前記操作された T A R D B P 遺伝子座についてヘテロ接合性であり、且つ

(i) 一方の染色体にて内在性 T A R D B P 遺伝子座での内在性 T A R D B P 遺伝子の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子による置換、及び

(i i) 他方の相同染色体にて前記内在性 T A R D B P 遺伝子座での前記ノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子または野生型 T A R D B P 遺伝子のいずれかを含む、項目 A 1 5 ~ A 2 0 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

40

(項目 A 2 2)

前記非ヒト動物細胞が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現しない、先行項目 A のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 2 3)

前記非ヒト動物細胞が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する、項目 A 1 ~ A 2 1 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 2 4)

(i) 対照細胞における野生型 T A R D B P 遺伝子の m R N A 転写物レベルに匹敵する前記変異させた T A R D B P 遺伝子の m R N A 転写物レベル、

50

(i i) 対照細胞における野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドのレベルと比べて前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドのレベルの増加、

(i i i) 例えば、運動ニューロンの核よりも細胞質に高濃度で見られる変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド、

(i v) 野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドと比べて不溶性が増した変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド、

(v) 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを含む細胞質凝集体、

(v i) 隠れエクソンのスプライシングの増加、及び/または

(v i i) 選択的スプライシングを受けた T D P - 4 3 形態のレベルの低下、を含む、先行項目 A のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

10

(項目 A 2 5)

(i) 一方の染色体にて内在性 T A R D B P 遺伝子座での T A R D B P 遺伝子の条件付きノックアウト突然変異と、

(i i) 他方の相同染色体にて前記内在性 T A R D B P 遺伝子座での T A R D B P コード配列全体の欠失と、を含む非ヒト動物細胞。

(項目 A 2 6)

前記細胞が胚性幹 (E S) 細胞、原始外胚葉細胞、または胚性幹細胞に由来する運動ニューロン (E S M N) である、先行項目 A のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 2 7)

前記非ヒト動物細胞が齧歯類細胞である、先行項目 A のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

20

(項目 A 2 8)

前記非ヒト動物細胞がラット細胞である、先行項目 A のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 2 9)

前記非ヒト動物細胞がマウス細胞である、項目 A 1 ~ A 2 7 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

(項目 A 3 0)

前記非ヒト動物細胞が試験管内で培養される、先行項目 A のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞。

30

(項目 A 3 1)

先行項目 A のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞を含む非ヒト動物組織。

(項目 A 3 2)

先行項目 A のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞または組織を含む組成物。

(項目 A 3 3)

変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する非ヒト動物または非ヒト動物細胞を作製する方法であって、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を含むように前記非ヒト動物または非ヒト動物細胞のゲノムを操作することを含み、その際、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドは野生型 T D P - 4 3 と比べて機能的構造ドメインを欠き、任意で、前記野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 5 として示される配列を含む、前記方法。

40

(項目 A 3 4)

操作することが、内在性 T A R D B P 遺伝子を、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子で置き換えることを含む、項目 A 3 3 に記載の方法。

(項目 A 3 5)

操作することがさらに、内在性 T A R D B P 遺伝子を、ノックアウト突然変異を含む T A R D B P 遺伝子で置き換えることを含む、項目 A 3 3 または項目 A 3 4 に記載の方法。

(項目 A 3 6)

前記ノックアウト突然変異が条件付きノックアウト突然変異を含む、項目 A 3 5 に記載

50

の方法。

(項目 A 3 7)

さらに、ノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子の発現を排除する条件で前記細胞を培養することを含む、項目 A 3 6 に記載の方法。

(項目 A 3 8)

疾患の治療のための治療候補を特定する方法であって、

(a) 項目 A 1 ~ A 3 1 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物細胞もしくは組織、または項目 A 3 2 に記載の組成物を候補薬剤と接触させることと、

(b) 前記非ヒト細胞または組織の表現型及び / または T D P - 4 3 生物活性を評価することと、

(c) 野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する対照の細胞または組織の表現型及び / または T D P - 4 3 生物活性に匹敵する表現型及び / または T D P - 4 3 生物活性を前記非ヒト細胞または組織に取り戻す前記候補薬剤を特定することと、を含む、前記方法。

(項目 A 3 9)

T D P - 4 3 構造ドメインの生物学的機能を評価する方法であって、

(a) 核局在化シグナル (N L S)、第 1 の R N A 認識モチーフ (R R M 1)、第 1 の R N A 認識モチーフ (R R M 2)、推定核外輸送シグナル (E)、プリオン様ドメイン (P L D)、及びそれらの組み合わせから成る群から選択される機能的構造ドメインを欠く変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた T A R D B P 遺伝子を含むように胚性幹 (E S) 細胞を操作することと、

(b) 任意で、前記操作された E S 細胞を試験管内で分化させること、及び / または前記操作された E S 細胞から遺伝子操作された非ヒト動物を取得することと、

(c) 前記遺伝子操作された E S 細胞、それに由来する原始外胚葉、それに由来する運動ニューロン、またはそれに由来する非ヒト動物の表現型及び / または T D P - 4 3 生物活性を評価することと、を含む、前記方法。

(項目 A 4 0)

前記表現型が、細胞培養、蛍光原位置ハイブリッド形成、ウエスタンブロット分析、またはそれらの組み合わせによって評価される、項目 A 3 8 または項目 A 3 9 に記載の方法。

(項目 A 4 1)

前記表現型を評価することが、前記遺伝子操作された E S 細胞、それに由来する原始外胚葉、それに由来する運動ニューロン、またはそれに由来する非ヒト動物の生存能力を測定することを含む、項目 A 3 8 ~ A 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 A 4 2)

前記表現型を評価することが、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドの細胞での位置を決定することを含む、項目 A 3 8 ~ A 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 A 4 3)

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドの前記生物活性を評価することが、T D P - 4 3 によって調節される隠れエクソンを含む遺伝子のスプライス産物を測定することを含む、項目 A 3 8 ~ A 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 A 4 4)

T D P - 4 3 によって調節される隠れエクソンを含む前記遺伝子が C r e m、F y x d 2、C l f 1 を含む、項目 A 4 3 に記載の方法。

(項目 A 4 5)

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドの前記生物活性を評価することが、選択的スプライシングを受けた T D P - 4 3 のレベルを測定することを含む、項目 A 3 8 ~ A 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 A 4 6)

T D P - 4 3 ポリペプチドの P L D をコードし、及び / またはエクソン 6 の下流とエクソン 7 の上流の非翻訳配列を含む T D P - 4 3 m R N A 配列を標的とするギャップマーモチーフを含む、アンチセンスオリゴヌクレオチド。

10

20

30

40

50

(項目 A 4 7)

TDP - 4 3 ポリペプチドの PLD をコードし、及び / またはエクソン 6 の下流とエクソン 7 の上流の非翻訳配列を含む TDP - 4 3 mRNA 配列を標的とする配列を含む、siRNA。

(項目 A 4 8)

Cas9 タンパク質と少なくとも 1 つの gRNA とを含む CRISPR / Cas システムであって、前記 gRNA が PLD を欠く切り詰めた TDP - 4 3 ポリペプチドをコードする選択的 mRNA をもたらす選択的スプライス部位をコードする配列でのまたはその近傍の配列を認識する、前記 CRISPR / Cas システム。

(項目 A 4 9)

項目 A 2 に記載の胚性幹細胞を含む、非ヒト動物。

(項目 A 5 0)

変異型 TDP - 4 3 ポリペプチドをコードする変異させた TARDBP 遺伝子を含む非ヒト動物であって、

前記変異型 TDP - 4 3 ポリペプチドが、野生型 TDP - 4 3 ポリペプチドに見いだされる核局在化シグナル (NLS)、RNA 認識モチーフ 1 (RRM1)、RNA 認識モチーフ 2 (RRM2)、推定核外輸送シグナル (E)、プリオン様ドメイン (PLD)、またはそれらの組み合わせを含む機能的構造ドメインを欠き、且つ

任意で、前記野生型 TDP - 4 3 ポリペプチドが配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 5 として示される配列を含む、前記非ヒト動物。

(項目 A 5 1)

前記変異させた TARDBP 遺伝子が前記非ヒト動物の変異させた TARDBP 遺伝子である、項目 A 5 0 に記載の非ヒト動物。

(項目 A 5 2)

前記変異させた TARDBP 遺伝子が変異させたヒト TARDBP 遺伝子である、項目 A 5 0 または項目 A 5 1 に記載の非ヒト動物。

(項目 A 5 3)

前記変異型 TDP - 4 3 ポリペプチドが以下：

(a) 前記 NLS におけるアミノ酸の点突然変異、

(b) 前記 RRM1 におけるアミノ酸の点突然変異、

(c) 前記 RRM2 におけるアミノ酸の点突然変異、

(d) 前記核外輸送シグナルの少なくとも一部の欠失、及び

(e) 前記プリオン様ドメインの少なくとも一部の欠失、の 1 以上に起因して機能的構造ドメインを欠く、項目 A 5 0 ~ A 5 2 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 A 5 4)

(a) 前記 NLS におけるアミノ酸の前記点突然変異が K 8 2 A、K 8 3 A、R 8 4 A、K 9 5 A、K 9 7 A、K 9 8 A、またはそれらの組み合わせを含み、

(b) RRM1 における前記点突然変異が F 1 4 7 L 及び / または F 1 4 9 L を含み、

(c) RRM2 における前記点突然変異が F 1 9 4 L 及び / または F 2 2 9 L を含み、

(d) 前記核外輸送シグナル欠失の少なくとも一部の前記欠失が野生型 TDP - 4 3 ポリペプチドの 2 3 9 位と 2 5 0 位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含み、且つ

(e) 前記プリオン様ドメインの少なくとも一部の前記欠失が野生型 TDP - 4 3 ポリペプチドの 2 7 4 位と 4 1 4 位にて及びその間でアミノ酸の欠失、を含む、項目 A 5 3 に記載の非ヒト動物。

(項目 A 5 5)

前記変異型 TDP - 4 3 ポリペプチドが K 8 2 A、K 8 3 A、R 8 4 A、K 9 5 A、K 9 7 A、及び K 9 8 A を含む、項目 A 5 0 ~ A 5 4 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 A 5 6)

前記変異型 TDP - 4 3 ポリペプチドが野生型ポリペプチドの 2 7 4 位から 4 1 4 位のアミノ酸で前記プリオン様ドメインを欠く、項目 A 5 0 ~ A 5 5 のいずれか 1 項に記載の

10

20

30

40

50

非ヒト動物。

(項目 A 5 7)

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが F 1 4 7 L 及び F 1 4 9 L を含む、項目 A 5 0 ~ A 5 6 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 A 5 8)

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが F 1 9 4 L 及び F 2 2 9 L を含む、項目 A 5 0 ~ A 5 7 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 A 5 9)

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが 2 3 9 位から 2 5 0 位のアミノ酸で前記核外輸送シグナルを欠く、項目 A 5 0 ~ A 5 8 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

10

(項目 A 6 0)

変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子が内在性 T A R D B P 遺伝子座にて内在性 T A R D B P 遺伝子に取って代わる、項目 A 5 0 ~ A 5 9 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 A 6 1)

前記非ヒト動物が、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子についてヘテロ接合性である、項目 A 6 0 に記載の非ヒト動物。

(項目 A 6 2)

前記非ヒト動物がさらに、ノックアウト突然変異を含む T A R D B P 遺伝子を含む、項目 A 5 0 ~ A 6 1 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

20

(項目 A 6 3)

前記ノックアウト突然変異が条件付きノックアウト突然変異を含む、項目 A 6 2 に記載の非ヒト動物。

(項目 A 6 4)

前記ノックアウト突然変異が部位特異的組換え認識配列を含む、項目 A 6 2 または項目 A 6 3 に記載の非ヒト動物。

(項目 A 6 5)

前記ノックアウト突然変異が 1 o x p 配列を含む、項目 A 6 2 ~ A 6 4 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 A 6 6)

前記 1 o x p 配列がノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子のエクソン 3 に隣接する、項目 A 6 5 に記載の非ヒト動物。

30

(項目 A 6 7)

前記ノックアウト突然変異が T D P - 4 3 ペプチドのコード配列全体の欠失を含む、項目 A 6 2 に記載の非ヒト動物。

(項目 A 6 8)

前記非ヒト動物が前記操作された T A R D B P 遺伝子座についてヘテロ接合性であり、且つ

(i) 一方の染色体にて内在性 T A R D B P 遺伝子座での内在性 T A R D B P 遺伝子の、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記変異させた T A R D B P 遺伝子による置換、及び

40

(i i) 他方の相対染色体にて前記内在性 T A R D B P 遺伝子座での、前記ノックアウト突然変異を含む前記 T A R D B P 遺伝子または野生型 T A R D B P 遺伝子のいずれか、を含む、項目 A 6 2 ~ A 6 7 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 A 6 9)

前記非ヒト動物が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する、項目 A 4 9 ~ A 6 8 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 A 7 0)

(i) 対照動物における野生型 T A R D B P 遺伝子の m R N A 転写物レベルに匹敵する前記変異させた T A R D B P 遺伝子の m R N A 転写物レベル、

50

(i i) 対照動物における野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドのレベルと比べて前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドのレベルの増加、

(i i i) 例えば、運動ニューロンの核よりも細胞質に高濃度で見られる変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド、

(i v) 野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドと比べて不溶性が増した変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド、

(v) 前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを含む細胞質凝集体、

(v i) 隠れエクソンのスプライシングの増加、

(v i i) 選択的スプライシングを受けた T D P - 4 3 形態のレベルの低下、

(v i i i) 前脛骨筋のような主に速筋で構成される筋肉組織の脱神経、及び/または

(i x) 肋間筋のような主に遅筋で構成される筋肉組織の正常な神経支配、を含む、項目 A 4 9 ~ A 6 9 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 A 7 1)

(i) 一方の染色体にて内在性 T A R D B P 遺伝子座での前記 T A R D B P 遺伝子の条件付きノックアウト突然変異、及び (i i) 他方の相同染色体にて前記内在性 T A R D B P 遺伝子座での T A R D B P コード配列全体の欠失、を含む、非ヒト動物。

(項目 A 7 2)

前記非ヒト動物が齧歯動物である、項目 A 4 9 ~ A 7 1 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 A 7 3)

前記非ヒト動物がラットである、項目 A 4 9 ~ A 7 2 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 A 7 4)

前記非ヒト動物がマウスである、項目 A 4 9 ~ A 7 2 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物。

(項目 A 7 5)

疾患の治療のための治療候補を特定する方法であって、

(a) 項目 A 4 9 ~ A 7 4 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物を候補薬剤と接触させることと、

(b) 前記非ヒト動物の表現型及び/または T D P - 4 3 生物活性を評価することと、

(c) 前記非ヒト動物が表現型及び/または T D P - 4 3 生物活性を取り戻す前記候補薬剤を特定することと、を含む、前記方法。

(項目 A 7 6)

変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドであって、以下：

(a) N L S におけるアミノ酸の点突然変異、

(b) R R M 1 におけるアミノ酸の点突然変異、

(c) R R M 2 におけるアミノ酸の点突然変異、

(d) 核外輸送シグナルの少なくとも一部の欠失、及び

(e) プリオン様ドメインの少なくとも一部の欠失、の 1 以上を含むように修飾された配列番号 1、3、または 5 として示される配列を含む、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド。

(項目 A 7 7)

(a) 前記 N L S におけるアミノ酸の前記点突然変異が K 8 2 A、K 8 3 A、R 8 4 A、K 9 5 A、K 9 7 A、K 9 8 A、またはそれらの組み合わせを含み、

(b) R R M 1 における前記点突然変異が F 1 4 7 L 及び/または F 1 4 9 L を含み、

(c) R R M 2 における前記点突然変異が F 1 9 4 L 及び/または F 2 2 9 L を含み、

(d) 前記核外輸送シグナル欠失の少なくとも一部の前記欠失が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドの 2 3 9 位と 2 5 0 位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含み、且つ

(e) 前記プリオン様ドメインの少なくとも一部の前記欠失が野生型 T D P - 4 3 ポリペプチドの 2 7 4 位と 4 1 4 位にて及びその間でアミノ酸の欠失を含む、項目 A 7 6 に記載

10

20

30

40

50

の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド。

(項目 A 7 8)

K 8 2 A 突然変異、K 8 3 A 突然変異、R 8 4 A 突然変異、K 9 5 A 突然変異、K 9 7 A 突然変異、及び/または K 9 8 A 突然変異を含む、項目 A 7 6 または項目 A 7 7 に記載の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド。

(項目 A 7 9)

野生型ポリペプチドの 2 7 4 位から 4 1 4 位のアミノ酸で前記プリオン様ドメインの欠失を含む、項目 A 7 6 ~ A 7 8 のいずれか 1 項に記載の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド。

(項目 A 8 0)

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが F 1 4 7 L 突然変異及び/または F 1 4 9 L 突然変異を含む、項目 A 7 6 ~ A 7 9 のいずれか 1 項に記載の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド。

10

(項目 A 8 1)

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが F 1 9 4 L 突然変異及び/または F 2 2 9 L 突然変異を含む、項目 A 7 6 ~ A 8 0 のいずれか 1 項に記載の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド。

(項目 A 8 2)

前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドが 2 3 9 位から 2 5 0 位のアミノ酸で前記核外輸送シグナルを欠く、項目 A 7 6 ~ A 8 1 のいずれか 1 項に記載の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド。

20

(項目 A 8 3)

項目 A 7 6 ~ 8 2 のいずれか 1 項に記載の変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸。

(項目 A 8 4)

さらに、5' から 3' に向かって：5' 相同性アームと、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記核酸配列と、3' 相同性アームとを含み、前記核酸が齧歯類細胞にて相同組換えを受ける、項目 A 8 3 に記載の核酸。

(項目 A 8 5)

前記核酸が内在性ラット T A R D B P 遺伝子座にて相同組換えを受け、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記核酸配列が前記内在性 T A R D B P コード配列を置き換えるように前記 5' 及び 3' の相同性アームがラット配列に相同である、項目 A 8 4 に記載の核酸。

30

(項目 A 8 6)

前記核酸が内在性マウス T A R D B P 遺伝子座にて相同組換えを受け、前記変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする前記核酸配列が前記内在性 T A R D B P コード配列を置き換えるように前記 5' 及び 3' の相同性アームがマウス配列に相同である、項目 A 8 4 に記載の核酸。

(項目 A 8 7)

細胞にて P L D を欠く切り詰めた T D P - 4 3 をコードする選択的 T D P - 4 3 m R N A を温存しながら、P L D を含む T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする T D P - 4 3 m R N A を選択的に減少させる方法であって、

40

(i) T D P - 4 3 ポリペプチドの P L D をコードし、及び/またはエクソン 6 の下流及びエクソン 7 の上流の非翻訳配列を含む T D P - 4 3 m R N A 配列を標的とするギャップマーモチーフを含むアンチセンスオリゴヌクレオチド、

(i i) T D P - 4 3 ポリペプチドの P L D をコードし、及び/またはエクソン 6 の下流及びエクソン 7 の上流の非翻訳配列を含む T D P - 4 3 m R N A 配列を標的とする配列を含む s i R N A、及び/または

(i i i) P L D を欠く切り詰め型 T D P - 4 3 ポリペプチドをコードする選択的 m R N A をもたらす選択的スプライス部位をコードする配列でのまたはその近傍の配列を、g R N A が認識する、C a s 9 タンパク質と少なくとも 1 つの前記 g R N A とを含む C R I S

50

P R / C a s システム、を前記細胞に導入することを含む、前記方法。
(項目 A 8 8)

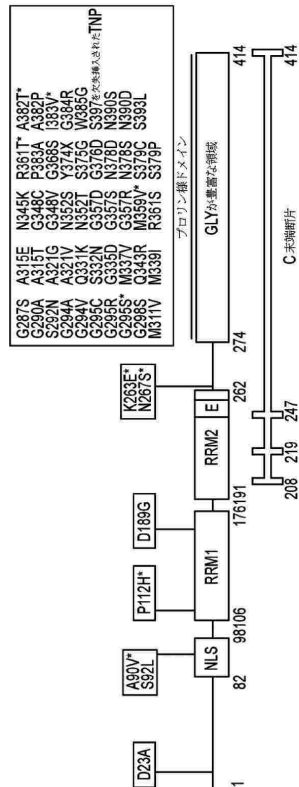
本特許出願にて最初に記載され、開示され、または図示された主題が包含する任意の実施形態または任意の適用可能な項目カテゴリー、例えば、製品、プロセス、または使用によって特徴付けられる、変異型 T D P - 4 3 を発現する非ヒト動物、非ヒト動物を作製する方法、非ヒト動物を作製する前記方法で使用するための核酸、非ヒト動物を作製する前記方法で使用するための細胞、そのように作製された前記非ヒト動物の使用、及び前記非ヒト動物に由来する細胞及び/または変異型 T D P - 4 3 ポリペプチドを発現する細胞、変異型 T D P - 4 3 ポリペプチド及び変異型ポリペプチドをコードする核酸、アンチセンスオリゴヌクレオチド、または s i R N A 、 C R I S P R / C a s システム。

10

【 図 面 】

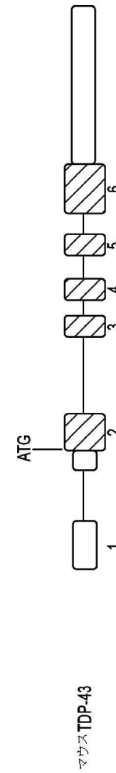
【 図 1 】

【 図 1 】



【 図 2 - 1 】

【 図 2 A 】



20

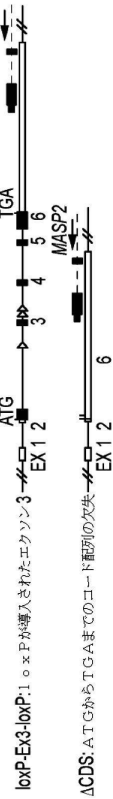
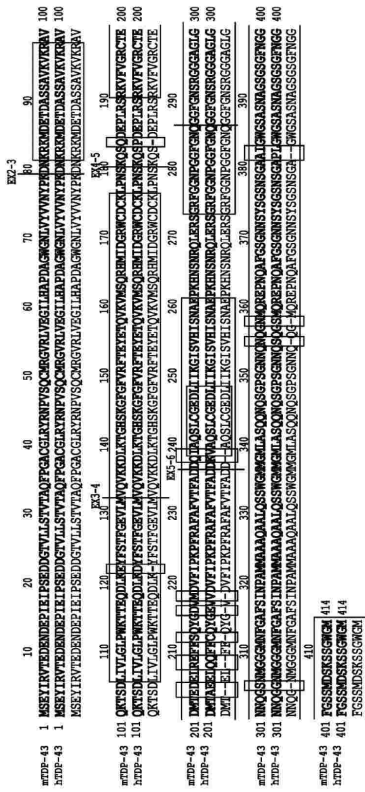
30

40

50

【 図 2 B】

【 図 2 B】

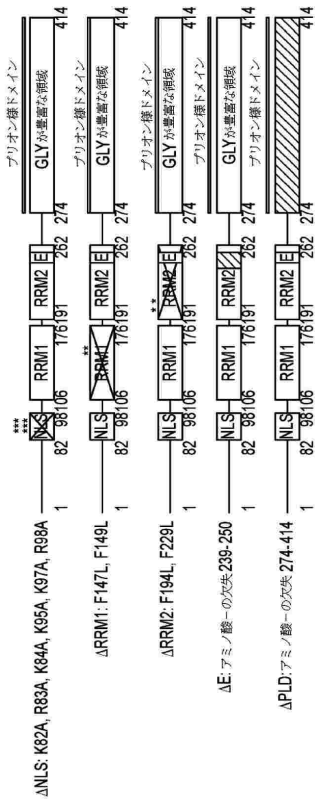


10

20

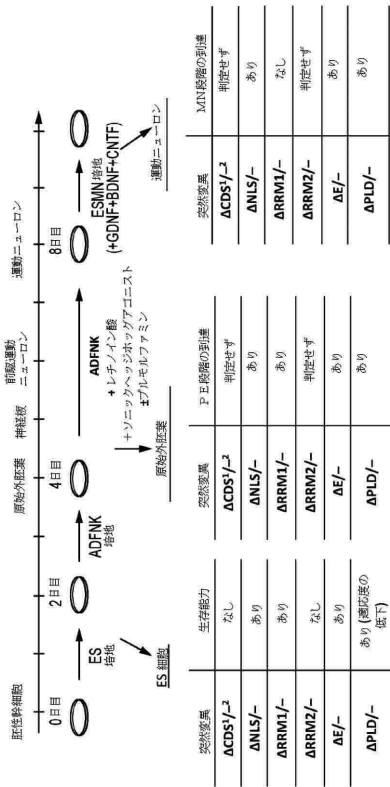
【 図 3 B】

【 図 3 B】



【 図 4】

【 図 4】



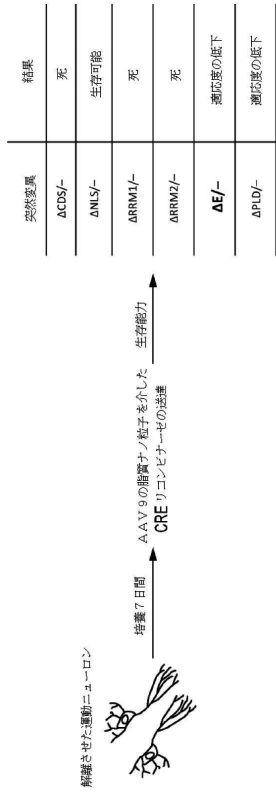
30

40

50

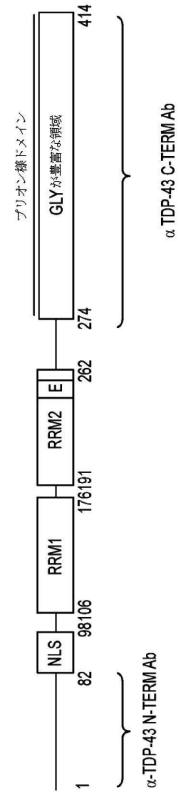
【 5 】

【 図 5 】



【 6 - 1 】

【 図 6 A 】

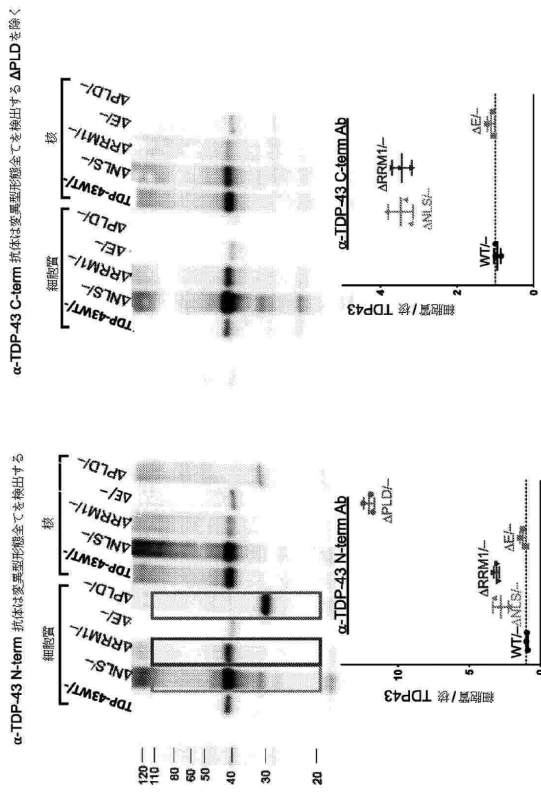


10

20

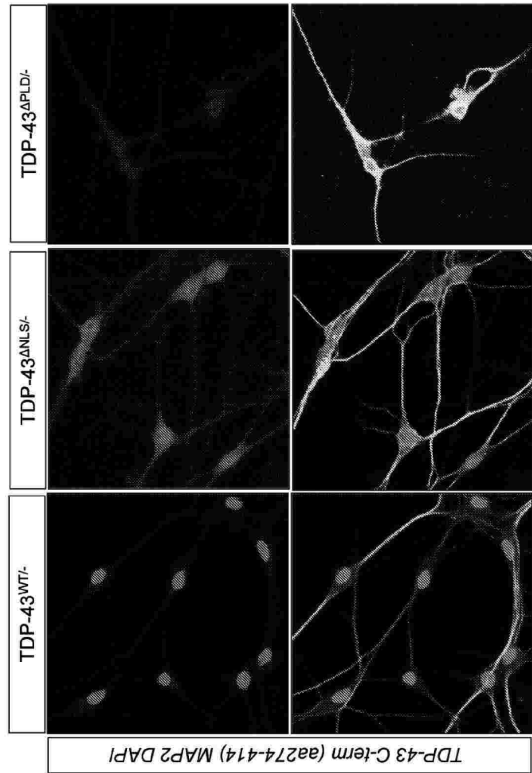
【 6 - 2 】

【 図 6 B 】



【 7 】

【 図 7 】



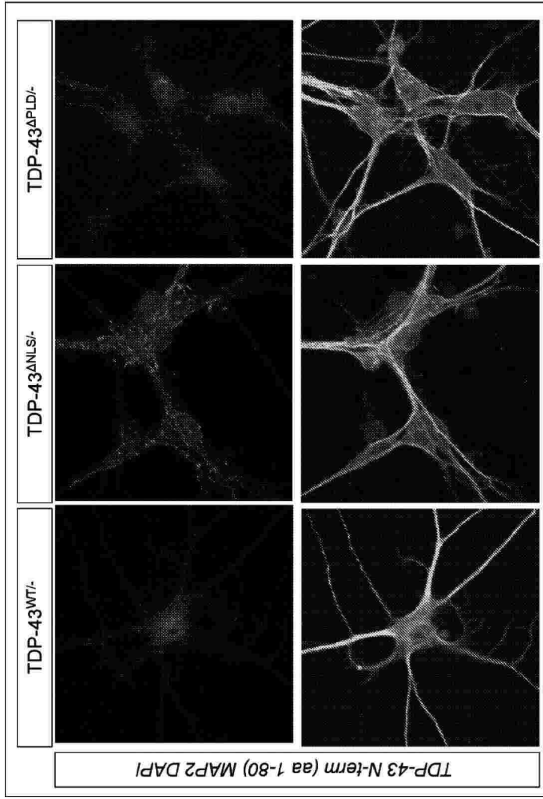
30

40

50

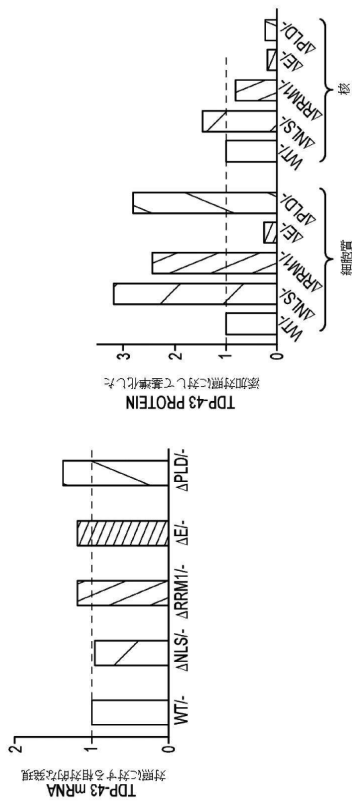
【 8 】

【 図 8 】



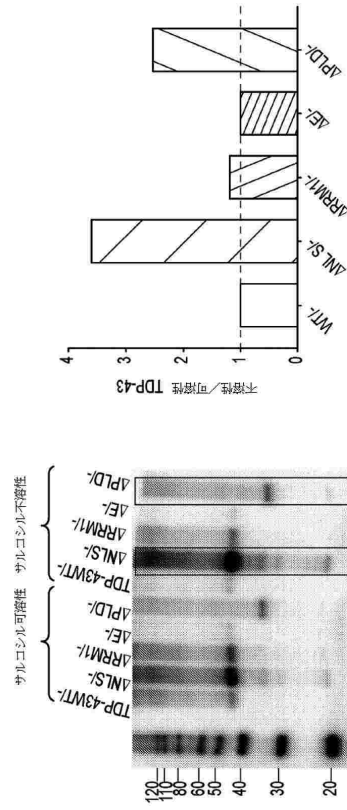
【 9 - 2 】

【 図 9 B 】



【 9 - 1 】

【 図 9 A 】

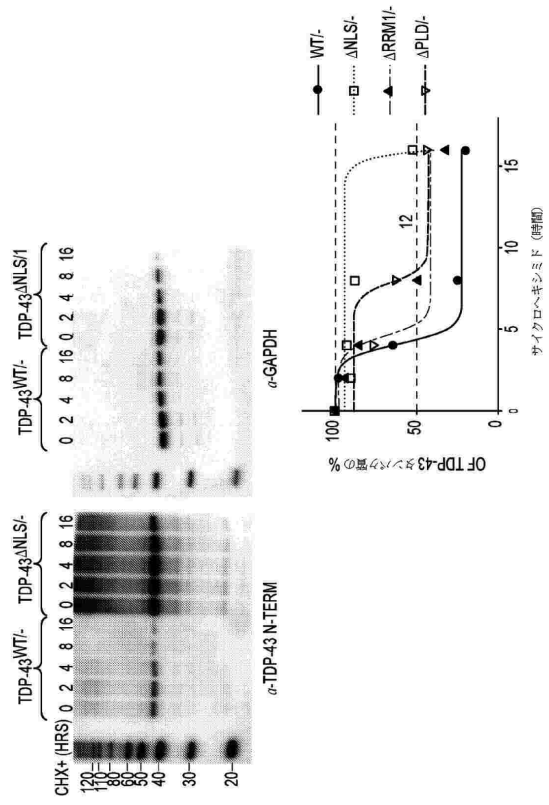


10

20

【 9 - 3 】

【 図 9 C 】



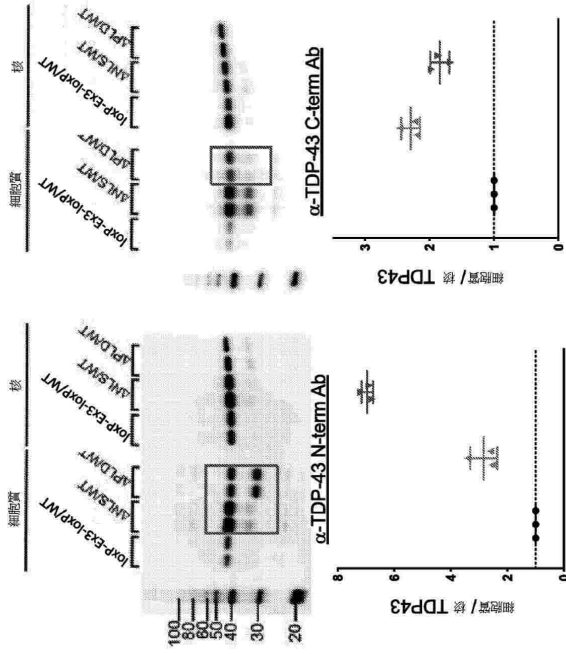
30

40

50

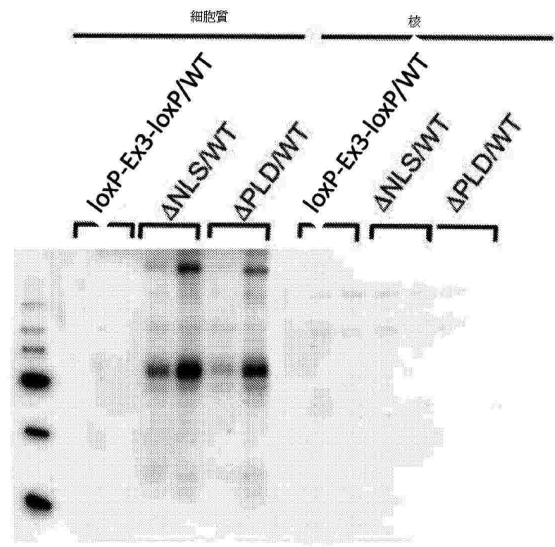
【 13 - 1 】

【 図 13 A 】



【 13 - 2 】

【 図 13 B 】

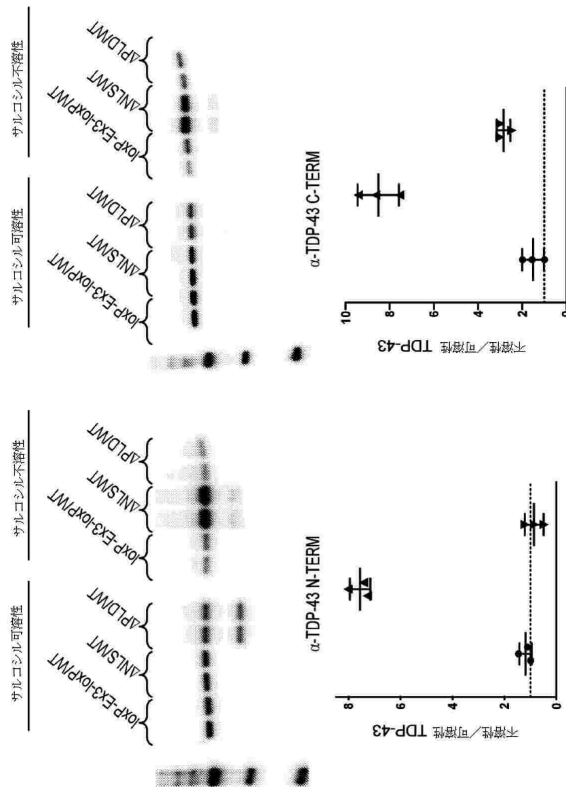


10

20

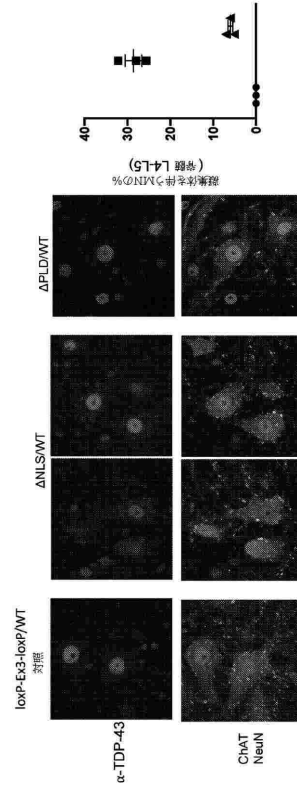
【 13 - 3 】

【 図 13 C 】



【 14 】

【 図 14 】



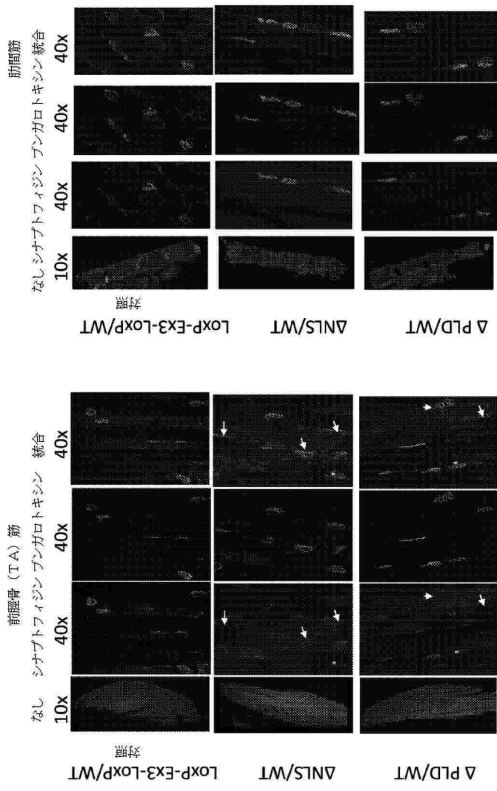
30

40

50

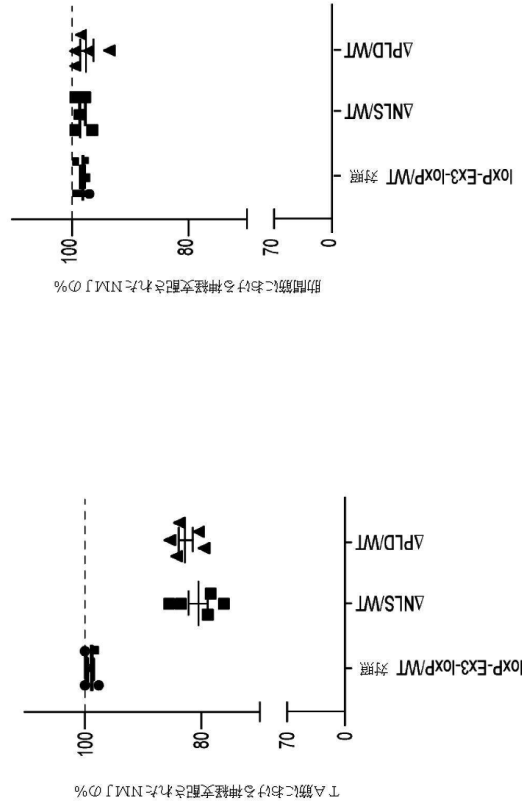
【図 15 - 1】

【図 15 A】



【図 15 - 2】

【図 15 B】



【配列表】

0007706380000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 弁理士 石川 大輔
- (74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
- (72)発明者 シャルマ - カニング, アールティ
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
ド 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 フレンドウェイ, デイビッド
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
ド 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ザンプロウィッツ, ブライアン
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロー
ド 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
- 審査官 坂井田 京
- (56)参考文献 Thomas Ricketts et al., PLOS ONE, 2014年01月, Vol.9, Issue.1, p.1-14
Matthew J. Winton et al., Journal of Biological Chemistry, 2008年05月09日, Vol.283, N
o.19, p.13302-13309
- (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 2 8
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)