

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-553490

(P2023-553490A)

(43)公表日 令和5年12月21日(2023.12.21)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10		4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54		4 H 0 4 5
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
				(全315頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-536049(P2023-536049)	(71)出願人	519397987		
(86)(22)出願日	令和3年12月15日(2021.12.15)		フラッグシップ パイオニアリング イノ		
(85)翻訳文提出日	令和5年8月10日(2023.8.10)		ベーションズ プイ, インコーポレイテ		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/010059		ッド		
(87)国際公開番号	WO2022/132195		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2		
(87)国際公開日	令和4年6月23日(2022.6.23)		1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ		
(31)優先権主張番号	63/281,022		パークウェイ 5 5, 8 ティーエイチ		
(32)優先日	令和3年11月18日(2021.11.18)		フロア		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100078282		
(31)優先権主張番号	63/212,991		弁理士 山本 秀策		
(32)優先日	令和3年6月21日(2021.6.21)	(74)代理人	100113413		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 森下 夏樹		
(31)優先権主張番号	63/125,833	(74)代理人	100181674		
			弁理士 飯田 貴敏		
		(74)代理人	100181641		
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 MY C 発現を調節するための組成物及び方法

(57)【要約】

本開示は、細胞におけるMYC遺伝子の発現を低減するための組成物及び方法に関する。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、MYCプロモータ、アンカー配列、又はスーパーエンハンサーを結合するターゲティング部分を含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、転写を抑制し又はDNAをメチル化するエフェクター部分を含む。2つの発現リプレッサーを含むシステムもまた開示される。本組成物は、例えば、HCC又はNSCLCなどの癌の治療に使用することができる。

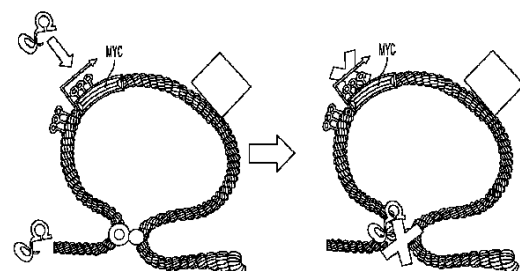


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 83 の配列の少なくとも 16、17、18、19、又は 20 ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合する第 1 ターゲティング部分と、

DNA メチルトランスフェラーゼを含む第 1 エフェクター部分とを含む発現リプレッサー。

【請求項 2】

前記第 1 ターゲティング部分がジンクフィンガードメインを含む、請求項 1 に記載の発現リプレッサー。

【請求項 3】

前記第 1 ターゲティング部分が、配列番号 13 に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも 80、85、90、95、99、又は 100% の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の発現リプレッサー。

【請求項 4】

前記第 1 エフェクター部分が MQ1 又はその機能性変異体若しくは断片を含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の発現リプレッサー。

【請求項 5】

前記第 1 エフェクター部分が、配列番号 19 又は 87 の配列、又はそれと少なくとも 80、85、90、95、99、又は 100% の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を含む、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の発現リプレッサー。

【請求項 6】

前記第 1 エフェクター部分が、配列番号 30 又は 129 の配列、又はそれと少なくとも 80、85、90、95、99、又は 100% の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の発現リプレッサー。

【請求項 7】

請求項 1～6 のいずれか一項に記載の発現リプレッサーをコードする核酸。

【請求項 8】

前記第 1 ターゲティング部分をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 7 に記載の核酸であって、前記第 1 ターゲティング部分をコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号 46 又は 131 に係る配列又はそれと少なくとも 80、85、90、95、99、又は 100% の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を含む、核酸。

【請求項 9】

前記第 1 エフェクター部分をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 7 又は 8 に記載の核酸であって、前記第 1 エフェクター部分をコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号 52 又は 132 に係る配列、又はそれと少なくとも 80、85、90、95、99、又は 100% の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を含む、核酸。

【請求項 10】

配列番号 63 又は 130 に係るヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも 80、85、90、95、99、又は 100% の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5

10

20

30

40

50

、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、請求項7～9のいずれか一項に記載の核酸であって、ポリA配列が任意選択である、核酸。

【請求項11】

請求項1～6のいずれか一項に記載の第1発現リプレッサーと、
第2発現リプレッサーと
を含むシステム。

【請求項12】

前記第2発現リプレッサーが、
ゲノム遺伝子座を結合する第2ターゲティング部分と、
第2エフェクター部分と
を含む、請求項11に記載のシステム。

10

【請求項13】

前記第2ターゲティング部分が、配列番号77 199又は201の配列の少なくとも14、15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合する、請求項12に記載のシステム。

【請求項14】

前記第2ターゲティング部分がジンクフィンガードメインを含む、請求項12又は13に記載のシステム。

【請求項15】

前記第2ターゲティング部分が、配列番号7 169、171に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、請求項12～14のいずれか一項に記載のシステム。

20

【請求項16】

前記第2エフェクター部分がKRAB又はその機能性変異体若しくは断片を含む、請求項12～15のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項17】

前記第2エフェクター部分が、配列番号18に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、請求項12～16のいずれか一項に記載のシステム。

30

【請求項18】

前記第2発現リプレッサーが、配列番号24 177、183、179、又は185に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、請求項12～17のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項19】

請求項12～18のいずれか一項に記載のシステムの前記第1発現リプレッサー及び第2リプレッサーをコードする核酸。

40

【請求項20】

配列番号113、196、又は197に係るヌクレオチド配列を含む、請求項19に記載の核酸であって、ポリA配列が任意選択である、核酸。

【請求項21】

a) 第1発現リプレッサーであって、
i) 配列番号13に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2

50

、又は1箇所を超えない配列を有する第1ターゲティング部分と

i i) 配列番号19又は87に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第1エフェクター部分と

を含む第1発現リプレッサーと、

b) 第2発現リプレッサーであって、

i) 配列番号7に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第2ターゲティング部分と、

i i) 配列番号18に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第2エフェクター部分と

を含む第2発現リプレッサーと

を含む発現抑制システム。

【請求項22】

a) 第1発現リプレッサーであって、

i) 配列番号13に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第1ターゲティング部分と、

i i) 配列番号19又は87に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第1エフェクター部分と

を含む第1発現リプレッサーと、

b) 第2発現リプレッサーであって、

i) 配列番号169、171に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第2ターゲティング部分と、

i i) 配列番号18に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第2エフェクター部分と

を含む第2発現リプレッサーと

を含む発現抑制システム。

【請求項23】

a) 第1発現リプレッサーであって、

i) 配列番号169、171に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第1ターゲティング部分と

i i) 配列番号18に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第1エフェクター部分と

を含む第1発現リプレッサーと、

b) 第2発現リプレッサーであって、

i) 配列番号13に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第2ターゲティング部分と、

ii) 配列番号19又は87に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第2エフェクター部分と

を含む第2発現リプレッサー

を含む発現抑制システム。

10

【請求項24】

例えば、ELISAにより測定したとき、MYCの発現を少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25日、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10回の細胞分裂の期間にわたって認め得るほどに低減する、請求項1～23のいずれか一項に記載の発現リプレッサー又は発現抑制システム。

【請求項25】

本明細書に記載の第1発現リプレッサーをコードする第1アミノ酸領域と、本明細書に記載の第2発現リプレッサーを含む第2アミノ酸領域とを含む融合タンパク質。

20

【請求項26】

前記発現リプレッサーがMYC遺伝子座に結合すると、前記発現リプレッサー又は発現抑制システムによるトランスフェクション後1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、又は96時間でMYCの発現が認め得るほどに減少する、請求項1～25のいずれか一項に記載の発現リプレッサー、融合タンパク質、又は発現抑制システム。

【請求項27】

複数の細胞を、前記発現リプレッサー、発現リプレッサーシステム、又は前記発現リプレッサー若しくは前記第1発現リプレッサー及び前記第2発現リプレッサーをコードする核酸と接触させると、前記複数の細胞の生存能力が減少する、請求項1～26のいずれか一項に記載の発現リプレッサー、融合タンパク質、又は発現抑制システム。

30

【請求項28】

前記発現リプレッサー又は発現抑制システムを投与すると、標的細胞（例えば、癌細胞）の少なくとも5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、75%にアポトーシスが起こる、請求項1～27のいずれか一項に記載の発現リプレッサー、融合タンパク質、又は発現抑制システム。

【請求項29】

前記複数の細胞が、複数の癌細胞及び複数の非癌細胞を含む、請求項17dに記載の発現リプレッサー、融合タンパク質、又は発現抑制システム。

40

【請求項30】

前記複数の細胞を前記システム又は前記システムをコードする核酸と接触させると、前記複数の癌細胞の生存能力が、それによる前記複数の非癌細胞の生存能力の減少よりも大きく減少し、任意選択で、前記複数の癌細胞の生存能力が、前記複数の非癌細胞の生存能力の1.05×（即ち、1.05倍）、1.1×、1.15×、1.2×、1.25×、1.3×、1.35×、1.4×、1.45×、1.5×、1.6×、1.7×、1.8×、1.9×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、20×、50×、又は100×大きく減少する、請求項17eに記載の発現リプレッサー、融合タンパク質、又は発現抑制システム。

50

【請求項 3 1】

請求項 1 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の発現リプレッサー、融合タンパク質、又はシステムをコードする配列を含む核酸。

【請求項 3 2】

発現抑制システムをコードする核酸であって、

a) 第 1 発現リプレッサーをコードする第 1 領域であって、前記第 1 発現リプレッサーが、

i) 配列番号 1 3 に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 9、又は 1 0 0 % の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 2 0、1 9、1 8、1 7、1 6、1 5、1 4、1 3、1 2、1 1、1 0、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を有する第 1 ターゲティング部分と、

i i) 配列番号 1 9 又は 8 7 に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 9、又は 1 0 0 % の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 2 0、1 9、1 8、1 7、1 6、1 5、1 4、1 3、1 2、1 1、1 0、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を有する第 1 エフェクター部分とを含む、第 1 領域と、

b) 第 2 発現リプレッサーをコードする第 2 領域であって、前記第 2 発現リプレッサーが、

i) 配列番号 7 に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 9、又は 1 0 0 % の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 2 0、1 9、1 8、1 7、1 6、1 5、1 4、1 3、1 2、1 1、1 0、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を有する第 2 ターゲティング部分と、

i i) 配列番号 1 8 に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 9、又は 1 0 0 % の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 2 0、1 9、1 8、1 7、1 6、1 5、1 4、1 3、1 2、1 1、1 0、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を有する第 2 エフェクター部分とを含む、第 2 領域とを含む、核酸。

【請求項 3 3】

発現抑制システムをコードする核酸であって、

a) 第 1 発現リプレッサーをコードする第 1 領域であって、前記第 1 発現リプレッサーが、

i) 配列番号 1 3 に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 9、又は 1 0 0 % の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 2 0、1 9、1 8、1 7、1 6、1 5、1 4、1 3、1 2、1 1、1 0、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を有する第 1 ターゲティング部分と、

i i) 配列番号 1 9 又は 8 7 に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 9、又は 1 0 0 % の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 2 0、1 9、1 8、1 7、1 6、1 5、1 4、1 3、1 2、1 1、1 0、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を有する第 1 エフェクター部分とを含む、第 1 領域と、

b) 第 2 発現リプレッサーをコードする第 2 領域であって、前記第 2 発現リプレッサーが、

i) 配列番号 1 6 9、1 7 1 に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 9、又は 1 0 0 % の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 2 0、1 9、1 8、1 7、1 6、1 5、1 4、1 3、1 2、1 1、1 0、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を有する第 2 ターゲティング部分と、

i i) 配列番号 1 8 に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 9、又は 1 0 0 % の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 2 0、1 9、1 8、1 7、1 6、1 5、1 4、1 3、1 2、1 1、1 0、9、8、7、6、5、4、3、

2、又は1箇所を超えない配列を有する第2エフェクター部分とを含む、第2領域とを含む核酸。

【請求項34】

発現抑制システムをコードする核酸であって、

a) 第1発現リプレッサーをコードする第1領域であって、前記第1発現リプレッサーが、

i) 配列番号169、171に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第1ターゲティング部分と、

ii) 配列番号18に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第1エフェクター部分とを含む、第1領域と、

b) 第2発現リプレッサーをコードする第2領域であって、前記第2発現リプレッサーが、

i) 配列番号13に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第2ターゲティング部分と、

ii) 配列番号19又は87に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第2エフェクター部分とを含む、第2領域とを含む核酸。

【請求項35】

配列番号93、94、112、113、196、197のヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、請求項19、21又は22のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項36】

表12の配列の少なくとも16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分と、

任意選択で、エフェクター部分と

を含む発現リプレッサー。

【請求項37】

表4に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有するターゲティング部分と、

任意選択で、エフェクター部分と

を含む発現リプレッサー。

【請求項38】

表7又は表9に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、

又は1箇所を超えない配列を含む、請求項37に記載の発現リプレッサー。

【請求項39】

表5、表6、表8、表16、又は表10に係る配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む核酸。

【請求項40】

請求項1～39のいずれか一項に記載の融合タンパク質、システム、又は発現リプレッサーをコードする核酸を含むベクター。

【請求項41】

請求項1～40のいずれか一項に記載の発現リプレッサー、システム、融合タンパク質、核酸、又はベクターを含む反応混合物。

【請求項42】

請求項1～41のいずれか一項に記載の発現リプレッサー、システム、融合タンパク質、核酸、ベクター、又は反応混合物を含む医薬組成物。

【請求項43】

必要としている対象の癌を治療する方法であって、

請求項1～20のいずれか一項に記載の発現リプレッサー、システム、融合タンパク質、又は前記発現リプレッサー若しくは前記システムをコードする核酸を投与することを含む方法。

【請求項44】

前記癌が、肝細胞癌(HCC)、線維層板肝細胞癌(FHCC)、胆管癌、血管肉腫、二次肝癌、肺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、腺癌、小細胞肺癌(SCLC)、大細胞(未分化)癌、トリプルネガティブ乳癌、胃腺癌、子宮内膜癌、又は膀胱癌である、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

必要としている対象の肝炎を治療する方法であって、

請求項1～42のいずれか一項に記載の発現リプレッサー、融合タンパク質、システム、又は前記発現リプレッサー若しくは前記システムをコードする核酸を投与することを含む方法。

【請求項46】

必要としている対象の腫瘍成長を低下させる方法であって、

請求項1～42のいずれか一項に記載の発現リプレッサー、融合タンパク質、システム、核酸、ベクター、又は医薬組成物を前記対象に投与すること、を含み、それによって前記対象の前記腫瘍成長を低下させる、方法。

【請求項47】

キナーゼ阻害薬、例えば、ソラフェニブに対する癌の感受性を増加させる、又は回復させる方法であって、請求項1～42のいずれか一項に記載の発現リプレッサー又はシステムを前記癌を有する対象に投与することを含み、任意選択で前記発現リプレッサー又はシステムを投与すると、例えば、癌細胞生存能力アッセイにおいて、前記キナーゼ阻害薬のIC₅₀が10%、20%、30%、又は40%下がる、方法。

【請求項48】

プロモドメイン阻害薬、例えば、BET阻害薬、例えば、JQ1に対する癌の感受性を増加させる、又は回復させる方法であって、請求項1～42のいずれか一項に記載の発現リプレッサー又はシステムを前記癌を有する対象に投与することを含み、任意選択で前記発現リプレッサー又はシステムを投与すると、例えば、癌細胞生存能力アッセイにおいて、前記プロモドメイン阻害薬のIC₅₀が10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は95%下がる、方法。

【請求項49】

MEK阻害薬、例えば、トラメチニブに対する癌の感受性を増加させる、又は回復させ

10

20

30

40

50

る方法であって、請求項 1～42 のいずれか一項に記載の発現リプレッサー又はシステムを前記癌を有する対象に投与することを含み、任意選択で、前記発現リプレッサー又はシステムを投与すると、例えば、癌細胞生存能力アッセイにおいて、前記 MEK 阻害薬の IC₅₀ が 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は 95% 下がる、方法。

【請求項 50】

前記癌が、参照レベルと比べた（例えば、参照細胞、例えば、前記対象の他の点では同様の非癌性細胞の MYC 発現と比べた）MYC 発現の増加によって特徴付けられる細胞と、参照レベルと比べた（例えば、参照細胞、例えば、前記対象の他の点では同様の非癌性細胞の MYC 発現と比べた）MYC 発現の増加によって特徴付けられない、例えば、正常な MYC 発現を有する細胞とを含む、請求項 43～49 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 51】

a) 第一に、請求項 _____ のいずれか一項に記載の発現リプレッサー又はシステムの第 1 の複数の用量を前記対象に投与することであって、任意選択で前記第 1 の複数中の各後続用量が、前記第 1 の複数中の前の用量の 5 日後に投与されること；

b) 第二に、前記発現リプレッサー又はシステムをある期間（「休薬期間」）、例えば、約 2 週間）にわたって中止すること、

c) 第三に、前記対象に前記発現リプレッサー又はシステムの第 2 の複数の用量を投与することであって、ここで任意選択で、前記第 2 の複数の後続用量が、前記第 2 の複数中の前の用量の 5 日後に投与されること

20

を含む、請求項 43～50 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 52】

前記発現リプレッサー、融合タンパク質、又はシステムによる治療の休止後に、腫瘍容積が（例えば、検出不能なレベルにまで）縮小する、請求項 43～51 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 53】

a. 前記細胞を第 2 治療薬と接触させること、又は

b. 第 2 治療薬を前記対象に投与することであって、任意選択で、前記第 2 治療薬が、請求項 _____ のいずれか一項に記載の発現リプレッサー、システム、融合タンパク質、核酸、ベクター、反応混合物、又は医薬組成物ではないこと

30

をさらに含む、請求項 43～52 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 54】

前記第 2 治療薬が、免疫療法、免疫チェックポイント療法及び抗血管内皮増殖因子療法的一方又は両方、全身化学療法、チロシンキナーゼ阻害薬、例えば、ソラフェニブ、マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ阻害薬、例えば、トラメチニブ、又はプロモドメイン阻害薬、例えば、BET 阻害薬、例えば、JQ1、例えば、ビラプレシブである、請求項 43～53 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 55】

前記第 1 及び前記第 2 治療薬が同時に投与される、請求項 43～54 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 56】

前記第 1 及び前記第 2 治療薬が逐次的に投与される、請求項 43～55 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 57】

前記対象が、少なくとも一部の細胞において MYC の過剰発現を示す、請求項 43～56 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

50

本願は、2020年12月15日に出願された米国仮特許出願第63／125,833号明細書、2021年1月13日に出願された米国仮特許出願第63／137,097号明細書、2021年6月21日に出願された米国仮特許出願第63／212,991号明細書、及び2021年11月18日に出願された米国仮特許出願第63／281,022号明細書に対する優先権を主張するものであり、これらの内容は全て、本明細書によって参照により組み込まれる。

【0002】

配列表

本願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含み、この配列表は、本明細書によって全体として参照により組み込まれる。2021年12月6日に作成された前記ASCII複製物は、02057-7029WO__SL.txtという名称であり、サイズが624,274バイトである。

10

【背景技術】

【0003】

遺伝子発現の誤調節は、多くの疾患（例えば、哺乳類、例えば、ヒトの疾患）、例えば、新生物形成、神経学的障害、代謝障害及び肥満の根底にある原因である。転写因子MYCの誤調節は、種々のヒト腫瘍及び慢性肝疾患において中心的な役割を果たす。MYCタンパク質は、様々な要因、例えば、明確なリガンド結合部位がないこと、生理的機能が正常組織の維持に不可欠であることに起因して、「創薬不可能」と考えられている。MYC遺伝子発現の調節に照準を合わせた技法が、これらの疾患の治療における実行可能な代替的手法を提供する。MYCなど、疾患関連遺伝子の発現を安定して変化させる、例えば、低減するための新規ツール、システム、及び方法が必要とされている。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本開示は、とりわけ、標的遺伝子、例えば、MYCの発現の調節、例えば、低減に使用し得る発現リプレッサー及び発現リプレッサーシステムを提供する。

【0005】

いくつかの態様では、本開示は、標的遺伝子プロモータ、例えば、MYCプロモータに結合するターゲティング部分と、任意選択で、エフェクター部分とを含む発現リプレッサーを提供し、ここで、上記発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減することができる。

30

【0006】

いくつかの態様では、本開示は、標的遺伝子座、例えば、MYCを結合するターゲティング部分と、MQ1又はその断片若しくは変異体を含むエフェクター部分とを含む発現リプレッサーを提供し、ここで、上記発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減することができる。

【0007】

いくつかの態様では、本開示は、MYCのスーパーエンハンサー領域に位置する調節エレメントに結合するターゲティング部分と、任意選択でエフェクター部分とを含む発現リプレッサーを提供し、ここで、上記発現リプレッサーは、MYCの発現を低減することができる。

40

【0008】

いくつかの態様では、本開示は、標的遺伝子、例えば、MYCのスーパーエンハンサー領域に位置する調節エレメントに結合するターゲティング部分と、エフェクター部分（例えば、KRAB、又はMQ1、又はその断片若しくは変異体）とを含む発現リプレッサーを提供し、ここで、上記発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減することができる。

【0009】

いくつかの態様では、本開示は、標的遺伝子、例えば、MYCのスーパーエンハンサー

50

領域に位置する調節エレメントを結合するターゲティング部分であって、ジンクフィンガードメインを含むターゲティング部分を含む発現リプレッサーを提供し、ここで、上記発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減することができる。

【0010】

いくつかの態様では、本開示は、MYCのスーパーエンハンサー領域に位置する調節エレメントを結合するターゲティング部分であって、ジンクフィンガードメイン又はTALエフェクタードメインを含むターゲティング部分と、エフェクター部分であって、転写リプレッサー（例えば、KRAB又はその断片若しくは変異体）又はDNAメチルトランスフェラーゼ（例えば、MQ1又はその断片若しくは変異体）を含むエフェクター部分とを含む発現リプレッサーを提供し；ここで、上記発現リプレッサーは、MYCの発現を低減することができる。

10

【0011】

いくつかの態様では、本開示は、標的遺伝子座、例えば、MYCを結合するターゲティング部分であって、ジンクフィンガードメインを含むターゲティング部分を含む発現リプレッサーを提供し、ここで、上記発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減することができる。

【0012】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号1、3、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、109、110、又は75、76、78、79、80、81、84、85、86の配列の少なくとも14、15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分を含む発現リプレッサーを提供し、ここで、上記発現リプレッサーは、MYCの発現を低減することができる。

20

【0013】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号2又は77、82、83の配列の少なくとも16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分を含む発現リプレッサーを提供し、ここで、上記発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減することができる。いくつかの実施形態では、発現リプレッサー（expression repressor）はエフェクター部分を含む。

【0014】

いくつかの態様では、本開示は、ターゲティング部分であって、配列番号4から上流又は下流の1400nt以内にあるゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分を含む発現リプレッサーを提供する。

30

【0015】

いくつかの態様では、本開示は、ターゲティング部分であって、配列番号4、77、82、又は83の配列の少なくとも14、15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分を含む発現リプレッサーを提供する。

【0016】

いくつかの態様では、本開示は、ターゲティング部分であって、配列番号83、96、又は108の配列の少なくとも14、15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分を含む発現リプレッサーを提供する。

40

【0017】

いくつかの態様では、本開示は、第1ターゲティング部分と任意選択で第1エフェクター部分とを含む第1発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した転写調節エレメント（例えば、プロモータ又は転写開始部位（TSS））に結合するか、又は転写調節エレメントに近接した配列に結合する第1発現リプレッサーと、第2ターゲティング部分と任意選択で第2エフェクター部分とを含む第2発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCを含むアンカー配列媒介接合部（ASMC）の

50

アンカー配列に結合するか、又はアンカー配列に近接した配列に結合する第2発現リプレッサーとを含むシステムを提供する。

【0018】

いくつかの態様では、本開示は、第1ターゲティング部分と任意選択で第1エフェクター部分とを含む第1発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した転写調節エレメント（例えば、プロモータ又は転写開始部位（TSS））に結合するか、又は転写調節エレメントに近接した配列に結合する第1発現リプレッサーと、第2ターゲティング部分と任意選択で第2エフェクター部分とを含む第2発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCのスーパーエンハンサー領域に位置するゲノム遺伝子座に結合する第2発現リプレッサーとを含むシステムを提供する。

10

【0019】

いくつかの実施形態では、第1ターゲティング部分は第1のDNA配列を特異的に結合し、第2ターゲティング部分は、第1のDNA配列と異なる第2のDNA配列を特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1エフェクター部分は第2エフェクター部分と異なる。

【0020】

いくつかの態様では、本開示は、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した転写調節エレメント（例えば、プロモータ又は転写開始部位（TSS））又は前記転写調節エレメントに近接した配列に結合する、CRISPR/Cas分子を含む、例えば、触媒として不活性なCRISPR/Casタンパク質を含むターゲティング部分と；MQ1又はその機能性変異体若しくは断片を含むエフェクター部分とを含む発現リプレッサーを提供する。

20

【0021】

いくつかの態様では、本開示は、標的遺伝子、例えば、MYCのスーパーエンハンサー領域に位置するゲノム遺伝子座に結合する、CRISPR/Cas分子を含む、例えば、触媒として不活性なCRISPR/Casタンパク質を含むターゲティング部分と、KRAB、MQ1、又はその機能性変異体若しくは断片を含むエフェクター部分とを含む発現リプレッサーを提供し、ここで、上記発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減することができる。

【0022】

いくつかの態様では、本開示は、標的遺伝子、例えば、MYCを含むアンカー配列媒介接合部（ASMC）のアンカー配列に結合するか、又はアンカー配列に近接した配列に結合する、CRISPR/Cas分子を含む、例えば、触媒として不活性なCRISPR/Casタンパク質を含むターゲティング部分と；KRAB又はその機能性変異体若しくは断片を含むエフェクター部分とを含む発現リプレッサーを提供する。

30

【0023】

いくつかの態様では、本開示は、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した転写調節エレメント（例えば、プロモータ又は転写開始部位（TSS））又は前記転写調節エレメントに近接した配列に結合するジンクフィンガー分子を含むターゲティング部分と；MQ1又はその機能性変異体若しくは断片を含むエフェクター部分とを含む発現リプレッサーを提供する。

40

【0024】

いくつかの態様では、本開示は、標的遺伝子、例えば、MYCを含むアンカー配列媒介接合部（ASMC）のアンカー配列に結合するか、又はアンカー配列に近接した配列に結合するジンクフィンガー分子を含むターゲティング部分と；KRAB又はその機能性変異体若しくは断片を含むエフェクター部分とを含む発現リプレッサーを提供する。

【0025】

いくつかの態様では、本開示は、標的遺伝子、例えば、MYCのスーパーエンハンサー領域に位置するゲノム遺伝子座に結合する、ジンクフィンガー分子を含むターゲティング部分と、KRAB又はその機能性変異体若しくは断片を含むエフェクター部分とを含む発

50

現リプレッサーを提供する。

【0026】

いくつかの態様では、本開示は、第1発現リプレッサー、第2発現リプレッサー、両方、又はその成分（例えば、gRNA、mRNA）をコードする核酸に関する。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーシステムをコードする核酸は、多シストロン性配列である。いくつかの実施形態では、多シストロン性配列は、バイシストロン性配列である。

【0027】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載の核酸、システム、又は発現リプレッサーを含むベクターに関する。別の態様では、本開示は、本明細書に記載のベクター、核酸、システム、又は発現リプレッサーを含む脂質ナノ粒子に関する。別の態様では、本開示は、本明細書に記載の発現リプレッサー、システム、核酸、ベクター、又は脂質ナノ粒子を含む反応混合物に関する。別の態様では、本開示は、本明細書に記載の発現リプレッサー、システム、核酸、ベクター、脂質ナノ粒子、又は反応混合物を含む医薬組成物に関する。

10

【0028】

いくつかの態様では、本開示は、標的遺伝子の発現を低減する方法に関し、これは、本明細書に記載の発現リプレッサー又は発現抑制システムを用意するステップ、並びに標的遺伝子及び／又は1つ以上の作動可能に連結した転写制御エレメントを発現リプレッサー又は発現抑制システムと接触させるステップを含み、それにより、標的遺伝子の発現を低減する。

20

【0029】

いくつかの態様では、本開示は、対象における標的遺伝子、例えば、MYCの過剰発現に関連する状態を治療する方法に関し、これは、本明細書に記載の発現リプレッサー若しくは系、核酸、又はベクターを上記対象に投与するステップを含み、それによって上記状態を治療する。

【0030】

いくつかの態様では、本開示は、対象における標的遺伝子、例えば、MYCの誤調節に関連する状態を治療する方法に関し、これは、本明細書に記載される発現リプレッサー、系、核酸、又はベクターを上記対象に投与するステップを含み、それによって上記状態を治療する。

30

【0031】

いくつかの態様では、本開示は、細胞における標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減する方法であって、第1ターゲティング部分と任意選択で第1エフェクター部分とを含む第1発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した転写調節エレメント（例えば、プロモータ又は転写開始部位（TSS））に結合する第1発現リプレッサーと、第2ターゲティング部分と任意選択で第2エフェクター部分とを含む第2発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCを含むアンカー配列媒介接合部（ASMC）のアンカー配列に結合するか、又はアンカー配列に近接した配列に結合する第2発現リプレッサーとを含むシステムと細胞を接触させることを含み、それにより、細胞における標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減する方法を提供する。

40

【0032】

いくつかの態様では、本開示は、細胞における標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減する方法であって、第1ターゲティング部分と任意選択で第1エフェクター部分とを含む第1発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した転写調節エレメント（例えば、プロモータ又は転写開始部位（TSS））に結合する第1発現リプレッサーと、第2ターゲティング部分と任意選択で第2エフェクター部分とを含む第2発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCのスーパーエンハンサー領域に位置するゲノム遺伝子座に結合する第2発現リプレッサーとを含むシステムと細胞を接触させることを含み、それにより、細胞における標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減する方法を提供する。

50

【0033】

本開示は、一部には、a) 標的遺伝子、プロモータ、例えば、MYCに結合するターゲティング部分と、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節する、例えば、低減することができるエフェクター部分とを含む発現リプレッサーを含む組成物を含む容器と、b) 前記組成物で細胞内の標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節する少なくとも1つの方法を含む説明書一式とを含むキットをさらに提供する。

【0034】

本開示は、一部には、a) 標的遺伝子、例えば、MYCのスーパーエンハンサー領域に位置する遺伝子座に結合するターゲティング部分と、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節する、例えば、低減することができるエフェクター部分とを含む発現リプレッサーを含む組成物を含む容器と、b) 前記組成物で細胞内の標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節する少なくとも1つの方法を含む説明書一式とを含むキットをさらに提供する。

【0035】

いくつかの態様では、キットは、a) 第1ターゲティング部分と任意選択で第1エフェクター部分とを含む第1発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した転写調節エレメント（例えば、プロモータ又は転写開始部位（TSS））に結合するか、又は転写調節エレメントに近接した配列に結合する第1発現リプレッサーと、第2ターゲティング部分と任意選択で第2エフェクター部分とを含む発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCを含むアンカー配列媒介接合部（ASMC）のアンカー配列に結合するか、又はアンカー配列に近接した配列に結合する第2発現リプレッサーとを含む、2つの発現リプレッサーを含むシステムを含む組成物を含む容器を含む。

【0036】

いくつかの態様では、キットは、a) 第1ターゲティング部分と任意選択で第1エフェクター部分とを含む第1発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した転写調節エレメント（例えば、プロモータ又は転写開始部位（TSS））に結合するか、又は転写調節エレメントに近接した配列に結合する第1発現リプレッサーと、第2ターゲティング部分と任意選択で第2エフェクター部分とを含む発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCのスーパーエンハンサー領域に位置するゲノム遺伝子座に結合する第2発現リプレッサーとを含む、2つの発現リプレッサーを含むシステムを含む組成物を含む容器を含む。

【0037】

いくつかの実施形態ではキットは、b) 前記組成物で疾患を治療する、又は細胞内の標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節する、例えば、低減する少なくとも1つの方法を含む説明書一式をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、任意選択で、前記組成物用の送達ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）を含み得る。試薬は賦形剤及び／又は送達ビヒクルに懸濁して提供されてもよく、又は後に賦形剤及び／又は送達ビヒクルと合わせることができる別個の成分として提供されてもよい。いくつかの実施形態では、キットには、任意選択で、所望の標的遺伝子発現、例えば、MYC遺伝子発現の調節に影響を及ぼすため組成物と共投与されることになる追加の治療薬が入っていてもよい。説明資料は、典型的には文書による、又は印刷された資料を含むが、それらに限定されない。本発明によれば、かかる説明書を保存し、それをエンドユーザに伝達することができる任意の媒体が企図される。かかる媒体としては、限定はされないが、電子記憶媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学媒体（例えば、CD ROM）などが挙げられる。かかる媒体には、かかる説明資料を提供するインターネットサイトへのアドレスが含まれ得る。

【0038】

前述した方法又は組成物のいずれかの別の特徴は、以下に列挙される実施形態の1つ又は複数を含む。

【0039】

当業者であれば、本明細書に記載される本開示の具体的な実施形態の多くの同等物を認識するか、又は常用的な実験を用いるだけでそれらを確認することができるだろう。こうした同等物は、以下に列挙される実施形態に包含されることが意図される。

【0040】

本明細書に挙げる全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献（例えば、配列データベース参照番号）は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。例えば、本明細書、例えば、本明細書のいずれかの表で参照される全ての GenBank、UniGene、及び Entrez 配列は、参照により本明細書に組み込まれる。別に明示しない限り、本明細書の全ての表を含め、本明細書に記載される配列アクセッション番号は、2020年12月15日現在のデータベースエントリーを指す。1つの遺伝子又はタンパク質が、複数の配列アクセッション番号を示す場合には、全ての配列変異体が包含される。

10

【0041】

実施形態の列挙

1. MYCプロモータに結合するターゲティング部分と、

任意選択で、エフェクター部分と

を含む発現リプレッサーであって、

MYCの発現を低減することができる、発現リプレッサー。

【0042】

2. 上記ターゲティング部分が、配列番号4、199、又は201から上流又は下流の1400、1200、1000、800、600、400、又は200nt以内にあるゲノム遺伝子座を結合する、実施形態1に記載の発現リプレッサー。

20

【0043】

3. 上記ターゲティング部分が、配列番号4、77、82、83、85、199、又は201の配列の少なくとも14、15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合する、実施形態1に記載の発現リプレッサー。

【0044】

4. 配列番号3、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、109、110、75、76、78、79、80、81、84、85、86、190、191、192、200、又は202の配列の少なくとも14、15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分と、

30

任意選択で、エフェクター部分と

を含む発現リプレッサーであって、

MYCの発現を低減することができる、発現リプレッサー。

【0045】

5. 配列番号2、77、82、83、199、又は201の配列の少なくとも16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分と

任意選択で、エフェクター部分と

を含む発現リプレッサーであって、

MYCの発現を低減することができる、発現リプレッサー。

40

【0046】

6. MYC遺伝子座を結合するターゲティング部分と、

MQ1又はその断片若しくは変異体を含むエフェクター部分と

を含む発現リプレッサーであって、

MYCの発現を低減することができる、発現リプレッサー。

【0047】

7. MYCスーパーエンハンサー領域にある遺伝子座を結合するターゲティング部分と、

任意選択でエフェクター部分、例えば、DNAメチルトランスフェラーゼを含むエフェ

50

クター部分であって、任意選択でM Q 1又はその断片若しくは変異体を含むエフェクター部分と

を含む発現リプレッサーであって、

M Y C の発現を低減することができる、発現リプレッサー。

【0048】

8. M Y C スーパーエンハンサー領域にある遺伝子座を結合するターゲティング部分と、

転写リプレッサーを含むエフェクター部分であって、任意選択でK R A B 又はその断片若しくは変異体を含むエフェクター部分と

を含む発現リプレッサーであって、

M Y C の発現を低減することができる、発現リプレッサー。

10

【0049】

9. 上記ターゲティング部分が、配列番号96～110、83、199、201のいずれかの配列の少なくとも14、15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合する、実施形態7又は8に記載の発現リプレッサー。

【0050】

10. 上記ターゲティング部分が、hg19参照ゲノムを使用して、GRCh37:chr8:129162465～129212140の配列の少なくとも14、15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合する、実施形態7～9のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0051】

20

11. 上記ターゲティング部分が、配列番号96又は108の配列の少なくとも14、15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合する、実施形態7～10のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0052】

12. 上記ターゲティング部分が、ジンクフィンガードメイン又はT A L エフェクタードメインを含む、実施形態7～11のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0053】

13. 遺伝子座、例えば、M Y C 遺伝子座を結合するターゲティング部分と、

E Z H 2 又はその断片若しくは変異体を含む第1エフェクター部分と、

K R A B 又はその断片若しくは変異体を含む第2エフェクター部分と

30

を含む発現リプレッサーであって、

上記遺伝子座における発現を低減すること、例えば、M Y C の発現を低減することができる、発現リプレッサー。

【0054】

14. 上記ターゲティング部分が、M Y C プロモータ、スーパーエンハンサー領域、又はアンカー配列を結合する、実施形態13に記載の発現リプレッサー。

【0055】

15. 上記ターゲティング部分が、T A L エフェクタードメイン、C R I S P R / C a s ドメイン、又はジンクフィンガードメインを含む、実施形態13又は14に記載の発現リプレッサー。

40

【0056】

16. 上記第1エフェクター部分が上記第2エフェクターのN末端側にあるか、又は上記第1エフェクターが上記第2エフェクター部分のC末端側にある、実施形態13～15のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0057】

17. M Y C 遺伝子座を結合するターゲティング部分であって、ジンクフィンガードメインを含むターゲティング部分と、

任意選択で、エフェクター部分と

を含む発現リプレッサーであって、

M Y C の発現を低減することができる、発現リプレッサー。

50

【0058】

18. MYC 遺伝子に作動可能に連結した転写調節エレメント（例えば、プロモータ、エンハンサー、スーパーエンハンサー、又は転写開始部位（TSS））又は前記転写調節エレメントに近接した配列に結合する、CRISPR/Casドメインを含む、例えば、触媒として不活性なCRISPR/Casタンパク質を含むターゲティング部分と；

MQ1 又はその機能性変異体若しくは断片を含むエフェクター部分とを含む発現リプレッサー。

【0059】

19. MYC 遺伝子に作動可能に連結した転写調節エレメント（例えば、プロモータ、エンハンサー、又は転写開始部位（TSS））又は前記転写調節エレメントに近接した配列に結合する、CRISPR/Casドメインを含む、例えば、触媒として不活性なCRISPR/Casタンパク質を含むターゲティング部分と；

MQ1 又はその機能性変異体若しくは断片を含むエフェクター部分とを含む発現リプレッサー。

【0060】

20. MYC 遺伝子に作動可能に連結した転写調節エレメント（例えば、プロモータ、エンハンサー、又は転写開始部位（TSS））又は前記転写調節エレメントに近接した配列に結合する、CRISPR/Casドメインを含む、例えば、触媒として不活性なCRISPR/Casタンパク質を含むターゲティング部分と；

KRAB 又はその機能性変異体若しくは断片を含むエフェクター部分とを含む発現リプレッサー。

【0061】

21. MYC 遺伝子を含むアンカー配列媒介接合体（ASMC）のアンカー配列に結合するか、又は上記アンカー配列に近接した配列に結合する、CRISPR/Casドメインを含む、例えば、触媒として不活性なCRISPR/Casタンパク質を含むターゲティング部分と；

KRAB 又はその機能性変異体若しくは断片を含むエフェクター部分とを含む発現リプレッサー。

【0062】

22. MYC 遺伝子に作動可能に連結した転写調節エレメント（例えば、プロモータ、エンハンサー、又は転写開始部位（TSS））又は前記転写調節エレメントに近接した配列に結合するジンクフィンガードメインを含むターゲティング部分と；

MQ1 又はその機能性変異体若しくは断片を含むエフェクター部分とを含む発現リプレッサー。

【0063】

23. MYC 遺伝子に作動可能に連結した転写調節エレメント（例えば、プロモータ、エンハンサー、又は転写開始部位（TSS））又は前記転写調節エレメントに近接した配列に結合するジンクフィンガードメインを含むターゲティング部分と；

KRAB 又はその機能性変異体若しくは断片を含むエフェクター部分とを含む発現リプレッサー。

【0064】

24. 配列番号190～192のいずれかの配列の少なくとも14、15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むマウスゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分と

任意選択で、エフェクター部分とを含む発現リプレッサーであって、MYCの発現を低減することができる、発現リプレッサー。

【0065】

25. 上記エフェクター部分が、DNAメチルトランスフェラーゼ、例えば、MQ1 又はその断片若しくは変異体を含む、請求項24に記載の発現リプレッサー。

10

20

30

40

50

【0066】

26. 上記ターゲティング部分が、T A Lエフェクタードメイン、C R I S P R / C a sドメイン、ジンクフィンガードメイン、t e t Rドメイン、メガヌクレアーゼドメイン、又はオリゴヌクレオチドを含む、実施形態24又は25に記載の発現リプレッサー。

【0067】

27. 上記ターゲティング部分が、ジンクフィンガードメイン又はT A Lエフェクタードメインを含む、実施形態24～26のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0068】

28. 上記発現リプレッサーが、配列番号160～165のいずれかから選択されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態24～27のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0069】

29. 上記発現リプレッサーが、配列番号166～168のいずれかから選択されるヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列によってコードされる、実施形態24～28のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0070】

30. 上記ターゲティング部分が、配列番号154～156のいずれかに係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態24～29のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0071】

31. 上記ターゲティング部分が、配列番号157～159のいずれかに係る核酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態24～30のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0072】

32. 上記エフェクター部分が、持続性のあるエフェクター部分である、実施形態24～31のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0073】

33. 上記エフェクター部分が、一過性のエフェクター部分である、実施形態24～32のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0074】

34. 融合分子である、実施形態24～33のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0075】

35. 上記ターゲティング部分がジンクフィンガードメインを含み、及び上記エフェクター部分がエピジェネティック修飾部分、例えば、DNAメチルトランスフェラーゼ、例えば、M Q 1又はその断片若しくは変異体を含む、実施形態24～34のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0076】

36. 上記調節エレメントが、調節エレメントのクラスターの一部である、実施形態18～20、22、又は23のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0077】

37. 上記調節エレメントが非コード領域に位置する、いずれかの実施形態18～20、22、又は23に記載の発現リプレッサー。

【0078】

38. 上記調節エレメントが、例えば、標的遺伝子プロモータ、例えば、MYCから少なくとも1,000nt離れた位置にある、遠位エンハンサーである、いずれかの実施形態18~20、22、又は23に記載の発現リプレッサー。

【0079】

39. 上記調節エレメントが標的遺伝子、例えば、MYCの発現を増加させる、いずれかの実施形態18~20、22、23又は36~38に記載の発現リプレッサー。

【0080】

40. 上記調節エレメントが1つ以上の突然変異を持つ、いずれかの実施形態18~20、22、23、又は36~39に記載の発現リプレッサー。

【0081】

41. 上記調節エレメントが少なくとも1つの疾患関連一塩基変異多型(SNP)を持つ、いずれかの実施形態18~20、22、23、又は36~40に記載の発現リプレッサー。

【0082】

42. 上記転写調節エレメントが、標的遺伝子、例えば、MYCのプロモータとエンハンサードッキング部位を通じて相互作用する、実施形態18~20、22、23、又は36~41のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0083】

43. 上記エンハンサードッキング部位が、配列番号71~74のいずれかに係るヌクレオチド配列を含む、実施形態42に記載の発現リプレッサー。

【0084】

44. MYC遺伝子を含むアンカー配列媒介接合部(ASMC)のアンカー配列に結合するか、又は上記アンカー配列に近接した配列に結合するジンクフィンガードメインを含むターゲティング部分と；

KRAB又はその機能性変異体若しくは断片を含むエフェクター部分とを含む発現リプレッサー。

【0085】

45. 上記発現リプレッサーが、配列番号22~37、129、133、134、139~149、又は177~186のいずれかから選択されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態1~23又は36~43のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0086】

46. 上記発現リプレッサーが、配列番号55~70、130、189、又は193~197のいずれかから選択されるヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列によってコードされる、実施形態1~23又は36~45のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0087】

47. 上記ターゲティング部分が、配列番号5~16、又は169~172のいずれかに係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態1~23又は36~46のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0088】

48. 上記エフェクター部分が、配列番号18 19、又は87に係るアミノ酸配列、又

10

20

30

40

50

はそれと少なくとも 80、85、90、95、99、又は 100% の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0089】

49. 上記エフェクター部分が、持続性のあるエフェクター部分である、実施形態 1～12、17～19、22、36～42、又は 44～47 のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0090】

50. 上記エフェクター部分が、一過性のエフェクター部分である、実施形態 1～23、又は 36～48 のいずれかに記載の発現リプレッサー。

10

【0091】

51. 上記エフェクター部分が、DNA メチルトランスフェラーゼ、例えば、MQ1 又はその断片若しくは変異体を含む、実施形態 1～12、17～19、22、36～42、又は 44～48 のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0092】

52. 上記エフェクター部分が転写リプレッサーを含み、例えば、KRAB 又はその断片若しくは変異体を含む、実施形態 1～23、36～47 又は 49 のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0093】

53. 上記ターゲティング部分が、TAL エフェクタードメイン、CRISPR/Cas ドメイン、ジンクフィンガードメイン、tetR ドメイン、メガヌクレアーゼドメイン、又はオリゴヌクレオチドを含む、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

20

【0094】

54. 上記 CRISPR/Cas ドメインが、gRNA、例えば、配列番号 1～4 のいずれかの配列の少なくとも 14、15、16、17、18、19、又は 20 ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合する gRNA を結合し、例えば、上記 gRNA が、配列番号 1～4 のいずれかの配列の少なくとも 14、15、16、17、18、19、又は 20 ヌクレオチドを含む配列を含む、実施形態 53 に記載の発現リプレッサー。

30

【0095】

55. 上記 CRISPR/Cas ドメインが、gRNA、例えば、配列番号 96～110 のいずれかの配列の少なくとも 14、15、16、17、18、19、又は 20 ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合する gRNA を結合し、例えば、上記 gRNA が、配列番号 96～110 のいずれかの配列の少なくとも 14、15、16、17、18、19、又は 20 ヌクレオチドを含む配列を含む、実施形態 53 に記載の発現リプレッサー。

【0096】

56. 上記 CRISPR/Cas ドメインが、表 1 から選択される Cas タンパク質又は Cpf1 タンパク質又はそのいずれかの変異体（例えば、突然変異体）を含む、実施形態 53～55 のいずれかに記載の発現リプレッサー。

40

【0097】

57. 上記 CRISPR/Cas ドメインが、触媒として不活性な CRISPR/Cas タンパク質、例えば、dCas9 を含む、実施形態 53～56 のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0098】

58. 上記ジンクフィンガードメインが、配列番号 96～110 のいずれかの配列の少なくとも 14、15、16、17、18、19、又は 20 ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合し、例えば、上記 gRNA が、配列番号 96～110 のいずれかの配列の少なくとも 14、15、16、17、18、19、又は 20 ヌクレオチドを含む配列を含む、実施形態 53 に記載の発現リプレッサー。

50

【0099】

59. 上記ジンクフィンガードメインが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のジンクフィンガー（及び任意選択で11、10、9、8、7、6、又は5個を超えないジンクフィンガー）を含む、実施形態17、22、26～53、又は57のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0100】

60. 上記ジンクフィンガードメインが、1～10、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5、1～4、1～3、1～2、2～10、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4、2～3、3～10、3～9、3～8、3～7、3～6、3～5、3～4、4～10、4～9、4～8、4～7、4～6、4～5、5～10、5～9、5～8、5～7、5～6、6～10、6～9、6～8、6～7、7～10、7～9、7～8、8～10、8～9、又は9～10個のジンクフィンガーを含む、実施形態17、22、26～53、57、又は58のいずれかに記載の発現リプレッサー。

10

【0101】

61. 上記ジンクフィンガードメインが、3個又は9個のジンクフィンガーを含む、実施形態17、22、26～53、又は57～59のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0102】

62. 融合分子である、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0103】

63. 上記ターゲティングドメインと上記エフェクタードメインとの間に位置するリンカーであって、任意選択で、配列番号137又は配列番号138に係るアミノ配列を含むリンカーを含む、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

20

【0104】

64. 上記ターゲティング部分が、触媒として不活性なCRISPR/Casドメイン（例えば、dCas9）を含み、及び上記エフェクター部分が転写リプレッサー、例えば、KRAB又はその断片若しくは変異体を含む、実施形態1～17、20、21、23、44～48、50、又は52～57のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0105】

65. 上記ターゲティング部分がジンクフィンガードメインを含み、及び上記エフェクター部分が転写リプレッサー、例えば、KRAB又はその断片若しくは変異体を含む、実施形態1～17、20、21、23、44～48、50、52、又は53～64のいずれかに記載の発現リプレッサー。

30

【0106】

66. 上記ターゲティング部分がジンクフィンガードメインを含み、及び上記発現リプレッサーがエフェクター部分を含まない、実施形態17、36～43、45～47、53、又は58～63のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0107】

67. 上記ターゲティング部分が、触媒として不活性なCRISPR/Casドメイン（例えば、dCas9）を含み、及び上記エフェクター部分がエピジェネティック修飾部分、例えば、DNAメチルトランスフェラーゼ、例えば、MQ1又はその断片若しくは変異体を含む、実施形態1～12、18～19、22、36～43、45～49、51、又は53～57のいずれかに記載の発現リプレッサー。

40

【0108】

68. 上記ターゲティング部分がジンクフィンガードメインを含み、及び上記エフェクター部分がエピジェネティック修飾部分、例えば、DNAメチルトランスフェラーゼ、例えば、MQ1又はその断片若しくは変異体を含む、実施形態1～12、17～19、22、36～43、45～49、51、53、又は58～63のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0109】

69. 配列番号22～37、129、133、134、139～149、又は177～1

50

86のいずれかのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を有する配列を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0110】

70. (i) 1つ以上の核局在化シグナル配列(NLS)を含む、又は(ii) NLSを含まない、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0111】

71. N末端にある第1のNLSであって、例えば、配列番号88の配列を有する第1のNLSを含む、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0112】

72. C末端にある、例えば、配列番号89の配列を有するNLS、例えば、第2のNLSを含む、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0113】

73. 上記第1のNLSと上記第2のNLSとが同じ配列を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0114】

74. 上記第1のNLSと上記第2のNLSとが異なる配列を有する、実施形態71~73のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0115】

75. エピトープタグを含む、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0116】

76. 上記エピトープタグがHAタグである、実施形態75に記載の発現リプレッサー。

【0117】

77. 上記アンカー配列が、配列番号71又は72の配列、又はそれと比べた改変が8、7、6、5、4、3、2、又は1個を超えない配列を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0118】

78. 上記アンカー配列が、配列番号73又は74に係る配列、又はそれと比べた改変が8、7、6、5、4、3、2、又は1個を超えない配列を含む、実施形態1~77のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0119】

79. 上記アンカー配列が、MYC遺伝子と同じ染色体上にある、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0120】

80. 上記アンカー配列が、MYC遺伝子の上流にある(例えば、TSSの上流又はプロモータの上流にある)、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0121】

81. 上記アンカー配列が、MYC遺伝子から(例えば、MYC遺伝子のTSS又はプロモータから)少なくとも1、5、10、50、100、又は1000キロベース離れている、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0122】

82. 上記アンカー配列が、MYC遺伝子から(例えば、MYC遺伝子のTSS又はプロモータから)0.1~0.5、0.1~1、0.1~5、0.1~10、0.1~50、0.1~100、0.1~500、0.1~1000、0.5~1、0.5~5、0.5~10、0.5~50、0.5~100、0.5~500、0.5~1000、1~5、1~10、1~50、1~100、1~500、1~1000、5~10、5~50、5~100、5~500、5~1000、10~50、10~100、10~500、10~1000、50~100、50~500、50~1000、100~500、100~1000、又は500~1000キロベース離れている、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

10

20

30

40

50

【0123】

83. 上記標的配列が、MYC遺伝子の下流にある（例えば、TSSの下流又はプロモーターの下流にある）、実施形態1～79又は81～82のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0124】

84. 上記ターゲティング部分が、染色体座標128746342～128746364、128746321～128746343、128746525～128746547、128748014～128748036、129188878～129188900、129188958～129188980、129188960～129188982、129189067～129189089、129189457～129189479、129189554～129189576、129189679～129189701、129209511～129209533、129209643～129209665、129209658～129209680、129209856～129209878、129189452～129189474、129189190～129189212、129189274～129189296、129189421～129189443、128746405～128746425、128748069～128748089、129188825～129188845、又は129188822～129188842における配列又はそれに近接した配列に結合する、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

10

【0125】

85. 上記発現リプレッサーが標的遺伝子座、例えば、MYCに結合すると、例えば、ELISAによるか、又は実施例7又は28のいずれかに記載のとおり測定したとき、上記標的遺伝子座、例えば、MYCの一部位におけるメチル化が、上記発現リプレッサーの非存在下でのメチル化と比較して10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は100%増加し、任意選択で、メチル化に関してアッセイされる上記部位が、hg19参照ゲノムに係るchr8:129188693～129189048であり、例えば、配列番号123に係る配列を含む、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

20

【0126】

86. 上記発現リプレッサーが標的遺伝子座、例えば、MYCに結合すると、例えば、実施例28に記載のとおり、上記標的遺伝子座、例えば、MYCの一部位におけるメチル化が、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25日、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10回の細胞分裂の期間にわたって増加する、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

30

【0127】

87. 上記発現リプレッサーがMYC遺伝子座に結合すると、例えば、ELISAによるか、又は実施例2～7又は9のいずれかに記載のとおり測定したとき、細胞のMYCの発現が、上記発現リプレッサーの非存在下での発現と比較して10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は100%減少する、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

40

【0128】

88. 上記発現リプレッサーがMYC遺伝子座に結合すると、例えば、ELISAによるか、又は実施例2～7又は9のいずれかに記載のとおり測定したとき、MYCの発現が、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25日、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10回の細胞分裂の期間にわたって認め得るほどに減少する、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0129】

89. 上記発現リプレッサーがMYC遺伝子座に結合すると、トランスフェクション後1

50

、2、3、4、5、6、7、8、10、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、又は96時間でMYCの発現が認め得るほどに減少する、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0130】

90．上記ターゲティング部分がヒトゲノム遺伝子座に結合する、実施形態1～23又は36～89のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0131】

91．上記ターゲティング部分がマウスゲノム遺伝子座に結合する、実施形態24～4349、51、53、56～57、59～62、66～68、70～89のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0132】

92．上記発現リプレッサーがMYC遺伝子座に結合すると、MYC遺伝子座を含む細胞（例えば、癌細胞）の生存能力が減少する、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0133】

93．複数の細胞を上記発現リプレッサー又は上記発現リプレッサーをコードする核酸と接触させると、上記複数の細胞の生存能力が減少する、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0134】

94．例えば、Cell Titer Gloによるか、又は実施例2～7のいずれかに記載のとおり測定したとき、生存能力が、上記第1発現リプレッサーの非存在下での生存能力と比較して10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は100%減少する、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0135】

95．上記発現リプレッサーを投与すると、標的細胞（例えば、癌細胞）の少なくとも5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、75%にアポトーシスが起こる、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0136】

96．上記複数の細胞が、複数の癌細胞及び複数の非癌細胞及び／又は複数の感染細胞及び複数の非感染細胞を含む、いずれかの先行する実施形態に記載の上記発現リプレッサー。

【0137】

97．上記複数の細胞を上記発現リプレッサー又は上記発現リプレッサーをコードする核酸と接触させると、複数の癌細胞の生存能力が、それによる複数の非癌細胞の生存能力の減少よりも大きく減少する、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0138】

98．上記複数の細胞を上記発現リプレッサー又は上記発現リプレッサーをコードする核酸と接触させると、複数の癌細胞の生存能力が、それによる複数の非癌細胞の生存能力の減少の1.05×（即ち、1.05倍）、1.1×、1.15×、1.2×、1.25×、1.3×、1.35×、1.4×、1.45×、1.5×、1.6×、1.7×、1.8×、1.9×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、20×、50×、又は100×大きく減少する、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0139】

99．上記癌細胞が、肺癌細胞、胃癌細胞、消化管癌細胞、結腸直腸癌細胞、膵癌細胞、又は肝癌細胞である、実施形態92～97のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0140】

100．上記癌が、肝細胞癌（HCC）、線維層板肝細胞癌（FHCC）、胆管癌、血管

10

20

30

40

50

肉腫、二次肝癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、腺癌、小細胞肺癌（SCLC）、大細胞（未分化）癌、トリプルネガティブ乳癌、胃腺癌、子宮内膜癌、又は膀胱癌である、実施形態 92～99 のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0141】

101. 複数の感染細胞及び複数の非感染細胞と接触させたとき、それが上記複数の非感染細胞の生存能力を低減するよりも大きく上記複数の感染細胞の生存能力を低減する、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0142】

102. 上記感染がウイルス感染である、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0143】

103. 上記ウイルス感染が、肝炎、例えば、B型肝炎である、実施形態 102 に記載の発現リプレッサー。

【0144】

104. 上記感染細胞が、ヒトヘパトサイトである、実施形態 92～103 のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0145】

105. 上記発現リプレッサーをコードする mRNA の LNP 送達を用いた癌細胞（例えば、HCC 細胞）の生存能力に関するアッセイ、例えば、実施例 12 に係るアッセイで試験したとき、0.04～0.4、0.04～0.1、0.1～0.2、0.2～0.3、又は 0.3～0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の EC50 を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0146】

106. 上記発現リプレッサーをコードする mRNA の LNP 送達を用いた癌細胞（例えば、肺癌細胞）の生存能力に関するアッセイ、例えば、実施例 18 に係るアッセイで試験したとき、0.1～2.5、0.5～2.2、1.0～1.5、1.2～2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の EC50 を有する、実施形態 1～104 のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0147】

107. 上記発現リプレッサーをコードする mRNA の LNP 送達を用いた癌細胞（例えば、HCC 細胞）の MYC mRNA レベルの低下に関するアッセイ、例えば、実施例 12 に係るアッセイで試験したとき、0.004～0.08、0.004～0.01、0.01～0.02、0.02～0.04、又は 0.04～0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の EC50 を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0148】

108. 上記発現リプレッサーをコードする mRNA の LNP 送達を用いた癌細胞（例えば、肺癌細胞）の MYC mRNA レベルの低下に関するアッセイ、例えば、実施例 18 に係るアッセイで試験したとき、0.04～0.1、0.04～0.09、0.05～0.09、又は 0.06～0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の EC50 を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0149】

109. 細胞における標的遺伝子、例えば、MYC によってコードされるタンパク質のレベルを、未処理細胞の上記タンパク質レベルと比較して少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、又は少なくとも 90% 低下させる、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0150】

110. 例えば、ヒト対象の、又は哺乳類モデルの、腫瘍容積を低下させることができる、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0151】

111. 例えば、上記発現リプレッサーが 5 日毎に 3 mg/kg の用量で投与されるよう

10

20

30

40

50

な治療の開始後20日目に例えば測定したとき、例えば、哺乳類モデルにおいて、腫瘍容積を化学療法剤と比較して同程度又はそれより高度に低下させることができる、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0152】

112. 例えば、上記発現リプレッサーが5日毎に4用量、続いて3日毎に3用量にわたって1mg/kg、1.5mg/kg、又は3mg/kgで投与されるような治療の開始後20日目に例えば測定したとき、例えば、哺乳類モデルにおいて、腫瘍容積をPBS対照と比較して低下させることができる、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0153】

113. 上記腫瘍容積が、例えば、治療の開始後20日目に、PBSで治療した対照と比較して少なくとも約10%、20%、30%、又は40%低下する、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0154】

114. 上記化学療法剤が、ソラフェニブ又はシスプラチンである、実施形態111~113のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0155】

115. 上記システムが、腫瘍容積を小分子MYC阻害薬と比較して同程度又はそれより高度に低下させることができる、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0156】

116. 上記小分子MYC阻害薬がMYCi975であり、任意選択で腫瘍容積が、例えば、治療の開始後20日目に、MYCi975で治療した対照と比較して少なくとも約10%、20%、30%、又は40%低下する、実施形態115に記載の発現リプレッサー。

【0157】

117. 治療開始時と比較して体重の減少が生じないか、又は生じる体重の減少が3%、2%、又は1%未満である、先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー。

【0158】

118. 先行する実施形態のいずれかに記載の第1発現リプレッサーと、
第2発現リプレッサー、例えば、本明細書に記載の第2発現リプレッサー、例えば、先行する実施形態のいずれかに記載の第2発現リプレッサーとを含むシステム。

【0159】

119. 第1ターゲティング部分と任意選択で第1エフェクター部分とを含む第1発現リプレッサーであって、MYC遺伝子に作動可能に連結した転写調節エレメント（例えば、プロモータ、エンハンサー、又は転写開始部位（TSS））に結合するか、又は上記転写調節エレメントに近接した配列に結合する第1発現リプレッサーと、

第2ターゲティング部分と任意選択で第2エフェクター部分とを含む第2発現リプレッサーであって、MYC遺伝子を含むアンカー配列媒介接合部（ASMC）のアンカー配列に結合するか、又は上記アンカー配列に近接した配列に結合する第2発現リプレッサーとを含むシステム。

【0160】

120. 上記転写調節エレメントがプロモータを含み、及び
上記アンカー配列がCTCF結合モチーフを含む、
実施形態118又は119に記載のシステム。

【0161】

121. 上記第2発現リプレッサーが、上記CTCF結合モチーフに隣接する下流領域に結合する、実施形態118~120のいずれかに記載のシステム。

【0162】

10

20

30

40

50

122. 上記第2発現リプレッサーが、上記CTCF結合モチーフに隣接する上流領域に結合する、実施形態118～120のいずれかに記載のシステム。

【0163】

123. 上記第1発現リプレッサーが、配列番号2、3、4、71～86、又は200～206の配列の少なくとも16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分を含み；及び

上記第2発現リプレッサーが、配列番号2、3、4、71～86、又は200～206の配列の少なくとも16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分を含む、
実施形態118～122のいずれかに記載のシステム。

10

【0164】

124. 上記第1発現リプレッサーが、配列番号96～110のいずれかの配列の少なくとも16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分を含む、

実施形態118～123のいずれかに記載のシステム。

【0165】

125. 上記第1発現リプレッサーが、配列番号71、配列番号72、又は配列番号83の配列の少なくとも16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分を含み；及び

上記第2発現リプレッサーが、配列番号77の配列の少なくとも16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分を含む、
実施形態118～124のいずれかに記載のシステム。

20

【0166】

126. 第1ターゲティング部分と任意選択で第1エフェクター部分とを含む第1発現リプレッサーであって、MYC遺伝子に作動可能に連結したプロモータに結合するか、又は上記プロモータに近接した配列に結合する第1発現リプレッサーと、

第2ターゲティング部分と任意選択で第2エフェクター部分とを含む第2発現リプレッサーであって、MYC遺伝子のエンハンサー（例えば、スーパーエンハンサー）に結合する第2発現リプレッサーと

を含むシステム。

30

【0167】

127. 上記第1発現リプレッサーが、配列番号204の配列の少なくとも16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分を含み、及び

上記第2発現リプレッサーが、配列番号199又は201のいずれかの配列の少なくとも16、17、18、19、又は20ヌクレオチドを含むゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分を含む、

実施形態126に記載のシステム。

【0168】

128. MYC発現を低下させるためのシステムであって、

40

a) 第1発現リプレッサーであって、

i) 配列番号13に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第1ターゲティング部分と

ii) 配列番号19又は87に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第1エフェクター部分と

を含む、第1発現リプレッサーと、

50

b) 第2発現リプレッサーであって、

i) 配列番号7 169、又は171に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第2ターゲティング部分と、

ii) 配列番号18に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第2エフェクター部分と

を含む、を含む第2発現リプレッサーとを含むシステム。

10

【0169】

129. 上記第1発現リプレッサーが、例えば、上記第1ターゲティング部分のN末端側に位置する、第1核局在化シグナル、例えば、SV40 NLS、例えば、配列番号135に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をさらに含む、実施形態128に記載のシステム。

【0170】

130. 上記第1発現リプレッサーが、例えば、上記第1エフェクター部分のC末端側に位置する、第2核局在化シグナル、例えば、ヌクレオプラスミンNLS、例えば、配列番号136に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をさらに含む、実施形態128又は129に記載のシステム。

20

【0171】

131. 上記第2発現リプレッサーが、例えば、上記第2ターゲティング部分のN末端側に位置する、第1核局在化シグナル、例えば、SV40 NLS、例えば、配列番号135に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をさらに含む、実施形態128～130のいずれかに記載のシステム。

【0172】

132. 上記第2発現リプレッサーが、例えば、上記第2エフェクター部分のC末端側に位置する、第2核局在化シグナル、例えば、ヌクレオプラスミンNLS、例えば、配列番号136に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をさらに含む、実施形態128～131のいずれかに記載のシステム。

30

【0173】

133. 上記第1発現リプレッサーが、上記第1ターゲティング部分と上記第1エフェクター部分との間に位置する第1リンカーをさらに含み、任意選択で上記第1リンカーが、配列番号137に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を有する、実施形態128～132のいずれかに記載のシステム。

【0174】

134. 上記第2発現リプレッサーが、上記第2ターゲティング部分と上記第2エフェクター部分との間に位置する第2リンカーをさらに含み、任意選択で上記第2リンカーが、配列番号138に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を有する、実施形態128～133のいずれかに記載のシステム。

40

【0175】

135. 上記第1発現リプレッサーが、上記第1エフェクター部分のC末端側にあるアミノ酸配列、例えば、最大30、25、20、又は18アミノ酸の配列、例えば、配列番号126に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をさらに含む、実施形態128～134のいずれかに記載のシステム。

【0176】

136. 上記第2発現リプレッサーが、上記第2ターゲティング部分のN末端側にあるア

50

ミノ酸配列、例えば、最大30、25、20、又は18アミノ酸の配列、例えば、配列番号128に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をさらに含む、実施形態128～132のいずれかに記載のシステム。

【0177】

137. 上記第1発現リプレッサーが、配列番号30又は129に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を有する、実施形態128～136のいずれかに記載のシステム。

【0178】

138. 上記第2発現リプレッサーが、配列番号24に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を有する、実施形態128～137のいずれかに記載のシステム。

【0179】

139. 上記第2ターゲティング部分が、配列番号169に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を含む、実施形態128～137のいずれかに記載のシステム。

【0180】

140. 上記第2ターゲティング部分が、配列番号171に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を含む、実施形態128～137のいずれかに記載のシステム。

【0181】

141. 上記第2発現リプレッサーが、配列番号177又は183に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を有する、実施形態128～140のいずれかに記載のシステム。

【0182】

142. 上記第2発現リプレッサーが、配列番号179、185に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を有する、実施形態128～140のいずれかに記載のシステム。

【0183】

143. 実施形態128～142のいずれかに記載のシステムの上記第1発現リプレッサー及び第2リプレッサーをコードする核酸。

【0184】

144. MYC発現を低下させるためのシステムをコードする核酸であって、

a) 第1発現リプレッサーをコードする第1領域であって、上記第1発現リプレッサーが、

i) 配列番号13に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第1ターゲティング部分と、

ii) 配列番号19又は87に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第1エフェクター部分を含む、第1領域と、

b) 第2発現リプレッサーをコードする第2領域であって、上記第2発現リプレッサーが、

i) 配列番号7に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第2ターゲティング部分と、

ii) 配列番号18に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、

10

20

30

40

50

95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第2エフェクター部分とを含む、第2領域とを含む核酸。

【0185】

145. 上記第1領域が、上記第2領域の5'側にある、実施形態144に記載の核酸。

【0186】

146. 上記第1領域が、上記第2領域の3'側にある、実施形態144に記載の核酸。

【0187】

147. 上記第1領域が、例えば、上記第1ターゲティング部分のN末端側に位置する、第1核局在化シグナル、例えば、SV40 NLS、例えば、配列番号135に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態145又は146に記載の核酸。

【0188】

148. 上記第1領域が、例えば、上記第1エフェクター部分のC末端側に位置する、第2核局在化シグナル、例えば、ヌクレオプラスミンNLS、例えば、配列番号136に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態145～147のいずれかに記載の核酸。

【0189】

149. 上記第2領域が、例えば、上記第2ターゲティング部分のN末端側に位置する、第1核局在化シグナル、例えば、SV40 NLS、例えば、配列番号135に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態145～148のいずれかに記載の核酸。

【0190】

150. 上記第2領域が、例えば、上記第2エフェクター部分のC末端側に位置する、第2核局在化シグナル、例えば、ヌクレオプラスミンNLS、例えば、配列番号136に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態145～149のいずれかに記載の核酸。

【0191】

151. 上記第1領域が、上記第1ターゲティング部分と上記第1エフェクター部分との間に位置する第1リンカーであって、任意選択で、配列番号137に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を有する第1リンカーをコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態145～150のいずれかに記載の核酸。

【0192】

152. 上記第2領域が、上記第2ターゲティング部分と上記第2エフェクター部分との間に位置する第2リンカーであって、任意選択で、配列番号138に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を有する第2リンカーをコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態145～151のいずれかに記載の核酸。

【0193】

153. 上記第1領域が、上記第1エフェクター部分のC末端側にあるアミノ酸配列、例えば、最大30、25、20、又は18アミノ酸の配列、例えば、配列番号126に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態145～152のいずれかに記載の核酸。

10

20

30

40

50

【0194】

154. 上記第2領域が、上記第2ターゲティング部分のN末端側にあるアミノ酸配列、例えば、最大30、25、20、又は18アミノ酸の配列、例えば、配列番号128に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態145～153のいずれかに記載の核酸。

【0195】

155. 上記第1発現リプレッサーが、配列番号30又は129に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を有する、実施形態145～154のいずれかに記載の核酸。

10

【0196】

156. 上記第2発現リプレッサーが、配列番号24に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を有する、実施形態145～155のいずれかに記載の核酸。

【0197】

157. 上記第1領域が、上記第1ターゲティング部分をコードするヌクレオチド配列を含み、上記第1ターゲティング部分をコードする上記ヌクレオチド配列が、配列番号46又は131に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態145～156のいずれかに記載の核酸。

20

【0198】

158. 上記第1領域が、上記第1エフェクター部分をコードするヌクレオチド配列を含み、上記第1エフェクター部分をコードする上記ヌクレオチド配列が、配列番号52又は132に係る配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態145～157のいずれかに記載の核酸。

【0199】

159. 上記第2領域が、上記第2ターゲティング部分をコードするヌクレオチド配列を含み、上記第2ターゲティング部分をコードする上記ヌクレオチド配列が、配列番号40に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態145～158のいずれかに記載の核酸。

30

【0200】

160. 上記第1領域が、上記第1エフェクター部分をコードするヌクレオチド配列を含み、上記第1エフェクター部分をコードする上記ヌクレオチド配列が、配列番号51に係る配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態145～159のいずれかに記載の核酸。

40

【0201】

161. 上記第1領域が、配列番号63又は130に係るヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含み、ポリA配列が任意選択である、実施形態145～160のいずれかに記載の核酸。

【0202】

162. 上記第2領域が、配列番号57に係るヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも

50

80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含み、ポリA配列が任意選択である、実施形態145～161のいずれかに記載の核酸。

【0203】

163. MYC発現を低下させるためのシステムをコードする核酸であって、

a) 第1発現リプレッサーをコードする第1領域であって、上記第1発現リプレッサーが、

i) 配列番号13に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第1ターゲティング部分と、

ii) 配列番号19又は87に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第1エフェクター部分とを含む、第1領域と、

b) 第2発現リプレッサーをコードする第2領域であって、上記第2発現リプレッサーが、

i) 配列番号169に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第2ターゲティング部分と、

ii) 配列番号18に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第2エフェクター部分とを含む、第2領域とを含む核酸。

【0204】

164. MYC発現を低下させるためのシステムをコードする核酸であって、

a) 第1発現リプレッサーをコードする第1領域であって、上記第1発現リプレッサーが、

i) 配列番号13に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第1ターゲティング部分と、

ii) 配列番号19又は87に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第1エフェクター部分とを含む、第1領域と、

b) 第2発現リプレッサーをコードする第2領域であって、上記第2発現リプレッサーが、

i) 配列番号171に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第2ターゲティング部分と、

ii) 配列番号18に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19

10

20

30

40

50

、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する第2エフェクター部分を含む、第2領域とを含む核酸。

【0205】

165．上記第1領域が、上記第2領域の5'側にある、実施形態163又は164に記載の核酸。

【0206】

166．上記第1領域が、上記第2領域の3'側にある、実施形態163又は164に記載の核酸。

【0207】

167．上記第1領域が、例えば、上記第1ターゲティング部分のN末端側に位置する、第1核局在化シグナル、例えば、SV40 NLS、例えば、配列番号135に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態163～166のいずれかに記載の核酸。

【0208】

168．上記第1領域が、例えば、上記第1エフェクター部分のC末端側に位置する、第2核局在化シグナル、例えば、ヌクレオプラスミンNLS、例えば、配列番号136に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態163～167のいずれかに記載の核酸。

【0209】

169．上記第2領域が、例えば、上記第2ターゲティング部分のN末端側に位置する、第1核局在化シグナル、例えば、SV40 NLS、例えば、配列番号135に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態163～168のいずれかに記載の核酸。

【0210】

170．上記第2領域が、例えば、上記第2エフェクター部分のC末端側に位置する、第2核局在化シグナル、例えば、ヌクレオプラスミンNLS、例えば、配列番号136に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態163～169のいずれかに記載の核酸。

【0211】

171．上記第1領域が、上記第1ターゲティング部分と上記第1エフェクター部分との間に位置する第1リンカーであって、任意選択で、配列番号137に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を有する第1リンカーをコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態163～170のいずれかに記載の核酸。

【0212】

172．上記第2領域が、上記第2ターゲティング部分と上記第2エフェクター部分との間に位置する第2リンカーであって、任意選択で、配列番号138に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を有する第2リンカーをコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態163～171のいずれかに記載の核酸。

【0213】

173．上記第1領域が、上記第1エフェクター部分のC末端側にあるアミノ酸配列、例えば、最大30、25、20、又は18アミノ酸の配列、例えば、配列番号126に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列

10

20

30

40

50

をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態 163～171 のいずれかに記載の核酸。

【0214】

174. 上記第2領域が、上記第2ターゲティング部分のN末端側にあるアミノ酸配列、例えば、最大30、25、20、又は18アミノ酸の配列、例えば、配列番号128に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態163～173のいずれかに記載の核酸。

【0215】

175. 上記第1発現リプレッサーが、配列番号30又は129に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を有する、実施形態163～174のいずれかに記載の核酸。

【0216】

176. 上記第2発現リプレッサーが、配列番号177、又は183に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を有する、実施形態144～175のいずれかに記載の核酸。

【0217】

177. 上記第2発現リプレッサーが、配列番号179、又は185に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を有する、実施形態144～176のいずれかに記載の核酸。

【0218】

178. 第1発現リプレッサーが、配列番号30、又は129に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を含み、上記第2発現リプレッサーが、配列番号24、141、177、179、183、又は185に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を有する、実施形態144～177のいずれかに記載の核酸。

【0219】

179. 上記第1領域が、上記第1ターゲティング部分をコードするヌクレオチド配列を含み、上記第1ターゲティング部分をコードする上記ヌクレオチド配列が、配列番号46又は131に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態144～178のいずれかに記載の核酸。

【0220】

180. 上記第1領域が、上記第1エフェクター部分をコードするヌクレオチド配列を含み、上記第1エフェクター部分をコードする上記ヌクレオチド配列が、配列番号52又は132に係る配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態144～179のいずれかに記載の核酸。

【0221】

181. 上記第2領域が、配列番号173に係るヌクレオチド配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含み、ポリA配列が任意選択である、実施形態144～180のいずれかに記載の核酸。

【0222】

182. 上記第2領域が、配列番号175に係るヌクレオチド配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8

10

20

30

40

50

、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含み、ポリA配列が任意選択である、実施形態144～181のいずれかに記載の核酸。

【0223】

183. 上記第2領域が、上記第2エフェクター部分をコードするヌクレオチド配列を含み、上記第2エフェクター部分をコードする上記ヌクレオチド配列が、配列番号51に係る配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態144～182のいずれかに記載の核酸。

【0224】

184. 上記第1領域が、配列番号63又は130に係るヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含み、ポリA配列が任意選択である、実施形態144～183のいずれかに記載の核酸。

【0225】

185. 上記第2領域が、配列番号189に係るヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含み、ポリA配列が任意選択である、実施形態144～184のいずれかに記載の核酸。

【0226】

186. 上記第2領域が、配列番号194に係るヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含み、ポリA配列が任意選択である、実施形態144～185のいずれかに記載の核酸

【0227】

187. 上記第1領域が、上記第1エフェクター部分をコードするヌクレオチド配列を含み、上記第1エフェクター部分をコードする上記ヌクレオチド配列が、配列番号52又は132に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態144～186のいずれかに記載の核酸。

【0228】

188. 上記第1領域が、上記第1ターゲティング部分をコードするヌクレオチド配列を含み、上記第1ターゲティング部分をコードする上記ヌクレオチド配列が、配列番号46又は131に係る配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態144～187のいずれかに記載の核酸。

【0229】

189. 上記第2領域が、上記第2エフェクター部分をコードするヌクレオチド配列を含み、上記第2エフェクター部分をコードする上記ヌクレオチド配列が、配列番号51に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態144～188のいずれかに記載の核酸。

【0230】

190. 上記第2領域が、配列番号189に係るヌクレオチド配列、又はそれと少なくと

10

20

30

40

50

も 80、85、90、95、99、又は 100% の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を含む、実施形態 144～189 のいずれかに記載の核酸。

【0231】

191. 上記第 2 領域が、配列番号 194 に係るヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも 80、85、90、95、99、又は 100% の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を含む、実施形態 144～190 のいずれかに記載の核酸。

10

【0232】

192. 配列番号 93、112 に係るヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも 80、85、90、95、99、又は 100% の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を有する、実施形態 144～191 のいずれかに記載の核酸。

【0233】

193. 配列番号 196 又は 197 に係るヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも 80、85、90、95、99、又は 100% の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を有する、実施形態 144～192 のいずれかに記載の核酸。

20

【0234】

194. 上記第 1 発現リプレッサーが上記第 1 エフェクター部分を含む、実施形態 118～193 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0235】

195. 上記第 2 発現リプレッサーが上記第 2 エフェクター部分を含む、実施形態 118～194 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0236】

196. 上記第 1 エフェクター部分が、上記第 2 エフェクター部分と異なるアミノ酸配列を有する、実施形態 118～195 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

30

【0237】

197. 上記第 1 エフェクター部分が、持続性のあるエフェクター部分である、実施形態 118～196 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0238】

198. 上記第 1 エフェクター部分が、一過性のエフェクター部分である、実施形態 118～125 又は 144～197 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0239】

199. 上記第 1 エフェクター部分が、エピジェネティック修飾部分である、実施形態 118～198 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

40

【0240】

200. 上記第 1 エフェクター部分がヒストンメチルトランスフェラーゼを含む、実施形態 118～143、163～197 又は 199 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0241】

201. 上記第 1 エフェクター部分が、SETDB1、SETDB2、EHMT2（即ち、G9A）、EHMT1（即ち、GLP）、SUV39H1、EZH2、EZH1、SUV39H2、SETD8、SUV420H1、SUV420H2、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片、例えば、これらのいずれかの SET ドメインから選択されるタンパク質を含む、実施形態 200 に記載のシステム又は核酸。

【0242】

50

202. 上記第1エフェクター部分がヒストンデメチラーゼ（例えば、リジンデメチラーゼ）を含む、実施形態118～143、163～197、又は199のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0243】

203. 上記第1エフェクター部分が、KDM1A（即ち、LSD1）、KDM1B（即ち、LSD2）、KDM2A、KDM2B、KDM5A、KDM5B、KDM5C、KDM5D、KDM4B、NO66（又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片）から選択されるタンパク質を含む、実施形態202に記載のシステム又は核酸。

【0244】

204. 上記第1エフェクター部分がヒストンデアセチラーゼを含む、実施形態118～143、163～197、又は199のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0245】

205. 上記第1エフェクター部分が、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8、HDAC9、HDAC10、HDAC11、SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6、SIRT7、SIRT8、SIRT9、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片から選択されるタンパク質を含む、実施形態204に記載のシステム又は核酸。

【0246】

206. 上記第1エフェクター部分が、DNAメチルトランスフェラーゼを含む、実施形態118～197又は200のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0247】

207. 上記第1エフェクター部分が、MQ1、DNMT1、DNMT3A1、DNMT3A2、DNMT3B1、DNMT3B2、DNMT3B3、DNMT3B4、DNMT3B5、DNMT3B6、DNMT3L、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片から選択されるタンパク質を含む、実施形態206に記載のシステム又は核酸。

【0248】

208. 上記第1エフェクター部分が、例えば、転写リプレッサーを含む、転写リプレッサー部分である、実施形態118～143、160～196、又は198又はのいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0249】

209. 上記第1エフェクター部分が、KRAB、MeCP2、HP1、RBBP4、REST、FOG1、SUZ12、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片から選択されるタンパク質を含む、実施形態198又は199に記載のシステム又は核酸。

【0250】

210. 上記第1エフェクター部分が、上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列のエピジェネティック修飾を促進する、実施形態118～209のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0251】

211. 上記第1エフェクター部分が、上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列のエピジェネティック修飾を触媒する、実施形態118～210のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0252】

212. 上記第2発現リプレッサーがエフェクター部分を含まない、実施形態118～125、194、又は197～211のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0253】

213. 上記第2エフェクター部分が、一過性のエフェクター部分である、実施形態118～212のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0254】

214. 上記第2エフェクター部分が、持続性のあるエフェクター部分である、実施形態118～125又は194～211のいずれかに記載のシステム又は核酸。

10

20

30

40

50

【0255】

215. 上記第2エフェクター部分が、エピジェネティック修飾部分である、実施形態118～211又は214のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0256】

216. 上記第2エフェクター部分がヒストンメチルトランスフェラーゼを含む、実施形態118～125、194～211、又は214～215のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0257】

217. 上記第2エフェクター部分が、SETDB1、SETDB2、EHMT2（即ち、G9A）、EHMT1（即ち、GLP）、SUV39H1、EZH2、EZH1、SUV39H2、SETD8、SUV420H1、SUV420H2、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片、例えば、これらのいずれかのSETドメインから選択されるタンパク質を含む、実施形態216に記載のシステム又は核酸。

【0258】

218. 上記第2エフェクター部分がヒストンデメチラーゼ（例えば、リジンデメチラーゼ）を含む、実施形態118～125、194～211、又は214～215のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0259】

219. 上記第2エフェクター部分が、KDM1A（即ち、LSD1）、KDM1B（即ち、LSD2）、KDM2A、KDM2B、KDM5A、KDM5B、KDM5C、KDM5D、KDM4B、NO66（又はこれらのいずれかの機能性変異体又は断片から選択されるタンパク質を含む、実施形態218に記載のシステム又は核酸。

【0260】

220. 上記第2エフェクター部分がヒストンデアセチラーゼを含む、実施形態118～125、194～211、又は214～215のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0261】

221. 上記第2エフェクター部分が、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8、HDAC9、HDAC10、HDAC11、SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6、SIRT7、SIRT8、SIRT9、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片から選択されるタンパク質を含む、実施形態220に記載のシステム又は核酸。

【0262】

222. 上記第2エフェクター部分が、DNAメチルトランスフェラーゼを含む、実施形態118～125、194～211、又は214～215のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0263】

223. 上記第2エフェクター部分が、MQ1、DNMT1、DNMT3A1、DNMT3A2、DNMT3B1、DNMT3B2、DNMT3B3、DNMT3B4、DNMT3B5、DNMT3B6、DNMT3L、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片から選択されるタンパク質を含む、実施形態222に記載のシステム又は核酸。

【0264】

224. 上記第2エフェクター部分が、転写リプレッサー部分である、実施形態118～211又は213のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0265】

225. 上記第2エフェクター部分が、上記アンカー配列又はそれに近接した配列のエピジェネティック修飾を促進する、実施形態224に記載のシステム又は核酸。

【0266】

226. 上記第2エフェクター部分が、1つ以上の内因性エピジェネティック修飾タンパク質又は1つ以上の内因性転写修飾タンパク質に結合する、実施形態223又は224に記載のシステム又は核酸。

10

20

30

40

50

【0267】

227. 上記第2エフェクター部分が、KRAB、MeCP2、HP1、RBBP4、REST、FOG1、SUZ12、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片を含む、実施形態223～226のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0268】

228. 上記第1エフェクター部分が、持続性のあるエフェクター部分であり、及び
上記第2エフェクター部分が、一過性のエフェクター部分である、
実施形態118～197、199～207、210～211、213、又は224～227のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0269】

229. 上記第1エフェクター部分が、エピジェネティック修飾部分である、実施形態228に記載のシステム又は核酸。

【0270】

230. 上記第2エフェクター部分が、転写リプレッサー部分である、実施形態227又は228に記載のシステム又は核酸。

【0271】

231. 上記第1エフェクター部分が、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ、DNAメチルトランスフェラーゼ、これらのいずれかの機能性変異体若しくは断片、又はこれらのいずれかの組み合わせを含み、及び
上記第2エフェクター部分が、転写リプレッサー又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片を含む、
実施形態227～230のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0272】

232. 上記第1エフェクター部分が、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ、DNAメチルトランスフェラーゼ、これらのいずれかの機能性変異体若しくは断片、又はこれらのいずれかの組み合わせを含み、及び
上記第2発現リプレッサーが第2エフェクター部分を含まない、
実施形態118～125、194、197、199～207、210～212、又は190のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0273】

233. 上記第1エフェクター部分が、SETDB1、SETDB2、EHMT2（即ち、G9A）、EHMT1（即ち、GLP）、SUV39H1、EZH2、EZH1、SUV39H2、SETD8、SUV420H1、SUV420H2、KDM1A（即ち、LSD1）、KDM1B（即ち、LSD2）、KDM2A、KDM2B、KDM5A、KDM5B、KDM5C、KDM5D、KDM4B、NO66、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8、HDAC9、HDAC10、HDAC11、SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6、SIRT7、SIRT8、SIRT9、MQ1、DNMT1、DNMT3A1、DNMT3A2、DNMT3B1、DNMT3B2、DNMT3B3、DNMT3B4、DNMT3B5、DNMT3B6、DNMT3L、これらのいずれかの機能性変異体若しくは断片、又はこれらのいずれかの組み合わせを含み、及び

上記第2エフェクター部分が、KRAB、MeCP2、HP1、RBBP4、REST、FOG1、SUZ12、これらのいずれかの機能性変異体若しくは断片、又はこれらのいずれかの組み合わせを含む、
実施形態118～125、199～207、210～211、213 214、又は224～231のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0274】

234. 上記第1エフェクター部分がDNAメチルトランスフェラーゼを含み、及び
上記第2エフェクター部分が転写リプレッサーを含む、
実施形態118～197、199、206～207、210～211、213、215、

10

20

30

40

50

2 2 4 ~ 2 3 1、又は 2 3 3 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0 2 7 5】

2 3 5．上記第 1 エフェクター部分が DNA メチルトランスフェラーゼを含み、及び
上記第 2 発現リプレッサーが第 2 エフェクター部分を含まない、

実施形態 1 1 8 ~ 1 2 5、1 9 4、1 9 7、2 0 0、2 0 6 ~ 2 0 7、2 1 0 ~ 2 1 2、
又は 2 3 2 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0 2 7 6】

2 3 6．上記第 1 エフェクター部分が、MQ 1、DNMT 1、DNMT 3 A 1、DNMT
3 A 2、DNMT 3 B 1、DNMT 3 B 2、DNMT 3 B 3、DNMT 3 B 4、DNMT
3 B 5、DNMT 3 B 6、DNMT 3 L、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは
断片を含む、実施形態 1 1 8 ~ 1 2 5、2 0 0、2 0 6 ~ 2 0 7、2 1 0 ~ 2 3 5 のい
ずれかに記載のシステム又は核酸。

10

【0 2 7 7】

2 3 7．上記第 2 エフェクター部分が、KRAB、MeCP2、HP1、RBBP4、R
EST、FOG1、SUZ12、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片を
含む、実施形態 1 1 8 ~ 2 1 1、2 1 4、2 2 4 ~ 2 3 4、又は 2 3 6 のいずれかに記載の
システム又は核酸。

【0 2 7 8】

2 3 8．上記第 1 エフェクター部分が、MQ 1 又はこれらのいずれかの機能性変異体若し
くは断片を含み、及び

20

上記第 2 エフェクターが、KRAB 又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片
を含む、

実施形態 1 1 8 ~ 2 1 1、1 9 9、2 0 6 ~ 2 0 7、2 1 0 ~ 2 1 1、2 1 3、2 2 4 ~
2 3 4、又は 2 3 6 ~ 2 3 7 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0 2 7 9】

2 3 9．上記第 1 エフェクター部分が、MQ 1 又はこれらのいずれかの機能性変異体若し
くは断片を含み、及び

上記第 2 発現リプレッサーが第 2 エフェクター部分を含まない、
実施形態 1 1 8 ~ 1 2 5、1 9 4、1 9 7、1 9 9 ~ 2 0 7、又は 2 1 0 ~ 2 1 2、2 2
9、2 3 2、2 3 5、又は 2 3 6 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

30

【0 2 8 0】

2 4 0．上記第 1 発現リプレッサーが、配列番号 2 2 ~ 3 7、1 2 9、1 3 3、1 3 4、
1 3 9 ~ 1 4 9、1 7 7 ~ 1 8 0、又は 1 8 3 ~ 1 8 6 のいずれかから選択されるアミノ
酸配列、又はそれと少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、又は 9 9 % の同一性の配列、又
はそれと差異のある位置が 2 0、1 9、1 8、1 7、1 6、1 5、1 4、1 3、1 2、1
1、1 0、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を含む、実施形
態 1 1 8 ~ 2 0 0 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0 2 8 1】

2 4 1．上記第 2 発現リプレッサーが、配列番号 2 2 ~ 3 7、1 2 9、1 3 3、1 3 4、
1 3 9 ~ 1 4 9、1 7 7 ~ 1 8 0、又は 1 8 3 ~ 1 8 6 のいずれかから選択されるアミノ
酸配列、又はそれと少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、又は 9 9 % の同一性の配列、又
はそれと差異のある位置が 2 0、1 9、1 8、1 7、1 6、1 5、1 4、1 3、1 2、1
1、1 0、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を含む、実施形
態 1 1 8 ~ 1 9 8、2 0 0、2 0 6 ~ 2 1 1、2 1 3 ~ 2 1 6、2 2 2 ~ 2 2 3、2 3 6
~ 2 3 7、又は 2 4 0 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

40

【0 2 8 2】

2 4 2．上記第 1 発現リプレッサーが、配列番号 3 0、1 2 9、1 3 3 のアミノ酸配列、
又はそれと少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、又は 9 9 % の同一性の配列、又はそれと
差異のある位置が 2 0、1 9、1 8、1 7、1 6、1 5、1 4、1 3、1 2、1 1、1 0
、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を含み、及び上記第 2 発

50

現リプレッサーが、配列番号 24、134、141、177、179、183、又は 185 のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 80、85、90、95、又は 99% の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を含む、実施形態 118~198、200、206~211、213~216、222~223、236~237、又は 240~241 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0283】

243. 上記第 1 発現リプレッサーが、配列番号 63 又は 130 の第 1 ヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも 80、85、90、95、又は 99% の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列によってコードされ、及び上記第 2 発現リプレッサーが、配列番号 57、189、又は 194 の第 2 ヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも 80、85、90、95、又は 99% の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列によってコードされる、実施形態 118~198、200、206~211、213~216、222~223、236~237、又は 240~242 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

10

【0284】

244. 上記第 1 及び上記第 2 リプレッサーが、配列番号 93、94、112、113、196、又は 197 の核酸配列、又はそれと少なくとも 80、85、90、95、又は 99% の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列によってコードされる、実施形態 118~198、200、206~211、213~216、222~223、236~237、又は 240~243 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

20

【0285】

245. 配列番号 91、92、121、122、181、182、187、又は 188 のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 80、85、90、95、又は 99% の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を含む、実施形態 244 に記載のシステム又は核酸。

30

【0286】

246. 上記第 1 発現リプレッサーが、N 末端から C 末端に：

(i) 第 1 核局在化シグナル、例えば、SV40 NLS；例えば、配列番号 135 に係る配列；

(ii) 第 1 ターゲティング部分、例えば、ジンクフィンガー結合ドメイン、例えば、ZF9；例えば、配列番号 13 に係る配列；

(iii) 第 1 エフェクター部分、例えば、DNA メチルトランスフェラーゼ、例えば、MQ1；例えば、配列番号 19 又は 87 に係る配列；

(iv) 第 2 核局在化シグナル、例えば、ヌクレオプラスミン NLS；例えば、配列番号 136 に係る配列

40

を含み；

及び上記第 2 発現リプレッサーが、N 末端から C 末端に：

(v) 第 3 の核局在化シグナル、例えば、SV40 NLS；例えば、配列番号 135 に係る配列；

(vi) 第 2 ターゲティング部分、例えば、ジンクフィンガー結合ドメイン、例えば、ZF3；例えば、配列番号 7 に係る配列；

(vii) 第 2 エフェクター部分、例えば、KRAB、例えば、配列番号 18 に係る配列；及び

(viii) 第 4 の核局在化シグナル、例えば、ヌクレオプラスミン NLS、例えば、

50

配列番号 136 に係る配列

を含む、実施形態 118～197、199、206～207、210～211、213、215、224～231、233～234、236～237、又は 240～244 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0287】

247. 上記第 1 発現リプレッサーが、N 末端から C 末端に：

(i) 第 1 核局在化シグナル、例えば、SV40 NLS；例えば、配列番号 135 に係る配列；

(ii) 第 1 ターゲティング部分、例えば、ジンクフィンガー結合ドメイン、例えば、ZF9；例えば、配列番号 13 に係る配列；

(iii) 第 1 エフェクター部分、例えば、DNA メチルトランスフェラーゼ、例えば、MQ1；例えば、配列番号 19 又は 87 に係る配列；

(iv) 第 2 核局在化シグナル、例えば、ヌクレオプラスミン NLS；例えば、配列番号 136 に係る配列

を含み；

及び上記第 2 発現リプレッサーが、N 末端から C 末端に：

(v) 第 3 の核局在化シグナル、例えば、SV40 NLS；例えば、配列番号 135 に係る配列；

(vi) 第 2 ターゲティング部分、例えば、ジンクフィンガー結合ドメイン、例えば、ZF54；例えば、配列番号 169 に係る配列；

(vii) 第 2 エフェクター部分、例えば、KRAB、例えば、配列番号 18 に係る配列；及び

(viii) 第 4 の核局在化シグナル、例えば、ヌクレオプラスミン NLS、例えば、配列番号 136 に係る配列

を含む、実施形態 118～197、199、206～207、210～211、213、215、224～231、233～234、236～237、又は 240～244 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0288】

248. 上記第 1 発現リプレッサーが、N 末端から C 末端に：

(i) 第 1 核局在化シグナル、例えば、SV40 NLS；例えば、配列番号 135 に係る配列；

(ii) 第 1 ターゲティング部分、例えば、ジンクフィンガー結合ドメイン、例えば、ZF9；例えば、配列番号 13 に係る配列；

(iii) 第 1 エフェクター部分、例えば、DNA メチルトランスフェラーゼ、例えば、MQ1；例えば、配列番号 19 又は 87 に係る配列；

(iv) 第 2 核局在化シグナル、例えば、ヌクレオプラスミン NLS；例えば、配列番号 136 に係る配列

を含み；

及び上記第 2 発現リプレッサーが、N 末端から C 末端に：

(v) 第 3 の核局在化シグナル、例えば、SV40 NLS；例えば、配列番号 135 に係る配列；

(vi) 第 2 ターゲティング部分、例えば、ジンクフィンガー結合ドメイン、例えば、ZF67；例えば、配列番号 171 に係る配列；

(vii) 第 2 エフェクター部分、例えば、KRAB、例えば、配列番号 18 に係る配列；及び

(viii) 第 4 の核局在化シグナル、例えば、ヌクレオプラスミン NLS、例えば、配列番号 136 に係る配列

を含む、実施形態 118～197、199、206～207、210～211、213、215、224～231、233～234、236～237、又は 240～244 のいずれかに記載のシステム又は核酸。

10

20

30

40

50

【0289】

249. 上記第1発現リプレッサー単独又は上記第2発現リプレッサー単独と比較してより高度にMYCの発現を低減することができる、実施形態118～248のいずれかに記載のシステム。

【0290】

250. 単独又は組み合わせでの配列番号22、23、25～29、31～37の発現リプレッサーのいずれかと比較してより高度にMYCの発現を低減することができる、実施形態128～194、又は242～249のいずれかに記載のシステム。

【0291】

251. 例えば、ヒト対象の、又は哺乳類モデルの、腫瘍容積を低下させることができる、実施形態118～250のいずれかに記載のシステム。

10

【0292】

252. 例えば、実施例15に記載のとおりモデルシステムにおいて、例えば、上記発現リプレッサーが5日毎に3mg/kgの用量で投与されるような治療の開始後20日目に例えば測定したとき、例えば、哺乳類モデルにおいて、腫瘍容積を化学療法剤と比較して同程度又はそれより高度に低下させることができる、実施形態128～193又は242～209のいずれかに記載のシステム。

【0293】

253. 例えば、実施例14に記載のとおりモデルシステムにおいて、例えば、上記発現リプレッサーが5日毎に6mg/kgの用量で投与されるような治療の開始後15日目に例えば測定したとき、例えば、哺乳類モデルにおいて、腫瘍容積を化学療法剤と比較してより高度に低下させることができる、実施形態128～193又は242～252のいずれかに記載のシステム。

20

【0294】

254. 例えば、治療の開始後20日目に、PBSで治療した対照と比較して、上記腫瘍容積が少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、又は60%低下する、実施形態128～193又は242～253のいずれかに記載のシステム。

【0295】

255. 上記化学療法剤が、ソラフェニブ又はシスプラチンである、実施形態254に記載のシステム。

30

【0296】

256. 小分子MYC阻害薬と比較して同程度又はそれより高度に腫瘍容積を低下させることができる、実施形態128～193又は242～253のいずれかに記載のシステム。

【0297】

257. 上記小分子MYC阻害薬がMYCi975であり、任意選択で腫瘍容積が、例えば、治療の開始後20日目に、上記MYCi975で治療した対照と比較して少なくとも約10%、20%、30%、又は40%低下する、実施形態256に記載のシステム。

【0298】

258. 治療開始時と比較して体重の減少が生じないか、又は生じる体重の減少が3%、2%、又は1%未満である、実施形態118～257のいずれかに記載のシステム。

40

【0299】

259. 上記第1ターゲティング部分が、TALEフェクタードメイン、CRISPR/Casドメイン、ジンクフィンガードメイン、tetRドメイン、メガヌクレアーゼ、又はオリゴヌクレオチドから選択される、実施形態118～258のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0300】

260. 上記第2ターゲティング部分が、TALEフェクタードメイン、CRISPR/Casドメイン、ジンクフィンガードメイン、tetRドメイン、メガヌクレアーゼ、又はオリゴヌクレオチドから選択される、実施形態118～260のいずれかに記載のシス

50

テム又は核酸。

【0301】

261. 上記第1ターゲティング部分がCRISPR/Casドメイン（例えば、第1のCRISPR/Casドメイン）を含む、実施形態118～260のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0302】

262. 上記第2ターゲティング部分が第2のCRISPR/Casドメイン（例えば、第2のCRISPR/Casドメイン）を含む、実施形態118～261のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0303】

263. i) 上記第1のCRISPR/Casドメインが第1ガイドRNAを結合し、ii) 上記第2のCRISPR/Casドメインが第2ガイドRNAを結合し、又はiii) (i)と(ii)との両方である、実施形態262に記載のシステム又は核酸。

【0304】

264. 上記第1のCRISPR/Casドメインが上記第2ガイドRNAを結合しないか、又は少なくとも10、20、50、100、1000、又は10,000nMのK_Dで結合し、及び上記第2のCRISPR/Casドメインが上記第1ガイドRNAを結合しないか、又は少なくとも10、20、50、100、1000、又は10,000nMのK_Dで結合する、実施形態262又は263に記載のシステム又は核酸。

【0305】

265. 上記第1のCRISPR/Casドメインが、上記第2のCRISPR/Casドメインと異なるアミノ酸配列を含む、実施形態260～264のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0306】

266. 上記第1又は第2のCRISPR/Casドメインが、表1から選択されるCasタンパク質又はCpf1タンパク質又はそのいずれかの変異体（例えば、突然変異体）のアミノ酸配列を含む、実施形態260～265のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0307】

267. 上記第1のCRISPR/Casドメインが、表1から選択されるCasタンパク質又はCpf1タンパク質又はそのいずれかの変異体（例えば、突然変異体）のアミノ酸配列を含み、及び上記第2のCRISPR/Casドメインが、表1から選択される異なるCasタンパク質又はCpf1タンパク質又はそのいずれかの変異体（例えば、突然変異体）のアミノ酸配列を含む、実施形態260～266のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0308】

268. 上記第1ターゲティング部分がジンクフィンガードメイン（例えば、第1ジンクフィンガードメイン）を含む、実施形態118～260のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0309】

269. 上記第2ターゲティング部分がジンクフィンガードメイン（例えば、第2ジンクフィンガードメイン）を含む、実施形態118～260又は268のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0310】

270. 上記第1ターゲティング部分が第1ジンクフィンガードメインを含み、及び上記第2ターゲティング部分が第2ジンクフィンガードメインを含む、実施形態118～261又は268～269のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0311】

271. 上記第1ジンクフィンガードメインと上記第2ジンクフィンガードメインとが同じゲノム遺伝子座を結合し、例えば、同じアミノ酸配列を有する、実施形態268～270のいずれかに記載のシステム又は核酸。

10

20

30

40

50

【0312】

272. 上記第1ジンクフィンガードメインと上記第2ジンクフィンガードメインとが異なるアミノ酸配列を有し、又は異なるゲノム遺伝子座を結合する、実施形態268～271のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0313】

273. 上記第1ジンクフィンガー分子が、少なくとも1、2、3、4、5、7、8、9、又は10個のジンクフィンガー（及び任意選択で11、10、9、8、7、6、又は5個を超えないジンクフィンガー）を含む、実施形態118～261又は267～272のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0314】

274. 上記第1ジンクフィンガー分子が、1～10、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5、1～4、1～3、1～2、2～10、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4、2～3、3～10、3～9、3～8、3～7、3～6、3～5、3～4、4～10、4～9、4～8、4～7、4～6、4～5、5～10、5～9、5～8、5～7、5～6、6～10、6～9、6～8、6～7、7～10、7～9、7～8、8～10、8～9、又は9～10個のジンクフィンガーを含む、実施形態267～273のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0315】

275. 上記第1ジンクフィンガードメインが、3個又は9個のジンクフィンガーを含む、実施形態268～274のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0316】

276. 上記第2ジンクフィンガードメインが、少なくとも1、2、3、4、5、7、8、9、又は10個のジンクフィンガー（及び任意選択で11、10、9、8、7、6、又は5個を超えないジンクフィンガー）を含む、実施形態268～275のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0317】

277. 上記第2ジンクフィンガードメインが、1～10、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5、1～4、1～3、1～2、2～10、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4、2～3、3～10、3～9、3～8、3～7、3～6、3～5、3～4、4～10、4～9、4～8、4～7、4～6、4～5、5～10、5～9、5～8、5～7、5～6、6～10、6～9、6～8、6～7、7～10、7～9、7～8、8～10、8～9、又は9～10個のジンクフィンガーを含む、実施形態268～276のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0318】

278. 上記第2ジンクフィンガードメインが、3個又は9個のジンクフィンガーを含む、実施形態268～277のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0319】

279. 上記第1ターゲティング部分がTALエフェクタードメイン（例えば、第1のTALエフェクタードメイン）を含む、実施形態118～278のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0320】

280. 上記第2ターゲティング部分がTALエフェクタードメイン（例えば、第2のTALエフェクタードメイン）を含む、実施形態118～260又は279のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0321】

281. 上記第1のTALエフェクタードメインが、少なくとも2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、又は40個の中央リピート（及び任意選択で、45、40、35、30、25、20、15、又は10個を超えない中央リピート）を含む、実施形態279又は280に記載のシステム又は核酸。

10

20

30

40

50

【0322】

282. 上記第1のTALエフェクタードメインが、2～40、5～40、10～40、15～40、20～40、25～40、30～40、35～40、2～35、5～35、10～35、15～35、20～35、25～35、30～35、2～30、5～30、10～30、15～30、20～30、25～30、2～25、5～25、10～25、15～25、20～25、2～20、5～20、10～20、15～20、2～15、5～15、10～15、2～10、5～10、又は2～5個の中央リピートを含む、実施形態279～281のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0323】

283. 上記第2のTALエフェクタードメインが、少なくとも2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、又は40個の中央リピート（及び任意選択で、45、40、35、30、25、20、15、又は10個を超えない中央リピート）を含む、実施形態279～282のいずれかに記載のシステム又は核酸。

10

【0324】

284. 上記第2のTALエフェクタードメインが、2～40、5～40、10～40、15～40、20～40、25～40、30～40、35～40、2～35、5～35、10～35、15～35、20～35、25～35、30～35、2～30、5～30、10～30、15～30、20～30、25～30、2～25、5～25、10～25、15～25、20～25、2～20、5～20、10～20、15～20、2～15、5～15、10～15、2～10、5～10、又は2～5個の中央リピートを含む、実施形態279～283のいずれかに記載のシステム又は核酸。

20

【0325】

285. 上記第1ターゲティング部分が核酸（例えば、第1核酸）を含む、実施形態118～284のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0326】

286. 上記第2ターゲティング部分が核酸（例えば、第2核酸）を含む、実施形態129～285のいずれかに記載のシステム。

【0327】

287. 上記第1ターゲティング部分がポリペプチド（例えば、第1ポリペプチド）を含む、実施形態129～286のいずれかに記載のシステム又は核酸。

30

【0328】

288. 上記第2ターゲティング部分がポリペプチド（例えば、第2ポリペプチド）を含む、実施形態129～287のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0329】

289. 上記核酸が上記ポリペプチドに共有結合的に結び付いている、実施形態287又は288に記載のシステム。

【0330】

290. 上記核酸が上記ポリペプチドと非共有結合的に結び付いている、実施形態288又は289に記載のシステム。

40

【0331】

291. 上記核酸が、上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に相補的な配列を含むか、又は上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列と比べて10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個を超えないミスマッチを含む、実施形態275～290のいずれかに記載のシステム又は核酸。

【0332】

292. 上記核酸が、上記アンカー配列又はそれに近接した配列に相補的な配列を含むか、又は上記アンカー配列又はそれに近接した配列と比べて10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個を超えないミスマッチを含む、実施形態275～291のいずれかに記載のシステム又は核酸。

50

【0333】

293. 上記核酸が、DNA、ペプチド核酸（PNA）、ペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲート、ロックド核酸（LNA）、架橋型核酸（BNA）、ポリアミド、三本鎖形成オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、tRNA、mRNA、rRNA、miRNA、gRNA、siRNA、又は他のRNA分子を含む、実施形態275～292のいずれかに記載のシステム。

【0334】

294. 上記核酸がgRNAを含む、実施形態275～293のいずれかに記載のシステム。

【0335】

295. 上記核酸が、配列番号1～4のいずれかと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を含むか、又はそれと差異のある位置が1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10箇所を超えない、実施形態275～294のいずれかに記載のシステム。

【0336】

296. 上記第1核酸が、配列番号1～4のいずれかと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を含むか、又はそれと差異のある位置が1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10箇所を超えないとともに、上記第2核酸が、配列番号1～4のいずれかと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を含むか、又はそれと差異のある位置が1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10箇所を超えない、実施形態275～295のいずれかに記載のシステム。

【0337】

297. 上記第1核酸が、配列番号96～110のいずれかと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を含むか、又はそれと差異のある位置が1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10箇所を超えないとともに、上記第2核酸が、配列番号96～110のいずれかと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を含むか、又はそれと差異のある位置が1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10箇所を超えない、実施形態275～295のいずれかに記載のシステム。

【0338】

298. 上記転写調節エレメントがプロモータを含む、実施形態118～297のいずれかに記載のシステム。

【0339】

299. 上記転写調節エレメントがエンハンサー；例えば、スーパーエンハンサーを含む、実施形態118～298のいずれかに記載のシステム。

【0340】

300. 上記アンカー配列がCTCF結合モチーフを含む、実施形態118～299のいずれかに記載のシステム。

【0341】

301. 上記アンカー配列がYY1結合モチーフを含む、実施形態118～300のいずれかに記載のシステム。

【0342】

302. 上記アンカー配列が、配列番号71又は72の配列、又はそれと比べた改変が8、7、6、5、4、3、2、又は1個を超えない配列を含む、実施形態118～301のいずれかに記載のシステム。

【0343】

303. 上記アンカー配列が、配列番号73又は74に係る配列、又はそれと比べた改変が8、7、6、5、4、3、2、又は1個を超えない配列を含む、実施形態118～302のいずれかに記載のシステム。

【0344】

10

20

30

40

50

304. 上記アンカー配列が、MYC遺伝子と同じ染色体上にある、実施形態118～303のいずれかに記載のシステム。

【0345】

305. 上記アンカー配列が、MYC遺伝子上流にある（例えば、TSSの上流又はプロモータの上流にある）、実施形態118～304のいずれかに記載のシステム。

【0346】

306. 上記アンカー配列が、MYC遺伝子から（例えば、MYC遺伝子のTSS又はプロモータから）少なくとも1、5、10、50、100、又は1000キロベース離れている、実施形態118～305のいずれかに記載のシステム。

【0347】

307. 上記アンカー配列が、MYC遺伝子から（例えば、MYC遺伝子のTSS又はプロモータから）0.1～0.5、0.1～1、0.1～5、0.1～10、0.1～50、0.1～100、0.1～500、0.1～1000、0.5～1、0.5～5、0.5～10、0.5～50、0.5～100、0.5～500、0.5～1000、1～5、1～10、1～50、1～100、1～500、1～1000、5～10、5～50、5～100、5～500、5～1000、10～50、10～100、10～500、10～1000、50～100、50～500、50～1000、100～500、100～1000、又は500～1000キロベース離れている、実施形態118～306のいずれかに記載のシステム。

【0348】

308. 上記アンカー配列がMYC遺伝子と異なる染色体上にある、実施形態118～303又は305～307のいずれかに記載のシステム。

【0349】

309. 上記第2ターゲティング部分が、内因性ポリペプチド（例えば、CTCF又はYY1）と結合に関して競合するのに十分な親和性で上記アンカー配列又は上記アンカー配列に近接した配列に結合する、実施形態118～308のいずれかに記載のシステム。

【0350】

310. 上記第1ターゲティング部分が、染色体座標128746342～128746364、128746321～128746343、又は128746525～128746547における配列、又はそれに近接した配列に結合する、実施形態118～309のいずれかに記載のシステム。

【0351】

311. 上記第1ターゲティング部分が、染色体座標128746405～128746425、128748069～128748089、129188825～129188845、又は129188822～129188842における配列又はそれに近接した配列に結合する、実施形態118～309のいずれかに記載のシステム。

【0352】

312. 上記第2ターゲティング部分が、染色体座標128748014～128748036における配列、又はそれに近接した配列に結合する、実施形態118～311のいずれかに記載のシステム。

【0353】

313. 上記第2ターゲティング部分が、染色体座標128746405～128746425、128748069～128748089、129188825～129188845、又は129188822～129188842における配列、又はそれに近接した配列に結合する、実施形態118～311のいずれかに記載のシステム。

【0354】

314. 上記第1発現リプレッサーが融合分子である、実施形態118～314のいずれかに記載のシステム。

【0355】

315. 上記第2発現リプレッサーが融合分子である、実施形態118～314のいずれ

10

20

30

40

50

かに記載のシステム。

【0356】

316. 上記第1発現リプレッサーがリンカーを含む、実施形態118～315のいずれかに記載のシステム。

【0357】

317. 上記第2発現リプレッサーがリンカーを含む、実施形態118～316のいずれかに記載のシステム。

【0358】

318. 上記第1発現リプレッサーが、第1のCRISPR/Cas分子を含む、例えば、第1の触媒として不活性なCRISPR/Casタンパク質を含むターゲティング部分と、エピジェネティック修飾部分を含むエフェクター部分とを含み；及び

10

上記第2発現リプレッサーが、第2のCRISPR/Cas分子を含む、例えば、第2の触媒として不活性なCRISPR/Casタンパク質を含むターゲティング部分と、任意選択で、転写リプレッサーを含むエフェクター部分とを含む、実施形態118～267又は285～317のいずれかに記載のシステム。

【0359】

319. 上記第1発現リプレッサーが、第1ジンクフィンガードメインを含むターゲティング部分と、エピジェネティック修飾部分を含むエフェクター部分とを含み；及び

上記第2発現リプレッサーが、第2ジンクフィンガードメインを含むターゲティング部分と、任意選択で、転写リプレッサーを含むエフェクター部分とを含む、実施形態118～260、268～278、又は285～317のいずれかに記載のシステム。

20

【0360】

320. 上記第1発現リプレッサーが、CRISPR/Cas分子を含む、例えば、触媒として不活性なCRISPR/Casタンパク質を含むターゲティング部分と、エピジェネティック修飾部分を含むエフェクター部分とを含み；及び

上記第2発現リプレッサーが、ジンクフィンガードメインを含むターゲティング部分と、任意選択で、転写リプレッサーを含むエフェクター部分とを含む、実施形態118～120、262、268、又は275～318のいずれかに記載のシステム。

30

【0361】

321. 上記第1発現リプレッサーが、ジンクフィンガードメインを含むターゲティング部分と、エピジェネティック修飾部分を含むエフェクター部分とを含み；及び

上記第2発現リプレッサーが、CRISPR/Casドメインを含む、例えば、触媒として不活性なCRISPR/Casタンパク質を含むターゲティング部分と、任意選択で、転写リプレッサーを含むエフェクター部分とを含む、実施形態118～260、268、又は275～318のいずれかに記載のシステム。

【0362】

322. 上記ジンクフィンガードメイン（例えば、上記第1又は第2ジンクフィンガードメイン）が、1～10、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5、1～4、1～3、1～2、2～10、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4、2～3、3～10、3～9、3～8、3～7、3～6、3～5、3～4、4～10、4～9、4～8、4～7、4～6、4～5、5～10、5～9、5～8、5～7、5～6、6～10、6～9、6～8、6～7、7～10、7～9、7～8、8～10、8～9、又は9～10個のジンクフィンガー、例えば、3又は9個のジンクフィンガーを含む、実施形態260、268～278、又は275～318のいずれかに記載のシステム。

40

【0363】

323. 上記エピジェネティック修飾部分が、DNAメチルトランスフェラーゼを含む、実施形態322のいずれかに記載のシステム。

【0364】

50

324. 上記エピジェネティック修飾部分が、MQ1又はその機能性変異体若しくは断片を含む、実施形態118～323のいずれかに記載のシステム。

【0365】

325. 上記第2発現リプレッサーが、転写リプレッサーを含むエフェクター部分を含む、実施形態118～324のいずれかに記載のシステム。

【0366】

326. 上記転写リプレッサーが、KRAB又はその機能性変異体若しくは断片を含む、実施形態118～323のいずれかに記載のシステム。

【0367】

327. 上記第1発現リプレッサーが、配列番号28～33又は35～37、145～149、151、152のいずれかのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態118～326のいずれかに記載のシステム。

10

【0368】

328. 上記第2発現リプレッサーが、配列番号22～27、34、139～144、150、177～180、183～186のいずれかのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態118～327のいずれかに記載のシステム。

20

【0369】

329. 上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合すると、細胞のMYCの発現が減少する、実施形態118～328のいずれかに記載のシステム。

【0370】

330. 例えば、QPCR又はELISAにより測定したとき、上記第1発現リプレッサーの非存在下での発現と比較して発現が10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は100%減少する、実施形態327に記載のシステム。

30

【0371】

331. 上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメントに結合すると、例えば、QPCR又はELISAにより測定したとき、MYCの発現が少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25日、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10回の細胞分裂の期間にわたって認め得るほどに減少する、実施形態326又は327に記載のシステム。

【0372】

332. 上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメントに結合すると、MYCの発現が、トランスフェクション後1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、又は96時間で認め得るほどに減少する、実施形態329～331のいずれかに記載のシステム。

40

【0373】

333. 上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合すると、細胞のMYCの発現が減少する、実施形態328～332のいずれかに記載のシステム。

【0374】

334. 発現が、例えば、QPCR又はELISAにより測定したとき、上記第2発現リプレッサーの非存在下での発現と比較して10、20、30、40、50、60、70、

50

80、90、又は100%減少する、実施形態333に記載のシステム。

【0375】

335. 上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合すると、例えば、QPCR又はELISAにより測定したとき、MYCの発現が少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25日、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10回の細胞分裂の期間にわたって認め得るほどに減少する、実施形態333又は334に記載のシステム。

【0376】

336. 上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合すると、MYCの発現が、トランスフェクション後1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、又は96時間で認め得るほどに減少する、実施形態334～335のいずれかに記載のシステム。

【0377】

337. 上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合すると、細胞のMYCの発現が減少する、実施形態329～336のいずれかに記載のシステム。

【0378】

338. 上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合すると、MYCの発現が、トランスフェクション後1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、又は96時間で認め得るほどに減少する、実施形態329～337のいずれかに記載のシステム。

【0379】

339. 例えば、QPCR又はELISAにより測定したとき、上記第1及び第2発現リプレッサーの非存在下での発現と比較して発現が10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は100%減少する、実施形態337又は338に記載のシステム。

【0380】

340. 上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合すると、例えば、QPCR又はELISAにより測定したとき、MYCの発現が少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12時間、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25日、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10回の細胞分裂の期間にわたって認め得るほどに減少する、実施形態329～339のいずれかに記載のシステム。

【0381】

341. 上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合することによって生じる発現の減少が、個別に上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合すること又は上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合することによって生じる発現の減少よりも大きい、実施形態329～340のいずれかに記載のシステム。

【0382】

342. 上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結

10

20

30

40

50

合すると、例えば、QPCR又はELISAにより測定したとき、個別に上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合すること又は上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合することのいずれと比べても、発現が1.05×（即ち、1.05倍）、1.1×、1.15×、1.2×、1.25×、1.3×、1.35×、1.4×、1.45×、1.5×、1.6×、1.7×、1.8×、1.9×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、20×、50×、又は100×大きく減少する、実施形態341に記載のシステム。

【0383】

343. 上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合することによって生じる発現の減少が、個別に上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合すること又は上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合することによって生じる発現の減少と比べて長い時間にわたって（例えば、より多くの時間数、日数、又は細胞分裂回数にわたって）持続する、実施形態329～342のいずれかに記載のシステム。

10

【0384】

344. 上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合すると、例えば、QPCR又はELISAにより測定したとき、個別に上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合すること又は上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合することのいずれと比べても、発現が1.05×（即ち、1.05倍）、1.1×、1.15×、1.2×、1.25×、1.3×、1.35×、1.4×、1.45×、1.5×、1.6×、1.7×、1.8×、1.9×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、20×、50×、又は100×長く（例えば、時間数、日数、又は細胞分裂回数で測定したとき）減少する、実施形態343に記載のシステム。

20

【0385】

345. 上記第1発現リプレッサーが上記プロモータ又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第2発現リプレッサーが上記スーパーエンハンサー又はそれに近接した配列に結合すると、例えば、QPCR又はELISAにより測定したとき、MYCの発現が少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12時間、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25日、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10回の細胞分裂の期間にわたって認め得るほどに減少する、実施形態329～344のいずれかに記載のシステム。

30

【0386】

346. 上記第1発現リプレッサーが上記プロモータ又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第2発現リプレッサーが上記スーパーエンハンサー又はそれに近接した配列に結合することによって生じる発現の減少が、個別に上記第1発現リプレッサーが上記プロモータ又はそれに近接した配列に結合すること又は上記第2発現リプレッサーが上記スーパーエンハンサー又はそれに近接した配列に結合することによって生じる発現の減少よりも大きい、実施形態329～345のいずれかに記載のシステム。

40

【0387】

347. 上記第1発現リプレッサーが上記プロモータ又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第2発現リプレッサーが上記スーパーエンハンサー又はそれに近接した配列に結合すると、例えば、QPCR又はELISAにより測定したとき、個別に上記第1発現リプレッサーが上記プロモータ又はそれに近接した配列に結合すること又は上記第2発現リプレッサーが上記スーパーエンハンサー又はそれに近接した配列に結合することのいずれと比べても、発現が1.05×（即ち、1.05倍）、1.1×、1.15×、1.2×、1.25×、1.3×、1.35×、1.4×、1.45×、1.5×、1.6×、1

50

・ 7 ×、1. 8 ×、1. 9 ×、2 ×、3 ×、4 ×、5 ×、6 ×、7 ×、8 ×、9 ×、1 0 ×、2 0 ×、5 0 ×、又は 1 0 0 × 大きく減少する、実施形態 3 4 6 に記載のシステム。

【0388】

3 4 8. 上記第 1 発現リプレッサーが上記プロモータ又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第 2 発現リプレッサーが上記スーパーエンハンサー又はそれに近接した配列に結合することによって生じる発現の減少が、個別に上記第 1 発現リプレッサーが上記プロモータ又はそれに近接した配列に結合すること又は上記第 2 発現リプレッサーが上記スーパーエンハンサー又はそれに近接した配列に結合することによって生じる発現の減少と比べて長い時間にわたって（例えば、より多くの時間数、日数、又は細胞分裂回数にわたって）持続する、実施形態 3 2 9 ~ 3 4 7 のいずれかに記載のシステム。

10

【0389】

3 4 9. 上記第 1 発現リプレッサーが上記プロモータ又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第 2 発現リプレッサーが上記スーパーエンハンサー又はそれに近接した配列に結合すると、例えば、Q P C R 又は E L I S A により測定したとき、個別に上記第 1 発現リプレッサーが上記プロモータ又はそれに近接した配列に結合すること又は上記第 2 発現リプレッサーが上記スーパーエンハンサー又はそれに近接した配列に結合することのいずれと比べても、発現が 1. 0 5 ×（即ち、1. 0 5 倍）、1. 1 ×、1. 1 5 ×、1. 2 ×、1. 2 5 ×、1. 3 ×、1. 3 5 ×、1. 4 ×、1. 4 5 ×、1. 5 ×、1. 6 ×、1. 7 ×、1. 8 ×、1. 9 ×、2 ×、3 ×、4 ×、5 ×、6 ×、7 ×、8 ×、9 ×、1 0 ×、2 0 ×、5 0 ×、又は 1 0 0 × 長く（例えば、時間数、日数、又は細胞分裂回数で測定したとき）減少する、実施形態 3 4 8 に記載のシステム。

20

【0390】

3 5 0. 発現が、無限に（例えば、実験的に測定できるよりも長い期間にわたって）認め得るほどに減少する、実施形態 3 2 9 ~ 3 4 9 のいずれかに記載のシステム。

【0391】

3 5 1. 上記第 1 発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合すると、上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列を含む細胞の生存能力が減少する、実施形態 3 2 9 ~ 3 5 0 のいずれかに記載のシステム。

【0392】

3 5 2. 複数の細胞を上記第 1 発現リプレッサー又は上記第 1 発現リプレッサーをコードする核酸と接触させると、上記複数の細胞の生存能力が減少し、任意選択で、上記複数の細胞が、癌性及び非癌性細胞及び／又は感染細胞及び非感染細胞を含む、実施形態 3 2 9 ~ 3 5 1 のいずれかに記載のシステム。

30

【0393】

3 5 3. 例えば、C e l l T i t e r G l o によって測定したとき、生存能力が、上記第 1 発現リプレッサーの非存在下での生存能力と比較して 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、又は 1 0 0 % 減少する、実施形態 3 5 2 に記載のシステム。

【0394】

3 5 4. 上記第 1 発現リプレッサーを投与することにより、標的細胞（例えば、癌細胞）の少なくとも 5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、1 2 %、1 5 %、1 7 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 5 % にアポトーシスが起こる、実施形態 3 2 9 ~ 3 5 3 のいずれかに記載のシステム。

40

【0395】

3 5 5. 上記第 2 発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合すると、上記アンカー配列又はそれに近接した配列を含む細胞の生存能力が減少する、実施形態 3 2 9 ~ 3 5 4 のいずれかに記載のシステム。

【0396】

3 5 6. 複数の細胞を上記第 2 発現リプレッサー又は上記第 2 発現リプレッサーをコードする核酸と接触させると、上記複数の細胞の生存能力が減少する、実施形態 3 2 9 ~ 3 5 5 のいずれかに記載のシステム。

50

【0397】

357. 上記第2発現リプレッサーが上記スーパーエンハンサー又はそれに近接した配列に結合すると、上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列を含む細胞の生存能力が減少する、実施形態329～356のいずれかに記載のシステム。

【0398】

358. 複数の細胞を上記第2発現リプレッサー又は上記第1発現リプレッサーをコードする核酸と接触させると、上記複数の細胞の生存能力が減少し、任意選択で、上記複数の細胞が、癌性及び非癌性細胞及び／又は感染細胞及び非感染細胞を含む、実施形態329～357のいずれかに記載のシステム。

【0399】

359. 例えば、Cell Titer Gloによって測定したとき、生存能力が、上記第2発現リプレッサーの非存在下での生存能力と比較して10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は100%減少する、実施形態358に記載のシステム。

【0400】

360. 上記第2発現リプレッサーを投与することにより、標的細胞（例えば、癌細胞）の少なくとも5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、75%にアポトーシスが起こる、実施形態329～359のいずれかに記載のシステム。

【0401】

361. 上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合すると、上記アンカー配列又はそれに近接した配列を含む細胞の生存能力が減少する、実施形態329～360のいずれかに記載のシステム。

【0402】

362. 上記第1発現リプレッサーが上記プロモータ又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第2発現リプレッサーが上記スーパーエンハンサー又はそれに近接した配列に結合すると、細胞の生存能力が減少する、実施形態329～361のいずれかに記載のシステム。

【0403】

363. 複数の細胞を上記システム又は上記システムをコードする核酸と接触させると、上記複数の細胞の生存能力が減少する、実施形態329～362のいずれかに記載のシステム。

【0404】

364. 例えば、Cell Titer Gloによって測定したとき、生存能力が、上記システムの非存在下での生存能力と比較して10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は100%減少する、実施形態329～363に記載のシステム。

【0405】

365. 上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合することによって生じる生存能力の減少が、個別に上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合すること又は上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合することによって生じる生存能力の減少よりも大きい、実施形態329～364のいずれかに記載のシステム。

【0406】

366. 上記第1発現リプレッサーが上記プロモータ又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第2発現リプレッサーが上記スーパーエンハンサー又はそれに近接した配列に結合することによって生じる生存能力の減少が、個別に上記第1発現リプレッサーが上記プロモータ又はそれに近接した配列に結合すること又は上記第2発現リプレッサーが上記スーパーエンハンサー又はそれに近接した配列に結合することによって生じる生存能力の減少よりも大きい、実施形態329～365のいずれかに記載のシステム。

10

20

30

40

50

【0407】

367. 上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合すると、例えば、CellTiter Gloによって測定したとき、個別に上記第1発現リプレッサーが上記転写調節エレメント又はそれに近接した配列に結合すること又は上記第2発現リプレッサーが上記アンカー配列又はそれに近接した配列に結合することのいずれと比べても、生存能力が1.05×（即ち、1.05倍）、1.1×、1.15×、1.2×、1.25×、1.3×、1.35×、1.4×、1.45×、1.5×、1.6×、1.7×、1.8×、1.9×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、20×、50×、又は100×大きく減少する、実施形態366に記載のシステム。

10

【0408】

368. 上記第1発現リプレッサーが上記プロモータ又はそれに近接した配列に結合し、及び上記第2発現リプレッサーが上記スーパーエンハンサー又はそれに近接した配列に結合すると、例えば、CellTiter Gloによって測定したとき、個別に上記第1発現リプレッサーが上記プロモータ又はそれに近接した配列に結合すること又は上記第2発現リプレッサーが上記スーパーエンハンサー又はそれに近接した配列に結合することのいずれと比べても、生存能力が1.05×（即ち、1.05倍）、1.1×、1.15×、1.2×、1.25×、1.3×、1.35×、1.4×、1.45×、1.5×、1.6×、1.7×、1.8×、1.9×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、20×、50×、又は100×大きく減少する、実施形態366又は367に記載のシステム。

20

【0409】

369. 上記第1発現リプレッサー及び上記第2発現リプレッサーを投与することにより、標的細胞（例えば、癌細胞）の少なくとも5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、75%にアポトーシスが起こる、実施形態329～368のいずれかに記載のシステム。

【0410】

370. 上記複数の細胞が、複数の癌細胞及び複数の非癌細胞を含む、実施形態329～369に記載のシステム。

30

【0411】

371. 上記複数の細胞を上記システム又は上記システムをコードする核酸と接触させると、上記複数の癌細胞の生存能力が、それによる上記複数の非癌細胞の生存能力の減少よりも大きく減少する、実施形態370に記載のシステム。

【0412】

372. 上記複数の細胞を上記システム又は上記システムをコードする核酸と接触させると、上記複数の癌細胞の生存能力が、それによる上記複数の非癌細胞の生存能力の減少の1.05×（即ち、1.05倍）、1.1×、1.15×、1.2×、1.25×、1.3×、1.35×、1.4×、1.45×、1.5×、1.6×、1.7×、1.8×、1.9×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、20×、50×、又は100×大きく減少する、実施形態370又は371に記載のシステム。

40

【0413】

373. 例えば、実施例29に従いアッセイしたとき、非癌細胞（例えば、初代ヘパトサイト）の生存能力が5、10、15、又は20%を超えて低下しない、いずれかの先行する実施形態に記載の発現リプレッサー又はシステム。

【0414】

374. 生存能力が、上記細胞を上記発現リプレッサー又はシステムと接触させてから72時間後にアッセイされる、実施形態320に記載の発現リプレッサー又はシステム。

【0415】

50

375. 上記アッセイが、上記非癌細胞を2.5、2、1.25、1、0.6、又は0.5 µg/mlの上記発現リプレッサー又はシステムと接触させることを含む、実施形態374に記載の発現リプレッサー又はシステム。

【0416】

376. 複数の感染細胞及び複数の非感染細胞と接触させたとき、それが上記複数の非感染細胞の生存能力を低減するよりも大きく上記複数の感染細胞の生存能力を低減し、及び／又はそれが上記複数の非癌性細胞の生存能力を低減するよりも大きく上記複数の癌性細胞の生存能力を低減する、実施形態352～375のいずれかに記載のシステム。

【0417】

377. 上記癌が、肝細胞癌(HCC)、線維層板肝細胞癌(FHCC)、胆管癌、血管肉腫、二次肝癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、腺癌、小細胞肺癌(SCLC)、大細胞(未分化)癌、トリプルネガティブ乳癌、胃腺癌、子宮内膜癌、又は膀胱癌である、実施形態352～376のいずれかに記載のシステム。

10

【0418】

378. 上記癌細胞が、肺癌細胞、胃癌細胞、消化管癌細胞、結腸直腸癌細胞、膀胱細胞、又は肝癌細胞である、実施形態352～377のいずれかに記載のシステム。

【0419】

379. 上記細胞が、ヒト肺上皮細胞又はヒト肺線維芽細胞である、実施形態352～378のいずれかに記載のシステム。

【0420】

380. 上記感染が、ウイルス感染である、実施形態352～379のいずれかに記載のシステム。

20

【0421】

381. 上記ウイルス感染が、肝炎、例えば、B型肝炎である、実施形態380に記載の発現リプレッサー。

【0422】

382. 上記感染細胞が、ヒトヘパトサイトである、実施形態378～381のいずれかに記載のシステム。

【0423】

383. 上記ウイルス感染が、慢性感染である、実施形態352～382のいずれかに記載のシステム。

30

【0424】

384. 実施形態118～383のいずれかに記載のシステムの上記第1発現リプレッサーをコードする配列を含む第1アミノ酸領域と；

実施形態118～383のいずれかに記載のシステムに記載の上記第2発現リプレッサーをコードする配列を含む第2アミノ酸領域とを含む融合タンパク質。

【0425】

385. 第3のアミノ酸領域であって、上記第1アミノ酸領域と上記第2アミノ酸領域との間に位置する第3のアミノ酸領域を含む、実施形態384に記載の融合タンパク質。

40

【0426】

386. 上記第3のアミノ酸領域が、プロテアーゼ切断ペプチド配列、例えば、自己切断型ペプチド配列、例えば、T2A自己切断型ペプチド配列、例えば、配列番号120に係る配列を含む、実施形態385に記載の融合タンパク質。

【0427】

387. 上記第3のアミノ酸領域が、プロテアーゼ切断ペプチド配列、例えば、自己切断型ペプチド配列、例えば、タンデム2Aペプチド配列、例えば、tPT2A配列、例えば、配列番号124に係る配列を含む、実施形態386に記載の融合タンパク質。

【0428】

388. 上記ペプチド配列が、T2Aペプチド配列及びP2Aペプチド配列を含む、実施

50

形態 385 に記載の融合タンパク質。

【0429】

389. 上記第1発現リプレッサーが、配列番号30又は129に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列を含み；及び

上記第2発現リプレッサーが、配列番号24又は142に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列を含む、

実施形態384～388のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0430】

390. 上記第1発現リプレッサーが、配列番号30又は129に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列を含み；及び

上記第2発現リプレッサーが、配列番号177又は183に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列を含む、

実施形態384～388のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0431】

391. 上記第1発現リプレッサーが、配列番号30又は129に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列を含み；及び

上記第2発現リプレッサーが、配列番号179又は185に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列を含む、

実施形態384～388のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0432】

392. 配列番号91、92、121、又は122のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態384～391のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0433】

393. 配列番号181、182、187、又は188のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態384～392のいずれかに記載の融合タンパク質。

【0434】

394. 実施形態118～393のいずれかに記載のシステムをコードする配列を含む核酸。

【0435】

395. 実施形態394に記載のシステムをコードする配列を含む核酸。

【0436】

396. 実施形態118～393のいずれかに記載のシステムの上記第1発現リプレッサーをコードする配列を含む第1領域；及び

実施形態118～393のいずれかに記載のシステムの上記第2発現リプレッサーをコードする配列を含む第2領域

を含む、実施形態394又は395に記載の核酸。

【0437】

397. 第3の領域であって、上記第1領域と上記第2領域との間に位置する第3の領域を含む、実施形態394～396のいずれかに記載の核酸。

【0438】

398. 上記第3の領域が、リボソームスキッピング配列をコードする、実施形態394～397のいずれかに記載の核酸。

【0439】

399. 上記第3の領域が、tP T 2 A ペプチド配列、例えば、配列番号124に係る配

10

20

30

40

50

列をコードする、実施形態 397 又は 398 に記載の核酸。

【0440】

400. 上記第3の領域が、プロテアーゼ切断ペプチド配列、例えば、自己切断型ペプチド配列、例えば、T2A自己切断型ペプチド配列、例えば、配列番号95に係る配列をコードする、実施形態397～399のいずれかに記載の核酸。

【0441】

401. 上記第3の領域が、プロテアーゼ切断ペプチド配列、例えば、自己切断型ペプチド配列、例えば、タンデム2Aペプチド配列、例えば、tPT2Aペプチド配列、例えば、配列番号124に係る配列をコードする、実施形態397～400のいずれかに記載の核酸。

10

【0442】

402. 上記第1発現リプレッサーが、配列番号30、129に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列を含み；及び

上記第2発現リプレッサーが、配列番号24、142に係るアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列を含む、
実施形態394～401のいずれかに記載の核酸。

【0443】

403. 上記第1発現リプレッサーが、配列番号30、129に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列を含み；及び

上記第2発現リプレッサーが、配列番号177、179、183、又は185に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列を含む、
実施形態394～401のいずれかに記載の核酸。

20

【0444】

404. 配列番号91、92、121、122のアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列をコードする、実施形態394～403のいずれかに記載の核酸。

【0445】

405. 配列番号181、182、187、188のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列をコードする、実施形態394～404のいずれかに記載の核酸。

30

【0446】

406. 配列番号93、94、112、又は113のヌクレオチド配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態394～405のいずれかに記載の核酸。

40

【0447】

407. 配列番号196、197のヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む、実施形態394～406のいずれかに記載の核酸。

【0448】

408. 実施形態1～407のいずれかに記載の発現リプレッサー又は発現リプレッサーシステムをコードする配列を含む核酸。

50

【0449】

409. RNA、例えば、mRNAである、実施形態394～408のいずれかに記載の核酸。

【0450】

410. 例えば、上記RNAの上記5'末端に、例えば、逆5'→5'三リン酸塩結合で連結した、N7-メチル化グアノシンを含む、実施形態394～409のいずれかに記載の核酸。

【0451】

411. 5'UTRを含む、実施形態394～410のいずれかに記載の核酸。

【0452】

412. 例えば、上記5'UTRと上記発現リプレッサーをコードする上記配列との間に、コザック配列を含む、実施形態394～411のいずれかに記載の核酸。

【0453】

413. 実施形態118～393のいずれかに記載のシステムの上記第1発現リプレッサーをコードする配列を含む第1核酸と；

第2発現リプレッサーであって、例えば、実施形態118～393のいずれかに記載のシステムの第2発現リプレッサーをコードする配列を含む第2核酸とを含むシステム。

【0454】

414. 上記第1核酸が、配列番号63、130のヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有し、及び配列番号57のヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する上記第2核酸、実施形態413に記載のシステム。

【0455】

415. 上記第1核酸が、配列番号63、130のヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有し、及び配列番号189、又は194のヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する上記第2核酸、実施形態414に記載のシステム。

【0456】

416. 上記第1核酸が、配列番号189、194のヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有し、及び配列番号63、130のヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、又は99%の同一性の配列、又はそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を有する上記第2核酸、実施形態415に記載のシステム。

【0457】

417. 上記核酸がmRNAを含む、実施形態394～416のいずれかに記載の核酸又はシステム。

【0458】

418. 先行する実施形態のいずれかに記載のシステム、又は発現リプレッサーをコード

10

20

30

40

50

する上記核酸を含むベクター。

【0459】

419. 先行する実施形態のいずれかに記載のシステム、核酸、mRNA、又はベクターを含む脂質ナノ粒子。

【0460】

420. イオン化可能な脂質、例えば、カチオン性脂質、例えば、MC3、SSOPを含む、実施形態419に記載の脂質ナノ粒子。

【0461】

421. 中性脂質、イオン化可能なアミン含有脂質、生分解性アルキン(alkyn)脂質、ステロイド類、リン脂質、多価不飽和脂質、構造脂質(例えば、ステロール類)、PEG、コレステロール、又はポリマーコンジュゲート脂質のうちの1つ以上をさらに含む、実施形態419又は420に記載の脂質ナノ粒子。

10

【0462】

422. 先行する実施形態のいずれかに記載の発現リプレッサー、システム、核酸、ベクター、又は脂質ナノ粒子を含む反応混合物。

【0463】

423. 細胞をさらに含む、実施形態422に記載の反応混合物。

【0464】

424. いずれかの先行する実施形態に記載の発現リプレッサー、システム、核酸、ベクター、脂質ナノ粒子又は反応混合物を含む医薬組成物。

20

【0465】

425. 細胞のMYC遺伝子の発現を低減する方法であって、

上記細胞(例えば、癌細胞)を、実施形態1~424のいずれかに記載の発現リプレッサー、システム、前記システム又は発現リプレッサーをコードする1つ以上の核酸、ベクター、脂質ナノ粒子、又は医薬組成物と接触させること

を含み、
それにより上記細胞のMYC遺伝子の発現を低減する方法。

【0466】

426. 必要としている対象の癌を治療する方法であって、

実施形態1~424のいずれかに記載の発現リプレッサー、システム、核酸、ベクター、脂質ナノ粒子、又は医薬組成物を上記対象に投与すること

を含み、

それにより上記対象の上記癌を治療する方法。

30

【0467】

427. 必要としている対象の腫瘍成長を低下させる方法であって、

実施形態1~424のいずれかに記載の発現リプレッサー、システム、核酸、ベクター、脂質ナノ粒子、又は医薬組成物を上記対象に投与すること

を含み、

それにより上記対象の腫瘍サイズを低下させる方法。

【0468】

428. 腫瘍成長の上記低下が、治療開始時の腫瘍容積と比較した腫瘍容積の低下を含む、実施形態427に記載の方法。

40

【0469】

429. 上記対象の腫瘍成長の上記低下が、未治療対象と比較して大きい、実施形態428に記載の方法。

【0470】

430. キナーゼ阻害薬、例えば、ソラフェニブに対する癌の感受性を増加させる、又は回復させる方法であって、上記癌を有する対象に、本明細書に記載の発現リプレッサー又はシステムを投与することを含む方法。

【0471】

50

431. 上記発現リプレッサー又はシステムを投与すると、例えば、癌細胞生存能力アッセイ、例えば、実施例38に係るアッセイにおいて、上記キナーゼ阻害薬のIC₅₀が10%、20%、30%、又は40%下がる、実施形態430に記載の方法。

【0472】

432. 上記キナーゼ阻害薬が、VEGFR、PDGFR、又はRAFキナーゼのうちの1つ以上（例えば、その全て）を阻害する、実施形態430又は431に記載の方法。

【0473】

433. プロモドメイン阻害薬、例えば、BET阻害薬、例えば、JQ1に対する癌の感受性を増加させる、又は回復させる方法であって、上記癌を有する対象に、本明細書に記載の（例えば、実施形態1～423のいずれかの）発現リプレッサー、システム、又は核酸を投与することを含み、任意選択で、上記発現リプレッサー又はシステムを投与すると、例えば、癌細胞生存能力アッセイ、例えば、実施例39に係るアッセイにおいて、上記プロモドメイン阻害薬のIC₅₀が10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は95%下がる、方法。

10

【0474】

434. 上記プロモドメイン阻害薬が、JQ1、BET672、又はビラプレシブであるか、又はそれを含む、実施形態433に記載の方法。

【0475】

435. MEK阻害薬、例えば、トラメチニブに対する癌の感受性を増加させる、又は回復させる方法であって、上記癌を有する対象に、本明細書に記載の（例えば、実施形態1～423のいずれかの）発現リプレッサー、システム、又は核酸を投与することを含み、任意選択で、上記発現リプレッサー又はシステムを投与すると、例えば、癌細胞生存能力アッセイ、例えば、実施例51に係るアッセイにおいて、上記MEK阻害薬のIC₅₀が10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は95%下がる、方法。

20

【0476】

436. 上記対象の腫瘍成長の上記低下が、上記対象が化学療法剤又は小分子MYC阻害薬で治療されたときの腫瘍サイズ低下よりも大きい、又はそれと同程度である、実施形態427～435のいずれかに記載の方法。

【0477】

30

437. 上記化学療法剤が、ソラフェニブ又はシスプラチンである、実施形態436に記載の方法。

【0478】

438. 上記小分子MYC阻害薬が、MYCi975である、実施形態437に記載の方法。

【0479】

439. 必要としている対象の腫瘍サイズを低下させる方法であって、

1～424の発現リプレッサー、システム、核酸、ベクター、脂質ナノ粒子、又は医薬組成物を上記対象に投与することを含み、腫瘍サイズの上記低下が、上記対象が化学療法剤で治療されたときの腫瘍サイズ低下よりも大きい、又はそれと同程度である、方法。

40

【0480】

440. 上記化学療法剤が、ソラフェニブ又はシスプラチンである、439の方法。

【0481】

441. 化学療法剤又は小分子MYC阻害薬で治療されたときと比較して上記対象にいかなる重大な副作用も起こらない、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

【0482】

442. 上記化学療法剤が、ソラフェニブ又はシスプラチンである、実施形態436～441のいずれかに記載の方法。

【0483】

443. 上記小分子MYC阻害薬が、MYCi975である、実施形態442に記載の方

50

法。

【0484】

444. 上記癌が、ステージⅠ、ステージⅡ、ステージⅢ、又はステージⅣの癌である、実施形態426～443のいずれかに記載の方法。

【0485】

445. 上記対象の体重が治療前と治療後とでほぼ同じままである、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

【0486】

446. 上記対象に体重の減少が起こらないか、又は上記対象に起こる体重の減少が、治療開始時と比較して3%、2%、又は1%未満である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

10

【0487】

447. 上記対象に、治療前の上記対象の体重と比較して、治療後の体重の低下又は増加が起こらない、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

【0488】

448. 必要としている対象の肝疾患を治療する方法であって、

上記対象に、発現リプレッサーであって、MYC遺伝子座（例えば、MYCの転写領域、MYCプロモータ、又はMYC遺伝子を含むアンカー配列媒介接合部（ASMC）のアンカー配列又は上記アンカー配列に近接した配列）を結合するターゲティング部分と、任意選択で、エフェクター部分、例えば、本明細書に記載のエフェクター部分とを含む発現リプレッサーを投与すること

20

を含み；

それにより上記対象の上記肝疾患を治療する方法。

【0489】

449. 上記対象に、第2発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCを含むアンカー配列媒介接合部（ASMC）のアンカー配列に結合するターゲティング部分と、任意選択で、第2エフェクター部分、例えば、本明細書に記載のエフェクター部分；例えば、KRABとを含む第2発現リプレッサーを投与することをさらに含み；

それにより上記対象の上記肝疾患を治療する、実施形態447に記載の方法。

【0490】

450. 必要としている対象の肝疾患を治療する方法であって、

実施形態1～424のいずれかに記載の発現リプレッサー、システム、核酸、ベクター、脂質ナノ粒子、又は医薬組成物を上記対象に投与すること

を含み、

それにより上記対象の上記肝疾患を治療する方法。

【0491】

451. 上記肝疾患が、慢性肝疾患である、実施形態450に記載の方法。

【0492】

452. 上記肝疾患が、ウイルス関連又はアルコール関連である、実施形態450又は451に記載の方法。

40

【0493】

453. 上記肝疾患が、肝炎又は肝細胞癌である、実施形態450～452のいずれかに記載の方法。

【0494】

454. 上記肝細胞癌が、HCC亜型S1、HCC亜型S2、又はHCC亜型S3から選択される、実施形態453に記載の方法。

【0495】

455. 上記肝細胞癌が、HCC S1である、実施形態453又は454に記載の方法。

【0496】

456. 上記肝細胞癌が、HCC S2である、実施形態453又は454に記載の方法。

50

【0497】

457. 上記肝疾患がB型肝炎ウイルス又はC型肝炎ウイルスによって引き起こされる、実施形態450～456のいずれかに記載の方法。

【0498】

458. 必要としている対象の肺疾患を治療する方法であって、

上記対象に、発現リプレッサーであって、MYC遺伝子座（例えば、MYCの転写領域、MYCプロモータ、又はMYC遺伝子を含むアンカー配列媒介接合部（ASMC）のアンカー配列又は上記アンカー配列に近接した配列）を結合するターゲティング部分と、任意選択で、エフェクター部分、例えば、本明細書に記載のエフェクター部分とを含む発現リプレッサーを投与すること

を含み；

それにより上記対象の上記肺疾患を治療する方法。

【0499】

459. 上記対象に、第2発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCのスーパーエンハンサー領域に位置するゲノム遺伝子座を結合するターゲティング部分と、任意選択で、第2エフェクター部分、例えば、本明細書に記載のエフェクター部分；例えば、KRABとを含む第2発現リプレッサーを投与すること

をさらに含み；

それにより上記対象の上記肺疾患を治療する、実施形態458に記載の方法。

【0500】

460. 必要としている対象の肺疾患を治療する方法であって、

実施形態1～424のいずれかに記載の発現リプレッサー、システム、核酸、ベクター、脂質ナノ粒子、又は医薬組成物を上記対象に投与すること

を含み、

それにより上記対象の上記肺疾患を治療する方法。

【0501】

461. 上記肺疾患が、癌、例えば、肺癌、例えば、肺癌腫、例えば、非小細胞肺癌腫又は小細胞肺癌腫である、実施形態459又は460に記載の方法。

【0502】

462. 接触させること又は投与することが、対象への静脈内投与を含む、実施形態425～461のいずれかに記載の方法。

【0503】

463. 接触させること又は投与することが、腫瘍内送達（例えば、注射）を含む、実施形態425～462のいずれかに記載の方法。

【0504】

464. 上記癌が、参照レベルと比べた（例えば、参照細胞、例えば、上記対象の他の点では同様の非癌性細胞のMYC発現と比べた）MYC発現の増加によって特徴付けられる、実施形態425～463のいずれかに記載の方法。

【0505】

465. 上記癌が、MYC遺伝子の一部又は全部の重複によって特徴付けられる、実施形態426～464のいずれかに記載の方法。

【0506】

466. 上記癌が、結腸直腸癌、乳癌、AML、前立腺癌、神経芽細胞腫、肺癌、子宮内膜癌、肝癌、リンパ腫（例えば、バーキットリンパ腫）、子宮頸癌、又は胃癌から選択される、実施形態426～465のいずれかに記載の方法。

【0507】

467. 上記癌が、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）分泌癌である、実施形態426～466のいずれかに記載の方法。

【0508】

468. 上記癌が、肝細胞癌である、実施形態426～467のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0509】

469. 上記癌が、不応性の癌、例えば、不応性の肝細胞癌である、実施形態426～468のいずれかに記載の方法。

【0510】

470. 上記癌が、非小細胞肺癌腫又は小細胞肺癌腫である、実施形態426～469のいずれかに記載の方法。

【0511】

471. 上記癌が、 α フェトプロテイン (AFP) を (例えば、参照細胞、例えば、上記対象の他の点では同様の非癌性細胞のAFP発現と比べて) 過剰発現する、実施形態426～470のいずれかに記載の方法。

10

【0512】

472. 上記癌の細胞が、例えば、MYC遺伝子を含むか、又はMYC遺伝子を含む上記アンカー配列媒介接合部を含むスーパーエンハンサーの存在によって特徴付けられ、任意選択で上記癌が、肝癌、結腸直腸癌、乳癌、AML、前立腺癌、神経芽細胞腫、肺癌、又は子宮内膜癌から選択される、実施形態431～471のいずれかに記載の方法。

【0513】

472. 上記発現リプレッサー (例えば、上記第2発現リプレッサー) がMYC遺伝子を含むアンカー配列媒介接合部 (ASMC) のアンカー配列に結合するか、又は上記アンカー配列に近接した配列に結合する、実施形態471に記載の方法。

20

【0514】

473. 上記癌の細胞が、MYC遺伝子を含むか、又はMYC遺伝子を含む上記アンカー配列媒介接合部を含むスーパーエンハンサーが存在しないことによって特徴付けられる、実施形態426～472のいずれかに記載の方法。

【0515】

474. 上記発現リプレッサー (例えば、上記第1発現リプレッサー) がMYCプロモータを結合する、実施形態473に記載の方法。

【0516】

475. 上記癌が、MYC遺伝子を含むか、又はMYC遺伝子を含む上記アンカー配列媒介接合部を含むスーパーエンハンサーを含む細胞と、MYC遺伝子を含むか、又はMYC遺伝子を含む上記アンカー配列媒介接合部を含むスーパーエンハンサーを含まない細胞とを含む、実施形態426～474のいずれかに記載の方法。

30

【0517】

476. 上記癌が、参照レベルと比べた (例えば、参照細胞、例えば、上記対象の他の点では同様の非癌性細胞のMYC発現と比べた) MYC発現の増加によって特徴付けられる細胞と、参照レベルと比べた (例えば、参照細胞、例えば、上記対象の他の点では同様の非癌性細胞のMYC発現と比べた) MYC発現の増加によって特徴付けられない細胞、例えば、正常なMYC発現を有する細胞とを含む、実施形態426～475のいずれかに記載の方法。

【0518】

477. 上記発現リプレッサー、システム、核酸、ベクター、脂質ナノ粒子、又は医薬組成物が、単剤療法として投与される、実施形態426～476のいずれかに記載の方法。

40

【0519】

478. 上記発現リプレッサー、システム、核酸、ベクター、脂質ナノ粒子、又は医薬組成物の複数の用量、例えば、少なくとも2、3、4、5、又は6用量を上記対象に投与することを含む、実施形態426～477のいずれかに記載の方法。

【0520】

479. 上記発現リプレッサー、システム、核酸、ベクター、脂質ナノ粒子、又は医薬組成物の複数の用量を上記対象に5日間隔で投与することを含む、実施形態426～479のいずれかに記載の方法。

【0521】

50

480. a) 第一に、上記対象に、本明細書に記載の（例えば、実施形態1～424のいずれかの）発現リプレッサー又はシステムの第1の複数の用量を投与することであって、任意選択で、上記第1の複数の各後続用量が、上記第1の複数の前の用量の5日後に投与されること；

b) 第二に、上記発現リプレッサー又はシステムをある期間中止すること（「休薬期間」）、例えば、約2週間）と、

c) 第三に、上記対象に、上記発現リプレッサー又はシステムの第2の複数の用量を投与することであって、任意選択で上記第2の複数の後続用量が、上記第2の複数の前の用量の5日後に投与されること

を含む、実施形態426～479のいずれかに記載の方法。

10

【0522】

481. 上記第1の複数の用量が4用量を含む、実施形態480に記載の方法。

【0523】

482. 上記第2の複数の用量が2用量を含む、実施形態479又は480に記載の方法。

【0524】

483. 上記対象が上記休薬期間中にいかなる治療薬の投与も受けない、実施形態480～482のいずれかに記載の方法。

【0525】

484. 上記対象が上記休薬期間中に第2治療薬の投与を受ける、実施形態480～483のいずれかに記載の方法。

20

【0526】

485. 上記休薬期間が、上記第1の複数の用量中の用量の投与間の時間の少なくとも2倍の長さである、実施形態480～484のいずれかに記載の方法。

【0527】

486. 上記休薬期間が、上記第2の複数の用量中の用量の投与間の時間の少なくとも2倍の長さである、実施形態480～486のいずれかに記載の方法。

【0528】

487. 上記発現リプレッサー又はシステムによる治療後に、上記腫瘍の容積が検出不能なレベルにまで小さくなる、実施形態426～486のいずれかに記載の方法。

30

【0529】

488. 上記発現リプレッサー又はシステムによる治療の休止後に、腫瘍容積が（例えば、検出不能なレベルにまで）縮小する、実施形態426～487のいずれかに記載の方法。

【0530】

489. 上記癌が上記発現リプレッサー又はシステムに対して抵抗性にならないか、又は10、20、30、40、50、又は60日の期間内に上記発現リプレッサー又はシステムに対して抵抗性にならない、実施形態425～488のいずれかに記載の方法。

【0531】

490. 上記癌細胞が機能性アポトーシス経路を有する、実施形態425～489のいずれかに記載の方法。

40

【0532】

491. 上記癌細胞が機能性カスパーゼ3を有する、実施形態425～490のいずれかに記載の方法。

【0533】

492. 上記対象への上記発現リプレッサー又はシステムの投与を受けて癌細胞でカスパーゼ3が上方制御される、実施形態491に記載の方法。

【0534】

493. 上記対象への上記発現リプレッサー又はシステムの投与を受けて癌細胞でKi67が下方制御される、実施形態425～492のいずれかに記載の方法。

50

【0535】

494. 上記対象への上記発現リプレッサー又はシステムの投与を受けて癌細胞増殖が減退する、実施形態425～493のいずれかに記載の方法。

【0536】

495. a. 上記細胞を第2治療薬と接触させること又は

b. 第2治療薬を上記対象に投与すること

をさらに含む、実施形態425～494のいずれかに記載の方法。

【0537】

496. 上記第2治療薬が、MYCプロモータに結合する発現リプレッサーではない、実施形態495に記載の方法。

10

【0538】

497. 上記第2治療薬が、実施形態1～424のいずれかに記載の発現リプレッサー、システム、融合タンパク質、核酸、ベクター、反応混合物、医薬組成物、又は脂質ナノ粒子ではない、実施形態495又は496に記載の方法。

【0539】

498. 上記第2治療薬が、実施形態1～424のいずれかに記載の発現リプレッサー、システム、融合タンパク質、核酸、ベクター、反応混合物、医薬組成物、又は脂質ナノ粒子である、実施形態494～496のいずれかに記載の方法。

【0540】

499. 上記第2治療薬が、免疫療法、免疫チェックポイント療法及び抗血管内皮増殖因子療法的一方又は両方、全身化学療法、チロシンキナーゼ阻害薬、例えば、ソラフェニブ、マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ阻害薬(MEK阻害薬)、例えば、トラメチニブ、又はプロモドメイン阻害薬、例えば、BET阻害薬、例えば、JQ1又はピラブレシブである、実施形態495～497のいずれかに記載の方法。

20

【0541】

500. 上記第2治療薬が、チロシンキナーゼ阻害薬、例えば、ソラフェニブである、実施形態495～499のいずれかに記載の方法。

【0542】

501. 上記第2治療薬が、プロモドメイン阻害薬、例えば、BET阻害薬、例えば、JQ1、ピラブレシブ、又はBET 672である、実施形態495～499のいずれかに記載の方法。

30

【0543】

502. 上記第2治療薬が、マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ阻害薬(MEK阻害薬)、例えば、トラメチニブである、実施形態495～499のいずれかに記載の方法。

【0544】

503. 上記対象に追加の治療法を投与することをさらに含む、実施形態495～502のいずれかに記載の方法。

【0545】

504. 上記追加の治療法が、外科的切除 同所性肝移植、高周波アブレーション、光線力学療法(PDT)、レーザー療法、小線源照射療法、放射線療法、経カテーテル動脈化学若しくは放射線塞栓術、又は定位放射線療法を含む、実施形態504に記載の方法。

40

【0546】

505. 上記第2治療薬が、チェックポイント阻害薬又は小分子から選択される、実施形態495～504のいずれかに記載の方法。

【0547】

506. 上記第2治療薬が、化学療法剤、例えば、キナーゼ阻害薬又はプロモドメイン阻害薬、例えば、BET阻害薬である、実施形態495～505のいずれかに記載の方法。

【0548】

507. 上記第2治療薬が、ソラフェニブ、JQ1、BET 672、ピラブレシブ、又は

50

トラメチニブから選択される、実施形態 505 又は 506 に記載の方法。

【0549】

508. 上記発現リプレッサー、システム、又は核酸と上記第 2 治療薬とが同時に投与される、実施形態 495～506 のいずれかに記載の方法。

【0550】

509. 上記発現リプレッサー、システム、又は核酸と上記第 2 治療薬とが逐次的に投与される、実施形態 495～508 のいずれかに記載の方法。

【0551】

509. 上記追加の療法が同時に投与される、実施形態 503～509 のいずれかに記載の方法。

【0552】

511. 上記追加の療法が逐次的に投与される、実施形態 503～510 のいずれかに記載の方法。

【0553】

512. 第 2 治療薬が、実施形態 1～424 のいずれかに記載の発現リプレッサー、システム、核酸、ベクター、脂質ナノ粒子、医薬組成物、又は反応混合物と同時に投与される、実施形態 495～511 のいずれかに記載の方法。

【0554】

513. 第 2 治療薬が、実施形態 1～424 のいずれかに記載の発現リプレッサー、システム、核酸、ベクター、脂質ナノ粒子、医薬組成物、又は反応混合物と連続的に投与される、実施形態 495～512 のいずれかに記載の方法。

【0555】

514. 上記発現リプレッサー、システム、又は核酸が静脈内投与され、及び上記第 2 療法が経口投与される、実施形態 495～513 のいずれかに記載の方法。

【0556】

515. 上記癌が抵抗性又は難治性の癌である、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

【0557】

516. 上記癌が、キナーゼ阻害薬、例えば、VEGFR、PDGFR、又はRAFキナーゼの 1 つ以上を阻害するキナーゼ阻害薬、例えば、ソラフェニブに対して抵抗性又は難治性を示す、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

【0558】

517. 上記対象が、MYCスーパーエンハンサーの増幅を有する、先行する実施形態のいずれかに記載の方法。

【0559】

518. 実施形態 1～424 のいずれかに記載の発現リプレッサー、システム、前記システム又は発現リプレッサーをコードする 1 つ以上の核酸、ベクター、脂質ナノ粒子、反応混合物、又は医薬組成物を含む組成物を含む容器と、前記組成物による細胞内の MYC 遺伝子の発現を調節する、例えば、低減する少なくとも 1 つの方法を含む説明書一式とを含むキット。

【0560】

定義

ある (a)、ある (an)、その (the) : 本明細書で用いられるとき、単数形「ある (a)」、「ある (an)」及び「その (the)」は、文脈上特に明確に指示されない限り複数の指示対象を含む。

【0561】

薬剤 : 本明細書で用いられるとき、用語「薬剤」は、例えば、ポリペプチド、核酸、糖類、脂質、小分子、金属、又はこれらの組み合わせ若しくは複合体を含めた、任意の化学的クラスの化合物又は実体を指して使用されることもある。当業者には文脈から明らかであろうとおり、いくつかの実施形態では、この用語は、細胞又は生物、又はその画分、抽

10

20

30

40

50

出物、若しくは成分であるか、又はそれを含む実体を指して利用されることもある。それに代えて、又は加えて、当業者が文脈に照らして理解するであろうとおり、いくつかの実施形態では、この用語は、自然中に見出される及び／又は自然から手に入るという点で天然の産物を指して使用されることもある。いくつかの実施形態では、この場合もやはり当業者によれば文脈に照らして理解されるであろうとおり、この用語は、人間の手による作爲を通じて設計され、操作され、及び／又は作製されている及び／又は自然中に見出されないという点で人工である1つ以上の実体を指して使用されることもある。いくつかの実施形態では、薬剤は、単離された形態又は純粋な形態で利用されてもよい；いくつかの実施形態では、薬剤は、粗製形態で利用されてもよい。いくつかの実施形態では、潜在的な薬剤がコレクション又はライブラリとして提供されてもよく、例えば、それをスクリーニングすることにより、その中で活性のある薬剤を同定し、又は特徴付け得る。いくつかの実施形態では、用語「薬剤」は、ポリマーであるか、又はそれを含む化合物又は実体を指し得る；いくつかの実施形態では、この用語は、1つ以上のポリマー部分を含む化合物又は実体を指し得る。いくつかの実施形態では、用語「薬剤」は、ポリマーでない、及び／又は実質的にいかなるポリマーも含まない、及び／又は1つ以上の特定のポリマー部分を含む化合物又は実体を指し得る。いくつかの実施形態では、この用語は、いかなるポリマー部分も欠いている、又は実質的に含まない化合物又は実体を指し得る。

10

20

30

40

50

【0562】

アンカー配列：本明細書で用いられるとき、用語「アンカー配列」は、核形成薬剤により認識される核酸配列であって、十分に結合して、アンカー配列媒介接合部、例えば複合体を形成する核酸配列を指す。いくつかの実施形態では、アンカー配列は、1つ又は複数のCTCF結合モチーフを含む。いくつかの実施形態では、アンカー配列は、遺伝子コーディング領域内に位置しない。いくつかの実施形態では、アンカー配列は、遺伝子間領域内に位置する。いくつかの実施形態では、アンカー配列は、エンハンサー又はプロモータ内のいずれにも位置しない。いくつかの実施形態では、アンカー配列は、任意の転写開始部位から少なくとも400bp、少なくとも450bp、少なくとも500bp、少なくとも550bp、少なくとも600bp、少なくとも650bp、少なくとも700bp、少なくとも750bp、少なくとも800bp、少なくとも850bp、少なくとも900bp、少なくとも950bp、又は少なくとも1kb離れて位置する。いくつかの実施形態では、アンカー配列は、ゲノム刷り込み、単一对立遺伝子の発現、及び／又は単一对立遺伝子のエピジェネティックマークと関連しない領域内に位置する。いくつかの実施形態では、アンカー配列は、内因性核形成ポリペプチド（例えば、CTCF）との結合、第2アンカー配列との相互作用によるアンカー配列媒介コンジュゲーションの形成、又はアンカー配列媒介コンジュゲーションの外側にあるエンハンサーに対する遮蔽から選択される1つ以上の機能を有する。本開示のいくつかの実施形態では、他のアンカー配列（例えば、別の状況での核形成薬剤（例えば、CTCF）結合モチーフを含有し得る配列）をターゲティングすることなく、特定の1つ又は複数のアンカー配列を特異的にターゲティングすることができる技術が提供され；こうした標的化アンカー配列は、「標的アンカー配列」と呼ばれることもある。いくつかの実施形態では、標的アンカー配列の配列及び／又は活性は調節されるが、標的化アンカー配列と同じシステム内（例えば、同じ細胞内及び／又はいくつかの実施形態では、同じ核酸分子、例えば、同じ染色体上）に存在し得る1つ若しくは複数の他のアンカー配列の配列及び／又は活性は調節されない。いくつかの実施形態では、アンカー配列は、核形成ポリペプチド結合モチーフを含むか、又は核形成ポリペプチド結合モチーフである。いくつかの実施形態では、アンカー配列は、核形成ポリペプチド結合モチーフに隣接している。

【0563】

アンカー配列媒介接合部：本明細書で用いられるとき、用語「アンカー配列媒介接合部」は、核形成ポリペプチドなどの1つ若しくは複数のポリペプチド、又は1つ若しくは複数のタンパク質及び／又は核酸実体（例えば、RNA若しくはDNAなど）によるDNA内の少なくとも2つのアンカー配列の物理的相互作用若しくは結合によって起こる、及び

／又はそれにより維持されるDNA構造、ある場合では複合体を指し、これは、アンカー配列と結合して、アンカー配列同士の空間的近接及び機能的連結を可能にする（例えば、図1を参照）。

【0564】

と関連する：この用語が本明細書で用いられるとき、2つの事象又は実体は、その一方の存在、レベル、形態及び／又は機能が、他方のものと関連する場合に、互いに「関連する」。例えば、いくつかの実施形態では、特定の实体（例えば、ポリペプチド、遺伝子シグネチャー、代謝物、微生物など）は、その存在、レベル、形態及び／又は機能が、特定の疾患、障害、若しくは病状の発生率及び／又はそれに対する感受性と関連する場合に、その疾患、障害、又は病状と関連すると考えられる。いくつかの実施形態では、2つ以上の実体は、それらが直接又は間接的に相互作用して、互いに物理的に近接し、且つ／又は物理的に近接したままであれば、互いに物理的に「関連する」。いくつかの実施形態では、互いに物理的に関連する2つ以上の実体は、互いに共有結合しており；いくつかの実施形態では、互いに物理的に関連する2つ以上の実体は、互いに共有結合していないが、例えば、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用、磁気、及びそれらの組合せにより、非共有結合している。いくつかの実施形態では、核酸が、標的ゲノム又は転写複体内に少なくとも部分的に存在し、DNA配列における遺伝子の発現が、標的ゲノム若しくは転写複体の形成又は崩壊による影響を受ける場合、DNA配列は、標的ゲノム又は転写複体と「関連」する。

【0565】

ドメイン：本明細書で用いられるとき、用語「ドメイン」は、或る実体のセクション又は部分を指す。いくつかの実施形態では、「ドメイン」は、当該実体の特定の構造及び／又は機能的特徴と関連しており、ドメインがその親実体の残りから物理的に分離されたとき、それは、上記の特定の構造及び／又は機能的特徴を実質的に若しくは完全に保持する。これに代わり、又は加えて、いくつかの実施形態では、ドメインは、（親）実体から分離されて、別の（レシピエント）実体と連結されると、レシピエント実体に、親実体においてそれを特徴付けた1つ若しくは複数の構造及び／又は機能的特徴を実質的に保持し、且つ／又は付与する実体の1部分であるか、又はそれを含み得る。いくつかの実施形態では、ドメインは、或る分子（例えば、小分子、炭水化物、脂質、核酸、ポリペプチドなど）のセクション若しくは1部分であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ドメインは、ポリペプチドのセクションであるか、又はそれを含む。いくつかのそうした実施形態では、ドメインは、特定の構造エレメント（例えば、特定のアミノ酸配列若しくは配列モチーフ、 α -ヘリックス特徴、 β -シート特徴、コイルドコイル特徴、ランダムコイル特徴など）、及び／又は特定の機能的特徴（例えば、結合活性、酵素活性、フォールディング活性、シグナル伝達活性など）を特徴とする。

【0566】

エフェクター部分：本明細書で用いられるとき、用語「エフェクター部分」は、細胞の核内の適切な部位に位置するとき標的遺伝子の発現を改変することができるドメインを指す。いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、転写機構の成分を動員する。いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、転写因子又は発現抑制因子の成分の動員を阻害する。いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、エピジェネティック修飾部分を含む（例えば、標的DNA配列をエピジェネティック修飾する）。

【0567】

エピジェネティック修飾部分：本明細書で用いられるとき、「エピジェネティック修飾部分」は、エピジェネティック修飾部分が核酸に対して（例えば、ターゲティング部分によって）適切な位置に置かれているとき、i）クロマチンの構造、例えば、二次元構造、；及び／又はii）エピジェネティックマーカー（例えば、DNAメチル化、ヒストンメチル化、ヒストンアセチル化、ヒストンSUMO化、ヒストンリン酸化、及びRNA関連サイレンシングの1つ以上）を改変するドメインを指す。いくつかの実施形態では、エピジェネティック修飾部分は、1つ以上のエピジェネティックマーカーに影響を及ぼす（例

えば、そのレベルを増加させる、又は低減する）酵素、又はその機能性断片若しくは変異体を含む。いくつかの実施形態では、エピジェネティック修飾部分は、DNAメチルトランスフェラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、CREB結合タンパク質（CBP）、又はこれらのいずれかの機能性断片を含む。

【0568】

発現制御配列：本明細書で用いられるとき、用語「発現制御配列」は、遺伝子の転写を増加させる、又は低減する核酸配列を指し、（限定はされないが）プロモーター及びエンハンサーが挙げられる。「増強配列」は、発現制御配列のサブタイプを指し、遺伝子転写の可能性を増加させる。「サイレンシング又はリプレッサー配列」は、発現制御配列のサブタイプを指し、遺伝子転写の可能性を低減する。

10

【0569】

発現リプレッサー：本明細書で用いられるとき、「発現リプレッサー」という用語は、細胞内の標的遺伝子の発現を低減し、DNA配列（例えば、標的遺伝子に関連するDNA配列、又は標的遺伝子に作動可能に連結した転写制御エレメント）に特異的に結合する1つ以上の機能性を有する薬剤又は実体を指す。発現リプレッサーは、少なくとも1つのターゲティング部分と、任意選択で、1つのエフェクター部分を含む。

【0570】

発現抑制システム：本明細書で用いられるとき、「発現抑制システム」という用語は、細胞内の標的遺伝子の発現を低減する複数の発現リプレッサーを指す。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、第1発現リプレッサー及び第2発現リプレッサーを含み、ここで、第1発現リプレッサー及び第2発現リプレッサー（又は第1発現リプレッサー及び第2発現リプレッサーをコードする核酸）は、単一の組成物、混合物、又は医薬組成物中に一緒に存在する。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、第1発現リプレッサー及び第2発現リプレッサーを含み、ここで、第1発現リプレッサー及び第2発現リプレッサー（又は第1発現リプレッサー及び第2発現リプレッサーをコードする核酸）は、個別の組成物又は医薬組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、第1発現リプレッサー及び第2発現リプレッサーは、同時に同じ細胞内に存在する。いくつかの実施形態では、第1発現リプレッサー及び第2発現リプレッサーは、同時に同じ細胞内に存在せず、例えば、それらは順次存在する。例えば、第1発現リプレッサーが、第1の期間、細胞内に存在した後、第2発現リプレッサーが、第2の期間、細胞内に存在してもよく、ここで、第1及び第2の期間は、重複又は非重複のいずれでもよい。

20

30

【0571】

融合分子：本明細書で用いられるとき、用語「融合分子」は、共有結合的に連結している2つ以上の部分、例えば、ターゲティング部分とエフェクター部分とを含む化合物を指す。融合分子及びその部分は、本明細書に記載のポリペプチド、核酸、グリカン、小分子、又は他の成分の任意の組み合わせを含み得る（例えば、ターゲティング部分が核酸を含んでもよく、エフェクター部分がポリペプチドを含んでもよい）。いくつかの実施形態では、融合分子は、例えば、ペプチド結合で共有結合的に連結している1つ以上のポリペプチドドメインを含んだ、融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、融合分子は、ペプチド結合又はリン酸ジエステル結合以外の共有結合によって連結しているターゲティング部分とエフェクター部分と（例えば、ペプチド結合又はリン酸ジエステル結合以外の共有結合によって連結した、核酸を含むターゲティング部分と、ポリペプチドを含むエフェクター部分と）を含むコンジュゲート分子である。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、融合分子であるか、又はそれを含む。

40

【0572】

ゲノム複合体：本明細書で用いられるとき、用語「ゲノム複合体」は、複数のタンパク質及び／又は他の成分（恐らく、ゲノム配列エレメントを含む）同士の相互作用によって、1つ若しくは複数の染色体上で互いに間隔をあけた2つのゲノム配列エレメントと一緒にする複合体である。いくつかの実施形態では、ゲノム配列エレメントは、複合体の1つ又は複数のタンパク質成分が結合するアンカー配列である。いくつかの実施形態では、ゲ

50

ノム複合体は、アンカー配列媒介接合部を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ゲノム配列エレメントは、CTCF結合モチーフ、プロモータ及び／又はエンハンサーであってもよいし、又はそれを含んでもよい。いくつかの実施形態では、ゲノム配列エレメントは、プロモータ及び／又は調節部位（例えば、エンハンサー）の少なくとも1つ又はその両方を含む。いくつかの実施形態では、複合体形成は、ゲノム配列エレメントにおいて、且つ／又はゲノム配列エレメントと1つ若しくは複数のタンパク質成分の結合により核形成される。当業者には理解されるように、いくつかの実施形態では、複合体の形成によるゲノム部位の共局在化（例えば、共役）によって、ゲノム配列エレメントにおける、又はその付近で（例えば、いくつかの実施形態では、配列間）のDNAトポロジーが変更される。いくつかの実施形態では、ゲノム複合体は、アンカー配列媒介コンジュゲーションを含み、これは、1つ以上のループを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のゲノム複合体は、例えば、CTCF及び／又はコヒーシンの核形成ポリペプチドにより核形成される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のゲノム複合体は、例えば、以下：CTCF、コヒーシン、ノンコーディングRNA（例えば、eRNA、転写機構タンパク質（例えば、RNAポリメラーゼ、例えば、TFIIA、TFIIB、TFIID、TFIIE、TFIIF、TFIIHなどからなる群から選択される1つ若しくは複数の転写因子）、転写調節因子（例えば、メディエータ（Mediator）、P300、エンハンサー結合タンパク質、リプレッサー結合タンパク質、ヒストン修飾因子など）のうち1つ又は複数を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のゲノム複合体は、1つ若しくは複数のポリペプチド成分及び／又は1つ若しくは複数の核酸成分（例えば、1つ若しくは複数のRNA成分）を含み、それらは、いくつかの実施形態では、互いに及び／又は1つ若しくは複数のゲノム配列エレメント（例えば、アンカー配列、プロモータ配列、調節配列（例えば、エンハンサー配列）と相互作用することにより、ゲノムDNAの1区間を、複合体が形成されなければ採用されないトポロジー立体配置（例えば、ループ）中に閉じ込め得る。

10

20

30

40

50

【0573】

部分：本明細書で用いられるとき、用語「部分」は、本明細書に記載のとおり、特定の構造及び／又は活性を備える定義付けられた化学基又は実体を指す。

【0574】

調節剤：本明細書で用いられるとき、用語「調節剤」は、1つ以上のターゲティング部分と、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を改変する（例えば、増加させる、又は低減する）ことのできる1つ以上のエフェクター部分とを含む薬剤を指す。

【0575】

MYC：本明細書で用いられるとき、用語「MYC遺伝子座」は、ヒトゲノムの中で、MYCポリペプチド（例えば、NCBIアクセッション番号NP002458.2に開示されるポリペプチド、又はその突然変異体）、MYCに作動可能に連結したプロモータ（「MYCプロモータ」）、及びMYC遺伝子を含むASMを形成するアンカー配列をコードする部分を指す。いくつかの実施形態では、MYC遺伝子座は、NCBIアクセッション番号NM-002467を有する核酸をコードする。いくつかの実施形態では、MYC遺伝子は癌原遺伝子であり、及びいくつかの実施形態ではMYC遺伝子は癌遺伝子である。特定の例では、MYC遺伝子は、8番染色体上、8q24.21に見られる。特定の例では、MYC遺伝子はpterから128,816,862bpを始端とし、pterから128,822,856bpを終端とする。特定の例では、MYC遺伝子は約6kbである。特定の例では、MYC遺伝子は、少なくとも8つの別個のmRNA配列-5つの選択的スプライシングを受ける変異体及び3つのスプライシングを受けない変異体-をコードする。

【0576】

核酸：本明細書で用いられるとき、その最も広い意味で、「核酸」という用語は、オリゴヌクレオチド鎖に組み込まれているか、若しくは組み込むことができる任意の化合物及び／又は物質を指す。いくつかの実施形態では、核酸は、ホスホジエステル結合を介して

オリゴヌクレオチド鎖に組み込まれているか、若しくは組み込むことができる化合物及び／又は物質である。文脈から明かなように、いくつかの実施形態では、「核酸」は、個々の核酸残基（例えば、ヌクレオチド及び／又はヌクレオシド）を指し；いくつかの実施形態では、「核酸」は、個々の核酸残基を含むオリゴヌクレオチド鎖を指す。いくつかの実施形態では、「核酸」は、RNAであるか、又はRNAを含み；いくつかの実施形態では、「核酸」は、DNAであるか又はDNAを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、1つ以上の天然核酸残基であるか、それを含むか、又はそれから成る。いくつかの実施形態では、核酸は、1つ以上の核酸類似体であるか、それを含むか、又はそれから成る。いくつかの実施形態では、核酸類似体は、ホスホジエステル骨格を利用しない点で、核酸とは異なる。例えば、いくつかの実施形態では、核酸は、1つ以上の「ペプチド核酸」を含むか、又はそれから成り、これは、当技術分野で公知であり、骨格中にホスホジエステル結合の代わりにペプチド結合を有し、本開示の範囲に含まれるとみなされる。代替的に、又は追加的に、いくつかの実施形態では、核酸は、ホスホジエステル結合ではなく、1つ以上のホスホロチオエート及び／又は5'-N-ホスホロアミダイト結合を有する。いくつかの実施形態では、核酸は、1つ以上の天然ヌクレオシド（例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、及びデオキシシチジン）であるか、それを含むか、又はそれから成る。いくつかの実施形態では、核酸は、1つ以上のヌクレオシド類似体（例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、0(6)-メチルグアニン、2-チオシチジン、メチル化塩基、介在塩基、及びこれらの組合せ）であるか、それを含むか、又はそれから成る。いくつかの実施形態では、核酸は、天然の核酸におけるものと比較して、1つ以上の修飾糖（例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、及びヘキソース）を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、RNA又はタンパク質などの機能的遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、核酸は、1つ以上のイントロンを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、天然源からの単離、相補的な鋳型に基づく重合による酵素合成（インビボ又はインビトロ）、組換え細胞又は組換え系における複製、及び化学合成のうちの1つ以上によって調製される。いくつかの実施形態では、核酸は、長さが少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000以上の残基である。いくつかの実施形態では、核酸は、部分的又は完全に一本鎖であり；いくつかの実施形態では、核酸は、部分的又は完全に二本鎖である。いくつかの実施形態では、核酸は、ポリペプチドをコードするか、又はポリペプチドをコードする配列の補体である少なくとも1つの要素を含むヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、核酸は、酵素活性を有する。

【0577】

核形成ポリペプチド：本明細書で用いられるとき、用語「核形成ポリペプチド」又は「接合部核形成ポリペプチド」は、本明細書で用いられるとき、アンカー配列と直接又は間接的に会合しているタンパク質であって、互いに同一であることも、又はそうでないこともある2つ以上のかかる接合部核形成ポリペプチドを含む二量体（又はより高次の構造）を形成するように1つ以上の接合部核形成ポリペプチド（アンカー配列又は他の核酸と相互作用し得る）と相互作用し得るタンパク質を指す。異なるアンカー配列と会合した接合

10

20

30

40

50

部核形成ポリペプチドが、それらの異なるアンカー配列を互いに物理的に近接して保つように互いに会合しているとき、それによって生じる構造が、アンカー配列媒介接合部である。つまり、核形成ポリペプチドーアンカー配列が別の核形成ポリペプチドーアンカー配列と相互作用して至近距離で物理的に近接していることにより、アンカー配列を始端及び終端とするアンカー配列媒介接合部（例えば、場合によってはDNAループ）が生じる。当業者は、本明細書を読めば直ちに理解するであろうとおり、「核形成ポリペプチド」、「核形成分子」、「核形成タンパク質」、「接合部核形成タンパク質」などの用語は、時に接合部核形成ポリペプチドを指して使用されることもある。同様に本明細書を読んだ当業者によって直ちに理解されるであろうとおり、2つ以上の接合部核形成ポリペプチドの集まったひとまとまり（これは、いくつかの実施形態では、同じ薬剤の複数のコピーを含むこともあり、及び／又はいくつかの実施形態では、複数の異なる薬剤の各々の1つ以上を含むこともある）は、「複合体」、「二量体」、「多量体」等と称され得る。

10

【0578】

作動可能に連結した：本明細書で用いられるとき、語句「作動可能に連結した」は、記載される成分が、その意図される様式でそれらを機能させることが可能な関係にある並置を指す。機能性エレメント、例えば、遺伝子と「作動可能に連結した」転写制御エレメントは、機能性エレメント、例えば、遺伝子の発現及び／又は活性が、転写制御エレメントと適合する条件下で達成されるように、結合されている。いくつかの実施形態では、「作動可能に連結した」転写制御エレメントは、目的のコーディングエレメント、例えば、遺伝子と連続的であり（例えば、共有している）；いくつかの実施形態では、作動可能に連結した転写制御エレメントは、目的の機能性エレメント、例えば、遺伝子に対してトランスで、或いはそうでなければそれから一定の距離の地点で作用する。いくつかの実施形態では、作動可能に連結したとは、2つの核酸配列が、同じ核酸分子上に含まれることを意味する。別の実施形態では、作動可能に連結したとは、さらに、2つの核酸配列が、同じ核酸分子上で互いに近接しており、例えば、互いに1000、500、100、50、若しくは10塩基対内にあるか、又は互いに隣接していることを意味する場合もある。

20

【0579】

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質：本明細書で用いられるとき、「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、ペプチド結合によって、又はペプチド結合以外の手段によって共有結合で連結されたアミノ酸残基からなる化合物を指す。タンパク質又はペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有していなければならない。タンパク質又はペプチドの配列を含むことができるアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドは、ペプチド結合によって、又はペプチド結合以外の手段によって互いに連結された2つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチド又はタンパク質を含む。本明細書で用いられるとき、この用語は、例えば、当技術分野で一般にペプチド、オリゴペプチド、及びオリゴマーと呼ばれる短鎖と、当技術分野で一般にタンパク質（多くの種類がある）と呼ばれる長鎖の両方を指す。

30

【0580】

医薬組成物：本明細書で用いられるとき、用語「医薬組成物」は、1つ以上の薬学的に許容可能な担体と共に製剤化された、活性薬剤（例えば、調節剤、例えば、破壊剤）を指す。いくつかの実施形態では、活性薬剤は、関連性のある集団に投与したときに所定の治療効果を実現する統計的に有意な確率を示す治療レジメンでの投与に適切な単位用量ずつの量で存在する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、以下に適合させたもの：経口投与、例えば、飲薬（水性又は非水性の溶液又は懸濁液）、錠剤、例えば、頬側、舌下、及び全身吸収を目標とするもの、巨丸剤、粉末、顆粒、舌に塗るペースト；非経口投与、例えば、皮下、筋肉内、静脈内又は硬膜外注射による、例えば、滅菌溶液又は懸濁液としての、又は徐放製剤；局所適用、例えば、クリーム、軟膏、又は皮膚、肺、又は口腔に適用する放出制御パッチ又はスプレーとして；腔内に又は直腸内に、例えば、ペッサリー、クリーム、又は泡として；舌下に；眼内に；経皮的に；又は鼻腔内に、肺内、及び／又は他の粘膜表面に対するものを含め、固体又は液体形態での投与のために特別に製剤化され

40

50

てもよい。

【0581】

近接：本明細書で用いられるとき、「近接」は、第1部位における発現リプレッサーの結合及び／又は発現リプレッサーによる第1部位の修飾が他の部位の結合及び／又は修飾と同じ又は実質的に同じ効果を生み出すこととなるような2つの部位、例えば、核酸部位の近さを指す。例えば、ターゲティング部分が第1部位に結合してもよく、この第1部位はエンハンサー（第2部位）に近接していて、前記ターゲティング部分に関連するエフェクター部分が第1部位をエピジェネティックに修飾すると、第2部位（エンハンサー配列）が結合を受けた及び／又は修飾されたのと同様に、エンハンサーが標的遺伝子の発現に及ぼす効果が修飾されることになり得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子（例えば、標的遺伝子内にあるエキソン、イントロン、又はスプライス部位）に近接した、標的遺伝子に作動可能に連結した転写制御エレメントに近接した、又はアンカー配列に近接した部位は、標的遺伝子（例えば、標的遺伝子内にあるエキソン、イントロン、又はスプライス部位）、転写制御エレメント、又はアンカー配列から5000、4000、3000、2000、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、50、又は25塩基対未満（及び任意選択で、標的遺伝子（例えば、標的遺伝子内にあるエキソン、イントロン、又はスプライス部位）、転写制御エレメント、又はアンカー配列から少なくとも20、25、50、100、200、又は300塩基対）にある。

10

【0582】

特異的：本明細書で用いられるとき、活性を有する薬剤に言及した用語「特異的」は、当業者によれば、その薬剤が潜在的標的実体又は状態の差異を見分けることを意味するものと理解される。例えば、いくつかの実施形態では、薬剤は、それがその標的に対して1つ以上の競合する別の標的の存在下で優先的に結合する場合、当該の標的に「特異的に」結合すると言われる。いくつかの実施形態では、特異的相互作用は、標的実体の特定の構造的特徴（例えば、エピトープ、クレフト、結合部位）の存在に依存する。特異性が絶対的なものである必要はないことが理解されるべきである。いくつかの実施形態では、特異性は、1つ以上の他の潜在的標的実体（例えば、競合体）に対する結合剤の特異性と相対的に評価されてもよい。いくつかの実施形態では、特異性は、参照用の特異的結合剤の特異性と相対的に評価される。いくつかの実施形態では、特異性は、参照用の非特異的結合剤の特異性と比べて評価される。いくつかの実施形態では、薬剤又は実体は、その標的実体に結合する条件下では、競合する別の標的に対して検出可能な結合を示さない。いくつかの実施形態では、結合剤は、1つ又は複数の競合する別の標的と比較したとき、速いオン速度、遅いオフ速度、高い親和性、低い解離度、及び／又は高い安定性でその標的実体に結合する。

20

30

【0583】

特異的結合：本明細書で用いられるとき、用語「特異的結合」は、結合が起こる環境において可能な結合パートナー同士を識別する能力を指す。いくつかの実施形態では、他の潜在的な標的が存在する場合に、1つの特定の標的と相互作用する結合剤は、それが相互作用する標的に「特異的に結合する」と言われる。いくつかの実施形態では、特異的結合は、結合剤とそのパートナーとの間の会合の程度を検出又は決定することによって評価される；いくつかの実施形態では、特異的結合は、結合剤－パートナー複合体の解離の程度を検出又は決定することによって評価される。いくつかの実施形態では、特異的結合は、そのパートナーと別の実体との間の代替的相互作用と競合する結合剤の能力を検出又は決定することによって評価される。いくつかの実施形態では、特異的結合は、様々な濃度でこのような検出又は決定を実施することによって評価される。

40

【0584】

実質的に：本明細書で用いられるとき、用語「実質的に」は、目的の特徴若しくは特性の全範囲若しくはほぼ全範囲又は程度を呈示する質的条件を指す。当業者には、生物学的及び化学的現象は、完了に到達する、且つ／又は完全性まで進行する、又は絶対的結果を

50

達成若しくは回避することが、もしあるとしても、稀であるのは理解されよう。従って、用語「実質的に」は、本明細書のいくつかの実施形態において、多くの生物学的及び化学的現象に固有の完全性の欠如の可能性を捉えるために使用される場合もある。

【0585】

症状が軽減される：本明細書で用いられるとき、「症状が軽減される」という語句は、特定の疾患、障害又は状態の1つ以上の症状の程度（例えば、強度、重症度など）及び／又は頻度が減少する場合に使用され得る。いくつかの実施形態では、特定の症状の発症の遅延は、その症状の頻度を減少させる1つの形態と考えられる。

【0586】

標的：薬剤又は実体は、それらが互いに接触する条件下で、標的化薬剤又は実体と特異的に結合する場合、本開示に従って、別の薬剤又は実体を「ターゲティングする」とみなされる。いくつかの実施形態では、例えば、抗体（又はその抗原結合断片）は、そのコグネイトエピトープ若しくは抗原をターゲティングする。いくつかの実施形態では、特定の配列を有する核酸は、実質的に相補的な配列の核酸をターゲティングする。

【0587】

標的遺伝子：本明細書で用いられるとき、用語「標的遺伝子」とは、調節、例えば発現の調節のためにターゲティングされる遺伝子を意味する。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、標的化ゲノム複合体の一部（例えば、アンカー配列媒介コンジュゲーション内部で、標的ゲノム複合体の一部としてそのゲノム配列の少なくとも一部を有する遺伝子）であり、このゲノム複合体は、本明細書に記載される1つ以上の調節剤によってターゲティングされる。いくつかの実施形態では、調節は、標的遺伝子の発現の阻害を含む。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、標的遺伝子又は標的遺伝子に作動可能に連結した転写制御エレメントを、本明細書に記載される発現抑制システム、例えば発現リプレッサーと接触させることによって調節される。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、細胞、例えば、対象（例えば患者）の細胞で異常に発現（例えば、過剰発現）される。

【0588】

ターゲティング部分：本明細書で用いられるとき、用語「ターゲティング部分」は、ゲノム配列エレメント（例えば、発現制御配列又はアンカー配列）を特異的にターゲティングする、例えば、結合する薬剤又は実体を意味する。いくつかの実施形態では、ゲノム配列エレメントは、標的遺伝子（例えば、MYC）に近接している、及び／又は作動可能に連結している。

【0589】

治療薬：本明細書で用いられるとき、「治療薬」という語句は、対象に投与されたとき、治療効果を有し、且つ／又は所望の生物学的及び／又は薬理学的効果を誘発する薬剤を指す。いくつかの実施形態では、治療薬は、疾患、障害、及び／若しくは状態の1つ以上の症状又は特徴の緩和、改善、軽減、阻害、予防、発症の遅延、重症度の低下、及び／又は発生率の低下に使用することができる任意の物質である。いくつかの実施形態では、治療薬は、本明細書に記載の発現抑制システム、例えば、発現リプレッサーを含む。一部の実施態様では、治療薬は、本明細書に記載の発現抑制システム、例えば、発現リプレッサーをコードする核酸を含む。一部の実施態様では、治療薬は、本明細書に記載の医薬組成物を含む。

【0590】

治療有効量：本明細書で用いられるとき、用語「治療有効量」は、治療レジメンの一環として投与されると、所望の生物学的応答を誘発する物質（例えば、治療薬、組成物、及び／又は製剤）の量を意味する。いくつかの実施形態では、或る物質の治療有効量は、疾患、障害、及び／又は病状に罹患しているか、若しくは罹患しやすい対象に投与されると、疾患、障害、及び／又は病状を治療、診断、予防する、且つ／又はその発症を遅延させるのに十分な量である。当業者には理解されるように、或る物質の有効量は、所望の生物学的エンドポイント、送達しようとする物質、標的細胞又は組織などの要因に応じて変動し得る。例えば、いくつかの実施形態では、疾患、障害、及び／又は病状を治療するため

10

20

30

40

50

の製剤中の化合物の有効量は、疾患、障害、及び／又は病状の1つ若しくは複数の症状又は特徴を改善、緩和、軽減、阻害、予防し、その発症を遅延させ、その重症度を低減させ、且つ／又はその発生率を低下させる量である。いくつかの実施形態では、治療有効量は、単一用量で投与され；いくつかの実施形態では、治療有効量を送達するために、複数回用量が必要とされる。

【0591】

本開示の実施形態の以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読めば、よりよく理解されるであろう。本開示を説明する目的で、本明細書に例示される実施形態が図面に示される。しかしながら、本開示は、図面に示される実施形態の詳細な配置及び手段に限定されないことを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【0592】

【図1A】DNAメチルトランスフェラーゼに融合したDBDを使用するMYCプロモータの持続性のあるブロック、及びDBD又は短期エフェクターに融合したDBDを使用するCTCF／TF部位の一過性（48／72時間）のブロックに基づく二重標的手法の概略図を描く。

【図1B-1】MYC遺伝子についてのガイドRNAの局在及び標的部位（CTCF及びプロモータ）のクロマチンコンテクストを描く。上から下に、これらのグラフは、Hep G2細胞のMYC遺伝子座について、H3K4me3（ヒストンH3 K9トリメチル化）レベル；H3K9me3（ヒストンH3 K9トリメチル化）レベル（レプリケート1）；H3K9me3（ヒストンH3 K9トリメチル化）レベル（レプリケート2）；H3K27me3（ヒストンH3 K27トリメチル化）レベル；H3K27ac（ヒストンH3 K27アセチル化）レベル；GROseq__fwdStrandレベル（転写活性のあるRNA pol IIによるフォワード鎖への結合）；GROseq__revStrandレベル（転写活性のあるRNA pol IIによるリバース鎖への結合）；RNAseq__rep2レベル（RNAseqを用いて測定したMYC転写物レベル、レプリケート2）；WGBS（全ゲノムバイサルファイトシーケンシング）により測定したときのDNAメチル化レベル、及びCTCF結合レベルを表す。4つのgRNAの位置は、矢印で示す。gRNA GD-28859、GD-28616、GD-28862がMYCの上流のアンカー部位又はその近傍をターゲティングし、gRNA GD-28617がMYCプロモータをターゲティングする。本開示において、GD-28859はGD-59とも称され；GD-28616はGD-16とも称され；GD-28862はGD-62とも称され；及びGD-28617はGD-17とも称される。

【図1B-2】同上。

【図1B-3】同上。

【図1C】例示的バイシストロン性構築物の概略図を示す。この構築物の5'末端は、N7-メチル化グアノシンが逆5'→5'三リン酸塩結合によってmRNAの最初のヌクレオチドに連結していることによって定義付けられるキャップ構造を備える。いくつかの実施形態では、このキャップ構造は、タンパク質翻訳及び安定性を促進する。キャップ構造の下流は、高度なタンパク質翻訳を促進するように設計された非翻訳領域（5'UTR）と、続くリボソームによって認識されるとタンパク質の翻訳が始まるカノニカルな「Kozak」配列である。「Kozak」配列に続いて、tP2A「リボソームスキッピング」配列（リンカー）によって分かれた、第1ターゲティング部分及び第1エフェクター部分を含む第1発現リプレッサーと、第2ターゲティング部分及び第2エフェクター部分を含む第2発現リプレッサーとを含む単一の連続する配列であるCDSがある。理論によって拘束されることを望むものではないが、リボソームがtP2Aリンカーに到達すると、それによるリンカーからアミノ酸への翻訳が始まる。P2Aリンカーから作り出される最初の18アミノ酸は第1発現リプレッサー（例えば、ZF DBD及びMQ1を含む）のC端側末端に残り、次にこれをリボソームが放出する。次にリボソームは進み続け、最後にT2Aリンカーに到達し、T2Aリンカーの最初の17残基が翻訳され、放出される

10

20

30

40

50

。次に、第2ポリペプチドが翻訳され、これは単一のアミノ酸を含み、次に第2発現リプレッサー（例えば、第2のZF DBD及びKRABを含む）が始まる。CDSの後は3' UTRであり、これは、高度な翻訳を助けるように、またmRNAを安定化させるようにも設計される。最後に、mRNAの3'末端の一番端に、ポリAテールがある。いくつかの実施形態では、ポリAテールはタンパク質翻訳及びmRNA安定性を促進する。

【図2】（図2A）CTCFモチーフのCas9ヌクレアーゼ編集により、MYC発現が下方制御されることを示す。CTCFモチーフをCas9によって（GD-28616と組み合わせて）破壊すると、3つ全てのHCC細胞株（HepG2、Hep3B及びSKHEP1）でMYC発現が32～39%下方制御された。CTCFモチーフに隣接する領域を破壊すると（GD-28859）、3つの細胞株のうち2つ（HepG2及びHep3B）でMYC発現が35～45%調節された。（図2B）AmpSeqにより評価したときの編集効率によれば、全ての細胞株の77～100%の編集が確認されたことを示す。

10

【図3】dCas9-KRABをプロモータ又は関連するCTCFモチーフに導いたとき、MYC発現が下方制御されることを示す。LNPの媒介によるdCas9-KRAB/GD-28616のトランスフェクションにより、Hep3B及びSKHEP1においてMYC発現が48/72時間の時点で11～34%下方制御された。LNPの媒介によるdCas9-KRAB/GD-28859のトランスフェクションにより、3つのHCCモデル全てにおいてMYC発現が48/72時間の時点で18～44%下方制御された。dCas9-KRABをdCas9-KRAB/GD-28617によってMYCプロモータに導くと、3つのHCCモデル全てにおいてMYC発現が48/72時間の時点で24～58%下方制御された。

20

【図4A-1】プロモータに関連するCTCFモチーフにおけるsgRNA局在及びジンクフィンガー設計を描く。図は配列番号208を開示する。

【図4A-2】同上。

【図4B】ZF-KRAB構築物をプロモータ関連CTCFに導くと、Hep3BにおいてMYC下方制御がもたらされたことを示す。ZF2-KRAB、ZF3-KRAB及びZF4-KRABは、Hep3B細胞においてdCas9-KRAB/GD-28859と同程度又はそれより高度にMYCを下方制御し、ZF3-KRABが最も強力な下方制御効果を有した。

30

【図4C】ZF3-エフェクターなし及びZF3-KRABが複数のヒトHCCモデル（HepG2、Hep3B、及びSKHEP1）でMYC発現を下方制御したことを示す。ZF3-KRABはまた、他の2つのHCCモデル、HepG2及びSKHEP1においてもZF3-エフェクターなし及びZF5-エフェクターなしと同程度又はそれより高度にMYCを下方制御することを示した。

【図4D】ZF3-エフェクターなし及びZF3-KRABが、異なる時点（24時間、72時間、及び120時間）でHep3B細胞におけるMYC発現及び生存能力に同等の効果を実証したことを示す。

【図5】複数のHCCモデル（HepG2、Hep3B、及びSKHEP1）においてdCas9-MQ1をMYCプロモータに導いたときMYC発現が下方制御されたことを示す。

40

【図6A-1】MYCプロモータにおけるsgRNA局在及びジンクフィンガー設計を描く。図は配列番号209を開示する。

【図6A-2】同上。

【図6B】Hep3BにおけるMYC下方制御への効果に関してスクリーニングした、MYCプロモータに導かれる6つのZF-MQ1構築物を描く。ZF8-MQ1、ZF9-MQ1及びZF11-MQ1は、Hep3B細胞においてMYCを最も高度に下方制御し、ZF9-KRAB MQ1が最も強力な下方制御効果を有した。

【図7A】ZF12-MQ1と比較して、ZF9-MQ1がHep3BにおいてMYC発現を有意に下方制御したとともに、生存能力を低下させることを示す。

50

【図 7 B】 Z F 1 2 - M Q 1 と比較して、 Z F 9 - M Q 1 が H e p G 2 において M Y C 発現を有意に下方制御したとともに、生存能力を低下させることを示す。

【図 7 C】 Z F 1 2 - M Q 1 と比較して、 Z F 9 - M Q 1 が S K H E P 1 において M Y C 発現を有意に下方制御したとともに、生存能力を低下させることを示す。

【図 7 D】 Z F 8 - M Q 1 と比較して、 Z F 9 - M Q 1 の方が、 H e p 3 B において M Y C 発現を下方制御する効率及び生存能力を低下させる効率がより高いことを示す。

【図 7 E】 Z F 8 - M Q 1 と比較して、 Z F 9 - M Q 1 の方が、 H e p G 2 において M Y C 発現を下方制御する効率及び生存能力を低下させる効率がより高いことを示す。

【図 7 F】 Z F 8 - M Q 1 と比較して、 Z F 9 - M Q 1 の方が、 S K H E P 1 において M Y C 発現を下方制御する効率及び生存能力を低下させる効率がより高いことを示す。

【図 7 G】 d C a s 9 - M Q 1 / G D 1 7 と比較して、 Z F 9 - M Q 1 が H e p 3 B において M Y C 発現を有意に下方制御したとともに、生存能力を低下させることを示す。

【図 7 H】 d C a s 9 - M Q 1 / G D 1 7 と比較して、 Z F 9 - M Q 1 が H e p G 2 において M Y C 発現を有意に下方制御したとともに、生存能力を低下させることを示す。

【図 7 I】 d C a s 9 - M Q 1 / G D 1 7 と比較して、 Z F 9 - M Q 1 が S K H E P 1 において M Y C 発現を有意に下方制御したとともに、生存能力を低下させることを示す。

【図 8 A】 d C a s 9 - M Q 1 が、全 3 つの細胞株 (H e p 3 B 、 H e p G 2 、 及び S K H E P 1) において 7 2 時間で m R N A の 5 0 ~ 9 0 % の減少をもたらしたことを示す。

【図 8 B】 M Y C 下方制御により、 H e p G 2 及び H e p 3 B の 7 2 及び 1 6 8 時間における生存能力が劇的に減少したが、 S K - H E P - 1 の生存能力は M Y C 下方制御の影響を最小限しか受けなかったことを示す。

【図 8 C】 7 日目及び 1 1 日目、 M Y C m R N A がそれぞれ約 7 0 % 及び約 5 5 % 減少したことを示す。 1 5 日目にまで至っても、転写物の約 4 0 % の下方制御が維持された。

【図 8 D】 d C a s 9 - M Q 1 / G D - 2 8 6 1 7 で処理すると、ターゲティングされた領域にメチル化がデノボで導かれること、及びこれらの転写の変化が標的領域における C p G メチル化の割合と密接に関連していることを示し、メチル化が 1 5 日目まで持続すると確認された。

【図 9】 d C a s 9 - M Q 1 / G D - 1 7 で治療すると、インビボで腫瘍成長が阻害されたことを示す。

【図 1 0】 ヒトヘパトサイトにおける B 型肝炎感染のコンテキストで d C a s 9 - M Q 1 / G D - 1 7 が M Y C を下方制御したことを示す。

【図 1 1】 ジンクフィンガードメインに融合した K R A B エフェクター (又はエフェクターなし、即ち N E) を C T C F モチーフに直接隣接する上流領域にターゲティングし (Z F 3 - N E 又は Z F 3 - K R A B) 、 及びジンクフィンガードメインに融合した M Q 1 エフェクターを M Y C プロモータにターゲティングすると (Z F 9 - M Q 1) 、 M Y C 1 m R N A 発現が下方制御されたことを示す。

【図 1 2】 Z F 3 - K R A B + Z F 9 - M Q 1 が、 Z F 9 - M Q 1 単独又は Z F 3 - N E + Z F 9 - M Q 1 の組み合わせよりも高度に M Y C を下方制御したことを示す。

【図 1 3】 (図 1 3 A) M Y C プロモータに結合してそれをターゲティングするように設計した Z F 9 - M Q 1 を 5 つの H C C 細胞株、 H e p 3 B 、 H e p G 2 、 S K H E P 1 、 S N U - 1 8 2 及び S N U - 4 4 9 において複数の濃度で投与したことを示す。 (図 1 3 B - 1 3 F) Z F 9 - M Q 1 が、試験した 5 つ全ての H C C 細胞株で M Y C 発現を下方制御し、生存能力を低下させたこと、及び Z F 9 - M Q 1 がインビトロで H e p G 2 細胞株において 7 2 時間で M Y C 発現を 0 . 0 2 8 u g / m l L N P / m R N A の E C 5 0 中央値で下方制御し、生存能力に対する E C 5 0 効果中央値 (0 . 1 3 u g / m l) の約 1 0 倍であったことを示す。

【図 1 4】 P B S 対照で治療したマウスと比較したとき、 Z F 9 - M Q 1 が腫瘍成長を有意に低下させることができ (6 日目以降) 、 Z F 9 - M Q 1 が小分子比較対照薬 (M Y C i 9 7 5) よりも大きく腫瘍成長を低下させたことを示す (A) 。 P B S 又は M Y C i 9 7 5 と比較して、 Z F 9 - M Q 1 は全体的な動物の体重に最小限の効果しか及ぼさなかつ

10

20

30

40

50

た (B)。

【図15】(図15A) 1.5 mg/kgで5日毎に2用量、3 mg/kgで5日毎に3用量、3 mg/kgで3日毎に1用量のZF9-MQ1とZF3-KRABとの組み合わせにより、腫瘍成長がソラフェニブと同等のレベルで低下したことを示す。(図15B) ZF9-MQ1とZF3-KRABとの組み合わせによる治療が、ソラフェニブで治療したときの全体的な動物の体重への効果と比較して全体的な動物の体重に最小限の効果しか及ぼさなかったことを示す。

【図16A】1 mg/kgのZF9-MQ1 (13日目以降) 及びZF9-MQ1とZF3-KRABとの共製剤 (6日目以降) が、陰性対照で治療したマウスと比較したとき、腫瘍成長を有意に低下させることができたことを示す。

【図16B】3 mg/kgのZF9-MQ1個別及びZF9-MQ1とZF3-KRABとの共製剤が、陰性対照で治療したマウスと比較したとき、腫瘍成長を低下させることができたことを示す。

【図16C】ZF9-MQ1とZF3-KRABとの共製剤が、1 mg/kg及び3 mg/kgの両方の投与量で、腫瘍成長をシスプラチン又は小分子比較対照薬 (MYC i 975) と同様の又はそれより高いレベルで低下させることができたことを示す。

【図16D】1 mg/kg及び3 mg/kgの両方の投与量でのZF9-MQ1とZF3-KRABとの共製剤による治療は、シスプラチン又はMYC i 975のいずれかで治療したときの全体的な動物の体重への効果と比較して、全体的な動物の体重に最小限の効果しか及ぼさなかったことを示す。

【図17】(図17A) ZF9-MQ1によりA549細胞株において処理120時間後にMYC mRNAレベルが80%超低下したことを示す。(図17B) ZF9-MQ1によりNCI-H2009細胞株において処理120時間後にMYC mRNAレベルが80%超低下したことを示す。(図17C) ZF9-MQ1によりNCI-H358細胞株において処理120時間後にMYC mRNAレベルが80%超低下したことを示す。(図17D) ZF9-MQ1によりHCC95細胞株において処理72時間後にMYC mRNAレベルが80%超低下したことを示す。(図17E) ZF9-MQ1がA549細胞株において処理120時間後に細胞生存能力の喪失を引き起こしたことを示す。(図17F) ZF9-MQ1がNCI-H2009細胞株において処理120時間後に細胞生存能力の喪失を引き起こしたことを示す。(図17G) ZF9-MQ1がNCI-H358細胞株において処理120時間後に細胞生存能力の喪失を引き起こしたことを示す。(図17H) ZF9-MQ1がHCC95細胞株において処理72時間後に細胞生存能力の喪失を引き起こしたことを示す。

【図18-1】(図18A) 処理96時間後に、未処理細胞集団中約17.5%の細胞がアポトーシス細胞であったことを示す。(図18B) 処理96時間後に、ZF9-NEで処理した細胞集団中約18%の細胞がアポトーシス細胞であったことを示す。(図18C) 処理96時間後に、ZF9-MQ1で処理した細胞集団中約38.9%の細胞がアポトーシス細胞であったことを示す。

【図18-2】処理96時間後に、ZF9-MQ1で処理した細胞集団中約38.9%の細胞がアポトーシス細胞であったことを示し、これは未処理細胞及びZF9-NE処理した細胞集団の両方における約18%のアポトーシス細胞と対照的であり、ZF9-MQ1が肺癌細胞の細胞アポトーシスを誘導できることが指摘される。

【図19】ZF9-MQ1によりMYCが0.08 µg/ml LNP/mRNAのEC50で下方制御され、これらのA549 (図19A) 及びHCC95 (図19B) 細胞株での72時間におけるインビトロでの生存能力へのEC50効果 (2 µg/ml) の約25倍の高さであったことを示す。

【図20】ZF9-MQ1処理により、肺癌細胞株で処理96時間後にMYCタンパク質レベルが80%超低下することを示す。

【図21】ZF9-MQ1が、PBS対照で治療したマウスと比較したとき腫瘍成長を有意に低下させることができた (8日目以降) ことを示す。ZF9-MQ1が全体的な動物

10

20

30

40

50

の体重に最小限の効果しか及ぼさなかったこともまた観察された。

【図22】SSOPによるLNP送達を用いてdCAS9-KRABエフェクターmRNAと共に送達したとき、ガイドRNA GD-29833及び29914がMYC mRNAレベルを有効に下方制御することができたことを示し、この遠位調節エレメントを使用して発癌性MYCを低減可能であることが強調される。

【図23】MC3によるLNP送達を用いてdCAS9-KRABエフェクターmRNAと共に送達したとき、ガイドRNA GD-29833及び29914がMYC mRNAレベルを有効に下方制御することができたことを示し、この遠位調節エレメントを使用して発癌性MYCを低減可能であることが強調される。

【図24】(図24A)3つ全てのエフェクタータンパク質(EZH2、EZH2-KRAB、及びMQ1)と共に送達したとき、ガイドRNA GD-29833及び29914がA549細胞株においてMYC mRNAレベルを有効に下方制御することができたことを示す。(図24B)3つ全てのエフェクタータンパク質(EZH2、EZH2-KRAB、及びMQ1)と共に送達したとき、ガイドRNA GD-29833及び29914がNCI-H2009細胞株においてMYC mRNAレベルを有効に下方制御することができたことを示す。

【図25】(図25A)ガイドRNA GD-29833及び29914をKRAB又はMQ1と共に送達すると、A549細胞株において処理120時間後にMYC mRNAレベルを有意に下方制御することができたことを示す。(図25B)ガイドRNA GD-29833及び29914をKRAB又はMQ1と共に送達すると、NCI-H2009細胞株において処理120時間後にMYC mRNAレベルを有意に下方制御することができたとともに、この下方制御が、ZF9-MQ1処理後に観察される下方制御と同等であることを示す。

【図26】(図26A)dCas9-MQ1によりNSCLCの標的部位のメチル化が約60%にまで増加したことを示す。(図26B)dCas9-MQ1により遠位プロモータ領域にメチル化が導かれた(約50%にまで増加した)ことを示す。

【図27】NCI-H2009肺癌細胞株においてガイドを転写リプレッサーでMYCスーパーエンハンサーに導くと、96時間でMYCタンパク質レベルが低下することを示す。

【図28-1】(図28A)全細胞ライセート中に存在するZF9-MQ1タンパク質が、Hep3B細胞をZF9-MQ1で処理した後、徐々に減少することを示す。(図28B)全細胞ライセート中のMYCタンパク質発現が、Hep3B細胞をZF9-MQ1で処理した後、徐々に下方制御されることを示す。

【図28-2】全細胞ライセート中に存在するZF9-MQ1タンパク質が、Hep3B細胞をZF9-MQ1で処理した後、MYCタンパク質の下方制御と相関することを示す。

【図29A】ZF9-MQ1による処理後のSK-HEP細胞株における15日目までのいくつかの時点でのMYC転写物の45%の下方制御に伴うmRNA発現の下方制御を示す。

【図29B】MYCの転写変化が15日目までのメチル化の割合と相関したことを示す。

【図30A】初代ヘパトサイトを0.6 µg/ml、1.25 µg/ml、及び2.5 µg/mlの濃度のZF9-MQ1、ZF9-MQ1+ZF3-KRAB、又はバイシストロン性ZF9-MQ1-ZF3-KRABで処理したところ、GFP、ZF-NE、又はZF3-KRAB単独と比較したときMYC mRNA発現の減少が示されたことを示す。

【図30B】0.6 µg/ml、1.25 µg/ml、及び2.5 µg/mlの濃度のZF9-MQ1、ZF9-MQ1+ZF3-KRAB、又はバイシストロン性ZF9-MQ1-ZF3-KRABによる処理が初代ヘパトサイトの生存能力に最小限の効果しか及ぼさなかったことを示し、MYC発現の減少による正常細胞への影響は、HCC細胞株と比較したとき小さいことが実証される。

【図30C】初代ヘパトサイトを0.5 µg/ml、1.0 µg/ml、及び2.0 µg

10

20

30

40

50

／m l の濃度の Z F 9 - M Q 1、Z F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A B、又はバイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 __ Z F 3 - K R A B で処理したところ、G F P、Z F - N E、又は Z F 3 - K R A B 単独と比較したとき M Y C m R N A 発現の減少が示されたことを示す。

【図 3 0 D】0.5 μ g / m l、1.0 μ g / m l、及び 2.0 μ g / m l の濃度の Z F 9 - M Q 1、Z F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A B、又はバイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 __ Z F 3 - K R A B による処理が初代ヘパトサイトの生存能力に最小限の効果しか及ぼさなかったことを示し、M Y C 発現の減少による正常細胞への影響は、H C C 細胞株と比較したとき小さいことが実証される。

【図 3 1 A】Z F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A B で治療すると、3 回の投与後に腫瘍サイズの統計的に有意な低下が示され、腫瘍容積が 25 日目に対照と比較して 63 % 小さくなったこと、及び Z F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A B 治療に伴いシスプラチンによる治療と同等の腫瘍容積への効果があったことを示す。

【図 3 1 B】Z F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A B で治療したマウスに重大な体重減少は見られなかったことを示した。

【図 3 2 A】1.5 m g / k g の Z F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A B による治療に伴い、2 回の投与後に腫瘍サイズが統計的に有意に低下した結果、23 日目までに陰性対照と比較して腫瘍成長が 63 % 阻害されたことを示す。3 m g / k g の Z F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A B に伴い、2 回の投与後に腫瘍サイズが統計的に有意に低下した結果、23 日目までに陰性対照と比較して腫瘍成長が 54 % 阻害されたとともに、6 m g / k g 用量の Z F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A B による治療に伴い、2 回の投与後に腫瘍サイズが統計的に有意に低下する結果、腫瘍容積が 23 日目に陰性対照と比較して 63 % 小さくなる。

【図 3 2 B】Z F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A B で治療したマウスに重大な体重減少は見られなかったことを示す。ソラフェニブで治療したマウスには、当初体重の下落が見られたが、後に全体的に見て体重は増加し、これは腫瘍量の増加に起因した可能性がある。

【図 3 3 A】H e p 3 B 細胞において濃度 0.6 μ g / m l 及び 2.0 μ g / m l でバイシストロン性構築物 Z F 9 - M Q 1 __ Z F 3 - K R A B により M Y C m R N A 発現が単一の構築物 (Z F 3 - K R A B 又は Z F 9 - M Q 1) 単独よりも大きい程度まで下方制御されたことを示す。バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 __ Z F 3 - K R A B により、0.6 μ g / m l 及び 2 μ g / m l の両方の濃度で総 M Y C m R N A レベルは 48 時間で 99 % 低下した。

【図 3 3 B】バイシストロン性構築物 Z F 9 - M Q 1 __ Z F 3 - K R A B により、H e p 3 B 細胞において細胞生存能力が単一の構築物 (Z F 3 - K R A B 又は Z F 9 - M Q 1) 単独よりも大きい程度まで下方制御されたことを示す。バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 __ Z F 3 - K R A B により、H e p 3 B 細胞の生存能力は 0.6 μ g / m l 及び 2 μ g / m l の両方の濃度でそれぞれ約 80 % 及び 27 % 低下した。

【図 3 4 - 1】(図 3 4 A) バイシストロン性構築物 Z F 9 - M Q 1 __ Z F 3 - K R A B により、H e p 3 B 細胞の M Y C m R N A 及び細胞生存能力が用量依存的に下方制御されたことを示す。(図 3 4 B) バイシストロン性構築物 Z F 9 - M Q 1 __ Z F 3 - K R A B により、H e p G 2 細胞の M Y C m R N A 及び細胞生存能力が用量依存的に下方制御されたことを示す。

【図 3 4 - 2】(図 3 4 C) バイシストロン性構築物 Z F 9 - M Q 1 __ Z F 3 - K R A B により、S K H E P 1 細胞の M Y C m R N A 及び細胞生存能力が用量依存的に下方制御されたことを示す。(図 3 4 D) バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 __ Z F 3 - K R A B バイシストロン性構築物 Z F 9 - M Q 1 __ Z F 3 - K R A B が、H C C S 1 及び S 2 の両方の亜型に対して有効であったことを示す。

【図 3 5】バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 __ Z F 3 - K R A B で 48 時間処理したとき、H e p 3 B 及び H e p G 2 細胞株に 75 % 超のアポトーシス細胞が検出され、S K - H E P - 1 細胞株に約 15 % のアポトーシス細胞が検出されたことを示す。未処理細胞と比較して (5 ~ 20 % のバックグラウンドアポトーシス)、細胞は非コード m R N A 対照の影響を受けなかった。

10

20

30

40

50

【図36】SKHEP1細胞において、バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB構築物による1回の処理後、MYC mRNAレベルは1日目に低下し、治療15日後まで抑えられたままであったことを示す。

【図37】Hep3B及びSKHEP1の両方の細胞株において、低分子非コードmRNA又は未処理細胞と比較したときバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB処理により6時間でMYC mRNA及びタンパク質発現が減少し、96時間後まで下がったままであったことを示す。

【図38】トランスフェクション後6時間及び24時間の両方の時点で、バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB mRNAによってコードされる両方のOEC ZF3-KRAB及びZF9-MQ1タンパク質について、ウエスタンブロットでHAタグにより可視化したことを示す。

【図39】(図39A)ソラフェニブを0.6 µg/mlバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABと組み合わせて投与したとき、SKHEP1におけるソラフェニブのIC50が12.3から10.7 µMに低下したことを示す。ソラフェニブを0.1 µg/mlバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABと組み合わせて投与したとき、SKHEP1細胞においてソラフェニブのIC50に有意な変化はなかった。

(図39B)ソラフェニブを0.6 µg/mlバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABと組み合わせて投与したとき、Hep3BにおけるソラフェニブのIC50が4.4から2.9 µMに低下したことを示す。ソラフェニブを0.1 µg/mlバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABと組み合わせて投与したとき、Hep3B細胞においてソラフェニブのIC50に有意な変化はなかった。

【図40】(図40A)それぞれ濃度0.6 µg/ml及び0.1 µg/mlのバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABで処理したとき、SKHEP1細胞におけるJQ1のIC50が低下したことを示す。(図40B)それぞれ濃度0.6 µg/ml及び0.1 µg/mlのバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABで処理したとき、Hep3B細胞におけるJQ1のIC50が低下したことを示す。

【図41A】未処理細胞と比較して、ZF17-MQ1が0.6及び1.2 µg/mlの両方の濃度でHepa1-6細胞におけるマウスMYC mRNA発現を下方制御することが可能であったことを示す。

【図41B】未処理細胞と比較して、ZF17-MQ1が0.6及び1.2 µg/mlの両方の濃度でマウスHepa1-6細胞の細胞生存能力を低下させることが可能であったことを示す。

【図42-1】(図42A)マウスHCC細胞Hepa1-6のZF17-MQ1処理により、24及び48時間でMYCタンパク質の有意な下方制御が示されたことを示す。

(図42B)マウスHCC細胞Hepa1-6のZF17-MQ1処理により、24及び48時間でMYCタンパク質の有意な下方制御が示されたことを示す。

【図42-2】(図42C)マウスHCC細胞Hepa1-6のZF17-MQ1処理により、96時間でMYC mRNAの有意な下方制御が示されたことを示す。(図42D)マウスHCC細胞Hepa1-6のZF17-MQ1処理により、96時間で細胞生存能力の有意な喪失が示されたことを示す。

【図43】4用量と、続く2週間の休薬期間後に、ZF17-MQ1によって動物腫瘍量が有意に低下し、マウスを再びZF17-MQ1で治療すると、約4週間後に完全な腫瘍枯渇が得られたことを示す。

【図44】(図44A)ZF17-MQ1で処理した細胞が、未処理細胞又はGFP処理細胞と比較して、LL2細胞におけるMYCタンパク質レベルの低下を示したことを示す。

(図44B)未処理細胞で観察されるレベルと比較して、ZF17-MQ1及びZF16-MQ1により、LL2細胞におけるMYC mRNAレベルがそれぞれ99.9%超又は74%低下したことを示す。(図44C)3つ全ての構築物、ZF15-MQ1、ZF16-MQ1、及びZF17-MQ1が、LL2細胞の細胞生存能力を未処理細胞及びGFP処理細胞よりも大きい程度まで低下させることが可能であったことを示す

10

20

30

40

50

。

【図45】（図45A）ZF17-MQ1により、 $1.25\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ の両方の濃度でMYC mRNAレベルが低下したことを示す。未処理細胞で観察されるレベルと比較して、 $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ のZF17-MQ1では、LL2及びCT26細胞におけるMYC mRNAレベルがそれぞれ93%及び85%低下した。（図45B）ZF17-MQ1により、両方の濃度で細胞生存能力が低下したことを示す。未処理細胞と比較して、これらの条件下では、ZF17-MQ1により、LL2及びCT26細胞の細胞生存能力がそれぞれ87%及び93%低下した。

【図46】ZF17-MQ1によりMYC mRNAが下方制御されたとともに、CMT167及びLL2細胞の細胞生存能力が未処理細胞及びGFP処理細胞（陰性対照）よりも大きい程度まで低下することを示す。未処理細胞で観察されるレベルと比較して、ZF17-MQ1により、CMT167及びLL2細胞におけるMYC mRNAレベルがそれぞれ62%及び73%低下した。さらには、未処理細胞と比較して、これらの条件下では、ZF17-MQ1により、CMT167及びLL2細胞の細胞生存能力がそれぞれ54%及び57%低下した。

【図47】ZF9-MQ1により、初代小気道上皮細胞、初代肺葉上皮細胞、及び初代肺線維芽細胞のMYC mRNAレベルが未処理細胞と比較してそれぞれ94%、96%、96%レベルだけ下方制御されたことを示す。しかしながら、生存能力は、対照細胞と比較して16%、9%、及び22%低下したに過ぎなかった。

【図48】（図48A）ZF9-MQ1及びJQ1が、各々別個に、A549細胞の細胞生存能力を阻害したことを示す。（図48B）ZF9-MQ1（ $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ ）及びJQ1（最高 $6.25\mu\text{M}$ までの濃度）が、A549生存能力の阻害に対し、その個別の活性によって予測されたものよりも大きい相加を上回る効果を示したことを示す。

（図48C）ZF9-MQ1（ $1.0\mu\text{g}/\text{mL}$ ）及びJQ1（最高 $6.25\mu\text{M}$ までの濃度）が、A549生存能力の阻害に対し、その個別の活性によって予測されたものよりも大きい相加を上回る効果を示したことを示す。

【図49】（図49A）ZF9-MQ1及びBET762が、各々別個に、A549細胞の細胞生存能力を阻害したことを示す。（図49B）ZF9-MQ1（ $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ ）及びBET762（最高 $1.25\mu\text{M}$ までの濃度）が、A549生存能力の阻害に対し、その個別の活性によって予測されたものよりも大きい相加を上回る効果を示したことを示す。（図49C）ZF9-MQ1（ $1.0\mu\text{g}/\text{mL}$ ）及びBET762（最高 $0.625\mu\text{M}$ までの濃度）が、A549生存能力の阻害に対し、その個別の活性によって予測されたものよりも大きい相加を上回る効果を示したことを示す。

【図50】（図50A）ZF9-MQ1及びピラブレシブが、各々別個に、A549細胞の細胞生存能力を阻害したことを示す。（図50B）ZF9-MQ1（ $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ ）及びピラブレシブ（最高 $0.625\mu\text{M}$ までの濃度）が、A549生存能力の阻害に対し、その個別の活性によって予測されたものよりも大きい相加を上回る効果を示したことを示す。（図50C）ZF9-MQ1（ $1.0\mu\text{g}/\text{mL}$ ）及びピラブレシブ（最高 $0.313\mu\text{M}$ までの濃度）が、A549生存能力の阻害に対し、その個別の活性によって予測されたものよりも大きい相加を上回る効果を示したことを示す。

【図51】（図51A）ZF9-MQ1及びトラメチニブが、各々別個に、A549細胞の細胞生存能力を阻害したことを示す。（図51B）ZF9-MQ1（ $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ ）及びトラメチニブ（最高 $0.05\mu\text{M}$ までの濃度）が、A549生存能力の阻害に対し、その個別の活性によって予測されたものよりも大きい相加を上回る効果を示したことを示す。（図51C）ZF9-MQ1（ $1.0\mu\text{g}/\text{mL}$ ）及びトラメチニブ（最高 $0.05\mu\text{M}$ までの濃度）が、A549生存能力の阻害に対し、その個別の活性によって予測されたものよりも大きい相加を上回る効果を示したことを示す。

【図52-1】（図52A）構築物ZF9-MQ1、ZF54-KRAB、ZF67-KRAB、及びZF68-KRABが全て、処理72時間後にH2009細胞のMYC mRNAレベルを未処理細胞と比較して少なくとも42%下方制御することが可能であった

ことを示す。(図52B)構築物ZF9-MQ1、ZF67-KRAB、及びZF68-KRABが、処理72時間後にH226細胞のMYC mRNAレベルを未処理細胞と比較して少なくとも27%下方制御することが可能であったことを示す。

【図52-2】構築物ZF9-MQ1及びZF54-KRABが両方とも、処理72時間後にH226細胞のMYC mRNAレベルを未処理細胞と比較して少なくとも27%下方制御することが可能であったことを示す。

【図52-3】構築物ZF9-MQ1、ZF61-KRAB、ZF67-KRAB、及びZF68-KRABが、処理72時間後にH460細胞のMYC mRNAレベルを未処理細胞と比較して少なくとも26%下方制御することが可能であったことを示す。

【図53】試験した最も高い濃度では、ZF9-MQ1及びZF54-KRABにより、各々別個に、H2009細胞のMYC mRNAが未処理対照細胞と比べてそれぞれ99%又は62%下方制御されたことを示す。0.313 μ g/mL未満のZF9-MQ1を1又は2 μ g/mL ZF54-KRABと組み合わせたとき、MYC mRNAはいずれかの治療単独について観察されるよりも大きい程度まで下方制御される。

【図54】ZF9-MQ1により、H1299細胞のMYC mRNAが48時間までに未処理対照細胞と比べて95%下方制御され、下方制御は144時間で対照レベルの90%に維持されていたことを示す。ZF9-MQ1+ZF54-KRABの組み合わせにより、MYC mRNAレベルは48時間で98%にまで低下し、下方制御は144時間で対照レベルの93%までに維持されていた(図54)。さらに、このデータは、ZF9-MQ1及びZF9-MQ1をZF54-KRABと組み合わせると、H1299細胞のMYC mRNAレベルが少なくとも6日間にわたって下方制御されたことを示した。

【図55】H2009細胞への導入から24時間後、ZF9-MQ1及びZF54-KRABによりMYC mRNAレベルが未処理細胞と比較して最大でそれぞれ83%及び55%下方制御されたことを示す。MYC mRNAレベルはさらに、処理の48時間後にZF9-MQ1処理細胞において未処理対照の96%にまでさらに13%低下したが、一方、ZF54-KRABではMYCレベルのさらなる下方制御はない。ZF9-MQ1—ZF54-KRAB及びZF54-KRAB—ZF9-MQ1で処理した細胞のMYC mRNAレベルは、処理後24時間で対照細胞のそれぞれ95%及び96%にまで低下した。このデータから、これらの対照薬がMYC mRNAレベルをZF9-MQ1よりも早く低下させることが可能であったため、H2009細胞において24時間でZF9-MQ1処理細胞と比較した処理細胞におけるより高度なMYC下方制御につながったことが指摘される。

【図56】ZF9-MQ1治療により、H460皮下腫瘍モデルの腫瘍成長がソラフェニブの誘導による腫瘍成長阻害と比較して同程度又はそれより高度に阻害されたことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0593】

本開示は、例えば、対象又は患者の細胞における標的遺伝子、例えば、MYCの発現を、本明細書に記載の発現リプレッサー又はシステムを用いて調節する、例えば、低減する技術を提供する。

【0594】

多くの異なる疾患及び症候群が、癌、自己免疫、心血管疾患、及び肥満を含め、遺伝子発現の誤調節によって引き起こされ得る。特に、転写因子の過剰発現が腫瘍発生に寄与することは長らく公知であり、最近の研究では、発癌性転写因子の過剰発現によって細胞の中心的な自己調節回路が変化し得ることが指摘されている。

【0595】

転写因子及び細胞マスターレギュレーターであるMYCは、50%を超えるヒト癌で高頻度に調節不全を示し、腫瘍形成過程のほとんど全ての側面で中心的な役割を果たす。初期応答遺伝子を除けば、MYCは典型的には遺伝子発現を上方調節する。MYCは、増幅される頻度が最も高い癌遺伝子であり、その遺伝子産物の発現上昇は、腫瘍による攻撃及

10

20

30

40

50

び臨床転帰の不良に関連する。c-MYCのレベルが上昇すると、広範囲にわたる組織で腫瘍発生が促進され得る。ほとんどの腫瘍細胞が、その成長及び増殖に関して転写因子c-MYCに依存している。MYCの過剰発現はまた、慢性肝疾患、例えば、ウイルス関連及びアルコール関連肝疾患にも関連する。MYCの過剰発現レベルは、具体的な癌の亜型で異なる。理論によって拘束されることを望むものではないが、MYC誤調節障害を患っている対象における（例えば、全体的な、又は特定の1つ又は複数の標的組織における）MYCのレベルを調節する、例えば、低減すると、又はMYC誤調節障害の症状を軽減し得る、又は取り除き得ると考えられている。

【0596】

本開示は、一部には、標的遺伝子プロモータ、例えば、MYCプロモータに結合する又は標的遺伝子、例えば、MYC遺伝子に作動可能に連結したターゲティング部分と、ターゲティング部分によって局在したとき標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節する（例えば、低減する）ことができるエフェクター部分とを含む発現リプレッサーを提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した発現制御エレメント（例えば、プロモータ又はエンハンサー、リプレッサー又はサイレンサー）にターゲティング部分を介して特異的に結合し、及びエフェクター部分が標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCを含むアンカー配列媒介接合部（ASMC）のアンカー配列に、又はアンカー配列に近接した配列にターゲティング部分を介して特異的に結合し、及びエフェクター部分が標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCのスーパーエンハンサー領域に位置するゲノム遺伝子座に特異的に結合し、及びエフェクター部分が標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節する。

【0597】

本開示は、一部には、ターゲティング部分と任意選択でエフェクター部分とを各々が含む2つ以上の発現リプレッサーを含む発現抑制システムをさらに提供する。いくつかの実施形態では、これらのターゲティング部分は、2つ以上の異なる配列をターゲティングする（例えば、各発現リプレッサーが異なる配列をターゲティングし得る）。いくつかの実施形態では、第1発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した転写調節エレメント（例えば、プロモータ又は転写開始部位（TSS））に結合し、第2発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCを含むアンカー配列媒介接合部（ASMC）のアンカー配列に結合する。いくつかの実施形態では、第1発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した転写調節エレメント（例えば、プロモータ又は転写開始部位（TSS））に結合し、第2発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した発現制御エレメント（例えば、エンハンサー、スーパーエンハンサー、リプレッサー、又はサイレンサー）に結合する。いくつかの実施形態では、第1発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCを含むアンカー配列媒介接合部（ASMC）のアンカー配列に結合し、第2発現リプレッサーは、標的遺伝子に作動可能に連結した発現制御エレメント（例えば、エンハンサー、スーパーエンハンサー、リプレッサー、又はサイレンサー）に結合する。概して、発現抑制システムによる標的遺伝子、例えば、MYCの発現の調節には、第1発現リプレッサー及び第2発現リプレッサーが、それぞれ第1及び第2のDNA配列に結合することが関わる。第1及び第2のDNA配列が結合すると、第1及び第2エフェクター部分の機能がそれらの部位に局在化する。理論によって拘束されることを望むものではないが、いくつかの実施形態では第1及び第2エフェクター部分（expressor moieties）の両方の機能を用いるため、第1及び／又は第2のDNA配列に関連する、又はそれを含む標的遺伝子の発現が安定に抑制され、例えば、ここで第1及び／又は第2のDNA配列は、標的遺伝子又は1つ以上の作動可能に連結された転写制御エレメントの配列であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーシステムは、バイシストロン性核酸配列によって

10

20

30

40

50

コードされる。

【0598】

本開示は、前記発現リプレッサー及び／又は発現リプレッサーシステムをコードする核酸、発現リプレッサー及び／又は発現リプレッサーシステムを含む組成物、及び前記核酸の送達方法をさらに提供する。さらに、本明細書に記載の発現リプレッサー又は発現リプレッサーシステムを使用して細胞の標的遺伝子発現、例えば、MYC遺伝子発現を増加させる方法が提供される。

【0599】

発現リプレッサー

本明細書に記載のとおり、本開示は、一部には、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節する、例えば、低減するための発現リプレッサーを提供する。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、標的遺伝子プロモータ、例えば、MYCプロモータに結合するターゲティング部分と、任意選択でエフェクター部分とを含み得る。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、標的DNA配列、例えば、MYC DNA配列に特異的に結合し、それによって発現リプレッサーの機能をDNA配列に局在化させる。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、ターゲティング部分と1つのエフェクター部分とを含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、ターゲティング部分と複数のエフェクター部分（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、又はそれ以上のエフェクタードメイン（及び任意選択で、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、又は2個未満のエフェクタードメイン））とを含む。

10

20

【0600】

発現リプレッサーは複数のエフェクター部分を含んでもよく、ここで各エフェクター部分は他のエフェクター部分と異なる機能を含む。例えば、発現リプレッサーは2つのエフェクター部分を含んでもよく、ここで第1エフェクター部分はDNAメチラーゼ機能を含み、第2エフェクター部分は転写リプレッサー機能を含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減することに関して機能が互いに補完的であるエフェクター部分を含み、ここでそれらの機能は一緒になって発現の阻害を実現し、任意選択で、個別に存在するときは発現を阻害しないか、又は無視できるほどしか阻害しない。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは複数のエフェクター部分を含み、ここで各エフェクター部分は互いのエフェクター部分と補完的であり、各エフェクター部分が標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減する。

30

【0601】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減することに関して機能が互いに相乗作用するエフェクター部分の組み合わせを含む。理論によって拘束されることを望むものではないが、いくつかの実施形態では、ゲノム遺伝子座へのエピジェネティック修飾は、複数の転写活性化エピジェネティックマーカー（例えば、複数の異なる種類のエピジェネティックマーカー及び／又はある所与の種類のより広範なマーキング）が個別に一緒になって個別の修飾単独よりも高い有効性で発現を阻害する（例えば、発現のより大きい低減及び／又は発現のより長く続く低減を生じさせる）という点で、累積的である。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは複数のエフェクター部分を含み、ここでは各エフェクター部分が互いのエフェクター部分と相乗作用し、例えば、各エフェクター部分が標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減する。いくつかの実施形態では、発現リプレッサー（互いに相乗作用する複数のエフェクター部分を含む）は、標的遺伝子、例えば、MYCの発現の阻害における有効性が、個別のエフェクター部分を含む発現リプレッサーよりも高い。いくつかの実施形態では、前記複数のエフェクター部分を含む発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCの発現の低減における有効性が、個別のエフェクター部分を含む発現リプレッサーの少なくとも1.05×（即ち、1.05倍）、1.1×、1.15×、1.2×、1.25×、1.3×、1.35×、1.4×、1.45×、1.5×、1.55×、1.6×、1.65×、1.7

40

50

×、1.75×、1.8×、1.85×、1.9×、1.95×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、20×、30×、40×、50×、60×、70×、80×、90×、又は100×である。

【0602】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、1つ以上のターゲティング部分、例えば、Casドメイン、TALEフェクタードメイン、又はZnフィンガードメインを含む。ある実施形態では、発現リプレッサーシステムが同じ種類の2つ以上のターゲティング部分、例えば、2つ以上のCasドメインを含むとき、それらのターゲティング部分は、2つ以上の異なる配列に特異的に結合する。例えば、2つ以上のCasドメインを含む発現リプレッサーシステムでは、2つ以上のCasドメインは、それらがその標的配列に対応するgRNAに限り認め得るほどに結合するように（例えば、且つ別のCasドメインの標的に対応するgRNAには認め得るほど結合しないように）選択され、又は改変されてもよい。

10

【0603】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、例えば、ペプチド結合によって共有結合的に連結されたターゲティング部分とエフェクター部分とを含む。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分とエフェクター部分とは同じポリペプチド鎖上に位置し、例えば、1つ以上のペプチド結合及び／又はリンカーによってつながっている。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、例えば、ペプチド結合及び／又はリンカーによって連結されたターゲティング部分とエフェクター部分とを含む融合分子であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、同じポリペプチド鎖上のエフェクター部分のN末端側に配置されるターゲティング部分を含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、同じポリペプチド鎖上のエフェクター部分のC末端側に配置されるターゲティング部分を含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、非ペプチド結合によって共有結合的に連結しているターゲティング部分とエフェクター部分とを含む。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、非ペプチド結合によってエフェクター部分にコンジュゲートしている。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーはターゲティング部分と複数のエフェクター部分とを含み、ここで、上記ターゲティング部分と上記複数のエフェクター部分とは、例えば、ペプチド結合によって共有結合的に連結している（例えば、ターゲティング部分及び複数のエフェクター部分は、全てが一連の共有結合によってつながっているが、但し各個別の部分が他の全てのエフェクター部分と共有結合性の結合を共有しているわけではないこともある）。

20

30

【0604】

他の実施形態では、発現リプレッサーは、共有結合的に連結していない、例えば、互いに非共有結合的に会合しているターゲティング部分とエフェクター部分とを含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、エフェクター部分に非共有結合的に結合しているターゲティング部分、又はその逆を含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーはターゲティング部分と複数のエフェクター部分とを含み、ここで、上記ターゲティング部分と少なくとも1つのエフェクター部分とは共有結合的に連結せず、例えば、互いと非共有結合的に会合し、及びここでターゲティング部分と少なくとも1つの他のエフェクター部分とは、例えば、ペプチド結合によって共有結合的に連結している。

40

【0605】

一般に、本明細書に記載のとおり発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCに近接した、及び／又はそれに作動可能に連結したゲノム配列エレメントに（例えば、ターゲティング部分を介して）結合する。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーがゲノム配列エレメントに結合すると、標的遺伝子、例えば、MYCの発現が調節される（例えば、減少する）。例えば、転写機構の成分を動員する、又はその動員を阻害するエフェクター部分を含む発現リプレッサーがゲノム配列エレメントに結合すると、標的遺伝子、例えば、MYCの発現が調節され得る（例えば、減少し得る）。さらなる例として、酵素活性を備えるエフェクター部分（例えば、エピジェネティック修飾部分）を含む発現リプレッ

50

レッサーが結合すると、エフェクター部分の酵素活性の局在化を通じて標的遺伝子、例えば、MYC)の発現が調節され得る(例えば、減少し得る)。さらなる例として、発現リプレッサーによるゲノム配列エレメントへの結合及び発現リプレッサーの酵素活性の局在化の両方が、結果として得られる標的遺伝子、例えば、MYCの発現の調節(例えば、減少)に寄与し得る。

【0606】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーはエフェクター部分を含み、ここで、上記エフェクター部分は、MQ1、DNMT1、DNMT3A1、DNMT3A2、DNMT3B1、DNMT3B2、DNMT3B3、DNMT3B4、DNMT3B5、DNMT3B6、DNMT3L、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8、HDAC9、HDAC10、HDAC11、SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6、SIRT7、SIRT8、SIRT9、KDM1A(即ち、LSD1)、KDM1B(即ち、LSD2)、KDM2A、KDM2B、KDM5A、KDM5B、KDM5C、KDM5D、KDM4B、NO66、SETDB1、SETDB2、EHMT2(即ち、G9A)、EHMT1(即ち、GLP)、SUV39H1、EZH2、EZH1、SUV39H2、SETD8、SUV420H1、SUV420H2、KRAB(例えば、KRABドメイン)、MeCP2、HP1、RBBP4、REST、FOG1、SUZ12又はその機能性変異体若しくは断片から選択されるタンパク質を含む。

10

【0607】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは第1エフェクター部分と第2エフェクター部分とを含み、ここで、上記第1エフェクター部分は、MQ1、DNMT1、DNMT3A1、DNMT3A2、DNMT3B1、DNMT3B2、DNMT3B3、DNMT3B4、DNMT3B5、DNMT3B6、DNMT3L、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8、HDAC9、HDAC10、HDAC11、SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6、SIRT7、SIRT8、SIRT9、KDM1A(即ち、LSD1)、KDM1B(即ち、LSD2)、KDM2A、KDM2B、KDM5A、KDM5B、KDM5C、KDM5D、KDM4B、NO66、SETDB1、SETDB2、EHMT2(即ち、G9A)、EHMT1(即ち、GLP)、SUV39H1、EZH2、EZH1、SUV39H2、SETD8、SUV420H1、SUV420H2、KRAB(例えば、KRABドメイン)、MeCP2、HP1、RBBP4、REST、FOG1、SUZ12又はその機能性変異体若しくは断片から選択されるタンパク質を含み、及び上記第2エフェクター部分は、MQ1、DNMT1、DNMT3A1、DNMT3A2、DNMT3B1、DNMT3B2、DNMT3B3、DNMT3B4、DNMT3B5、DNMT3B6、DNMT3L、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8、HDAC9、HDAC10、HDAC11、SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6、SIRT7、SIRT8、SIRT9、KDM1A(即ち、LSD1)、KDM1B(即ち、LSD2)、KDM2A、KDM2B、KDM5A、KDM5B、KDM5C、KDM5D、KDM4B、NO66、SETDB1、SETDB2、EHMT2(即ち、G9A)、EHMT1(即ち、GLP)、SUV39H1、EZH2、EZH1、SUV39H2、SETD8、SUV420H1、SUV420H2、KRAB(例えば、KRABドメイン)、MeCP2、HP1、RBBP4、REST、FOG1、SUZ12、又はその機能性変異体若しくは断片から選択される異なるタンパク質を含む。

20

30

40

【0608】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載のとおり発現リプレッサー、発現リプレッサーシステム、ターゲティング部分及び／又はエフェクター部分をコードする核酸配列を提供する。当業者は、RNAの核酸配列が、典型的にはチミン(T)がウラシル(U)によって置換されることを除き、対応するDNA配列と同一であることを認識し

50

ている。ヌクレオチド配列がDNA配列（例えば、A、T、G、Cを含む）によって表される場合、本開示はまた、「T」が「U」に置換される、対応するRNA配列（例えば、A、U、G、Cを含む）を提供する。本明細書では従来の表記法を使用して、ポリヌクレオチド配列を記述する：一本鎖ポリヌクレオチド配列の左端は、5'末端であり；二本鎖ポリヌクレオチド配列の左手方向は、5'方向と呼ばれる。

【0609】

遺伝暗号の縮重のために、本明細書に記載されるターゲティング部分及び／又はエフェクター部分を含む発現リプレッサーをコードする多数のヌクレオチド配列が産生され得るが、そのうちのいくつかは、本明細書に開示される核酸配列との類似性、例えば、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有することが当業者には理解されよう。例えば、コドンAGA、AGG、CGA、CGC、CGG、及びCGUは全て、アミノ酸アルギニンをコードする。従って、アルギニンがコドンにより指定される本発明の核酸分子中の全ての位置で、コドンは、コードされたポリペプチドを改変することなく、前述の対応するコドンのいずれかに改変され得る。

【0610】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分及び／又はエフェクター部分を含む発現リプレッサーをコードする核酸凝集は、哺乳動物、例えば、ヒトにおけるコドン使用頻度に従って最適化されたコドン最適化コード領域の一部又は全部であり得る。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分及び／又はエフェクター部分をコードする核酸凝集は、タンパク質発現を増加させる、及び／又はタンパク質発現の持続時間を増加させるために最適化されたコドンである。いくつかの実施形態では、コドン最適化核酸配列によって産生されるタンパク質は、コドン最適化されていない核酸配列によりコードされる場合のタンパク質のレベルと比較して、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、又は少なくとも50%高い。

【0611】

発現抑制システム

本開示の発現抑制システムは、2つ以上の発現リプレッサーを含み得る。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個、又はそれ以上の（及び任意選択で、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、又は2個以下の）発現リプレッサーを含む。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、2つ以上の異なる配列（例えば、第1及び第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、及び／又はそれ以上のDNA配列、及び任意選択で第20、第19、第18、第17、第16、第15、第14、第13、第12、第11、第10、第9、第8、第6、第5、第4、第3、又は第2以下の配列）をターゲティングする。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは複数の発現リプレッサーを含み、ここで、複数の発現リプレッサーの各メンバーは、複数の発現リプレッサーの別のメンバーに検出可能なほど結合せず、例えば、結合しない。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは第1発現リプレッサーと第2発現リプレッサーとを含み、ここで、上記第1発現リプレッサーは上記第2発現リプレッサーに検出可能なほど結合せず、例えば、結合しない。

【0612】

いくつかの実施形態では、本開示の発現抑制システムは2つ以上の発現リプレッサーを含み、ここで、上記発現リプレッサーは、組成物、医薬組成物、又は混合物中に一緒に存在する。いくつかの実施形態では、本開示の発現抑制システムは2つ以上の発現リプレッサーを含み、ここで、1つ以上の発現リプレッサーは少なくとも1つの他の発現リプレッサーと混合されない。例えば、発現抑制システムは第1発現リプレッサーと第2発現リプレッサーとを含んでもよく、ここで、細胞の核における第1発現リプレッサーの存在は、同じ細胞の核における第2発現リプレッサーの存在と重複せず、ここで、上記発現抑制システムは、第1及び第2発現リプレッサーが重複せずに存在することによってMYC遺伝

子の発現の減少を実現する。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、第1又は第2発現リプレッサー単独によって実現するMYC遺伝子の発現の減少と比較してより大きいMYC遺伝子の発現の減少を実現する。

【0613】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーシステムの発現リプレッサーは、各々が異なるターゲティング部分を含む（例えば、第1、第2、第3、又はそれ以上の発現リプレッサーが、各々、互いに異なるターゲティング部分を含む）。例えば、発現抑制システムは第1発現リプレッサーと第2発現リプレッサーとを含んでもよく、ここで上記第1発現リプレッサーは、第1ターゲティング部分（例えば、Cas9ドメイン、TALEエフェクタードメイン、又はZnフィンガードメイン）を含み、上記第2発現リプレッサーは、第1ターゲティング部分と異なる第2ターゲティング部分（例えば、Cas9ドメイン、TALEエフェクタードメイン、又はZnフィンガードメイン）を含む。いくつかの実施形態では、異なるとは、個別的な種類のターゲティング部分を含むこと、例えば、第1ターゲティング部分がCas9ドメインを含み、第2のDNAターゲティング部分がZnフィンガードメインを含むことを意味し得る。他の実施形態では、異なるとは、同じ種類のターゲティング部分の個別的な変異体を含むこと、例えば、第1ターゲティング部分が第1のCas9ドメイン（例えば、第1の種由来のもの）を含み、第2ターゲティング部分が第2のCas9ドメイン（例えば、第2の種由来のもの）を含むことを意味し得る。ある実施形態では、発現リプレッサーシステムが同じ種類の2つ以上のターゲティング部分、例えば、2つ以上のCas9又はZFドメインを含むとき、それらのターゲティング部分は、2つ以上の異なる配列に特異的に結合する。例えば、2つ以上のCas9ドメインを含む発現リプレッサーシステムでは、2つ以上のCas9ドメインは、それらがその標的配列に対応するgRNAに限り認め得るほどに結合するように（例えば、且つ別のCas9ドメインの標的に対応するgRNAには認め得るほど結合しないように）選択され、又は改変されてもよい。さらなる例において、2つ以上のエフェクター部分を含む発現リプレッサーシステムでは、2つ以上のエフェクター部分は、それらがその標的配列に限り認め得るほどに結合するように（例えば、且つ別のエフェクター部分の標的配列には認め得るほど結合しないように）選択され、又は改変されてもよい。

【0614】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーシステムは3つ以上の発現リプレッサーを含み、2つ以上の発現リプレッサーが同じターゲティング部分を含む。例えば、発現リプレッサーシステムは3つの発現リプレッサーを含んでもよく、ここで、第1及び第2発現リプレッサーは、両方とも第1ターゲティング部分を含み、第3の発現リプレッサーは第2の異なるターゲティング部分を含む。さらなる例について、発現リプレッサーシステムは4つの発現リプレッサーを含んでもよく、ここで、第1及び第2発現リプレッサーは、両方とも第1ターゲティング部分を含み、第3及び第4発現リプレッサーは第2の異なるターゲティング部分を含む。さらなる例について、発現リプレッサーシステムは5つの発現リプレッサーを含んでもよく、ここで、第1及び第2発現リプレッサーは、両方とも第1ターゲティング部分を含み、第3及び第4発現リプレッサーは、両方とも第2の異なるターゲティング部分を含み、第5発現リプレッサーは第3の異なるターゲティング部分を含む。上記に記載のとおり、異なるとは、異なる種類のターゲティング部分を含むこと又は同じ種類のターゲティング部分の個別的な変異体を含むことを意味し得る。

【0615】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーシステムの発現リプレッサーは、各々が異なるDNA配列に結合する（例えば、第1、第2、第3、又はそれ以上の発現リプレッサーが、各々、互いに異なるDNA配列に結合する）。例えば、発現抑制システムは第1発現リプレッサーと第2発現リプレッサーとを含んでもよく、ここで、上記第1発現リプレッサーは第1のDNA配列に結合し、上記第2発現リプレッサーは第2のDNA配列に結合する。いくつかの実施形態では、異なるとは、一方の発現リプレッサーが結合するDNA配列ともう一方の発現リプレッサーが結合するDNA配列との間に同一でない少なくとも

も1つの位置があること、又は一方の発現リプレッサーが結合するDNA配列に存在する少なくとも1つの位置であって、もう一方の発現リプレッサーが結合するDNA配列に存在しない位置があることを意味し得る。

【0616】

いくつかの実施形態では、第1のDNA配列が第1ゲノムDNA鎖上に位置してもよく、第2のDNA配列が第2ゲノムDNA鎖上に位置してもよい。いくつかの実施形態では、第1のDNA配列が第2のDNA配列と同じゲノムDNA鎖上に位置してもよい。

【0617】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーシステムは3つ以上の発現リプレッサーを含み、2つ以上の発現リプレッサーが同じDNA配列に結合する。例えば、発現リプレッサーシステムは3つの発現リプレッサーを含んでもよく、ここで第1及び第2発現リプレッサーは、両方とも第1のDNA配列に結合し、第3の発現リプレッサーは第2の異なるDNA配列に結合する。さらなる例について、発現リプレッサーシステムは4つの発現リプレッサーを含んでもよく、ここで、第1及び第2発現リプレッサーは、両方とも第1のDNA配列に結合し、第3及び第4発現リプレッサーは、両方とも第2のDNA配列に結合する。さらなる例について、発現リプレッサーシステムは5つの発現リプレッサーを含んでもよく、ここで、第1及び第2発現リプレッサーは、両方とも第1のDNA配列に結合し、第3及び第4発現リプレッサーは、両方とも第2のDNA配列に結合し、第5発現リプレッサーは第3のDNA配列に結合する。上記に記載のとおり、異なるとは、一方の発現リプレッサーが結合するDNA配列ともう一方の発現リプレッサーが結合するDNA配列との間に同一でない少なくとも1つの位置があること、又は一方の発現リプレッサーが結合するDNA配列に存在する少なくとも1つの位置であって、もう一方の発現リプレッサーが結合するDNA配列に存在しない位置があることを意味し得る。

【0618】

いくつかの実施形態では、発現抑制システムは2つ以上の（例えば、2つの）発現リプレッサーを含み、それらの発現リプレッサーのうちの複数（例えば、2つ）が、異なるDNA配列に結合するターゲティング部分を含む。かかる実施形態では、第1ターゲティング部分は第1のDNA配列に結合してもよく、第2のDNAターゲティング部分は第2のDNA配列に結合してもよく、ここで、第1及び第2のDNA配列は異なり、重複しない。一部のかかる実施形態では、第1のDNA配列は第2のDNA配列と少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、又は100塩基対（及び任意選択で、500、400、300、200、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、又は50塩基対以下）だけ離れている。一部のかかる実施形態では、第1のDNA配列は第2のDNA配列と1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、又は100塩基対以下だけ離れている（及び任意選択で、いかなる塩基対も離れていない、例えば、第1及び第2配列は互いに直接隣接している）。

【0619】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーシステムの発現リプレッサーは、各々が、異なるエフェクター部分を含む（例えば、第1、第2、第3、又はそれ以上の発現リプレッサーが、各々、互いに異なるエフェクター部分を含む）。例えば、発現抑制システムは第1発現リプレッサーと第2発現リプレッサーとを含んでもよく、ここで、上記第1発現リプレッサーは第1エフェクター部分（例えば、DNAメチルトランスフェラーゼ又はその機能性断片を含むもの）を含み、上記第2発現リプレッサーは、第1エフェクター部分と異なる第2エフェクター部分（例えば、転写リプレッサー（例えば、K R A B）又はその機能性断片を含むもの）を含む。いくつかの実施形態では、異なるとは、個別的な種類のエフェクター部分を含むことを意味し得る。他の実施形態では、異なるとは、同じ種類

のエフェクター部分の個別的な変異体を含むこと、例えば、第1エフェクター部分が第1のDNAメチルトランスフェラーゼ（例えば、第1部位特異性又はアミノ酸配列を有するもの）を含み、第2エフェクター部分が第2のDNAメチルトランスフェラーゼ（例えば、第2部位特異性又はアミノ酸配列を有するもの）を含むことを意味し得る。

【0620】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーシステムは、第1エフェクター部分を含む第1発現リプレッサーと第2エフェクター部分を含む第2発現リプレッサーとを含み、ここで、上記第1エフェクター部分は、MQ1、DNMT1、DNMT3A1、DNMT3A2、DNMT3B1、DNMT3B2、DNMT3B3、DNMT3B4、DNMT3B5、DNMT3B6、DNMT3L、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8、HDAC9、HDAC10、HDAC11、SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6、SIRT7、SIRT8、SIRT9、KDM1A（即ち、LSD1）、KDM1B（即ち、LSD2）、KDM2A、KDM2B、KDM5A、KDM5B、KDM5C、KDM5D、KDM4B、NO66、SETDB1、SETDB2、EHMT2（即ち、G9A）、EHMT1（即ち、GLP）、SUV39H1、EZH2、EZH1、SUV39H2、SETD8、SUV420H1、SUV420H2、KRAB、MeCP2、HP1、RBBP4、REST、FOG1、SUZ12又はその機能性変異体若しくは断片から選択されるタンパク質を含み、上記第2エフェクター部分は、MQ1、DNMT1、DNMT3A1、DNMT3A2、DNMT3B1、DNMT3B2、DNMT3B3、DNMT3B4、DNMT3B5、DNMT3B6、DNMT3L、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8、HDAC9、HDAC10、HDAC11、SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6、SIRT7、SIRT8、SIRT9、KDM1A（即ち、LSD1）、KDM1B（即ち、LSD2）、KDM2A、KDM2B、KDM5A、KDM5B、KDM5C、KDM5D、KDM4B、NO66、SETDB1、SETDB2、EHMT2（即ち、G9A）、EHMT1（即ち、GLP）、SUV39H1、EZH2、EZH1、SUV39H2、SETD8、SUV420H1、SUV420H2、KRAB、MeCP2、HP1、RBBP4、REST、FOG1、SUZ12、又はその機能性変異体若しくは断片から選択される異なるタンパク質を含む。

【0621】

いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分はDNAメチルトランスフェラーゼ活性（例えば、MQ1、DNMT1、DNMT3A1、DNMT3A2、DNMT3B1、DNMT3B2、DNMT3B3、DNMT3B4、DNMT3B5、DNMT3B6、DNMT3L、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片を含み、他のエフェクター部分は転写リプレッサー活性（例えば、KRAB、MeCP2、HP1、RBBP4、REST、FOG1、SUZ12、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片）を含み、第1又は第2エフェクター部分はヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分はヒストンデアセチラーゼ活性（例えば、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8、HDAC9、HDAC10、HDAC11、SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6、SIRT7、SIRT8、SIRT9、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片）を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分はヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分は、DNAメチルトランスフェラーゼ活性（例えば、MQ1、DNMT1、DNMT3A1、DNMT3A2、DNMT3B1、DNMT3B2、DNMT3B3、DNMT3B4、DNMT3B5、DNMT3B6、DNMT3L、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片）を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分はDNAメチルトランスフェラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分は転写リプレッサー活性を含む。いくつかの実施形態では第1又は第2エフェクター部分はヒストン

メチルトランスフェラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分は転写リプレッサー活性（例えば、K R A B、M e C P 2、H P 1、R B B P 4、R E S T、F O G 1、S U Z 1 2、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片）を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分が転写リプレッサー活性を含み、他のエフェクター部分が異なる転写リプレッサー活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がD N Aメチルトランスフェラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分が同じD N Aメチルトランスフェラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がD N Aメチルトランスフェラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分がヒストンデアセチラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がヒストンデメチラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分がD N Aメチルトランスフェラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分がD N Aデメチラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がヒストンデメチラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分が転写リプレッサー活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がヒストンデメチラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分が異なるヒストンデメチラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がヒストンデメチラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分が同じヒストンデメチラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がヒストンデアセチラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分がD N Aメチルトランスフェラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がヒストンデアセチラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分がD N Aデメチラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がヒストンデアセチラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分が異なるヒストンデアセチラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がヒストンデアセチラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分が同じヒストンデアセチラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がD N Aメチルトランスフェラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分がD N Aデメチラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がD N Aデメチラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分が転写リプレッサー活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がD N Aメチルトランスフェラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分が異なるD N Aメチルトランスフェラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がD N Aメチルトランスフェラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分が同じD N Aメチルトランスフェラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がD N Aデメチラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分が転写リプレッサー活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がD N Aデメチラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分が異なるD N Aデメチラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分がD N Aデメチラーゼ活性を含み、他のエフェクター部分が同じD N Aデメチラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分が転写リプレッサー活性を含み、他のエフェクター部分が異なる転写リプレッサー活性を含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2エフェクター部分が転写リプレッサー活性を含み、他のエフェクター部分が同じ転写リプレッサー活性を含む。

10

20

30

40

50

【0622】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーシステムは3つ以上の発現リプレッサーを含み、2つ以上の発現リプレッサーが同じD N Aターゲティング部分を含む。例えば、発現リプレッサーシステムは3つの発現リプレッサーを含んでもよく、ここで、第1及び第2発現リプレッサーは、両方とも第1エフェクター部分を含み、第3の発現リプレッサーは第2の異なるエフェクター部分を含む。さらなる例について、発現リプレッサーシステムは4つの発現リプレッサーを含んでもよく、ここで、第1及び第2発現リプレッサーは

、両方とも第1エフェクター部分を含み、第3及び第4発現リプレッサーは第2の異なるエフェクター部分を含む。さらなる例について、発現リプレッサーシステムは5つの発現リプレッサーを含んでもよく、ここで、第1及び第2発現リプレッサーは、両方とも第1エフェクター部分を含み、第3及び第4発現リプレッサーは、両方とも第2の異なるエフェクター部分を含み、第5発現リプレッサーは第3の異なるエフェクター部分を含む。上記に記載のとおり、異なるとは、異なる種類のエフェクター部分を含むこと、又は同じ種類のエフェクター部分の個別的な変異体を含むことを意味し得る。

【0623】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーシステムの2つ以上の（例えば、全ての）発現リプレッサーは、互いに共有結合的に会合しておらず、例えば、各発現リプレッサーは、いかなる他の発現リプレッサーとも共有結合的に会合していない。別の実施形態では、発現リプレッサーシステムの2つ以上の発現リプレッサーは、互いに共有結合的に会合している。ある実施形態では、発現抑制システムは、例えば、ペプチド結合及び任意選択でリンカーによってつながった、例えば、融合分子として、同じポリペプチド上に配置された第1発現リプレッサーと第2発現リプレッサーとを含む。いくつかの実施形態では、ペプチドは自己切断型ペプチド、例えば、T2A自己切断型ペプチドである。ある実施形態では、発現抑制システムは、非ペプチド結合によってつながっている、例えば、互いにコンジュゲートしている第1発現リプレッサーと第2発現リプレッサーとを含む。

【0624】

リンカー

本明細書に開示されるとおりの発現リプレッサー又は発現リプレッサーシステムは、1つ以上のリンカーを含み得る。リンカーは、ターゲティング部分をエフェクター部分につなぎ、エフェクター部分を別のエフェクター部分につなぎ、又はターゲティング部分を別のターゲティング部分につなぎ得る。リンカーは、化学結合、例えば、1つ以上の共有結合性の結合又は非共有結合性の結合であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは共有結合性である。いくつかの実施形態では、リンカーは非共有結合性である。いくつかの実施形態では、リンカーはペプチドリンカーである。かかるリンカーは、2～30、5～30、10～30、15～30、20～30、25～30、2～25、5～25、10～25、15～25、20～25、2～20、5～20、10～20、15～20、2～15、5～15、10～15、2～10、5～10、又は2～5アミノ酸長、又は2、5、10、15、20、25、又は30アミノ酸長以上（及び任意選択で50、40、30、25、20、15、10、又は5アミノ酸長以下）であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーを使用して第1ドメイン又は部分を第2ドメイン又は部分と隔てる、例えば、DNAターゲティング部分をエフェクター部分と隔てることができる。いくつかの実施形態では、例えば、リンカーをDNAターゲティング部分とエフェクター部分との間に位置決めして、例えば、二次及び三次構造の分子柔軟性を提供することができる。リンカーは、本明細書に記載のフレキシブル、リジッド、及び／又は切断可能リンカーを含み得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、少なくとも1つのグリシン、アラニン、及びセリンアミノ酸を含むことにより柔軟性を提供する。いくつかの実施形態では、リンカーは、負電荷のスルホン酸基、ポリエチレングリコール（PEG）基、又はピロリン酸ジエステル基を含むなど、疎水性リンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは切断可能であり、調節剤から部分（例えば、ポリペプチド）を選択的に放出するが、早まった切断を防ぐには十分に安定している。

【0625】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサーの1つ以上の部分及び／又はドメインは、1つ以上のリンカーと連結される。いくつかの実施形態では、発現抑制は、ターゲティング部分とエフェクター部分との間に位置するリンカーを含み得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、ASGSGGGSGGARD（配列番号137）、又はASGSGGGSGG（配列番号138）の配列を有し得る。いくつかの実施形態では、第1及び第2リプレッサーを含むシステムは、第1ターゲティング部分と第1エフェク

10

20

30

40

50

ター部分との間に位置する第1リンカーと、第2ターゲティング部分と第2エフェクター部分との間に位置する第2リンカーとを含み得る。いくつかの実施形態では、第1及び第2リンカーは同一であり得る。いくつかの実施形態では、第1及び第2リンカーは異なり得る。いくつかの実施形態では、第1リンカーは、配列番号137に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を含んでもよく、第2リンカーは、配列番号138に係るアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性の配列を含んでもよい。

【0626】

当業者には公知であろうとおり、一般的に用いられるフレキシブルリンカーは、主に一続きのGly及びSer残基（「GS」リンカー）からなる配列を有する。フレキシブルリンカーは、ある程度の動き又は相互作用を必要とするドメイン／部分をつなぎ合わせるのに有用であってよく、小さい非極性の（例えば、Gly）又は極性の（例えば、Ser又はThr）アミノ酸を含み得る。Ser又はThrを取り込むと、水分子との水素結合の形成によって水溶液中でのリンカーの安定性もまた維持することができ、従ってリンカーと部分／ドメインとの間の好ましくない相互作用を低減することができる。いくつかの実施形態では、リンカーは、GSリンカー又はその変異体、例えば、G4S（配列番号207）である。

【0627】

リジッドリンカーは、ドメイン／部分間を一定の距離に保ち、その独立した機能を維持するのに有用である。リジッドリンカーはまた、融合体内の1つ以上の成分の安定性又は生物活性を確保するのにドメインが空間的に離れていることが決定的に重要であるときにも有用であり得る。リジッドリンカーは、 α ヘリックス構造又はProリッチ配列、（XP）_n（式中、Xは、任意のアミノ酸、好ましくはAla、Lys、又はGluを意味する）を有し得る。

【0628】

切断可能リンカーは、インビボで遊離機能性ドメインを放出し得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、還元試薬又はプロテアーゼの存在など、特別な条件下で切断されてもよい。インビボ切断可能リンカーは、ジスルフィド結合の可逆的な性質を利用し得る。一例としては、2つのCys残基間にあるトロンビン感受性配列（例えば、PRS）が挙げられる。インビトロでCPRSC残基をトロンビン処理すると、トロンビン感受性配列の切断が起こる一方、可逆的なジスルフィド結合はインタクトなまま残る。かかるリンカーは公知であり、例えば、Chen et al. 2013. Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. Adv Drug Deliv Rev. 65 (10): 1357-1369に記載されている。融合体内のリンカーのインビボ切断もまた、インビボである種の条件下に、特異的細胞又は組織で発現するか、又はある種の細胞内コンパートメントの中に拘束されているプロテアーゼによって行われ得る。多くのプロテアーゼの特異性は、拘束されているコンパートメントでのリンカーの切断の遅れをもたらす。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、自己切断型リンカー、例えば、T2Aペプチドリンカーであり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、「リボソームスキッピング」配列、例えば、tPT2Aリンカーを含み得る。

【0629】

本明細書に記載のリンカーにおける使用に好適な分子の例としては、負電荷スルホン酸基；脂質、例えば、ポリ（-CH₂-）炭化水素鎖、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）基、その不飽和変異体、そのヒドロキシル化変異体、そのアミド化されるか、又はその他の形でNを含有する変異体；無炭素リンカー；炭水化物リンカー；リン酸ジエステルリンカー、又は発現リプレッサーの2つ以上の成分を共有結合的に連結することができる他の分子が挙げられる。非共有結合性のリンカー、例えば、ロイシン、イソロイシン、バリン、又は恐らくはまたアラニン、フェニルアラニンも、又はさらにはチロシン、メチオニン、グリシンまでも、又は他の疎水性残基に富む一連の残基など、ポリペプチドの

疎水性領域又はポリペプチドの疎水性伸長部を通じてポリペプチドが連結する疎水性脂質小球などもまた含まれる。発現リプレッサーの成分は、発現リプレッサーの正電荷成分が別の成分の負電荷に連結するなど、電荷に基づくケミストリーを用いて連結されてもよい。

【0630】

ターゲティング部分

本開示は、例えば、標的遺伝子にある、それに近接した、及び／又はそれに作動可能に連結したゲノム配列エレメント（例えば、プロモータ、TSS、又はアンカー配列）を特異的にターゲティングする、例えば、結合するターゲティング部分を含む発現リプレッサーを提供する。ターゲティング部分は、DNA配列、例えば、標的遺伝子、例えば、MYCに関連するDNA配列を特異的に結合し得る。DNA配列を特異的に結合する任意の分子又は化合物をターゲティング部分として使用し得る。

10

【0631】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、ゲノム複合体（例えば、ASMC）の成分をターゲティングし、例えば、それに結合する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、標的遺伝子に作動可能に連結した発現制御配列（例えば、プロモータ又はエンハンサー）をターゲティングし、例えば、それに結合する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、標的遺伝子、又は標的遺伝子の一部をターゲティングし、例えば、それに結合する。ターゲティング部分の標的は、その標的化成分と呼ばれ得る。標的化成分は、標的遺伝子に作動可能に連結した任意のゲノム配列要素、又は標的遺伝子自体であってもよく、限定はされないが、プロモータ、エンハンサー、アンカー配列、エキソン、イントロン、UTRコード配列、スプライス部位、又は転写開始部位を含む。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、1つ以上の標的アンカー配列（例えば、細胞内）に特異的に結合し、非標的アンカー配列（例えば、同じ細胞内）には結合しない。

20

【0632】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、CRISPR/Casドメイン、TALEエフェクタードメイン、Znフィンガードメイン、ペプチド核酸（PNA）又は核酸分子であり得るか、又はそれを含み得る。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは1つのエフェクター部分を含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは複数のターゲティング部分を含み、ここで、各ターゲティング部分は、別のターゲティング部分に検出可能なほど結合せず、例えば、結合しない。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、複数の発現リプレッサーを含み、ここで、複数の発現リプレッサーの各メンバーは、ターゲティング部分を含み、ここで、各ターゲティング部分は、別のターゲティング部分に検出可能に結合せず、例えば、結合しない。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、第1ターゲティング部分を含む第1発現リプレッサーと、第2ターゲティング部分を含む第2発現リプレッサーとを含み、ここで、第1ターゲティング部分は、第2ターゲティング部分に検出可能に結合せず、例えば、結合しない。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、第1ターゲティング部分を含む第1発現リプレッサーと、第2ターゲティング部分を含む第2発現リプレッサーとを含み、ここで、第1ターゲティング部分は、別の第1ターゲティング部分に検出可能に結合せず、例えば、結合せず、また、第2ターゲティング部分は、別の第2ターゲティング部分に検出可能に結合せず、例えば、結合しない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるターゲティング部分は、単量体、例えば、非二量体状態で機能性である（例えば、配列に結合する）。

30

40

【0633】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分が標的化成分に結合すると、別の転写因子、ゲノム複合体成分、又はゲノム配列要素に対する標的化成分の結合親和性を低下させる。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、500、450、400、350、300、250、200、150、100、50、40、30、20、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.

50

3、0、2、0、1、0、09、0、08、0、07、0、06、0、05、0、04、0、03、0、02、0、01、0、005、0、002、又は0、001 nM以下のK_D（及び任意選択で、少なくとも50、40、30、20、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0、9、0、8、0、7、0、6、0、5、0、4、0、3、0、2、0、1、0、09、0、08、0、07、0、06、0、05、0、04、0、03、0、02、0、01、0、005、0、002、又は0、001 nMのK_D）でその標的配列に結合する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、0、001 nM～500 nM、例えば、0、1 nM～5 nM、例えば、約0、5 nMのK_Dでその標的配列に結合する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、少なくとも500、600、700、800、900、1000、2000、5000、10,000、又は100,000 nMのK_Dで非標的配列に結合する（及び任意選択で、非標的配列に、認め得るほどに結合しない）。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、非標的配列に結合しない。

10

【0634】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、標的化成分に相補的な核酸配列、例えば、標的遺伝子、例えば、MYCの調節エレメント（例えば、プロモータ又はエンハンサー）を含む。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、標的化成分と少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、又は100%相補的である核酸配列を含む。

20

【0635】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、CRISPR/Casドメイン、TALEエフェクタードメイン、Znフィンガードメイン、又は核酸分子であり得るか、又はそれを含み得る。

【0636】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーのターゲティング部分は、100、90、80、70、60、50、40、30、又は20以下のヌクレオチド（及び任意選択的に、少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、又は90のヌクレオチド）を含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサー又は融合分子のエフェクター部分は、2000、1900、1800、1700、1600、1500、1400、1300、1200、1100、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、又は100以下のアミノ酸（及び任意選択的に、少なくとも50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、又は1900のアミノ酸）を含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサー又は融合分子のエフェクター部分は、100～2000、100～1900、100～1800、100～1700、100～1600、100～1500、100～1400、100～1300、100～1200、100～1100、100～1000、100～900、100～800、100～700、100～600、100～500、100～400、100～300、100～200、200～2000、200～1900、200～1800、200～1700、200～1600、200～1500、200～1400、200～1300、200～1200、200～1100、200～1000、200～900、200～800、200～700、200～600、200～500、200～400、200～300、300～2000、300～1900、300～1800、300～1700、300～1600、300～1500、300～1400、300～1300、300～1200、300～1100、300～1000、300～900、300～800、300～700、300～600、300～500、300～400、400～2000、400～1900、400～1800、400～1700、400～1600、400～1500、400～1400、400～1300、400～1200、400～1100、400～1000、400～900、400～800、400～700

30

40

50

0、400～600、400～500、500～2000、500～1900、500～1800、500～1700、500～1600、500～1500、500～1400、500～1300、500～1200、500～1100、500～1000、500～900、500～800、500～700、500～600、600～2000、600～1900、600～1800、600～1700、600～1600、600～1500、600～1400、600～1300、600～1200、600～1100、600～1000、600～900、600～800、600～700、700～2000、700～1900、700～1800、700～1700、700～1600、700～1500、700～1400、700～1300、700～1200、700～1100、700～1000、700～900、700～800、800～2000、800～1900、800～1800、800～1700、800～1600、800～1500、800～1400、800～1300、800～1200、800～1100、800～1000、800～900、900～2000、900～1900、900～1800、900～1700、900～1600、900～1500、900～1400、900～1300、900～1200、900～1100、900～1000、1000～2000、1000～1900、1000～1800、1000～1700、1000～1600、1000～1500、1000～1400、1000～1300、1000～1200、1000～1100、1100～2000、1100～1900、1100～1800、1100～1700、1100～1600、1100～1500、1100～1400、1100～1300、1100～1200、1200～2000、1200～1900、1200～1800、1200～1700、1200～1600、1200～1500、1200～1400、1200～1300、1300～2000、1300～1900、1300～1800、1300～1700、1300～1600、1300～1500、1300～1400、1400～2000、1400～1900、1400～1800、1400～1700、1400～1600、1400～1500、1500～2000、1500～1900、1500～1800、1500～1700、1500～1600、1600～2000、1600～1900、1600～1800、1600～1700、1700～2000、1700～1900、1700～1800、1800～2000、1800～1900、又は1900～2000アミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【0637】

本明細書に開示されるとおりの発現リプレッサー又はリプレッサー (expressor) を含むシステムは、核酸、例えば、1つ以上の核酸を含み得る。用語「核酸」は、オリゴヌクレオチド鎖であるか、又はそれに取り込まれることのできる任意の化合物を指す。いくつかの実施形態では、核酸は、オリゴヌクレオチド鎖であるか、又はそれにリン酸ジエステル結合を介して取り込まれることのできる化合物及び／又は物質である。文脈から明らかであろうとおり、いくつかの実施形態では、「核酸」は、個別の核酸残基 (例えば、ヌクレオチド及び／又はヌクレオシド) を指す；いくつかの実施形態では、「核酸」は、個別の核酸残基を含むオリゴヌクレオチド鎖を指す。いくつかの実施形態では、「核酸」は、RNAであるか、又はそれを含む；いくつかの実施形態では、「核酸」は、DNAであるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、50%超がリボヌクレオチドであるか、又はそれを含み、本明細書ではリボ核酸 (RNA) と称される。いくつかの実施形態では、核酸は、1つ以上の天然の核酸残基であるか、それを含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、核酸は、1つ以上の核酸類似体であるか、それを含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、核酸類似体は、それがリン酸ジエステル骨格を利用しない点で核酸と異なる。例えば、いくつかの実施形態では、核酸は、1つ以上の「ペプチド核酸」であるか、それを含むか、又はそれからなり、これは当技術分野において公知であり、骨格にリン酸ジエステル結合の代わりにペプチド結合を有し、本発明の範囲内にあると見なされる。これに代わり、又は加えて、いくつかの実施形態では、核酸は、リン酸ジエステル結合ではなく、1つ若しくは複数のホスホロチオエート及び／又は5'-N-ホスホロアミダイト結合を有する。いくつかの実施形態では、核酸は

、1つ若しくは複数の天然ヌクレオシド（例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、及びデオキシシチジン）であるか、それを含むか、又はそれから構成される。いくつかの実施形態では、核酸は、1つ若しくは複数のヌクレオシドアナログ（例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロ-ピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、0(6)-メチルグアニン、2-チオシチジン、メチル化塩基、介在塩基、及びそれらの組合せ）であるか、それを含むか、又はそれから構成される。いくつかの実施形態では、核酸は、天然の核酸に存在するものと比較して、1つ若しくは複数の修飾糖（例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、及びヘキソース）を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、RNA又はタンパク質などの機能性遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、核酸は、1つ又は複数のイントロンを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、天然の供給源からの単離、相補性鋳型に基づく重合による酵素合成（インビボ若しくはインビトロ）、組換え細胞若しくは系中での生殖、及び化学合成のうちの1つ又は複数により調製される。本明細書で用いられるとき、「組換え」は、核酸を記載するために使用されるとき、天然に存在しない任意の核酸を指す。いくつかの実施形態では、核酸は、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000残基長又はそれ以上である。いくつかの実施形態では、核酸は、約2～約5000nt、約10～約100nt、約50～約150nt、約100～約200nt、約150～250nt、約200～約300nt、約250～約350nt、約300～約500nt、約10～約1000nt、約50～約1000nt、約100～約1000nt、約1000～約2000nt、約2000～約3000nt、約3000～約4000nt、約4000～約5000nt、又はそれらの間の任意の範囲の長さを有し得る。いくつかの実施形態では、核酸は、一部が、又は完全に一本鎖であり；いくつかの実施形態では、核酸は、一部が、又は完全に二本鎖である。いくつかの実施形態では、核酸は、ポリペプチドをコードするか、又はポリペプチドをコードする配列の補体である少なくとも1つのエレメントを含むヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、核酸は、酵素活性を有する。

【0638】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、核酸配列、タンパク質、タンパク質融合体、又は膜輸送ポリペプチドを含むか、又はそれである。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、外因性接合部核形成分子、接合部核形成分子をコードする核酸、又は配列ターゲティングポリペプチドと接合部核形成分子との融合体から選択される。接合部核形成分子は、例えば、CTCF、コヒーシン、USF1、YY1、TATAボックス結合タンパク質関連因子3（TAF3）、ZNF143結合モチーフであり得る。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、ポリマー又はポリマー部分、例えば、ヌクレオチドのポリマー（オリゴヌクレオチドなど）、ペプチド核酸、ペプチド-核酸ミックスマー、ペプチド又はポリペプチド、ポリアミド、炭水化物等を含むか、又はそれである。

【0639】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、核酸を含むか、又はそれである。いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、核酸を含むか、又はそれである。いくつか

の実施形態では、部分に含まれ得る核酸は、DNA、RNA、及び／又は人工若しくは合成核酸又は核酸アナログ若しくは模倣物であってもよいし、或いはそれを含有してもよい。例えば、いくつかの実施形態では、核酸は、以下：ゲノムDNA（gDNA）、相補的DNA（cDNA）、ペプチド核酸（PNA）、ペプチド-核酸mixmer、ペプチドオリゴヌクレオチドコンジュゲート、ロック核酸（LNA）、架橋核酸（BNA）、ポリアミド、トリプレックス形成オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、tRNA、mRNA、rRNA、miRNA、gRNA、siRNA若しくは他のRNA分子（例えば、本明細書に記載されるノンコーディングRNAをターゲティングするもの、及び／又は本明細書に記載される標的化ゲノム複合体に関連する特定の遺伝子の発現産物をターゲティングするもの）などのうちの1つ若しくは複数であるか、又はそれを含み得る。調節剤における使用に好適な核酸配列として、修飾オリゴヌクレオチド（例えば、化学修飾、例えば、骨格連結、糖分子、及び／若しくは核酸塩基を変更する修飾など）、並びに／又は人工核酸を挙げることができる。いくつかの実施形態では、核酸配列として、限定されないが、ゲノムDNA、cDNA、ペプチド核酸（PNA）若しくはペプチドオリゴヌクレオチドコンジュゲート、ロック核酸（LNA）、架橋核酸（BNA）、ポリアミド、トリプレックス形成オリゴヌクレオチド、修飾DNA、アンチセンスDNAオリゴヌクレオチド、tRNA、mRNA、rRNA、修飾RNA、miRNA、gRNA、及びsiRNA又は他のRNA若しくはDNA分子が挙げられる。いくつかの実施形態では、核酸は、天然に存在するDNA又はRNA残基ではない1つ若しくは複数の残基を含んでもよく、リン酸ジエステル結合ではない1つ若しくは複数の連結（例えば、ホスホロチオエート結合などであり得る）を含んでもよく、且つ／又は例えば、2'-OmePといった2'-O修飾などの1つ若しくは複数の修飾を含んでもよい。合成核酸を調製するのに有用な種々の核酸構造は当技術分野で公知であり（例えば、国際公開第2017/062862号パンフレット及び同第2014/012081号パンフレットを参照）、当業者は、これらが、本開示に従って使用され得ることを理解されよう。

10

20

30

40

50

【0640】

核酸のいくつかの例としては、限定はされないが、標的遺伝子、例えば、MYCにハイブリダイズする核酸（例えば、本明細書において他の部分に記載のとおりgRNA又はアンチセンスssDNA）、ウイルスDNA又はRNAなどの外因性核酸にハイブリダイズする核酸、RNAにハイブリダイズする核酸、遺伝子転写に干渉する核酸、RNA翻訳に干渉する核酸、分解の標的とすることを通じてRNAを安定化させる又はRNAを不安定化させる核酸、DNA又はRNA結合因子にその発現又はその機能への干渉を通じて干渉する核酸、細胞内タンパク質又はタンパク質複合体に連結した、且つその機能を調節する核酸等が挙げられる。

【0641】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、1つ以上のヌクレオシド類似体を含む。いくつかの実施形態では、核酸配列は、1つ又は複数の天然ヌクレオシドヌクレオシドに加えて、又はそれに代わるものとして、例えば、プリン若しくはピリミジン、例えば、アデニン、シトシン、グアニン、チミン及びウラシル、1つ若しくは複数のヌクレオシドアナログを含んでもよい。いくつかの実施形態では、核酸配列は、1つ又は複数のヌクレオシドアナログを含む。ヌクレオシドアナログとして、限定されないが、ヌクレオシドアナログ、例えば、5-フルオロウラシル；5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、4-メチルペンズイミダゾール、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ジヒドロウリジン、β-D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、β-D-マンノシルキューオシン、5

’-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N 6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸 (v)、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸 (v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、2, 6-ジアミノプリン、3-ニトロピロール、イノシン、チオウリジン、キューオシン、ワイオシン、ジアミノプリン、イソグアニン、イソシトシン、ジアミノピリミジン、2, 4-ジフルオロトルエン、イソキノリン、ピロロ[2, 3-β]ピリジン、及びプリン又はピリミジン側鎖と塩基対合することができるいずれか他のものが挙げられる。

10

【0642】

CRISPR/Casドメイン

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、CRISPR/Casドメインであるか、又はそれを含む。CRISPR/Casタンパク質は、CRISPR/Casエフェクターと、任意選択で1つ以上の他のドメインとを含むことができる。CRISPR/Casドメインは典型的には、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (clustered regulatory interspaced short palindromic repeat) (CRISPR) システムに関わるタンパク質、例えば、Casタンパク質と構造的及び/又は機能的類似性を有する。CRISPR/Casドメインは、任意選択で、ガイドRNA、例えば、シングルガイドRNA (sgRNA) を含む。いくつかの実施形態では、CRISPR/Casドメインによって含まれるgRNAには、CRISPR/Casドメインが非共有結合的に結合する。

20

【0643】

CRISPRシステムは、細菌及び古細菌中に最初に発見された適応型防御システムである。CRISPRシステムは、CRISPR関連又は「Cas」エンドヌクレアーゼ (例えば、Cas9若しくはCpf1) と呼ばれるRNA誘導ヌクレアーゼを用いて、外来DNAを切断する。例えば、典型的なCRISPR/Casシステムでは、エンドヌクレアーゼは、一本鎖又は二本鎖DNA配列をターゲティングする配列特異的、ノンコーディング「ガイドRNA」により標的ヌクレアーゼ配列 (例えば、配列編集しようとするゲノム内の部位) に向けられる。3つのクラス (I~III) のCRISPRシステムが同定されている。クラスII CRISPRシステムは、単一のCasエンドヌクレアーゼ (複数のCasタンパク質ではなく) を使用する。1クラスのII CRISPRシステムは、II型Casエンドヌクレアーゼ、例えば、Cas9、CRISPR RNA (「crRNA」)、及びトランス作用性crRNA (「tracrRNA」) を含む。crRNAは、「ガイドRNA」を含み、これは、典型的には約20ヌクレオチドRNA配列であり、標的DNA配列に対応する。crRNAはまた、tracrRNAに結合して、部分的二本鎖構造を形成する領域を含み、この構造が、RnaseIIIにより切断されて、crRNA/tracrRNAハイブリッドが得られる。次に、crRNA/tracrRNAハイブリッドは、Cas9エンドヌクレアーゼを指令して、標的DNA配列を認識させ、これを切断させる。標的DNA配列は、概して、所与のCasエンドヌクレアーゼに特異的な「プロトスペーサ隣接モチーフ」(「PAM」) と隣接していなければならないが; PAM配列は、所与のゲノム全体にわたって出現する。多様な原核生物種から同定されたCRISPRエンドヌクレアーゼは、ユニークなPAM配列要件を有し; PAM配列の例としては、5'-NGG (化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes))、5'-NNAGAA (ストレプトコッカス・サーモフィルス (Streptococcus thermophilus) CRISPR1)、5'-NGGNG (ストレプトコッカス・サーモフィルス (Streptococcus thermophilus) CRISPR3)、及び5'-NNNGATT (髄膜炎菌 (Neisseria meningitidis)) が挙げられる。いくつかのエンドグルカナーゼ、例えば、Cas9エンドヌクレアーゼは、G-リッチPAM部位、例えば、5'-NG

30

40

50

Gと結合し、PAM部位から（その5'側）3ヌクレオチド上流の位置で標的DNAの平滑末端切断を実施する。別のクラスII CRISPRシステムは、Cas9より小さいV型エンドヌクレアーゼCpf1を含み；例として、AsCpf1（アシダミノコッカス属種（*Acidaminococcus* sp.）由来）及びLbCpf1（ラクノスピラ科種（*Lachnospiraceae* sp.）由来）が挙げられる。Cpf1関連CRISPRアレイは、tracrRNAを必要とせずに成熟crRNAにプロセシングされ；言い換えれば、Cpf1システムは、標的DNA配列を切断するために、Cpf1ヌクレアーゼとcrRNAしか必要としない。Cpf1エンドヌクレアーゼは、T-リッチPAM部位、例えば、5'-TTNと結合する。Cpf1はまた、5'-CTA PAMモチーフも認識する。Cpf1は、4-若しくは5-ヌクレオチド5'オーバーハングを有するオフセット又はスタグガード二本鎖切断を導入する、例えば、コーディング鎖上のPAMから（その3'側）18ヌクレオチド下流及び相補鎖上のPAMから23ヌクレオチド下流に位置する5-ヌクレオチドオフセット又はスタグガード切断を用いて標的DNAを切断することにより、標的DNAを切断し；こうしたオフセット切断によって生じる5-ヌクレオチドオーバーハングは、平滑末端切断DNAでの挿入によるものと比較して、相同組換えによるDNA挿入によってさらに正確なゲノム編集を可能にする。例えば、Zetsche et al. (2015) Cell, 163: 759-771を参照されたい。

10

【0644】

多種多様なCRISPR関連（Cas）遺伝子又はタンパク質を、本開示に提供される技術で使うことができ、Casタンパク質の選択は、本方法の特定の条件に応じて変化し得る。Casタンパク質の具体的な例として、クラスIIシステムが挙げられ、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Cpf1、C2C1、又はC2C3を含む。いくつかの実施形態では、Casタンパク質、例えば、Cas9タンパク質は、多様な原核生物種のいずれに由来するものでもよい。いくつかの実施形態では、特定のCasタンパク質、例えば、特定のCas9タンパク質は、特定のプロトスペーサ隣接モチーフ（PAM）配列を認識するように選択される。いくつかの実施形態では、DNAターゲティング部分として、配列ターゲティングポリペプチド、例えば、Casタンパク質、例えば、Cas9が挙げられる。特定の実施形態では、Casタンパク質、例えば、Cas9タンパク質は、細菌若しくは古細菌から取得するか、又は公知の方法を用いて合成してもよい。特定の実施形態では、Casタンパク質は、グラム陽性菌又はグラム陰性菌に由来するものであってもよい。特定の実施形態では、Casタンパク質は、レンサ球菌属（*Streptococcus*）（例えば、化膿性レンサ球菌（*S. pyogenes*）、若しくは*S. thermophilus*）、フランシセラ属（*Francisella*）（例えば、*F. novicida*）、スタフィロコッカス属（*Staphylococcus*）（例えば、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*））、アシダミノコッカス属（*Acidaminococcus*）（例えば、アシダミノコッカス属種（*Acidaminococcus* sp.）BV3L6）、ナイセリア属（*Neisseria*）（例えば、髄膜炎菌（*N. meningitidis*））、クリプトコッカス属（*Cryptococcus*）、コリネバクテリウム属（*Corynebacterium*）、ヘモフィラス属（*Haemophilus*）、ユーバクテリウム属（*Eubacterium*）、パスツレラ属（*Pasteurella*）、プレボテラ属（*Prevotella*）、ベイルネラ属（*Veillonella*）、又はマリノバクター属（*Marinobacter*）に由来するものであってもよい。

20

30

40

【0645】

いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、Casタンパク質が結合及び／又は機能するために、プロトスペーサ隣接モチーフ（PAM）が標的DNA配列中に存在するか、若しくはそれと隣接する必要がある。いくつかの実施形態では、PAMは、5'から3'に、NGG、YG、NNGRRT、NNNRRT、NGA、TYCV、TATV、NTT

50

N、又はNNNGATTであるか、又はそれを含み、ここで、Nは、任意のヌクレオチドを表し、Yは、C又はTを表し、Rは、A又はGを表し、Vは、A又はC又はGを表す。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、表1に挙げるタンパク質である。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、そのPAMを変更する1つ又は複数の突然変異を含む。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、E1369R、E1449H、及びR1556A突然変異、又は前記位置に対応するアミノ酸への類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、E782K、N968K、及びR1015H突然変異、又は前記位置に対応するアミノ酸への類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、D1135V、R1335Q、及びT1337R突然変異、又は前記位置に対応するアミノ酸への類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、S542R及びK607R突然変異、又は前記位置に対応するアミノ酸への類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、S542R、K548V、及びN552R突然変異、又は前記位置に対応するアミノ酸への類似の置換を含む。

10

20

30

40

50

【0646】

【表 1】

表 1

名称	酵素	種	アミノ酸数	PAM	PAM 認識を改変するための突然変異	触媒的にデッド型にするための突然変異
<i>FnCas</i> ₉	Cas9	フランシセラ・ノビシダ (<i>Francisella novicida</i>)	1629	5'-NGG-3'	Wt	D11A/H969A/N995A
<i>FnCas</i> _{9 RHA}	Cas9	フランシセラ・ノビシダ (<i>Francisella novicida</i>)	1629	5'-YG-3'	E1369R/E1449H/R1556A	D11A/H969A/N995A
<i>SaCas</i> ₉	Cas9	黄色ブドウ球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1053	5'-NNGRRT-3'	Wt	D10A/H557A
<i>SaCas</i> _{9 KKH}	Cas9	黄色ブドウ球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1053	5'-NNNRRT-3'	E782K/N968K/R1015H	D10A/H557A
<i>SpCas</i> ₉	Cas9	化膿レンサ球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	1368	5'-NGG-3'	Wt	D10A/D839A/H840A/N863A
<i>SpCas</i> _{9 VQR}	Cas9	化膿レンサ球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	1368	5'-NGA-3'	D1135V/R1335Q/T1337R	D10A/D839A/H840A/N863A
<i>AsCpfI</i> _{RR}	CpfI	アシダミノコッカス属種 (<i>Acidaminococcus</i> sp.) BV3L6	1307	5'-TYCV-3'	S542R/K607R	E993A
<i>AsCpfI</i> _{RVR}	CpfI	アシダミノコッカス属種 (<i>Acidaminococcus</i> sp.) BV3L6	1307	5'-TATV-3'	S542R/K548V/N552R	E993A
<i>FnCpfI</i> ₁	CpfI	フランシセラ・ノビシダ (<i>Francisella novicida</i>)	1300	5'-NTTN-3'	Wt	D917A/E1006A/D1255A
<i>NmCas</i> ₉	Cas9	髄膜炎菌 (<i>Neisseria meningitidis</i>)	1082	5'-NNNGATT-3'	Wt	D16A/D587A/H588A/N611A

【0647】

いくつかの実施形態では、Cas タンパク質は、ヌクレアーゼが不活性化するように修飾され、例えば、ヌクレアーゼ欠損 Cas である。いくつかの実施形態では、Cas タンパク質は Cas 9 タンパク質である。野生型 Cas 9 は、gRNA がターゲティングする特定の DNA 配列に二本鎖切断 (DSB) を生成するのに対し、修飾された機能性を有するいくつかの CRISPR エンドヌクレアーゼが入手可能であり、例えば：Cas 9 の「ニックアーゼ」バージョンは、一本鎖切断のみを生成し；触媒として不活性の Cas 9 (「dCas 9」) は、標的 DNA を切断しない。いくつかの実施形態では、DNA 配列と dCas の結合は、立体障害により当該部位の転写に干渉する。いくつかの実施形態では、

DNAターゲティング部分は、触媒として不活性のCas、例えば、dCasであるか、又はそれを含む。触媒として不活性の多くのCasタンパク質が当技術分野で知られている。いくつかの実施形態では、dCas9は、Casタンパク質の各エンドヌクレアーゼドメインに突然変異、例えば、D10A及びH840A突然変異を含む。

【0648】

いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対してD11A変異又は類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対するH969A変異又は類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対するN995A変異又は類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対するD11A、H969A、及びN995A突然変異又は類似の置換を含む。

10

【0649】

いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対してD10A突然変異又は類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、H557A変異又は前記位置に対応するアミノ酸への類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対してD10A及びH557A変異又は類似の置換を含む。

20

【0650】

いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対してD839A変異又は類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対してH840A変異又は類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対してN863A変異又は類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対し、D10A、D839A、H840A、及びN863A突然変異又は類似の置換を含む。

30

【0651】

いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対してE993A変異又は類似の置換を含む。

【0652】

いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対してD917A変異又は類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対してE1006A変異又は類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対してD1255A変異又は類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対してD917A、E1006A、及びD1255A変異又は類似の置換を含む。

40

【0653】

いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対してD16A変異又は類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置に対応するアミノ酸に対してD587A変異又は類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、触媒として不活性なCas9タンパク質、例えば、dCas9は、前記位置

50

に対応するアミノ酸に対してH 5 8 8 A変異又は類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、触媒として不活性なC a s 9タンパク質、例えば、d C a s 9は、前記位置に対応するアミノ酸に対してN 6 1 1 A変異又は類似の置換を含む。いくつかの実施形態では、触媒として不活性なC a s 9タンパク質、例えば、d C a s 9は、前記位置に対応するアミノ酸に対してD 1 6 A、D 5 8 7 A、H 5 8 8 A、及びN 6 1 1 Aの変異又は類似の置換を含む。

【 0 6 5 4 】

別の態様において、本開示は、1つ以上の（例えば、1つの）ターゲティング部分と、1つ以上のエフェクター部分とを含む発現リプレッサー又はポリペプチドに関し、この場合、1つ以上のターゲティング部分は、C a s タンパク質、例えば、触媒として不活性なC a s 9タンパク質、例えば、d C a s 9、又はその機能性変異体若しくは断片を含むC R I S P R / C a s ドメインであるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、d C a s 9は、配列番号17のアミノ酸配列を含む：

【 0 6 5 5 】

【 化 1 】

DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEA
TRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA
YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTY
NQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDL
AEDAKLQLSKDQYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIK
RYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEE
LLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPPYYVGPL
ARGNSRFAMWTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGV
EDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMK
QLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS
GQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVTEMARENQTTQKGQKNSR
ERMKRIEEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIV
PQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAER
GGLSELDKAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDF
QFYKVRINNYYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKAT
AKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTE
VQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKEL
LGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLEFLENGRKRMLASAGELQKGNELALP
SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAY
NKHHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TLHQ SITGLYETRJD
LSQLGGD (配列番号17)

【 0 6 5 6 】

いくつかの実施形態では、d C a s 9は、配列番号50の核酸配列によってコードされる：

10

20

30

40

50

【化 2】

GACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGT
GATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGG
CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTGACAGCGGCGAGACCGCCGAGG
CCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTA
CCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTG
GAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACA
TCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCCTACCTGCGGAAGAAGCT
GGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATC
AAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCGACAACAGCGACGTGGACA
AGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCC
AGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGA
ACCTGATCGCCCAGCTGCCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCT
GAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTG
CAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCGACC
AGTACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATC
CTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACG
ACGAGCACCAACAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCCGAGAA
GTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGC
GCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCG
AGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAA
CGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAG
GACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCGGAT
CCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAT
CCGAGGAGACCATCACCCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCA
GAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCC
AAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACG
TGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGA
CCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAG

10

20

30

40

50

【化 3】

AAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCC
TGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGA
GAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATG
ATCGAGGAGCGGCTGAAAACCTACGCCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGA
AGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGA
CAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGG
TGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCAT
CAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGG
CACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCC
AGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCC
AGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTA
CTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGC
GACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACA
AGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGGCCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCAGCGAGGAGG
TGGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCAGCG
GAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGC
TTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGG
ACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGA
TCACCCTGAAATCCAAGCTGGTGAGCGACTTCGGGAAGGACTTCAGTTCTACAAGGTGCGG
GAGATCAACAATAACACACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCC
TGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGA
CGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTC
TTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCG
GAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCG
GGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACC
GAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGC
TGATCGCCCCGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGT
GGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCC
GTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCG
ACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA
GTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTG
CAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCC
ACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTTCGTGGAGC

10

20

30

40

50

【化 4】

AGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGAT
 CCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCC
 ATCCGGGAGCAGGCGGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGC
 CGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTG
 CTGGACGCCACCCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGA
 GCCAGCTGGGCGGCGAC (配列番号50)

10

【0657】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、gRNAを含むか、又はそれと（例えば、共有）結合したCasドメインを含み得る。gRNAは、Casタンパク質結合に必要な「スカフォールド」配列と、ゲノム標的のためのユーザ定義の約20ヌクレオチドターゲティング配列から構成される短い合成RNAである。実際には、ガイドRNA配列は、概して17～24ヌクレオチド（例えば、19、20、又は21ヌクレオチド）の間の長さを有するように設計され、且つ標的化核酸配列に対して相補的である。カスタムgRNAジェネレータ及びアルゴリズムは、有効なガイドRNAの設計に使用する目的で市販されている。遺伝子編集はまた、キメラ「単一ガイドRNA」（「sgRNA」）、操作（合成）単一RNA分子を用いても達成されており、これは、天然に存在するcrRNA-tracrRNA複合体を模倣し、tracrRNA（ヌクレアーゼとの結合用）と、少なくとも1つのcrRNA（編集のためにターゲティングされる配列にヌクレアーゼを誘導する）の両方を含む。キメラ編集sgRNAはまた、Casタンパク質と一緒に使用する上で有効であることが実証されている；例えば、Hendel et al. (2015) Nature Biotechnol., 985-991を参照されたい。例示的ガイドRNA配列は、表2及び表13に開示される。

20

【0658】

いくつかの実施形態では、gRNAは、標的遺伝子に関連するDNA配列に相補的な核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、DNA配列は、標的遺伝子に作動可能に連結している発現制御エレメントであるか、それを含むか、又はそれと重複する。いくつかの実施形態では、gRNAは、標的遺伝子に関連するDNA配列に少なくとも90、95、99、又は100%相補的な核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Cas分子を含むDNAターゲティング部分と共に使用するためのgRNAは、sgRNAである。

30

【0659】

いくつかの実施形態では、CRISPR/Casドメインと共に使用するためのgRNAは、CTCFに関連する標的配列に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、CRISPR/Casドメインと共に使用するためのgRNAは、プロモータに関連する標的配列に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、gRNAは、表2又は表13に掲載される標的配列に結合する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサーは、表2又は表13に掲載される標的配列に結合する。

40

【0660】

50

【表 2】

表 2: 例示的 gRNA 配列

ガイド名	標的部位	標的配列	ゲノム座標	鎖
GD-28616	CTCF	ATGATCTCTGCTGCCAGTAG (配列番号 1)	chr8:128746342- 128746364	+
GD-28859	CTCF	ATCGCGCCTGGATGTCAACG (配列番号 2)	chr8:128746321- 128746343	-
GD-28862	CTCF	ATTGTGCAGTGCATCGGATT (配列番号 3)	chr8:128746525- 128746547	+
GD-28617	プロモータ	GTCAAACAGTACTGCTACGG (配列番号 4)	chr8:128748014- 128748036	+

10

【 0 6 6 1 】

20

30

40

50

【表 3】

表 13 例示の gRNA 配列

ガイド名	標的配列	ゲノム座標
GD-29833	TGCCACTTCCCCACTAACCC (配列番号 96)	GRCh37: chr8:129188878- 129188900
GD-29834	GGCCACACAAGGAAGCTGCA (配列番号 97)	GRCh37: chr8:129188958- 129188980
GD-29835	CCACACAAGGAAGCTGCAGG (配列番号 98)	GRCh37: chr8:129188960- 129188982
GD-29836	TGATTGGAATGCAACCCGAA (配列番号 99)	GRCh37: chr8:129189067- 129189089
GD-29837	TTTGTCCCTTGCTACCCCAA (配列番号 100)	GRCh37: chr8:129189457- 129189479
GD-29838	AGCTGATGGTATCCACTAGG (配列番号 101)	GRCh37: chr8:129189554- 129189576
GD-29839	CACATCCAAGAATGTAGTGG (配列番号 102)	GRCh37: chr8:129189679- 129189701
GD-29840	GATACAGCCACAAAGCTCAC (配列番号 103)	GRCh37: chr8:129209511- 129209533
GD-29841	ATTACATAACAGAATCCAGG (配列番号 104)	GRCh37: chr8:129209643- 129209665

【 0 6 6 2 】

10

20

30

40

50

【表 4】

GD-29842	CCCTTGACTGTGCTGCCACC (配列番号 105)	GRCh37: chr8:129209658- 129209680
GD-29843	CAGACGAGGAACCTGAACCC (配列番号 106)	GRCh37: chr8:129209856- 129209878
GD-29844	AGAATCCCTTGGGGTAGCAA (配列番号 107)	GRCh37: chr8:129189452- 129189474
GD-29914	CAGCACTCTCGCTGACCGCA (配列番号 108)	GRCh37: chr8:129189190- 129189212
GD-29915	GTTGAGTCATGTGTACTCTG (配列番号 109)	GRCh37: chr8:129189274- 129189296
GD-29916	AGGAACAGGATGTTACAACCT (配列番号 110)	GRCh37: chr8:129189421- 129189443
GD-28662	GGGGCCACTAGGGACAGGAT (配列番号 111)	GRCh37: chr19:55627120-55627139

10

20

【0663】

いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、第1 DNA ターゲティング部分を含む第1 発現リプレッサーと、第2 DNA ターゲティング部分を含む第2 発現リプレッサーとを含み、ここで、第1 DNA ターゲティング部分は、第1 CRISPR/Casドメインを含むか、又はそれであり、第2 DNA ターゲティング部分は、第2 CRISPR/Casドメインを含むか、又はそれである。いくつかの実施形態では、第1 CRISPR/Casドメインは、第1 CRISPR/Casタンパク質と、第1 ガイドRNAを含み、第2 CRISPR/Casドメインは、第2 CRISPR/Casタンパク質と、第2 ガイドRNAを含む。いくつかの実施形態では、第1 CRISPR/Casタンパク質は、第2 ガイドRNAと、認め得るほどに結合せず（例えば、結合せず）、例えば、少なくとも10、20、50、100、1000、又は10,000 nMの K_D で結合し、第2 CRISPR/Casタンパク質は、第1 ガイドRNAと、認め得るほどに結合せず（例えば、結合せず）、例えば、少なくとも10、20、50、100、1000、又は10,000 nMの K_D で結合する。

30

【0664】

TALエフェクタードメイン

いくつかの実施形態では、DNA ターゲティング部分は、TALエフェクタードメインであるか、又はそれを含む。TALエフェクタードメイン、例えば、DNA 配列に特異的に結合するTALエフェクタードメインは、複数のTALエフェクターリピート又はその断片と、任意選択で、天然に存在するTALエフェクターリピートの1つ以上の追加的な一部分（例えば、複数のTALエフェクタードメインのN端側及び／又はC端側にある）を含み、ここでは各TALエフェクターリピートがヌクレオチドを認識する。TALエフェクタータンパク質は、TALエフェクタードメインと、任意選択で、1つ以上の他のドメインとを含むことができる。多くのTALエフェクタードメインが当業者に公知であり、例えば、Thermo Fisher Scientificから市販されている。

40

【0665】

TALEは、宿主植物における遺伝子発現を調節して、細菌のコロニー形成及び生存を

50

促進する植物病原菌キサントモナス属 (*Xanthomonas*) などの多くの病原菌種により分泌される天然のタンパク質である。TALエフェクターの特異的な結合は、典型的には33又は34アミノ酸のタンデムに配列されたほぼ同一の反復配列から成る中央リピートドメイン (リピート可変二残基、RVDドメイン) に基づく。

【0666】

TALエフェクターファミリーのメンバーは、主にそれらのリピートの数及び順序が異なる。反復配列の数は、1.5～33.5リピートの範囲であり、C-末端リピートは、通常、長さが短く (例えば、約20アミノ酸)、一般に「ハーフリピート」と呼ばれる。TALエフェクターの各リピートは、異なる塩基対特異性を呈示する異なるリピートタイプとの1リピート対1塩基対相関を特徴とする (1リピートが、標的遺伝子配列上の1塩基対を認識する)。概して、リピートの数が少ないほど、タンパク質-DNA相互作用が弱くなる。6.5リピートの数は、リポータ遺伝子の転写を活性化する上で十分であることが判明している (Scholze et al., 2010)。

【0667】

リピート対リピートの変化は、主としてアミノ酸位置12及び13で起こり、そのため、これらは、「超可変」と呼ばれており、また、これは、例示的なリピート可変二残基 (RVD) 及び核酸塩基標的とのそれらの対応を列記する表3に示すように、標的DNAプロモータ配列との相互作用の特異性の原因となる。

【0668】

【表5】

表3- RVD 及び核酸塩基特異性

標的	可能なRVDアミノ酸の組み合わせ												
A	NI	NN	CI	HI	KI								
G	N N	GN	SN	VN	LN	DN	QN	EN	HN	RH	NK	AN	FN
C	H D	RD	KD	ND	AD								
T	N G	HG	VG	IG	EG	MG	YG	AA	EP	VA	QG	KG	RG

【0669】

従って、特異的DNA配列をターゲティングするようにTALエフェクターのリピートを修飾することが可能である。さらなる研究では、RVD NKがGをターゲティングできることが示されている。TALエフェクターの標的部位はまた、最初のリピートの標的となる5'塩基にフランキングするTを含む傾向もあるが、この認識の厳密な機構は不明である。現在までに113を超えるTALエフェクター配列が知られている。キサントモナス属 (*Xanthomonas*) 由来のTALエフェクターの非限定的な例としては、Hax2、Hax3、Hax4、AvrXa7、AvrXa10及びAvrBs3が挙げられる。

【0670】

従って、本開示のTALエフェクタードメインのTALエフェクターリピートは、任意の細菌種 (例えば、キサントモナス・オリザエ病原型オリザエ (*Xanthomonas oryzae* p.v. *Oryzae*) のアフリカ株 (Yu et al., 2011)、キサントモナス・カンペストリス病原型ラファニ株 (*Xanthomonas campestris* p.v. *raphani* strain) 株756C及びキサントモナス・オ

リザエ病原型オリジコラ (*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*) 株 BLS256 (Bogdanove et al., 2011) などのキサントモナス属 (*Xanthomonas*) 種の TALE 効果タードメインに由来し得る。本明細書で用いられるとき、本開示に従う TALE 効果タードメインは、RVD ドメイン、並びに同様に天然に存在する TALE 効果タードメイン由来の 1 つ又は複数のフランキング配列 (RVD ドメインの N 末端側及び／又は C 末端側にある配列) を含む。これは、天然に存在する TALE 効果タードメインの RVD より多い又は少ないリピートを含み得る。本開示の TALE 効果タードメインは、所与の DNA 配列を上記のコード及び当技術分野において公知の他のものに基づいてターゲティングするように設計される。TALE 効果タードメイン (例えば、単量体又はモジュール) の数及びその具体的な配列は、所望の DNA 標的配列に基づき選択される。例えば、具体的な標的配列に適するように TALE 効果タードメインのリピートを取り除いてもよく、又は加えてもよい。ある実施形態では、本開示の TALE 効果タードメインは、6.5~33.5 個の TALE 効果タードメインのリピートを含む。ある実施形態では、本開示の TALE 効果タードメインは、8~33.5 個の TALE 効果タードメインのリピート、例えば、10~25 個の TALE 効果タードメインのリピート、例えば、10~14 個の TALE 効果タードメインのリピートを含む。

10

20

30

40

50

【0671】

いくつかの実施形態では、TALE 効果タードメインは、DNA 標的配列との完全なマッチに対応する TALE 効果タードメインのリピートを含む。いくつかの実施形態では、DNA 標的配列上のリピートと標的塩基対との間のミスマッチは、それが、発現抑制システム、例えば、TALE 効果タードメインを含む発現リプレッサーの機能を可能にする場合に限って許容される。一般に、TALE 結合は、ミスマッチの数と逆相関する。いくつかの実施形態では、本開示の発現リプレッサーの TALE 効果タードメインは、標的 DNA 配列に対して、7 つ、6 つ、5 つ、4 つ、3 つ、2 つ、又は 1 つ以下のミスマッチ、また任意選択的にゼロのミスマッチを含む。理論に束縛されることは望まないが、一般に、TALE 効果タードメイン中の TALE 効果タードメインのリピートの数が少ないほど、より少数のミスマッチが許容され、これは、発現抑制システム、例えば、TALE 効果タードメインを含む発現リプレッサーの機能を依然として可能にする。結合親和性は、マッチするリピート-DNA 組合せの合計に依存すると考えられる。例えば、25 以上の TALE 効果タードメインのリピートを有する TALE 効果タードメインは、最大 7 つのミスマッチを許容することができる。

【0672】

TALE 効果タードメインに加えて、本開示の TALE 効果タードメインは、天然に存在する TALE 効果タードメインに由来する追加の配列を含んでもよい。TALE 効果タードメインの TALE 効果タードメイン部分の両側に含まれる C-末端及び／又は N-末端配列の長さは、変動し得、例えば、Zhang et al. (2011) の研究に基づいて、当業者により選択することができる。Zhang et al. は、Hax3 由来の TALE 効果タードメインのタンパク質中のいくつかの C-末端及び N-末端切断変異体を特性決定し、標的配列との最適な結合、従って転写の活性化に寄与する重要なエレメントを同定した。概して、転写活性は、N-末端の長さとは逆相関することが判明した。C-末端に関しては、Hax3 配列の最初の 68 アミノ酸内の DNA 結合残基に重要なエレメントが同定された。従って、いくつかの実施形態では、天然に存在する TALE 効果タードメインの TALE 効果タードメイン部分の C-末端側の最初の 68 アミノ酸は、本開示の発現リプレッサーの TALE 効果タードメインに含まれる。従って、一実施形態では、本開示の TALE 効果タードメインは、以下：1) 天然に存在する TALE 効果タードメイン由来の 1 つ若しくは複数の TALE 効果タードメインのリピート；2) TALE 効果タードメインの N-末端側の天然に存在する TALE 効果タードメイン由来の少なくとも 70、80、90、100、110、120、130、140、150、170、180、190、200、220、230、240、250、260、270、280 以上のアミノ酸；及び／又は 3) TALE 効果タードメインの C-末端側の少なくとも 68、80、90、100

、110、120、130、140、150、170、180、190、200、220、230、240、250、260以上のアミノ酸を含む。

【0673】

いくつかの実施形態では、調節剤は、操作されたDNA結合ドメイン（DBD）、例えば、標的配列、例えば、標的遺伝子（例えば、MYC）に作動可能に連結したプロモータ又は転写開始部位（TSS）配列、例えば、転写調節エレメントに近接した配列、例えば、標的遺伝子（例えば、MYC）を含むアンカー配列媒介接合部（ASMC）のアンカー配列、例えば、アンカー配列に近接した配列に結合するTALエフェクターリピートを含むTALエフェクターを含むターゲティング部分を含む。いくつかの実施形態では、TALエフェクタードメインは、標的部位にエピジェネティックエフェクター部分を運ぶように操作することができる。

10

【0674】

Znフィンガードメイン

いくつかの実施形態では、DNAターゲティング部分は、Znフィンガードメインであるか、又はそれを含む。Znフィンガードメインは、Znフィンガー、例えば、天然に存在するZnフィンガー又は操作されたZnフィンガー、又はその断片を含む。多くのZnフィンガーが当業者に公知であり、例えば、Sigma-Aldrichから市販されている。概して、Znフィンガードメインは複数のZnフィンガーを含み、ここでは各Znフィンガーが3つのヌクレオチドを認識する。Znフィンガータンパク質は、Znフィンガードメインと、任意選択で、1つ以上の他のドメインとを含むことができる。

20

【0675】

いくつかの実施形態では、Znフィンガードメインは、選択した標的DNA配列に結合するように操作された非天然のZnフィンガータンパク質を含む。例えば、以下を参照されたい：Beerli, et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo, et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan, et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal, et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo, et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416; 米国特許第6,453,242号明細書；同第6,534,261号明細書；同第6,599,692号明細書；同第6,503,717号明細書；同第6,689,558号明細書；同第7,030,215号明細書；同第6,794,136号明細書；同第7,067,317号明細書；同第7,262,054号明細書；同第7,070,934号明細書；同第7,361,635号明細書；同第7,253,273号明細書；及び米国特許出願公開第2005/0064474号明細書；同第2007/0218528号明細書；同第2005/0267061号明細書（全て、それらの全体が、参照により本明細書に組み込まれる）。

30

【0676】

操作Znフィンガーは、天然に存在するZnフィンガーと比較して、新たな結合特異性を有し得る。操作方法として、限定されないが、合理的設計及び様々なタイプの選択が挙げられる。合理的設計は、例えば、トリプレット（クアドルプレット）ヌクレオチド配列と個別のZnフィンガーアミノ酸配列の使用を含み、ここで、トリプレット又はクアドルプレットヌクレオチド配列は各々、上記の特定のトリプレット又はクアドルプレット配列に結合するジンクフィンガーの1つ若しくは複数のアミノ酸配列と結合している。例えば、米国特許第6,453,242号明細書及び同第6,534,261号明細書（それらの全体が、参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

40

【0677】

ファージディスプレイ及びツーハイブリッドシステムを含む例示的な選択方法が、以下：米国特許第5,789,538号明細書；同第5,925,523号明細書；同第6,007,988号明細書；同第6,013,453号明細書；同第6,410,248号

50

明細書；同第6，140，466号明細書；同第6，200，759号明細書；及び同第6，242，568号明細書；並びに国際公開第98／37186号パンフレット；同第98／53057号パンフレット；同第00／27878号パンフレット；及び同第01／88197号パンフレット並びに英国特許第2，338，237号明細書に開示されている。加えて、ジンクフィンガータンパク質に対する結合特異性の増強が、例えば、国際公開第02／077227号パンフレットに記載されている。

【0678】

さらに、上記の参照文献及びその他の参照文献に開示されているように、ジンクフィンガー及び／又はマルチフィンガージンクフィンガードメインは、任意の好適なリンカー配列を用いて互いに連結されていてもよく、そうしたリンカーとして例えば、長さ5アミノ酸以上のリンカーが挙げられる。また、長さ6アミノ酸以上の例示的なリンカー配列については、米国特許第6，479，626号明細書；同第6，903，185号明細書；及び同第7，153，949号明細書を参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、当該タンパク質の個々のジンクフィンガー間に好適なリンカーの任意の組合せを含んでもよい。加えて、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の増強については、例えば、共同所有国際公開第02／077227号パンフレットに記載されている。

【0679】

融合タンパク質（及びそれをコードするポリヌクレオチド）の設計及び構築のためのZnフィンガー及び方法は、当業者には周知であり、以下に詳しく記載されている：米国特許第6，140，081号明細書；同第789，538号明細書；同第6，453，242号明細書；同第6，534，261号明細書；同第5，925，523号明細書；同第6，007，988号明細書；同第6，013，453号明細書；及び同第6，200，759号明細書；国際公開第95／19431号パンフレット；同第96／06166号パンフレット；同第98／53057号パンフレット；同第98／54311号パンフレット；同第00／27878号パンフレット；同第01／60970号パンフレット；同第01／88197号パンフレット；同第02／099084号パンフレット；同第98／53058号パンフレット；同第98／53059号パンフレット；同第98／53060号パンフレット；同第02／016536号パンフレット；及び同第03／016496号パンフレット。

【0680】

特定の実施形態では、DNAターゲティング部分は、標的DNA配列に（配列特異的に）結合する操作ジンクフィンガーを含むZnフィンガードメインを含む。いくつかの実施形態では、Znフィンガードメインは、1つのZnフィンガー又はその断片を含む。いくつかの実施形態では、Znフィンガードメインは、複数のZnフィンガー（又はその断片）、例えば、2、3、4、5、6以上のZnフィンガー（及び任意選択的に、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、若しくは2以下のフィンガー）を含む。いくつかの実施形態では、Znフィンガードメインは、少なくとも3つのZnフィンガーを含む。いくつかの実施形態では、Znフィンガードメインは、4、5、又は6つのZnフィンガーを含む。いくつかの実施形態では、Znフィンガードメインは、8、9、10、11、又は12のZnフィンガーを含む。いくつかの実施形態では、3つのZnフィンガーを含むZnフィンガードメインは、9又は10ヌクレオチドを含む標的DNA配列を認識する。いくつかの実施形態では、4つのZnフィンガーを含むZnフィンガードメインは、12～14ヌクレオチドを含む標的DNA配列を認識する。いくつかの実施形態では、6つのZnフィンガーを含むZnフィンガードメインは、18～21ヌクレオチドを含む標的DNA配列を認識する。

【0681】

いくつかの実施形態では、ターゲティングドメインは、2枝型（two handed）Znフィンガータンパク質を含む。2枝型Znフィンガータンパク質は、2つのジンクフィンガードメインが2つの不連続標的部位に結合するように、ジンクフィンガーの2つのクラスターが、アミノ酸を介在することにより隔てられている、タンパク質である。2

10

20

30

40

50

枝型のジンクフィンガー結合タンパク質の例は、SIP1であり、この場合、4個のジンクフィンガーのクラスターが、タンパク質のアミノ末端に位置し、3個のZnフィンガーのクラスターが、カルボキシル末端に位置する(Remade, et al. (1999) EMBO Journal, 18(18):5073-5084を参照)。これらのドメイン中のジンクフィンガーの各クラスターは、ユニークな標的配列に結合することができ、2つの標的配列間のスペーシングは、多くのヌクレオチドを含むことができる。

【0682】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、操作されたDNA結合ドメイン(DBD)、例えば、標的配列、例えば、標的遺伝子(例えば、MYC)に作動可能に連結したプロモータ又は転写開始部位(TSS))配列、例えば、転写調節エレメントに近接した配列、例えば、標的遺伝子(例えば、MYC)を含むアンカー配列媒介接合部(ASMC)のアンカー配列、例えば、アンカー配列に近接した配列に結合するZnフィンガー(ZFN)を含むZnフィンガードメインを含むターゲティング部分を含む。いくつかの実施形態では、ZFNは、標的部位にエピジェネティックエフェクター分子を運ぶように操作することができる。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、2、3、4、5、6、7、又は8個のジンクフィンガーを含むZnフィンガードメインを含む。本明細書に開示される例示的ターゲティング部分のアミノ酸配列を表4に掲載する。本明細書に開示される例示的ターゲティング部分をコードするヌクレオチド配列を表5に掲載する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサー又はシステムは、表4に示される配列、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%の同一性を有する配列を有するターゲティング部分を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、表5に示される配列、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%の同一性を有する配列を含む。

【0683】

10

20

30

40

50

【表 6】

表4: 例示的ターゲティング部分のアミノ酸配列

名称	配列番号	配列
ZF1 (aa)	5	LEPGKPYKCCECGKSFSRSDKLTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSSTTGALTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSDSGNLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSSTSGELVRHQRTHTGEKPTGKKTS
ZF2 (aa)	6	LEPGKPYKCCECGKSFSRSPADLRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPTGKKTS
ZF3 (aa)	7	LEPGKPYKCCECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPTGKKTS
ZF4 (aa)	8	LEPGKPYKCCECGKSFSHTGHLLEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSSTGNLTVHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSDDKDLTRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSDKLTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRTDTRLRHDHQRTHTGEKPTGKKTS
ZF5 (aa)	9	LEPGKPYKCCECGKSFSHTGHLLEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSSTGNLTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSSTGNLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSHLREHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSSTHDLIRHQRTHTGEKPTGKKTS
ZF6 (aa)	10	LEPGKPYKCCECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSHLREHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPTGKKTS
ZF7 (aa)	11	LEPGKPYKCCECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQSGHLTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPTGKKTS
ZF8 (aa)	12	LEPGKPYKCCECGKSFSRSDKLTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRDELNVHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSPADLRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSHLREHQRTHTGEKPTGKKTS
ZF9 (aa)	13	LEPGKPYKCCECGKSFSRSDDLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSHLREHQRTHTGEKPTGKKTS
ZF10 (aa)	14	LEPGKPYKCCECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQSGHLTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSHLREHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRNDLTLTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSSTHDLIRHQRTHTGEKPTGKKTS
ZF11 (aa)	15	LEPGKPYKCCECGKSFSHTGHLLEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSHTGHLLEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSDSGNLVRHQRTHTGEKPTGKKTS
ZF12 (aa)	16	LEPGKPYKCCECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSDLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPTGKKTS
ZF54 (aa)	169	LEPGKPYKCCECGKSFSRSHLREHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSSTGNLTVHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRTDTRLRHDHQRTHTGKKTS
ZF61 (aa)	170	LEPGKPYKCCECGKSFSQSSSLAHOHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSHKNALQNHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSDDKDLTRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQAGHLASHQRTHTGKPYKCCECGKSFSDDKDLTRHQRTHTGKKTS
ZF67 (aa)	171	LEPGKPYKCCECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSSTGNLTVHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRTDTRLRHDHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSREDNLHTHQRTHTGKKTS
ZF68 (aa)	172	LEPGKPYKCCECGKSFSRSDHLTHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQSSSLAHOHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSRDELNVHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSSTGNLTEHQRTHTGEKPYKCCECGKSFSQAGHLASHQRTHTGKKTS

【0684】

10

20

30

40

50

【表 7】

表5: 例示的ターゲティング部分のヌクレオチド配列

名称	配列 番号	配列
ZF1 (nt)	38	CTGGAGCCCGGCGAGAAACCCTACAAGTGCCCCGAGTGCGGCAAATCCTTCTCTAGAAGCGACAAACTGAC CGAACATCAGAGGACCCACACCGGCGAGAAAGCCTTATAAGTGTCCTCGAATGCGGCAAATCCTTCAGCACCA AGAACTCTCTGACAGAACACCAGAGAAACATACCGGAGAGAAACCTTATAATGCCCCGAGTGCGGCAAG TCCTTCTCCAGTCCGGCGATCTGAGGAGACACCAAAGAACACATACCGGCGAAAAGCCTTACAAGTGCCC CGAGTGTGGAAGAGCTTCTCCACCACCGGCGCTCTGACCGAGCACCAAGAGAACACACACCGGCGAGAAAC CCTATAAATGTCCCGAGTGTGGCAAATCCTTCAGCGACAGCGGCAATCTGAGAGTGCACCAAAGAACCCAT ACCGGCGAAAAACCCTACAAATGCCCCGAGTGCGGCAAATCCTTCAGCCAGAGGGCCCATCTGGAGAGGCA CCAAAGGACACACACCGGAGAAAAGCCCTACAAGTGTCCCGAGTGTGGAAAAAGCTTTAGCACAAAGCGGCG AGCTGGTGAGGCATCAAAGGACCCACACCGGCGAAAAGCCACCGGCAAAAAGACCAGC

10

20

30

40

50

【 0 6 8 5 】

【表 8】

ZF2 (nt)	39	CTGGAGCCCGGCGAGAAGCCCTACAAGTGCCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCAGCTCCCCGCGGATCTGAC AAGACATCAGAGAACCATACCGGCGAGAAACCTTACAAATGCCCGAATGTGGCAAGTCCTTTAGCGATC CCGGACATCTGGTGAGGCACACAGAGGACACACACCGGCGAAAAAGCCCTATAAATGTCCCGAGTGTTGAAAG AGCTTTTCTAGAAAGCGACAATCTCTGTGAGACACCAGAGAACCACACCGGAGAGAAGCCTTACAAGTGCCC CGAGTGCGGCAAAATCCTTCAGCCAGAGCTCCTCTCTGGTGAGGCACCAAGGACCCACACCGGCGAGAAAC CTTATAAGTGTTCCCGAGTGTTGCAAAAGCTTCAGCACCTCCCACTCTCTGACCGAGCATCAAAGAACCACACA CCGGCGAAAAACCTTATAAATGCCCGAGTGTTGCAAAATCCTTCAGCAGAAATGACGCTCTGACAGAGCAC CAAAGACACATACCGGAGAAAAAGCCCTACAATGCCCGAGTGTTGAAAAATCCTTTTCTAGAAACGATGCT CTGACCGAACACCAAAGAACACACACCGGCGAAAAAGCCTACCGGAAAAAAGACCAGC
ZF3 (nt)	40	CTGGAGCCCGGCGAAAAACCTTACAAGTGCCCCGAGTGCGGAAAGAGCTTCAGCAGAAGCGACAAACTGGT GAGGCATCAAAGGACACATACCGGAGAGAAGCCCTATAAGTGCCCCGAATGTGGCAAAATCCTTTCCAGAG GGCTCATCTGGAAAGACACAGAGGACCCATACCGGCGAAAAACCTTACAATGTCCCGAGTGTTGAAAGA GCTTTTCCGATCCCGGCCATCTGGTCAGACATCAGAGGACACATACCGGCGAAAAAGCCTTACAAGTGTCCTG AATGCCGAAAAATCCTTCTCCAGAAGCGACAAGCTGGTGAGGCACCAAGAACCACACCGGCGAAAAACCC TATAAATGCCCGAGTGCGGCAAGTCCTTTAGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCCAACAGAGAACACACACC GGAGAGAAGCCTTATAAGTGTCCTGAGTGCGGAAAGTCCTTCTAGAGCCGACAATCTGACCGAACATCAA AGGACACACACCGGCGAGAAACCTTATAAATGCCCGAGTGCGGAAAAAGCTTTTCCGACTGCAGAGATCTG GCTAGACACACAGAGAACCACACCGGCGAGAAACCCACCGGCAAAAAAGACCAGC
ZF4 (nt)	41	CTGGAGCCCGGCGAAAAAGCCTTATAAATGTCCCGAATGCCGCAAGAGCTTTAGCCACACCGGCCATCTGCT GGAACACCAAAGGACCCATACCGGCGAAAAAGCCCTATAAGTGCCCCGAGTGTTGCAAGAGCTTCAGCACCA CCGGCAATCTGACAGTCCATCAGAGGACCCACACCGGAGAGAAACCTTATAAATGCCCGAGTGTTGAAAG TCCTTCTCCGACAAGAAGGATCTGACAAGACACACAGAGGACCCATACCGGCGAGAAACCTTACAATGCC CGAGTGCGGCAAAATCCTTCTCCAGAGCGGCGATCTGAGGAGACATCAAAGAACACATACCGGCGAAAAAC CCTATAAGTGCCCCGAATGCCGCAAGTCCTTCAGCCAGAGGGCCCATCTGGAAAGGCATCAGAGGACACAC ACCGGCGAGAAAGCCTTACAATGTCCCGAGTGCGGAAAGAGCTTCTCTAGAAGCGACAAGCTGACCGAGCA TCAGAGGACCCACACCGGAGAAAAACCTTACAAGTGCCCCGAGTGCGGCAAAAGCTTCAGCAGAACCGACA CACTGAGAGATCACCAAAGGACACACACCGGCGAGAAACCCACCGGCAAAAAAGACCAGC
ZF5 (nt)	42	CTGGAGCCCGGCGAGAAGCCTTATAAAGTGCCCCGAGTGTTGCAAGAGCTTTAGCCACACCGGCCATCTGCTG GAGCATCAAAGGACACACACCGGAGAAAAAGCCCTATAAGTGCCCCGAGTGTTGCAAAATCCTTCAGCACCTCC GGCAATCTCACCAGAACACAGAGAACACACACCGGAGAAAAACCTTACAATGTCCCGAGTGTTGAAAGAGC TTTTCCACCAGCGCAATCTGGTGAGACATCAAAGAACACATACCGGCGAAAAACCTTATAAATGCCCGGAG TGTGGAAAAATCCTTCTCCCAACTGGCCCATCTGAGGGCCCAACAGAGGACACATACCGGAGAAAAACCTTACA AATGCCCGCAATGCCGAAAAAGCTTCTCCGAGAGAAGCCATCTGAGAGAGCACCAAAGGACCCATACCGGAG AAAAGCCTTACAAGTGTCCTGAGTGCGGAAAAAGCTTTAGCGATCCCGGACATCTGGTGAGACATCAGAGAA CCCACACCGGCGAAAAAGCCTTATAAATGTCCCGAATGTGGCAAGTCCTTTAGCACCCATCTGGATCTGATTAG ACACCAAAGAACCACACCGGCGAGAAACCCACCGGAAAAAAGACCAGC
ZF6 (nt)	43	CTGGAGCCCGGCGAAAAAGCCTTACAATGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCAGCGACCCCGGCGCTCTGGTG AGACATCAAAGAACACATACCGGCGAGAAACCTTATAAATGCCCGAATGTGGAAAAATCCTTCAGCGAAAGA AGCCATCTGAGGGAACACAGAGGACCCACACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGCCCCGAATGCCGAAAAAG CTTTTCTAGAAAGGATCATCTGACCAACCATCAGAGAACACACACCGGCGAAAAAGCCCTATAAATGTCCCGA GTGTGGCAAAATCCTTTAGCGAGAGGTCCCATCTGAGAGAGCACACAGAGGACACATACCGGAGAGAAGCCCTA CAAGTGCCCCGAGTGTTGCAAGAGCTTTAGCAGAAGCGACCATCTGACCAATCATCAAAGGACCCACACCGG AGAGAAGCCTTACAAGTGTCCTGAGTGCGGAAAGTCCTTTTCCGATCCCGGCCACCTCGTGAGGCAACCAAG AACCCATACCGGCGAGAAACCTTACAATGCCCGAGTGTTGAAAGAGCTTCTCCAGAAGCGACAAGCTGGT GAGGCATCAGAGGACACACACCGGCGAAAAACCCACCGGCAAGAAAAACCAGC

【 0 6 8 6 】

10

20

30

40

50

【表 9】

ZF7 (nt)	44	CTGGAGCCCGGAGAGAAGCCCTACAAATGCCCCGAGTGTGGAAAGAGCTTCTCTAGAAATGACGCTCTGAC AGAACACCAAGAGGACCCATACCGGCGAGAAAACCTTACAAATGCCCCGAGTGTGGAAAGAGCTTTAGCGATT GCAGAGATCTGGCTAGACATCAGAGAACACACACCCGGCGAGAAAGCCCTATAAGTGTCCCGAATGCGGCAA GAGCTTTAGCGACCCCGGCCATCTGGTGAGACATCAAAGGACACATACCGGAGAAAAACCTTACAAGTGCC CCGAGTGTGGAAAGTCTTCTCCAGAGCGGCCATCTCACCAGCATCAAAGGACCCACACCGGCGAAAAG CCTTATAAATGTCCCGAATGTGGCAAGTCCTTCTCTAGAGAGGATAATCTGCACAUUCAICAGAGGAUUCAC ACCGGCGAAAAGCCTTATAAATGCCCGAATGTGGAAAGTCTTTTCCACCAAGAACTCTCTGACCGAGCAT CAGAGGACACACACCGGAGAGAAACCCCTATAAATGTCCCGAGTGTGGCAAGAGCTTCAGCAGAGCCGACAA TCTGACAGAGCACCAAGAACACATACCGGCGAAAAGCCACCGGCAAAAAGACCAGC
ZF8 (nt)	45	CTGGAGCCCGGCGAGAAAACCTTACAAAGTGTCCCGAGTGTGGCAAATCCTTCTCTAGATCCGACAAACTGAC CGAACATCAGAGGACCCATACCGGCGAAAAACCTTATAAATGTCCCGAGTGTGGAAAGTCTTCTCTAGAA GGGACGAGCTGAACGTGCATCAGAGAACACATACCGGCGAGAAAGCCCTATAAATGCCCGAATGCGGCAA AAGCTTCTCTAGAAAGCGATCATCTGACCAACCCAGAGAAACCCATACCGGAGAAAAAGCCTTACAAGTGTG CCGAATGTGGAAAATCCTTACGCTCCCGCGCATCTGACCAAGACACCAAGGACCCACACCGGCGAGAAG CCCTATAAATGCCCGAGTGTGGCAAGAGCTTTTCCAGATCCGACCATCTGACCAATCATCAAAGAACCCAC ACCGGCGAAAAGCCTTATAAATGTCCCGAGTGTGGCAAAATCCTTTTCCAGCAAGAAGGCTCTGACCGAGCA TCAAAGGACCCATACCGGCGAGAAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGTGGAAAGTCTTTAGCACCCATCTGGA TCTGATTAGACACCAAGGACACACACCGGAGAGAAACCCACCGGCAAAAAGACCAGC
ZF9 (nt)	46	CTGGAGCCCGGCGAGAAAACCTTACAAATGCCCCGAGTGTGGCAAAGAGCTTACGAGAAGCGACGATCTGGT GAGGCACCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCTTACAAGTGTCCCGAATGCGGAAAGTCTTACGACAGAG AGGACATCTGCACACCCACAGAGAAACACACCGGAGAAAAGCCTTACAAGTGTCCCGAATGCGGCAA ATCCTTTTCTAGAAAGCGATCATCTGACCAACCCACCAAGAACACATACCGGCGAGAAAGCCTTACAATGTCC CGAGTGTGGAAAGTCTTCTCCAGAGAGCCAATCTGAGGGCTCATCAAAGGACCCATACCGGCGAAAAGC CCTACAAATGCCCGAGTGTGGAAAATCCTTTCAGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCCAACCAAGGACACAC ACCGGAGAGAAAACCTTATAAATGTCCCGAGTGTGGAAAAGCTTTTCCAGAGGGCCAACTGAGGGAUUC TCAGAGGACCCATACCGGAGAGAAAGCCTTATAAATGTCCCGAGTGTGGAAAAGCTTTCAGCGAGAGGAGCC ATCTGAGGGAACATCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCCACCGGAAAAAAGACCAGC
ZF10 (nt)	47	CTGGAGCCCGGCGAGAAAACCTTACAAAGTGTCCCGAGTGTGGAAAAAGCTTTAGCCAAAGCGGCGATCTGAGG AGACACCAAAGAACACACACCGGCGAGAAAGCCCTACAAATGTCCCGAGTGTGGAAAAGCTTACGCCAGAG CGGCCATCTGACCGAGCATCAGAGAACCCATACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGTCCCGAGTGTGGAAAGTC TTCTCTCGAGAGATCCCATCTGAGAGAACACAGAGGACACACACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGTCCCGA GTGCGGAAAGTCTTTCAGCGATCCCGGCCATCTGGTGAGACATCAAAGGACACATACCGGCGAAAAACCTTA TAAGTGTCCCGAATGCGGCAAGAGCTTTAGCAGAAACGACACACTACCGGAACACAGGAGGCCACACCGG CGAGAAAACCTTACAAATGTCCCGAGTGTGGCAAATCCTTTTCTAGAGCCGACAATCTGACCGAUAUUCAGAG GACCCATACCGGAGAAAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGTGGCAAATCCTTCTCCACCCATCTGGATCTGATT AGACACCAAAGAACACATACCGGAGAAAAGCCACCGGAAAAAAGACCAGC
ZF11 (nt)	48	CTGGAGCCCGGCGAAAAACCTTATAAGTGTCCCGAATGTGGAAAAGAGCTTACGCCATACCGGCCATCTGCT GGAACACCAAAGGACACACACCGGCGAGAAAACCTTACAAGTGTCCCGAGTGTGGAAAAGCTTCTCTCTCCA AAAAGGCTCTACCGAGCACCAGAGAACACATACCGGCGAAAAGCCTTATAAGTGTCCCGAGTGTGGAAAA TCCTTTTCCGACTGTAGAGATCTGGCCAGACATCAAAGAACCCACACCGGAGAGAAAACCTTATAAATGCCCG GAGTGTGGCAAGTCTTTAGCCATACCGGCCATCTGCTGGAGCACCAGAGGACCCATACCGGCGAGAAAGCC TTACAAATGCCCGAGTGTGGCAAAAGCTTACGAGAAAATGACGCTCTGACCGAGCATCAAAGGACCCATA CCGGCGAAAAAGCCTTACAAGTGTCCCGAGTGTGGAAAGTCTTCTCCAGAGCGGCGATCTGAGGAGACAC CAGAGAACACACACCGGCGAGAAAACCTTATAAATGTCCCGAGTGTGGAAAAGCTTTCAGCGACAGCGGCAA TCTGAGGGTGCATCAAAGAACACACACCGGCGAAAAACCCACCGGAAAAAAGACAAGC
ZF12 (nt)	49	CACCGGCGAAAAAGCCTTATAAGTGTCCCGAGTGTGGCAAAGTCTTCTCTAGAAAGCGATCACCTCACCAATCA TCAGAGGACACATACCGGAGAGAAGCCCTATAAGTGTCCCGAGTGTGGCAAAGAGCTTTAGCCAGCTGGCTC ATCTGAGAGCTACCAAAGAACCCATACCGGCGAGAAAGCCTTACAAATGCCCGAGTGTGGAAAATCCTTT TCCAGTCCAGCAACCTCGTCAGACATCAAAGGACCCATACCGGCGAAAAGCCTTACAAGTGTCCCGAGTG CGGAAAAGTCTTCTCTAGATCCGACAACCTCTGTGAGGACACAGAGAACCCACACCGGCGAGAAAACCTTACA AATGTCCCGAGTGTGGCAAAAGCTTTCTAGAAAGCGACGAGCTGGTGAGACATCAAAGAACCCATACCGGC GAAAAACCTTATAAGTGTCCCGAGTGTGGCAAATCCTTTAGCCAGCTGGCCATCTGAGGGCCCAACAGAGA ACACATACCGGCGAAAAACCCACCGGCAAAAAGACAAGC

【0687】

【表 10】

ZF12 (nt) 完全長	115	CTGGAGCCCGCGGAGAAAACCTATAAATGCCCGGAATGCGGAAAAGCTTCAGCCAGTCCAGCTCTCTGGTG AGACATCAGAGGACACACACCGGCGAAAAAGCCTTATAAGTGCCCCGAGTGCGGCAAGTCTTCTCTAGAAGC GATCACCTACCAATCATCAGAGGACACATACCGGAGAGAAGCCCTATAAGTGCCCCGAGTGCGGCAAGGAGC TTTAGCCAGCTGGCTCATCTGAGAGCTCACCAAAGAACCCTACCGGCGAGAAGCCTTACAAATGCCCGGAG TGTGGAAAATCCTTTTCCAGTCCAGCAACCTCGTCAGACATCAAAGGACCCATACCGGCGAAAAAGCCTTAC AAGTGTCCCGAGTGCGGAAAAGTCTTCTAGATCCGACAACCTCGTGAGGCACAGAGAACCCACACCGGC GAGAAAACCTTACAAATGTCCCGAGTGTTGGCAAAAAGCTTTTCTAGAAGCGACGAGCTGGTGAGACATCAAAGA ACCCATACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGTTCCCGAGTGCGGCAAAATCCTTTAGCCAGCTGGCCCATCTGAGG GCCACCAGAGAACACATACCGGCGAAAAACCCACCGGCAAAAAGACAAGC
ZF9	131	CUGGAGCCCGGCGAGAAAACCUUACAAAUGCCCCGAGUGCGCAAGAGCUUCAGCAGAAGCGACGAUCUGG UGAGGCACCAAGAACCACACCGGCGAAAAACCUUACAAGUGUCCCGAAUGCGGAAAGUCCUUCAGCAG AGAGGACAAUCUGCACACCCACAGAGAACACACACCGGAGAAAAAGCCUUAACAAGUGCCCCGAAUGCGGC AAAUCCUUUUUCUAGAAGCGAUCAUCUGACCAACCCACCAAGAACACAUACCGGCGAGAAGCCUUACAAU GUCCCGAGUGCGGAAAGUCCUUCUCCAGAGAGCCAAUCUGAGGGCUCUAUCAAAGGACCCAUACCGGCGA AAAGCCCUACAAAUGCCCCGAGUGCGGAAAAUCCUUCAGCCAGCUGGCCAUUCUGAGAGGCCACCAAGG ACACACACCGGAGAGAAAACCUUUAAGUGCCCCGAGUGUGGAAAAAGCUUUUCCAGAGGGGCAAUUCUGA GGGCCAUACAGAGGACCCAUACCGGAGAGAAAGCCUUAUAAAUGUCCCGAGUGCGGAAAAAGCUUCAGCGA GAGGAGCCAUUCUGAGGGAACAUAAGAACCACACCGGCGAAAAACCCACCGGAAAAAAGACCAGC
ZF54	173	CTGGAGCCTGGAGAGAAAACCTACAAATGCCCGGAATGCGGGAAGTCTTTTCCGAACGCTCGCACCTGAGG GAACACCAGAGAACTCACACCGGCGAAAAACCTATAAGTGCCGAGAATGCGGAAAGAGCTTTTACGGTGC GACAACCTCGTGCGGCACCAACGCATCATACCGGAGAGAAGCCGTACAAGTGTCTGAGTGCGGAAAGTCA TCTCCGACTGCGGGATTGGCCCGCCACCAAGAACAACACTGGCGAAAAGCCCTACAAAGTCCCGGAG TGTGAAAAGTCTTCAGCACTTCCGGAGAGCTGGTCCGCAACAGAGGACCCACACCGGGGAGAAGCCTTAC AAATGTCCAGAGTGCGGTAAGGCTTCTCCACCACCGGCAACCTCACCGTGCACAGCGGACCCACACTGGA GAAAAGCCGTATAAATGCCCGGAATGCGGCAAGAGCTTCTCGCATCCGATAAGCTTGTGCGGCATCAGAGA ACGCACACTGGGAAAAAGCCTTATAAGTGTCGGAGTGCGGCAAAATCCTTCTCCGCACTGACACCCCTGCGG GACCATCAGCGACCCATACCGGCAAAAAGACCTCT
ZF61	174	CTTGAACCCGGGAGAGCCCTACAAGTGCCCGGAATGCGGAAAGAGCTTCAGCCAGAAAGTCTCGTGATC GCGCACCAAGGACTCACACCGGCGAAAAAGCCATACAAGTGCTCTGAGTGTGGCAAAATCCTTCTCGCACAAG AACGCACTGCAGAACCCACAGAGAACCCACACCGGGGAAAAAGCCGTATAAGTGCCCGGAATGTGGAAAGTC GTTCAGCCAGTCATCAACCTCGTGCGCATCAAAGGACTCATACCGGAGAGAAACCTTACAAATGCCCTGA ATGCGGCAAACTTTTCTCCCGGAATGATGCCCTGACCGAGCACCAGCGCACTCACACGGGAGAGAAGCCGT CAAAATGTCCGGAGTGCGGAAAGTCTTCTCCGACAAGAAGGACTTGACCAGACACCGGACCCATCTAGG CGAAAAACCTTATAAGTGTCAGAGTGCGGGAAGTCTTTAGCCAAGCCGCTACCTCGCTTCCACCAACG GACCCACACAGGAGAAAAAGCCTTATAAATGCCCGAGTGCGGCAAAAGCTTCTCCGATAAGAAGGACCTGAC TCGGCATCAGCGACCCATACCGGAAAGAAAACTCA
ZF67	175	CTGGAGCCTGGCGAAAAACCTATAAGTGCCCGAATGCGGAAAGAGCTTTTACGGTTCGGACAACCTCGTG CGGCACCAACGCACTCATACCGGAGAGAAGCCGTACAAGTGCTCTGAGTGCGGAAAGTCAATTCCTCGACTGC CGGATTTGGCCCGCCACCAAGAACACACACTGGCGAAAAAGCCCTACAAGTGCCCGGAGTGTTGAAAGTCC TTCAGCACTTCCGGAGAGCTGGTCCGGCACAGAGGACCCACACCGGGGAGAAGCCTTACAAATGTCCAGAG TGCGGTAAAAGCTTCTCCACCACCGGCAACCTCACCGTGCACAGCGGACCCACACTGGAGAAAAAGCCGTAT AAATGCCCGGAATGCGGCAAGAGCTTCTCGCATCCGATAAGCTTGTGCGGCATCAGAGAACGCACACTGGG GAAAAGCCTTATAAGTGTCGGAGTGCGGCAAAATCCTTCTCCGCACTGACACCTGCGGGACCCACAGAGA ACCCATCTGGCGAGAAGCCATACAAATGCCCGGAATGTGGAAGAGTTCCTCGCGCAGGACAACTCCAC ACCCATCAGCGACCCATACCGGCAAAAAGACCTCT
ZF68	176	CTGGAACCCGGAGAGAAAACCTACAAATGCCAGAGTGCGGCAAAATCGTTCTCACGGTCCGATCACTCACC ACCCACAGAGGACCCATACCGGGGAGAAGCCTTACAAGTGCTCTGAGTGTTGAAAGTCTTACGCCAAAAG TCTCTCGTGATCGCACACAGCGCACGCACTGGGGAAAAAGCCATATAAATGCCCGGAGTGTTGCAAAATCC TTCTCCCGCGCGACGAACGTGACAGAGAACCCACACTGGAGAGAAGCCGTATAAGTGTCCGGAG TGCGGAAAGAGCTTCTCGCAATCCGGGGACCTTCGGAGACATCAGAGGACACACACTGGCGAAAAAGCCTAT AAGTGCCCTGAGTGCGGGAAGTCTTTAGCCAAGCCGCTACCTGGCTCCCAACCGGACTCACACCGGC GAAAAACCGTACAAGTGCCCGGAATGCGGAAAGTCTTCTTACCTCCGGAACCTTGACCGAACACAGCGG ACCCACACCGGAGAAAAAGCCGTACAAATGTCTGAATGCGGCAAAAGCTTCAGCCAGGCGGCTATCTCGCG AGCCATCAGCGGACTCATCTGCAAAAAGACCTCA

10

20

30

40

【0688】

いくつかの実施形態では、発現抑制は、操作されたDNA結合ドメイン（DBD）、例えば、マウスゲノムにおける標的配列、例えば、標的遺伝子（例えば、MYC）に作動可能に連結したプロモータ又は転写開始部位（TSS）配列、例えば、転写調節エレメントに近接した配列、例えば、標的遺伝子（例えば、MYC）を含むアンカー配列媒介接合部（ASMC）のアンカー配列、例えば、アンカー配列に近接した配列に結合するZnフィンガー（ZFN）を含むZnフィンガードメインを含むターゲティング部分を含む。いくつかの実施形態では、ZFNは、標的部位にエピジェネティックエフェクター分子を運ぶように操作することができる。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、2、

50

3、4、5、6、7、又は8個のジンクフィンガーを含むZnフィンガードメインを含む。本明細書に開示される例示的ターゲティング部分のアミノ酸配列を表14に掲載する。本明細書に開示される例示的ターゲティング部分をコードするヌクレオチド配列を表15に掲載する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサー又はシステムは、表14に示される配列、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%の同一性を有する配列を有するターゲティング部分を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、表15に示される配列、又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%の同一性を有する配列を含む。

【0689】

【表11】

表14: 例示的マウス特異的ターゲティング部分のアミノ酸配列

名称	配列番号	配列
ZF15 (aa)	154	LEPGKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGK SFSRNDILTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGSLVRHQRTHT TGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPTGKKTS
ZF16(a a)	155	LEPGKPYKCPECGKSFSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECG KSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDDKDLTRHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGHLTEHQRTHTGEKPTGKKTS
ZF17(a a)	156	LEPGKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECG KSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPTGKKTS

【0690】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表15: 例示的マウス特異的ターゲティング部分のヌクレオチド配列

名称	配列番号	配列
ZF15 nt	157	CTTGAGCCCGGAGAAAAGCCATACAAATGTCTGAATGCGGAAAGTCATTTTCTACGAGCGGCGAAC TCGTGCGGCACCAAAGGACTCATACUGGUGAAAAGCCTTACAAAIGUUUGGAGIGCGGAAAAAGCTT CTCCGAGCGCTCGCACTTGCGGGAACACCAGCGAACCACACAGGGGAGAAACCGTATAAGTGCCCA GAGTGCGGCAAAATCGTTCTCCCGGAACGACACCTGACCGAACCAACGCACTCATACTGGCGAAA AACCTTACAAGTGCCCTGAGTGTGGAAGAGCTTCTCCCGCGCCGATAACCTGACCGAGCACCAGCG GACCCATACCGGGGAAAAGCCGTACAAGTGTCCGGAATGCGGCAAAAGCTTCAGCACCTCGGGTTCC CTGGTCCGGCATCAGAGAACTCACACCGGAGAGAAAACCTATAAGTGTCTGAGTGCGGGAAGTCTCT TTTCATCGCCCGCGACCTGACTAGACACCAGAGGACCCACACCGGGGAGAAGCCCTACAAGTGCCC CGAATGTGGAAGTCTTCTCCGACTCCGGCAACCTCCGGGTGCACCAGCGCACCCACACTGGAGAG AAGCCGACCGGAAAGAAAACCTCC
ZF16 nt	158	CTGGAACCCGGAGAAAAACCTTATAAGTGCCCTGAATGCGGAAAGTCATCTCGAGGTGGACAAGC TCGTGCGGCACAGAGGACACACACCGGGGAAAAGCCATACAAGTGTCCCGAATGTGGAAGTCTCT CAGCCAACGCGCCAACCTGAGAGCTCATCAGCGGACTCACACTGGCGAAAAACCGTACAAATGCCCC GAATGCGGCAAAAGCTTCTCCCGCGCCGACAACTTGACCGAGCACCAGCGGACCCATACCGGCGAAA AGCCGTACAAGTGCCCGGAGTGTGGGAAGTCGTTAGCCAGTCTCTTCCCTCGTGCGCCACCAACGC ACCCATACTGGGGAGAAGCCCTATAAGTGTCTGAGTGTGGCAAAATCATTACGCGATAAGAAGGATC TTACCCGGCACCAACGGACTCATACCGGAGAGAAGCCTTACAAGTGCCCGAGTGCGGAAAGAGCTT CTCGTCCCGGGCGGACCTGACTAGACACCAGCGCACCCACACCGGAGAAAAAGCCCTACAAGTGCCCA GAGTGCGGGAAGTCTTTTCCCAATCCGGTCACTGACTGAGCACCAGAGAACCCACACGGGAGAGA AACCGACCGGAAAGAAAACCTCC
ZF17 nt	159	TTGGAACCCGGAGAAAAGCCATACAAATGCCCGAATGCGGAAAGTCGTTACGCCAGTCCGGCGACC TCAGACGGCACCAACGGACTCACACCGGCGAAAAACCGTACAAGTGCCAGAGTGCGGCAAAAGCTT TAGCCAGTCCGGCGATCTGCGGAGACATCAGCGCACTCACACTGGTGAAAAAGCCCTACAAGTGTCT GAGTGCGGGAAGTCTTACGCGAGCGCTCCCATCTTCGCGAGCACCAGAGAAACCCACACTGGAGAAA AACCTTATAAGTGCCCTGAGTGTGGCAAAATCTTCTCAACACCGGCAACCTGACTGTGCACCAGCGG ACCCACACAGGGGAGAAGCCTTACAAGTGCCCGGAGTGTGGGAAGTCATTTCTCCCATCGGACGACCC TGACCAACCAACAGAGGACCCATACTGGCGAAAAGCCGTATAAGTGTCCGAGTGCGGAAAGAGCTT CTCCGACTCCGGAACCTCAGGGTGACCAACGCACCCACACCGGAGAGAAGCCGTACAATGTCCC GAATGTGGAAGTCTTCTCCCAATCTCTTCGCTGGTCCGGCACCAGCGAACTCATACCGGGGAAAA GCCACCGGAAAGAAAACCTCG

10

20

30

40

50

【0691】

核酸分子

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、ヌクレアーゼ由来のDNA結合ドメインであるか、又はそれを含む。例えば、ホーミングエンドヌクレアーゼ及びメガヌクレアーゼの認識配列、例えば、I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII及びI-TevIIIが知られている。また、以下の文献も参照されたい：米国特許第5,420,032号；同第6,833,252号明細書；Belfort, et al (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388；Dujon, et al. (1989) Gene 82:115-118；Perler, et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22:1125-1127；Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228；Gimble, et al. (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180；Argast, et al. (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353及びNew England Biolabsカタログ。加えて、非天然標的部位に結合するように、ホーミングエンド

ヌクレアーゼ及びメガヌクレアーゼのDNA結合特異性を操作することができる。例えば、Chevalier, et al. (2002) Molec. Cell 10:895-905; Epinat, et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962; Ashworth, et al. (2006) Nature 441:656-659; Paques, et al. (2007) Current Gene Therapy 7:49-66; 米国特許出願公開第2007/0117128号明細書を参照されたい。

【0692】

いくつかの実施形態では、DNAターゲティング部分は、核酸を含むか、又は核酸である。いくつかの実施形態では、DNAターゲティング部分に含まれ得る核酸は、DNA、RNA、及び／又は人工若しくは合成核酸又は核酸類似体若しくは模倣物であるか、又はそれを含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、核酸は、ゲノムDNA (gDNA)、相補的DNA (cDNA)、ペプチド核酸 (PNA)、ペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲート、ロック核酸 (LNA)、架橋核酸 (BNA)、ポリアミド、トリプレックス形成オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、tRNA、mRNA、rRNA、miRNA、gRNA、siRNA又は他のRNA分子 (例えば、本明細書に記載の非コードRNAをターゲティングし、且つ／又は本明細書に記載の標的ゲノム複合体と結合した特定の遺伝子の発現産物をターゲティングするもの) などのうち1つ以上であってもよいし、又はそれらを含んでもよい。いくつかの実施形態では、核酸は、天然に存在するDNA又はRNA残基ではない1つ以上の残基を含んでもよく、ホスホジエステル結合ではない (例えば、ホスホロチオエート結合などであり得る) 1つ以上の結合を含んでもよく、且つ／又は、例えば、2'-OmePのような2' O修飾などの1つ以上の修飾を含んでもよい。合成核酸を調製するのに有用な様々な核酸構造は、当技術分野で公知であり (例えば、国際公開第2017/062862号及び同第2014/012081号パンフレットを参照)、当業者は、本開示に従ってそれらが使用され得ることを理解されよう。

【0693】

発現リプレッサー、例えば、DNAターゲティング部分における使用に適した核酸として、限定はされないが、DNA、RNA、修飾オリゴヌクレオチド (例えば、骨格結合、糖分子、及び／又は核酸塩基を改変する修飾などの化学修飾)、並びに人工核酸を挙げることができる。いくつかの実施形態では、核酸として、限定はされないが、ゲノムDNA、cDNA、ペプチド核酸 (PNA) 又はペプチドオリゴヌクレオチドコンジュゲート、ロック核酸 (LNA)、架橋核酸 (BNA)、ポリアミド、トリプレックス形成オリゴヌクレオチド、修飾DNA、アンチセンスDNAオリゴヌクレオチド、tRNA、mRNA、rRNA、修飾RNA、miRNA、gRNA、及びsiRNA又は他のRNA若しくはDNA分子が挙げられる。

【0694】

いくつかの実施形態では、DNAターゲティング部分は、長さが約15~200、20~200、30~200、40~200、50~200、60~200、70~200、80~200、90~200、100~200、110~200、120~200、130~200、140~200、150~200、160~200、170~200、180~200、190~200、215~190、20~190、30~190、40~190、50~190、60~190、70~190、80~190、90~190、100~190、110~190、120~190、130~190、140~190、150~190、160~190、170~190、180~190、15~180、20~180、30~180、40~180、50~180、60~180、70~180、80~180、90~180、100~180、110~180、120~180、130~180、140~180、150~180、160~180、170~180、15~170、20~170、30~170、40~170、50~170、60~170、70~170、80~170、90~170、100~170、110~170、120~

170、130~170、140~170、150~170、160~170、15~160、20~160、30~160、40~160、50~160、60~160、70~160、80~160、90~160、100~160、110~160、120~160、130~160、140~160、150~160、215~150、20~150、30~150、40~150、50~150、60~150、70~150、80~150、90~150、100~150、110~150、120~150、130~150、140~150、15~140、20~140、30~140、40~140、50~140、60~140、70~140、80~140、90~140、100~140、110~140、120~140、130~140、15~130、20~130、30~130、40~130、50~130、60~130、70~130、80~130、90~130、100~130、110~130、120~130、215~120、20~120、30~120、40~120、50~120、60~120、70~120、80~120、90~120、100~120、110~120、15~110、20~110、30~110、40~110、50~110、60~110、70~110、80~110、90~110、100~110、15~100、20~100、30~100、40~100、50~100、60~100、70~100、80~100、90~100、15~90、20~90、30~90、40~90、50~90、60~90、70~90、80~90、15~80、20~80、30~80、40~80、50~80、60~80、70~80、15~70、20~70、30~70、40~70、50~70、60~70、15~60、20~60、30~60、40~60、50~60、15~50、20~50、30~50、40~50、15~40、20~40、30~40、15~30、20~30、若しくは15~20ヌクレオチド、又はこれらの間の任意の範囲である核酸を含む。

10

20

30

40

50

【0695】

エフェクター部分

いくつかの実施形態では、本開示の発現リプレッサーは1つ以上のエフェクター部分を含む。いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、本明細書に記載の発現リプレッサー（*expressor repressor*）又は発現抑制システムの一部として使用されるとき、細胞における標的遺伝子の発現を低減する。

【0696】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、ターゲティング部分の結合には無関係な機能を有する。例えば、エフェクター部分は、ターゲティング部分が標的とするゲノム配列エレメント又はゲノム配列エレメントに近接したゲノム複合体成分を標的とし、例えば、それに結合し、又は転写因子を動員し得る。さらなる例として、エフェクター部分は、酵素活性、例えば、遺伝子修飾機能を含み得る。

【0697】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、エピジェネティック修飾部分を含む。いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、DNA修飾機能、例えば、DNAメチルトランスフェラーゼを含む。いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、MQ1、DNMT1、DNMT3A1、DNMT3A2、DNMT3B1、DNMT3B2、DNMT3B3、DNMT3B4、DNMT3B5、DNMT3B6、DNMT3L、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片から選択されるタンパク質であるか、又はそれを含む。

【0698】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、転写リプレッサーを含む。いくつかの実施形態では転写リプレッサーは、例えば標的遺伝子の、転写を刺激し又は促進する因子の動員を遮断する。いくつかの実施形態では、転写リプレッサーは、例えば標的遺伝子の、転写を阻害する因子を動員する。いくつかの実施形態では、エフェクター部分、例えば、転写リプレッサーは、KRAB、MeCP2、HP1、RBBP4、REST、FOG1、SUZ12、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片から選択されるタン

パク質であるか、又はそれを含む。

【0699】

いくつかの実施形態ではエフェクター部分は、エピジェネティック修飾を、例えば、直接的又は間接的に促進する。例えば、エフェクター部分は、クロマチンをエピジェネティック修飾する内因性タンパク質を動員することによってエピジェネティック修飾を間接的に促進し得る。エフェクター部分は、エピジェネティック修飾を触媒することによってエピジェネティック修飾を直接促進することができ、ここで、上記エフェクター部分は、酵素活性を含み、及びクロマチンにエピジェネティックマークを直接置く。

【0700】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、ヒストン修飾機能、例えば、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼ、又はヒストンデアセチラーゼ活性を含む。いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、KDM1A（即ち、LSD1）、KDM1B（即ち、LSD2）、KDM2A、KDM2B、KDM5A、KDM5B、KDM5C、KDM5D、KDM4B、NO66、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片から選択されるタンパク質であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8、HDAC9、HDAC10、HDAC11、SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6、SIRT7、SIRT8、SIRT9、又はこれらのいずれかの機能性変異体若しくは断片から選択されるタンパク質であるか、又はそれを含む。

【0701】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、本明細書に記載の機能を有するタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、以下から選択されるタンパク質であるか、又はそれを含む：KRAB（例えば、NP__056209.2に記載のもの又はNM__015394.5によってコードされるタンパク質）；SETドメイン（例えば、以下のSETドメイン：SETDB1（例えば、NP__001353347.1に記載のもの又はNM__001366418.1によってコードされるタンパク質）；EZH2（例えば、NP__004447.2に記載のもの又はNM__004456.5によってコードされるタンパク質）；G9A（例えば、NP__001350618.1に記載のもの又はNM__001363689.1によってコードされるタンパク質）；又はSU39H1（例えば、NP__003164.1に記載のもの又はNM__003173.4によってコードされるタンパク質））；ヒストンデメチラーゼLSD1（例えば、NP__055828.2に記載のもの又はNM__015013.4によってコードされるタンパク質）；FOG1（例えば、FOG1のN-末端残基）（例えば、NP__722520.2に記載のもの又はNM__153813.3によってコードされるタンパク質）；又はKAP1（例えば、NP__005753.1に記載のもの又はNM__005762.3によってコードされるタンパク質）；これらのいずれかの機能性断片又は変異体、又は上記に言及する配列のいずれかと少なくとも80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%の同一性を有する配列のポリペプチド。

【0702】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、以下から選択されるタンパク質であるか、又はそれを含む：DNMT3A（例えば、ヒトDNMT3A）（例えば、NP__072046.2に記載のもの又はNM__022552.4によってコードされるタンパク質）；DNMT3B（例えば、NP__008823.1に記載のもの又はNM__006892.4によってコードされるタンパク質）；DNMT3L（例えば、NP__787063.1に記載のもの又はNM__175867.3によってコードされるタンパク質）；DNMT3A／3L複合体、細菌性MQ1（例えば、CAA35058.1又はP15840.3に記載のもの）；これらのいずれかの機能性断片、又は上記に言及する配列のいずれかと少なくとも80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%の同一性を有する配列のポリペプチド。

【0703】

別の態様では、本開示は、1つ以上の（例えば、1つの）ターゲティング部分と1つ以上のエフェクター部分とを含む発現リプレッサー又はポリペプチドに関し、ここで、上記1つ以上のエフェクター部分は、K r u e p p e l結合ボックス（K R A B）、例えば、N P _ 0 5 6 2 0 9 . 2に記載のもの又はN M _ 0 1 5 3 9 4 . 5によってコードされるタンパク質又はその機能性変異体若しくは断片であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、K R A Bは、合成K R A B構築物である。いくつかの実施形態では、K R A Bは、配列番号18のアミノ酸配列を含む：

D A K S L T A W S R T L V T F K D V F V D F T R E E W K L L D T A Q Q I L Y R N
V M L E N Y K N L V S L G Y Q L T K P D V I L R L E K G E E P W L V E R E I H Q
E T H P D S E T A F E I K S S V（配列番号18）

10

【0704】

いくつかの実施形態では、K R A Bエフェクター部分は、配列番号51のヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のヌクレオチド配列は、配列番号51の配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む。

【化5】

GACGCCAAGAGCCTGACCGCCTGGAGCCGGACCCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTCTGTGG
ACTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGT
GATGCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAAGCCCGACGTG
ATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGAGCGGGAGATCCACCAGGAGA
CCCACCCCGACAGCGAGACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTG（配列番号51）

20

【0705】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド又は発現リプレッサーで使用するためのK R A Bは、変異体、例えば、配列番号18のK R A B配列と比べて1つ以上の突然変異を含む変異体である。いくつかの実施形態では、K R A B変異体は、配列番号18と比べて1つ以上のアミノ酸置換、欠失、又は挿入を含む。

30

【0706】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド又は発現リプレッサーは、K R A Bであるか、又はそれを含むエフェクター部分とDNAターゲティング部分とを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、ジンクフィンガードメイン、T A Lドメイン、又はC R I S P R / C a sドメイン、例えば、C R I S P R / C a sタンパク質、例えば、d C a s 9タンパク質を含むものであるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド又は発現リプレッサーは、本明細書に記載の追加的な部分を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド又は発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、M Y Cの発現を低減する。いくつかの実施形態では、ポリペプチド又は発現リプレッサーは、遺伝子発現を調節する、例えば、低減する方法、病態を治療する方法、又は標的遺伝子、例えば、M Y C又は本明細書に記載の転写制御エレメントをエピジェネティック修飾する方法で、例えば、発現抑制システムの代わりに使用されてもよい。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは2つ以上の（例えば、2、3、又は4つの）発現リプレッサーを含み、ここで、第1発現リプレッサーは、配列番号18のK R A B配列を含むエフェクター部分、又はその機能性変異体若しくは断片を含む。

40

【0707】

別の態様では、本開示は、1つ以上の（例えば、1つの）ターゲティング部分と1つ以上のエフェクター部分とを含む発現リプレッサー又はポリペプチドに関し、ここで、上記

50

1つ以上のエフェクター部分は、MQ1、例えば、細菌性MQ1、又はその機能性変異体若しくは断片であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、MQ1は、モリクテス綱 (Mollicutes) スピロプラズマMQ1である。いくつかの実施形態では、MQ1は、スピロプラズマ・モノビアエ (Spiroplasma monobiae) MQ1である。いくつかの実施形態では、MQ1は、株ATCC 33825からの、及び／又はUniprot ID P15840に対応するMQ1である。いくつかの実施形態では、MQ1は、配列番号19のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、MQ1は、配列番号87のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のエフェクタードメインは、配列番号19又は87、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む。

10

【化6】

SKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEY
KSVSREEMIDYLENKTLWSNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTL
KNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLH
KKNEEELNQWKQKLES LGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKK
VLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRI
KIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIDKIGG (配列
番号19)

20

MSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHT
KLEYKSVSREEMIDYLENKTLWSNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFD
IRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLP
KYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLES LGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLN
EFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNS
EGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLT
ENQKIFVCGNSISVEVLEAIDKIGG (配列番号87)

30

【0708】

いくつかの実施形態では、MQ1は、配列番号52又は132のヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号52、132の配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む。

40

【化 7】

AGCAAGGTGGAGAACAAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCG
CCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGCGCCTGGCCG
AGTGGTACGTGCCCCGCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACCTCCACACCAAGCTG
GAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATCGACTACCTGGAGAACAAAGACCCTGAGCT
GGAACAGCAAGAACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGA
AGATCATCTACAACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGA
CCTGTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCTTCCCCTGCCAGGACC
TGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCT
GTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTG
ATGGAGAACGTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAGTGGAAG
CAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCG
GCAGCAGCCAGGCCCGGCGGGCGGGTGTTTCATGATCAGCACCTGAACGAGTTCGTGGAGCT
GCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGA
GAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGC
AACATCAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACGTGTACG
ACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGCCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAA
GGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGAC
AGCCAGGACGGCAAGCGGGTGAACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCG
TGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGC
(配列番号52)

10

20

30

40

50

【化 8】

AGCAAGGUGGAGAACAAGACCAAGAAGCUGCGGGUGUUCGAGGCCUUCGCCGGCAUCGGC
GCCCAGCGGAAGGCCCUUGGAGAAGGUGCGGAAGGACGAGUACGAGAUCGUGGGCCUGGCC
GAGUGGUACGUGCCCGCCAUCGUGAUGUACCAGGCCAUCCACAACAACUCCACACCAAG
CUGGAGUACAAGAGCGUGAGCCGGGAGGAGAUGAUCGACUACCUGGAGAACAAGACCCU
GAGCUGGAACAGCAAGAACCCCGUGAGCAACGGCUACUGGAAGCGGAAGAAGGACGACG
AGCUGAAGAUAUCUACAACGCCAUCAAGCUGAGCGAGAAGGAGGGCAACAUCUUCGACA
UCCGGGACCUGUACAAGCGGACCCUGAAGAACAUCGACCUGCUGACCUACAGCUUCCCCU
GCCAGGACCUGAGCCAGCAGGGCAUCCAGAAGGGCAUGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGA
GCGGCCUGCUGUGGGAGAUCGAGCGGGGCCUGGACAGCACCGAGAAGAACGACCUGCCCA
AGUACCUGCUGAUGGAGAACGUGGGCGCCCUGCUGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCUG
AACCAGUGGAAGCAGAAGCUGGAGAGCCUGGGCUACCAGAACAGCAUCGAGGUGCUGAA
CGCCGCCGACUUCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGGUGUUCAUGAUCAGCACCCUGAA
CGAGUUCGUGGAGCUGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGAGCAUCAAGAAGGUGCUGA
ACAAGAUCGUGAGCGAGAAGGACAUCUGAACAACCUGCUGAAGUACAACCUGACCGAGU
UCAAGAAaACCAAGAGCAACAUCAACAAGGCCAGCCUGAUCGGCUACAGCAAGUUCAACA
GCGAGGGCUACGUGUACGACCCCGAGUUCACCGGCCCCACCCUGACCGCCAGCGGCGCCA
ACAGCCGGAUCAAGAUAAGGACGGCAGCAACAUCGGAAGAUGAACAGCGACGAGACCU
UCCUGUACAUCGGCUUCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGUGAACGAGAUCGAGUCCUGA
CCGAGAACCAGAAGAUCUUCGUGUGCGCAACAGCAUCAGCGUGGAGGUGCUGGAGGCCA
UCAUCGACAAGAUCGGCGGC (配列番号132)

10

20

【0709】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド又は発現リプレッサーで使用するためのMQ1は、変異体、例えば、野生型MQ1（例えば、配列番号19）と比べて1つ以上の突然変異を含む変異体である。いくつかの実施形態では、MQ1変異体は、野生型MQ1、例えば、配列番号19のMQ1と比べて1つ以上のアミノ酸置換、欠失、又は挿入を含む。いくつかの実施形態では、MQ1変異体はK297P置換を含む。いくつかの実施形態では、MQ1変異体はN299C置換を含む。いくつかの実施形態では、MQ1変異体はE301Y置換を含む。いくつかの実施形態では、MQ1変異体はQ147L置換を含む（例えば、及び野生型MQ1と比べて低下したDNAメチルトランスフェラーゼ活性を有する）。いくつかの実施形態では、MQ1変異体は、K297P、N299C、及びE301Y置換を含む（例えば、及び野生型MQ1と比べて低下したDNA結合親和性を有する）。いくつかの実施形態では、MQ1変異体は、Q147L、K297P、N299C、及びE301Y置換を含む（例えば、及び野生型MQ1と比べて低下したDNAメチルトランスフェラーゼ活性及びDNA結合親和性を有する）。

30

40

【0710】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド又は発現リプレッサーは、MQ1であるか、又はそれを含むエフェクター部分と、ジンクフィンガードメイン、TALドメイン、又はCRISPR/Casドメイン、dCas9ドメインであるか、又はそれを含むターゲティング部分とを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド又は発現リプレッサーは、本明細書に記載の追加的な部分を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド又は発現リプレッサーは、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減する。いくつかの実施形態では、ポリペプチド又は発現リプレッサーは、遺伝子発現を調節する、

50

例えば、低減する方法、病態を治療する方法、又は標的遺伝子、例えば、MYC又は本明細書に記載の転写制御エレメントをエピジェネティック修飾する方法で、例えば、発現抑制システムの代わりに使用されてもよい。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは2つ以上の（例えば、2、3、又は4つの）発現リプレッサーを含み、ここで、第1発現リプレッサーは、MQ1、例えば、細菌性MQ1、又はその機能性変異体若しくは断片を含むエフェクター部分を含む。

【0711】

別の態様では、本開示は、1つ以上の（例えば、1つの）ターゲティング部分と1つ以上のエフェクター部分とを含む発現リプレッサー又はポリペプチドに関し、ここで、上記1つ以上のエフェクター部分は、DNMT1、例えば、ヒトDNMT1、又はその機能性変異体若しくは断片であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、DNMT1は、ヒトDNMT1、例えば、遺伝子ID1786に対応するもの、例えば、UniProt ID P26358.2に対応するものである。いくつかの実施形態では、DNMT1は、配列番号20のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のエフェクタードメインは、配列番号20に係る配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む：

【化9】

VDLRTLDFVSGCGGLSEGFHQAGISDTLWAIEMWDPAAQAFRLNPNPGSTVFTEDCNILLKLVMA
GETTNSRGQRLPQKGDVEMLCGGPPCQGFSGMNRFNRSRTYSKFKNSLVVSFLSYCDYYRPRFFL
LENVRNFVSVFKRSMVLKLTCLRCLVRMGYQCTFGVLQAGQYGVAQTRRRAILAAAPGEKLPFP
EPLHVFAPRACQLSVVVDKKFVSNITRLSSGPFRTITVRDTMSDLPEVRNGASALEISYNGEPQS
WFQRQLRGAQYQPILRDHICKDMSALVAARMRHIPLAPGSDWRDLNIEVRLSDGTMARKLRY
THHDRKNGRSSSGALRGVCSCVEAGKACDPAARQFNTLIPWCLPHTGNRHNNHWAGLYGRLEW
DGFFSTTVTNPEPMGKQGRVLHPEQHRVVSVRECARSQGFPTYRLFGNILDKHRQVGNAVPPP
LAKAIGLEIKLCMLAKARESASAKIKEEEAAKD (配列番号20)

【0712】

いくつかの実施形態では、DNMT1は、配列番号53のヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号53の配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む

【化 1 0】

GTGGATCTGAGGACACTCGACGTGTTTAGCGGATGCGGCGGACTCTCCGAAGGCTTCCACCA
 AGCCGGAATTTCCGACACACTCTGGGCCATTGAGATGTGGGACCCCGCCGCTCAAGCCTTCA
 GACTGAATAATCCCGGCTCCACCGTGTTACCGAGGACTGCAACATTCTGCTGAAGCTGGTG
 ATGGCTGGCGAAACCACCAACTCTAGAGGCCAGAGGCTGCCCCAGAAGGGAGATGTGGAAA
 TGCTCTGTGGAGGCCCTCCTTGCCAAGGCTTCTCCGGCATGAACAGGTTCAACTCTAGAACA
 TACAGCAAGTTCAAGAACTCTCTGGTCGTGAGCTTTCTGAGCTACTGCGACTACTATAGACC
 TAGGTTCTTTCTGCTGGAGAACGTGAGAAATTCGTGTCTTCAAGAGGAGCATGGTGCTGA
 AGCTGACACTGAGGTGTCTGGTGAGGATGGGCTACCAGTGCACATTCGGAGTGCTGCAAGCT
 GGCCAGTACGGCGTGGCCCAGACCAGAAGGAGGGGCCATCATTCTGGCTGCTGCCCCCGGCG
 AGAAACTCCCTCTGTTCCCCGAGCCCCTCCACGTGTTTCGCCCCCTAGAGCTTGCCAGCTGAGC
 GTGGTGGTCGACGATAAGAAGTTCGTGAGCAACATCACAAGGCTGTCCAGCGGACCCCTTCA
 GAACCATTACCGTGAGGGATACCATGTCCGACCTCCCCGAGGTGAGGAATGGCGCCAGCGC
 TCTGGAGATTTCTACAACGGCGAACCTCAGAGCTGGTTCCAAAGGCAGCTGAGAGGCGCTC
 AGTATCAGCCCATTCTGAGGGACCACATCTGCAAAGATATGAGCGCTCTGGTGGCCGCTAGA
 ATGAGACATATTCCTCTGGCCCCCGGCAGCGACTGGAGAGATCTGCCCAATATTGAGGTGAG
 ACTCAGCGACGGAACAATGGCTAGAAAAGTGGTACACCCATCATGATAGAAAGAACGGA
 AGGAGCAGCAGCGGCGCTCTGAGAGGAGTGTGTAGCTGCGTGGAAGCTGGCAAGGCTTGCG
 ATCCCGCCGCTAGGCAGTTCAATACCCTCATCCCTTGGTGTCTGCCTCACACCGGCAACAGA
 CACAATCATTGGGCTGGACTGTATGGAAGGCTCGAATGGGACGGCTTTTTTCAGCACCACCGT
 GACCAATCCCGAACCTATGGGCAAGCAAGGAAGGGTGCTCCACCCCGAGCAGCATAGAGTC
 GTGTCCGTGAGAGAATGCGCTAGAAGCCAAGGCTTCCCCGACACCTATAGACTGTTTCGGCAA
 CATTCTGGATAAGCACAGACAAGTGGGAAATGCTGTCCCTCCTCCTCTGGCCAAGGCTATCG
 GACTGGAGATCAAGCTGTGTATGCTCGCCAAAGCTAGGGAGAGCGCTTCCGCCAAGATTAA
 GGAGGAGGAGGCCGCCAAGGAC (配列番号53)

10

20

30

【0 7 1 3】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド又は発現リプレッサーで使用するためのDNMT1は、変異体、例えば、配列番号20のDNMT配列と比べて1つ以上の突然変異を含む変異体である。いくつかの実施形態では、エフェクタードメインは、野生型DNMT1と比べて1つ以上のアミノ酸置換、欠失、又は挿入を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、DNMT1であるか、又はそれを含むリプレッサードメインと、ターゲティング部分とを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、ジンクフィンガードメイン、TALドメイン、又はCRISPR/Casドメイン、例えば、dCas9ドメインであるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは2つ以上の（例えば、2、3、又は4つの）発現リプレッサーを含み、ここで、第1発現リプレッサーは、DNMT1、又はその機能性変異体若しくは断片を含むエフェクター部分を含む。

40

【0 7 1 4】

別の態様では、本開示は、1つ以上の（例えば、1つの）ターゲティング部分と1つ以上のエフェクター部分とを含む発現リプレッサー又はポリペプチドに関し、ここで、上記1つ以上のエフェクター部分は、DNMT3a/3L複合体、又はその機能性変異体若しくは断片であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、DNMT3a/3L複合

50

体融合構築物。いくつかの実施形態ではDNMT3a／3L複合体は、DNMT3A（例えば、ヒトDNMT3A）（例えば、NP__072046.2に記載のもの又はNM__022552.4によってコードされるタンパク質）を含む。いくつかの実施形態ではDNMT3a／3L複合体は、DNMT3L（例えば、NP__787063.1に記載のもの又はNM__175867.3によってコードされるタンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、DNMT3a／3Lは、配列番号21又は配列番号114のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のエフェクタードメインは、配列番号21又は配列番号114、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む。

10

【化11】

EWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHDARPKEGDDRPFVWLFENVVAMGVSDKRDISRFLSNPVMIDAKEVSAHRARYFWGNLPGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGKDQHFVPFMNEKEDILWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLGRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACVSSGNSNANSRGPSFSSGLVPLSLRGSHMNPLEMFTVPVWRQRPVRVLSLFEDIKKELTSLGFLESGSDPGQLKHVVVDVTDTVRKDVVEEWGPFDLVYGATPPLGHTCDRPPSWYLFQFHRLLQYARPKGPSRPFFWMFVDNLVLNKEDLDVASRFLEMEPV TIPDVHGGSLQNAVRVWSNIPAIRSRHWALVSEEELSLLAQNKQSSKLAAKWPTKL VKNCFLPLREYFKYFSTELTSSL (配列番号21)

20

NHDQEFDPPKVYPPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGLLVLKDLGIQVDRYIASEVCEDSITVGMVVRHQGKIMYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHDARPKEGDDRPFVWLFENVVAMGVSDKRDISRFLSNPVMIDAKEVSAHRARYFWGNLPGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGKDQHFVPFMNEKEDILWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLGRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACVSSGNSNANSRGPSFSSGLVPLSLRGSHMNPLEMFTVPVWRQRPVRVLSLFEDIKKELTSLGFLESGSDPGQLKHVVVDVTDTVRKDVVEEWGPFDLVYGATPPLGHTCDRPPSWYLFQFHRLLQYARPKGPSRPFFWMFVDNLVLNKEDLDVASRFLEMEPV TIPDVHGGSLQNAVRVWSNIPAIRSRHWALVSEEELSLLAQNKQSSKLAAKWPTKL VKNCFLPLREYFKYFSTELTSSL (配列番号114)

30

【0715】

いくつかの実施形態では、DNMT3a／3Lは、配列番号54のヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号54の配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む。

40

【化 1 2】

AACCACGACCAGGAGTTCGACCCCCCAAGGTGTACCCCCCGTGCCCGCCGAGAAGCGGA
AGCCCATCCGGGTGCTGAGCCTGTTCGACGGCATCGCCACCGGCCTGCTGGTGCTGAAGGAC
CTGGGCATCCAGGTGGACCGGTACATCGCCAGCGAGGTGTGCGAGGACAGCATCACCGTGG
GCATGGTGCGGCACCAGGGCAAGATCATGTACGTGGGCGACGTGCGGAGCGTGACCCAGAA
GCACATCCAGGAGTGGGGCCCCCTTCGACCTGGTGATCGGGCGGCAGCCCCCTGCAACGACCTG
AGCATCGTGAACCCCGCCCGGAAGGGCCTGTACGAGGGCACCGGCCGGCTGTTCTTCGAGTT
CTACCGGCTGCTGCACGACGCCCGGCCCAAGGAGGGCGACGACCGGCCCTTCTTCTGGCTGT
TCGAGAACGTGGTGGCCATGGGCGTGAGCGACAAGCGGGACATCAGCCGGTTCCTGGAGAG
CAACCCCGTGATGATCGACGCCAAGGAGGTGAGCGCCGCCACCGGGCCCGGTACTTCTGG
GGCAACCTGCCCCGGCATGAACCGGCCCTGGCCAGCACCGTGAACGACAAGCTGGAGCTGC
AGGAGTGCCTGGAGCACGGCCGGATCGCCAAGTTCAGCAAGGTGCGGACCATCACCAACCG
GAGCAACAGCATCAAGCAGGGCAAGGACCAGCACTTCCCCGTGTTTCATGAACGAGAAGGAG
GACATCCTGTGGTGCAACCGAGATGGAGCGGGTGTTCGGCTTCCCCGTGCACTACACCGACGT
GAGCAACATGAGCCGGCTGGCCCCGGCAGCGGCTGCTGGGCCGGAGCTGGAGCGTGCCCCGTG
ATCCGGCACCTGTTTCGCCCCCCTGAAGGAGTACTTCGCCTGCGTGAGCAGCGGCAACAGCAA
CGCCAACAGCCGGGGCCCCAGCTTCAGCAGCGGCCTGGTGCCCCCTGAGCCTGCGGGGCAGC
CACATGAATCCTCTGGAGATGTTTCGAGACAGTGCCCGTGTGGAGAAGGCAACCCGTGAGGG
TGCTGAGCCTCTTCGAGGACATTAAGAAGGAGCTGACCTCTCTGGGCTTTCTGGAATCCGGC
AGCGACCCCGGCCAGCTGAAACACGTGGTGGACGTGACCGACACAGTGAGGAAGGACGTGG
AAGAGTGGGGCCCCCTTTGACCTCGTGTATGGAGCCACACCTCCTCTCGGCCACACATGCGAT
AGGCCTCCCAGCTGGTATCTCTTCCAGTTCCACAGACTGCTCCAGTACGCCAGACCTAAGCC
CGGCAGCCCCAGACCCTTCTTCTGGATGTTTCGTGGACAATCTGGTGCTGAACAAGGAGGATC
TGGATGTGGCCAGCAGATTTCTGGAGATGGAACCCGTGACAATCCCCGACGTGCATGGCGG
CTCTCTGCAGAACGCCGTGAGAGTGTGGTCCAACATCCCCGCCATTAGAAGCAGACACTGGG
CTCTGGTGAGCGAGGAGGAAGTGTCTCTGCTGGCCAGAATAAGCAGTCCTCCAAGCTGGCC
GCCAAGTGGCCACCAAGCTGGTGAAGAACTGCTTTCTGCCTCTGAGGGAGTATTTCAAGTA
TTTCAGCACCGAACTGACCAGCAGCCTG (配列番号54)

10

20

30

【0 7 1 6】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド又は発現リプレッサーで使用するためのDNMT3a/3Lは、変異体、例えば、配列番号21又は配列番号114のDNMT3a/3Lと比べて1つ以上の突然変異を含む変異体である。いくつかの実施形態では、DNMT3a/3L変異体は、配列番号21又は配列番号114と比べて1つ以上のアミノ酸置換、欠失、又は挿入を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド又は発現リプレッサーは、DNMT3a/3Lであるか、又はそれを含むエフェクター部分とターゲティング部分とを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、ジンクフィンガードメイン、TALドメイン、又はCRISPR/Casドメイン、例えば、dCas9ドメインであるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは2つ以上の（例えば、2、3、又は4つの）発現リプレッサーを含み、ここで、第1発現リプレッサーは、DNMT3a/3L、又はその機能性変異体若しくは断片を含むエフェクター部分を含む。

40

【0 7 1 7】

50

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、ポリペプチドであるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、核酸であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、化学物質、例えば、シトシンI又はアデニン(A)を調節する化学物質(例えば、亜硫酸水素Na、亜硫酸水素アンモニウム)である。いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、酵素活性(例えば、メチルトランスフェラーゼ、デメチラーゼ、ヌクレアーゼ(例えば、Cas9)、又はデアミナーゼ活性)を有する。エフェクター部分は、小分子、ペプチド、核酸、ナノ粒子、アプタマー、又はPK/PDが不十分な薬剤学的作用物質のうちの1つ以上であり得るか、又はそれを含み得る。

【0718】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、ペプチドリガンド、完全長タンパク質、タンパク質断片、抗体、抗体断片、及び/又はターゲティングアプタマーを含み得る。いくつかの実施形態では、タンパク質は、細胞外受容体などの受容体、神経ペプチド、ホルモンペプチド、ペプチド薬、毒性ペプチド、ウイルス若しくは微生物ペプチド、合成ペプチド、又はアゴニスト若しくはアンタゴニストペプチドを結合し得る。

【0719】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、抗原、抗体、抗体断片、例えばシングルメイン抗体など、リガンド、又は受容体、例えば、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)、GLP-2受容体2、コレシストキニンB(CCKB)、若しくはソマトスタチン受容体など、ペプチド療法薬、例えば、Gタンパク質共役受容体(GPCR)などの特異的細胞表面受容体又はイオンチャネルに結合するものなど、天然で生理活性のあるペプチドからの合成若しくは類似体ペプチド、抗微生物ペプチド、ポア形成ペプチド、腫瘍ターゲティング若しくは細胞毒性ペプチド、又はアポトーシス誘導性ペプチドシグナルなどの分解若しくは自己破壊性ペプチド又は光増感剤ペプチドを含み得る。

【0720】

本明細書に記載のとおりエフェクター部分で使用するためのペプチド又はタンパク質部分にはまた、小さい抗原結合性ペプチド、例えば、抗原結合性抗体又は抗体様断片、例えば、単鎖抗体、ナノボディ(例えば、Steel et al., 2016, Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies, Drug Discov Today: 21(7): 1076-113を参照のこと)なども含まれ得る。かかる小さい抗原結合ペプチドは、例えば、細胞質抗原、核抗原、細胞内小器官抗原に結合し得る。

【0721】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、ドミナントネガティブ成分(例えば、ドミナントネガティブ部分)、例えば、ある配列(例えば、アンカー配列、例えば、CTCF結合モチーフ)であって、但し不活性な(例えば、突然変異した)二量化ドメイン、例えば、機能性のアンカー配列媒介接合部を形成することができない二量化ドメイン)を有する配列を認識して結合するタンパク質、又は機能性の転写因子の形成を妨げるゲノム複合体の成分(例えば、転写因子サブユニット等)に結合するタンパク質等を含む。例えば、CTCFのジンクフィンガードメインを、それが(フランキング核酸を認識するジンクフィンガーを付加することにより)特異的アンカー配列と結合するように変化させることができる一方で、ホモ二量化ドメインを、操作されたCTCFと内因性形態のCTCFとの間の相互作用を妨げるように変化させる。いくつかの実施形態では、ドミナントネガティブ成分は、標的アンカー配列媒介接合部内にあるアンカー配列に対して選択された結合親和性を持つ合成核形成ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、結合親和性は、標的アンカー配列に関連する内因性核形成ポリペプチド(例えば、CTCF)の結合親和性よりも少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又はそれより高い若しくは低いものであってもよい。合成核形成ポリペプチドは、対応する内因性核形成ポリペプチドと30~90%、30~85%、30~80%、30~

10

20

30

40

50

70%、50～80%、50～90%のアミノ酸配列同一性を有する。核形成ポリペプチドは、例えば、内因性核形成ポリペプチドによるそのアンカー配列への結合と競合した、競合的結合を通じるなどして、調節（例えば、破壊）し得る。

【0722】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、抗体又はその断片を含む。いくつかの実施形態では、標的遺伝子（例えば、MYC）発現は、1つ以上の抗体又はその断片であるか、又はそれを含むエフェクター部分の使用によって変化させる。いくつかの実施形態では、遺伝子発現は、1つ以上の抗体（又はその断片）及びdCas9であるか、又はそれを含むエフェクター部分の使用によって変化させる。

【0723】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分で使用するための抗体又はその断片は、モノクローナルであってもよい。抗体は、融合体、キメラ抗体、非ヒト化抗体、部分的又は完全ヒト化抗体等であってもよい。当業者は理解するであろうとおり、1つ又は複数の抗体のフォーマットは、所与の標的に応じて同じであっても、又は異なってもよい。

【0724】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、接合部核形成分子、接合部核形成分子をコードする核酸、又はこれらの組み合わせを含む。接合部核形成分子は、例えば、CTCF、コヒーシン、USF1、YY1、TATAボックス結合タンパク質関連因子3（TAF3）、ZNF143結合モチーフ、又はアンカー配列媒介接合部の形成を促進する別のポリペプチドであり得る。接合部核形成分子は、内因性ポリペプチド又はその他の、転写因子などのタンパク質、例えば、自己免疫調節因子（AIRE）、別の因子、例えば、X不活性化特異的転写物（XIST）、又は目的の特異的DNA配列、例えば、配列認識用のジンクフィンガー、ロイシンジッパー又はbHLHドメインを有するものを認識するように操作されている操作されたポリペプチドであり得る。接合部核形成分子は、アンカー配列媒介接合部（例えば、ターゲティング部分が標的とするゲノム配列エレメントに関連するか、又はそれを含むもの）の範囲内にある、又はその周囲にあるDNA相互作用を調節し得る。例えば、接合部核形成分子は、他の因子をアンカー配列に動員して、アンカー配列媒介接合部の形成又は破壊を変化させることができる。

【0725】

接合部核形成分子はまた、ホモ又はヘテロ二量化のための二量化ドメインも有し得る。1つ以上の接合部核形成分子、例えば、内因性のもの及び操作されたものが相互作用して、アンカー配列媒介接合部を形成し得る。いくつかの実施形態では、接合部核形成分子は、アンカー配列媒介接合部を安定化させるため、安定化ドメイン、例えば、凝集相互作用ドメインをさらに含むように操作される。いくつかの実施形態では、接合部核形成分子は標的配列に結合するように操作され、例えば、標的配列結合親和性が調節される。いくつかの実施形態では、接合部核形成分子は、アンカー配列媒介接合部内のアンカー配列に対して選択の結合親和性を持つように選択され、又は操作される。

【0726】

接合部核形成分子及びその対応するアンカー配列は、CTCFに不活性化突然変異を抱える細胞及び染色体コンホメーションキャプチャ（Chromosome Conformation Capture）、即ち3Cベースの方法、例えば、Hi-C又はハイスループットシーケンシングの使用により、CTCFの非存在下でトポロジー的に関連性のあるドメイン、例えば、遠位DNA領域間又は遺伝子座間のトポロジー的相互作用を調べることによって同定し得る。長距離DNA相互作用もまた同定し得る。さらなる分析としては、コヒーシン、YY1又はUSF1、ZNF143結合モチーフ、及びMSなどのベイトを使用してベイトに関連する複合体を同定するChIA-PET解析を挙げることができる。

【0727】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、タンパク質のDNA結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、エフェクター部分のDNA結合ドメインは、調節剤のター

10

20

30

40

50

ゲティングを増強するか、又は変化させるが、単独では調節剤による完全なターゲティングを実現しない（例えば、調節剤のターゲティングを実現するのに、ターゲティング部分がなにも必要である）。いくつかの実施形態では、DNA結合ドメインは、調節剤のターゲティングを増強する。いくつかの実施形態では、DNA結合ドメインは、調節剤の有効性を増強する。DNA結合タンパク質は、当業者に公知の、例えば、DNAの結合において鍵となる役割を果たす個別的な構造モチーフを有する。いくつかの実施形態では、DNA結合ドメインは、リプレッサータンパク質によく見られるDNA認識モチーフであるヘリックス・ターン・ヘリックス（HTH）モチーフを含む。かかるモチーフは、2つのヘリックスを含み、そのうち一方が、結合特異性を提供する側鎖を有するDNA（別名、認識ヘリックス）を認識する。かかるモチーフは、発生過程に関わるタンパク質を調節するためによく使用される。時に2つ以上のタンパク質が同じ配列に関して競合し、又は同じDNA断片を認識する。異なるタンパク質は、同じ配列に対するその親和性、又はDNAコンホメーションの点で、それぞれH-結合、塩橋及びファンデルワールス相互作用を通じて異なり得る。

10

【0728】

いくつかの実施形態では、DNA結合ドメインは、ヘリックス-ヘアピン-ヘリックス（HhH）モチーフを含む。HhH構造モチーフを有するDNA結合タンパク質は、タンパク質骨格窒素とDNAリン酸基との間の水素結合の形成によって生じる非配列特異的DNA結合に関与している可能性がある。

20

【0729】

いくつかの実施形態では、DNA結合ドメインは、ヘリックスループ-ヘリックス（HLH）モチーフを含む。HLH構造モチーフを有するDNA結合タンパク質は、転写調節タンパク質であり、主に多様な発生過程に関連している。HLH構造モチーフは、残基に関して、HTH又はHhHモチーフよりも長い。これらのタンパク質の多くは、相互作用して、ホモダイマー及びヘテロダイマーを形成する。構造モチーフは、DNAに結合するN末端ヘリックスを有する2つの長いヘリックス領域で構成されるが、複合体領域は、タンパク質の二量体化を可能にする。

【0730】

いくつかの実施形態では、DNA結合ドメインは、ロインジッパーモチーフを含む。いくつかの転写因子では、DNAとの二量体結合部位が、ロインジッパーを形成する。このモチーフは、各サブユニットから1つずつ、2つの両親媒性ヘリックスを含み、互いに相互作用して、左巻きのコイルドコイル超二次構造をもたらす。ロインジッパーは、1つのヘリックス内に規則的な間隔を置くロイシン残基と、隣接するヘリックスからのロイシンの相互嵌合である。ほとんどの場合、ロインジッパーに関与するヘリックスは、残基a及びdが疎水性であり、他の残基が親水性であるヘプタッド（heptad）配列（a b c d e f g）を示す。ロインジッパーモチーフは、ホモ又はヘテロ二量体形成のいずれかを媒介することができる。

30

【0731】

いくつかの実施形態では、DNA結合ドメインは、Znフィンガードメインを含み、ここで、 Zn^{++} イオンは、2つのCys及び2つのHis残基によって配位される。このような転写因子は、化学量論 $\beta\beta'\alpha$ を有する三量体を含む。 Zn^{++} 配位の明らかな効果は、疎水性コア残基ではなく、小さな複合体構造の安定化である。各Znフィンガーは、二重らせんの主溝における連続した三重塩基対セグメントと立体構造的に同一の方法で相互作用する。タンパク質-DNA相互作用は、以下：（i） α ヘリックスとDNAセグメント間、主としてArg残基とグアニン塩基の間の、H結合相互作用、（ii）DNAリン酸骨格、主にArg及びHisとのH結合相互作用の2つの要因によって決定される。代替的Znフィンガーモチーフは、 Zn^{++} を6 Cysとキレート化する。

40

【0732】

いくつかの実施形態では、DNA結合ドメインは、TATAボックス結合タンパク質（TBP）を含む。TBPは当初、クラスII開始因子TFIIDの一成分として同定され

50

た。この結合タンパク質は、3つ全ての核RNAポリメラーゼがその各々でサブユニットとして作用することにより転写に關与する。TBPの構造は、89～90アミノ酸の2つの α/β 構造ドメインを示す。TBPのC末端又はコア領域がTATAコンセンサス配列(TATAa/tAa/t、配列番号210)に高親和性で結合することで、副溝決定基を認識し、DNA屈曲を促進する。TBPは分子の鞍に似ている。結合側面が10本鎖逆平行 β シートの中心の8本の鎖と並ぶ。上表面には4つの α -ヘリックスが含まれ、転写機構の様々な成分に結合する。

【0733】

いくつかの実施形態では、DNA結合ドメインは、転写因子であるか、又はそれを含む。転写因子(TF)は、塩基配列の特異的認識に關与するDNA結合ドメインと、転写を活性化させる、又は抑制することのできる1つ以上のエフェクタードメインとを含むモジュラータンパク質であり得る。TFはクロマチンと相互作用し、コアクチベーター又はコリプレッサーとして働くタンパク質複合体を動員する。

【0734】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、1つ以上のRNA(例えば、gRNA)とdCas9とを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のRNAは、dCas9及び標的特異的ガイドRNAによってゲノム配列エレメントにターゲティングされる。当業者は理解するであろうとおり、ターゲティングに使用されるRNAは、所与の標的に応じて同じであっても、又は異なってもよい。エフェクター部分は、オリゴヌクレオチドアプタマー又はペプチドアプタマーなど、アプタマーを含み得る。アプタマー部分はオリゴヌクレオチド又はペプチドアプタマーである。

【0735】

エフェクター部分は、オリゴヌクレオチドアプタマーを含み得る。オリゴヌクレオチドアプタマーは、タンパク質及びペプチドを含め、予め選択された標的に高い親和性及び特異性で結合することのできる一本鎖DNA又はRNA(ssDNA又はssRNA)分子である。

【0736】

オリゴヌクレオチドアプタマーは、小分子、タンパク質、核酸など、さらには細胞、組織及び生物までもの様々な分子標的に結合させるインビトロ選択ラウンドの繰り返し、即ちSELEX(試験管内進化法)を通じて操作し得る核酸種である。アプタマーが分子認識を提供して区別し、これは化学合成によって作製することができる。加えて、アプタマーは望ましい保存特性を備えており、治療適用でも免疫原性をほとんど又は全く誘発しない。

【0737】

DNA及びRNAの両方のアプタマーとも、様々な標的に対してロバストな結合親和性を示す。例えば、DNA及びRNAアプタマーは、トリゾチーム、トロンビン、ヒト免疫不全ウイルストランス作用応答性エレメント(HIV TAR)、ヘミン、インターフェロン γ 、血管内皮成長因子(VEGF)、前立腺特異抗原(PSA)、ドーパミン、及び非古典的癌遺伝子、熱ショック因子1(HSF1)に關して選択されている。

【0738】

アプタマーベースの血漿タンパク質プロファイリングのための診断技法には、アプタマー血漿プロテオミクスが含まれる。この技術によれば、将来、健常状態と比べた疾患の分別診断を支援し得る多バイオマーカータンパク質の測定が実現するであろう。

【0739】

エフェクター部分は、ペプチドアプタマー部分を含み得る。ペプチドアプタマーは、低分子量、12～14kDaを呈するペプチドを含め、低分子可変ペプチドドメインを1つ(又は複数)有する。ペプチドアプタマーは、細胞内部のタンパク質に特異的に結合してその間の相互作用に干渉するように設計されてもよい。

【0740】

ペプチドアプタマーは、特異的標的分子に結合するように選択又は操作された人工的タ

10

20

30

40

50

ンパク質である。こうしたタンパク質には、可変配列の1つ以上のペプチド複合体が含まれる。これは典型的にはコンビナトリアルライブラリから単離され、多くの場合に、続いて定方向突然変異又は可変領域突然変異誘発及び選択ラウンドによって改良される。インビボでは、ペプチドアプタマーは細胞タンパク質標的に結合し、その標的となる分子の他のタンパク質との正常なタンパク質相互作用への干渉を含め、生物学的効果を及ぼすことができる。詳細には、転写因子結合ドメインに結合した可変ペプチドアプタマー複合体が、転写因子活性化ドメインに結合した標的タンパク質に対してスクリーニングされる。この選択戦略を用いたペプチドアプタマーによるその標的へのインビボ結合は、下流酵母マーカー遺伝子の発現として検出される。かかる実験では、所与の表現型を生じさせるような、アプタマーが結合する詳細なタンパク質、及びアプタマーが破壊するタンパク質相互作用が同定される。加えて、適切な機能部分で誘導体化されたペプチドアプタマーは、その標的タンパク質の特異的翻訳後修飾を生じさせ、又は標的の細胞内局在性を変化させることができる。ペプチドアプタマーはまた、インビトロで標的を認識することもできる。ペプチドアプタマーは、バイオセンサーにおいて抗体の代わりとしての使用が見出されており、不活性及び活性の両方のタンパク質形態を含む集団から活性なタンパク質アイソフォームを検出するために使用されている。タッドポール（オタマジャクシ）として公知の、ペプチドアプタマーの「頭」がユニークな配列の二本鎖DNAの「尾」に共有結合的に連結している誘導体によれば、混合物中の数量的に不十分な標的分子の定量化が、そのDNA尾部のPCRによって（例えば、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応を用いて）可能となる。

10

20

【0741】

ペプチドアプタマー選択は、種々のシステムを用いて行うことができるが、現在、最もよく用いられているのは、酵母2ハイブリッドシステムである。ペプチドアプタマーはまた、ファージディスプレイ及び他の表面ディスプレイ技術、例えば、mRNAディスプレイ、リボソームディスプレイ、細菌ディスプレイ及び酵母ディスプレイなどによって構築したコンビナトリアルペプチドライブラリから選択することもできる。これらの実験手順は、バイオパニングとしても公知である。バイオパニングから得られるペプチドの中でも特に、ミモトープは、ある種のペプチドアプタマーと見なすことができる。コンビナトリアルペプチドライブラリからパニングされたペプチドが、Mimodbという名前の特別なデータベースに保存されている。

30

【0742】

例示的なエフェクター部分は、以下を含むが、これらに限定されない：ユビキチン、ユビキチンリガーゼ阻害剤としての二環式ペプチド、転写因子、トポイソメラーゼなどのDNA及びタンパク質修飾酵素、トポテカンなどのトポイソメラーゼ阻害剤、DNMTファミリー（例えば、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3a/3L、MQ1）などのDNAメチルトランスフェラーゼ、タンパク質メチルトランスフェラーゼ（例えば、ウイルスリシンメチルトランスフェラーゼ（vSET）、タンパク質リシンN-メチルトランスフェラーゼ（SMYD2）、デアミナーゼ（例えば、APOBEC、UG1）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、例えば、zesteホモログ2のエンハンサー（EZH2）、PRMT1、ヒストン-リシンN-メチルトランスフェラーゼ（Setdb1）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ（SET2）、ユークロマチンヒストン-リシンN-メチルトランスフェラーゼ2（G9a）、ヒストン-リシンN-メチルトランスフェラーゼ（SUV39H1）、及びG9a）、ヒストンデアセチラーゼ（例えば、HDAC1、HDAC2、HDAC3）、DNA脱メチル化に役割を有する酵素（例えば、TETファミリー酵素は、5-メチルシトシンから5-ヒドロキシメチルシトシンへの酸化及びより高度な酸化誘導体を触媒する）、KDM1A及びリシン特異的ヒストンデメチラーゼ1（LSD1）などのタンパク質デメチラーゼ、DHX9などのヘリカーゼ、デアセチラーゼ（例えば、サーチュイン1、2、3、4、5、6、若しくは7）、キナーゼ、ホスファターゼ、臭化エチジウム、SYBRグリーン、及びプロフラビンなどのDNAインターカレート剤、フェニルアラニンアルギニルβ-ナフチルアミド若しくはキノリン誘導体のよう

40

50

なペプチド模倣薬などの排出ポンプ阻害剤、核内受容体活性化剤及び阻害剤、プロテアソーム阻害剤、リソソーム蓄積症に關与するものなどの酵素の競合阻害剤、タンパク質合成阻害剤、ヌクレアーゼ（例えば、C p f 1、C a s 9、ジンクフィンガーヌクレアーゼ）、K R A Bドメインなどのタンパク質由来の特異的ドメイン、並びにそれらの1つ以上の融合物（例えば、d C a s 9 - D N M T、d C a s 9 - M Q 1、d C a s 9 - K R A B）が挙げられる。

【0743】

いくつかの実施形態では、候補ドメインは、当業者に周知の方法によってエフェクター部分としての使用に適していると決定することができる。例えば、候補エフェクター部分が、細胞の核内に存在し、適切に局在化されている（例えば、標的遺伝子に、又は、例えば、ターゲティング部分を介して前記標的遺伝子に作動可能に連結した転写制御エレメントに）とき、候補エフェクター部分が、細胞内の標的遺伝子の発現を低減するか、例えば、標的遺伝子によりコードされるRNA転写産物のレベルを低減する（例えば、RNASeq若しくはノーザンブロットによって測定して）か、又は標的遺伝子によりコードされるタンパク質のレベルを低下させる（例えば、ELISAによって測定して）か否かをアッセイすることにより試験することができる。

【0744】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは複数のエフェクター部分を含み、ここで各エフェクター部分は別のエフェクター部分に検出可能なほど結合せず、例えば、結合しない。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、第1エフェクター部分を含む第1発現リプレッサーと第2エフェクター部分を含む第2発現リプレッサーとを含み、ここで、第1エフェクター部分は第2エフェクター部分に検出可能なほど結合せず、例えば、結合しない。

【0745】

いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、複数の発現リプレッサーを含み、この場合、複数の発現リプレッサーの各メンバーは、エフェクター部分を含み、ここで、各エフェクター部分は、別のエフェクター部分に検出可能に結合せず、例えば、結合しない。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、第1エフェクター部分を含む第1発現リプレッサーと、第2エフェクター部分を含む第2発現リプレッサーとを含み、ここで、第1エフェクター部分は、第2エフェクター部分に検出可能に結合せず、例えば、結合しない。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、第1エフェクター部分を含む第1発現リプレッサーと、第2エフェクター部分を含む第2発現リプレッサーとを含み、ここで、第1エフェクター部分は、別の第1エフェクター部分に検出可能に結合せず、例えば、結合せず、第2エフェクター部分は、別の2番目のエフェクター部分に検出可能に結合せず、例えば、結合しない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法で使用されるエフェクター部分は、単量体、例えば非二量体の状態で機能性である。

【0746】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、エピジェネティック修飾部分であるか、又はそれを含み、例えば、クロマチンの二次元構造を調節する（即ち、クロマチンの構造を、その二次元提示を改変するように調節する）。

【0747】

本開示の方法及び組成物において有用なエピジェネティック修飾部分は、エピジェネティックマーカー、例えば、DNAメチル化、ヒストンメチル化、ヒストンアセチル化、ヒストンSUMO化、ヒストンリン酸化、及びRNA関連サイレンシングに影響を及ぼす薬剤を含む。本明細書に記載のゲノム配列要素にターゲティングさせることができる例示的なエピジェネティック酵素としては、DNAメチラーゼ（例えば、DNMT3a、DNMT3b、DNMT3a/3L、MQ1）、DNA脱メチル化（例えば、TETファミリー）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ（例えば、HDAC1、HDAC2、HDAC3）、サーチュイン1、2、3、4、5、6、又は7、リシン特異的ヒストンデメチラーゼ1（LSD1）、ヒストン-リシン-N-メチルトランスフェ

10

20

30

40

50

ラーゼ (Setdb1)、ユークロマチンヒストン-リシンN-メチルトランスフェラーゼ2 (G9a)、ヒストン-リシンN-メチルトランスフェラーゼ (SUV39H1)、ゼステ (Zeste) ホモログ2 (EZH2) のエンハンサー、ウイルス性リシンメチルトランスフェラーゼ (VSET)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ (SET2)、及びタンパク質-リシンN-メチルトランスフェラーゼ (SMYD2) が挙げられる。このようなエピジェネティック修飾剤の例は、例えば、de Groot et al. Nucleic Acids Res. (2012) : 1-18に記載されている。

【0748】

いくつかの実施形態では、本明細書において有用な発現リプレッサー (例えば、エピジェネティック修飾部分を含む) は、参照により本明細書に組み込まれる Kofler et al. Genome Medicine 7, 59 (2015) : 1-3に記載の構築物を含むか又はそうした構築物である。例えば、いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、Kofler et al. の表1に見出される構築物、例えば、ヒストンデアセチラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、DNA脱メチル化、又は表1に記載のH3K4及び/若しくはH3K9ヒストンデメチラーゼ (例えば、dCas9-p300、TALE-TET1、ZF-DNMT3A、若しくはTALE-LSD1) を含むか、又はそうした構築物である。

【0749】

いくつかの実施形態では、エフェクター部分は、遺伝子編集システムの一成分、例えば、CRISPR/Casドメイン、例えば、Znフィンガードメイン、例えば、TALEエフェクタードメインを含む。いくつかの実施形態では、エピジェネティック修飾部分は、gRNAに連結したポリペプチド (例えば、ペプチド又はタンパク質部分) と、標的化されるヌクレアーゼ、例えば、Cas9、例えば、野生型Cas9、ニックアーゼCas9 (例えば、Cas9 D10A)、触媒として不活性なCas9 (dCas9)、eSpCas9、Cpf1、C2C1、又はC2C3、又はかかるヌクレアーゼをコードする核酸とを含み得る。

【0750】

本明細書で用いられるとき、「エフェクタードメインの生物学的に活性な一部分」とは、エフェクタードメインの機能を (例えば、完全に、部分的に、最小限に) 維持している一部分 (例えば、「最小」又は「コア」ドメイン) である。いくつかの実施形態では、dCas9をエピジェネティック修飾剤 (DNAメチラーゼ又はDNA脱メチル化において役割を担う酵素など、例えば、DNMT3a、DNMT3b、DNMT3L、DNMT阻害薬、これらの組み合わせ、TETファミリー酵素、タンパク質アセチルトランスフェラーゼ又はデアセチラーゼ、dCas9-DNMT3a/3L、dCas9-DNMT3a/3L/KRAB、dCas9/VP64) の1つ以上のエフェクタードメインの全部又は一部分と融合すると、ポリペプチドに連結した、本明細書に記載の方法において有用なキメラタンパク質が作り出される。かかるキメラタンパク質を含むエフェクター部分は、遺伝子修飾部分 (それが遺伝子編集システム成分、Cas9を使用するため) 又はエピジェネティック修飾部分 (それがエピジェネティック修飾剤のエフェクタードメインを使用するため) のいずれかと称される。

【0751】

いくつかの実施形態では、提供される技術は、標的遺伝子の特異的にターゲティングするgRNAを含むと記載される。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、癌遺伝子、腫瘍抑制因子、又はMYC誤調節障害関連遺伝子である。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、MYCである。

【0752】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される技術には、かかる部分を融合分子の一部としてターゲティング部分に連結することにより、本明細書に記載の1つ以上の遺伝子修飾部分 (例えば、CRISPRシステム成分) を対象に、例えば、対象の細胞又は組織の核に送達する方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される技術に

は、1つ以上の遺伝子修飾部分（例えば、CRISPRシステム成分）を脂質ナノ粒子に封入することにより、本明細書に記載の1つ以上の遺伝子修飾部分（例えば、CRISPRシステム成分）を対象に、例えば、対象の細胞又は組織の核に送達する方法が含まれる。

【0753】

追加的な部分

発現リプレッサーは、1つ以上の追加的な部分を（例えば、1つ以上のターゲティング部分及び1つ以上のエフェクター部分に加えて）さらに含み得る。いくつかの実施形態では、追加的な部分は、タグ付加用又はモニタリング用部分、切断可能な部分（例えば、DNAターゲティング部分とエフェクター部分との間又はポリペプチドのN端側若しくはC端側末端に位置する切断可能な部分）、小分子、膜輸送ポリペプチド、又は薬剤学的作用物質部分から選択される。

10

【0754】

例示的発現リプレッサー

以下の例示的発現リプレッサーは例示を目的として提示されるに過ぎず、限定することを意図するものではない。

【0755】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、dCas9、例えば、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）dCas9を含むターゲティング部分と、MQ1、例えば、細菌性MQ1を含むエフェクター部分とを含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、配列番号68の核酸配列（例えば、発現リプレッサーをコードする核酸（例えば、cDNA））によってコードされる。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、配列番号119の核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号68、119の核酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む。

20

【0756】

dCas9-MQ1ヌクレオチド配列：

【化13】

```
GAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGC
AGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAG
ACCGAGATCACCTTGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCG
AGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAG
CATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAG
AGCATCCTGCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCA
AGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGT
GGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATG
GAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGG
TGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCG
GAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGC
AAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGG
ACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGA
GCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTG
```

30

40

50

【化 1 4】

AGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACC
TGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGAC
CGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCA
CCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACAAGCGGCCCGCCGC
CACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAA
GACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCCCAGCGGAAGGCCCTG
GAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCA
TCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACCTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAG
CCGGGAGGAGATGATCGACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCC
GTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCA
TCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTACAAGCGGACCCT
GAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCC
AGAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGG
CCCTGGACAGCACCCGAGAAGAACGACCTGCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTGGGCGC
CCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAAGTGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCT
GGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGG
CGGCGGGTGTTTCATGATCAGCACCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCAAGGGCGACAAGA
AGCCCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAACA
ACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGGCCAG
CCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACGTGTACGACCCCGAGTTACCGGCC
CCACCCTGACCGCCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAAATCCG
GAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGG
GTGAACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCAACAGCATCA
GCGTGAGAGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGGCCCCAGCAGCGGCGGCAAGCG
GCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGA
CGTGCCCGACTACGCTGAGCGGCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCTTCTG
GCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGG
AAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (配列番号68)
AAGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGCCCCAAG
AAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGACAAGAAGTACAGCATCGGCC
TGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATACCGACGAGTACAAGGTGCCAG
CAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGC
GCCCTGCTGTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGC

10

20

30

40

50

【化 1 5】

GGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGAT
GGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGAC
AAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGA
AGTACCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCT
GCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGG
GCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTA
CAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTG
AGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGA
AGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAG
AGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACG
ACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGGCAGCAGTACGCCGACCTGTTCTGCGCCGCAAG
AACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGG
CCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACACCAGGACCTGACCCTGCT
GAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAACTACAAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGC
AAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCA
TCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGA
GGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTG
GGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGCGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACC
GGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGG
GGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGGAGACCATACCCCTGGAACCT
TCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTT
CGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTC
ACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCT
TCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAG
ATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGA
TCATCAAGGACAAGGACTTCTGAGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGT
GCTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCTACGCC
CACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCC
GGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGA
CTTCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCC
TGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGA
GCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAG
GTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGA

10

20

30

40

50

【化 1 6】

TGCCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAAGAGCCGGGAGCGGATGAAGC
GGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGA
ACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTA
CGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCC
CAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGGCCC
GGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGC
GGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGA
GCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACC
CGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACG
AGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAATCCAAGCTGGTGAAGCA
CTTCGGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAGCCCCACG
ACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAG
CGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAG
CAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAAGTCTTCAA
GACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGC
GAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGA
GCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGA
GAGCATCCTGCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCC
AAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGG
TGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCAT
GGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAG
GTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCC
GGAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAG
CAAGTACGTGAAGTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAG
GACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTTCGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCG
AGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT
GAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCAC
CTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGA
CCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATC
ACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACAAGCGGCCCGCCG
CCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAAC
AGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCCCAGCGGAAGGCCCT
GGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCCGC
ATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACCTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGA

10

20

30

40

50

【化 1 7】

GCCGGGAGGAGATGATCGACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCC
CGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCC
ATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTACAAGCGGACCC
TGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATC
CAGAAGGGCATGAAGCGGGGACGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCTGTGGGAGATCGAGCGG
GCCCTGGACAGCACCGAGAAGAACGACCTGCCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTGGGCG
CCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCC
TGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCCG
GCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCCAAGGGCGACAAG
AAGCCCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAAC
AACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGGCCA
GCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGG
CCCCACCCTGACCGCCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATC
CGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGC
GGGTGAACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCAACAGCAT
CAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCAGCGGCGGCAAG
CGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTAC
GACGTGCCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCTTC
TGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTA
GGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (配列番号119)

10

20

【0 7 5 7】

30

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、配列番号35又は151のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサーは、配列番号35、151のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む。

【0 7 5 8】

d C a s 9 - M Q 1 タンパク質配列：

【化 1 8】

MAPKKRKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI
GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKH
ERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS
DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS
LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNT

40

50

【化 1 9】

EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKF
IKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEK
ILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKV
LPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK
KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKKIHKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSL
TFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVDELVKVMGRHKPENIVIEMAREN
QTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDIN
RLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQ
RKFDNLTKAERGGSELKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK
SKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI
AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS
MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKG
KSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAG
ELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLAD
ANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKKARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALE
KVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSN
GYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLKRTLNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRG
SGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLES LGYQNSIEVLN
AADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKPKPSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKS
NINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGK
RVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIDKIGGPSSGGKRPAAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDY
A (配列番号35)

10

20

30

40

50

【化 2 0】

KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT
 YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSL
 TFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAREN
 QTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDIN
 RLSYDVAIIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQ
 RKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK
 SKLVSDFRKDFQFYKVBREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI
 AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS
 MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKG
 KSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAG
 ELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLAD
 ANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQ
 SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKKARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALE
 KVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLWSNSKNPVS
 GYWKRRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLKYRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRG
 SGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLN
 AADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTFEKKTKS
 NINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGK
 RVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIDKIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS (配列番号
 151)

10

20

【0 7 5 9】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、dCas9、例えば、化膿レンサ球菌
 (S. pyogenes) dCas9を含むターゲティング部分と、KRAB、例えば、
 KRABドメインを含むエフェクター部分とを含む。いくつかの実施形態では、発現リ
 プレッサーは、配列番号67の核酸配列（例えば、発現リプレッサーをコードする核酸（例
 えば、cDNA））によってコードされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の
 核酸は、配列番号67の核酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、
 又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17
 、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は
 1箇所を超えない配列を含む。

30

【0 7 6 0】

dCas9-KRABヌクレオチド配列：

40

【化 2 1】

AAGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGCCCCCAAG
 AAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGACAAGAAGTACAGCATCGGCC
 TGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAG
 CAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGC

50

【化 2 2】

GCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGC
GGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGAT
GGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGAC
AAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGAGAGGTTGGCCTACCACGAGA
AGTACCCCAACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCT
GCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCCTGATCGAGG
GCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTA
CAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTG
AGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCTGCCCGGCGAGA
AGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAG
AGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACG
ACCTGGACAACCTGCTGGCCCAAGATCGGCGACACAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAG
AACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGG
CCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCT
GAAGGCCCTGGTGCAGGACGAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGC
AAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCA
TCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGA
GGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTG
GGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACC
GGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGG
GGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAATCCGAGGAGACCATACCCCTGGAACCT
TCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTT
CGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTC
ACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCT
TCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAG
ATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGA
TCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGT
GCTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCTACGCC
CACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCC
GGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGA
CTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCC
TGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGA
GCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAG

10

20

30

40

50

【化 2 3】

GTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGA
TGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGC
GGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGA
ACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTA
CGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCC
CAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGGCCC
GGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGC
GGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGA
CGGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACC
CGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACG
AGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAATCCAAGCTGGTGAGCGA
CTTCGGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACG
ACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAG
CGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAG
CAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAA
GACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGC
GAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGA
GCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGA
GAGCATCCTGCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCC
AAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGCCAAGG
TGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCAT
GGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCTTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAG
GTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCC
GGAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAG
CAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAG
GACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTTCGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCG
AGCAGATCAGCGAGTTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT
GAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCAC
CTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGA
CCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATC
ACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACAAGCGGCCCGCCG
CCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGCCAGCGACGCCAAGAGCCTGACCG
CCTGGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTTCGTGGACTTCACCCGGGAGGAGTGG
AAGCTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGAGAACTACAAGA

10

20

30

40

50

【化 2 4】

ACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAAGCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGG
CGAGGAGCCCTGGCTGGTGGAGCGGGAGATCCACCAGGAGACCCACCCCGACAGCGAGACC
GCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCG
GCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTGAGCGGC
CGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCA
CCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA (配列番号67)

10

【0761】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、配列番号34又は150のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号34、150のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む。

20

【0762】

d C a s 9 - K R A B タンパク質配列：

【化 2 5】

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI
GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKH
ERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS
DVDKLFQQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS
LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILSDILRVNT
EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKF
IKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEK
ILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKV
LPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK
KIECFDSVEISGVEDRFNASLGT YHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSL
TFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAREN
QTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDIN
RLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQ
RKFDNLTKAERGGSELKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK
SKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI
AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS
MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKG
KSKKLKSVKELGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAG

30

40

50

【化 2 6】

ELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDENEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLAD
ANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKKASDAKSLTAWSR TLVTFKDV FVDF TREEWK
LLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIQETHPDSETAFEIK
SSVSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA (配列番号34)

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLGNTDRHSIKKNLI
GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKH
ERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS
DVDKLFQILVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS
LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNT
EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKF
IKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEK
ILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKV
LPKHSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK
KIECFDSVEISGVEDRFNASLGT YHDL LKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSL
TFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAREN
QTTQKGQKNSRERMKRIE EGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDIN
RLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVKMKKNYWRQLLNAKLITQ
RKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK
SKLVSDFRKDFQFYK VREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI
AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS
MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKG
KSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIHKLPKYSLFELENGRKRMLASAG
ELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDENEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLAD
ANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKKASDAKSLTAWSR TLVTFKDV FVDF TREEWK
LLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIQETHPDSETAFEIK
SSVSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS (配列番号150)

【0 7 6 3】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、dCas9、例えば、黄色ブドウ球菌 (S. aureus) dCas9を含むDNAターゲティング部分と、DNMT1、例えば、ヒトDNMT1を含むエフェクター部分とを含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、配列番号69の核酸配列（例えば、発現リプレッサーをコードする核酸（例えば、cDNA））によってコードされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号69の核酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む。

【 0 7 6 4 】

d C a s 9 - D N M T 1 ヌクレオチド配列

【 化 2 7 】

AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGCCCCCAAGA
AGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGACAAGAAGTACAGCATCGGCCT
GGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGC
AAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCG
CCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCG
GCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATG
GCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACA
AGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAA
GTACCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTG
CGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGG
CGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTAC
AACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGA
GCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCTGCCCGGCGAGAA
GAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGA
GCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGA
CCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGCGCCGCAAGA
ACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATACCAAGGC
CCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCCTGCTG
AAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCA
AGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCAT
CAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAG
GACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACAGATCCACCTGG
GCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCG
GGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCGGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGG
GCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAATCCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACCTT
CGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTC
GACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCA
CCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTT

10

20

30

40

50

【化 2 8】

CCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTG
ACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGA
TCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTG
CTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCTACGCCC
ACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCG
GCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGAC
TTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCT
GACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAG
CACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGG
TGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGAT
GGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCG
GATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAA
CACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTAC
GTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCC
AGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGGCCCG
GGGCAAGAGCGACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCG
GCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAG
CGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCC
GGCAGATCACCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGA
GAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAATCCAAGCTGGTGAGCGAC
TTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCCACG
ACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAG
CGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAG
CAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAA
GACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGC
GAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGA
GCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGA
GAGCATCCTGCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCC
AAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGG
TGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCAT
GGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAG
GTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCC
GGAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAG

10

20

30

40

50

【化 2 9】

CAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAG
GACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCG
AGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT
GAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCAC
CTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGA
CCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATC
ACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACAGCGGCGGCAAGC
GGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGTCGGGCGGGGGTGGCT
CAGTGATCTGAGGACACTCGACGTGTTAGCGGATGCGGCGGACTCTCCGAAGGCTTCCAC
CAAGCCGGAATTTCCGACACACTCTGGGCCATTGAGATGTGGGACCCCGCCGCTCAAGCCTT
CAGACTGAATAATCCCGGCTCCACCGTGTTACCGAGGACTGCAACATTCTGCTGAAGCTGG
TGATGGCTGGCGAAACCACCAACTCTAGAGGCCAGAGGCTGCCCCAGAAGGGAGATGTGGA
AATGCTCTGTGGAGGCCCTCCTTGCCAAGGCTTCTCCGGCATGAACAGGTTCAACTCTAGAA
CATACAGCAAGTTCAAGAACTCTCTGGTCGTGAGCTTTCTGAGCTACTGCGACTACTATAGA
CCTAGGTTCTTTCTGCTGGAGAACGTGAGAAATTTCTGTTCCTTCAAGAGGAGCATGGTGCT
GAAGCTGACACTGAGGTGTCTGGTGAGGATGGGCTACCAAGTGCACATTCGGAGTGCTGCAA
GCTGGCCAGTACGGCGTGGCCCAGACCAGAAGGAGGGGCCATCATCTGGCTGCTGCCCCCG
GCGAGAACTCCCTCTGTTCCCCGAGCCCCCTCACGTGTTCCGCCCTAGAGCTTGCCAGCTG
AGCGTGGTGGTCGACGATAAGAAGTTCGTGAGCAACATCACAAGGCTGTCCAGCGGACCCT
TCAGAACCATTACCGTGAGGGATACCATGTCCGACCTCCCCGAGGTGAGGAATGGCGCCAG
CGCTCTGGAGATTTCTACAACGGCGAACCTCAGAGCTGGTTCCAAAGGCAGCTGAGAGGC
GCTCAGTATCAGCCATTCTGAGGGACCACATCTGCAAAGATATGAGCGCTCTGGTGGCCGC
TAGAATGAGACATATTCCTCTGGCCCCCGGCAGCGACTGGAGAGATCTGCCCAATATTGAGG
TGAGACTCAGCGACGGAACAATGGCTAGAAAAGTACAGGTACACCCATCATGATAGAAAGAA
CGGAAGGAGCAGCAGCGGCGCTCTGAGAGGAGTGTGTAGCTGCGTGGAAGCTGGCAAGGCT
TGCGATCCCGCCGCTAGGCAGTTCAATACCCTCATCCCTTGGTGTCTGCCTCACACCGGCAA
CAGACACAATCATTGGGCTGGACTGTATGGAAGGCTCGAATGGGACGGCTTTTTTCAGCACCA
CCGTGACCAATCCCGAACCTATGGGCAAGCAAGGAAGGGTGCTCCACCCCGAGCAGCATAG
AGTCGTGTCCGTGAGAGAATGCGCTAGAAGCCAAGGCTTCCCCGACACCTATAGACTGTTCC
GCAACATTCTGGATAAGCACAGACAAGTGGGAAATGCTGTCCCTCCTCCTCTGGCCAAGGCT
ATCGGACTGGAGATCAAGCTGTGTATGCTCGCCAAAGCTAGGGAGAGCGCTTCCGCCAAGA
TTAAGGAGGAGGAGGCCGCCAAGGACGGAGGTGGCGGATCGGGAAAGCGGCCCGCCGCCA
CCAAGAAGGCCGGTCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTA
CGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCT

10

20

30

40

【化 3 0】

TCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (配列番号69)

【0 7 6 5】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、配列番号 3 6、又は 1 5 2 のアミノ酸

50

配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサーは、配列番号 36、152 のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 80、85、90、95、99、又は 100 % の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を含む。

【0766】

d C a s 9 - D N M T 1 タンパク質配列：

【化31】

MAPKKKRRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI
GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKH
ERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS
DVDKLFQQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS
LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNT
EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKF
IKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEK
ILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKV
LPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK
KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSL
TFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAREN
QTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDIN
RLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVKKMKKNYWRQLLNAKLITQ
RKFDNLTAKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK
SKLVSDFRKDFQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMI
AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS
MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKG
KSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLENGRKRMLASAG
ELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVLAD
ANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDSGGKRPAAATKKAGQAKKKKSGGGGSVDLRTLDFVSGCGGLSEGFHQ
AGISDTLWAIEMWDPAQAFAFLNNPGSTVFTEDCNILLKLVMAGETTNSRGQRLPQKGDVEML

10

20

30

40

50

【化 3 2】

CGGPPCQGFSGMNRFNRSRTYSKFKNSLVVSFLSYCDYYRPRFFLLENVRNFVSFKRSMVLKLT
CLVRMGYQCTFGVLQAGQYGVAQTRRRAILAAPGEKLPFPEPLHVFAPRACQLSVVDDKK
FVSNITRLSSGPFRTITVRDMSDLPEVRNGASALEISYNGEPQSWFQRQLRGAQYQPILRDHICK
DMSALVAARMRHIPLAPGSDWRDLNIEVRLSDGTMARKLRYTHHDRKNGRSSSGALRGVCSC
VEAGKACDPAARQFNTLIPWCLPHTGNRHNHWAGLYGRLEWDGFFSTTVTNPEPMGKQGRVL
HPEQHRVVSVRECARSQGFPDITYRLFGNILDKHRQVGNAVPPPLAKAIGLEIKLCMLAKARESAS
AKIKEEEAAKDGGGGSGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA (配列番号36)

10

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI
GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKH
ERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS
DVKDLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS
LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILSDILRVNT
EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKF
IKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEK
ILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKV
LPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK
KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSL
TFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKQILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMAREN
QTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDIN
RLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQ
RKFDNLTKAERGGSELDAKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK
SKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI
AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS
MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVG
KSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAG
ELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLAD
ANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAITLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDSGGKRPAATKKAGQAKKKKSGGGGSVDLRTLDVFSGCGGLSEGFHQ
AGISDTLWAIEMWDPAQAFLNNPGSTVFTEDCNILLKVMAGETTNSRGQRLPQKGDVEML
CGGPPCQGFSGMNRFNRSRTYSKFKNSLVVSFLSYCDYYRPRFFLLENVRNFVSFKRSMVLKLT
CLVRMGYQCTFGVLQAGQYGVAQTRRRAILAAPGEKLPFPEPLHVFAPRACQLSVVDDKK
FVSNITRLSSGPFRTITVRDMSDLPEVRNGASALEISYNGEPQSWFQRQLRGAQYQPILRDHICK

20

30

40

【化 3 3】

DMSALVAARMRHIPLAPGSDWRDLNIEVRLSDGTMARKLRYTHHDRKNGRSSSGALRGVCSC
VEAGKACDPAARQFNTLIPWCLPHTGNRHNHWAGLYGRLEWDGFFSTTVTNPEPMGKQGRVL
HPEQHRVVSVRECARSQGFPDITYRLFGNILDKHRQVGNAVPPPLAKAIGLEIKLCMLAKARESAS
AKIKEEEAAKDGGGGSGKRPAATKKAGQAKKKKGS (配列番号152)

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、dCas9、例えば、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）dCas9を含むDNAターゲティング部分と、DNMT13a／3Lを含むエフェクター部分とを含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、配列番号70の核酸配列（例えば、発現リプレッサーをコードする核酸（例えば、cDNA））によってコードされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号70の核酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む。

【0768】

dCas9－DNMT13a／3Lヌクレオチド配列

【化34】

AGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGCCCCCAAGA
AGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGACAAAGAAGTACAGCATCGGCCT
GGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGC
AAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCG
CCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCG
GCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATG
GCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACA
AGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAA
GTACCCACCATCTACCACTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTG
CGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGG
CGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTAC
AACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGA
GCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCAGGCGAGAA
GAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGA
GCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGA
CCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCCAAGA
ACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATACCAAGGC
CCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTG
AAGGCCCTGGTGCAGGACGAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCA
AGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCAT

10

20

30

40

50

【化 3 5】

CAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAG
GACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGG
GCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCG
GGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCGGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGG
GCAACAGCCGGTTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTT
CGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTC
GACAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCA
CCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTT
CCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTG
ACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGA
TCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTG
CTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCTACGCCC
ACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCG
GCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGAC
TTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCT
GACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAG
CACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGG
TGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGAT
GGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCG
GATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAA
CACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTAC
GTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCC
AGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGGCCCG
GGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCG
GCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAG
CGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCC
GGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGA
GAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAATCCAAGCTGGTGGAGCGAC
TTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCCACG
ACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAG
CGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAG
CAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAA
GACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGC

10

20

30

40

50

【化 3 6】

GAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGA
GCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGA
GAGCATCCTGCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCC
AAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGG
TGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCAT
GGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAG
GTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCC
GGAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAG
CAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAG
GACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTTCGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCG
AGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT
GAGCGCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCAC
CTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGA
CCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATC
ACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACAGCGCCGGCGGCG
GCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCCCAAGAAGAAGCGGAAGG
TGGCCGCCGCCGCGCAGCAACCACGACCAGGAGTTCGACCCCCCAAGGTGTACCCCCCGT
GCCCCGCCGAGAAGCGGAAGCCCATCCGGGTGCTGAGCCTGTTTCGACGGCATCGCCACCGGC
CTGCTGGTGCTGAAGGACCTGGGCATCCAGGTGGACCGGTACATCGCCAGCGAGGTGTGCG
AGGACAGCATCACCGTGGGCATGGTGCGGCACCAGGGCAAGATCATGTACGTGGGCGACGT
GCGGAGCGTGACCCAGAAGCACATCCAGGAGTGGGGCCCCCTTCGACCTGGTGATCGGCGGC
AGCCCCTGCAACGACCTGAGCATCGTGAACCCCGCCCGGAAGGGCCTGTACGAGGGCACCG
GCCGGCTGTTCTTCGAGTTCTACCGGTGCTGCACGACGCCCGGCCCAAGGAGGGCGACGAC
CGGCCCTTCTTCTGGCTGTTTCGAGAACGTGGTGGCCATGGGCGTGAGCGACAAGCGGGACAT
CAGCCGGTTCCTGGAGAGCAACCCCGTGATGATCGACGCCAAGGAGGTGAGCGCCGCCAC
CGGGCCCCGGTACTTCTGGGGCAACCTGCCCCGCATGAACCGGCCCTGGCCAGCACCGTGA
ACGACAAGCTGGAGCTGCAGGAGTGCCTGGAGCACGGCCGGATCGCCAAGTTCAGCAAGGT
GCGGACCATCACCAACCGGAGCAACAGCATCAAGCAGGGCAAGGACCAGCACTTCCCCGTG
TTCATGAACGAGAAGGAGGACATCCTGTGGTGCACCGAGATGGAGCGGGTGTTCGGCTTCC
CCGTGCACTACACCGACGTGAGCAACATGAGCCGGCTGGCCCCGGCAGCGGCTGCTGGGCCG
GAGCTGGAGCGTGCCCGTGATCCGGCACCTGTTTCGCCCCCTGAAGGAGTACTTCGCCTGCG
TGAGCAGCGGCAACAGCAACGCCAACAGCCGGGGCCCCAGCTTCAGCAGCGGCCTGGTGCC
CCTGAGCCTGCGGGGCAGCCACATGAATCCTCTGGAGATGTTTCGAGACAGTGCCCGTGTGGA
GAAGGCAACCCGTGAGGGTGCTGAGCCTCTTCGAGGACATTAAGAAGGAGCTGACCTCTCT

10

20

30

40

50

【化 3 7】

GGGCTTTCTGGAATCCGGCAGCGACCCCGGCCAGCTGAAACACGTGGTGGACGTGACCGAC
ACAGTGAGGAAGGACGTGGAAGAGTGGGGCCCCTTTGACCTCGTGTATGGAGCCACACCTC
CTCTCGGCCACACATGCGATAGGCCTCCCAGCTGGTATCTCTTCCAGTTCCACAGACTGCTCC
AGTACGCCAGACCTAAGCCCGGCAGCCCCAGACCCTTCTTCTGGATGTTCTGTGGACAATCTG
GTGCTGAACAAGGAGGATCTGGATGTGGCCAGCAGATTTCTGGAGATGGAACCCGTGACAA
TCCCCGACGTGCATGGCGGCTCTCTGCAGAACGCCGTGAGAGTGTGGTCCAACATCCCCGCC
ATTAGAAGCAGACACTGGGCTCTGGTGAGCGAGGAGGAAGTGTCTCTGTCTGGCCCAGAATA
AGCAGTCCTCCAAGCTGGCCGCCAAGTGGCCCACTAAGCTGGTGAAGAACTGCTTTCTGCCT
CTGAGGGAGTATTTCAAGTATTTCAAGCACCCTGACCAGCAGCCTGAGCGGCGGCAAGC
GGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACG
ACGTGCCCCGACTACGCCTGAGCGGCGGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCT
GGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAG
GAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (配列番号70)

10

20

【0 7 6 9】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、配列番号 3 7 又は 1 5 3 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサーは、配列番号 3 7 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 9、又は 1 0 0 % の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が 2 0、1 9、1 8、1 7、1 6、1 5、1 4、1 3、1 2、1 1、1 0、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 箇所を超えない配列を含む。

【0 7 7 0】

d C a s 9 - D N M T 3 a / 3 L タンパク質配列

【化 3 8】

30

MAPKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI
GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEFSNEMAKVDDSFHRLAESFLVEEDKKH
ERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS
DVDKLFQILVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS
LGLTPNFKSNFDLAEDAQLQSKDQYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNT
EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKF
IKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEK
ILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKV
LPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK
KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSL
TFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIAMAREN

40

50

【化 3 9】

QTTQKGQKNSRERMKRIEELGSGILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDIN
RLSDYDVAAIIPQSFLLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQ
RKFDNLTKAERGGSELDAKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK
SKLVSDFRKDFQFYKVRINNYYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMI
AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL
MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVEG
KSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLENGRKRMLASAG
ELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEKQQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLAD
ANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDSAGGGGSGGGGSGGGGSGPKKKRKVAAAGSNHDQEFDPKVPYPPVP
AEKRKPIRVLSLFDGLATGLLVKDLGIQVDRYIASEVCEDSITVGMVRHQGKIMYVGDVRSVTQ
KHIQE WGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHDARPKEGDDRPFWFLEN
VVAMGVSDKRDISRFLESNPVMIDAKEVSAHRARYFWGNLPGMNRPLASTVNDKLELQECLE
HGRIAKFSKVRTITRSNSIKQGKDQHFPVFMNEKEDILWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLAR
QRLGRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACVSSGNSNANSRGPFSFSSGLVPLSLRGSHMNPLEMFTVP
VWRRQPVRVLSLFEDIKKELTSLGFLESGLDPGQLKHVVDVTDTVRKDVEEWGPFDLVYGATPP
LGHTCDRPPSWYLFQFHRLQLYARPKPGSPRPFFWMFVDNLVLNKEDLDVASRFLEMEPV TIPD
VHGGSLQNAVVRVWSNIPAIRSRHWALVSEEELSLAQNKQSSKLA AKWPTKLVKNCFLPLREYF
KYFSTELTSSLSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA (配列番号37)

10

20

30

40

50

【化 4 0】

RKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK
 SKLVSDFRKDFQFYKVBREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI
 AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS
 MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVG
 KSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLENGRKRMLASAG
 ELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLAD
 ANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQ
 SITGLYETRIDLSQLGGDSAGGGGSGGGGSGGGGSGPKKKRKVAAAGSNHDQEFDPKVPVPPVP
 AEKRKPIRVLSLFDGIATGLLVLKDLGIQVDRIASEVCEDSITVGMVRHQGKIMYVGDVRSVTQ
 KHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHDARPKEGDDRPFWFLEN
 VVAMGVSDKRDISRFLSNPVMIDAKEVSAHRARYFWGNLPGMNRPLASTVNDKLELQECLE
 HGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGKDQHFPVFMNEKEDILWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLAR
 QRLLGRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACVSSGNSNANSRGPSFSSGLVPLSLRGSHMNPLEMFTVP
 VWRQPVRVLSLFEDIKKELTSLGFLESGSDPGQLKHVVDTVDTVRKDVEEWGPFDLVYGATPP
 LGHTCDRPPSWYLFQFHRLLQYARPKPGSPRPFFWMFVDNLVLNKEDLDVASRFLEMEPVTPD
 VHGGSLQNAVVRVWSNIPAIRSRHWALVSEEELSLLAQNKQSSKLAACKWPTKLVKNCFLPLREYF
 KYFSTELTSSLSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS (配列番号153)

10

20

【0 7 7 1】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、Znフィンガードメインを含むターゲ
 ティング部分と、KRAB、例えば、KRABドメインを含むエフェクター部分とを含む
 。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、配列番号55、56、57、58、5
 9、60、189、194、195、及び196のうちのいずれかの核酸配列（例えば、
 発現リプレッサーをコードする核酸（例えば、cDNA））によってコードされる。これ
 らの例示的発現リプレッサーの核酸配列は、表6に開示される。いくつかの実施形態では
 、本明細書に記載の核酸は、配列番号55～60、189、194～196のうちのい
 ずれかの核酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の
 同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、
 14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えな
 い配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸配列はポリA配列を含み、他の実施形態で
 は、核酸はポリA配列を欠いている。

30

【0 7 7 2】

【表 1 3】

表6: 例示的ZF-KRABエフェクターのヌクレオチド配列

名称	配列 番号	配列

40

【0 7 7 3】

50

【表 1 4】

ZF1-KRA B (nt)	55	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAT GGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCC GGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCCGGCGAGAAACCCTACAAGTGCCCCG AGTGCGGCAAATCCTTCTCTAGAAGCGACAACTGACCGAACATCAGAGG ACCCACACCGGCGAGAAAGCCTTATAAGTGTCCCGAATGCGGCAAATCCTT CAGCACCAAGAACTCTCTGACAGAACACCAGAGAACACATACCGGAGAG AAACCTTATAAATGCCCGAGTGC GGCAAGTCCTTCTCCCAGTCCGGCGAT CTGAGGAGACACCAAAGAACACATACCGGCGAAAAGCCTTACAAGTGCC CCGAGTGTGGAAAGAGCTTCTCCACCACCGGCGCTCTGACCGAGCACCAG AGAACACACACCGGCGAGAAACCCTATAAATGTCCCGAGTGTGGCAAATC CTTCAGCGACAGCGGCAATCTGAGAGTGCACCAAAGAACCCATACCGGCG AAAAACCCTACAAATGCCCGAGTGC GGCAAATCCTTCAGCCAGAGGGCC CATCTGGAGAGGCACCAAAGGACACACACCGGAGAAAAGCCCTACAAGT GTCCCGAGTGTGGAAAAGCTTTAGCACAAGCGGCGAGCTGGTGAGGCAT CAAAGGACCCACACCGGCGAAAAGCCACCGGCAAAAAGACCAGCGCTA GCGGCAGCGGCGGCGGCGAGCGGCGGCGACGCCAAGAGCCTGACCGCCTG GAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTCGTGGACTTCACCCGGG AGGAGTGGAAGCTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTG ATGCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAA GCCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTG AGCGGGAGATCCACCAGGAGACCCACCCCGACAGCGAGACCGCCTTCGA GATCAAGAGCAGCGTGAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAG GCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCCG ACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTT CTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAAT AAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAA	10
ZF2-KRA	56	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAT GGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCC	40

【0 7 7 4】

【表 1 5】

B (nt)		GGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCCGGCGAGAAGCCCTACAAGTGCCCCG AGTGCGGAAAGTCCTTCAGCTCCCCCGCCGATCTGACAAGACATCAGAGA ACCCATACCGGCGAGAAACCTTACAAATGCCCCGAATGTGGCAAGTCCTT TAGCGATCCCGGACATCTGGTGAGGCACCAGAGGACACACACCGGCGAA AAGCCCTATAAATGTCCCGAGTGTGGAAAGAGCTTTTCTAGAAGCGACAA TCTCGTGAGACACCAGAGAACCCACACCGGAGAGAAGCCTTACAAGTGCC CCGAGTGCGGCAAAATCCTTCAGCCAGAGCTCCTCTCTGGTGAGGCACCAA AGGACCCACACCGGCGAGAAACCTTATAAGTGTCCCGAGTGTGGCAAAAG CTTCAGCACCTCCCCTCTCTGACCGAGCATCAAAGAACCCACACCGGCG AAAAACCTTATAAATGCCCCGAGTGTGGCAAATCCTTCAGCAGAAATGAC GCTCTGACAGAGCACCAAAGAACACATACCGGAGAAAAGCCCTACAAAT GCCCCGAGTGTGGAAAATCCTTTTCTAGAAACGATGCTCTGACCGAACAC CAAAGAACACACACCGGCGAAAAGCCTACCGGAAAAAAGACCAGCGCTA GCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGACGCCAAGAGCCTGACCGCCTG GAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTCTGTGGACTTCACCCGGG AGGAGTGGAAGCTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTG ATGCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAA GCCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGG AGCGGGAGATCCACCAGGAGACCCACCCCGACAGCGAGACCGCCTTCGA GATCAAGAGCAGCGTGAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAG GCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCCG ACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCTT CTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAAT AAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAA
ZF3- KRA B (nt)	57	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAT GGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCC GGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCCGGCGAAAAACCTTACAAGTGCCCCGA GTGCGGAAAGAGCTTCAGCAGAAGCGACAAACTGGTGAGGCATCAAAGG ACACATACCGGAGAGAAGCCCTATAAGTGCCCCGAATGTGGCAAATCCTT TTCCCAGAGGGCTCATCTGGAAAGACACCAGAGGACCCATACCGGCGGAAA AACCCTACAAATGTCCCGAGTGTGGAAAGAGCTTTTCCGATCCCGGCCAT

【0 7 7 5】

10

20

30

40

50

【表 16】

		CTGGTCAGACATCAGAGGACACATACCGGCGAAAAGCCTTACAAGTGTCC CGAATGCGGAAAATCCTTCTCCAGAAGCGACAAGCTGGTGAGGCACCAAA GAACCCACACCGGCGAAAAACCTATAAATGCCCCGAGTGCGGCAAGTCC TTTAGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCACCAGAGAACACACACCGGAGA GAAGCCTTATAAGTGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCTAGAGCCGACA ATCTGACCGAACATCAAAGGACACACACCGGCGAGAAACCTTATAAATGC CCCGAGTGCGGAAAAAGCTTTTCCGACTGCAGAGATCTGGCTAGACACCA GAGAACCCACACCGGCGAGAAACCCACCGGCAAAAAGACCAGCGCTAGC GGCAGCGGCGGCGGCGAGCGGCGGCGACGCCAAGAGCCTGACCGCCTGGA GCCGACCCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTCTGTGGACTTCACCCGGGAG GAGTGGAAGCTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGAT GCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAAGC CCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGGAG CGGGAGATCCACCAGGAGACCCACCCGACAGCGAGACCGCCTTCGAGAT CAAGAGCAGCGTGAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCC GGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCCACT ACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCTTCTG GCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAA GCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAA	10
ZF4- KRA B (nt)	58	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGCCCCAAGAAGAAGCGG AAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCGGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCCGCGAAAAAGCCTTAT AAATGTCCGAATGCGGCAAGAGCTTTAGCCACACCGGCCATCTGCTGGAACACCAAAGGACCCATACC GGCGAAAAGCCCTATAAGTGCCCCGAGTGTTGGCAAGAGCTTCAGCACCACCGGCAATCTGACAGTCCATC AGAGGACCCACACCGGAGAGAAACCTATAAATGCCCCGAGTGTTGAAAGTCCTTCTCCGACAAGAAGG ATCTGACAAGACACCAGAGGACCCATACCGGCGAGAAACCTACAAATGCCCCGAGTGCGGCAAAATCCT TCTCCAGAGCGGCGATCTGAGGAGACATCAAAGAACAATACCGGCGAAAAACCTATAAGTGCCCCG AATGCGGCAAGTCCTTCAGCCAGAGGGCCCATCTGGAAGGCATCAGAGGACACACACCGGCGAGAAGC CTTACAAATGTCCCGAGTGCGGAAAGAGCTTCTCTAGAAGCGACAAGCTGACCGAGCATCAGAGGACCC ACACCGGAGAAAAACCTTACAAGTGCCCCGAGTGCGGCAAAAGCTTCAGCAGAACCGACACACTGAGAG ATCACCAAAGGACACACACCGGCGAGAAACCCACCGGCAAAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGC GGCAGCGGCGGCGACGCAAGAGCCTGACCGCCTGGAGCCGGACCCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTT GTGGACTTACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATG CTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAAGCCCGACGTGATCCTGCGGCTG GAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGGAGCGGGAGATCCACCAGGAGACCCACCCGACAGCGAGAC CGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGC	30
			40

【0776】

【表 17】

		CAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTG CCTTCTGCGGGGCTTGCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAAT AAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
ZF5- KRA B (nt)	59	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAT GGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCC GGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCCGGCGAGAAGCCTTATAAGTGCCCCGA GTGTGGCAAGAGCTTTAGCCACACCGGCCATCTGCTGGAGCATCAAAGGA CACACACCGGAGAAAAGCCCTATAAGTGCCCCGAGTGTGGCAAATCCTTC AGCACCTCCGGCAATCTCACCGAACACCAGAGAACACACACCGGAGAAA AACCTTACAAATGTCCCGAGTGTGGAAAGAGCTTTTCCACCAGCGGCAAT CTGGTGAGACATCAAAGAACACATACCGGCGAAAAACCCTATAAATGCCC CGAGTGTGGAAAATCCTTCTCCCAACTGGCCCATCTGAGGGGCCACCAGA GGACACATACCGGAGAAAAACCCTACAAATGCCCCGAATGCGGAAAAAG CTTCTCCGAGAGAAGCCATCTGAGAGAGCACCAAAGGACCCATACCGGAG AAAAGCCTTACAAGTGTCCCGAGTGCGGAAAAAGCTTTAGCGATCCCGGA CATCTGGTGAGACATCAGAGAACCCACACCGGCGAAAAGCCTTATAAATG TCCCGAATGTGGCAAGTCCTTTAGCACCCATCTGGATCTGATTAGACACCA AAGAACCCACACCGGCGAGAAAACCCACCGGAAAAAGACCAGCGCTAGC GGCAGCGGCGGCGGCGAGCGGCGGCGACGCCAAGAGCCTGACCGCCTGGA GCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTCTGTGGACTTCACCCGGGAG GAGTGGAAAGCTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGAT GCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAAGC CCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGAG CGGGAGATCCACCAGGAGACCCACCCCGACAGCGAGACCGCCTTCGAGAT CAAGAGCAGCGTGAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCC GGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACT ACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCCTCTG GCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAA GCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAA
ZF6- KRA	60	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAT GGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCC GGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCCGGCGAAAAGCCTTAGAAATGTCCCGA

【0777】

10

20

30

40

50

【表 18】

B (nt)		GTGCGGAAAGTCCTTCAGCGACCCCGGCGCTCTGGTGAGACATCAAAGAA CACATACCGGCGAGAAACCTTATAAATGCCCGAATGTGGAAAATCCTTC AGCGAAAGAAGCCATCTGAGGGAACACCAGAGGACCCACACCGGCGAAA AACCTTATAAGTGCCCGAATGCGGAAAAAGCTTTTCTAGAAGCGATCAT CTGACCAACCATCAGAGAACACACACCGGCGAAAAGCCCTATAAATGTCC CGAGTGTGGCAAATCCTTTAGCGAGAGGTCCCATCTGAGAGAGCACCAGA GGACACATACCGGAGAGAAGCCCTACAAGTGCCCGAGTGTGGCAAGAG CTTTAGCAGAAGCGACCATCTGACCAATCATCAAAGGACCCACACCGGAG AGAAGCCTTACAAGTGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTTTCCGATCCCGGC CACCTCGTGAGGCACCAAAGAACCCTATACCGGCGAGAAACCCTACAAATG CCCCGAGTGTGGAAAGAGCTTCTCCAGAAGCGACAAGCTGGTGAGGCATC AGAGGACACACACCGGCGAAAAACCCACCGGCAAGAAAACCAGCGCTAG CGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGACGCCAAGAGCCTGACCGCCTGG AGCCGGACCCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTTCGTGGACTTCACCCGGA GGAGTGGAAGCTGCTGGACACCGCCAGCAGATCCTGTACCGGAACCTGTA TGCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAAG CCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGGA GCGGGAGATCCACCAGGAGACCCACCCCGACAGCGAGACCGCCTTCGAG ATCAAGAGCAGCGTGAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGG CCGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGA CTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTC TGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATA AAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAA
ZF54 - KRA B	189	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAT GGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCC GGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCTGGAGAGAAACCCTACAAATGCCCGG AATGCGGGAAGTCCTTTTCCGAACGCTCGCACCTGAGGGAACACCAGAGA ACTCACACCGGCGAAAAACCCTATAAGTGCCCGAATGCGGAAAGAGCTT TTCACGGTCGGACAACCTCGTGCGGCACCAACGCACTCATACCGGAGAGA AGCCGTACAAGTGCCTGAGTGCGGAAAGTCATTCTCCGACTGCCGGGAT TTGGCCCCGCCACCAAGAACACACACTGGCGAAAAGCCCTACAAGTGCCC

【0778】

10

20

30

40

50

【表 19】

		GGAGTGTGGAAAGTCCTTCAGCACTTCCGGAGAGCTGGTCCGGCACCAGA GGACCCACACCGGGGAGAAGCCTTACAAATGTCCAGAGTGCGGTAAAAG CTTCTCCACCACCGGCAACCTCACCGTGACCAGCGGACCCACACTGGAG AAAAGCCGTATAAATGCCCGAATGCGGCAAGAGCTTCTCGCGATCCGAT AAGCTTGTGCGGCATCAGAGAACGCACACTGGGGAAAAGCCTTATAAGTG TCCGGAGTGCGGCAAATCCTTCTCCCGCACTGACACCCTGCGGGACCATC AGCGCACCCATACCGGCAAAAAGACCTCTGCTAGCGGCAGCGGCGGCGG CAGCGGCGGCGCCCGGGACGACGCCAAGAGCCTGACCGCCTGGAGCCGG ACCTTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTCTGTGGACTTCACCCGGGAGGAGTG GAAGCTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGG AGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAAGCCCGAC GTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGGAGCGGG AGATCCACCAGGAAACCAACCCGACAGCGAAACCGCCTTCGAGATCAAG AGCAGCGTGCCAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGG CCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGA CTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCCTC TGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATA AAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
ZF61 - KRA B	193	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAT GGCCCCCAAGAAGAAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCC GGCAGCAGCGGATCCCTTGAACCCGGGGAGAAGCCCTACAAGTGCCCGG AATGCGGAAAGAGCTTCAGCCAGAAGTCCTCGCTGATCGCGCACCAGAGG ACTCACACCGGCGAAAAGCCATACAAGTGTCTGAGTGTGGCAAATCCTT CTCGCACAAGAACGCACTGCAGAACCACCAGAGAACCCACACCGGGGAA AAGCCGTATAAGTGCCCCGAATGTGGAAAGTCGTTACGCCAGTCATCCAA CCTCGTGCGCCATCAAAGGACTCATACCGGAGAGAAACCTTACAAATGCC CTGAATGCGGCAAATCTTTCTCCCGGAATGATGCCCTGACCGAGCACCAG CGCACTCACACGGGAGAGAAGCCGTACAAATGTCCGGAGTGCGGAAAGT CCTTCTCCGACAAGAAGGACTTGACCAGACACCAGCGGACCCATACTGGC GAAAAACCCTATAAGTGTCCAGAGTGCGGGAAGTCCTTTAGCCAAGCCGG TCACCTCGCTTCCCACCAACGGACCCACACAGGAGAAAAGCCTTATAAAT

10

20

30

40

【0779】

50

【表 2 0】

		GCCCCGAGTGC GGCAAAAGCTTCTCCGATAAGAAGGACCTGACTCGGCAT CAGCGCACCCATACCGGAAAGAAAACCTCAGCTAGCGGCAGCGGCGGCG GCAGCGGCGGCGCCCGGGACGACGCCAAGAGCCTGACCGCCTGGAGCCG GACCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTCTGTGGACTTCACCCGGGAGGAGT GGAAGCTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTG GAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAAGCCCGA CGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGGAGCGG GAGATCCACCAGGAAACCCACCCGACAGCGAAACCGCCTTCGAGATCAA GAGCAGCGTGCCAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAG GCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCCG ACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTT CTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAAT AAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
ZF67 - KRA B	194	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAT GGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCC GGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCTGGCGAAAAACCCTATAAGTGCCCAGA ATGCGGAAAGAGCTTTTCACGGTCGGACAACCTCGTGCGGCACCAACGCA CTCATACCGGAGAGAAGCCGTACAAGTGTCTGAGTGCGGAAAGTCATTC TCCGACTGCCGGGATTTGGCCCGCCACCAAGAACACACACTGGCGAAAA GCCCTACAAGTGCCCGGAGTGTGGAAAGTCCTTCAGCACTTCCGGAGAGC TGGTCCGGCACCAGAGGACCCACACCGGGGAGAAGCCTTACAAATGTCCA GAGTGCGGTAAAAGCTTCTCCACCACCGGCAACCTCACCGTGACCCAGCG GACCCACACTGGAGAAAAGCCGTATAAATGCCCCGAATGCGGCAAGAGCT TCTCGCGATCCGATAAGCTTGTGCGGCATCAGAGAACGCACACTGGGGAA AAGCCTTATAAGTGTCCGGAGTGC GGCAAAATCCTTCTCCCGCACTGACACC CTGCGGGACCACCAGAGAACCATACTGGCGAGAAGCCATACAAATGCCC GGAATGTGGAAAGAGTTTCTCGCGGAGGACAACCTCCACACCCATCAGC GCACCCATACCGGCAAAAAGACCTCTGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCAG CGGCGGCGCCCGGGACGACGCCAAGAGCCTGACCGCCTGGAGCCGGACC CTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTCTGTGGACTTCACCCGGGAGGAGTGGAA GCTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGAGA

【0 7 8 0】

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

【表 2 2】

		CTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTC TGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATA AAGCCTGAGTAGGAAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

10

【0782】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、Znフィンガードメインを含むターゲティング部分（例えば、配列番号5～10又は169～172のいずれかに係るアミノ酸配列を有する）と、KRAB（例えば、アミノ酸配列配列番号18）、例えば、KRABドメインを含むエフェクター部分とを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサーは、配列番号22、23、24、25、26、27、139～144、177～180、又は183～186のうちのいずれかのアミノ配列を含む。これらの例示的発現リプレッサーのタンパク質配列は、表7に開示される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサーは、配列番号22～27、139～144、177～180、183～186のうちのいずれかのアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む。

20

【0783】

【表 2 3】

表7: 例示的ジंकフィンガー-KRABエフェクターのアミノ酸配列

名称	配列番号	配列
ZF1-KRAB (aa)	22	MAPKKRKVGIVPAAGSSGSLEPGKPYKCPEGKSFSDKLTEHQRTHTGEKPYKCPEGKSFSTKN SLTEHQRTHTGEKPYKCPEGKSFSDGLRRHQRTHTGEKPYKCPEGKSFSTTGALTEHQRTHTGEKPY KCPEGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPEGKSFQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPEGKSFSTSGEL VRHQRTHTGEKPTGKKTASGSGGGSGGDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQLYRNV MLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEPPWLVEREIQETHPDSETAFEIKSSVSGGKRPAAATKKAGQAK KKKGSYPYDVPDYA
ZF2-KRAB (aa)	23	MAPKKRKVGIVPAAGSSGSLEPGKPYKCPEGKSFSSPADLTHQRTHTGEKPYKCPEGKSFSDPG HLVRHQRTHTGEKPYKCPEGKSFSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPEGKSFSSSLVRHQRTHTGEKPY KCPEGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPEGKSFSDNDALTEHQRTHTGEKPYKCPEGKSFSDRNDAL TEHQRTHTGEKPTGKKTASGSGGGSGGDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQLYRNV MLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEPPWLVEREIQETHPDSETAFEIKSSVSGGKRPAAATKKAGQAK KKKGSYPYDVPDYA
ZF3-KRAB (aa)	24	MAPKKRKVGIVPAAGSSGSLEPGKPYKCPEGKSFSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPEGKSFSDQRA HLERHQRTHTGEKPYKCPEGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPEGKSFSDKLVRHQRTHTGEKPY KCPEGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPEGKSFSDRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPEGKSFSDCR DLARHQRTHTGEKPTGKKTASGSGGGSGGDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQLYR NVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEPPWLVEREIQETHPDSETAFEIKSSVSGGKRPAAATKKAGQ AKKKGSYPYDVPDYA

30

40

【0784】

50

【表 2 4】

ZF4- KRAB (aa)	25	MAPKKRKVGIVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSHTGHLLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTG NLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSDKDLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEK PYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRTDT LRDHQRTHTGEKPTGKKTASGSGGGSGGDAKSLTAWSRITLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQILYRN VMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIQETHPDSETAFEIKSSVSGGKRPAATKKAGQA KKKKGSYPDVPDYA
ZF5- KRAB (aa)	26	MAPKKRKVGIVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSHTGHLLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTG NLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEK PYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTHLD LIRHQRTHTGEKPTGKKTASGSGGGSGGDAKSLTAWSRITLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQILYRN VMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIQETHPDSETAFEIKSSVSGGKRPAATKKAGQAK KKKGSYPYDVPDYA
ZF6- KRAB (aa)	27	MAPKKRKVGIVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSE RSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSR SDKLVRHQRTHTGEKPTGKKTASGSGGGSGGDAKSLTAWSRITLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQIL YRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIQETHPDSETAFEIKSSVSGGKRPAATKK AGQAKKKKGSYPYDVPDYA
iPT2A 断片 3+ZF3- KRAB	134	PLEGSSSGSPKKRKVGIVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPE CGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVR HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKC PECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPTGKKTASGSGGGSGGDAKSLTAWSRITLVTFKDVFDFTREEWK LLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIQETHPDSETAFEIKSSVSGG KRPAATKKAGQAKKKKGS
ZF1- KRAB HA なし (aa)	139	MAPKKRKVGIVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSDKLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTK NSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTGALTEHQRTHTGEK PYKCPECGKSFSDSGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSST GELVRHQRTHTGEKPTGKKTASGSGGGSGGDAKSLTAWSRITLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQILY RNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIQETHPDSETAFEIKSSVSGGKRPAATKKA GQAKKKKGS
ZF2- KRAB HA なし (aa)	140	MAPKKRKVGIVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSPPADLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS GHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSR NDALTEHQRTHTGEKPTGKKTASGSGGGSGGDAKSLTAWSRITLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQIL YRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIQETHPDSETAFEIKSSVSGGKRPAATKK AGQAKKKKGS

【0 7 8 5】

【表 2 5】

ZF3- KRAB HA なし (aa)	141	MAPKKKRRKVGHHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVHRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSQ RAHLERHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVHRHQRTHHTG EKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFS DCRDLARHQRTHHTGEKPTGKKTASGSGGGSGGDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQL ILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKRPAATK KAGQAKKKKGS
ZF4- KRAB HA なし (aa)	142	MAPKKKRRKVGHHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSHTGHLLEHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSST GNLTVHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSDDKDLTRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHHTGE KPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVHRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSR TDTLRDHQRTHHTGEKPTGKKTASGSGGGSGGDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQL YRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKRPAATKK AGQAKKKKGS
ZF5- KRAB HA なし (aa)	143	MAPKKKRRKVGHHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSHTGHLLEHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSST GNLTVHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSSTGNLVRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHHTGE KPYKCPECGKSFSRSHLREHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSST HLDLIRHQRTHHTGEKPTGKKTASGSGGGSGGDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQL YRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKRPAATKK AGQAKKKKGS
ZF6- KRAB HA なし (aa)	144	MAPKKKRRKVGHHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSSE RSHLREHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSRSHLREHQRTHHTGE KPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSR SDKLVHRHQRTHHTGEKPTGKKTASGSGGGSGGDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQL YRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKRPAATKK AGQAKKKKGS
ZF54- KRAB aa	177	MAPKKKRRKVGHHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSHLREHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSRS DNLVRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSSTSGELVRHQRTHHTGE KPYKCPECGKSFSSTGNLTVHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVHRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSR TDTLRDHQRTHHTGKKTASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQL YRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKRPAATK KAGQAKKKKGSYPYDVPDYA
ZF61- KRAB aa	178	MAPKKKRRKVGHHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSHK NALQNHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHHTGE KPYKCPECGKSFSDDKDLTRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFS DKKDLTRHQRTHHTGKKTASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQL YRNVMI.FENYKNI.VSI.GYQI.TKPDVII.RLEKGEEPWI.VEREIHQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKRPAAT KKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA

10

20

30

40

【0 7 8 6】

50

【表 2 6】

ZF67- KRAB aa	179	MAPKKKRRKVGHHGVPAAAGSSGSLEPGKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS CRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTGNLTVHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRTDRLDHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS REDNLHTHQRTHTGKKTASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQIL YRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKRPAAT KKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA
ZF68- KRAB aa	180	MAPKKKRRKVGHHGVPAAAGSSGSLEPGKPYKCPECGKSFSRSDHLLTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQK SSLIAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEK PYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTGNLTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQA GHLASHQRTHTGKKTASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQILYR NVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKRPAATKK AGQAKKKKGSYPYDVPDYA
ZF54- KRAB aa HAタグ なし	183	MAPKKKRRKVGHHGVPAAAGSSGSLEPGKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRS DNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSGELVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSSTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSR TDRLDHQRTHTGKKTASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQILY RNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKRPAATK KAGQAKKKKGS
ZF61- KRAB aa HAタグ なし	184	MAPKKKRRKVGHHGVPAAAGSSGSLEPGKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHK NALQNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSDDKDLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS DKKDLTRHQRTHTGKKTASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQIL YRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKRPAAT KKAGQAKKKKGS
ZF67- KRAB aa HAタグ なし	185	MAPKKKRRKVGHHGVPAAAGSSGSLEPGKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS CRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTGNLTVHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRTDRLDHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS REDNLHTHQRTHTGKKTASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQIL YRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKRPAAT KKAGQAKKKKGS
ZF68- KRAB aa HAタグ なし	186	MAPKKKRRKVGHHGVPAAAGSSGSLEPGKPYKCPECGKSFSRSDHLLTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQK SSLIAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEK PYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTGNLTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQA GHLASHQRTHTGKKTASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRVLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQILYR NVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKRPAATKK AGQAKKKKGS

【0787】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、Znフィンガードメインを含むターゲ
ティング部分（例えば、配列番号44～49又は115のうちのいずれかのヌクレオチド
配列によってコードされるもの）と、MQ1、例えば、細菌性MQ1を含むエフェクター
部分（例えば、配列番号52のヌクレオチド配列によってコードされるもの）とを含む。
いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、配列番号61、62、63、64、65
、66、116、117、118、又は130の核配列によってコードされる。これらの
例示的発現リプレッサーの核酸配列は、表8に開示される。いくつかの実施形態では、本
明細書に記載の核酸は、配列番号61～66、116～118、130のうちのいずれか

の核酸配列又はそれと少なくとも８０、８５、９０、９５、９９、又は１００％の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、又は１箇所を超えない配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸配列はポリＡ配列を含み、他の実施形態では、核酸はポリＡ配列を欠いている。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号６１～６６、１１６～１１８、又は１３０のうちのいずれかに係る配列（又はそれと少なくとも８０、８５、９０、９５、９９、又は１００％の同一性であるか、又はそれと差異のある位置が２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、又は１箇所を超えない配列）を含むが、３'ポリＡ配列を欠いているか、又はより短い長さの３'ポリＡ配列を含む。

10

【０７８８】

【表２７】

表8: 例示的ZF-MQ1エフェクターのヌクレオチド配列

名称	配列番号	配列
ZF7-MQ1 (nt)	61	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAT GGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCC GGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCCGGAGAGAAGCCCTACAAATGCCCCG AGTGTGGAAAGAGCTTCTCTAGAAATGACGCTCTGACAGAACACCAGAGG ACCCATACCGGCGAGAAACCTTACAAATGCCCCGAGTGCGGAAAAAGCTT TAGCGATTGCAGAGATCTGGCTAGACATCAGAGAACACACACCGGCGAGA AGCCCTATAAGTGCCCCGAATGCGGCAAGAGCTTTAGCGACCCCGGCCAT CTGGTGAGACATCAAAGGACACATACCGGAGAAAAACCTTACAAGTGCCC CGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCCCAGAGCGGCCATCTCACCGAGCATCAA GGACCCACACCGGCGAAAAGCCTTATAAATGTCCCGAATGTGGCAAGTCC TTCTCTAGAGAGGATAATCTGCACACCCATCAGAGGACCCACACCGGCGA AAAGCCTTATAAATGCCCCGAATGTGGAAAGTCCTTTCCACCAAGAAGT CTCTGACCGAGCATCAGAGGACACACACCGGAGAGAAACCCTATAAATGT

20

30

【０７８９】

40

50

【表 28】

	CCCGAGTGTGGCAAGAGCTTCAGCAGAGCCGACAATCTGACAGAGCACCA AAGAACACATACCGGCGAAAAGCCCACCGGCAAAAAGACCAGCGCTAGC GGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACA AGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCCCAG CGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGGGCC TGGCCGAGTGGTACGTGCCCCGCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAAC AACTTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGA TCGACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCCGTG AGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCT ACAACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGG GACCTGTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCTT CCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCGG GGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGG ACAGCACCGAGAAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTG GGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAAGTGGAAGC AGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGC CGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTTCATGATCAGCA CCCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGAG CATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAAC AACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACAT CAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACG TGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGCCAGCGGCGCCAAC AGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAGCG ACGAGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTG AACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCAA CAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGCC CCAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGCGCCAGGC CAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCTGA GCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCC CTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGT AGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	10 20 30 40

【0790】

【表 2 9】

ZF8-MQ1 (nt)	62	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAT GGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCC GGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCCCGGCGAGAAACCTACAAGTGCCCCG AGTGTGGCAAATCCTTCTCTAGATCCGACAAACTGACCGAACATCAGAGG ACCCATACCGGCGAAAAACCTTATAAATGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTT CTCTAGAAGGGACGAGCTGAACGTGCATCAGAGAACACATACCGGCGAG AAGCCCTATAAATGCCCCGAATGCGGCAAAAGCTTCTCTAGAAGCGATCA TCTGACCAACCACAGAGAACCCATACCGGAGAAAAGCCTTACAAGTGTC CCGAATGTGGAATAATCCTTCAGCTCCCCCGCCGATCTGACCAGACACCAA AGGACCCACACCGGCGAGAAGCCCTATAAATGCCCCGAGTGCGGCAAGA GCTTTTCCAGATCCGACCATCTGACCAATCATCAAAGAACCCACACCGGC GAAAAGCCTTATAAATGTCCCGAGTGCGGCAAAATCCTTTTCCAGCAAGAA GGCTCTGACCGAGCATCAAAGGACCCATACCGGCGAGAAGCCTTACAAAT GCCCCGAGTGTGAAAAGTCTCTTACGACCCATCTGGATCTGATTAGACACC AGAGGACACACACCGGAGAGAAAACCCACCGGCAAAAAGACCAGCGCTAG CGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAAC AAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCCCA GCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGGGC CTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAA CAACTTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATG ATCGACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCCGT GAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATC TACAACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCG GGACCTGTACAAGCGGACCCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCT TCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCG GGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTG GACAGCACCGAGAAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGT GGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAAGTGAAG CAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACG CCGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGC ACCCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGA GCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAA CAACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACA

10

20

30

40

【0 7 9 1】

50

【表 3 0】

		TCAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTAC GTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGCCAGCGGCGCCAA CAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAGC GACGAGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGT GAACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCA ACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGC CCCAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGG CCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCTGA GCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCC CTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGT AGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	10
ZF9- MQ1 (nt)	63	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAT GGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCC GGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCCGCGAGAAACCTTACAAATGCCCCGA GTGCGGCAAGAGCTTCAGCAGAAGCGACGATCTGGTGAGGCACCAAAGA ACCCACACCGGCGAAAAACCTTACAAGTGTCCCGAATGCGGAAAGTCCTT CAGCAGAGAGGACAATCTGCACACCCACCAGAGAACACACACCGGAGAA AAGCCTTACAAGTGCCCCGAATGCGGCAAATCCTTTTCTAGAAGCGATCA TCTGACCACCCACCAAAGAACACATACCGGCGAGAAGCCTTACAAATGTC CCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCCAGAGAGCCAATCTGAGGGCTCATCAA AGGACCCATACCGGCGAAAAGCCCTACAAATGCCCCGAGTGCGGAAAAT CCTTCAGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCCAACCAAGGACACACACCGGA GAGAAACCCTATAAGTGCCCCGAGTGCGGAAAAGCTTTTCCAGAGGGC CAATCTGAGGGCCCATCAGAGGACCCATACCGGAGAGAAGCCTTATAAAT GTCCCGAGTGCGGAAAAGCTTCAGCGAGAGGAGCCATCTGAGGGAACA TCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCCACCGGAAAAAAGACCGCGCT AGCGGCAGCGGCGGCGGCGAGCGGCGGCGCCCGGACAGCAAGGTGGAGA ACAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCC CAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGG GCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCCGCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCAC AACAACTTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGA TGATCGACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCC	20 30 40

【 0 7 9 2 】

【表 3 1】

		GTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCA TCTACAACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATC CGGGACCTGTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAG CTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGC GGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCT GGACAGCACCGAGAAGAAGACGACCTGCCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAAC GTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAGTGGA AGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAA CGCCGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCA GCACCCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCCAA GAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTG AACAACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCA ACATCAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGC TACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGCCAGCGGCGC CAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAAC AGCGACGAGACCTTCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCG GGTGAACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCG GCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGC GGCCCCAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGCGCCACCAAGAAGGCCGGCC AGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGC CTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCA TGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCT GAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	10
ZF10	64	AGTGTGGAAGAGCTTTAGCCAAAGCGGCGATCTGAGGAGACACCAAAGAACACACACCGGCGAGAAG CCCTACAAATGTCCCGAGTGCAGAAAGAGCTTCAGCCAGAGCGGCCATCTGACCGAGCATCAGAGAACC CATACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGCCCCGAGTGTGGAAAGTCCTTCTCCGAGAGATCCCATCTGAGAG AACACCAGAGGACACACACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGTCGAGTGCAGAAAGTCCTTCAGCGATC CCGGCCATCTGGTGAGACATCAAAGGACACATACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGTCGAGTGCAGAAAGTCCTTCAGCGATC AGAGCTTTAGCAGAAACGACACACTCACCGAACACAGAGGACCCACACCGGCGAGAAACCTTACAAAT GCCCCGAGTGCAGCAATCCTTTCTAGAGCCGACAATCTGACCGAACACAGAGGACCCATACCGGAG AAAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGTGGCAATCCTTCTCCACCCATCTGGATCTGATTAGACACCAAAG AACACATACCGGAGAAAAGCCACCGGAAAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCGAGCGGCG GCGCCCGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGCGATCG GCGCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGGCCCTGGCCGAGTGGT ACGTGCCCCCATCTGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACCTTCCACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGT GAGCCGGGAGGAGATGATCGACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCCGTGAG	30
MQ1 (nt)			40

【 0 7 9 3 】

10

20

30

40

【 0 7 9 4 】

【表 3 3】

		CAGCACCGAGAAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTGG GCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAAGTGGAAGCA GAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGCC GCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTTCATGATCAGCAC CCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGAGC ATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAACA ACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATC AACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGGCTACGT GTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGCCAGCGGCGCCAACA GCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGA CGAGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGA ACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCAAC AGCATCAGCGTGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGCCCC CAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCC AAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCCACTACGCCTGAG CGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCCTTCTGGCCATGCCC TTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTA GGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	10
ZF12 - MQ1 (nt)	66	GACCCATACCGGCGAAAAGCCTTACAAGTGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCT TCTCTAGATCCGACAACCTCGTGAGGCACCAGAGAACCCACACCGGCGAG AAACCTTACAAATGTCCCGAGTGTGGCAAAAGCTTTTCTAGAAGCGACGA GCTGGTGAGACATCAAAGAACCCATACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGTC CCGAGTGCGGCAATCCTTTAGCCAGCTGGCCCATCTGAGGGCCCACCAG AGAACACATACCGGCGAAAAACCCACCGGCAAAAAGACAAGCGCTAGCG GCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGCCCGGACAGCAAGGTGGAGAACAA GACCAAGAAGCTGCGGGTGTTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCCCAGC GGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGGGCCT GGCCGAGTGGTACGTGCCCCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACA ACTTCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATC GACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCCGTGA GCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTA CAACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGG	30 40

【0 7 9 5】

10

20

30

40

【 0 7 9 6 】

【表 3 5】

	GAGAAACCCTACAAATGCCCCGAGTGCGGCAAATCCTTTTCTAGAGCCGA CAATCTGACCGAACACCAGAGGACCCATACCGGAGAAAAGCCTTACAAAT GTCCCGAGTGTGGCAAATCCTTCTCCACCCATCTGGATCTGATTAGACACC AAAGAACACATACCGGAGAAAAGCCCACCGGAAAAAAGACCAGCGCTAG CGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAAC AAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCTTCGCCGGCATCGGCGCCCA GCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGGGC CTGGCCGAGTGGTACGTGCCCCGCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAA CAACTTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATG ATCGACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCCGT GAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATC TACAACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCG GGACCTGTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCT TCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCG GGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTG GACAGCACCGAGAAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGT GGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAGTGGAAG CAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACG CCGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGC ACCCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGA GCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAA CAACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACA TCAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTAC GTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGCCAGCGGCGCCAA CAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAGC GACGAGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGT GAACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCA ACAGCATCAGCGTGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGC CCCAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGG CCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCTGA GCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCTTCTGGCCATGCC CTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGT

10

20

30

40

【0 7 9 7】

50

【表 3 6】

		AGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
ZF11 - MQ1 (nt) 完全長	117	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAT GGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCC GGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCCGGCCGAAAAACCTTATAAGTGCCCCGA ATGTGGAAAGAGCTTCAGCCATACCGGCCATCTGCTGGAACACCAAAGGA CACACACCGGCGAGAAACCTTACAAGTGTCCCGAGTGCGGAAAAAGCTTC TCCTCCAAAAAGGCTCTCACCGAGCACCAGAGAACACATACCGGCGAAAA GCCTTATAAGTGCCCCGAGTGTGGCAATCCTTTTCCGACTGTAGAGATCT GGCCAGACATCAAAGAACCCACACCGGAGAGAAACCTTATAAATGCCCC GAGTGCGGCAAGTCCTTTAGCCATACCGGCCATCTGCTGGAGCACCAGAG GACCCATACCGGCGAGAAAGCCTTACAAATGCCCCGAGTGCGGCAAAAGCT TCAGCAGAAATGACGCTCTGACCGAGCATCAAAGGACCCATACCGGCGAA AAGCCCTACAAGTGTCCCGAGTGTGGAAAGTCCTTCTCCAGAGCGGCGA TCTGAGGAGACACCAGAGAACACACACCGGCGAGAAACCTTATAAATGTC CCGAGTGCGGAAAGAGCTTTAGCGACAGCGGCAATCTGAGGGTGCATCAA AGAACACACACCGGCGAAAAACCCACCGGAAAAAAGACAAGCGCTAGCG GCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGCCCGGACAGCAAGGTGGAGAACAA GACCAAGAAGCTGCGGGTGTTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCCAGC GGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGGGCCT GGCCGAGTGGTACGTGCCCCGCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACA ACTTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATC GACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCCGTGA GCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTA CAACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGG ACCTGTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCTTC CCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCGGG GCAGCGGCACCCGAGCGGCCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGA CAGCACCGAGAAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTGG GCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAAGTGAAGCA GAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGCC GCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTTCATGATCAGCAC CCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGAGC

10

20

30

40

【0 7 9 8】

50

【表 3 7】

		ATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAACA ACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATC AACAAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACGT GTACGACCCCGAGTTACCGGCCCCACCCTGACCGCCAGCGGCGCCAACA GCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGA CGAGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGA ACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAAGATCTTCGTGTGCGGCAAC AGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGCCC CAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCC AAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCTGAG CGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCTTCTGGCCATGCC TTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTA GGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	10
ZF12 MQ1 (nt) 完全長	118	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAT GGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCC GGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCCGGCGAGAAACCTATAAATGCCCCGA ATGCGGAAAAAGCTTCAGCCAGTCCAGCTCTCTGGTGAGACATCAGAGGA CACACACCGGCGAAAAGCCTTATAAGTGCCCCGAGTGCGGCAAGTCCTTC TCTAGAAGCGATCACCTCACCAATCATCAGAGGACACATACCGGAGAGAA GCCCTATAAGTGCCCCGAGTGCGGCAAGAGCTTTAGCCAGCTGGCTCATC TGAGAGCTCACCAAAGAACCCATACCGGCGAGAAAGCCTTACAAATGCCCC GAGTGTGGAAAATCCTTTTCCAGTCCAGCAACCTCGTCAGACATCAAAG GACCCATACCGGCGAAAAGCCTTACAAGTGTCCCGAGTGCGGAAAAGTCCT TCTCTAGATCCGACAACCTCGTGAGGCACCAGAGAACCCACACCGGCGAG AAACCTTACAAATGTCCCGAGTGTGGCAAAAGCTTTTCTAGAAGCGACGA GCTGGTGAGACATCAAAGAACCCATACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGTC CCGAGTGCGGCAAAATCCTTTAGCCAGCTGGCCCATCTGAGGGCCCACCAG AGAACACATACCGGCGAAAAACCCACCGGCAAAAAGACAAGCGCTAGCG GCAGCGGCGGCGGCGAGCGGCGGCGCCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAA GACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCCCAGC GGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGGGCCT GGCCGAGTGGTACGTGCCCCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACA	20 30 40

【0 7 9 9】

【表 3 8】

		ACTTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATC GACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCCGTGA GCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTA CAACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGG ACCTGTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCTTC CCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCGGG GCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGA CAGCACCGAGAAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTGG GCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAAGTGAAGCA GAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGCC GCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGGCGGGTGTTCATGATCAGCAC CCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGAGC ATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAACA ACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATC AACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACGT GTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGCCAGCGGCGCCAACA GCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGA CGAGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGA ACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCAAC AGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGCCC CAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGCGCCAGGCC AAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCTGAG CGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCC TTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTA GGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	10 20 30
ZF9- MQ1 HA なし	130	GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAT GGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCC GGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCCGGCGAGAAACCTTACAAATGCCCCGA GTGCGGCAAGAGCTTCAGCAGAAGCGACGATCTGGTGAGGCACCAAAGA ACCCACACCGGCGAAAAACCTTACAAGTGTCCCGAATGCGGAAAGTCCTT CAGCAGAGAGGACAATCTGCACACCCACCAGAGAACACACACCGGAGAA AAGCCTTACAAGTGCCCCGAATGCGGCAAATCCTTTTCTAGAAGCGATCA	40

【0800】

【表 3 9】

	TCTGACCACCCACCAAAGAACACATACCGGCGAGAAGCCTTACAAATGTC CCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCCCAGAGAGCCAATCTGAGGGCTCATCAA AGGACCCATACCGGCGAAAAGCCCTACAAATGCCCCGAGTGCGGAAAAT CCTTCAGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCCACCAAAGGACACACCCGGA GAGAAACCCTATAAGTGCCCCGAGTGTGGAAAAAGCTTTTCCCAGAGGGC CAATCTGAGGGCCCATCAGAGGACCCATACCGGAGAGAAGCCTTATAAAT GTCCCGAGTGCGGAAAAAGCTTCAGCGAGAGGAGCCATCTGAGGGAACA TCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCCACCGGAAAAAAGACCAGCGCT AGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGA ACAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCC CAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGG GCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCAC AACAACTTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGA TGATCGACTACCTGGAGAAUAAGACCCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCC GTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCA TCTACAACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATC CGGGACCTGTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAG CTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGC GGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCT GGACAGCACCGAGAAGAACGACCTGCCAAGTACCTGCTGATGGAGAAC GTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAAGTGA AGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAA CGCCGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCA GCACCCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAA GAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTG AACAACTGCTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCA ACATCAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGC TACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGCCAGCGGCGC CAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAAC AGCGACGAGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCG GGTGAACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCG GCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGC GGCCCCAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCC

10

20

30

40

【0801】

50

【表 4 0】

		AGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTT CTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTAC CTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAA

10

【0802】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、Znフィンガードメインを含むターゲティング部分（例えば、配列番号11～14のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む）と、MQ1、例えば、細菌性MQ1を含むエフェクター部分（例えば、配列番号19）とを含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、配列番号28、29、30、31、32、33、129、及び145～149のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む。これらの例示的発現リプレッサーのタンパク質配列は、表9に開示される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサーは、配列番号28～33、129のうちのいずれかのアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む。

20

【0803】

【表 4 1】

表9 例示的ZF-MQ1エフェクターのアミノ酸配列

名称	配列番号	配列
ZF7-MQ1 (aa)	28	MAPKKKRKVGIVPAAGSSGSLEPGKPYKCPECCKSFSRNDALTE HQRTHTEKPYKCPECCKSFSDCRDLARHQRTHTEKPYKCPECCKS FSDPGHLVRHQRTHTEKPYKCPECCKSFSQSGHLEHQRTHTEKPY KCPECCKSFSREDNLHTEHQRTHTEKPYKCPECCKSFSSTKNSLTEHQ RTHTEKPYKCPECCKSFSRADNLTEHQRTHTEKPTGKKTSASGSG GGSGGARDSKVENKTKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGL AEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKN PVSNGYWKRKKDDELKITYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLT YSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLL MENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQAR RRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTE FKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVVDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDG

30

40

【0804】

50

【表 4 2】

		SNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVL EAIIDKIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA
ZF8- MQ1 (aa)	29	MAPKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGKPYKCPECGKSFSRSDKLTE HQRTHTEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQRTHTEKPYKCPECGKS FSRSDHLTNHQRTHTEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTEKPY KCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQR THTGEKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTEKPTGKKTSASGSGG SGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAE WYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPV SNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYS FPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLM ENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFSSQARR RVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEF KKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIDGS NIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVL EAIIDKIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA
ZF9- MQ1 (aa)	30	MAPKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGKPYKCPECGKSFSRSDDLVR HQRTHTEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTEKPYKCPECGKS FSRSDHLTTHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQANLRAHQRTHTEKPY KCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQANLRAH QRTHTEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTEKPTGKKTSASGSG GGSGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGL AEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKN PVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLT YSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLL MENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFSSQAR RRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTE FKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIDG SNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVL EAIIDKIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA
ZF10- MQ1 (aa)	31	MAPKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTEKPYKCPECGKS FSQSGHLEHQRTHTEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRH QRTHTEKPYKCPECGKSFSRNDLTHQRTHTEKPYKCPECGKSFSRADNLTHQRTHTEKPY KCPECGKSFSSTHLDLIRHQRTHTEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIG AQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSK

【0805】

10

20

30

40

50

【表 4 3】

		NPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGM KRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLENVVGALLHKKNEEELNQWKQKLES LGYQNSIEV LNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLT EFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRV NEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIIDKIGGPSSGGKRPAAATKAGQAKKKKGSYPYDVDPDYA
ZF11- MQ1 (aa)	32	MAPKKKRKVGIHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSHTGHLLE HQRTHTEKPYKCPECGKSFSKKALTEHQRTHTEKPYKCPECGKS FSDCDLARHQRTHTEKPYKCPECGKSFSHTGHLLEHQRTHTEKPY YKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRH QRTHTEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTEKPTGKKTSASGS GGSGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVG LAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSK NPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLL TYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYL LMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLES LGYQNSIEVLNAADFGSSQA RRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLT EFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKD GSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEV LEAIIDKIGGPSSGGKRPAAATKAGQAKKKKGSYPYDVDPDYA
ZF12- MQ1 (aa)	33	MAPKKKRKVGIHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRH QRTHTEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTEKPYKCPECGKSFS QLAHLRAHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTEKPYK CPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQR THTEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTEKPTGKKTSASGSGG SGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAE WYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPV SNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYS FPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLEN VVGALLHKKNEEELNQWKQKLES LGYQNSIEVLNAADFGSSQARR RVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLT EFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGS NIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLE AIIDKIGGPSSGGKRPAAATKAGQAKKKKGSYPYDVDPDYA

10

20

30

40

【0806】

50

【表 4 4】

ZF9- MQ1 HA なし	129	MAPKKRKRKVGIIHGVPAAAGSSGSLEPGKPYKCPECGKSFSRSDDLVR HQRTHTEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTEKPYKCPECGKS FSRSDIILTTIIQRTIITGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAIIQRTIITGEKPY KCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQRANLRAH QRTHTEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTEKPTGKKTSASGSG GGSGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGL AEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKN PVSNGYWKRRKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLKRTLKNIDLLT YSFPCQDLSQQGIQKGMKRSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLL MENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQAR RRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTE FKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVVDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDG SNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVL EAIIDKIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS
ZF9- MQ1+ tPT2Aの 断片1 (aa)	133	MAPKKRKRKVGIIHGVPAAAGSSGSLEPGKPYKCPECGKSFSRSDDLVR HQRTHTEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTEKPYKCPECGKS FSRSDHLTTHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTEKPY KCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQRANLRAH QRTHTEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTEKPTGKKTSASGSG GGSGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGL AEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKN PVSNGYWKRRKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLKRTLKNIDLLT YSFPCQDLSQQGIQKGMKRSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLL MENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQAR RRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTE FKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVVDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDG SNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVL EAIIDKIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYAGSYPYD VPDYAATNFSLLKQAGDVEENPG
ZF7- MQ1 HAなし	145	MAPKKRKRKVGIIHGVPAAAGSSGSLEPGKPYKCPECGKSFSRNDALTE HQRTHTEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTEKPYKCPECGKS FSDPGHLVRHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQSGHLEHQRTHTEKPY KCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTEKPYKCPECGKSFSSTKNSLTEHQ

10

20

30

40

【0807】

50

【表 4 5】

(aa)		RTHTGEKPYKCPECCKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPTGKKTASGSG GGSGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGL AEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKN PVSNGYWKRRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLT YSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNLDPKYLL MENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQAR RRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTE FKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDG SNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVL EAIIDKIGGPSSGGKRPAAATKKAGQAKKKKGS
ZF8- MQ1 HA なし (aa)	146	MAPKKKRKVGIHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECCKSFSRSDKLTE HQRTHTGEKPYKCPECCKSFSRRDELNVHQRTHTGEKPYKCPECCKS FSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPY KCPECCKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSSKKALTEHQRT HTHTGEKPYKCPECCKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPTGKKTASGSGGG SGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAE WYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPV SNGYWKRRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYS FPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNLDPKYLLM ENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQARR RVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEF KKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGS NIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLE AIIIDKIGGPSSGGKRPAAATKKAGQAKKKKGS
ZF10- MQ1 HA なし (aa)	147	MAPKKKRKVGIHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECCKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECCKS FSQSGHLTEHQRTHTGEKPYKCPECCKSFERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSDPGHLVRH QRTHTGEKPYKCPECCKSFSRNDTLTEHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPY KCPECCKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPTGKKTASGSGGGSGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIG AQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSK NPVSNGYWKRRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGM KRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNLDPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEV LNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKS NINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRV NEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIIIDKIGGPSSGGKRPAAATKKAGQAKKKKGS
ZF11- MQ1	148	MAPKKKRKVGIHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECCKSFSHTGHLE HQRTHTGEKPYKCPECCKSFSSKKALTEHQRTHTGEKPYKCPECCKS

10

20

30

40

【0808】

50

【表 4 6】

HA なし (aa)		FSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHTGHLLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYL
ZF12-MQ1 HA なし (aa)	149	LMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLES LGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIDGGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIIKDIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS
		MAPKKKRKVGIHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDDELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYL
		LMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLES LGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIDGGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIIKDIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS

10

20

30

【0809】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、Znフィンガードメインを含むターゲティング部分（例えば、配列番号11～14のいずれかのアミノ酸配列を有する）と、MQ1、例えば、細菌性MQ1を含むエフェクター部分（例えば、配列番号87）とを含む。

40

【0810】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、Znフィンガードメインを含むターゲティング部分（例えば、配列番号166～168のうちのいずれかのヌクレオチド配列によってコードされるもの）と、MQ1、例えば、細菌性MQ1を含むエフェクター部分（例えば、配列番号52のヌクレオチド配列によってコードされるもの）とを含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、配列番号157、158、又は159の核配列によってコードされる。これらの例示的発現リプレッサーの核酸配列は、表16に開示される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号166～168のうちのいずれかの核酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は10

50

0 %の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸配列はポリA配列を含み、他の実施形態では、核酸はポリA配列を欠いている。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号166～168のうちのいずれかに係る配列（又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100 %の同一性であるか、又はそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列）を含むが、3'ポリA配列を欠いているか、又はより短い長さの3'ポリA配列を含む。

【0811】

【表47】

10

表16: 例示的マウス特異的ZF-MQ1エフェクターのヌクレオチド配列

名称	配列番号	配列
ZF15-MQ1 nt	166	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGCCCCAAGAAGAAGCG GAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCGGCAGCAGCGGATCCCTTGAGCCCGGAGAAAAGCCAT ACAAATGTCCTGAATGCGGAAAGTCATTTTCTACGAGCGGCGAACTCGTGCGGCACCAAAGGACTCATA CCGGCGAAAAGCCTTACAAATGCCCGGAGTGCGGAAAAAGCTTCTCCGAGCGCTCGCACTTGCGGGAAC ACCAGCGAACCCACACAGGGGAGAAACCGTATAAGTGCCCAGAGTGCGGCAAAATCGTTCTCCCGGAAC GACACCTGACCGAACACCAACGCACTCATACTGGCGAAAAACCTTACAAGTGCCCTGAGTGTGGAAG AGCTTCTCCCGCGCCGATAACCTGACCGAGCACCAGCGGACCCATACCGGGGAAAAGCCGTACAAGTGT CCGGAATGCGGCAAAAGCTTCAGCACCTCGGGTTCCTTTCATCGCCCGGACCTGACTAGACACCAGAGG AAACCTATAAGTGTCTGAGTGCGGGAAGTCTTTTCATCGCCCGGACCTGACTAGACACCAGAGG ACCCACACCGGGGAGAAAGCCCTACAAGTGCCCGAATGTGGAAGTCTTCTCCGACTCCGGCAACCTC CGGGTGACACGCGACCCACACTGGAGAGAAGCCGACCGGAAAGAAAACTTCCGCTCCGGTTCGGG AGGAGGCTCAGGAGGAGCGAGAGATTCCAAGTTCGAGAACAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGG CCTTTGCTGGCATCGGAGCCAGAGGAAGGCCCTCGAGAAGGTCCGCAAGGATGAGTACGAGATCGTG GGAATCGCGGAGTGGTACGTGCCCCGCAATTGTGATGTACCAGGCCATCCATAACAACCTCCACACTAAG CTGGAGTACAAGTCCGTGTCCCGGGAGGAAATGATTGACTACCTGGAGAATAAGACCTGTGATGGAAC TCTAAGAACCCCGTGTGCAACGGTTACTGGAAGAGAAAGAGGATGACGAACGAAGATTATCTACAA CCGATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTCTACAAGCGCACCTTGA AGAACATCGATCTGCTGACCTACTCCTTCCCGTGCCAAGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGGA TGAAACGGGGCTCCGGTACTCGCAGCGGCTTGCTGTGGGAAATTGAGCGGGCCCTGGATAGCACCGAGA AGAACGACTTGCCGAAGTATCTTCTCATGGAACCGTCGGGGCTCTCCTTCACAAGAAGAACGAGGAAG AACTGAACCAGTGAAGCAAAAGCTGGAATCCCTCGGATACCAGAATCCATTGAGGTCTGAACGCCG CCGACTTCGGATCGTCGAAGCCAGACGAGGGGTGTTTCATGATTAGCACTCTGAACGAATTCGTGGAAC TGCCGAAGGGCGACAAGAAGCCTAAGTCCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGTCCGAGAAGGAC ATTCTCAACAATCTGCTGAAGTACAACCTGACAGAGTTCAAGAAAACCAAGTCCAACATCAACAAGGCC TCCTTGATTGTTACTCAAAGTTCAACAGCGAGGGATACGTGTACGACCCCGAATTCAGTGGACCCACTC TGACCGCTCCGGAGCAAACTTAGGATTAAGATCAAGGACGGCTCCAACATCCGAAGATGAACTCCG

20

30

【0812】

40

50

【表 4 8】

		ACGAAACCTTTCTGTACATCGGCTTCGACTCGCAAGACGGAAAGCGCGTGAACGAGATCGAATTTCTTA CCGAAACAGAGATCTTCGTGTGCGGCAATTCAATCTCCGTGGAAGTCTTGAAGCGATTATCGACA AGATCGGAGGCAGTGGTGAAAGCGCCAGCAGCCACTAAGAAGGCCGGACAGGCCAAGAAGAAGAA GGGATCCTACCCTTACGATGTGCCGATTACGCTTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCTTTCGCGGGG TTGCCCTTCTGGCCATGCCCTTCTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTA GGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
ZF16- MQ1 nt	167	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCG GAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCCGGCAGCAGCGGATCCCTGGAACCCGGAGAAAAACCTT ATAAGTGCCCTGAATGCGGAAAGTCATTCTCGAGGTGCGACAAGCTCGTGCGGCACAGAGGACACAC ACCGGGGAAAAAGCCATACAAGTGTCGGAATGTGGAAGTCTTCAGCCAACCGCCAACTGAGAGC TCATCAGCGGACTCAGCTGGCGAAAAACCGTACAAATGCCCGGAATGCGGCAAAAGCTTCTCCCGCGC CGACAACTTGACCGAGCACCAGCGGACCCATACCGCGGAAAAAGCCGTACAAGTGCCCGGAGTGTGGGA AGTCGTTGAGCCAGTCTCTTCCCTCGTGCGCCACCAACGCACCCATACTGGGGAGAAGCCCTATAAGT GTCCTGAGTGTGGCAAATCATTGAGGATAAGAAGGATCTTACCGGCACCAACGGACTCATACCGGAG AGAAGCCTTACAAGTGCCCGAGTGCGGAAAGAGCTTCTCGTCCCGCGGACCTGACTAGACACCAGC GCACCCACACCGGAGAAAAGCCCTACAAGTGCCCGAGAGTGCGGGAAGTCTTTTCCCAATCCGGTCACC TGACTGAGCACCAGAGAACCCACACGGGAGAGAAACCGACCGGAAAGAAAACCTCCGCTCCGGTTTCG GGAGGAGGCTCAGGAGGAGCGAGAGATTCCAAGGTCGAGAAAGAGCAAGAACGAGGAGTGTGAGGAGT GGCCTTTGCTGGCATCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG TGGGACTCGCGGAGTGTGACGTGCCCGCATTGTGATGTACCAGGCCATCCATAACAACCTTCCACACTA AGCTGGAGTACAAGTCCGTGTCCCGGAGGAAATGATTGACTACCTGGAGAATAAGACCTGTCTATGGA ACTCTAAGAACCCCGTGTGCAACGGTTACTGGAAGAGAAAAGAGGATGACGAACTGAAGATTATCTAC AACCGCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTCTACAAGCGCACCTT GAAGAACATCGATCTGCTGACCTACTCTTCCCGTGCCAAGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGG GATGAACCGGGGCTCCGGTACTCGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GAAGAACGACTTGCCGAAGTATCTTCTCATGGAAGAACGTCGGGGCTCTCTTACAAGAAGAACGAGGA AGAAGTGAACAGTGGAAGCAAAAGCTGGAATCCCTCGGATACCAGAAGTCCATTGAGGTCTGAAAGC CCGCCGACTTCGGATCGTGCAGGCCAGCAGGAGGGTGTTCATGATTAGCACTCTGAACGAATTCGTGG AACTGCCGAAGGGCGACAAGAAGCCTAAGTCCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGTCCGAGAAG GACATTTCTAACAATCTGCTGAAGTACAACCTGACAGAGTTCAAGAAAACCAAGTCCAACATCAACAAG GCCTCCTTGATTGGTTACTCAAGTTCACAGCGAGGGATACGTGTACGACCCCGAATTCAGTGACCC ACTCTGACCGCTCCGGAGCAAACTCTAGGATTAAGATCAAGGACGGCTCCAACATCCGGAAGATGAAC TCCGACGAAACCTTTCTGTACATCGGCTTCGACTCGCAAGACGGAAAGCGCGTGAACGAGATCGAATTT CTTACCGAAAACAGAGATCTTCGTGTGCGGCAATTCAATCTCCGTGGAAGTCTTGAAGCGATTATC GACAAGATCGGAGGCAGTGGTGAAAGCGCCAGCAGCCACTAAGAAGGCCGGACAGGCCAAGAAGA AGAAGGGATCCTACCTTACGATGTGCCGATTACGCTTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCTTCTGCG GGGCTTGCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTG AGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
ZF17- MQ1 nt	168	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCG GAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCCGGCAGCAGCGGATCCCTGGAACCCGGAGAAAAGCCAT ACAAATGCCCCGAATGCGGAAAGTCGTTACGCCAGTCCGGCGACCTCAGACGGCACCAACGGACTCAC ACCGCGGAAAAACCGTACAAGTGCCAGAGTGCGGCAAAAGCTTTAGCCAGTCCGGCGATCTGCGGAG ACATCAGCGCACTCAGCTGGTGAAGCCCTACAAGTGCTCTGAGTGCGGGAAGTCTTCAGCGAGCG CTCCCATCTTCGCGAGCACCAGAGAACCACACTGGAGAAAAACCTTATAAGTGCCCTGAGTGTGGCAA

【0 8 1 3】

10

20

30

40

50

【表 4 9】

	ATCCTTCTCAACCACCGGCAACCTGACTGTGCACCAGCGGACCCACACAGGGGAGAAGCCTTACAAGTG CCGGAGTGTGGGAAGTCATTCTCCATCGGACGACCCTGACCAACCACCAGAGGACCCATACTGGCGA AAAGCCGTATAAGTGTCCGGAGTGCAGAAAGAGCTTCTCCGACTCCGGAACCTCAGGGTGACCAACG CACCCACACCGGAGAGAAGCCGTACAAATGTCCCGAATGTGGAAGTCTTCTCCCAATCCTCTTCGCT GGTCCGGCACCAGCGAACTCATACCGGGGAAAAGCCACCGGAAAGAAAACCTCGGCTCCGGTTCGG GAGGAGGCTCAGGAGGAGCGAGAGATTCCAAGGTCGAGAACAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAG GCCTTTGCTGGCATCGGAGCCCAGAGGAAGGCCCTCGAGAAGGTCCGCAAGGATGAGTACGAGATCGT GGGACTCGCGGAGTGGTACGTGCCCGCCATTGTGATGTACCAGGCCATCCATAACAACCTCCACACTAA GCTGGAGTACAAGTCCGTGTCCCGGGAGGAAATGATTGACTACCTGGAGAATAAGACCCCTGTATGGAA CTCTAAGAACCCCGTGTGCAACGGTTACTGGAAGAGAAAAGGATGACGAACTGAAGATTATCTACA ACGCGATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTCTACAAGCGCACCTTG AAGAACATCGATCTGCTGACCTACTCCTTCCCGTGCCAAGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGG ATGAAACGGGGCTCCGGTACTCGCAGCGGCTTGTGTGGGAAATTGAGCGGGCCCTGGATAGCACCGAG AAGAACGACTTGCCGAAGTATCTTCTCATGGAAAACGTCGGGGCTCTCCTTCACAAGAAGAACGAGGAA GAACTGAACCAAGTGAAGCAAAAGCTGGAATCCCTCGGATACCAGAATCCATTGAGGTCTGAACGCC GCCGACTTCGGATCGTCGAAGCCAGACGAGGGGTGTTTCATGATTAGCACTCTGAACGAATTCGTGGAA CTGCCGAAGGGCGACAAGAAGCCTAAGTCCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGTCCGAGAAGGA CATTCTCAACAATCTGCTGAAGTACAACCTGACAGAGTTCAAGAAAACCAAGTCCAACATCAACAAGGC CTCCTTGATTGGTTACTCAAAGTTCAACAGCGAGGGATACGTGTACGACCCGAATTCAGTGACCCACT CTGACCGCCTCCGGAGCAAACTCTAGGATTAAGATCAAGGACGGCTCCAACATCCGGAAGATGAACTCC GACGAAACCTTCTGTACATCGGCTTCGACTCGCAAGACGGAAGCGCGTGAACGAGATCGAATTTCTT ACCGAAAACAGAAAGATCTTCGTGTGCGGCAATTCAATCTCCGTGGAAGTCTGGAAGCGATTATCGAC AAGATCGGAGGCAGTGGTGGAAAGCGCCAGCAGCCACTAAGAAGGCCGACAGGCCAAGAAGAAGA AGGGATCCTACCTTACGATGTGCCGATTACGCTTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGG CTTGCCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGT AGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

10

20

【0814】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、Znフィンガードメインを含むターゲティング部分（例えば、配列番号154～156のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む）と、MQ1、例えば、細菌性MQ1を含むエフェクター部分（例えば、配列番号19）とを含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、配列番号160～165のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む。これらの例示的発現リプレッサーのタンパク質配列は、表17に開示される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサーは、配列番号160～165のうちのいずれかのアミノ酸配列又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む。

30

【0815】

【表 5 0】

40

表17: 例示的ZF-MQ1エフェクターのアミノ酸配列

名称	配列番号	配列

【0816】

50

【表 5 1】

ZF15-MQI aa	160	MAPKKRKRKVGIHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESHLREH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSESRNDLTLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSE TSGSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESDGNLVRHQRTHTGEKPTGK KISASGSGGSGGARDKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFI TKLEYKSVSREEMIDYLENKTLWSNSKNPVSNYWKRRKDDDELKIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLKYRTLKNIDLLT YSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLES GYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNI NKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKI FVCGNSISVEVLEAIDKIGGSGGKRPAATKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA
ZF16-MQI aa	161	MAPKKRKRKVGIHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSESDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESRANLRA HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SDKKDLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESGHLTEHQRTHTGEKPTG KKTASGSGGSGGARDKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFI HTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLWSNSKNPVSNYWKRRKDDDELKIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLKYRTLKNIDLL TYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLES LGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNI INKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKI FVCGNSISVEVLEAIDKIGGSGGKRPAATKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA
ZF17-MQI aa	162	MAPKKRKRKVGIHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSESGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESGDLRR HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESHLREHQRTHTEKPYKCPECGKSFSESTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESDGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESSSLVRHQRTHTGEKPTG KKTASGSGGSGGARDKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFI HTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLWSNSKNPVSNYWKRRKDDDELKIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLKYRTLKNIDLL TYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLES LGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNI INKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKI FVCGNSISVEVLEAIDKIGGSGGKRPAATKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA
ZF15-MQI aa HAタグ なし	163	MAPKKRKRKVGIHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESHLREH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSESRNDLTLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSE TSGSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESDGNLVRHQRTHTGEKPTGK KKTASGSGGSGGARDKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFI TKLEYKSVSREEMIDYLENKTLWSNSKNPVSNYWKRRKDDDELKIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLKYRTLKNIDLLT YSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLES GYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNI NKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKI FVCGNSISVEVLEAIDKIGGSGGKRPAATKAGQAKKKKGS
ZF16-MQI aa HAタグ なし	164	MAPKKRKRKVGIHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSESDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESRANLRA HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SDKKDLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSESGHLTEHQRTHTGEKPTG KKTASGSGGSGGARDKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFI HTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLWSNSKNPVSNYWKRRKDDDELKIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLKYRTLKNIDLL TYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLES LGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNI INKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKI FVCGNSISVEVLEAIDKIGGSGGKRPAATKAGQAKKKKGS

10

20

30

40

【0 8 1 7】

50

【表 5 2】

ZF17-MQ1 aa HAタグ なし	165	MAPKKKRRKVGTHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRR HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS SHRRTLTHNQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPTG KKTSASGSGGGSGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNF HTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLWSNKNPVSNGYWKRRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLKRTLKNIDLL TYSFPCQDLSQGGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNLDPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLES LGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTFKKTKSN INKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKI FVCGNSISVEVLEAIIDKIGGSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS

10

【0818】

いくつかの実施形態では、本開示は、第1のZFを含む第1ターゲティング部分と、DNAメチルトランスフェラーゼ、例えば、MQ1又はその機能性断片を含む第1エフェクター部分と、第2のZFを含む第2ターゲティング部分と、KRAB、例えば、KRABドメインを含む第2エフェクター部分とを含む発現リプレッサーシステムを提供する。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーシステムは、第1ターゲティング部分及び第1エフェクター部分をコードする第1核酸であって、発現が第1プロモータ又はIRESによってドライブされる第1核酸と、第2ターゲティング部分及び第2エフェクター部分をコードする第2核酸であって、発現が第2プロモータ又はIRESによってドライブされる第2核酸とによってコードされる。いくつかの実施形態では、モノシストロン性配列が使用される。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーシステムをコードする核酸は、多シストロン性配列である。いくつかの実施形態では、多シストロン性配列は、バイシストロン性配列である。いくつかの実施形態では、多シストロン性配列は、第1発現リプレッサーをコードする配列と、第2発現リプレッサーをコードする配列とを含む。いくつかの実施形態では、多シストロン性配列は、自己切断可能なペプチド配列、例えば、2Aペプチド配列、例えば、T2Aペプチド配列、P2A配列をコードする。いくつかの実施形態では、多シストロン性配列は、T2Aペプチド配列とP2Aペプチド配列とをコードする。いくつかの実施形態では、多シストロン性配列は、タンデム2A配列、例えば、tPT2A配列をコードする。いくつかの実施形態では、多シストロン性構築物は、5'から3'に、(i)第1核局在化シグナル、例えば、SV40NLS、(ii)第1ターゲティング部分、例えば、DNA結合ドメイン、例えば、ジンクフィンガー結合ドメイン、例えば、ZF-9、(iii)第1エフェクター部分、例えば、DNAメチルトランスフェラーゼ、例えば、MQ1、(iv)第2核局在化シグナル、例えば、ヌクレオプラスミンNLS、(v)リンカー、例えば、tPT2Aリンカー、(vi)第3核局在化シグナル、例えば、SV40NLS、(vii)第2ターゲティング部分、例えば、DNA結合ドメイン、例えば、ジンクフィンガー結合ドメイン、例えば、ZF-3、(viii)第2エフェクター部分、例えば、転写リプレッサー部分、例えば、KRAB、及び(ix)第4核局在化シグナル、例えば、ヌクレオプラスミンNLSをコードする。いくつかの実施形態では、バイシストロン性構築物は、ポリAテールをさらに含む。いくつかの実施形態では、バイシストロン性遺伝子構築物の転写に伴い、第1発現リプレッサー、及び第2発現リプレッサーをコードする単一のmRNA転写物が産生され、これが翻訳に伴い、例えば、2Aペプチド内のグリシン残基の後ろで切断されると、第1発現リプレッサー及び第2発現リプレッサーが2つの別個のタンパク質として生じる。いくつかの実施形態では、第1及び第2発現リプレッサーは、「リボソームスキッピング」によって分離される。いくつかの実施形態では第1発現リプレッサー及び／又は第2発現リプレッサーは、リボソームスキッピング後も2Aペプチドの断片を保持している。いくつかの実施形態では、第1及び第2発現リプレッサーの発現レベルは等しい。いくつかの実施形態では、第1及び第2発現リプレッサーの発現レベルは異なる。いくつかの実施形態では、第1発現リプレッサーのタンパク質レベルは、第2発現リプレッサーのタンパク質レベルの1%、2%

20

30

40

50

、5%、又は10%以内である（それより高い又は低い）。

【0819】

いくつかの実施形態では、バイシストロン性核酸によってコードされるシステムは、他の点では同様のシステムと比べて細胞における標的遺伝子（例えば、MYC）の発現を少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%低減し、ここで、第1及び第2発現リプレッサーは、モノシストロン性核酸によってコードされる。

【0820】

いくつかの実施形態では、バイシストロン性配列は、配列番号91、92、121、122、181、182、187、188のアミノ酸、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列をコードする。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーシステムは、Znフィンガードメインを含むターゲティング部分（例えば、配列番号7又は13のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む）と、MQ1、例えば、細菌性MQ1（例えば、配列番号19）又はKRAB、例えば、KRABドメイン（例えば、配列番号18）を含むエフェクター部分とを含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、配列番号91、92、121、122、181、182、187、188のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む。これらの例示的発現リプレッサーシステムのタンパク質配列は、表10に開示される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサーシステムは、配列番号91～92、121～122、181、182、187、188のうちのいずれかのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む。

【0821】

いくつかの実施形態では、バイシストロン性配列は、配列番号93又は112（例えば、発現リプレッサーをコードする核酸（例えば、cDNA））又は配列番号94又は113（例えば、発現リプレッサーをコードする核酸（例えば、cDNA））の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、バイシストロン性配列は、配列番号196（例えば、発現リプレッサーをコードする核酸（例えば、cDNA））又は配列番号197（例えば、発現リプレッサーをコードする核酸（例えば、cDNA））の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、配列番号93、94、112、113、196、又は197の核酸配列、又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、或いはそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列を含む。これらの例示的発現リプレッサーシステムをコードする核酸配列は、表10に開示される。いくつかの実施形態では、核酸配列はポリA配列を含み、他の実施形態では、核酸はポリA配列を欠いている。

【0822】

10

20

30

40

50

【表 5 3】

表10 例示的発現リプレッサーシステムのアミノ酸配列、及びそれをコードする核酸配列

名称	配列 番号	配列
ZF9- MQ1+ZF 3-KRAB (aa)	91	MAPKKRKRKVGHHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECCKSFSRSDDLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSREDNLHTHQ RTHTGEKPYKCPECCKSFSRSDHLLTHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQ AHLRAHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSERSHLREHQRTHTGEKPTGKKT ASGSGGGSGGARDKVENKTKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEY KSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLTKRTLKNIDLLTYSFPCQD LSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNLDPKYLLENVVGALLHKKNEEELNQWKQKLES LGYQNSIEVL NAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTFEKKTKSNINKASLIGYSKF NSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLE AIIDKIGGSSGGKRPAAATKAGQAKKKKGSYPYDVPDYAGSYYPYDVPDYAATNFSLLKQAGDVEENPGPTSAGKL GSGEGRGSLLTCGDVEENPGPLEGSSGSGSPKKRKRKVGHHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECCKSFSRSDKLVRHQ RTHTGEKPYKCPECCKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSRSD KLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECCK KSFSDCRDLARHQRTHTGEKPTGKKTASGSGGGSGGDAKSLTAWSRTLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQLYR NVMLENYKNLVS LGYQLTKPDVILREKGEPPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKRPAAATKAGQAKKKKGS SYYPYDVPDYA*SSGGKRPAAATKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA
ZF3- KRAB+Z F9- MQ1(aa)	92	MAPKKRKRKVGHHGVPAAAGSSGSLEPGEKPYKCPECCKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQRAHLERHQ RTHTGEKPYKCPECCKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQ AHLRAHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPTGKKT ASGSGGGSGGDAKSLTAWSRTLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQLYRNVMLENYKNLVS LGYQLTKPDVILRE KGEPPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSSGGKRPAAATKAGQAKKKKGSYPYDVPDYAGSYYPYDVPDYAATNFS LLKQAGDVEENPGPTSAGKLGS GEGRGSLLTCGDVEENPGPLEGSSGSGSPKKRKRKVGHHGVPAAAGSSGSLEPGEKPY KCPECCKSFSRSDDLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSRSDHLLTHQRT HTGEKPYKCPECCKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQRAN LRAHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSERSHLREHQRTHTGEKPTGKKTASGSGGGSGGARDKVENKTKLRVFEAFAG IGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYW KRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLTKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDS TEKNLDPKYLLENVVGALLHKKNEEELNQWKQKLES LGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGD KKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTFEKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGS NIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIIDKIGGSSGGKRPAAATKAGQAKKKKGS YPYDVPDYA*SSGGKRPAAATKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA
ZF9- MQ1+ZF	93	GCGGCAAATCCTTTTCTAGAAAGCATCTGACCACCCACCAAAGAACACATACCGGCGAGAAGCCTTACAAA TGTCCTCGAGTGCGGAAAGTCTTCTCCAGAGAGCCAATCTGAGGGCTCATCAAAGGACCCATACCGGCGAAAA

【0 8 2 3】

10

20

30

40

50

【表 5 4】

3-KRAB (nt)		GCCCTACAAATGCCCGAGTGCGGAAAAATCCTTCAGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCCAACAAAGGACACACA CCGGAGAGAAACCCCTATAAGTGCCCGAGTGTGAAAAAGCTTTTCCAGAGGGCCAATCTGAGGGCCCATCA GAGGACCCATACCGGAGAGAAGCCTTATAAATGTCCCGAGTGCGGAAAAAGCTTCAGCGAGAGGAGCCATCTG AGGGAACATCAAAGAACCCACACCGCGAAAAACCCACCGGAAAAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGGCGG GGCAGCGCGCGCGCGCGGACAGCAAGGTGGAGAACAAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCCTTCGCCG GCATCGCGCGCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGGGCTGGCCGAGTG GTACGTGCGCCGCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACCTTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGA GCCGGGAGGAGATGATCGACTACCTGGAGAACAAGACCCCTGAGCTGGAAACAGCAAGAACCCCGTGAGCAACGG CTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGC AACATCTTCGACATCCGGGACCTGTACAAGCGGACCCCTGAAGAATCGACCTGTGACCTACAGCTTCCCCCTG CCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCGGGGACGCGGCACCCGAGCGGCGCTGCTGTGG GAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAAGAACGACCTGCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTGGGCG CCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGA ACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCCGGACCTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGCGGGGTGTTTATGATCAGCACC CTGAACGAGTTCTGTGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCG TGAGCGAGAAGGACATCCTGAACAACCTGTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAACCAAGAGCAACAT CAACAAGGCCAGCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACGTGTACGACCCCGAGTTACCCGGCC CCACCTGACCGCCAGCGCGGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAG CGACGAGACCTTCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGAACGAGATCGAGTTCTGACCG AUAALUAAAGATTTUJFIFUGUGCAACAGCATCAGCGTGAAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGG CGGCCACGACGCGCGGCAAGCGGCCCGCGGCCACCAAGAAGGCCCGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAG CTACCCTACGACGTGCCGACTACGCCGGTCTACCCGTACGACGTGCCGATTACGCCGCCACCAACTTCTC GCTGTGAAGCAGGCCGGAGATGTGGAAGAAAACCTGGACCTACCAGTGCCGGAAGCTCGGTAGCGGAGAG GGTGGGGAAGCCTGCTTACTTGGCGGACGTGGAAGAAACCCCGTCCGCTGGAGGGTTCGTCCGGCTCCGG ATCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCGCGCGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCC GGCGAAAAACCTTACAAGTGCCCCGAGTGCGGAAGAGCTTCAGCAGAAACGACAAAACCTGGTGAGGCATCAA GGACACATACCGGAGAGAAGCCCTATAAGTGCCCCGAATGTGGCAATCCTTTCCAGAGGGCTCATCTGGAA AGACACCAGAGGACCATACCGGCGAAAAACCTACAAATGTCCCGAGTGTGGAAGAGCTTTCCGATCCCG GCCATCTGGTCAGACATCAGAGGACATACCGGCGAAAAAGCCTTACAAGTGTCCCGAATGCGGAAAAATCCTTC TCCAGAAGCGACAAGCTGGTGAGGCACCAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCTATAAATGCCCCGAGTGCG GCAAGTCTTTAGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCCAACAGAGAACACACACCGGAGAGAAGCCTTATAAGTGT CCCGAGTGCGGAAAGTCTTCTCTAGAGCCGACAATCTGACCGAACATCAAAGGACACACACCGGCGAGAAAC CTTATAAATGCCCGAGTGCGGAAAAAGCTTTCCGACTGCAGAGATCTGGCTAGACACCAGAGAACCACACCC GGCGAGAAACCCACCGCAAAAAGACCGCGCTAGCGGCAGCGCGGCGGCGCAGCGCGGCGACGCCAAGAGC CTGACCGCCTGGAGCGGACCCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTCTGTGGAATCACCAGGAGGAGTGGAAGCT GCTGGACACCGCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCT ACCAGCTGACCAAGCCCGACGTGATCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGAGCGGGAGAT CCACAGGAGACCCACCCGACAGCGAGACCGCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGAGCGGCGGCAAGCGGCC GCCGCCACCAAGAAGGCCCGGCCAGGCCAAGAAAGAAAGGCGAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC GAAGCAGCGCGGCAAGCGGCCCGGCCGCCACCAAGAAGGCCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACC CCTACGACGTGCCCGACTACGCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCCTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATG CCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	10
ZF3- KRAB+Z	94	TATAAATGCCCGAGTGCGGAAAAAGCTTTTCCGACTGCAGAGATCTGGCTAGACACCAGAGAACCACACCGG CGAGAAACCCACCGCAAAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGCGGCGGCGCAGCGGCGGCGACGCCAAGAGCCT	40

【0824】

【表 5 5】

F9-MQ1 (nt)		GACCGCCTGGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTCGTGGACTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGC TGGACACCGCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGAGAATAACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTAC CAGCTGACCAAGCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGAGCGGGAGATCC ACCAAGGAGACCCACCCGACAGCGAGACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGAGCAGCGGCGCAAGCGGCC CGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC GGTCTACCCGTACGACGTGCCGATTACGCCGCCACCAACTTCTCGCTGCTGAAGCAGGCCGGAGATGTGGA AGAAAAACCTGGACCTACCAAGTGCCGGAAGCTCGGTAGCGGAGAGGGTCGGGGAAGCCTGCTTACTTGCGGC GACGTGGAAGAGAACCCCGGTCCGCTGGAGGGTTCGTCCGGCTCCGGATCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGG GCATCCACGGCGTGCCCGCCCGCCGACGACGGATCCCTGGAGCCCGCGAGAAAACCTTACAAATGCCCGGA GTGCGGCAAGAGCTTCAGCAGAAAGCGACGATCTGGTGAGGCACCAAGAAGCCACACCGGCGAAAAACCTTAC AAGTGTCCCGAATGCGGAAAGTCCTTCAGCAGAGAGGACAATCTGCACACCCACAGAGAACACACACCGGAG AAAAGCCTTACAAGTGCCCGGAATGCGGCAAAATCCTTTTCTAGAAGCGATCATCTGACCACCCACCAAGAACA CATACCGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCCAGAGAGCCAATCTGAGGGCTCA TCAAAGGACCCATACCGGCGAAAAAGCCCTACAAATGCCCGAGTGCGGAAAAATCCTTACGCCAGCTGGCCCATC TGAGAGCCCAACCAAGGACACACACCGGAGAGAAAACCTATAAGTGCCCGAGTGTTGGAAGAAAGCTTTTCCCA GAGGGCCAATCTGAGGGCCCATCAGAGGACCCATACCGGAGAGAAGCCTTATAATGTCCCGAGTGCGGAAAA AGCTTCAGCGAGAGGAGCCATCTGAGGGAACATCAAAGAAGCCACACCGGCGAAAAACCCACCGGAAAAAAG ACCAAGCGCTAGCGGCAGCGCGCGCGGACGCGCGCGCGCGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAGAAG CTGCGGGTGTTCGAGGCCCTTCGCGGCATCGCGCGCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGT ACGAGATCGTGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAATTTCCAC ACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATCGACTACCTGGAGAACAAGACCTTGAGCTGGA ACAGCAAGAACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGC CATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTACAAGCGGACCTGAAGAATC GACCTGTGACCTACAGCTTCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCGGGGCA GCGGCACCCGAGCGGCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAGAAGACGACCTGCCCAA GTACCTGTGTGAGAGAAGCTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAAGAGGAGGAGCTGAACAGTGGGAAGCAG AAGCTGGAGAGCCTGGGTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCCGCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCC GGCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGAG CATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCTGAACAACCTGTGAAGTACAACCTGACC GAGTTCAAGAAAAACAGAGCAACATCAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCT ACGTGTACGACCCCGAGTTACCGGCCCCACCTGACCGCCAGCGGCGCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGA CGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAG CGGGTGAACGAGATCGAGTTCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGG TGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGCGGCCCCAGCGGCGCAAGCGGCCCCGCCCAACAAGAAGGCCGG CCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCGACTACGCTGAAGCAGCGGCGGCAAGCGG CCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGCGCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCGACTACG CCTGAGCGGCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCCCTTGCAAC TGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAA
ZF9- MQ1+ZF 3-KRAB 完全長 nt配列	112	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGG TGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCCGCGGACGACGGATCCCTGGAGCCCGCGAGAAACCTTACAAATGCCCC GAGTGCGGCAAGAGCTTCAGCAGAAAGCGACGATCTGGTGAGGCACCAAGAAGCCACACCGGCGAAAAACCTT ACAAGTGTCCCGAATGCGGAAAGTCCTTCAGCAGAGAGGACAATCTGCACACCCACAGAGAACACACACCGG AGAAAAAGCCTTACAAGTGCCCGGAATGCGGCAAAATCCTTTTCTAGAAGCGATCATCTGACCACCCACCAAGA CACATACCGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCCAGAGAGCCAATCTGAGGGCT

10

20

30

40

【0825】

【表 5 6】

		CATCAAAGGACCCATACCGGCGAAAAAGCCCTACAAA TGCCCGAGTGCGGAAAAATCCTTCAGCCAGCTGGCCC ATCTGAGAGCCCAACAAAGGACACACACCGGAGAGAAACCTATAAGTGCCCGAGTGTTGAAAAAGCTTTTC CCAGAGGGCCAATCTGAGGGCCCATCAGAGGACCCATACCGGAGAGAAAGCCTTATAAATGTCCCGAGTGCGGA AAAAGCTTCAGCGAGAGGAGCCA ICIGAGGGAALATCAAAGAAUUAUACCGGCGAAAAACCCACCGGAAAA AAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGGGCGGCGAGCGGCGGCCCGGACAGCAAGGTGGAGAACAAAGACCAAG AAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCCTCGCCGGCATCGGCGCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACG AGTACGAGATCGTGGGCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACCTTC CACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATCGACTACCTGGAGAACAAAGACCTGAGCT GGAACAGCAAGAACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTACA ACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTACAAGCGGACCTGAAGAA CATCGACCTGCTGACCTACAGCTTCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCGGG GCAGCGGCACCCGAGCGGCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAAGAACGACCTGCC CAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAAGTGAAG CAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAAGACGATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGG CCCGCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAA GAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCTCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCTG ACCGAGTTCAAGAAACCAAGAGCAACATCAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGG GCTACGTGTACGACCCCGAGTTACCGGCCCCACCTGACCGCCAGCGGCGCCAAACAGCCGGATCAAGATCAAG GACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCA AGCGGTGAACGAGATCGAGTTCTTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGA GGTGTGAGGGCCATATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAG GCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCGGTCTTACCCGTACG ACGTGCCGATTACGCCGCCACCAACTTCTCGTGTGTAAGCAGGCCGGAGATGTGGAAGAAAAACCTGGACCT ACCAGTGCCGGAAGCTCGGTAGCGGAGAGGGTCGGGGAAGCCTGCTTACTTGCGGCGACGTGGAAGAGAACC CCGTCCGCTGGAGGGTTCGTCCGGCTCCGGATCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCC GCCGCCGCGCAGCAGCGGATCCCTGGAGGCCCGCGAAAAACCTTACAAGTGCCCGAGTGCGGAAAGAGCTTCA GCAGAAGCGACAACTGGTGAGGCATCAAAAGGACACATACCGGAGAGAAGCCCTATAAGTGCCCGGAATGTGG CAAACTCTTTTCCAGAGGGCTCATCTGGAAGACACCAGAGGACCCATACCGGCGAAAAACCTACAAATGTC CCGAGTGTGGAAGAGCTTTCCGATCCCGGCCATCTGGTCAGACATCAGAGGACACATACCGGCGAAAAAGCCT TACAAGTGTCCCGAATGCGGAAAACTCTTCTCCAGAAGCGACAAGCTGGTGAGGCACCAAGAACCACACCG GCGAAAAACCTATAAATGCCCGAGTGCGGCAAGTCTTTAGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCCCACCAAGAG ACACACACCGGAGAGAAGCCTTATAAGTGTCCCGAGTGCGGAAAGTCTTCTCTAGAGCCGACAATCTGACCGA ACATCAAAGGACACACACCGGCGAGAAACCTTATAAATGCCCGAGTGCGGAAAAAGCTTTTCCGACTGCAGA GATCTGGCTAGACACCAGAGAAACCCACACCGGCGAGAAACCCACCGGCAAAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCG GCGGCGGCGAGCGGCGGCGACGCCAAGAGCCTGACCGCCTGGAGCCGGAACCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTT CGTGGACTTACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGACACCGCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGG AGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAAGCTGACCAAGCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGG CGAGGAGCCCTGGCTGGTGAGCGGGAGATCCACCAGGAGACCCACCCGACAGCGAGACCGCCTTCGAGATC AAGAGCAGCGTGAGCGGCGCAAGUUGUUUUUUUUUUAUUAAGAAGGCGGCGCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGC AGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTGAAGCAGCGGCGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCG GCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAG CTGCCCTCTGCGGGGCTTGCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACTGTACCTCTTGGTCTTTGAATA AAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
ZF3- KRAB+Z	113	AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGG TGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCCGCGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCCCGCGAAAAACCTTACAAGTGCCCC

10

20

30

40

【0 8 2 6】

50

【表 5 7】

F9-MQ1 完全長 mt配列	GAGTGC GGAAAGAGCTTCAGCAGAAGCGACAACTGGTGAGGCATCAAAGGACACATACCGGAGAGAAGCCCT ATAAGTGCCCGAATGTGGCAAATCCTTTTCCAGAGGGCTCATCTGGAAAGACACCAGAGGACCCATACCGGC GAAAAACCTTACAAATGTCCCGAGTGTGGAAAGAGCTTTTCCGATCCCGGCCATCTGGTCAGACATCAGAGGAC ACATACCGGCGAAAAGCCTTACAAGTGTCCCGAATGCGGAAAAATCCTTCTCCAGAAGCGACAAGCTGGTGAGG CACCAGAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCTTATAATGCCCCGAGTGCGGCAAGTCTTTAGCCAGCTGGCCCA TCTGAGAGCCCCACAGAGAACACACACCGGAGAGAAGCCTTATAAGTGTCCCGAGTGCGGAAAGTCTTCTCTA GAGCCGACAATCTGACCGAACATCAAAGGACACACACCGGCGAGAAACCTTATAATGCCCCGAGTGCGGAAA AAGCTTTTCCGACTGCAGAGATCTGGCTAGACACCAGAGAACCCACACCGGCGAGAAACCCACCGGCAAAAAG ACCAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCGAGCGGCGCGGACGCAAGAGCCTGACCGCCTGGAGCGGACCCCTGG TGACCTTCAAGGACGTGTTCTGTGGACTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGACACCGCCAGCAGATCCTG TACCGGAACGTGATGCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAAGCCCGACGTGA TCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGAGCGGGAGATCCACAGGAGACCCACCCCGACAG CGAGACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAAGCGCGC CAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCGACTACGCCGGTCTTACCCGTACGACGTGC CCGATTACGCCGCCACCAACTTCTCGTGTCTGAAGCAGGCCGAGATGTGGAAGAAAACCTTGGACCTACCAGT GCCGGAAGCTCGGTAGCGGAGAGGGTTCGGGGAAGCCTGCTTACTTGCGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGTC CGCTGGAGGGTTCTGTCCGCTCCCGATCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCG CGGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCCGGCGAGAAACCTTACAAATGCCCCGAGTGCGGCAAGAGCTTCAGCAGA AGCGACGATCTGGTGAGGCACCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCTTACAAGTGTCCCGAATGCGGAAAGT CCTTCAGCAGAGAGGACAATCTGCACACCCACCAGAGAACACACACCGGAGAAAAGCCTTACAAGTGTCCCGA ATGCGGCAAAATCCTTTTCTAGAAGCGATCATCTGACCACCCACCAAAGAACACATACCGGCGAGAAGCCTTACA AATGTCCCGAGTGCGGAAAGTCTTCTCCAGAGAGCCAATCTGAGGGCTCATCAAAGGACCCATACCGGCGAA AAGCCCTACAAATGCCCCGAGTGCGGAAAATCCTTCAGCCAGCTGGGCCATCTGAGAGCCCAACAAAGGACAC ACACCGGAGAGAAAACCTTAAAGTGTCCCGAGTGTGGA AAAAGCTTTTCCAGAGGGCCAATCTGAGGGCCCA TCAGAGGACCCATACCGGAGAGAAGCCTTATAAATGTCCCGAGTGCGGAAAAAGCTTCAGCGAGAGGAGCCAT CTGAGGGAACATCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCCACCGGAAAAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGGC GGCGGCAGCGGCGGCGCCCGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCG CCGGCATCGGCGCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGGGCTGGCCGA GTGGTACGTGCCCGCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAATTCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCG TGAGCCGGGAGGAGATGATCGACTACCTGGAGAACAAGACCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCCGTGAGCAA CGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAG GGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTACAAGCGGACCCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCTTCCC CTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCGGGGACGCGGACCCCGAGCGGCTGCTG TGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAAGAAGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAAGCTGG GCGCCCTGCTGCACAAGAAGAAGCAGGAGGAGCTGAACAGTGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCA GAACAGCATCGAGGTGCTGAACGCGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGGGTGTTTCATGATCAGC ACCCTGAACGAGTTCTGTGAGCTGCCAAGGGCGCAAGAAGCCCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGA TCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAA CATCAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACGTGTACGACCCCGAGTTACCG GCCCCACCTGACCGCCAGCGGCGCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAA CAGCGACGAGACCTTCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGAACGAGATCGAGTTCTGA CCGAGAACCAGAAGATCTTCTGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGAT CGGCGGCCCCAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGCGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAG CTACCCTACGACGTGCCGACTACGCTGAAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGCGC CAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCGACTACGCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCT GCCTTCTGCGGGGCTTGCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAA

10

20

30

40

【0827】

【表 5 8】

		GCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
ZF09- MQ1- tPT2A- ZF54- KRAB nt	196	GGGAAATAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGCCCCAAAGAAGAAGAGAAAG GTCGGAATTCATGGCGTGCCCGCAGCCGGCAGCAGCGTTCCCTGGAGCCCGCGAGAAACCTTACAAATGCCC CGAGTGCGGCAAGAGCTTCAGCAGAAGCGACGATCTGGTGAGGCACCAAGAACCACACCGCGGAAAAACCT TACAAGTGTCCTGAATGCGGAAAGTCTTCAGCAGAGAGGACAATCTGCACACCCACCAGAGAACACACACCG GAGAAAAAGCCTTACAAGTGCCCGGAATGCGGCAAAATCCTTTCTAGAAGCGATCATCTGACCACCCACCAAGA ACACATACCGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGCGGAAAGTCTTCTCCAGAGAGCCAATCTGAGGGC TCATCAAAGGACCCATACCGGCGAAAAGCCCTACAAATGCCCCGAGTGCGGAAAAATCCTTCAGCCAGCTGGCCC ATCTGAGAGCCCAAAAGGACACACACCGGAGAGAAACCTTAAAGTGCCCGAGTGTTGAAAAAGCTTTTC CCAGAGGGCCAATCTGAGGGCCCATCAGAGGACCCATACCGGAGAGAAGCCTTATAAATGTCCCGAGTGCGGA AAAAGCTTCAGCGAGAGGAGCCATCTGAGGGAACA TCAAAGAACCACACCGGCGAAAAACCCACCGGAAAA AAGACCAGCGCTAGCGGACGCGGCGGCGGACGCGGCGGCCCGGACAGCAAGGTGGAGAAACAAGACCAAG AAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACG AGTACGAGATCGTGGGCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACCTTC CACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATCGACTACCTGGAGAACAAGACCTGAGCT GGAACAGCAAGAACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTACA ACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTACAAGCGGACCTGAAGAA CATCGACCTGTGAOCTACAGCTTCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCGGG GCAGCGGCACCCGAGCGGCTGTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAAGAAGACCTGCC CAAGTACCTGTGTATGGAGAACGTGGGCGCCCTGTGTCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAAGTGAAG CAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAAGACGATCGAGGTGCTGAACGCGCGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGG CCCGCGGCGGGGTGTTTCATGATCAGCACCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAA GAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCTG ACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGG GCTACGTGTACGACCCCGAGTTACCGGCCCCACCTGACCGCCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAG GACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCA AGCGGGTGAACGAGATCGAGTTCTGTACCGAGAACCAGAAATCTTCGTGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGA GGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCGGCGGCAAGCGGCGCCGCCACCAAGAAGGCC GGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCGGGTCCGCCACCAACTTCT CGCTGTGAAGCAGGCCCGAGACGTGGAAGAAAACCTGGACCTACAGTGCCGGAAAGCTCGGTAGCGGAGA GGGTGCGGGAAGCCTGCTTACTTGCGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGTCCGCTGGAGGGTTCGTCCGGCTCCG GATCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCCGGCGAGCAGCGGATCCCTGGAGCC TGGAGAGAAACCTACAAATGCCCGGAATGCGGGAAGTCTTTTCCGAACGCTCCACCTGAGGGAACACCAG AGAACTCACACCGCGAAAAACCTATAAGTGCCAGAAATGCGGAAAGAGCTTTTACGGTGGACAACCTCGT GCGGCACCAACGCACTCATACCGGAGAGAAGCCGTACAAGTGTCTGAGTGCGGAAAGTCAATTCTCCGACTGCC GGGATTTGGCCCGCCACCAAGAACAACACTGGCGAAAAGCCCTACAAGTGCCCGGAGTGTTGGAAGTCCCTT CAGCACTTTCGAGAGCTGGTCCCGCACCAAGAGGCCACACCGGGGAGAAGCCTTACAAATGTCCAGAGTGC GGTAAAAGCTTCTCCACACCGGCAACCTCACCGTGCACCAAGCGACCCACACTGGAGAAAAGCCGTATAATG CCCCGAATGCGGCAAGAGCTTCTCGCATCCGATAAGCTTGTGCGGCATCAGAGAACGCACACTGGGAAAAAG CCTTATAAGTGTCCGGAGTGCGGCAAAATCCTTCTCCGCACTGACACCTGCGGGACCATCAGCGCACCCATAC CGGCAAAAAGACCTCTGTAGCGGACGCGGCGGCGGACGCGGCGGCGCCGGGACGACGCCAAGAGCCTGACC GCCTGGAGCCGACCTGTGTGACCTTCAAGGACGTGTCTGTGGAAGTCAACCGGGAGGAGTGAAGCTGTGGA CACCGCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGC TGACCAAGCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGGAGCGGGAGATCCACCA

【0 8 2 8】

10

20

30

40

50

【表 5 9】

		GGAAACCCACCCCGACAGCGAAACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGCCAGCAGCGCGGCAAGCGGCC GCCGCCACCAAGAGGCGCGCCAGGCCAAGAAGAAGAGGCGAGCTACCCCTACGAGCTGCCGACTACGCCT GAGCGGCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCCTTCGCGCATGCCCTTCTCTCTCCCTTGACCTGT ACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAA
ZF54- KRAB- IPT2A- ZF09- MQ1 nt	197	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGCCCCAAAGAAGAGAGAAAG GTCGGAATTCATGGCGTGCCCGCAGCCGCGCAGCAGCGGTTCCCTGGAGCCTGGAGAGAAACCTACAAATGCC GGAATGCGGGAAGTCCTTTCCGAACGCTCGCACCTGAGGGAACACCAGAGAACTACACCGGCGAAAAACCC TATAAGTGCCCGAATGCGGAAAGAGCTTTTACGGTCGGACAACCTCGTGCGGCACCAACGCACCTCATACCGG AGAGAAGCCGTACAAGTGTCTGAGTGCGGAAAGTCAATTCGCGACTGCCGGATTGCGCCGCCACCAAGAA CACACACTGGCGAAAGCCCTACAAGTGCCCGGAGTGTGGAAGTCCCTTCAGCACTTCGGGAGAGCTGGTCCGG CACCAGAGGACCCACACCGGGGAGAAGCCTTACAAATGTCCAGAGTGCGGTAAGAGCTTCTCCACCACCGGCA ACCTCACCGTGACACGCGGACCCACACTGGAGAAAAGCCGTATAAATGCCCGAATGCGGCAAGAGCTTCTCG CGATCCGATAAGCTTGTGCGGCATCAGAGAACGCACACTGGGGAAAAGCCTTATAAGTGTCCGGAGTGCGGCA AATCCTTCTCCCGCACTGACACCTGCGGGACCATCAGCGCACCATACCGGCAAAAAGACCTCTGTAGCGGC AGCGGCGCGCGCAGCGGCGCGCCCGGACGACGCCAAGAGCCTGACCGCTGGAGCCGACCTGGTGACCT TCAAGGACGTGTTCTGTTGACTTCAACCGGGAGGAGTGAAGCTGCTGGACACCGCCAGCAGATCTGTACCGG AACGTGATGCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAAGCTGACCAAGCCGACGTGATCTGCG GCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGAGCGGGAGATCCACCAGGAAACCCACCCGACAGCGAAAC GCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGCCAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCAACAAGAAGGCCGCGCAGG CCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCGACTACGCCGGTCCGCCACCACCTTCTCGCTGCTG AAGCAGGCCGAGACGTGGAAGAAAACCTGGACCTACAGTGCCGGAAGCTCGGTAGCGGAGAGGGTCCG GGAAGCTGCTTACTTGCGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGTCCGCTGGAGGGTTCGTCGGCTCCGGATCCCC CAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCGCGGACGACGCGATCCCTGGAGCCCGCGGAG AAACCTTACAAATGCCCGAGTGCGGCAAGAGCTTCAGCAGAAGCGACGATCTGGTGAGGCACCAAGAACCC ACACCGCGCAAAAACCTTACAAGTGTCCGAATGCGGAAAGTCTTCAGCAGAGAGGACATCTGCACACCCA CCAGAGAACACACACCGGAGAAAAGCCTTACAAGTGCCCGAATGCGGCAAACTCTTTCTAGAAGCGATCATC TGACACCCACCAAGAACACATACCGGCGAGAAAGCCTTACAATGTCCCGAGTGCGGAAAGTCTTCTCCAG AGAGCCAATCTGAGGGCTCATCAAGGACCCATACCGGCGAAAAGCCCTACAAATGCCCGAGTGCGGAAAT CCTTCAGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCCAACAAAGGACACACCGGAGAGAAAACCTATAAGTGCCCGA GTGTGGAAGAAAGCTTTTCCAGAGGGCCAATCTGAGGGCCATCAGAGGACCCATACCGGAGAGAAAGCCTTAT AAATGTCCCGAGTGCGGAAAAGCTTCAGCGAGAGGAGCCATCTGAGGGAACATCAAGAAGCCACACCGGCG AAAAACCCACCGGAAAAAGACGAGCTAGCGGCAGCGCGCGGCGGAGCGGCGCGCGCGGACAGCAAGG TGGAGAACAAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCTTCGCGGCATCGGCGCCAGCGGAAGGCCCTGGA GAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGGGCTGGCCGAGTGTACGTGCCCGCATCGTGATGTACCA GCCATCCACAACAACTTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATCGACTACCTGG AGAACAAGACCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACG AGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTA CAAGCGGACCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCTTCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCC AGAAGGGCATGAAGCGGGGACGCGCACCCGAGCGGCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCAC CGAGAAGAACGACCTGCCAAGTACCTGCTGATGGAGAAGTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAAGGAGGAG GAGCTGAACAGTGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGCGCGCG ACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGCGGGTGTTCATGATCAGCACCCCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCAAG GGCGACAAGAAGCCCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCTGAACAAC

10

20

30

40

【0829】

【表 60】

		CTGCTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACA GCAAGTTCAACAGCGAGGGGTACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGCCAGCGGCGCAAC AGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCTGTACATCGGCT TCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGAACGAGATCGAGTTCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCTGTGCGG CAACAGCATCAGCGTGGAGGTGTGAGGCGCATCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCGGCGGCAAGCGGCC GCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC GAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCTTCTGCGCATGCCTTCTTCTCCTTGCACCTGT ACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAA
ZF9- MQ1+ZF 3-KRAB (aa)	121	MAPKKRKRKVGIGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSDDLVRHQRTHTEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQ RTHTEKPYKCPECGKSFSRSDHLTHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQ AHLRAHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTEKPTGKKT ASGSGGSGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEY KSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQD LSQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNLDPKYLLENVVGALLHKKNEEELNQWKQKLESIGYQNSIEVL NAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTFEKKTKSNINKASLIGYSKF NSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLE AIIDKIGGPSGGKRPAAIKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYAGSYYPYDVPDYAATNFSLLKQAGDVEENPGPT3AGKL GSGEGRGSLTTCGDVEENPGPLEGSSGSGSPKKRKRKVGIGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQR THTEKPYKCPECGKSFSQRALHQRTHTEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTEKPYKCPECGKSFSRSD KLVRHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTEKPYKCPECG KSFSDCRDLARHQRTHTEKPTGKKTASGSGGSGGDAKSLTAWSRTLVTFKDFVDFTREEWKLLDTAQQILYR NVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEPPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKRPAAIKKAGQAKKKKGS SYPYDVPDYA
ZF3- KRAB+Z F9- MQ1(aa)	122	MAPKKRKRKVGIGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQRALHQRH RTHTEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQ AHLRAHQRTHTEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTEKPTGKKT ASGSGGSGGDAKSLTAWSRTLVTFKDFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLE KGEPPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKRPAAIKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYAGSYYPYDVPDYAATNFS LLKQAGDVEENPGPT3AGKLGSSEGRGSLTTCGDVEENPGPLEGSSGSGSPKKRKRKVGIGVPAAGSSGSLEPGEKPY KCPECGKSFSRSDDLVRHQRTHTEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTTEKPYKCPECGKSFSRSDHLTHQR THTEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQRAN LRAHQRTHTEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTEKPTGKKTASGSGGSGGARDSKVENKTKKLRVFEAF GIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYW KRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDS TEKNLDPKYLLENVVGALLHKKNEEELNQWKQKLESIGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGD KKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTFEKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGS NIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIIDKIGGPSGGKRPAAIKKAGQAKKKKGS YPYDVPDYA
ZF09- MQ1- IPT2A- ZF54- KRAB aa	181	MAPKKRKRKVGIGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSDDLVRHQRTHTEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQ RTHTEKPYKCPECGKSFSRSDHLTHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQ AHLRAHQRTHTEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTEKPTGKKT ASGSGGSGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEY KSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQD LSQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNLDPKYLLENVVGALLHKKNEEELNQWKQKLESIGYQNSIEVL

10

20

30

40

【0830】

50

【表 6 1】

		NAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKKIVSEKDILNNLLKYNLTFEKKTKSNINKASLIGYSKF NSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLE AIIDKIGGPSGGKRPAAATKAGQAKKKKGSYPYDVPDYAGSATNFSLLKQAGDVEENPGPTSAGKLGSGEGRGSLLT CGDVEENPGPLEGSSGSGSPKKRRKVGIIHGVPAAGSSGSLPEGEKPYKCPECGKSFERSHLREHQRTHTEKPYKCP ECGKSFSRSDNLVRHQRTHTEKPYKPECGKSFSDCDRLARHQRTHTEKPYKPECGKSFSTSGELVRHQRTHTG EKPYKPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTEKPYKPECGKSFSDKLVHQRTHTEKPYKPECGKSFSDTLRD HQRTHTGKKTASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSTRLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQLYRNVMLNENYKLVSL LGYQLTKPDVILRLEKGEEPWVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKRPAAATKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA
ZF54- KRAB- IPT2A- ZF09- MQI aa	182	MAPKKRKRKVGIIHGVPAAGSSGSLPEGEKPYKCPECGKSFERSHLREHQRTHTEKPYKPECGKSFSDNLVRHQ RTHTEKPYKPECGKSFSDCDRLARHQRTHTEKPYKPECGKSFSTSGELVRHQRTHTEKPYKPECGKSFSTTG NLTVHQRTHTEKPYKPECGKSFSDKLVHQRTHTEKPYKPECGKSFSDTLRDHQRTHTGKKTASGSGG GSGGARDDAKSLTAWSTRLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQLYRNVMLNENYKLVSLGYQLTKPDVILRLEKGE EPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKRPAAATKAGQAKKKKGSYPYDVPDYAGSATNFSLLKQAGDVEEN PGPTSAGKLGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPLEGSSGSGSPKKRRKVGIIHGVPAAGSSGSLPEGEKPYKCPECGKSFERS DDLVRHQRTHTEKPYKPECGKSFSDNLHQRTHTEKPYKPECGKSFSDHLLTHQRTHTEKPYKPECG KSFSDQRANLRAHQRTHTEKPYKPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTEKPYKPECGKSFSDQRANLRAHQRTHTE KPYKPECGKSFERSHLREHQRTHTEKPTGKKTASGSGGGSGGARDSKVENKTKKLRFVEAFAGIGAQRKALEK VRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLWSNSKNPVSNGYWKRKKDDELKII YNAIKLSEKEGNIFDIRDLTKRNLIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLL MENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESGLYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLN KIVSEKDILNNLLKYNLTFEKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETF LYIGFDSQDGRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIIDKIGGPSGGKRPAAATKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA
ZF09- MQI- IPT2A- ZF54- KRAB aa HAタグ なし	187	MAPKKRKRKVGIIHGVPAAGSSGSLPEGEKPYKCPECGKSFSDNLVRHQRTHTEKPYKPECGKSFSDNLHQR RTHTEKPYKPECGKSFSDHLLTHQRTHTEKPYKPECGKSFSDQRANLRAHQRTHTEKPYKPECGKSFSQL AHLRAHQRTHTEKPYKPECGKSFSDQRANLRAHQRTHTEKPYKPECGKSFERSHLREHQRTHTEKPTGKKT ASGSGGGSGGARDSKVENKTKKLRFVEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEY KSVSREEMIDYLENKTLWSNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLTKRNLIDLLTYSFPCQD LSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESGLYQNSIEVL NAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKKIVSEKDILNNLLKYNLTFEKKTKSNINKASLIGYSKF NSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLE AIIDKIGGPSGGKRPAAATKAGQAKKKKGSYPYDVPDYAGSATNFSLLKQAGDVEENPGPTSAGKLGSGEGRGSLLT CGDVEENPGPLEGSSGSGSPKKRRKVGIIHGVPAAGSSGSLPEGEKPYKCPECGKSFERSHLREHQRTHTEKPYKCP ECGKSFSRSDNLVRHQRTHTEKPYKPECGKSFSDCDRLARHQRTHTEKPYKPECGKSFSTSGELVRHQRTHTG EKPYKPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTEKPYKPECGKSFSDKLVHQRTHTEKPYKPECGKSFSDTLRD HQRTHTGKKTASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSTRLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQLYRNVMLNENYKLVSL LGYQLTKPDVILRLEKGEEPWVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKRPAAATKAGQAKKKKGS
ZF54- KRAB- IPT2A- ZF09- MQI aa HAタグ なし	188	MAPKKRKRKVGIIHGVPAAGSSGSLPEGEKPYKCPECGKSFERSHLREHQRTHTEKPYKPECGKSFSDNLVRHQ RTHTEKPYKPECGKSFSDCDRLARHQRTHTEKPYKPECGKSFSTSGELVRHQRTHTEKPYKPECGKSFSTTG NLTVHQRTHTEKPYKPECGKSFSDKLVHQRTHTEKPYKPECGKSFSDTLRDHQRTHTGKKTASGSGG GSGGARDDAKSLTAWSTRLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQLYRNVMLNENYKLVSLGYQLTKPDVILRLEKGE EPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKRPAAATKAGQAKKKKGSYPYDVPDYAGSATNFSLLKQAGDVEEN PGPTSAGKLGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPLEGSSGSGSPKKRRKVGIIHGVPAAGSSGSLPEGEKPYKCPECGKSFERS DDLVRHQRTHTEKPYKPECGKSFSDNLHQRTHTEKPYKPECGKSFSDHLLTHQRTHTEKPYKPECG KSFSDQRANLRAHQRTHTEKPYKPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTEKPYKPECGKSFSDQRANLRAHQRTHTE KPYKPECGKSFERSHLREHQRTHTEKPTGKKTASGSGGGSGGARDSKVENKTKKLRFVEAFAGIGAQRKALEK VRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLWSNSKNPVSNGYWKRKKDDELKII

【0831】

【表 6 2】

	YNAIKLSEKEGNIFDIRDLTKRNLIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLL MENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESGLYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLN KIVSEKDILNNLLKYNLTFEKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETF LYIGFDSQDGRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIIDKIGGPSGGKRPAAATKAGQAKKKKGS

【0832】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、核局在化配列（NLS）を含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、NLS、例えば、SV40 NLSをN末端に含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、NLS、例えば、ヌクレオプラスミンNLSをC末端に含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、N末端に第1のNLSを含み、C末端に第2のNLSを含む。いくつかの実施形態では第1及び第2のNLSは同じ配列を有する。いくつかの実施形態では、第1及び第2のNLSは異なる配列を有する。いくつかの実施形態では、発現抑制リプレッサーは、SV40 NLSを含み、例えば、発現リプレッサーは、PKKKRK（配列番号135）に係る配列を含む。いくつかの実施形態では、N末端配列は、NLS及びスペーサーを含んで、例えば、MAPKKRKVGIGHGVPAAGSSGS（配列番号88）に係る配列を有する。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、スペーサー、ヌクレオプラスミン核局在化配列及びHAタグのうちの1つ以上、例えば、いずれか2つ又は3つ全てを含むC末端配列：例えば、SGGKRPAATKKAGQAKKKGSYPYDVPDYA（配列番号89）を含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、エピトープタグ、例えば、HAタグ：YPYDVPDYA（配列番号90）を含む。例えば、発現リプレッサーは、エピトープタグを2コピー含み得る。

10

20

30

40

50

【0833】

エピトープタグは、多くの研究というコンテキストでは有用であるが、治療というコンテキストでは、時にエピトープタグを省くことが望ましい。従って、いくつかの実施形態では、発現リプレッサーはエピトープタグを欠いている。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサーは、本明細書に提供される配列（又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、又はそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列）を含むが、配列番号90のHAタグを欠いている。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、本明細書に提供される配列（又はそれと少なくとも80、85、90、95、99、又は100%の同一性であるか、又はそれと差異のある位置が20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1箇所を超えない配列）を含むが、配列番号90のHAタグをコードする領域を欠いている。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーはヌクレオプラスミンNLSを含み、例えば、発現リプレッサーは、KRPAATKKAGQAKKK（配列番号136）の配列を含む。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーはNLSを含まない。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーはエピトープタグを含まない。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーはHAタグを含まない。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、配列番号90に係るHAタグ配列を含まない。

【0834】

いくつかの実施形態では、本開示は、発現リプレッサーシステムが自己切断型ペプチドを含むことを提供する。当初ピコルナウイルスで発見された自己切断型ペプチドは、19～22アミノ酸長のペプチドであり、通常、ピコルナウイルス科の一部のメンバーにおいて2つのタンパク質の間に見られる。ピコルナウイルスは、自己切断型タンパク質を用いることにより、同じmRNAから等モルレベルの複数の遺伝子を産生することができる。かかる自己切断型タンパク質は、他のウイルス種にも見られることが公知であり、当業者は、本明細書に提供される情報に基づいて、本明細書に開示される自己切断型タンパク質の好適な代替を必要に応じて容易に決定することが可能であろう。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーシステムは、自己切断型ペプチド、例えば、2A自己切断型ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、2Aペプチドは単一の切断部位を含む（例えば、2Aペプチド、例えば、P2A、T2A、E2A、又はF2Aペプチド）。いくつかの実施形態では自己切断型ペプチド、例えば、2Aペプチドは、2つの切断部位を含む（例えば、pPT2A、又はP2A-T2A-E2A）。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーシステムは、複数の切断部位を含む自己切断型ペプチド、例えば、T2A自己切断型

ペプチドと P 2 A 自己切断型ペプチドとを含む。いくつかの実施形態では、2 A ペプチドは翻訳後に切断される。いくつかの実施形態では、自己切断型ペプチドは切断後に 2 つ以上の断片を産生する。いくつかの実施形態では、2 A ペプチド断片は、配列番号 1 2 6 ~ 1 2 8 の配列を含む。いくつかの実施形態では、2 A 自己切断型ペプチドは、配列番号 1 2 0、1 2 4、1 2 5 の配列又はその誘導体を含む。いくつかの実施形態では、配列番号 9 5 は、自己切断型ペプチドの配列を含む。

P S S G G K R P A A T K K A G Q A K K K K G S Y P Y D V P D Y A G S Y P Y D V P
D Y A A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P T S A G K L G S G E G R G S L L T C
G D V E E N P G P L E G S S G S G S P K K K R K V G I H G V P A A G S S G S (配列番号 9 5)

E G R G S L L T C G D V E E N P G P (配列番号 1 2 0)

A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P T S A G K L G S G E G R G S L L T C G D V
E E N P G P (配列番号 1 2 4)

A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (配列番号 1 2 5)

A T N F S L L K Q A G D V E E N P G (配列番号 1 2 6)

P T S A G K L G S G E G R G S L L T C G D V E E N P G (配列番号 1 2 7)

P (配列番号 1 2 8)

【0 8 3 5】

当然ながら、2 A 配列、例えば、t P T 2 A 配列（例えば、配列番号 1 2 4 に係る）は、科学文献中及び本明細書では自己切断型ペプチドとして言及され得るが、これは非限定的な理論によるものであることが理解される。別の非限定的な理論によれば、いくつかの実施形態では、2 A 配列はリボソームスキッピングを介して働く。例えば、2 A 配列をコードする m R N A がリボソームスキッピングを誘導してもよく、ここで上記リボソームは 2 A 領域を翻訳する間にペプチド結合を形成することができないため、翻訳産物の第 1 部分が放出されることになる。次にリボソームは翻訳産物の第 2 部分を産生する。総じて、第 1 配列と第 2 配列との間に 2 A 配列が置かれると、第 1 配列を含む第 1 タンパク質と、別個の、第 2 配列を含む第 2 タンパク質との産生につながるであろうことは十分に確立されている。本開示は、これが実現される分子機構に関しては、いかなる特定の理論にも拘束されない。

【0 8 3 6】

機能的特性

本開示の発現リプレッサー又はシステムを使用することにより、細胞における標的遺伝子、例えば、M Y C の発現を低減することができる。一般に、本明細書に記載のとおり発現リプレッサー又はシステムは、標的遺伝子、例えば、M Y C に近接した、及び／又はそれに作動可能に連結したゲノム配列エレメントを（例えば、ターゲティング部分を介して）結合する。いくつかの実施形態では、発現リプレッサー又はシステムがゲノム配列エレメントに結合すると、標的遺伝子、例えば、M Y C の発現が調節される（例えば、低減される）。例えば、転写機構の成分の動員を阻害するエフェクター部分を含む発現リプレッサー又はシステムがゲノム配列エレメントに結合すると、標的遺伝子、例えば、M Y C の発現が調節され得る（例えば、低減され得る）。さらなる例として、酵素活性（例えば、エピジェネティック修飾部分）のあるエフェクター部分を含む発現リプレッサー又はシステムが結合すると、エフェクター部分の酵素活性の局在化を通じて標的遺伝子、例えば、M Y C の発現が調節され得る（例えば、低減され得る）。さらなる例として、発現リプレッサー又はシステムによるゲノム配列エレメントへの結合及び発現リプレッサー又はシステムの酵素活性の局在化の両方が、結果として得られる標的遺伝子、例えば、M Y C の発現の調節（例えば、低減）に寄与し得る。

【0 8 3 7】

いくつかの実施形態では、発現の低減は、標的遺伝子、例えば、M Y C によってコードされる R N A、例えば、m R N A のレベルの低減を含む。いくつかの実施形態では、発現の低減は、標的遺伝子、例えば、M Y C によってコードされるタンパク質のレベルの低減

10

20

30

40

50

を含む。いくつかの実施形態では、発現の低減は、標的遺伝子、例えば、MYCによってコードされるmRNA及びタンパク質のレベルの低減の両方を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される発現リプレッサー又は発現抑制システムを接触させるか、又はそれを含む細胞における標的遺伝子の発現は、本明細書に開示される発現リプレッサー又は発現抑制システムを接触させていないか、又はそれを含まない細胞における標的遺伝子の発現のレベルと比べて少なくとも $1.05\times$ （即ち、 1.05 倍）、 $1.1\times$ 、 $1.15\times$ 、 $1.2\times$ 、 $1.25\times$ 、 $1.3\times$ 、 $1.35\times$ 、 $1.4\times$ 、 $1.45\times$ 、 $1.5\times$ 、 $1.55\times$ 、 $1.6\times$ 、 $1.65\times$ 、 $1.7\times$ 、 $1.75\times$ 、 $1.8\times$ 、 $1.85\times$ 、 $1.9\times$ 、 $1.95\times$ 、 $2\times$ 、 $3\times$ 、 $4\times$ 、 $5\times$ 、 $6\times$ 、 $7\times$ 、 $8\times$ 、 $9\times$ 、 $10\times$ 、 $20\times$ 、 $30\times$ 、 $40\times$ 、 $50\times$ 、 $60\times$ 、 $70\times$ 、 $80\times$ 、 $90\times$ 、又は $100\times$ 低い。標的遺伝子、例えば、MYCの発現は、RT-PCR、ELISA、ウエスタンブロット、及び実施例2～9の方法を含め、当業者に公知の方法によりアッセイし得る。対象、例えば、患者、例えば、MYC誤調節障害を有する患者、例えば、肝疾患を有する患者、新生物形成及び／又はウイルス関連若しくはアルコール関連肝疾患を有する患者、例えば、肝細胞癌を有する患者、例えば、肝細胞癌亜型S1又は肝細胞癌亜型S2を有する患者における標的遺伝子、例えば、MYCの発現レベルは、例えば、Oglesbee et al. Clin Chem. 2013 Oct; 59 (10): 1461-9. Doi: 10.1373/clinchem.2013.207472又はDeutsch et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2014 Sep; 85 (9): 994-1002. Doi: 10.1136/jnnp-2013-306788（これらの内容は本明細書によって全体として参照により組み込まれる）のいずれかの方法により、標的遺伝子、例えば、MYCの血中（例えば、全血）レベルを判定することによって評価し得る。

10

20

30

40

50

【0838】

本開示の発現リプレッサー又はシステムを使用することにより、細胞における標的遺伝子、例えば、MYCの発現をある期間にわたって低減することができる。いくつかの実施形態では、発現リプレッサー又はシステムを接触させるか、又はそれを含む細胞における標的遺伝子、例えば、MYCの発現は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、又は24時間、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、10、14、又は15日、又は少なくとも1、2、3、4、又は5週間、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12ヵ月、又は少なくとも1、2、3、4、又は5年にわたって（例えば、無限に）認め得るほどに減少する。任意選択で、発現リプレッサー又はシステムを接触させるか、又はそれを含む細胞における標的遺伝子、例えば、MYCの発現は、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1年以下にわたって認め得るほどに減少する。いくつかの実施形態では、発現リプレッサー又はシステムを接触させるか、又はそれを含む細胞における標的遺伝子、例えば、MYCの発現は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10回の細胞分裂にわたって認め得るほどに減少する。本開示の発現リプレッサー又はシステムを使用することにより、標的プロモータ、例えば、MYCプロモータのCpGヌクレオチドをメチル化することができる。いくつかの実施形態では、MYC発現における転写の変化は、CpGメチル化率と相関する。いくつかの実施形態では、メチル化は、本明細書に開示される発現リプレッサー又はシステムによる処理後少なくとも1日間、少なくとも2日間、少なくとも5日間、少なくとも7日間、少なくとも10日間、少なくとも15日間、又は少なくとも20日間持続する。

【0839】

本開示の発現リプレッサー又はシステムを使用することにより、標的遺伝子座、例えば、MYC遺伝子座を含む細胞の生存能力を低減することができる。いくつかの実施形態では、本開示の発現リプレッサー又はシステムを使用することにより、標的遺伝子座、例えば、MYC遺伝子座を含む複数の細胞の生存能力を低減することができる。いくつかの実施形態では、発現リプレッサー、又システムを接触させるか、又はそれを含む生細胞の数

は、発現リプレッサー又はシステムを接触させていないか、又はそれを含まない細胞の対照集団における生細胞の数と比較して10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は100%だけ認め得るほどに減少する。

【0840】

いくつかの実施形態では、本開示の発現リプレッサー又はシステムを使用することにより、癌細胞及び非癌細胞を含む複数の細胞の生存能力を低減することができる。いくつかの実施形態では、本開示の発現リプレッサー又はシステムを使用することにより、複数の癌細胞の生存能力を、それが複数の非癌細胞の生存能力を低減するよりも大きく低減することができる。いくつかの実施形態では、本開示の発現リプレッサー又はシステムを使用することにより、複数の癌細胞の生存能力を、それが複数の非癌細胞の生存能力を低減するよりも1.05×（即ち、1.05倍）、1.1×、1.15×、1.2×、1.25×、1.3×、1.35×、1.4×、1.45×、1.5×、1.6×、1.7×、1.8×、1.9×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、20×、50×、又は100×大きく低減することができる。

10

【0841】

いくつかの実施形態では、本開示の発現リプレッサー又はシステムを使用することにより、感染細胞及び非感染細胞を含む複数の細胞の生存能力を低減することができる。いくつかの実施形態では、本開示の発現リプレッサー又はシステムを使用することにより、それが複数の非感染細胞の生存能力を低減するよりも大きく複数の感染細胞の生存能力を低減することができる。いくつかの実施形態では、本開示の発現リプレッサー又はシステムを使用することにより、複数の感染細胞の生存能力を、それが複数の非感染細胞の生存能力を低減するよりも1.05×（即ち、1.05倍）、1.1×、1.15×、1.2×、1.25×、1.3×、1.35×、1.4×、1.45×、1.5×、1.6×、1.7×、1.8×、1.9×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、20×、50×、又は100×大きく低減することができる。

20

【0842】

発現抑制システムは、各発現リプレッサーが別の発現リプレッサーのエフェクター部分と異なる機能のエフェクター部分を含むような複数の発現リプレッサーを含み得る。例えば、発現抑制システムは、第1発現リプレッサーが、エピジェネティック修飾部分、例えば、DNAメチルトランスフェラーゼ、例えば、MQ1を含む第1エフェクター部分を含み、第2発現リプレッサーが、転写リプレッサー、例えば、KRABを含む第2エフェクター部分を含むような2つの発現リプレッサーを含み得る。いくつかの実施形態では、第2発現リプレッサーは第2エフェクター部分を含まない。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を阻害することに関して互いに補完的な機能を持つエフェクター部分の組み合わせであって、それらの機能が一緒になって発現の阻害を実現するものであり、任意選択で、個別に存在するとき発現を阻害しないか、又は無視できるほどしか阻害しないようなエフェクター部分の組み合わせを含む発現リプレッサーを含む。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは複数の発現リプレッサーを含み、ここでは各発現リプレッサーが、互いの発現リプレッサーのエフェクター部分に補完的なエフェクター部分を含み、例えば、各エフェクター部分が、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減する。

30

40

【0843】

いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を阻害することに関して互いに相乗作用する機能を持つエフェクター部分の組み合わせを含む発現リプレッサーを含む。理論によって拘束されることを望むものではないが、ゲノム遺伝子座へのエピジェネティック修飾は、複数の抑制性エピジェネティックマーカー（例えば、複数の異なる種類のエピジェネティックマーカー及び／又はある所与の種類のより広範なマーキング）が個別に一緒になって個別の修飾単独よりも高い有効性で発現を低下させる（例えば、発現のより大きい低減及び／又は発現のより長く続く低減を生じさせる）という点で、累積的であり得る。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは複数の

50

発現リプレッサーを含み、ここでは各発現リプレッサーが、互いの発現リプレッサーのエフェクター部分と相乗作用するエフェクター部分を含み、例えば、各エフェクター部分が、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減する。

【0844】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサー又はシステムは、標的遺伝子、例えば、MYCに関連する1つ以上のエピジェネティックマーカー又はそれに作動可能に連結した発現制御配列を変化させることにより、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節する（例えば、低減する）。いくつかの実施形態では、変化させることは、標的遺伝子、例えば、MYCに関連するエピジェネティックマーカー又はそれに作動可能に連結した発現制御配列のレベルを低減することを含む。エピジェネティックマーカーとしては、限定はされないが、DNAメチル化、ヒストンメチル化、及びヒストン脱アセチル化が挙げられる。

10

【0845】

いくつかの実施形態では、エピジェネティックマーカーのレベルを変化させると、標的遺伝子、例えば、MYCに関連するエピジェネティックマーカー又はそれに作動可能に連結した発現制御配列のレベルが、発現リプレッサー又はシステムを接触させていないか、又はそれを含まない細胞における標的遺伝子、例えば、MYCに関連するエピジェネティックマーカー又はそれに作動可能に連結した発現制御配列のレベルと比べて少なくとも1.05×（即ち、1.05倍）、1.1×、1.15×、1.2×、1.25×、1.3×、1.35×、1.4×、1.45×、1.5×、1.55×、1.6×、1.65×、1.7×、1.75×、1.8×、1.85×、1.9×、1.95×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、20×、30×、40×、50×、60×、70×、80×、90×、又は100×低いレベルに減少する。エピジェネティックマーカーのレベルは、全ゲノムバイサルファイトシーケンシング、縮小表現バイサルファイトシーケンシング、バイサルファイトアンプリコンシーケンシング、メチル化アレイ、パイロシーケンシング、ChIP-seq、又はChIP-qPCRを含め、当業者に公知の方法によりアッセイし得る。いくつかの実施形態では、hg19参照ゲノムに係る正確なゲノム座標、例えば、hg19参照ゲノムに係るchr8:129188693~129189048におけるバイサルファイトゲノムシーケンシングを用いてエピジェネティックマーカー、例えば、DNAメチル化の変化（例えば、増加又は減少）をアッセイし得る。いくつかの実施形態では、配列番号123に係るゲノム位置におけるバイサルファイトゲノムシーケンシングを用いてエピジェネティックマーカー、例えば、DNAメチル化の変化（例えば、増加又は減少）をアッセイし得る。

20

30

【化41】

CAGAGAAGGAGGAAGTTAATTCACATTCTTAATTTTTCTAAGGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAATGCAC
CAGCTCATTTTCCATCTCTGCTTGGGTCATCAGTGTGCATTGTGAGCCTGTACAAAGGCCTTAGACGGG
GAATGCTGCCGAGAGCATCACCTTTTATGTCTTCTTTATATGAAATGTGCCACTTCCCCACTAACCCT
GGCTCTGGGCTCTGCCTCTGCTCTCCTGATGGTGTGTTTATGGTGGATTGAGCATTCTGGGCCACACAA
GGAAGCTGCAGGGGGTGTCCAAGTTCACATGTCCCGCATTCAGGCGAATGTTTCTGACATTGAGCA
ATGATATGGCTCT (配列番号123)

40

【0846】

本開示の発現リプレッサー又はシステムを使用することにより、細胞における標的遺伝子、例えば、MYCに関連するエピジェネティックマーカー又はそれに作動可能に連結した発現制御配列のレベルをある期間にわたって変化させることができる。いくつかの実施形態では、発現リプレッサー又はシステムを接触させるか、又はそれを含む細胞における標的遺伝子に関連するエピジェネティックマーカー又はそれに作動可能に連結した発現制御配列のレベルは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、又は24時間、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、10、又は14日、又は少なくとも1、

50

2、3、4、又は5週間、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12ヵ月、又は少なくとも1、2、3、4、又は5年にわたって（例えば、無限に）認め得るほどに減少する。任意選択で、発現リプレッサー又はシステムを接触させるか、又はそれを含む細胞における標的遺伝子、例えば、MYCに関連するエピジェネティックマーカー又はそれに作動可能に連結した発現制御配列のレベルは、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1年以下にわたって認め得るほどに減少する。

【0847】

リプレッサーの組み合わせ

いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、第1エフェクター部分を含む第1発現リプレッサーと第2エフェクター部分を含む第2発現リプレッサーとを含み、ここで、第1エフェクター部分と第2エフェクター部分とは互いに異なる。いくつかの実施形態では、第1エフェクター部分は、第1エピジェネティック修飾部分（例えば、第1エピジェネティックマーカーを増加又は減少させるもの）又はその機能性断片であるか、又はそれを含み、第2エフェクター部分は、第2エピジェネティック修飾部分（例えば、第2エピジェネティックマーカーを増加又は減少させるもの）又はその機能性断片であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、第1エフェクター部分は、DNAメチルトランスフェラーゼ又はその機能性断片であるか、又はそれを含み、第2エフェクター部分は、KRAB又はその機能性断片であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、第1エフェクター部分は、ヒストンデアセチラーゼ又はその機能性断片であるか、又はそれを含み、第2エフェクター部分は、KRAB又はその機能性断片であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、第1エフェクター部分は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ又はその機能性断片であるか、又はそれを含み、第2エフェクター部分nは、KRAB又はその機能性断片であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、第1エフェクター部分は、ヒストンデメチラーゼ又はその機能性断片であるか、又はそれを含み、第2エフェクター部分は、KRAB又はその機能性断片であるか、又はそれを含む。

【0848】

いくつかの実施形態では、第1エフェクター部分は、MQ1、DNMT1、DNMT3A1、DNMT3A2、DNMT3B1、DNMT3B2、DNMT3B3、DNMT3B4、DNMT3B5、DNMT3B6、DNMT3L、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8、HDAC9、HDAC10、HDAC11、SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6、SIRT7、SIRT8、SIRT9、KDM1A（即ち、LSD1）、KDM1B（即ち、LSD2）、KDM2A、KDM2B、KDM5A、KDM5B、KDM5C、KDM5D、KDM4B、NO66、SETDB1、SETDB2、EHMT2（即ち、G9A）、EHMT1（即ち、GLP）、SUV39H1、EZH2、EZH1、SUV39H2、SETD8、SUV420H1、SUV420H2又はこれらのいずれかの機能性断片であるか、又はそれを含み、第2エフェクター部分は、KRAB（例えば、KRABドメイン）、MeCP2、HP1、RBBP4、REST、FOG1、SUZ12、又はこれらのいずれかの機能性断片であるか、又はそれを含む。

【0849】

いくつかの実施形態では、第1エフェクター部分は、KRAB（例えば、KRABドメイン）、MeCP2、HP1、RBBP4、REST、FOG1、SUZ12、又はこれらのいずれかの機能性断片であるか、又はそれを含み、第2エフェクター部分は、MQ1、DNMT1、DNMT3A1、DNMT3A2、DNMT3B1、DNMT3B2、DNMT3B3、DNMT3B4、DNMT3B5、DNMT3B6、DNMT3L、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8、HDAC9、HDAC10、HDAC11、SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6、SIRT7、SIRT8、SIRT9、KDM1A（即ち、LSD1）、KDM1B（即ち、LSD2）、KDM2A、KDM2B、KDM5A、KDM5B、KDM5C、KDM5D、KDM4B、NO66、SET

DB1、SETDB2、EHMT2（即ち、G9A）、EHMT1（即ち、GLP）、SUV39H1、EZH2、EZH1、SUV39H2、SETD8、SUV420H1、SUV420H2又はこれらのいずれかの機能性断片であるか、又はそれを含む。

【0850】

いくつかの実施形態では、第1エフェクター部分は、細菌性MQ1又はその機能性変異体若しくは断片であるか、又はそれを含み、第2エフェクター部分は、KRAB又はその機能性変異体若しくは断片であるか、又はそれを含む。

【0851】

いくつかの実施形態では、第1エフェクター部分は、DNMT3A又はその機能性変異体若しくは断片であるか、又はそれを含み、第2エフェクター部分は、KRAB又はその機能性変異体若しくは断片であるか、又はそれを含む。

10

【0852】

いくつかの実施形態では、第1エフェクター部分は、DNMT3B又はその機能性変異体若しくは断片であるか、又はそれを含み、第2エフェクター部分は、KRAB又はその機能性変異体若しくは断片であるか、又はそれを含む。

【0853】

いくつかの実施形態では、第1エフェクター部分は、DNMT3L又はその機能性変異体若しくは断片であるか、又はそれを含み、第2エフェクター部分は、KRAB又はその機能性変異体若しくは断片であるか、又はそれを含む。

【0854】

いくつかの実施形態では、第1エフェクター部分は、DNMT3a／3L複合体又はその機能性変異体若しくは断片であるか、又はそれを含み、第2エフェクター部分は、KRAB又はその機能性変異体若しくは断片であるか、又はそれを含む。

20

【0855】

標的部位

本明細書に開示される発現リプレッサー又は発現リプレッサーシステムは、細胞、例えば、対象又は患者における標的遺伝子、例えば、MYCの発現の調節、例えば、低減に有用である。標的遺伝子、例えば、MYCは、当業者に公知の任意の遺伝子であってよい。いくつかの実施形態では、標的遺伝子、例えば、MYCは、対象、例えば、哺乳類、例えば、ヒト、ウシ、ウマ、ヒツジ、ニワトリ、ラット、マウス、ネコ、又はイヌの疾患又は病態に関連する。標的遺伝子には、コード配列、例えば、エキソン、及び／又は非コード配列、例えば、イントロン、3'UTR、又は5'UTRが含まれ得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、転写制御エレメントに作動可能に連結している。

30

【0856】

本明細書に記載の発現リプレッサー又は発現リプレッサーシステムにおける使用に好適なターゲティング部分は、標的遺伝子、例えば、MYCの範囲内にある任意の部位、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した転写制御エレメント、アンカー配列（例えば、標的遺伝子に近接しているか、又は標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結したアンカー配列媒介接合部に関連するアンカー配列（例えば、アンカー配列媒介接合部は、接合部の破壊によって標的遺伝子、例えば、MYCの発現が変化する場合には、その標的遺伝子に作動可能に連結している））、又はスーパーエンハンサー領域に位置する調節エレメント（例えば、MYCのスーパーエンハンサー領域に位置する調節エレメント）に結合し、例えば、それに特異的に結合し得る。

40

【0857】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサーは、ある部位で、又はその部位に近接している位置で結合する。例えば、ターゲティング部分が、リプレッサー（第2部位）に近接している第1部位に結合してもよく、前記ターゲティング部分に関連するエフェクター部分が、第2部位（エンハンサー配列）が結合した及び／又は修飾されたと実質的に同じく、エンハンサーによる標的遺伝子の発現への効果が修飾されるように、第1部位をエピジェネティック修飾してもよい。いくつかの実施形態では、標的遺伝子

50

(例えば、標的遺伝子の範囲内にあるエキソン、イントロン、又はスプライス部位)に近接した部位、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した転写制御エレメントに近接した部位、又はアンカー配列に近接した部位は、標的遺伝子、例えば、MYC(例えば、標的遺伝子、例えば、MYCの範囲内にあるエキソン、イントロン、又はスプライス部位)、転写制御エレメント、又はアンカー配列から5000、4000、3000、2000、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、50、又は25塩基対未満にある(及び任意選択で、標的遺伝子、例えば、MYC(例えば、標的遺伝子の範囲内にあるエキソン、イントロン、又はスプライス部位)、転写制御エレメント、又はアンカー配列から少なくとも20、25、50、100、200、又は300塩基対にある)。

10

【0858】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、標的遺伝子、例えば、MYCに結合する。いくつかの実施形態では、DNAターゲティング部分は、標的遺伝子、例えば、MYCのエキソンの範囲内にある部位に結合する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、標的遺伝子、例えば、MYCのイントロンの範囲内にある部位に結合する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、標的遺伝子、例えば、MYCのエキソンとイントロンとの境界にある部位、例えば、スプライス部位に結合する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、標的遺伝子、例えば、MYCの5'UTRの範囲内にある部位に結合する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、標的遺伝子、例えば、MYCの3'UTRの範囲内にある部位に結合する。標的遺伝子としては、限定はされないが、MYCをコードする遺伝子が挙げられる。

20

【0859】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、標的遺伝子(例えば、MYC)に作動可能に連結した転写制御エレメント、例えば、プロモータ又はエンハンサーに結合する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結したプロモータの一部分又はその範囲内にある部位に結合する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、標的遺伝子、例えば、MYCの転写開始部位に結合する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結したエンハンサーの一部分又はその範囲内にある部位に結合する。いくつかの実施形態では、ゲノム複合体(例えば、ASMC)によって2つ以上のゲノム配列エレメントが共局在化し、ここで、上記2つ以上のゲノム配列エレメントにはプロモータが含まれる。プロモータは、典型的には、関連する遺伝子の転写を惹起する配列エレメントである。プロモータは、典型的には、遺伝子の5'末端の近く、その転写開始部位から遠くない所にある。当業者が認識しているとおり、真核細胞におけるタンパク質コード遺伝子の転写は、典型的には、基本転写因子(例えば、TFIID、TFIIE、TFIIH、FUSE、CTEエレメント等)及びメディエータがコアプロモータ配列に前開始複合体として結合することによって惹起され、前開始複合体は、RNAポリメラーゼIIを転写開始部位に導くものであり、多くの場合、RNAポリメラーゼのエスケープ及び一次転写物の伸長が始まった後であってもコアプロモータ配列に結合したまま残る。いくつかの実施形態では、プロモータには、TATA、Inr、DPE、又はBREなどの配列エレメントが含まれるが、当業者は、プロモータを定義付けるのに必ずしもかかる配列を必要としないことを十分に認識している。当業者は、遺伝子に関連する種々の正の(例えば、エンハンサー)又は負の(例えば、リプレッサー又はサイレンサー)転写制御エレメントを熟知している。いくつかの実施形態では、転写制御エレメントは、転写因子結合部位である。典型的には、かかる転写制御エレメントにコグネイト調節タンパク質が結合すると、関連する1つ又は複数の遺伝子からの転写が変化する(例えば、増加又は減少する)。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、ゲノム座標GRCh37:chr8:129162465~129212140の範囲内に位置するゲノム配列に結合する。

30

40

【0860】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、ゲノム配列エレメントに含まれる又

50

は部分的に含まれる標的配列に結合する。いくつかの実施形態では、ゲノム配列エレメントは、発現制御配列であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ゲノム配列エレメントは、標的遺伝子、例えば、MYC又は標的遺伝子、例えば、MYCの一部であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、又は35塩基長（及び任意選択で、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、又は20塩基長以下）である標的配列に結合する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、10〜30、15〜30、15〜25、18〜24、19〜23、20〜23、21〜23、又は22〜23塩基長である標的配列に結合する。いくつかの実施形態では、標的配列は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、又は40塩基長である。いくつかの実施形態では、ゲノム配列エレメントは、アンカー配列であるか、又はそれを含む。

10

【0861】

各ASMCは、1つ以上の、例えば、複数のアンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、アンカー配列は、天然に存在するゲノム複合体（例えば、ASMC）を調節する（例えば、破壊する）ように、又は新規のゲノム複合体（例えば、ASMC）を形成するように（例えば、外因性の又は変化したアンカー配列を含む天然に存在しないゲノム複合体（例えば、ASMC）を形成するように）操作し、又は変化させることができる。いくつかの実施形態では、アンカー配列媒介接合部を破壊することにより、標的遺伝子の発現を変化させる、例えば、阻害する、例えば、低減することができる。かかる破壊は、例えば、標的遺伝子が転写制御エレメントと相互作用する能力の調節により（例えば、増強及びサイレンシング／抑制配列）、例えば、DNAのトポロジー構造が変わることによって遺伝子発現を調節し得る。

20

【0862】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、アンカー配列、例えば、標的遺伝子、例えば、MYCに近接したアンカー配列、又は標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結したアンカー配列媒介接合部（ASMC）に関連するアンカー配列に結合する（例えば、接合部を破壊すると標的遺伝子、例えば、MYCの発現が変化する場合、アンカー配列媒介接合部は標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結している）。一般に、アンカー配列は、ゲノム複合体成分、例えば、核形成ポリペプチドが特異的に結合するゲノム配列エレメントである。いくつかの実施形態では、ゲノム複合体成分がアンカー配列に結合すると、それが複合体形成、例えば、ASMC形成の核となる。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、標的遺伝子、例えば、MYC遺伝子座に結合する。遺伝子座とは、概して、転写領域、プロモータ、及び標的遺伝子、例えば、MYCを含むASMCのアンカー部位を包含すると定義される。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、配列番号75〜86又は199〜206のいずれか1つを含む配列に結合する。いくつかの実施形態では、第1ターゲティング部分は、配列番号75〜86のいずれか1つを含む配列に結合し、第2ターゲティング部分は、配列番号75〜86のいずれか1つを含む配列に結合し、ここで第1及び第2ターゲティング部分は同じ配列に結合する。いくつかの実施形態では、第1ターゲティング部分は、配列番号75〜86のいずれか1つを含む配列に結合し、第2ターゲティング部分は、配列番号75〜86のいずれか1つを含む配列に結合し、ここで第1及び第2ターゲティング部分は異なる配列に結合する。いくつかの実施形態では、第1ターゲティング部分は、配列番号83、203、又は206のいずれかを含む配列に結合し、第2ターゲティング部分は、配列番号77を含む配列に結合する。いくつかの実施形態では、第1ターゲティング部分は、配列番号77を含む配列に結合し、第2ターゲティング部分は、配列番号83、203、又は206のいずれかを含む配列に結合する。いくつかの実施形態では、第1ターゲティング部分は、配列番号8

30

40

50

3、203、又は206のいずれかを含む配列に結合し、第2ターゲティング部分は、配列番号199、204、又は205のいずれかを含む配列に結合する。いくつかの実施形態では、第1ターゲティング部分は、配列番号199、204、又は205のいずれかを含む配列に結合し、第2ターゲティング部分は、配列番号83、203、又は206のいずれかを含む配列に結合する。いくつかの実施形態では、第1ターゲティング部分は、配列番号83、203、又は206のいずれかを含む配列に結合し、第2ターゲティング部分は、配列番号201を含む配列に結合する。いくつかの実施形態では、第1及び第2発現リプレッサーをコードする核酸は、第1発現リプレッサーをコードする第1領域を含み、ここで第1領域は、第2発現リプレッサーをコードする第2領域の上流にある。いくつかの実施形態では、第1及び第2発現リプレッサーをコードする核酸は、第1発現リプレッサーをコードする第1領域を含み、ここで第1領域は、第2発現リプレッサーをコードする第2領域の下流にある。いくつかの実施形態では、第1ターゲティング部分は、配列番号75～86又は199～206のいずれか1つを含む配列に結合し、第2ターゲティング部分（例えば、gRNAを含むCRISPR/Casドメイン）は、配列番号1～4のいずれか1つを含む配列に結合する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、配列番号96～110のいずれか1つを含む配列に結合する。いくつかの実施形態では、第1ターゲティング部分は、配列番号96～110のいずれか1つを含む配列に結合し、第2ターゲティング部分は、配列番号96～110のいずれか1つを含む配列に結合し、ここで第1及び第2ターゲティング部分は同じ配列に結合する。いくつかの実施形態では、第1ターゲティング部分は、配列番号96～110のいずれか1つを含む配列に結合し、第2ターゲティング部分は、配列番号96～110のいずれか1つを含む配列に結合し、ここで第1及び第2ターゲティング部分は異なる配列に結合する。いくつかの実施形態では、第1ターゲティング部分は、配列番号96～110のいずれか1つを含む配列に結合し、第2ターゲティング部分（例えば、gRNAを含むCRISPR/Casドメイン）は、配列番号1～4のいずれか1つを含む配列に結合する。いくつかの実施形態では、第1ターゲティング部分は、表2、表12、又は表13に開示される配列番号のいずれか1つを含む配列に結合し、第2ターゲティング部分（例えば、gRNAを含むCRISPR/Casドメイン）は、表2、表12、又は表13に開示される配列番号のいずれか1つを含む配列に結合する。

【0863】

例示的標的配列を表12に開示する。

【0864】

10

20

30

40

50

【表 6 3】

表12: 例示的標的配列

名称	配列 番号	配列	ゲノム座標
ZF1- KRAB	75	GCTGGAAACCTTGCACCTCGG	GRCh37: chr8:128746267- 128746287
ZF2- KRAB	76	CTGCTGCCAGTAGAGGGCACA	GRCh37: chr8:128746349- 128746369
ZF3- KRAB	77	GCCCAGAGAGGGGGCGGAGGG	GRCh37: chr8:128746405- 128746425
ZF4- KRAB	78	ACGCGGGGAGCAACCAATCGC	GRCh37: chr8:128746455- 128746475
ZF5- KRAB	79	ACTGGCAGCAGAGATCATCGC	GRCh37: chr8:128746339- 128746359
ZF6- KRAB	80	GGGGGCAGGAGCAGGAGCGTC	GRCh37: chr8:128746287- 128746307
ZF7-MQ1	81	CAGCCTTAGCGAGGCGCCCTG	GRCh37: chr8:128747885- 128747905
ZF8-MQ1	82	ACTCACAGGACAAGGATGCGG	GRCh37: chr8:128747990- 128748010

【0 8 6 5】

【表 6 4】

ZF9-MQ1	83	AGCAAAAGAAAATGGTAGGCG	GRCh37: chr8:128748069- 128748089
ZF10-MQ1	84	ACTCAGCCGGGCAGCCGAGCA	GRCh37: chr8:128748143- 128748163
ZF11-MQ1	85	CGTACCAGGCTGCAGGGCGCC	GRCh37: chr8:128747897- 128747917
ZF12-MQ1	86	AGAGTGGAGGAAAGAAGGGTA	GRCh37: chr8:128747829- 128747849
ZF54-KRAB	199	ACGGGGAATGCTGCCGAGAGC	GRCh37: chr8:129188825- 129188845
ZF61-KRAB	200	ACCTGAACCCTGGAAATTATA	GRCh37: chr8:129209866- 129209888
ZF67-KRAB	201	TAGACGGGGAATGCTGCCGAG	GRCh37: chr8:129188822- 129188842
ZF68-KRAB	202	TGACATTGAGCAATGATATGG	GRCh37: chr8:129189024- 129189044
ZF09-MQ1- iPT2A- ZF54- KRAB 標的配列1	203	AGCAAAAGAAAATGGTAGGCG	GRCh37: chr8:128748069- 128748089
ZF09-MQ1- iPT2A- ZF54- KRAB 標的配列2	204	ACGGGGAATGCTGCCGAGAGC	GRCh37: chr8:129188825- 129188845

【0 8 6 6】

10

20

30

40

50

【表 6 5】

ZF54-KRAB-iPT2A-ZF09-MQ1 標的配列1	205	ACGGGGAATGCTGCCGAGAGC	GRCh37: chr8:129188825- 129188845
ZF54-KRAB-iPT2A-ZF09-MQ1 標的配列2	206	AGCAAAAGAAAATGGTAGGCG	GRCh37: chr8:128748069- 128748089

10

【0 8 6 7】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、本明細書に記載の配列、例えば、配列番号 1～4、75～86、96～110、又は 199～206 のいずれか 1 つを有するゲノム遺伝子座に結合する。多くの場合、結合されるゲノム遺伝子座は、二本鎖 DNA を含み、この遺伝子座は、そのセンス鎖又はそのアンチセンス鎖の配列を付与することによって表現され得ることが理解される。従って、所与のスペーサー配列を有する gRNA は、発現リプレッサーを特定のゲノム遺伝子座に結合させることができ、ここで、ゲノム遺伝子座の一方の鎖は、スペーサー配列と類似又は同一の配列を有し、ゲノム遺伝子座の他方の鎖は、相補配列を有する。典型的には、gRNA とゲノム遺伝子座との結合は、ゲノム遺伝子座の一部の巻き戻し及び gRNA スペーサーとスペーサーが相補的である鎖との対合を伴うことになる。

20

【0 8 6 8】

いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、マウスゲノムにおけるアンカー配列、例えば、標的遺伝子、例えば、MYC に近接したアンカー配列、又は標的遺伝子、例えば、MYC に作動可能に連結したアンカー配列媒介接合部 (ASMC) に関連するアンカー配列に結合する (例えば、接合部を破壊すると標的遺伝子、例えば、MYC の発現が変化する場合、アンカー配列媒介接合部は標的遺伝子、例えば、MYC に作動可能に連結している)。一般に、アンカー配列は、ゲノム複合体成分、例えば、核形成ポリペプチドが特異的に結合するゲノム配列エレメントである。いくつかの実施形態では、ゲノム複合体成分がアンカー配列に結合すると、それが複合体形成、例えば、ASMC 形成の核となる。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、標的遺伝子、例えば、MYC 遺伝子座に結合する。遺伝子座とは、概して、転写領域、プロモータ、及び標的遺伝子、例えば、MYC を含む ASMC のアンカー部位を包含すると定義される。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、配列番号 190～192 のいずれか 1 つを含む配列に結合する。いくつかの実施形態では、ターゲティング部分は、表 18 に開示される配列番号のいずれか 1 つを含む配列に結合する。マウスゲノムにおける例示的標的配列を表 18 に開示する。

30

【0 8 6 9】

40

50

【表 6 6】

表18: マウスゲノムにおける例示的標的配列

名称	配列番号	配列	ゲノム座標
ZF15-MQ1	190	AACACAGTTCAGCCGAGCGCT	GRCm38: chr15:61985053- 61985073
ZF16-MQ1	191	CGAACAACCGTACAGAAAGGG	GRCm38: chr15:61985079- 61985099
ZF17-MQ1	192	GTAAACAGTAATAGCGCAGCA	GRCm38: chr15:61985151- 61985171

10

【0870】

20

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、本明細書に示される配列、例えば、配列番号190～192のいずれか1つを有するゲノム遺伝子座に結合する。多くの場合、結合を受けるゲノム遺伝子座は二本鎖DNAを含み、この遺伝子座は、そのセンス鎖又はそのアンチセンス鎖の配列を与えることによって表記し得ることが理解される。

【0871】

一実施形態では、アンカー配列媒介接合部は、染色体内ループなど、ループを含む。特定の実施形態では、アンカー配列媒介接合部は複数のループを有する。1つ以上のループが、第1アンカー配列、核酸配列、転写制御配列、及び第2アンカー配列を含み得る。別の実施形態では、少なくとも1つのループが、順番に、第1アンカー配列、転写制御配列、及び第2アンカー配列、又は第1アンカー配列、核酸配列、及び第2アンカー配列を含む。さらに別の実施形態では、核酸配列及び転写制御配列のいずれか一方又は両方が、ループの中又は外側に位置する。なおも別の実施形態では、ループの1つ以上が転写制御配列を含む。

30

【0872】

いくつかの実施形態では、アンカー配列媒介接合部は、TATAボックス、CAATボックス、GCボックス、又はCAP部位を含む。いくつかの実施形態では、アンカー配列媒介接合部は複数のループを含み、ここでアンカー配列媒介接合部は、ループの1つ以上に、アンカー配列、核酸配列、及び転写制御配列のうちの少なくとも1つを含む。

【0873】

いくつかの実施形態では、アンカー配列内の1つ以上のヌクレオチドの置換、付加、又は欠失によってクロマチン構造が修飾される。いくつかの実施形態では、アンカー配列媒介接合部のアンカー配列内の1つ以上のヌクレオチドの置換、付加、又は欠失によってクロマチン構造が修飾される。いくつかの実施形態では、活性化型ループを含めるか、又は抑制性ループを除くことによって転写が阻害される。一つのかかる実施形態では、アンカー配列媒介接合部から、核酸配列の転写を低減する転写制御配列が除かれる。いくつかの実施形態では、抑制性ループを含めるか、又は活性化型ループを除くことによって転写が抑制される。一つのかかる実施形態では、アンカー配列媒介接合部には、核酸配列の転写を低減する転写制御配列が含まれる。

40

【0874】

アンカー配列は互いに隣接していなくてもよい。隣接していないアンカー配列の実施形

50

態において、第1アンカー配列は第2アンカー配列と約500bp～約500Mb、約750bp～約200Mb、約1kb～約100Mb、約25kb～約50Mb、約50kb～約1Mb、約100kb～約750kb、約150kb～約1500kb、又は約175kb～約500kbだけ離れていてもよい。いくつかの実施形態では、第1アンカー配列は第2アンカー配列と約500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1kb、5kb、10kb、15kb、20kb、25kb、30kb、35kb、40kb、45kb、50kb、55kb、60kb、65kb、70kb、75kb、80kb、85kb、90kb、95kb、100kb、125kb、150kb、175kb、200kb、225kb、250kb、275kb、300kb、350kb、400kb、500kb、600kb、700kb、800kb、900kb、1Mb、2Mb、3Mb、4Mb、5Mb、6Mb、7Mb、8Mb、9Mb、10Mb、15Mb、20Mb、25Mb、50Mb、75Mb、200Mb、300Mb、400Mb、500Mb、又はこれらの間の任意のサイズだけ離れている。

10

【0875】

いくつかのさらなる実施形態では、ターゲティング部分は、以下のうちの少なくとも1つを導入する：少なくとも1つの外因性アンカー配列；接合部核形成分子に対する結合親和性を変化させることによるなどの、少なくとも1つの接合部核形成分子結合部位の変化；CTCF結合モチーフ、YY1結合モチーフ、ZNF143結合モチーフ、又は本明細書において言及される他の結合モチーフなど、少なくとも1つの共通のヌクレオチド配列の向きの変更；及びCTCF結合モチーフ、YY1結合モチーフ、ZNF143結合モチーフ、又は本明細書において言及される他の結合モチーフなど、少なくとも1つのアンカー配列における置換、付加又は欠失。

20

【0876】

いくつかの実施形態では、アンカー配列は、核形成ポリペプチド結合モチーフ、例えば、CTCF-結合モチーフ：

N (T/C/G) N (G/A/T) C C (A/T/G) (C/G) (C/T/A) A G (G/A) (G/T) G G (C/A/T) (G/A) (C/G) (C/T/A) (G/A/C) (配列番号71) (Nは、任意のヌクレオチドである)

を含む。

【0877】

CTCF-結合モチーフはまた、逆配向、例えば、

(G/A/C) (C/T/A) (C/G) (G/A) (C/A/T) G G (G/T) (G/A) G A (C/T/A) (C/G) (A/T/G) C C (G/A/T) N (T/C/G) N (配列番号72) (Nは、任意のヌクレオチドである)

であってもよい。

【0878】

いくつかの実施形態では、アンカー配列は、配列番号71若しくは配列番号72又は配列番号71若しくは配列番号72のいずれかに対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%同一の配列を含む。

40

【0879】

いくつかの実施形態では、アンカー配列は、核形成ポリペプチド結合モチーフ、例えば、YY1結合モチーフ：CCGCCATNTT (配列番号73) を含み、ここで、Nは、任意のヌクレオチドである。

【0880】

YY1結合モチーフはまた、反対の配向、例えば、AANATGGCGG (配列番号74) であってもよく、ここで、Nは、任意のヌクレオチドである。

【0881】

いくつかの実施形態では、アンカー配列媒介接合部は、少なくとも第1アンカー配列と第2アンカー配列とを含む。例えば、いくつかの実施形態では、第1アンカー配列及び第

50

2 アンカー配列は、各々が核形成ポリペプチド結合モチーフを含んでもよく、例えば、各々がCTCF結合モチーフを含む。

【0882】

いくつかの実施形態では、第1アンカー配列と第2アンカー配列とは異なる配列を含み、例えば、第1アンカー配列がCTCF結合モチーフを含み、第2アンカー配列がCTCF結合モチーフ以外のアンカー配列を含む。いくつかの実施形態では、各アンカー配列は、核形成ポリペプチド結合モチーフと、核形成ポリペプチド結合モチーフの片側又は両側にある1つ以上のフランキングヌクレオチドとを含む。

【0883】

ASMCを形成することのできる2つのCTCF結合モチーフ（例えば、隣接している、又は隣接していないCTCF結合モチーフ）は、ゲノム中に任意の向きで、例えば、5'→3'（左タンデム、例えば、配列番号71を含む2つのCTCF結合モチーフ）又は3'→5'（右タンデム、例えば、2つのCTCF結合モチーフは配列番号72を含む）のいずれかの同じ向きで（タンデム）、又は一つのCTCF結合モチーフが配列番号71を含み、且つもう一つの他方が配列番号72を含むようなコンバージェントの向きで存在し得る。

10

【0884】

いくつかの実施形態では、アンカー配列は、標的遺伝子（例えば、MYC）に関連するCTCF結合モチーフを含み、ここで、上記標的遺伝子は、疾患、障害及び／又は病態、例えば、MYC誤調節障害、例えば、肝障害、（例えば、肝細胞癌）又は肺癌に関連する。

20

【0885】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、例えば、クロマチン構造の修飾によるか、アンカー配列内、例えば、核形成ポリペプチド結合モチーフ内の1つ以上のヌクレオチドの置換、付加、又は欠失により、ゲノム複合体（例えば、ASMC）を調節する、例えば、破壊することを含む。1つ以上のヌクレオチドが特異的標的となってもよく、例えば、アンカー配列内、例えば、核形成ポリペプチド結合モチーフ内の置換、付加又は欠失の標的となる変化であり得る。

【0886】

いくつかの実施形態では、ゲノム複合体（例えば、ASMC）は、少なくとも1つの核形成ポリペプチド結合モチーフの向きを変えることにより変化させてもよい。いくつかの実施形態では、アンカー配列は、核形成ポリペプチド結合モチーフ、例えば、CTCF結合モチーフを含み、ターゲティング部分が少なくとも1つの核形成ポリペプチド結合モチーフに変化を導入し、例えば、核形成ポリペプチドに対する結合親和性を変化させる。

30

【0887】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサー又はシステムの投与前、標的遺伝子、例えば、MYCは、例えば、罹患した状態にある、定義付けられた発現状態を呈する。例えば、標的遺伝子、例えば、MYCは、疾患細胞において高度な発現を呈し得る。アンカー配列媒介接合部を破壊することにより、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を低減し得る。

40

【0888】

本明細書に記載の発現抑制システムの発現リプレッサーでの使用に適したターゲティング部分は、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、若しくは50ヌクレオチド又は塩基対（並びに任意選択で多くとも50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、若しくは10ヌクレオチド又は塩基対）を含む部位に結合することができ、例えば、それ

50

に特異的に結合し得る。いくつかの実施形態では、DNAターゲティング部分は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、若しくは50ヌクレオチド又は塩基対を含む部位に結合する。

【0889】

本開示の発現抑制システムは、2つ以上の発現リプレッサーを含み得る。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーシステムの発現リプレッサーは各々、異なるターゲティング部分を含む。

【0890】

いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、標的遺伝子、例えば、エキソン、イントロン、又はエキソンイントロン境界（例えば、スプライス部位）に結合するターゲティング部分を含む第1発現リプレッサーと、標的遺伝子、例えば、エキソン、イントロン、又はエキソンイントロン境界（例えば、スプライス部位）に結合するターゲティング部分を含む第2発現リプレッサーとを含む。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、標的遺伝子、例えば、エキソン、イントロン、又はエキソンイントロン境界（例えば、スプライス部位）に結合するターゲティング部分を含む第1発現リプレッサーと、標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結した転写制御エレメント（例えば、プロモータ又はエンハンサー）に結合するターゲティング部分を含む第2発現リプレッサーとを含む。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、標的遺伝子と作動可能に連結した転写制御エレメント（例えば、プロモータ又はエンハンサー）に結合するターゲティング部分を含む第1発現リプレッサーと、標的遺伝子と作動可能に連結した転写制御エレメント（例えば、プロモータ又はエンハンサー）に結合するターゲティング部分を含む第2発現リプレッサーとを備える。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、標的遺伝子、例えば、MYCに近接しているか、又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結したアンカー配列媒介コンジュゲーションに関連するアンカー配列に結合するターゲティング部分を含む第1発現リプレッサーと、標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結した転写制御エレメント（例えば、プロモータ又はエンハンサー）に結合するターゲティング部分を含む第2発現リプレッサーとを含む。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、標的遺伝子、例えば、MYCに近接しているか、又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結したアンカー配列媒介コンジュゲーションに関連するアンカー配列に結合するターゲティング部分を含む第1発現リプレッサーと、標的遺伝子（例えば、MYC）、例えば、エキソン、イントロン、又はエキソンイントロン境界（例えば、スプライス部位）に結合するターゲティング部分を含む第2発現リプレッサーとを含む。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、標的遺伝子、例えば、MYCに近接しているか、又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結したアンカー配列媒介コンジュゲーションに関連するアンカー配列に結合するターゲティング部分を含む第1発現リプレッサーと、標的遺伝子、例えば、MYCに近接しているか、又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結したアンカー配列媒介コンジュゲーションに関連するアンカー配列に結合するターゲティング部分を含む第2発現リプレッサーとを含む。

【0891】

いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、例えば、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結したプロモータ中の、第1部位に結合するターゲティング部分を含む第1発現リプレッサーと、例えば、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結したプロモータ中の、第2部位に結合するターゲティング部分を含む第2発現リプレッサーとを含む。第1部位及び第2部位は、重複のない異なる部位であってもよく、例えば、第1部位及び第2部位はいかなる共通する配列も共有しない。第1部位と第2部位とは、異なるが、重複のある部位であってもよく、例えば、第1部位と第2部位とは異なる配列を含むが、一部の配列を共通して共有する。

【0892】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子はMYCである。いくつかの実施形態では、MYCは、ヒト8番染色体に位置する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のとおり発現リプレッサー (expressor repressor) 又は発現リプレッサーシステムは、MYCの転写開始部位 (TSS) に結合する。

【0893】

他の組成物

核酸及びベクター

本開示はさらに、一部には、本明細書に記載の発現リプレッサー又は発現抑制システムをコードする核酸に関する。いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、発現リプレッサーをコードする核酸を含む組成物によって提供されてもよく、ここで、上記核酸は、目的の系において (例えば、特定の細胞、組織、生物等において) 発現リプレッサーの発現を実現するのに十分な他の配列と会合している。いくつかの実施形態では、発現抑制システムは、発現抑制システム、例えば、発現抑制システムの1つ又は複数の発現リプレッサーをコードする核酸を含む組成物によって提供されてもよく、ここで、上記核酸は、目的の系において (例えば、特定の細胞、組織、生物等において) 発現抑制システム、例えば、発現抑制システムの1つ又は複数の発現リプレッサーの発現を実現するのに十分な他の配列と会合している。

10

【0894】

一部の詳細な実施形態では、本開示は、発現リプレッサー又はそのポリペプチド部分をコードする核酸の組成物を提供する。一部のかかる実施形態では、提供される核酸は、DNA、RNA、又は本明細書に記載のとおり任意の他の核酸部分若しくは実体であるか、又はそれを含んでもよく、本明細書に記載の、又はその他、当技術分野で利用可能な任意の技術 (例えば、合成、クローニング、増幅、インビトロ又はインビボ転写等) によって調製し得る。いくつかの実施形態では、発現リプレッサー又はそのポリペプチド部分をコードする提供される核酸は、目的の系において (例えば、特定の細胞、組織、生物等において) 提供される核酸の組込み、複製、及び／又は発現を実現するのに適切な及び／又は十分な1つ以上の複製、組込み、及び／又は発現シグナルと作動可能に会合していてもよい。

20

【0895】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサーを送達するための組成物は、本明細書に記載のとおり発現リプレッサー又は発現リプレッサーの1つ以上の成分をコードする1つ以上の核酸を含むベクター、例えば、ウイルスベクターであるか、又はそれを含む。

30

【0896】

一部の詳細な実施形態では、本開示は、発現抑制システム、1つ以上の発現リプレッサー、又はそのポリペプチド部分をコードする核酸の組成物を提供する。一部のかかる実施形態では、提供される核酸は、DNA、RNA、又は本明細書に記載のとおり任意の他の核酸部分若しくは実体であるか、又はそれを含んでもよく、本明細書に記載の、又はその他、当技術分野で利用可能な任意の技術 (例えば、合成、クローニング、増幅、インビトロ又はインビボ転写等) によって調製し得る。いくつかの実施形態では、発現抑制システム、1つ以上の発現リプレッサー、又はそのポリペプチド部分をコードする提供される核酸は、目的の系において (例えば、特定の細胞、組織、生物等において) 提供される核酸の組込み、複製、及び／又は発現を実現するのに適切な及び／又は十分な1つ以上の複製、組込み、及び／又は発現シグナルと作動可能に会合していてもよい。

40

【0897】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現抑制システムを送達するための組成物は、発現抑制システムの1つ以上の成分、例えば、本明細書に記載のとおり発現抑制システムの1つ又は複数の発現リプレッサーをコードする1つ以上の核酸を含むベクター、例えば、ウイルスベクターであるか、又はそれを含む。

【0898】

50

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサーを送達するための組成物は、本明細書に記載のとおり、発現リプレッサー又は発現リプレッサーの1つ以上の成分をコードする1つ以上の核酸を含むRNA、例えば、mRNAであるか、又はそれを含む。

【0899】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現抑制システムを送達するための組成物は、発現抑制システムの1つ以上の成分、例えば、本明細書に記載のとおり、発現抑制システムの1つ又は複数の発現リプレッサーをコードする1つ以上の核酸を含むRNA、例えば、mRNAであるか、又はそれを含む。

【0900】

本明細書に記載のような核酸又は本明細書に記載のタンパク質をコードする核酸は、ベクター中に組み込まれてもよい。ベクター、例えばレンチウイルスなどのレトロウイルス由来のものは、導入遺伝子の長期の安定な組込み及び娘細胞におけるその増殖を可能にすることから、長期遺伝子導入を達成するために好適なツールである。ベクターの例として、発現ベクター、複製ベクター、プロンプト生成ベクター、及び配列決定ベクターが挙げられる。発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に提供されてもよい。ウイルスベクター技術は、当該技術分野で周知であり、種々のウイルス学及び分子生物学のマニュアルに説明されている。ベクターとして有用であるウイルスとして、限定はされないが、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、及びレンチウイルスが挙げられる。一般に、好適なベクターは、少なくとも1つの生物において機能的な複製起点、プロモーター配列、便宜的な制限エンドヌクレアーゼ部位、及び1以上の選択可能マーカーを有する。

【0901】

天然又は合成核酸の発現は、典型的には目的の遺伝子をコードする核酸をプロモーターに作動可能に連結し、構築物を発現ベクターに組み込むことにより達成される。ベクターは、真核生物における複製及び組み込みに適し得る。典型的なクロニングベクターは、所望される核酸配列の発現にとって有用な転写及び翻訳ターミネーター、開始配列、並びにプロモーターを有する。

【0902】

追加的なプロモーター領域、例えば増強配列は、転写開始の頻度を調節してもよい。典型的には、これらの配列は転写開始部位の30～110bp上流の領域内に位置するが、近年、いくつかのプロモーターが同様に転写開始部位の下流に機能的要素を有することが示されている。

【0903】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の発現リプレッサー又はシステムは、増強配列において作用する。いくつかの実施形態では、増強配列は、エンハンサー、ストレッチエンハンサー、シャドウエンハンサー、遺伝子座制御領域(LCR)、又はスーパーエンハンサーである。いくつかの実施形態では、スーパーエンハンサーは、エンハンサー及び他の調節エレメントのクラスターを含む。いくつかの実施形態では、これらの配列は、転写開始部位から0.2～2Mb上流又は下流の領域に位置する。いくつかの実施形態では、この領域は、非コード領域である。いくつかの実施形態では、この領域には、癌を発症するリスクが高くなることに関連する少なくとも1つのSNPが含まれる。いくつかの実施形態では、この領域は、標的遺伝子、例えば、MYCの長距離調節に関連する。いくつかの実施形態では、この領域は、細胞型特異的である。いくつかの実施形態では、スーパーエンハンサーは、標的遺伝子プロモーター、例えば、MYCプロモーターを動員することによって標的遺伝子発現、例えば、MYC発現を修飾する(例えば、増加又は減少させる)。いくつかの実施形態では、スーパーエンハンサーは、標的遺伝子プロモーター、例えば、MYCプロモーターとエンハンサードッキング部位を通じて相互作用する。いくつかの実施形態では、エンハンサードッキング部位は、アンカー配列である。いくつかの実施形態では、エンハンサードッキング部位は、標的遺伝子プロモーター、例えば、MYCプロモーター

10

20

30

40

50

から少なくとも100bp、200bp、500bp、1000bp、1500bp、2000bp、又は3000bp離れた所に位置する。いくつかの実施形態では、スーパーエンハンサー領域は、少なくとも100bp、少なくとも200bp、少なくとも300bp、少なくとも500bp、少なくとも1kb、少なくとも2kb、少なくとも3kb、少なくとも5kb、少なくとも10kb、少なくとも15kb、少なくとも20kb、又は少なくとも25kb長である。

【0904】

プロモータ領域間のスペーシングはフレキシブルであることが多いことから、プロモータ機能は、領域が互いに対して反転又は移動されるとき、保存される。チミジンキナーゼ (tk) プロモータでは、プロモータ領域間のスペーシングは、活性が低下し始める前に50bp離れるまで増加し得る。プロモータに応じて、転写を活性化するため、各領域が協同的又は非依存的に機能し得るように思われる。

【0905】

好適なプロモータの一例が、最初期サイトメガロウイルス (CMV) プロモータ配列である。このプロモータ配列は、それに作動可能に連結された任意のポリヌクレオチド配列の発現を高レベルで駆動する能力がある強力な構成的プロモータ配列である。いくつかの実施形態では、好適なプロモータが伸長成長因子-1 α (EF-1 α) である。しかし、他の構成的プロモータ配列、例えば限定はされないが、サルウイルス40 (SV40) 初期プロモータ、マウス乳腺腫瘍ウイルス (MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 長末端リピート (LTR) プロモータ、MoMuLVプロモータ、トリ白血病ウイルスプロモータ、エプスタイン・バーウイルス最初期プロモータ、ラウス肉腫ウイルスプロモータ、並びにヒト遺伝子プロモータ、例えば限定はされないが、アクチンプロモータ、ミオシンプロモータ、ヘモグロビンプロモータ、及びクレアチンキナーゼプロモータも使用されてもよい。

【0906】

本開示は、任意の特定のプロモータ又はプロモータのカテゴリ (例えば構成的プロモータ) の使用に限定されるように解釈されるべきではない。例えば、いくつかの実施形態では、誘導性プロモータが本開示の一部として検討される。いくつかの実施形態では、誘導性プロモータの使用により、それが作動可能に連結される対象のポリヌクレオチド配列の発現を、かかる発現が所望されるときに活性化する能力がある分子スイッチが提供される。いくつかの実施形態では、誘導性プロモータの使用により、発現を、所望されないうきに不活性化する能力がある分子スイッチが提供される。誘導性プロモータの例として、限定はされないが、メタロチオニンプロモータ、グルココルチコイドプロモータ、プロゲステロンプロモータ、及びテトラサイクリンプロモータが挙げられる。

【0907】

いくつかの実施形態では、導入されるべき発現ベクターはまた、ウイルスベクターを介してトランスフェクト又は感染されることが探求された細胞の集団から細胞を発現する同定及び選択を促進するため、選択可能マーカー遺伝子若しくはレポーター遺伝子のいずれか又は双方を有し得る。いくつかの態様では、選択可能マーカーは、DNAの分離片に対して実施され、同時トランスフェクション法において使用されてもよい。宿主細胞内での発現を可能にするため、選択可能マーカーとレポーター遺伝子の双方は、適切な転写調節配列と隣接されてもよい。有用な選択可能マーカーは、例えば抗生物質耐性遺伝子、例えばneoなどを含んでもよい。

【0908】

いくつかの実施形態では、潜在的にトランスフェクトされた細胞を同定するため、且つ／又は転写調節配列の機能性を評価するため、レポーター遺伝子が使用されてもよい。一般に、レポーター遺伝子は、(レポーター遺伝子の) レシピエント供給源中に存在しないか又はそれによって発現され、且ついくつかの容易に検出可能な特性、例えば酵素活性又は可視化可能な蛍光により発現が明らかにされるようなポリペプチドをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、DNAがレシピエント細胞に導入されてからの好適

な時点でアッセイされる。好適なレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ、 β ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌されたアルカリホスファターゼをコードする遺伝子、又は緑色蛍光タンパク質遺伝子（例えば、U i - T e i e t a l . , 2 0 0 0 F E B S L e t t e r s 4 7 9 : 7 9 - 8 2 ）を含んでもよい。好適な発現系は、周知であり、公知の技術を用いて調製されるか又は商業的に得られてもよい。一般に、レポーター遺伝子の最高レベルでの発現を示す最小の5'隣接領域を有する構築物は、プロモータとして同定される。かかるプロモータ領域は、レポーター遺伝子に連結され、薬剤のプロモータ駆動転写を調節する能力について評価するため、使用されてもよい。

【0909】

10

細胞

本開示はさらに、一部には、本明細書に記載の発現リプレッサー又は発現抑制システムを含む細胞に関する。当業者には周知である任意の細胞、例えば、細胞株、例えば、組換えポリペプチドの発現に適した細胞株は、本明細書に記載の発現リプレッサー又は発現抑制システムを含有するのに好適である。いくつかの実施形態では、細胞、例えば、細胞株を用いて、本明細書に記載の発現リプレッサー又は発現抑制システム、例えば、発現リプレッサーを発現させることができる。いくつかの実施形態では、細胞、例えば、細胞株を用いて、本明細書に記載の発現リプレッサー又は発現抑制システム、例えば、発現リプレッサーをコードする核酸、例えば、ベクターを発現又は増幅させることができる。いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載の発現リプレッサー又は発現抑制システム、例えば、発現リプレッサーをコードする核酸を含む。

20

【0910】

いくつかの実施形態では、細胞は、発現抑制システムの第1成分、例えば、第1発現リプレッサーをコードする第1核酸と、発現抑制システムの第2成分、例えば、第2発現リプレッサーをコードする第2核酸を含む。細胞が、2つ以上の発現リプレッサーを含む発現抑制システムをコードする核酸を含むいくつかの実施形態では、各発現リプレッサーをコードする配列は、個別の核酸分子上、例えば、異なるベクター上、例えば、第1発現リプレッサーをコードする第1ベクター及び第2発現リプレッサーをコードする第2ベクター上に配置される。いくつかの実施形態では、各発現リプレッサーをコードする配列は、同じ核酸分子上、例えば、同じベクター上に配置される。いくつかの実施形態では、発現抑制システムをコードする核酸の一部又は全部が細胞のゲノムDNAに組み込まれる。いくつかの実施形態では、発現抑制システムの第1発現リプレッサーをコードする核酸は、細胞のゲノムDNAに組み込まれ、発現抑制システムの第2発現リプレッサーをコードする核酸は、細胞のゲノムDNAに組み込まれない（例えば、ベクター上に位置する）。いくつかの実施形態では、発現抑制システムの第1及び第2発現リプレッサーをコードする核酸は、細胞のゲノムDNAに、例えば、ゲノムDNA中の同じ（例えば、隣接若しくは共局在した）又は異なる部位に組み込まれる。

30

【0911】

本明細書に記載される発現抑制システム又は発現リプレッサーを含み得る及び／又は発現し得る細胞の例としては、肝細胞、神経細胞、内皮細胞、筋細胞、及びリンパ球が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0912】

本開示はさらに、一部には、本明細書に記載の方法又はプロセスによって作成される細胞に関する。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載の発現リプレッサー又は発現抑制システムを提供すること、細胞を提供すること、及び細胞を発現リプレッサー（又は発現リプレッサーをコードする核酸、又は前記発現リプレッサー若しくは核酸を含む組成物）又は発現抑制システム（又は発現抑制システムをコードする核酸、又は前記発現抑制システム若しくは核酸を含む組成物）と接触させることによって作製される細胞を提供する。いくつかの実施形態では、細胞を発現リプレッサーと接触させることは、細胞が発現リプレッサーを産生することを許容する条件下で、細胞を、発現リプレッサーをコ

50

ードする核酸と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞を発現リプレッサーと接触させることは、細胞が発現リプレッサーを産生することを許容する条件下で、細胞を含む生物を、発現リプレッサー又は発現リプレッサーをコードする核酸と接触させることを含む。

【0913】

理論によって拘束されることを望むものではないが、本明細書に記載の発現リプレッサー又は発現抑制システムと接触させる細胞は、発現リプレッサー又は発現抑制システムを接触させていない同様の細胞と比較して、標的遺伝子（例えば、MYC）の発現の減少及び／又は標的遺伝子、例えば、MYCに関連するエピジェネティックマーカー、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した転写制御エレメント、又は標的遺伝子に近接した、若しくは標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結したアンカー配列媒介接合部に関連するアンカー配列の修飾を呈し得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子、例えば、MYCの発現の前記減少及び／又はエピジェネティックマーカーの修飾を呈する細胞は、発現リプレッサー又は発現抑制システムを含まない。発現の減少及び／又はエピジェネティックマーカーの修飾は、例えば、発現リプレッサー又は発現抑制システムと接触させた後に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、又は24時間、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、10、又は14日、又は少なくとも1、2、3、4、又は5週間、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12ヵ月、又は少なくとも1、2、3、4、又は5年にわたって（例えば、無限に）持続し得る。

10

20

【0914】

いくつかの実施形態では、発現リプレッサー又は発現抑制システムを予め接触させた細胞は、発現リプレッサー又は発現抑制システムがもはや細胞に存在しなくなった後も、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、又は24時間、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、10、又は14日、又は少なくとも1、2、3、4、又は5週間、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12ヵ月、又は少なくとも1、2、3、4、又は5年にわたって（例えば、無限に）発現リプレッサー又は発現抑制システムがもはや細胞に存在しなくなった後も発現の減少及び／又はエピジェネティックマーカーの修飾を保持している。

30

【0915】

発現抑制システム及び／又は発現リプレッサーの製造方法

いくつかの実施形態では、発現リプレッサーは、タンパク質を含むか、又はタンパク質であり、従って、タンパク質を作製する方法によって産生され得る。いくつかの実施形態では、発現抑制システム、例えば、発現抑制システムの発現リプレッサーは、1つ以上のタンパク質を含み、従って、タンパク質を作製する方法によって生産され得る。当業者には理解されるように、タンパク質又はポリペプチド（本明細書に記載の調節剤に含有され得る）を作製する方法は、当技術分野で常用的である。概要については、以下：Smal es & James (Eds.), Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press (2005); 及び Crommelin, Sindelar & Meibohm (Eds.), Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications, Springer (2013) を参照されたい。

40

【0916】

本開示の組成物のタンパク質又はポリペプチドは、標準的な固相技術を用いて生化学的に合成することができる。こうした方法としては、排他的固相合成、部分的固相合成方法、フラグメント凝縮、古典的溶液合成が挙げられる。これらの方法は、ペプチドが比較的短い（例えば、10 kDa）場合、且つ／又はそれを組換え技術により生産することがで

50

きない（即ち、核酸配列によりコードされない）ため、別の化学を必要とする場合に使用することができる。

【0917】

固相合成法は、当技術分野で公知であり、John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, Solid Phase Peptide Syntheses, 2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984; 及び Coin, I., et al., Nature Protocols, 2: 3247-3256, 2007により詳しく記載されている。

【0918】

より長いペプチドの場合、組換え法を使用することができる。組換え治療用ポリペプチドを作製する方法は、当技術分野において常用的である。概要については、以下: Smalles & James (Eds.), Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press (2005); 及び Crommelin, Sindelar & Meibohm (Eds.), Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications, Springer (2013)を参照されたい。

【0919】

治療薬用タンパク質又はポリペプチドを生産する例示的な方法は、哺乳動物細胞における発現を含むが、適切なプロモータの制御下で、昆虫細胞、酵母、細菌、又は他の細胞を用いて組換えタンパク質を生産することもできる。哺乳動物発現ベクターは、非転写エレメント、例えば、複製起点、好適なプロモータ、並びに他の5'又は3'フランキング非転写配列、及び5'又は3'非翻訳配列、例えば、必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー及びアクセプター部位、並びに終結配列を含み得る。異種DNA配列の発現に必要な他の遺伝子エレメントを取得するために、SV40ウイルスゲノム由来のDNA配列、例えば、SV40起点、初期プロモータ、スプライス、及びポリアデニル化部位を用いてもよい。細菌、真菌、酵母、及び哺乳動物細胞宿主と共に使用するのに適したクローニング及び発現ベクターは、以下: Green & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012)に記載されている。

【0920】

多量のタンパク質又はポリペプチドが要望される場合には、以下: Brian Bray, Nature Reviews Drug Discovery, 2: 587-593, 2003; 及び Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463に記載されるような技術を用いて、それを生成することができる。

【0921】

様々な哺乳動物細胞培養システムを使用して、組換えタンパク質を発現させ、製造することができる。哺乳動物発現システムの例として、CHO細胞、COS細胞、HeLa及びBHK細胞株が挙げられる。タンパク質治療薬生産のための宿主細胞培養のプロセスは、Zhou and Kantardjiev (Eds.), Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology), Springer (2014)に記載されている。本明細書に記載される組成物は、組換えタンパク質をコードするベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターを含有してもよい。いくつかの実施形態では、ベクター、例えば、ウイルスベクターは、組換えタンパク質をコードする核酸を含み得る。本明細書に記載の組成物は、組換えタンパク質をコードするベクター、例えば、ウイルスベ

クター、例えば、レンチウイルスベクターを封入する脂質ナノ粒子を含み得る。いくつかの実施形態では、ベクターを封入する脂質ナノ粒子、例えば、ウイルスベクターは、組換えタンパク質をコードする核酸を含んでもよい。

【0922】

タンパク質治療薬の精製については、Franks, Protein Biotechnology: Isolation, Characterization, and Stabilization, Humana Press (2013); 及び Cutler, Protein Purification Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press (2010) に記載されている。タンパク質治療薬の製剤化については、Meyer (Ed.), The Therapeutic Protein Drug Products: Practical Approaches to Formulation in the Laboratory, Manufacturing, and the Clinic, Woodhead Publishing Series (2012) に記載されている。

10

【0923】

タンパク質は、1つ又は複数のアミノ酸を含む。アミノ酸は、例えば、1つ又は複数のペプチド結合を介して、ポリペプチド鎖に組み込むことができる任意の化合物及び／又は物質を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、一般的な構造： $H_2N-C(H)(R)-COOH$ を有する。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、天然に存在するアミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、非天然アミノ酸であり；いくつかの実施形態では、アミノ酸は、D-アミノ酸であり；いくつかの実施形態では、アミノ酸は、L-アミノ酸である。「標準アミノ酸」とは、天然に存在するペプチドに共通して存在する20の標準L-アミノ酸のいずれかを指す。「非標準アミノ酸」とは、それが合成により調製されたか、又は天然供給源から得られたかにかかわらず、標準アミノ酸以外のあらゆるアミノ酸を指す。いくつかの実施形態では、ポリペプチド中のカルボキシー及び／又はアミノ末端アミノ酸を含め、アミノ酸は、上の一般的な構造と比較して、構造修飾を含んでもよい。例えば、いくつかの実施形態では、アミノ酸は、一般的な構造と比較して、（例えば、アミノ基、カルボン酸基、1つ若しくは複数のプロトン、及び／又はヒドロキシル基の）メチル化、アミド化、アセチル化、ペグ化、グリコシル化、リン酸化、及び／又は置換により修飾されていてもよい。いくつかの実施形態では、こうした修飾は、例えば、そうでなければ同じ非修飾アミノ酸を含有するものと比較して、修飾アミノ酸を含有するポリペプチドの循環半減期を変更し得る。いくつかの実施形態では、こうした修飾は、そうでなければ同じ非修飾アミノ酸を含有するものと比較して、修飾アミノ酸を含有するポリペプチドの関連活性を有意に変更しない。文脈から明らかになるように、いくつかの実施形態では、用語「アミノ酸」は、遊離アミノ酸を示すために使用される場合もあり；いくつかの実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸残基を示すために使用される場合もある。

20

30

【0924】

医薬組成物、製剤、送達、及び投与

本開示はさらに、一部には、本明細書に記載の発現リプレッサー若しくは発現抑制システム、例えば、発現リプレッサーを含む医薬組成物、本明細書に記載の発現リプレッサー若しくは発現抑制システム、例えば、発現リプレッサーをコードする核酸を含む医薬組成物、並びに／又は本明細書に記載の発現リプレッサー若しくは発現抑制システム、例えば、発現リプレッサーを細胞、組織、器官、及び／若しくは対象に送達する組成物に関する。

40

【0925】

本明細書で用いられるとき、用語「医薬組成物」は、1つ又は複数の薬学的に許容できる担体（例えば、業者に公知の薬学的に許容できる担体）と一緒に製剤化された活性薬剤（例えば、発現リプレッサー又は発現受容体の核酸、例えば、発現抑制システム、例えば、発現リプレッサーシステムの発現リプレッサー、又はそれをコードする核酸）を指す。

50

いくつかの実施形態では、活性薬剤は、関連集団に投与されると、予定された治療効果を達成する統計的に有意な確率を示す治療レジメンでの投与に適した単位用量で存在する。いくつかの実施形態では、本開示の発現リプレッサーを含む医薬組成物は、発現リプレッサー又はそれをコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、本開示の発現抑制システムを含む医薬組成物は、発現抑制システムの発現リプレッサー又はそれをコードする核酸の各々を含む（例えば、発現抑制システムが、第1発現リプレッサーと第2発現リプレッサーを含む場合、医薬組成物は第1及び第2発現リプレッサーを含む）。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、複数の発現リプレッサーを含む発現抑制システムの全ての発現リプレッサーよりも少ない発現リプレッサーを含む。例えば、発現抑制システムは、第1発現リプレッサー及び第2発現リプレッサーを含むことができ、第1医薬組成物は、第1発現リプレッサー又はそれをコードする核酸を含み得ると共に、第2医薬組成物は、第2発現リプレッサー又はそれをコードする核酸を含み得る。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1つ以上の発現リプレッサー、又はそれをコードする1つ又は複数の核酸の共製剤を含み得る。

10

20

30

40

50

【0926】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、固体又は液体形態での投与のために特別に製剤化することができ、以下：経口投与、例えば、飲薬（水性若しくは非水性溶液又は懸濁液）、錠剤、例えば、口腔、舌下、及び全身吸収を目的とするもの、ボラス、粉末剤、顆粒剤、舌への適用のためのペースト剤；非経口投与、例えば、皮下、筋肉内、静脈内若しくは硬膜外注射（例えば、滅菌溶液若しくは懸濁液として）、又は持続放出製剤；例えば、クリーム、軟膏、又は皮膚、肺、若しくは口腔に適用される制御放出パッチ若しくはスプレーとしての局所適用；例えば、ベッサリー、クリーム、若しくはフォームとしての腔内若しくは直腸内；舌下；眼内；経皮；或いは鼻、肺、及び／又は他の粘膜表面のために設計されたものが挙げられる。

【0927】

本明細書で用いられる場合、用語「薬学的に許容できる」は、信頼できる医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、又は他の障害若しくは合併症を起こすことなく、ヒト及び動物の組織と接触した使用に適しており、妥当なベネフィット／リスク比に見合う化合物、材料、組成物、及び／又は剤形を指す。

【0928】

本明細書で用いられるとき、用語「薬学的に許容できる担体」とは、主題の組成物を1つの器官、若しくは身体の部分から、別の器官、若しくは身体の部分に運搬又は輸送するのに関与する液体若しくは固体充填剤、希釈剤、賦形剤、若しくは溶媒カプセル化材料などの薬学的に許容できる材料、組成物又はビヒクルを意味する。各担体は、製剤の他の成分と適合性であり、且つ患者に対して有害ではないという意味で「許容できる」ものでなければならない。いくつかの実施形態では、例えば、薬学的に許容できる担体として役立ち得る物質として、以下：ラクトース、グルコース及びスクロースなどの糖；トウモロコシデンプン及びジャガイモデンプンなどのデンプン；セルロース、及びその誘導体、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、エチルセルロース及び酢酸セルロース；粉末トラガカント；麦芽；ゼラチン；タルク；ココアバター及び坐剤用ワックスなどの賦形剤；ピーナッツ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油及びダイズ油などの油；プロピレングリコールなどのグリコール；グリセリン、ソルビトール、マンニトール及びポリエチレングリコールなどのポリオール；オレイン酸エチル及びラウリン酸エチルなどのエステル；寒天；水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；アルギン酸；発熱性物質除去蒸留水；等張食塩水；リンガー液；エチルアルコール；pH緩衝液；ポリエステル、ポリカーボネート、及び／又はポリ無水物；並びに医薬製剤に使用される他の非毒性適合性物質が挙げられる。

【0929】

本明細書で用いられるとき、用語「薬学的に許容できる塩」は、医薬関連での使用に適した化合物の塩、即ち、信頼できる医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー

一反応などを起こすことなく、ヒト及び下等動物の組織と接触した使用に適しており、且つ妥当なベネフィット／リスク比に見合う塩を指す。薬学的に許容できる塩は、当技術分野で公知である。例えば、S. M. Berge, et al. は、J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977) に薬学的に許容できる塩を記載している。いくつかの実施形態では、薬学的に許容できる塩として、限定されないが、非毒性酸付加塩が挙げられ、これは、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸及び過塩素酸などの無機酸、又は酢酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸若しくはマロン酸などの有機酸と共に形成されるか、或いはイオン交換などの当技術分野で使用される他の方法を用いることにより形成されるアミノ基の塩である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容できる塩として、限定されないが、以下：アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、ショウノウ酸塩、カンファースルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシーエタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアネート、p-トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが挙げられる。代表的なアルカリ又はアルカリ土類金属塩として、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、薬学的に許容できる塩として、適切であれば、非毒性アンモニウム、第四級アンモニウム、並びにハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、1～6個の炭素原子を有するアルキル、スルホン酸塩及びアリールスルホン酸塩などの対イオンを用いて形成されるアミンカチオンが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0930】

様々な実施形態では、本開示は、薬学的に許容できる賦形剤と共に、本明細書に記載の医薬組成物を提供する。薬学的に許容できる賦形剤は、一般に安全、非毒性で、望ましい医薬組成物を調製するのに有用な賦形剤を含み、且つヒト医薬品用途と同様に動物用途にも許容できる賦形剤を含む。こうした賦形剤は、固体、液体、半固体であってもよいし、又はエアロゾル組成物の場合には、気体であってもよい。

【0931】

医薬調製物は、錠剤の場合、粉碎、混合、顆粒化、及び必要に応じて圧縮；硬質ゼラチンカプセル剤形の場合、粉碎、混合及び充填を含む従来の製剤技術に従って製造することができる。液体担体を用いる場合、調製物は、シロップ、エレキシル、エマルジョン又は水性若しくは非水性溶液又は懸濁液の形態であってよい。こうした液体製剤は、直接経口投与され得る。

【0932】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、任意の投与経路を介して、細胞及び／又は対象に送達するために、製剤化され得る。対象への投与方法としては、注射、注入、吸入、鼻内、眼内、局所送達、カニューレ内送達、又は摂取を挙げることができる。注射としては、限定しないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、血管内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、脳脊髄内、並びに胸骨内注射及び注入が挙げられる。いくつかの実施形態では、投与は、例えば、噴霧法を用いたエアロゾル吸入を含む。いくつかの実施形態では、投与は、全身（例えば、経口、直腸、鼻内、舌下、口腔、若しくは非経口）、経腸（例えば、全身作用だが、消化管を介して送達される）、又は局所（例えば、皮膚への局所適用、硝子体内注射）である。いくつかの実施形態では、1つ若しくは複数の組成物は、全身投与される。いくつかの実施形態では、投与は注射ではなく、且つ、治療薬は非経口治療薬である。いくつかの実

施形態では、投与は、気管支（例えば、気管支内点滴による）、口腔、皮膚（例えば、真皮、皮内、皮内、経皮などに対する局所の1つ若しくは複数であるか、又はそれを含み得る）、経腸、動脈内、皮内、胃内、髄内、筋肉内、鼻内、腹腔内、髄腔内、静脈内、心室内、特定の器官内（例えば、肝臓内）、粘膜、鼻内、経口、皮下、舌下、局所、気管（例えば、気管内点滴により）、腔内、硝子体などであってよい。いくつかの実施形態では、投与は、単回用量であり得る。いくつかの実施形態では、投与は、間欠的（例えば、時間間隔をあけた複数回用量）及び／又は定期的（例えば、共通の時間間隔を開けた個別の用量）な投薬を含み得る。いくつかの実施形態では、投与は、少なくとも選択された期間にわたり連続した投薬（例えば、灌流）を含み得る。いくつかの実施形態では、1回の治療の間に又はある期間にわたって治療レジメンとして6、8、10、12、15又は20回又はそれ以上の投与が対象に与えられてもよい。

10

【0933】

いくつかの実施形態では、投与は、必要に応じて、例えば、疾患、障害又は病態に関連する症状が続いている限りは与えられてもよい。いくつかの実施形態では、対象の残りの人生にわたって反復投与が適応されてもよい。治療期間は様々であってよく、例えば、1日、2日、3日、1週間、2週間、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、6ヵ月、1年、又はそれ以上である可能性がある。

【0934】

投与量

投与される薬剤又は組成物の投与量は、例えば、治療下の病態、疾患の重症度、対象の個別のパラメータであって、年齢、生理的状态、サイズ及び体重を含めたもの、治療継続期間、実施しようとする治療の種類（ある場合）、詳細な投与経路及び同様の要因に基づき異なり得る。従って、本明細書に記載の薬剤の投与される用量は、このような様々なパラメータに依存し得る。投与される組成物の投与量はまた、対象の性別、全般的な医学的状态、及び治療しようとする障害の重症度のような他の要因に応じて異なり得る。約1 mg/kg～6 mg/kgの範囲にある投与量の明細書に開示される調節剤又は調節剤の組み合わせを単回静脈内注入として対象に提供することを望ましいし得るが、状況次第では、それより低い又は高い投与量もまた投与されてよい。投与量は、必要に応じて繰り返されてもよく、例えば、1日に1回（例えば、1～30日間にわたって）、3日に1回（例えば、1～30日間にわたって）、5日に1回（例えば、1～30日間にわたって）、週1回（例えば、1～6週間にわたって、又は2～5週間にわたって）であってもよい。いくつかの実施形態では、投与量としては、限定はされないが、1.0 mg/kg～6 mg/kg、1.0 mg/kg～5 mg/kg、1.0 mg/kg～4 mg/kg、1.0～3.0 mg/kg、1.5 mg/kg～3.0 mg/kg、1.0 mg/kg～1.5 mg/kg、1.5 mg/kg～3 mg/kg、3 mg/kg～4 mg/kg、4 mg/kg～5 mg/kg、又は5 mg/kg～6 mg/kgを挙げることができる。投与量は、複数回、例えば、週に1回、若しくは2回、又は1週間若しくは2週間毎に1回投与されてもよい。いくつかの実施形態では、対象には、約1 mg/kg～6 mg/kgの範囲にある投与量の明細書に開示される調節剤又は調節剤の組み合わせが複数回静脈内注入として提供されるが、状況次第では、それより低い又は高い投与量もまた投与されてよい。

20

30

40

【0935】

本明細書に開示されるとおりの調節剤又は調節剤の組み合わせは、3～5日毎に1投与量として、合計少なくとも3投与量にわたって繰り返し投与されてもよい。或いは、本明細書に開示されるとおりの調節剤又は調節剤の組み合わせは、3 mg/kgで5日毎に25日間にわたって投与されてもよい。或いは、本明細書に開示されるとおりの調節剤又は調節剤の組み合わせは、1.0～5.0 mg/kgで3～5日毎に1～10用量にわたって投与されてもよい。或いは、本明細書に開示されるとおりの調節剤又は調節剤の組み合わせは、1.0～3.0 mg/kgで5日毎に3用量、次に3日毎に3用量にわたって投与されてもよい。或いは、本明細書に開示されるとおりの調節剤又は調節剤の組み合わせ

50

は、 $1.0 \sim 3.0 \text{ mg/kg}$ で5日毎に4用量、次に3日毎に3用量にわたって投与されてもよい。或いは、本明細書に開示されるとおりの調節剤又は調節剤の組み合わせは、 6 mg/kg で5日毎に1～10用量にわたって投与されてもよい。或いは、本明細書に開示されるとおりの調節剤又は調節剤の組み合わせは、 3 mg/kg で5日毎に1～10用量にわたって投与されてもよい。或いは、本明細書に開示されるとおりの調節剤又は調節剤の組み合わせは、 1.5 mg/kg で5日毎に2用量、 3 mg/kg で5日毎に3用量、 3 mg/kg で3日毎に1用量にわたって投与されてもよい。或いは、本明細書に開示されるとおりの調節剤又は調節剤の組み合わせは、 6 mg/kg で5日毎又は 1.5 mg/kg で1日1回を5日間と2日の休薬で投与されてもよい。投薬スケジュールは、任意選択で他の間隔で繰り返すことができ、投与量は、様々な非経口経路を通じて、用量及びスケジュールを適宜調整して与えられてもよい。いくつかの実施形態では、調節剤又は調節剤の組み合わせの用量設定には、任意選択で、毎週、週2回、又は隔週のいずれかで与えられる $1.0 \text{ mg/kg} \sim 6.0 \text{ mg/kg}$ の投与量が含まれ得る。当業者は、本明細書に開示されるとおりの調節剤又は調節剤の組み合わせの投与量の選択に際しては、年齢、性別、体重、治療しようとする障害の重症度など、種々の要因が考慮され得ること、及び治療の経過中に投与量及び／又は投与頻度を増加又は減少させ得ることを認識するであろう。投与量は、僅か2～8用量の後に腫瘍容積の低下のエビデンスが観察されることに伴い、必要に応じて繰り返されてもよい。本明細書に開示される投与量及び投与スケジュールについて、対象の全般的な体重に及ぼす効果は、シスプラチン、ソラフェニブ、又は小分子比較対照薬と比較して最小限を示す。主題の方法には、CT及び／又はPET/CT、又はMRIを使用して、腫瘍応答を一定の間隔で測定することが含まれ得る。血中腫瘍マーカーレベルもまたモニタし得る。投与量及び／又は投与スケジュールは、イメージング及び／又は血中マーカーレベルの結果に基づき、必要に応じて調整され得る。

10

20

30

40

50

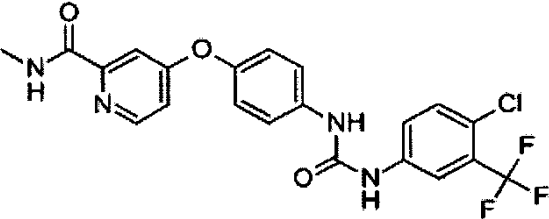
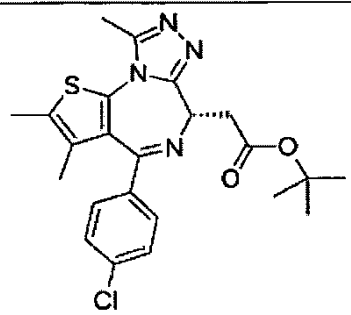
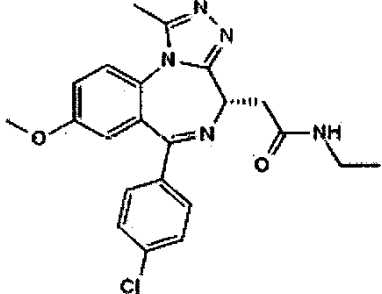
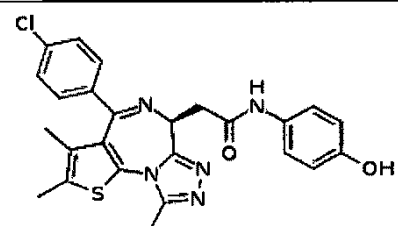
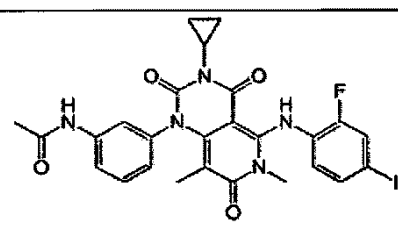
【0936】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、疾患又は障害の治療のため、外科的切除、チロシンキナーゼ阻害薬（TKI）、例えば、ソラフェニブ、プロモドメイン阻害薬、例えば、BET阻害薬、例えば、JQ1、例えば、BET672、例えば、ビラブレシブ、MEK阻害薬（例えば、トラメチニブ）、同所性肝移植、高周波アブレーション、免疫療法、免疫チェックポイント＋抗血管内皮増殖因子併用療法、光線力学療法（PDT）、レーザー療法、小線源照射療法、放射線療法、経カテーテル動脈化学又は放射線塞栓術、定位放射線療法、化学療法、及び／又は全身化学療法から選択される1つ以上の治療薬又は方法と組み合わせて投与されてもよい。以下の表21に例示的治療薬を開示する。

【0937】

【表 6 7】

表21: 例えば、本明細書に記載の発現リプレッサーとの組み合わせ療法における使用のための、小分子化合物。

ソラフェニブ	
JQ1	
BET762	
ピラブレシブ	
トラメチニブ	

10

20

30

40

【0938】

本開示に従う医薬組成物は、治療有効量で投与され得る。正確な治療有効量は、所与の対象の治療の効力に関して最も有効な結果をもたらすと考えられる組成物の量である。この量は、様々な要因に応じて変動するが、そうした要因として、限定されないが、治療化合物の特徴（活性、薬物動態、薬力学、及び生体利用可能性など）、対象の生理学的状態（年齢、性別、疾患の種類及びステージ、健康状態全般、所与の用量に対する応答性、並びに薬剤の種類など）、製剤中の薬学的に許容できる1つ若しくは複数の担体、及び／又は投与経路が挙げられる。

【0939】

50

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載の組成物を対象に投与することを含む、治療薬の送達方法を提供し、ここで、調節剤が治療薬であり、且つ／又は治療薬の送達は、治療薬の非存在下での遺伝子発現に比して、遺伝子発現の変化を引き起こす。

【0940】

本明細書の様々な実施形態で提供される方法を、本明細書に描写されるいくつかの態様のいずれに使用してもよい。いくつかの実施形態では、1つ若しくは複数の組成物を特定の細胞、又は1つ若しくは複数の特定の組織に対してターゲティングさせる。

【0941】

例えば、いくつかの実施形態では、1つ若しくは複数の組成物を、肝臓、上皮、結合、筋肉、生殖、及び／又は神経組織若しくは細胞に対してターゲティングさせる。いくつかの実施形態では、組成物を、特定の器官系、例えば、心血管系（心臓、血管）；消化系（食道、胃、肝臓、膀胱、膵臓、腸、結腸、直腸及び肛門）；内分泌系（視床下部、下垂体、松果体若しくは松果腺、甲状腺、副甲状腺、副腎）；排出系（腎臓、尿管、膀胱）；リンパ系（リンパ、リンパ節、リンパ管、扁桃腺、アデノイド、胸腺、脾臓）；外皮系（皮膚、毛髪、爪）；筋肉系（例えば、骨格筋）；神経系（脳、脊髄、神経）；生殖系（卵巣、子宮、乳腺、精巣、精管、精囊、前立腺）；呼吸系（咽頭、喉頭、気管、気管支、肺、横隔膜）；骨格系（骨、軟骨）；及び／又はそれらの組合せの細胞又は組織にターゲティングさせる。

10

【0942】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、血液脳関門、胎盤膜、又は血液精巣関門を通過する。

20

【0943】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される医薬組成物は、全身投与される。

【0944】

いくつかの実施形態では、投与は注射によるものではなく、且つ治療薬は非経口治療薬である。

【0945】

本明細書に提供される方法及び組成物は、疾患、障害、及び／又は病態の症状を軽減するのに十分なレジメンによって投与される医薬組成物を含み得る。いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載のとおり組成物を投与することにより治療薬を送達する方法を提供する。

30

【0946】

本開示の薬学的使用には、本明細書に記載のとおり組成物（例えば、調節剤、例えば、破壊剤）が含まれ得る。

【0947】

いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、活性薬剤単独と比較して、PK／PDの改善、例えば、増加した薬物動態又は薬物力学、例えば、ターゲティング、吸収、若しくは輸送の改善（例えば、少なくとも5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、若しくはそれ以上の改善）を有する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、活性薬剤単独と比較して、低減した望ましくない作用、例えば、低減した非標的位置への拡散、オフターゲット活性、又は毒性代謝産物（例えば、治療薬単独と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、若しくはそれ以上の低減）を有する。いくつかの実施形態では、組成物は、活性薬剤単独と比較して、治療薬の効力を増大し、且つ／又は治療薬の毒性を低減する（例えば、少なくとも5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、若しくはそれ以上）。

40

【0948】

本明細書に記載される医薬組成物は、例えば、製剤用担体及び／又はポリマー担体、例えば、ナノ粒子、リボソーム若しくは小胞体などの担体を含め、製剤化して、公知の方法により、それを必要とする対象（例えば、ヒト又はヒト以外の農場若しくは家畜動物、例

50

えば、畜牛、イヌ、ネコ、ウマ、家禽）に送達される。こうした方法としては、トランスフェクション（例えば、脂質媒介性、カチオンポリマー、リン酸カルシウム）；エレクトロポレーション又は他の膜破壊（例えば、ヌクレオフェクション）及びウイルス送達（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、AAV）が挙げられる。さらに送達方法は、例えば、以下：Gori et al., *Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy*. *Human Gene Therapy*. July 2015, 26 (7) : 443-451. Doi:10.1089/hum.2015.074; 及び Zuris et al. にも記載されている。タンパク質のカチオン脂質媒介送達は、インビトロ及びインビボで効率的なタンパク質ベースのゲノム編集を可能にする。Nat Biotechnol. 2014 Oct 30; 33 (1) : 73-80.

10

【0949】

脂質ナノ粒子

本明細書に記載される発現リプレッサー又は発現抑制システムは、粒子を含む任意の生物学的送達システム／製剤、例えば、ナノ粒子送達システムを用いて送達することができる。ナノ粒子は、約1～約1000ナノメートル、約1～約500ナノメートルのサイズ、約1～約100nm、約30nm～約200nm、約50nm～約300nm、約75nm～約200nm、約100nm～約200nm、及びそれらの間の任意の範囲の寸法（例えば、粒径）を有する粒子を含む。ナノ粒子は、ナノスケールの寸法の複合構造を有する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、典型的には球形であるが、ナノ粒子組成に応じて異なる形態が可能である。ナノ粒子の外部の環境に接触するナノ粒子の部分は、一般に、ナノ粒子の表面として識別される。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、25nm～200nmの範囲の最大寸法を有する。本明細書に記載されるナノ粒子は、限定はされないが、固体、半固体、エマルジョン、又はコロイドナノ粒子を含む任意の形態で提供され得る送達システムを含む。ナノ粒子送達システムは、脂質ベースのシステム、リポソーム、ミセル、微小小胞体、エキソソーム、又は遺伝子銃を含み得るが、これらに限定されない。一実施形態において、ナノ粒子は、脂質ナノ粒子（LNP）である。いくつかの実施形態では、LNP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。

20

30

【0950】

いくつかの実施形態では、LNPは、複数の成分、例えば、3～4個の成分を含み得る。一実施形態において、発現リプレッサー又は前記発現リプレッサーを含む医薬組成物（又はそれをコードする核酸、又は前記発現リプレッサー核酸を含む医薬組成物）は、LNPに封入される。一実施形態において、発現抑制システム又は前記発現抑制システムを含む医薬組成物（又はそれをコードする核酸、若しくは前記発現抑制システム核酸を含む医薬組成物）は、LNPに封入される。いくつかの実施形態では、第1発現リプレッサーをコードする核酸及び第2発現リプレッサーをコードする核酸は、同じLNP中に存在する。いくつかの実施形態では、第1発現リプレッサーをコードする核酸と第2発現リプレッサーをコードする核酸は、異なるLNP中に存在する。LNPの調製及び調節剤封入は、Rosin et al., *Molecular Therapy*, vol. 19, no. 12, pages 1286-2200, December 2011) から使用してもよいし、且つ／又は改変してもよい。いくつかの実施形態では、本明細書で開示される脂質ナノ粒子組成物は、mRNAによってコードされるタンパク質の発現に有用である。いくつかの実施形態では、核酸は、脂質ナノ粒子中に存在する場合、水溶液中でヌクレアーゼによる分解に対して耐性である。

40

【0951】

いくつかの実施形態では、LNP製剤は、CCD脂質、中性脂質、及び／又はヘルパー脂質を含み得る。いくつかの実施形態では、LNP製剤は、イオン化脂質を含む。いくつかの実施形態では、イオン化脂質は、カチオン性脂質、イオン化カチオン性脂質、又は容

50

易にプロトン化することができるアミン含有脂質であってもよい。いくつかの実施形態では、脂質は、pHに応じて正荷電又は中性形態で存在し得るカチオン性脂質である。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、例えば、生理学的条件下で正荷電することができる脂質である。いくつかの実施形態では、脂質粒子は、以下：中性脂質、イオン化アミン含有脂質、生分解性アルキン脂質、ステロイド、多価不飽和脂質、構造脂質（例えば、ステロール）、PEG、コレステロール、及びポリマー共役脂質などのリン脂質のうちの1つ以上と一緒に、製剤中にカチオン性脂質を含む。

【0952】

いくつかの実施形態では、LNP製剤（例えば、MC3及び／若しくはSSOP）は、コレステロール、PEG、並びに／又はヘルパー脂質を含む。LNPは、例えば、ミクロスフェア（単層小胞及び多重層小胞、いくつかの実施形態では、実質的に球状であるラメラ相脂質二重層などであってもよい。

10

【0953】

いくつかの実施形態では、LNPは、水性コア、例えば、本明細書に開示されるような発現リプレッサー又は系をコードする核酸を含むことができる。本開示のいくつかの実施形態では、LNP製剤のカーゴは、少なくとも1つのガイドRNAを含む。いくつかの実施形態では、カーゴ、例えば、発現リプレッサー、又は本明細書に開示されるような系をコードする核酸は、LNP、例えば、カチオン性脂質を含むLNPの表面に吸着され得る。いくつかの実施形態では、カーゴ、例えば、発現リプレッサー、又は本明細書に開示されるような系をコードする核酸をLNPと結合させてもよい。いくつかの実施形態では、カーゴ、例えば、発現リプレッサー、又は本明細書に開示されるような系をコードする核酸は、LNPに封入してもよく、例えば、完全に封入しても、及び／又は部分的に封入してもよい。

20

【0954】

いくつかの実施形態では、カーゴを含むLNPは、全身送達、例えば、生物内での活性剤の広範な曝露を達成し得る治療有効用量のカーゴの送達のために投与することができる。脂質ナノ粒子の全身送達は、例えば、静脈内、動脈内、皮下、及び腹腔内送達を含む当技術分野で知られる任意の手段によるものであってよい。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子の全身送達は、静脈内送達によるものである。いくつかの実施形態では、カーゴを含むLNPは、局所送達、例えば、生物内の標的部位への活性剤の直接送達のために投与され得る。いくつかの実施形態では、LNPは、疾患部位、例えば、腫瘍、他の標的部位、例えば、炎症部位へと、又は標的器官、例えば、肝臓、肺、胃、結腸、脾臓、子宮、乳房、リンパ節などに局所送達されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるとおりのLNPは、特異的細胞、例えば、肝細胞、星細胞、クッパー細胞、内皮、肺胞、及び／又は上皮細胞に局所送達されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるとおりのLNPは、例えば、皮下の、同所性の、特異的腫瘍部位に局所送達されてもよい。

30

【0955】

LNPは、エマルジョン、ミセル中の分散相、又は懸濁液中の内相として製剤化することができる。いくつかの実施形態では、LNPは、生分解性である。いくつかの実施形態では、LNPは、治療有効用量で細胞毒性レベルまで蓄積しないか、又はインビボで毒性を引き起こさない。いくつかの実施形態では、LNPは、治療有効用量で反復投与した後、細胞毒性レベルまで蓄積しないか、又はインビボで毒性を引き起こさない。いくつかの実施形態では、LNPは、治療有効用量で実質的に有害作用をもたらす自然免疫応答を引き起こさない。

40

【0956】

いくつかの実施形態では、使用されるLNPは、式（6Z，9Z，28Z，31Z）－ヘプタトリアコント－6，9，28，31－テトラエン－19－イル4－（ジメチルアミノ）ブタノエート又はssPalmo－フェニル－P4C2（ssPalmo－Phe、SS－OP）を含む。いくつかの実施形態では、LNP製剤は、式、（6Z，9Z，28

50

Z, 31 Z) -ヘプタトリアコント-6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート(MC3)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、コレステロール、1, 2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000(PEG2k-DMG)、例えば、MC3LNP又はssPalmo-フェニル-P4C2(ssPalmo-Phe、SS-OP)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、コレステロール、1, 2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000(PEG2k-DMG)、例えば、SSOP-LNPを含む。

【0957】

リポソームは、内部水性コンパートメントを取り囲む単層又は多重層脂質二重層と、比較的浸透性の外側親油性リン脂質二重層とから構成される球状小胞構造である。リポソームは、アニオン性、中性、又はカチオン性であり得る。リポソームは、生体適合性、非毒性であり、親水性及び親油性の薬物分子の両方を送達し、血漿酵素による分解からカーゴを保護し、生体膜及び血液脳関門(BBB)を通過してそのロードを輸送することができる(例えば、検討のためにSpuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. Doi:10.1155/2011/469679を参照)。

【0958】

小胞は、いくつかの異なるタイプの脂質から作製することができるが、薬物担体としてのリポソームを生成するためには、リン脂質が最も一般的に使用されている。小胞は、限定はされないが、DOTMA、DOTAP、DOTIM、DDABを単独で又はコレステロールと一緒に含有して、DOTMAとコレステロール、DOTAPとコレステロール、DOTIMとコレステロール、及びDDABとコレステロールを生成する。多重層小胞脂質の調製方法は、当該技術分野において公知である(例えば、米国特許第6,693,086号明細書を参照されたい;多重層小胞脂質調製に関するその教示内容は、参照により本明細書に組み込まれる)。脂質膜を水溶液と混合すると、小胞形成は自発的になり得るが、ホモジナイザー、超音波処理装置、又は押出装置を用いて振盪の形態で力を加えることにより促進することもできる(例えば、Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. Doi:10.1155/2011/469679を参照)。押し出された脂質は、Templeton et al., Nature Biotech, 15:647-652, 1997に記載されているように、サイズ縮小フィルターを通して押し出すことにより調製することができ、押出脂質調製に関するその教示内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0959】

本明細書に提供される方法及び組成物は、疾患、障害、及び/又は状態の症状を緩和するのに十分なレジメンによって投与される医薬組成物を含み得る。いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載の組成物を投与することによって治療薬を送達する方法を提供する。

【0960】

使用

本開示はさらに、本明細書に開示される発現リプレッサー又は発現リプレッサーシステムの使用に関する。とりわけ、いくつかの実施形態では、かかる提供される技術を使用することにより、標的遺伝子、例えば、MYCの発現の調節、例えば、抑制が実現し、例えば、標的遺伝子、例えば、MYCの活性、送達、及び透過の制御が、例えば、細胞において可能となり得る。いくつかの実施形態では、細胞は、哺乳類細胞、例えば、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、体細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、初代細胞である。例えば、いくつかの実施形態では、細胞は、哺乳類体細胞である。いくつかの実施形態では、哺乳類体細胞は、初代細胞である。いくつかの実施形態では、

10

20

30

40

50

哺乳類体細胞は、非胚細胞である。

【0961】

遺伝子発現の調節

本開示はさらに、一部には、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節する、例えば、低減する方法であって、発現リプレッサー（又はそれをコードする核酸、又は前記発現リプレッサー核酸を含む医薬組成物）又は本明細書に記載の発現抑制システム（又はそれをコードする核酸、又は前記発現抑制システム若しくは核酸を含む医薬組成物）を提供すること、及び標的遺伝子、例えば、MYC、及び／又は1つ又は複数の作動可能に連結された転写制御エレメントを発現リプレッサー又は発現抑制システムと接触させることを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節すること、例えば、低減することは、基準値、例えば、発現リプレッサー又は発現抑制システムの非存在下での標的遺伝子、例えば、MYCの転写と比較したときの、標的遺伝子、例えば、MYCの転写の調節を含む。いくつかの実施形態では、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節する、例えば、低減する方法は、エキソビボで、例えば、対象、例えば、哺乳類対象、例えば、ヒト対象からの細胞に対して使用される。いくつかの実施形態では、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節する、例えば、低減する方法は、インビボで、例えば、哺乳類対象、例えば、ヒト対象に対して使用される。いくつかの実施形態では、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節する、例えば、低減する方法は、インビトロで、例えば、本明細書に記載の細胞又は細胞株に対して使用される。

10

【0962】

本開示はさらに、一部には、対象における標的遺伝子、例えば、MYCの誤調節、例えば、過剰発現に関連する病態を治療する方法であって、対象に発現リプレッサー（又はそれをコードする核酸、又は前記発現リプレッサー核酸を含む医薬組成物）又は本明細書に記載の発現抑制システム（又はそれをコードする核酸、又は前記発現抑制システム若しくは核酸を含む医薬組成物）を投与することを含む方法に関する。特定の遺伝子の過剰発現に関連する病態は、当業者に公知である。かかる病態としては、限定はされないが、代謝障害、癌（例えば、固形腫瘍）、及び肝炎が挙げられる。

20

【0963】

本明細書に提供される方法及び組成物は、標的遺伝子、例えば、MYCの転写を安定的、又は一過性変更（例えば、低減）することにより、標的遺伝子、例えば、MYCの過剰発現又は誤調節に関連する病状を治療することができる。いくつかの実施形態では、こうした調節は、少なくとも約1時間～約30日、又は少なくとも約2時間、6時間、12時間、18時間、24時間、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、若しくはそれ以上又はそれらの間の任意の時間持続する。いくつかの実施形態では、こうした調節は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、若しくは24時間、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、若しくは7日、又は少なくとも1、2、3、4、若しくは5週間、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、若しくは12ヶ月、又は少なくとも1、2、3、4、若しくは5年にわたって（例えば、永続的に又は無期限に）持続する。任意選択的に、こうした調節は、10、9、8、7、6、5、4、3、2、若しくは1年以下にわたって持続する。

30

40

【0964】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法又は組成物は、組成物と接触させていないか、又は上記方法で処理されていない細胞における標的遺伝子の発現と比較して、細胞における標的遺伝子、例えば、MYCの発現を少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、若しくは100%（及び場合によっては最大100%）低減することができる。

【0965】

50

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される方法は、標的遺伝子と関連するゲノム複合体、例えば、アンカー配列媒介接合部を妨害することにより、標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節、例えば、低減し得る。アンカー配列媒介接合部と関連する遺伝子は、少なくとも部分的に、接合部内（即ち、第1及び第2アンカー配列の間に配列様に位置する）にあってもよいし、又は第1及び第2アンカー配列の間に配列様に位置していないという点で接合部の外部であってもよいが、上記遺伝子は、同じ染色体上で、しかも、アンカー配列媒介接合部のトポロジーを制御することによりその発現を調節することができるように、少なくとも第1又は第2アンカー配列と十分に近接して位置する。当業者は、2つのエレメント同士（例えば、上記遺伝子とアンカー配列媒介接合部の間）の三次元空間中での距離が、いくつかの実施形態において、塩基対に関する距離よりも重要となり得ることは理解されよう。いくつかの実施形態では、外部ではあるが、関連する遺伝子は、第1又は第2アンカー配列から2 Mb以内、1.9 Mb以内、1.8 Mb以内、1.7 Mb以内、1.6 Mb以内、1.5 Mb以内、1.4 Mb以内、1.3 Mb以内、1.3 Mb以内、1.2 Mb以内、1.1 Mb以内、1 Mb以内、900 kb以内、800 kb以内、700 kb以内、500 kb以内、400 kb以内、300 kb以内、200 kb以内、100 kb以内、50 kb以内、20 kb以内、10 kb以内、又は5 kb以内に位置する。

10

【0966】

いくつかの実施形態では、遺伝子、例えば、MYCの発現の調節は、遺伝子、例えば、MYCに対する転写制御配列の到達性を変更することを含む。転写制御配列は、アンカー配列媒介接合部の内部又は外部にかかわらず、増強配列又はサイレンシング（若しくは抑制）配列であり得る。

20

【0967】

いくつかの実施形態では、かかる提供される技術を使用して、それを必要としている対象、例えば、患者における遺伝子誤調節障害、例えば、MYC遺伝子誤調節障害、例えば、MYC遺伝子誤調節に関連する症状が治療されてもよい。いくつかの実施形態では、かかる提供される技術を使用して、それを必要としている対象、例えば、患者におけるMYC遺伝子誤調節障害又はMYC遺伝子誤調節障害に関連する症状が治療されてもよい。いくつかの実施形態では、障害は、MYC誤調節、例えば、MYC過剰発現に関連する。いくつかの実施形態では、障害は、AFP誤調節、例えば、AFP過剰発現に関連する。いくつかの実施形態では、かかる提供される技術を使用して、標的遺伝子、例えば、MYCのプロモータをメチル化することにより、それを必要としている対象、例えば、患者における遺伝子誤調節障害、例えば、MYC遺伝子誤調節障害、例えば、MYC遺伝子誤調節に関連する症状が治療されてもよい。いくつかの実施形態では、かかる提供される技術は、標的遺伝子、例えば、MYCによってコードされるポリペプチドを異常発現する細胞の生存能力に選択的に影響を及ぼし得る。

30

【0968】

いくつかの実施形態では、かかる提供される技術を使用して、それを必要としている対象、例えば、患者における肝障害又は肝障害に関連する障害、例えば症状が治療されてもよい。いくつかの実施形態では、かかる提供される技術を使用して、それを必要としている対象、例えば、患者における肺障害又は肝障害に関連する障害、例えば症状が治療されてもよい。いくつかの実施形態では、かかる提供される技術を使用して、それを必要としている対象、例えば、患者における新生物形成障害、例えば新生物形成障害に関連する障害又は症状が治療されてもよい。いくつかの実施形態では、かかる提供される技術を使用して、それを必要としている対象、例えば、患者におけるウイルス感染関連障害、例えばウイルス感染関連障害に関連する障害又は症状が治療されてもよい。いくつかの実施形態では、かかる提供される技術を使用して、それを必要としている対象、例えば、患者におけるアルコール乱用関連障害、例えばアルコール乱用関連障害に関連する障害又は症状が治療されてもよい。いくつかの実施形態では、かかる提供される技術を使用して、それを必要としている対象、例えば、患者におけるウイルス感染又はアルコール乱用に関連する

40

50

新生物形成障害、例えば、ウイルス感染又はアルコール乱用に関連する新生物形成障害に関連する障害又は症状が治療されてもよい。

【0969】

いくつかの実施形態では、治療される病態は、新生物形成である。いくつかの実施形態では、治療される病態は、腫瘍発生である。いくつかの実施形態では、治療される病態は、癌である。いくつかの実施形態では、癌は、予後不良に関連する。いくつかの実施形態では、癌は、MYC誤調節、例えば、MYC過剰発現に関連する。いくつかの実施形態では、癌は、AFP誤調節、例えば、AFP過剰発現に関連する。いくつかの実施形態では、癌は、乳癌、肝癌、結腸直腸癌、肺癌、膵癌、胃癌、及び／又は子宮癌である。いくつかの実施形態では、癌は、感染、例えば、ウイルス感染、例えば、細菌感染に関連する。いくつかの実施形態では、癌は、アルコール乱用に関連する。いくつかの実施形態では、癌は、肝細胞癌である。

10

【0970】

いくつかの実施形態では、癌細胞は、肺癌細胞、胃癌、消化器癌、結腸直腸癌、膵癌又は肝癌細胞である。いくつかの実施形態では、癌は、肝細胞癌（HCC）、線維層板肝細胞癌（FHCC）、胆管癌、血管肉腫、二次肝癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、腺癌、小細胞肺癌（SCLC）、大細胞（未分化）癌、トリプルネガティブ乳癌、胃腺癌、子宮内膜癌、又は膵癌である。

【0971】

いくつかの実施形態では治療される病態は、肝疾患である。いくつかの実施形態では治療される病態は、MYC誤調節、例えば、MYC過剰発現に関連する。いくつかの実施形態では治療される病態は、慢性疾患である。いくつかの実施形態では治療される病態は、慢性肝疾患である。いくつかの実施形態では治療される病態は、ウイルス感染である。いくつかの実施形態では、治療される病態は、アルコール乱用関連障害である。

20

【0972】

いくつかの実施形態では治療される病態は、肺疾患である。いくつかの実施形態では治療される病態は、MYC誤調節、例えば、MYC過剰発現に関連する。いくつかの実施形態では治療される病態は、慢性疾患である。いくつかの実施形態では治療される病態は、慢性肺疾患である。いくつかの実施形態では、かかる提供される技術を使用して、肺癌成長、転移、薬剤耐性、及び／又は癌幹細胞（CSC）維持が治療され、又は低減されてもよい。いくつかの実施形態では、治療される病態は、癌腫、例えば、非小細胞肺癌腫（NSCLC）である。いくつかの実施形態では、慢性肺疾患は、タバコ乱用に関連する。

30

【0973】

いくつかの実施形態では、癌 肝細胞癌亜型S1（HCC S1）、肝細胞癌亜型S2（HCC S2）、又は肝細胞癌亜型S3（HCC S2）。いくつかの実施形態では、HCC亜型は、MYC過剰発現に関連する。いくつかの実施形態では、癌は、HCC S1又はHCC S2である。いくつかの実施形態では、癌の亜型は、高悪性度腫瘍及び臨床転帰不良に関連する。

【0974】

いくつかの実施形態では、本開示は、対象のHCC亜型に基づいて対象に送達され得る治療レジメン、例えば、対象におけるHCC亜型に基づき治療の攻撃性をオーダーメイドで調整する個別化された手法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に開示される発現リプレッサー又は発現リプレッサーシステムを使用した治療方法であって、患者のHCC亜型を同定すること、並びにHCC亜型の同定に基づき前記発現リプレッサー及び／又は発現リプレッサーシステムの投与量及び投与スケジュールを決定することを含む方法を提供する。

40

【0975】

化学療法治療と比較して対象が被る副作用又は全身毒性が最小限となるように、障害の治療のため対象に本明細書に開示されるとおりの薬剤、又は組成物を送達する方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の薬剤及び／又は組成物で

50

治療したとき、対象には、化学療法に典型的に付随するいかなる重大な副作用も起こらない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の薬剤及び／又は組成物で治療したとき、対象には、限定はされないが、脱毛症、悪心、嘔吐、食欲不振、ひりひりする痛み、好中球減少、貧血、血小板減少、眩暈、疲労、便秘、口腔潰瘍、皮膚のかゆみ、皮膚剥離、神経及び筋損傷、聴覚変化、体重減少、下痢、免疫抑制、打撲傷、心損傷、出血、肝損傷、腎損傷、浮腫、口腔・咽頭の痛み、不妊、線維化、脱毛、湿性落屑、粘膜乾燥、眩暈及び脳症を含めた重大な副作用が起こらない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の薬剤及び／又は組成物で治療したとき、対象は、重大な体重減少を示さない。

【0976】

本明細書に記載の薬剤及び組成物は、例えば、インビボで対象、例えば、哺乳類に投与することにより、本明細書に記載のとおり種々の障害を治療又は予防することができる。これには、MYCの発現パターンの変化によって特徴付けられる細胞が関わる障害が含まれる。

【0977】

エピジェネティック修飾

本開示はさらに、一部には、標的遺伝子、標的遺伝子に作動可能に連結した転写制御エレメント、又はアンカー配列（例えば、標的遺伝子に近接したアンカー配列、又は標的遺伝子に作動可能に連結したアンカー配列媒介接合部に関連するアンカー配列）をエピジェネティック修飾する方法であって、発現リプレッサー（又はそれをコードする核酸）又は発現抑制システム（例えば、1つ又は複数の発現リプレッサー）、又はそれをコードする核酸又は前記発現リプレッサー（又はそれをコードする核酸）若しくは発現抑制システム若しくは核酸を含む医薬組成物を提供すること；及び標的遺伝子又は標的遺伝子に作動可能に連結した転写制御エレメントを発現リプレッサー又は発現抑制システムと接触させることであって、それによって標的遺伝子、例えば、MYC又は標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した転写制御エレメントをエピジェネティック修飾することを含む方法に関する。

【0978】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子、例えば、MYC又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結した転写制御エレメントをエピジェネティック的に修飾する方法は、標的遺伝子、例えば、MYC又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結した転写制御エレメントのDNAメチル化の増大若しくは低減を含む。いくつかの実施形態では、標的遺伝子、例えば、MYC又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結した転写制御エレメントをエピジェネティック的に修飾する方法は、標的遺伝子、例えば、MYC又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結した転写制御エレメントに関連するヒストンのヒストンメチル化の増大若しくは低減を含む。いくつかの実施形態では、標的遺伝子、例えば、MYC又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結した転写制御エレメントをエピジェネティック的に修飾する方法は、標的遺伝子、例えば、MYC又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結した転写制御エレメントに関連するヒストンのヒストンアセチル化の増大若しくは低減を含む。いくつかの実施形態では、標的遺伝子、例えば、MYC又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結した転写制御エレメントをエピジェネティック的に修飾する方法は、標的遺伝子、例えば、MYC又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結した転写制御エレメントに関連するヒストンのヒストンSUMO化の増大若しくは低減を含む。いくつかの実施形態では、標的遺伝子、例えば、MYC又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結した転写制御エレメントをエピジェネティック的に修飾する方法は、標的遺伝子、例えば、MYC又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結した転写制御エレメントに関連するヒストンのヒストンリン酸化の増大若しくは低減を含む。

【0979】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子、例えば、MYC又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結した転写制御エレメントをエピジェネティック的に修飾する方法は、

エピジェネティック修飾のレベルを、上記組成物と接触させていないか、又は上記方法で処理されていない細胞における当該部位でのエピジェネティック修飾のレベルに比して、少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は100%（及び任意選択的に、最大100%）低減し得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子、例えば、MYC又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結した転写制御エレメントをエピジェネティック的に修飾する方法は、エピジェネティック修飾のレベルを、上記組成物と接触させていないか、又は上記方法で処理されていない細胞における当該部位でのエピジェネティック修飾のレベルに比して、少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、300、400、500、600、700、800、900、又は1000%（及び任意選択的に、最大200、300、400、500、600、700、800、900、1000、又は2000%）増大し得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子、例えば、MYC又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結した転写制御エレメントのエピジェネティック修飾により、例えば、本明細書に記載されるように、標的遺伝子、例えば、MYCの発現のレベルを修飾することができる。

10

【0980】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法により達成されるエピジェネティック修飾は、少なくとも約1時間～約30日、又は少なくとも約2時間、6時間、12時間、18時間、24時間、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、若しくはそれ以上、又はそれらの間の任意の時間持続する。いくつかの実施形態では、こうした調節は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、若しくは24時間、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、若しくは7日、又は少なくとも1、2、3、4、若しくは5週間、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、若しくは12ヶ月、又は少なくとも1、2、3、4、若しくは5年にわたって（例えば、無期限に）持続する。任意選択的に、こうした調節は、10、9、8、7、6、5、4、3、2、若しくは1年以下にわたって持続する。

20

【0981】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子、例えば、MYC又は標的遺伝子、例えば、MYCと作動可能に連結した転写制御エレメントをエピジェネティック的に修飾する方法に使用される発現リプレッサー、又は発現抑制システムは、エピジェネティック修飾部分であるか、又はそれを含むエフェクター部分を有する発現リプレッサーを含む。

30

【0982】

例えば、エフェクター部分は、DNAメチルトランスフェラーゼ活性を有するエピジェネティック修飾部分であるか、又はそれを含んでもよく、内因性又は天然に存在する標的配列（例えば、標的遺伝子、例えば、MYC若しくは転写制御エレメント）は、そのメチル化を増大するように改変（例えば、転写因子若しくは転写制御エレメントの一部と標的遺伝子、例えば、MYCの相互作用の低減、核形成タンパク質とアンカー配列の結合の低減、及び／又はアンカー配列媒介コンジュゲーションの破壊又は防止）してもよいし、或いはそのメチル化を低減するように改変（例えば、転写因子若しくは転写制御エレメントの一部と標的遺伝子、例えば、MYCの相互作用の増大、核形成タンパク質とアンカー配列の結合の増大、及び／又はアンカー配列媒介コンジュゲーションの促進又は強度の増加）してもよい。

40

【0983】

キット

本開示はさらに、一部には、本明細書に記載の発現リプレッサー又は発現抑制システム、例えば、発現リプレッサーを含むキットにも関する。いくつかの実施形態では、キットは、発現リプレッサー又は発現抑制システム（例えば、発現抑制システムの発現リプレッ

50

サー)と、前記発現リプレッサー又は発現抑制システムの使用説明書とを含む。いくつかの実施形態では、キットは、発現リプレッサーをコードする核酸又は発現抑制システム若しくはその成分(例えば、発現抑制システムの発現リプレッサー)をコードする核酸と、前記発現リプレッサー(及び/若しくは前記核酸)及び/又は前記発現抑制システム(及び/若しくは前記核酸)の使用説明書とを含む。いくつかの実施形態では、キットは、発現リプレッサーをコードする核酸又は発現抑制システム若しくはその成分(例えば、発現抑制システムの発現リプレッサー)をコードする核酸を含む細胞と、前記細胞、核酸、及び/又は前記発現リプレッサー若しくは発現抑制システムの使用説明書とを含む。

【0984】

いくつかの態様では、キットは、a)第1ターゲティング部分と任意選択で第1エフェクター部分とを含む第1発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した転写調節エレメント(例えば、プロモータ又は転写開始部位(TSS))に結合するか、又は転写調節エレメントに近接した配列に結合する第1発現リプレッサーと、第2ターゲティング部分と任意選択で第2エフェクター部分とを含む発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCを含むアンカー配列媒介接合部(ASMC)のアンカー配列に結合するか、又はアンカー配列に近接した配列に結合する第2発現リプレッサーとを含む、2つの発現リプレッサーを含むシステムを含む組成物を含む容器を含む。

10

【0985】

いくつかの態様では、本キットは、a)第1ターゲティング部分と任意選択で第1エフェクター部分とを含む第1発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCに作動可能に連結した転写調節エレメント(例えば、プロモータ又は転写開始部位(TSS))に結合するか、又は転写調節エレメントに近接した配列に結合する第1発現リプレッサーと、第2ターゲティング部分と任意選択で第2エフェクター部分とを含む発現リプレッサーであって、標的遺伝子、例えば、MYCのスーパーエンハンサー領域に位置するゲノム遺伝子座に結合する第2発現リプレッサーとを含む、2つの発現リプレッサーを含むシステムを含む組成物を含む容器を含む。

20

【0986】

いくつかの実施形態では、キットは、b)疾患を治療するか、又は前記組成物を有する細胞内の標的遺伝子、例えば、MYCの発現を調節、例えば、低減するための少なくとも1つの方法を含む一連の説明書をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、任意選択で、前記組成物のための送達ビヒクル(例えば、脂質ナノ粒子)を含むことができる。試薬は、賦形剤及び/又は送達ビヒクルに懸濁させて提供してもよいし、又は、別個の成分として提供してもよく、これは、後に賦形剤及び/又は送達ビヒクルと組み合わせることができる。いくつかの実施形態では、キットは、所望の標的遺伝子発現、例えば、MYC遺伝子発現調節に影響を及ぼすために、組成物と同時投与しようとする追加の治療薬を任意選択で含有してもよい。説明資料は通常、書面又は印刷物を含むが、それらに限定されない。そのような命令を記憶し、それらをエンドユーザに伝達することができる任意の媒体が企図される。そうした媒体として、限定はされないが、電子記憶媒体(例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ)、光学媒体(例えば、CD ROM)などが挙げられる。このような媒体には、そうした説明資料を提供するインターネットサイトのアドレスが含まれ得る。

30

40

【0987】

いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の発現リプレッサー、発現抑制システム、例えば、発現リプレッサーを単位投与量で、又は本明細書に記載の発現抑制システム、例えば、発現リプレッサーをコードする核酸、例えば、ベクターを単位投与量で含む。

【0988】

以下の実施例は、本開示のいくつかの実施形態をさらに説明するために提供されるが、本開示の範囲の限定を意図するものではなく;それらの例示的な性質から、当業者には周

50

知の他の手順、方法、又は技術が代替的に使用され得ることは理解されよう。

【実施例】

【0989】

実施例1：CTCFモチーフの修飾をターゲティングするとMYCが下方制御される

この例は、CTCFモチーフ又はCTCFモチーフに隣接する領域をCas9でヌクレアーゼ編集することによるMYC発現の下方制御について記載する。

【0990】

この例では、エピジェネティックエフェクターの媒介によるMYC遺伝子の下方制御を導くのに最良の標的領域を同定するため、エキソン1に含まれるプロモータ領域CpG島に相補的な4つのsgRNAを設計した。c-MYC遺伝子には長鎖非翻訳エキソン1が含まれ（Spencer CA、Groudine M 1991）、エキソン2及び3には主要コード領域が含まれる。好適な下方制御領域を同定するため、4つのsgRNAによってMYCプロモータCpG島の領域にターゲティングされるCRISPR-dCas9-KRAB及びCRISPR-dCas9-MQ1（細菌モリクテス綱（Molluscutes）スピロプラズマ由来のDNMT）エフェクターを使用してゲノム編集を実施した。（1）sgRNAと組み合わせたdCas9（エフェクターなし）、及び（2）未処理細胞の両方を対照として使用して、MYC発現の変化を評価した。容易に成長する、且つトランスフェクトが可能な細胞K562及びHEK293でこれらの初期スクリーニングを実施してsgRNAを選択し、sgRNAのGD-28617が、MYC mRNAの下方制御に対する最も強力な効果を媒介したと決定した（データは示さず）。

【0991】

CTCFモチーフ（GD-28616）又はCTCFモチーフに直接隣接する上流領域（GD-28859）（CTCFアンカー部位）にターゲティングされるCas9を3つのヒトHCCモデル（HepG2、Hep3B及びSKHEP1）に2.5ug/mlのSSOP製剤と共にトランスフェクトした（表11及び図1A～図1B）。CTCFモチーフをCas9（GD-28616との組み合わせ）によって破壊すると、3つ全てのHCC細胞株（HepG2、Hep3B及びSKHEP1）でMYC発現が32～39%下方制御されることになった。CTCFモチーフに隣接する領域を破壊すると（GD-28859）、3つの株のうち2つ（HepG2及びHep3B）でMYC発現が35～45%下方制御された（図2A）。AmpSeqにより評価したときの編集効率によれば、細胞株の77～100%の編集が確認された（図2B）。

【0992】

【表68】

表 11: ガイド

ガイド名	標的部位	標的配列	ゲノム座標
GD-28616	CTCF	ATGATCTCTGCTGCCAGTAG (配列番号 1)	chr8:128746342-128746364
GD-28859	CTCF	ATCGCGCCTGGATGTCAACG (配列番号 2)	chr8:128746321-128746343
GD-28862	CTCF	ATTGTGCAGTGCATCGGATT (配列番号 3)	chr8:128746525-128746547
GD-28617	プロモータ	GTCAAACAGTACTGCTACGG (配列番号 4)	chr8:128748014-128748036

【0993】

実施例2：dCas9sgRNAに融合したKRABエフェクターによるMYC1発現の下方制御

この例は、dCas9sgRNAに融合したKRABエフェクターをCTCFモチーフ（GD-28616）又はCTCFモチーフに直接隣接する上流領域（GD-28859）又はMYCプロモータ（GD-28617）にターゲティングすることによるMYC1発現の下方制御について記載する。HCCにおけるMYC発現をターゲティングするため、CRISPR-dCas9システムを、それをKRABにテザリングすることによって修飾した。

【0994】

この例では、dCas9-KRAB mRNAをヒトHCC細胞株（HepG2、Hep3B及びSKHEP1）に送達し、ここでは個々のsgRNA（表1及び図1A～図1B）がそれをCTCFモチーフ（GD-28616）、CTCF「アンカー」部位（GD-28859）、又はMYCプロモータ（GD-28617）にターゲティングした。SOPによるLNP送達を用いてエフェクターmRNA及びsgRNAを共送達した。対照には、（1）sgRNAと組み合わせたdCas9（エフェクターなし）、及び（2）未処理細胞の両方を使用して、変化を評価した。HCC細胞を96ウェルプレート内の成長培地に播種した（5000細胞／ウェル）。次にLNP製剤（2～2.5ug／ml）を細胞に加えてmRNA及びsgRNAをトランスフェクトした。処理は全て、バイオロジカルトリPLICATEで行った。24～168時間までの範囲の時点について、MYC発現及び細胞生存能力を評価した。RNeasy（登録商標）plus 96ウェルキット（Qiagen）を製品のプロトコルに従い使用して、独立した4実験からRNAを単離した。LunaScript（登録商標）RT SuperMixキット（NEB）を使用してRNAサンプルをcDNAに逆転写し、MYC特異的TaqMan（商標）プライマー／プローブセットアッセイをTaqMan（商標）Fast Advancedマスターミックス（Thermo Scientific）と共に使用して定量的PCR（qPCR）により（テクニカルトリPLICATEで）分析した。GAPDH参照遺伝子の発現に対する相対的なMYC発現を $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて定量化した。未処理及びdCas9（エフェクターなし）サンプルを検量用物質として使用した。

【0995】

実験データによれば、LNPの媒介によるdCas9-KRAB／GD-28616のトランスフェクションにより、Hep3B及びSKHEP1においてMYC発現が48／72時間の時点で11～34％下方制御されたことが実証された。LNPの媒介によるdCas9-KRAB／GD-28859のトランスフェクションにより、3つのHCCモデル全てにおいてMYC発現が48／72時間の時点で18～44％下方制御された（図3）。この効果は、これらの株のうちの2つ（Hep3B及びSKHEP1）において168時間までに低下したが、HepG2株では168時間でMYC発現が28％下がったままであった（図3）。dCas9-KRABをdCas9-KRAB／GD-28617によってMYCプロモータに導くと、3つのHCCモデル全てにおいてMYC発現が48／72時間の時点で24～58％下方制御された。この効果は、これらの株のうちの2つ（Hep3B及びSKHEP1）において168時間までに低下したが、HepG2では168時間でMYCが43％下がったままであった（図3）。

【0996】

実施例3：ジンクフィンガードメインに融合したKRABエフェクターによるMYC1発現の下方制御

この例は、ジンクフィンガードメインに融合したKRABエフェクターをCTCFモチーフに直接隣接する上流領域にターゲティングすることによる（GD-28859）、MYC1発現の下方制御について記載する。

【0997】

この例では、ジンクフィンガー誘導型KRABエフェクター（ZF-KRABエフェク

10

20

30

40

50

ター)を、GD-28859が標的とするDNA領域におけるアンカー部位に結合するように設計した(図4A)。7つの構築物(dCas-KRAB/GD-59、ZF1-KRAB、ZF2-KRAB、ZF3-KRAB、ZF4-KRAB、ZF5-KRAB、及びZF6-KRAB)を設計し、ヒトHCCモデル(HepG2、Hep3B、SKHEP1)でスクリーニングした。これらの実験の陰性対照には未処理細胞が含まれ、dCas9-KRAB/GD-28859を陽性対照として使用した。Rneasy(登録商標)Plus 96ウェルキット(Qiagen)を製品のプロトコルに従い使用して、各々バイオロジカルトリプリケートで行った独立した2実験からRNAを単離した。LunaScript(登録商標)RT SuperMixキット(NEB)を使用してRNAサンプルをcDNAに逆転写し、MYC特異的Taqmanプライマー/プローブセットアッセイをTaqMan(商標)Fast Advancedマスターミックス(Thermo Scientific)と共に使用して定量的PCR(qPCR)により(テクニカルトリプリケートで)分析した。GAPDH参照遺伝子の発現に対する相対的なMYC発現を $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて定量化し、未処理及びdCas9(エフェクターなし)サンプルを検量用物質として使用した。CellTiter-GLO(登録商標)発光細胞生存能力アッセイ(Promega #G9241)を使用して細胞生存能力をATP定量化により評価した。HCC細胞を96ウェルプレート内の成長培地に播種した(5000細胞/ウェル)。次にLNP製剤(0.6~2.5ug/ml)を細胞に加えてmRNA及びsgRNAをトランスフェクトした。処理は全て、バイオロジカルトリプリケートで行った。

10

20

【0998】

これらのデータから、ZF2-KRAB、ZF3-KRAB及びZF4-KRABがHep3B細胞においてdCas9-KRAB/GD-28859と同程度又はそれより高度にMYCを下方制御し、ZF3-KRABが最も強力な下方制御効果を有したことが示された(図4B)。ZF3-KRABはまた、他の2つのHCCモデル、HepG2及びSKHEP1においても、dCas9-KRAB/GD-28859と同程度又はそれより高度にMYCを下方制御することを示した(図4C)。ZF3-エフェクターなし(NE)もまた、MYC発現に下方制御効果を有すると決定されたが、これは調節部位の立体化学的遮断に起因するものと思われる。ZF3-KRAB及びZF3-NEは両方とも、Hep3Bにおいて、24、72及び120時間の時間経過に伴うMYC発現及び生存能力に対する下方制御効果を実証した(図4D)。

30

【0999】

実施例4：dCas9sgRNAに融合したMQ1エフェクターによるMYC1発現の下方制御

この例は、dCas9sgRNAに融合したMQ1エフェクターをCTCFモチーフ(GD-28616)又はCTCFモチーフに直接隣接する上流領域(GD-28859)、GD-28862、又はMYCプロモータ(GD-28617)にターゲティングすることによるMYC1発現の下方制御について記載する。

【1000】

この例では、dCas9-MQ1 mRNAをヒトHCC細胞株(HepG2、Hep3B及びSKHEP1)に送達し、ここでは個々のsgRNA(表11及び図1A~図1B)がそれをCTCF「アンカー」部位、又はMYCプロモータにターゲティングした。SOPによるLNP送達を用いてエフェクターmRNA及びsgRNAを共送達した。対照には、(1)sgRNAと組み合わせたdCas9(エフェクターなし)、及び(2)未処理細胞の両方を使用して、変化を評価した。本質的に実施例2に記載のとおりプロトコルに従い本実験を行った。

40

【1001】

結果から、dCas9-MQ1をGD-16、GD-59及びGD-62によってCTCFにターゲティングすると、細胞株特異的に様々な下方制御及び上方制御につながったことが示された。dCas9-MQ1をGD-17によってプロモータにターゲティング

50

すると、3つのHCCモデル全てにおいて72時間で50～90%のMYC下方制御となり、これは168時間まで続いた（図5）。MYC下方制御により、HepG2及びHep3Bの72及び168時間における生存能力が劇的に低減したが、SK-HEP-1の生存能力はMYC下方制御の影響を最小限しか受けなかった。dCas9-sgRNA対照は、未処理対照と比較したとき、発現又は生存能力に何ら効果を及ぼさなかった

【1002】

実施例5：ジンクフィンガードメインに融合したMQ1エフェクターによるMYC1発現の下方制御

この例は、ジンクフィンガードメインに融合したMQ1エフェクターをMYCプロモータにターゲティングすることによる（GD-28617）、MYC1発現の下方制御について記載する。

【1003】

この例では、ジンクフィンガー誘導型MQ1エフェクター（ZF-MQ1エフェクター）を、GD-28617が標的とするDNA領域に結合するように設計した（図4A及び図6A）。6つの構築物（ZF7-MQ1、ZF8-MQ1、ZF9-MQ1、ZF10-MQ1、ZF11-MQ1、及びZF12-MQ1）をGD-28617の周りに、実施例4のスクリーニングで同定された領域に結合するように設計し、設計し、ヒトHCCモデル（HepG2、Hep3B、SKHEP1）でスクリーニングした。未処理細胞及びZFタンパク質単独をトランスフェクトした細胞（ZF-エフェクターなし、即ちZF-NE）をこの実験の陰性対照として使用し、dCas9-KRAB/GD-28859を陽性対照として使用した。実施例3に記載のとおりプロトコルに従った。

【1004】

結果から、ZF8-MQ1、ZF9-MQ1及びZF11-MQ1がHep3B細胞においてMYCを最も高度に下方制御し、ZF9-MQ1が最も強力な下方制御効果を有したことが実証された（図6B）。このデータによればさらに、MYC発現を低下させることに成功したZF-MQ1分子（ZF8-MQ1、ZF9-MQ1及びZF11-MQ1）のゲノム結合部位は、MYC発現を変化させなかったZF-MQ1分子（ZF7-MQ1、ZF10-MQ1及びZF12-MQ1）と近接していたことが実証された。これは、結合効率の効果、結合の3次元の向き、領域のメチル化の程度、又はMYCプロモータにおける調節エレメントに対して特異的なエフェクター位置にあった結果である可能性がある。ZF-エフェクター結合部位の僅かなシフトがMYC遺伝子調節に重大な帰結を及ぼすように見える。ZF9-MQ1は、3つのHCCモデル全てにおいてMYC mRNAを強力に下方制御し、生存能力を低下させること、及びZF9-MQ1構築物で見られるこうした効果が、dCas9-MQ1/GD-28617システムが導くことのできるものと比べてはるかに大きいことが分かった。

【1005】

実施例6：ZF9-MQ1は、他のZF-MQ1エフェクターと比較してMYC1発現に対する最も強力な下方制御効果を実証する

この例は、ジンクフィンガードメインに融合したMQ1エフェクターをMYCプロモータにターゲティングすることにより（GD-28617）、試験した他のZF-MQ1エフェクターと比較して、ZF9-MQ1がMYC1発現の下方制御に最も強力な効果を有することについて記載する。

【1006】

この例では、全てのHCCモデル（HepG2、Hep3B及びSKHEP1）におけるZF9-MQ1がMYC発現の下方制御に及ぼす効果を、それぞれ、ZF12-MQ1、ZF8-MQ1、及びdCas9-MQ1/GD-28617の効果と比較した。未処理細胞及びZFタンパク質単独をトランスフェクトした細胞（ZF-エフェクターなし、即ちZF-NE）をこの実験の陰性対照として使用し、dCas9-KRAB/GD-28859を陽性対照として使用した。実施例3に記載のとおりプロトコルに従った。

【1007】

10

20

30

40

50

Z F 9 - M Q 1 は、調べた 3 つの H C C モデル全てにおいて (H e p 3 B、H e p G 2 及び S K H E P 1)、Z F 1 2 - M Q 1 と比較して M Y C を強力に下方制御し、生存能力を低下させることを示した (図 7 A ~ 図 7 C)。Z F 9 - M Q 1 により調節された M Y C 1 発現の下方制御は、Z F 8 - M Q 1 の存在下で見られる下方制御と比較してより大きく (図 7 D ~ 図 7 F)、Z F 9 - M Q 1 構築物で見られる効果は、d C a s 9 - M Q 1 / G D - 2 8 6 1 7 システムによって導くことのできるものよりもはるかに大きい (図 7 G ~ 図 7 I)。これらのデータはさらに、Z F 9 - M Q 1 が 2 4 時間もの早さで M Y C 発現を下方制御した一方、生存能力に対する効果は 7 2 時間以降まで観察されなかったことを示した。対照的に、Z F 8 - M Q 1 で生じた M Y C m R N A の変化ははるかに小さく、及び細胞生存能力の低下ははるかに即時的であった。

10

【1008】

実施例 7 : d C a s 9 - M Q 1 は、M Y C 発現に対してヒト d C a s 9 - D N M T 1 又は d C a s 9 - D N M T - 3 A - 3 L よりも有意に大きい効果を及ぼす

この例では、d C a s 9 - M Q 1 が M Y C 発現に対してヒト d C a s 9 - D N M T 1 又は d C a s 9 - D N M T - 3 A - 3 L よりも有意に大きい効果を及ぼすことを実証する。

【1009】

この例では、K R A B、ヒト D N M T 1、ヒト D N M T 3 A - 3 L 融合体、ヒト D N M T 3 B m 原核生物 D N M T、及び M Q 1 を含めた一連の選択されたエピジェネティックリプレッサーに C R I S P R - d C a s 9 システムをテザリングすることによってそれを修飾した。これらの分子は、抑制性複合体を動員することによるか (K R A B)、又は D N A の C p G ヌクレオチドをメチル化することにより (D N M T 1、D N M T 3 A - 3 L、D N M T 3 B 及び M Q 1)、転写抑制を調節する。H e p G 2、H e p 3 B 及び S K H E P 1 を含めたヒト H C C 細胞株のパネルを利用して、肝細胞癌モデルにおいてエフェクタースクリーニングを実行した。G D - 2 8 6 1 7 s g R N A を d C a s 9 - D N M T m R N A と組み合わせ、L N P トランスフェクションによってこれらの細胞株に共送達した。s g R N A / C a s 9 の編集効率を測定することにより L N P 送達の有効性を評価する C R I S P R - C a s 9 研究により、このシステムを使用した 9 0 ~ 9 9 % の編集効率が確認された (データは示さず)。トランスフェクション後、次に複数の時点で細胞を M Y C m R N A 発現に関して q P C R により、及び生存能力に関して C e l l T i t e r - G L O (登録商標) によりアッセイした。バイサルファイトシーケンシングによる標的化した大域的メチル化分析のため、L u c i g e n D N A 抽出キットを使用してゲノム D N A を単離した。

20

30

【1010】

これらの研究は、d C a s 9 - M Q 1 が M Y C 発現に対し、調べたヒト d C a s 9 - D N M T 1 又は d C a s 9 - K R A B のいずれよりも有意に大きい効果を及ぼすことを実証している (データは示さず)。d C a s 9 - M Q 1 は、全 3 株において 7 2 時間で m R N A の 5 0 ~ 9 0 % の減少をもたらした (図 8 A)。M Y C 下方制御により、H e p G 2 及び H e p 3 B の 7 2 及び 1 6 8 時間における生存能力が劇的に減少したが、S K - H E P - 1 の生存能力は M Y C 下方制御の影響を最小限しか受けなかった (図 8 B)。d C a s 9 - s g R N A 対照は、未処理対照と比較したとき、発現又は生存能力に何ら効果を及ぼさ

40

【1011】

S K - H E P - 1 モデルは M Y C 下方制御時の生存能力の変化が最小限であることが実証されたため、この株を利用して、M Y C 発現に対する下方制御効果の持続性を評価した。5 日目、M Y C m R N A は、d C a s 9 D B D のみ及び未処理対照と比較したとき 8 0 % 減少した。7 日目及び 1 1 日目、M Y C m R N A はそれぞれ約 7 0 % 及び約 5 5 % 減少した。1 5 日目にまで至っても、転写物の約 4 0 % の下方制御が維持された (図 8 C)。一塩基対の分解能で 5 - メチルシトシンを測定する定性的及び定量的手段であるバイサルファイトゲノムシーケンシングを使用することにより、d C a s 9 - M Q 1 / G D - 2 8 6 1 7 で処理すると、ターゲティングされた領域にメチル化がデノボで導かれるこ

50

と、及びこれらの転写の変化が標的領域におけるCpGメチル化の割合と密接に相関している、メチル化が15日目まで持続すると確認されることを確立した(図8D)。

【1012】

実施例8：dCas9-MQ1/GD-17で治療するとインビボで腫瘍成長が阻害される

この例は、対照治療(PBS及び/又はdCas9/GD-SafeHarbor)と比較したとき腫瘍成長の阻害を生じた、皮下Hep3B異種移植片のdCas9-MQ1/GD-17治療のインビボ分析について記載する。

【1013】

この例では、試験群動物において0.6mg/mL LNP(MC3)に製剤化したエフェクター(dCas9-MQ1/GD-17)を1日目及び7日目に腫瘍内注射によって腫瘍部位に送達した(20μL/マウス)。対照群マウスには、腫瘍部位にPBS又は0.6mg/mL LNP(MC3)対照エフェクターdCas9/GD-SafeHarborのいずれかを注射した(20μL/マウス)。各対照群及び試験群は、SubQ Hep3B異種移植片(250mm³)を有する6匹の動物からなった。各群の腫瘍容積の変化を3日毎に15日間にわたって測定した。15日間の終了時、平均腫瘍容積の変化を対応のあるt検定を用いて測定し、プロットした。dCas9-MQ1/GD-17で治療したマウスは、いずれの対照群と比較しても、腫瘍容積の低下を示した(図9)。

【1014】

実施例9：dCas9-MQ1/GD-17はヒトヘパトサイトにおいてB型肝炎感染のコンテキストでMYCを下方制御する

この例は、dCas9-MQ1/GD-17がヒトヘパトサイトにおいてB型肝炎感染のコンテキストでMYCを下方制御することを実証する。

【1015】

この例では、ヒトヘパトサイト細胞にHBVを感染させて、非感染及び感染の両方のヘパトサイト細胞を播き、8日の期間にわたって成長させた。9日間の終了時、HBV感染したヒトヘパトサイト細胞は非感染細胞と比較して高いMYC発現を示した。非感染及びHBV感染ヘパトサイト細胞を両方ともLNPによって対照エフェクター(dCas9+SafeHarbor sgRNA(GD-SH))、又はエフェクターdCas9-MQ1/GD-17でトランスフェクトし、さらに48時間成長させた。次に、48時間後、MYC発現をqPCRにより評価した(図8)。この研究はバイオロジカルトリプレットで行った。Rneasy(登録商標)Plus 96ウェルキット(Qiagen)を製品のプロトコルに従い使用してRNAを単離した。LunaScript(登録商標)RT SuperMixキット(NEB)を使用してRNAサンプルをcDNAに逆転写し、MYC特異的TaqMan(商標)プライマー/プローブセットアッセイをTaqMan(商標)Fast Advancedマスターミックス(Thermo Scientific)と共に使用して定量的PCR(qPCR)により(テクニカルトリプレットで)分析した。GAPDH参照遺伝子の発現に対する相対的なMYC発現をΔΔCt法を用いて定量化し、dCas9+GD-SHサンプルを検量用物質として使用した。

【1016】

48時間後にqPCRにより評価し、非感染ヒトヘパトサイト対照で正規化したときのMYC発現によれば、dCas9-MQ1/GD-17(プロモータ)が非感染及び感染細胞でMYCを下方制御することが実証された(図10)。

【1017】

実施例10：ジンクフィンガードメイン+転写エフェクターの組み合わせをMYC ASMにターゲティングすると、MYC発現が下方制御される

この例は、ジンクフィンガードメインに融合したKRABエフェクター(又はエフェクターなし、即ちNE)を、CTCFモチーフに直接隣接する上流領域にターゲティングし(ZF3-NE又はZF3-KRAB)、及びジンクフィンガードメインに融合したMQ1エフェクターをMYCプロモータにターゲティングすると(ZF9-MQ1)、MYC

10

20

30

40

50

mRNA発現が下方制御されることを実証する。ZF9-MQ1とZF3-KRABとの組み合わせは、個別に又は組み合わせで、この実施例で試験した他のエフェクターと比較して、MYC発現の下方制御における有効性がより高い。

【1018】

HCC細胞株、Hep3Bにおいて、アンカーCTCFをターゲティングするZF3-NE又はZF3-KRABエフェクターを、MYCプロモータに結合してそれをターゲティングするように設計したZF9-MQ1と組み合わせた。dCas-KRAB/GD-28859及びdCas9-MQ1/GD-28617をこれらの2つの領域についての陽性対照で使用した。これらの実験の陰性対照には、未処理細胞並びにZF5-NE及び緑色蛍光タンパク質(GFP)をトランスフェクトした細胞を含めた。これらのエフェクターmRNAをSSOPによるLNP送達を用いて共送達した。HCC細胞を96ウェルプレート内の成長培地に播種した(約5000細胞/ウェル)。次にLNP製剤(0.6ug/ml)を細胞に加えてmRNAをトランスフェクトし、次に種々の時点にわたってインキュベートした。Rneasy(登録商標)Plus 96ウェルキット(Qiagen)を製品のプロトコルに従い使用して、3バイオロジカルレプリケートからRNAを単離した。LunaScript(登録商標)RT SuperMixキット(NEB)を使用してRNAサンプルをcDNAに逆転写し、MYC特異的TaqMan(商標)プライマー/プローブセットアッセイをTaqMan(商標)Fast Advancedマスターミックス(Thermo Scientific)と共に使用して定量的PCR(qPCR)により(テクニカルトリPLICATEで)分析した。GAPDH参照遺伝子の発現に対する相対的なMYC発現を $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて定量化し、未処理及びdCas9(エフェクターなし)サンプルを検量用物質として使用した。

10

20

【1019】

これらのデータから、ZF3-KRAB+ZF9-MQ1が、dCas9-KRAB/GD-28859、ZF3-KRAB、ZF3-NE、dCas9-MQ1/GD-28617、ZF9-MQ1単独又はZF3-NE又はZF5-NE+ZF9-MQ1の組み合わせよりも高度にMYCを下方制御したことが示された(図11)。GFP及びZF5-NE単独は、MYC発現に対して無視し得る程度の効果しかなかった。これらのデータは試験した時間経過にわたって(24、48及び72時間)同等であり、24時間後に最大となった抑制が、少なくとも72時間まで続いた。

30

【1020】

実施例11: 3つのHCCモデルにおいてZF9-MQ1とZF3-KRABとの組み合わせがMYC発現を下方制御する。

この例では、ZF9-MQ1とZF3-KRABとの組み合わせが、単独又は組み合わせで試験した他のエフェクターと比較して、追加のHCC細胞株(Hep3B、HepG2及びSKHEP1)においてMYC mRNA発現をさらに下方制御することを実証する。

【1021】

アンカーCTCFをターゲティングするZF3-NE又はZF3-KRABエフェクターを、3つのHCC細胞株、Hep3B、HepG2及びSKHEP1においてMYCプロモータに結合してそれをターゲティングするように設計したZF9-MQ1と組み合わせた。これらの実験の陰性対照には、ZF5-NEをトランスフェクトした細胞を含めた。これらのエフェクターmRNAをSSOPによるLNP送達を用いて共送達した。HCC細胞を96ウェルプレート内の成長培地に播種した(約5000細胞/ウェル)。次にLNP製剤(0.6ug/ml)を細胞に加えてmRNAをトランスフェクトし、次に種々の時点にわたってインキュベートした。Rneasy(登録商標)Plus 96ウェルキット(Qiagen)を製造者のプロトコルに従い使用して、3バイオロジカルレプリケートからRNAを単離した。LunaScript(登録商標)RT SuperMixキット(NEB)を使用してRNAサンプルをcDNAに逆転写し、MYC特異的TaqMan(商標)プライマー/プローブセットアッセイをTaqMan(商標)Fast

40

50

t Advancedマスターミックス (Thermo Scientific) と共に使用して定量的PCR (qPCR) により (テクニカルトリPLICATEで) 分析した。GAPDH参照遺伝子の発現に対する相対的なMYC発現を $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて定量化し、未処理及びdCas9 (エフェクターなし) サンプルを検量用物質として使用した。

【1022】

これらのデータから、ZF3-KRAB+ZF9-MQ1が、ZF9-MQ1単独又はZF3-NE+ZF9-MQ1の組み合わせよりも高度にMYCを下方制御したことが示された (図12)。このデータは、試験した時間経過 (24、48及び72時間) にわたって同等であった。

【1023】

実施例12：追加のHCCモデルにおけるZF9-MQ1についての生存能力及びMYC発現の用量反応曲線。

この例は、5つのHCC細胞株における用量反応曲線を用いたZF9-MQ1によるMyC発現及び細胞生存能力の下方制御について記載する。

【1024】

この例では、MYCプロモータに結合してそれをターゲティングするように設計したZF9-MQ1を5つのHCC細胞株、Hep3B、HepG2、SKHEP1、SNU-182及びSNU-449において複数の濃度で投与した (図13A)。d未処理細胞を陰性対照として使用した。エフェクターmRNAをSSOPによるLNP送達を用いて送達した。HCC細胞を96ウェルプレート内の成長培地に播種した (約5000細胞/ウェル)。次にLNP製剤 (5又は0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から始める) を各3ウェルに加え、次にmRNAをトランスフェクトするため6~10用量にわたって後続のウェルに約1:2で希釈し、次に72時間インキュベートした。生存能力及びRNA用に種々のレプリケートプレートを回収した。生存能力は、PromegaからのCelltiter GLOアッセイキットを用いて製造者のプロトコルに従い測定した。Rneasy (登録商標) Plus 96ウェルキット (Qiagen) を製造者のプロトコルに従い使用して、3バイオロジカルレプリケートからRNAを単離した。LunaScript (登録商標) RT SuperMixキット (NEB) を使用してRNAサンプルをcDNAに逆転写し、MYC特異的TaqMan (商標) プライマー/プローブセットアッセイをTaqMan (商標) Fast Advancedマスターミックス (Thermo Scientific) と共に使用して定量的PCR (qPCR) により (テクニカルトリPLICATEで) 分析した。GAPDH参照遺伝子の発現に対する相対的なMYC発現を $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて定量化し、未処理及びdCas9 (エフェクターなし) サンプルを検量用物質として使用した。用量反応曲線からEC50値を計算した。

【1025】

これらのデータから、ZF9-MQ1が、試験した5つ全てのHCC細胞株でMYC発現を下方制御し、生存能力を低下させたことが示された。ZF9-MQ1はMYC発現を下方制御し、EC50の範囲は0.0057~0.065 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LNP/mRNAであり、これらの5つのHCC細胞株におけるインビトロで72時間での生存能力に関するEC50効果は0.049~0.29 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲であった (図13B~図13F)。

【1026】

実施例13：ヌードマウスの皮下増殖Hep3BモデルにおけるZF9-MQ1のインビボ有効性。

この例では、ZF9-MQ1で治療することにより、雌ヌードマウスに樹立したHep3B腫瘍の成長が阻害されたことを実証する。

【1027】

Hep3B腫瘍細胞を30匹の雌ヌードマウスの左側腹部に移植して、腫瘍を誘導した。腫瘍容積の変化を測定し、平均腫瘍容積が約100~150 mm^3 に達したとき治療を開始した。マウスを各群の平均腫瘍容積がほぼ等しくなるように治療群と対照群とに分

10

20

30

40

50

割した。対照群には、P B S又は小分子比較対照薬であるM Y C i 9 7 5のいずれかを注射した。各群のマウスにP B Sを腫瘍内注射し（5日毎に3用量、次にI Vに切り替えて2用量）、Z F 9 - M Q 1を静脈内注射し（5日毎に3 m g / k gで）、又はM Y C i 9 7 5を腹腔内注射した（1日1回、5日／週にわたる）。全ての動物を毎日秤量し、目視で評価した。各群の腫瘍容積の変化は週3回測定した。22日間の経過にわたり、ベースラインからの体重の変化及び平均腫瘍容積を対応のあるt検定を用いて測定し、プロットした（図14A～図14B）。

【1028】

これらの結果は、Z F 9 - M Q 1が、P B S対照で治療したマウスと比較したとき、腫瘍成長を有意に低下させることができた（6日目以降）ことを示している。Z F 9 - M Q 1は、小分子比較対照薬（M Y C i 9 7 5）よりも大きく腫瘍成長を低下させた（図14A）。加えて、最終回用量から48時間後のI H C染色により、Z F 9 - M Q 1ポリペプチドの発現、M Y C発現の減少、及びK i 6 7によって測定したときの増殖の減少が明らかになった（データは示さず）。Z F 9 - M Q 1は全体的な動物の体重に最小限の効果しか及ぼさなかった（図14B）。

10

【1029】

実施例14：F o x C h a s e C B 1 7 S C I Dマウスの同所性増殖H e p 3 BモデルにおけるZ F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A Bのインビボ有効性。

この例では、雌F o x C h a s e C B 1 7 S C I Dマウスの同所性H e p 3 B - l u cモデルにおいて、バイシストロン性Z F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A Bの投与後の長期抗腫瘍有効性及び持続性を実証する。

20

【1030】

H e p - 3 B - l u c細胞をS C I Dマウスの肝左上葉に注射した。無作為化時の各群の平均腹側表示全身腫瘍関連生物発光（T A B L）は、約 2.8×10^9 p / sであった。細胞の移植後7日目に、マウスをP B S及びZ F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A Bによる治療の各12匹のマウスの2群並びにソラフェニブによる治療の6匹のマウスの1群に無作為に割り付けた。治療は、腫瘍細胞の移植後8日目開始した（グラフ上では投与1日目として示される）。マウスをP B Sで静脈内治療し（5日毎に4用量、次に3日毎に2用量）、L N P（M C 3）Z F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A Bで静脈内治療し（1.5 m g / k gで5日毎に2用量、3 m g / k gで5日毎に3用量、3 m g / k gで3日毎に1用量）、ソラフェニブで経口治療した（連日50 m g / k g）。全ての動物を毎日秤量し、目視で評価した。腫瘍サイズを生物発光により週2回測定した。

30

【1031】

これらの結果は、Z F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A Bで治療すると、P B S対照で治療したマウスと比較したとき、腫瘍成長が有意に低下した（21日目以降）ことを示している。Z F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A Bにより低下した腫瘍成長は、ソラフェニブと同等であった（図15A）。Z F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A Bによる治療は全体的な動物の体重に最小限の効果しか及ぼさなかった（図15B）。

【1032】

実施例15：ヌードマウスの皮下増殖H e p 3 BモデルにおけるZ F 9 - M Q 1及び共製剤化したZ F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A Bのインビボ有効性。

40

この例では、Z F 9 - M Q 1及び共製剤化したZ F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A Bが雌ヌードマウスにおいてH e p 3 B腫瘍の成長を用量依存的に阻害することが可能であったことを実証する。

【1033】

H e p 3 B腫瘍細胞を72匹の雌ヌードマウスの左側腹部に移植して腫瘍を誘導した。腫瘍容積の変化を測定し、平均腫瘍容積が約 200 mm^3 に達したとき治療を開始した。マウスを各群の平均腫瘍容積がほぼ等しくなるように9治療群（各8匹のマウス）に分割した。各群のマウスにP B S（5日毎に3用量、次に3日毎に3用量）、1 m g / k g及び3 m g / k gのZ F 9 - M Q 1（5日毎に3用量、次に3日毎に3用量）、1 m g /

50

k g 及び 3 m g / k g の共製剤化した Z F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A B (5 日毎に 3 用量、次に 3 日毎に 3 用量)、1 m g / k g 及び 3 m g / k g の陰性対照 m R N A (5 日毎に 3 用量、次に 3 日毎に 3 用量) を静脈内注射するか、1 0 0 m g / k g の M Y C i 9 7 5 (1 日 1 回を週に 5 日間) を腹腔内注射するか、又は 1 m g / k g のシスプラチン (1 5 日毎に 1 回) を腹腔内注射した。全ての動物を毎日秤量し、目視で評価した。腫瘍容積の変化は週 3 回測定した。

【1034】

これらの結果は、陰性対照で治療したマウスと比較したとき、1 m g / k g の Z F 9 - M Q 1 が個別に、及び Z F 9 - M Q 1 と Z F 3 - K R A B との組み合わせで腫瘍成長を低下させることが可能であったことを示している (図 1 6 A) 。さらに、3 m g / k g の Z F 9 - M Q 1 は、個別に (1 3 日目以降)、及び共製剤化した Z F 9 - M Q 1 + Z F 3 - K R A B の組み合わせで (6 日目以降)、陰性対照で治療したマウスと比較したとき、腫瘍成長を有意に低下させることが可能であった (図 1 6 B) 。共製剤化した Z F 9 - M Q 1 + / Z F 3 - K R A B は、1 m g / k g 及び 3 m g / k g の両方の投与量で、腫瘍成長をシスプラチン又は小分子比較対照薬 (M Y C i 9 7 5) と同様の又はそれより高いレベルで低下させることが可能であった。共製剤化した Z F 9 - M Q 1 + / - Z F 3 - K R A B が全体的な動物の体重に及ぼした効果は、1 m g / k g 及び 3 m g / k g の両方の投与量でシスプラチン及び M Y C i 9 7 5 のいずれと比較しても最小限であった (図 1 6 C ~ 図 1 6 D) 。

【1035】

実施例 1 6 : ジンクフィンガードメイン + D N A メチルトランスフェラーゼの組み合わせを M Y C 隔離ゲノムドメイン (i n s u l a t e d g e n o m i c d o m a i n : I G D) にターゲティングすると、様々な肺癌細胞株において M Y C 発現が下方制御され、及び細胞生存能力が低下する

この例では、N S C L C 株 (A 5 4 9 、 N C I - H 2 0 0 9 、 N C I - H 3 5 8 H C C 9 5) においてジンクフィンガードメインに融合した M Q 1 エフェクターによる M Y C プロモータのターゲティング (Z F 9 - M Q 1) によって M y c 1 m R N A 発現を下方制御すると、数多くの肺癌細胞株で細胞生存能力の喪失が生じることを実証する。

【1036】

肺癌細胞株で M Y C プロモータに結合してそれをターゲティングするように設計した Z F 9 - M Q 1 を、未処理細胞及び緑色蛍光タンパク質 (G F P) をトランスフェクトした細胞を含んだ陰性対照と一緒に送達した。Z F 9 - M Q 1 又は G F P のいずれをコードする m R N A も、上記の実施例 1 2 及び 1 4 に記載のとおり S S O P L N P 送達を用いて送達した。肺癌細胞を 9 6 ウェルプレート内の成長培地に播種した (約 1 0 0 0 0 細胞 / ウェル) 。次に L N P 製剤 (1 u g / m l) を細胞に加えて m R N A をトランスフェクトし、次にそれぞれ 7 2 時間及び 1 2 0 時間インキュベートした。生存能力及び m R N A 発現の変化を決定するため、種々のレプリケートプレートを回収した。

【1037】

生存能力は、P r o m e g a から C e l l T i t e r - G L O (登録商標) アッセイキットを製造者のプロトコルに従い使用して測定した。R n e a s y (登録商標) P l u s 9 6 ウェルキット (Q i a g e n) を製品のプロトコルに従い使用して、3 バイオロジカルレプリケートから R N A を単離した。L u n a S c r i p t (登録商標) R T S u p e r M i x キット (N E B) を使用して R N A サンプルを c D N A に逆転写し、M Y C 特異的 T a q M a n (商標) プライマー / プロブセットアッセイを T a q M a n (商標) F a s t A d v a n c e d マスターミックス (T h e r m o S c i e n t i f i c) と共に使用して定量的 P C R (q P C R) により (テクニカルトリPLICATE で) 分析した。G A P D H 参照遺伝子の発現に対する相対的な M Y C 発現を $\Delta \Delta C t$ 法を用いて定量化し、未処理サンプルを検量用物質として使用した。

【1038】

これらのデータから、Z F 9 - M Q 1 は 4 つの肺癌細胞株において M Y C m R N A レ

ベルを80%超低下させることができ、これは、4つ全ての細胞株における肺癌細胞生存能力の有意な喪失と一致したことが示された（図17A～図17H）。

【1039】

実施例17：ZF9-MQ1はNSCLC細胞株NCI-H2009において細胞アポトーシスを誘導する

この例では、ZF9-MQ1が肺癌細胞の細胞アポトーシスに及ぼす効果を実証する。

【1040】

Cell Titer Glo（実施例16で使用した）などの生存能力アッセイは、ATPレベルに基づきウェル内に残る細胞の相対数を決定することによって生存能力を測定する。これらのアッセイは、細胞増殖の喪失と異なる種類の細胞死との間（例えば、ネクロトーシス対アポトーシス）を区別しない。

10

【1041】

ZF9-MQ1のトランスフェクション後に、蛍光タグを付加した抗アネキシンVタンパク質抗体及びヨウ化プロピジウム（PI）核染色を利用してアポトーシス細胞を定量化した。未処理細胞に加えて、エフェクタータンパク質のないZF9ジンクフィンガードメインをコードするmRNA（ZF9-NE）を陰性対照として使用した。肺癌細胞株NCI-H2009を12ウェルプレート内の成長培地に播いた（各ウェル50,000細胞）。次にmRNA（1ug/ml）を含むLNP製剤を細胞に加えてZF9-MQ1又はZF9-NE mRNAをトランスフェクトし、次に96時間インキュベートした。細胞を回収し、BDアネキシンV：FITCアポトーシス検出キット（BDB556570）を使用して染色し、フローサイトメトリーにより分析した。アネキシンV-FITC及びPIが陽性の細胞をアポトーシス性と分類した。

20

【1042】

これらのデータから、96時間後、陰性対照（ZF9-NEで処理した細胞及び未処理細胞）では僅か18%の細胞がアポトーシス性であったことが示された（図18A～図18B、図18D）。対照的に、ZF9-MQ1で処理したNCI-H2009培養物では、40%の細胞がアポトーシス性であった（図18C～図18D）。これは、ZF9-MQ1が肺癌細胞の細胞アポトーシスを誘導できたことを示している。

【1043】

実施例18：追加のNSCLC細胞株におけるZF9-MQ1についての生存能力及びMYC発現の用量反応曲線。

30

この例では、ZF9-MQ1がNSCLC細胞株においてMYC1発現及び細胞生存能力を用量反応性のある形で下方制御することを実証する。

【1044】

MYCプロモータに結合してそれをターゲティングするように設計したZF9-MQ1を、2つのNSCLC細胞株、A549及びHCC95において複数の濃度で投与した。未処理細胞を陰性対照として使用した。SSOPによるLNP送達を用いてエフェクターmRNAを送達した。肺癌細胞を96ウェルプレート内の成長培地に播種した（約10000細胞/ウェル）。次にLNP製剤（5ug/mlから始める）を各3ウェルに加え、次に後続のウェルに10用量にわたって約1：2で希釈することによりmRNAをトランスフェクトし、72時間インキュベートした。生存能力及びmRNA発現の変化を決定するため、種々のレプリケートプレートを回収した。

40

【1045】

生存能力は、PromegaからのCellTiter-Glo（登録商標）アッセイキットを製造者のプロトコルに従い使用して測定した。Rneasy（登録商標）Plus 96ウェルキット（Qiagen）を製造者のプロトコルに従い使用して、3バイオリジカルレプリケートからRNAを単離した。LunaScript（登録商標）RT SuperMixキット（NEB）を使用してRNAサンプルをcDNAに逆転写し、MYC特異的TaqMan（商標）プライマー/プローブセットアッセイをTaqMan（商標）Fast Advancedマスターミックス（Thermo Scientific

50

i c) と共に使用して定量的 PCR (qPCR) により (テクニカルトリPLICATEで) 分析した。GAPDH 参照遺伝子の発現に対する相対的な MYC 発現を $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて定量化し、未処理及び dCas9 (エフェクターなし) サンプルを検量用物質として使用した。

【1046】

データから、ZF9-MQ1 により MYC が下方制御されたことが明らかになり、インビトロで A549 及び HCC95 の両方において 72 時間の EC50 は $0.08 \mu\text{g}/\text{mL}$ LNP/mRNA であり、生存能力への EC50 効果 ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$) の約 25 倍の高さであった (図 19A ~ 図 19B)。

【1047】

実施例 19: ZF9-MQ1 は NSCLC 細胞株 NCI-H2009 において MYC タンパク質レベルを 80% 超低下させる

この例では、ZF9-MQ1 処理に反応した MYC タンパク質レベルの変化をイムノブロットング技法で実証する。

【1048】

肺癌細胞株で MYC プロモータに結合してそれをターゲティングするように設計した ZF9-MQ1 を陰性対照 ZF9-NE 及び未処理細胞と一緒に送達した。肺癌細胞株 NCI-H2009 を 12 ウェルプレート内の成長培地に播いた (各ウェル 50,000 細胞)。次に LNP 製剤 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) を細胞に加えて ZF9-MQ1 又は ZF9-NE mRNA をトランスフェクトし、次に 96 時間インキュベートした。次に細胞を RIPA 緩衝液で溶解させて、Pierce BCA タンパク質アッセイ (23225) を用いてタンパク質レベルを定量化した。各サンプルに等量のタンパク質をロードし、NuPAGE (商標) ミニゲルシステム (Thermo Fisher) を使用してサイズ別に分離した。次に iBlot (商標) 2 ゲル転写装置 (Thermo Fisher) を使用してタンパク質を PVDF 膜に転写した。膜を ABCAM 抗 MYC 抗体 (ab32072) で一晩プローブした。Cell Signaling 抗アクチン抗体 (8H10D10) をローディング対照として使用した。次にシグナルを可視化し、MYC 及びアクチン抗体種に対する蛍光二次抗体を使用した LI-COR イメージングシステムを使用して定量化した。

【1049】

データから、ZF9-MQ1 処理により、肺癌細胞株において処理 96 時間後に MYC タンパク質レベルが 80% 超低下し (図 20A ~ 図 20B)、mRNA 発現レベルの低下と同等であった (実施例 17) ことが示された。

【1050】

実施例 20: ヌードマウスの皮下増殖 NCI-H2009 モデルにおける ZF9-MQ1 のインビボ有効性。

この例では、ZF9-MQ1 が、雌ヌードマウスに樹立した NCI-H2009 腫瘍の成長を阻害することを実証する。

【1051】

雌ヌードマウスにおいて、NCI-H2009 腫瘍細胞を左側腹部に移植することにより疾患を誘導した。平均腫瘍容積が約 $100 \sim 150 \text{ mm}^3$ に達したとき治療を開始した。マウスを各群の平均腫瘍容積がほぼ等しくなるように治療群に分割した。mRNA を MC3 LNP で送達した。マウスに $3 \text{ mg}/\text{kg}$ の MC3 LNP 中の ZF9-MQ1 若しくは非コード mRNA 又は PBS を静脈内注射した (5 日毎に 1 回を 4 用量、次に 3 日毎に 1 回を 3 用量; マウスには合計 7 用量を与えた)。全ての動物を毎日秤量し、目視で評価した。腫瘍サイズは週 3 回測定した。

【1052】

これらの結果から、ZF9-MQ1 が、PBS 対照で治療したマウスと比較したとき腫瘍成長を有意に低下させることが可能であった (8 日目以降) ことが示された (図 21)。ZF9-MQ1 は全体的な動物の体重に最小限の効果しか及ぼさなかった。

10

20

30

40

50

【1053】

実施例21：SSOP LNPを使用してガイドRNA＋転写リプレッサーの組み合わせを（dCas9によって）MYC IGDスーパーエンハンサーにターゲティングすると、MYC発現が下方制御される

この例では、A549細胞株のMYC発現を調節する肺特異的スーパーエンハンサーをKRABエフェクタータンパク質によってターゲティングすると、MYC mRNA発現が下方制御されることを実証する。

【1054】

肺スーパーエンハンサー領域にわたってガイドRNA（表13）を設計し、酵素的にデッド型のCAS9にコンジュゲートしたKRABリプレッサータンパク質と組み合わせて試験した。エフェクターmRNA及びガイドRNAをSSOPによるLNP送達を用いて共送達し、GFPのmRNA送達を陰性対照とした。NCSLC細胞株A549を96ウェルプレート内の成長培地に播種した（約10000細胞／ウェル）。次にLNP製剤（2.5ug／ml）を細胞に加えてエフェクターmRNA／ガイドRNAをトランスフェクトし、次に72時間インキュベートした。Rneasy（登録商標）Plus 96ウェルキット（Qiagen）を製品のプロトコルに従い使用して、3バイオロジカルレプリケートからRNAを単離した。LunaScript（登録商標）RT SuperMixキット（NEB）を使用してRNAサンプルをcDNAに逆転写し、MYC特異的TaqMan（商標）プライマー／プローブセットアッセイをTaqMan（商標）Fast Advancedマスターミックス（Thermo Scientific）と共に使用して定量的PCR（qPCR）により（テクニカルトリPLICATEで）分析した。GAPDH参照遺伝子の発現に対する相対的なMYC発現を $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて定量化し、未処理サンプルを検量用物質として使用した。

【1055】

10

20

30

40

50

【表 6 9】

表 13: ガイド

ガイド名	標的配列	ゲノム座標
GD-29833	TGCCACTTCCCCACTAACCC (配列番号 96)	GRCh37: chr8:129188878-129188900
GD-29834	GGCCACACAAGGAAGCTGCA (配列番号 97)	GRCh37: chr8:129188958-129188980
GD-29835	CCACACAAGGAAGCTGCAGG (配列番号 98)	GRCh37: chr8:129188960-129188982
GD-29836	TGATTGGAATGCAACCCGAA (配列番号 99)	GRCh37: chr8:129189067-129189089
GD-29837	TTTGTCCCTTGCTACCCCAA (配列番号 100)	GRCh37: chr8:129189457-129189479
GD-29838	AGCTGATGGTATCCACTAGG (配列番号 101)	GRCh37: chr8:129189554-129189576
GD-29839	CACATCCAAGAATGTAGTGG (配列番号 102)	GRCh37: chr8:129189679-129189701
GD-29840	GATACAGCCACAAAGCTCAC (配列番号 103)	GRCh37: chr8:129209511-129209533
GD-29841	ATTACATAACAGAATCCAGG (配列番号 104)	GRCh37: chr8:129209643-129209665
GD-29842	CCCTTGACTGTGCTGCCACC (配列番号 105)	GRCh37: chr8:129209658-129209680
GD-29843	CAGACGAGGAACCTGAACCC (配列番号 106)	GRCh37: chr8:129209856-129209878
GD-29844	AGAATCCCTTGGGGTAGCAA (配列番号 107)	GRCh37: chr8:129189452-129189474
GD-29914	CAGCACTCTCGCTGACCGCA (配列番号 108)	GRCh37: chr8:129189190-129189212
GD-29915	GTTGAGTCATGTGTACTCTG (配列番号 109)	GRCh37: chr8:129189274-129189296
GD-29916	AGGAACAGGATGTTACAACT (配列番号 110)	GRCh37: chr8:129189421-129189443
GD-28662	GGGGCCACTAGGGACAGGAT (配列番号 111)	GRCh37: chr19:55627120-55627139

【1056】

これらのデータは、ガイドRNA GD-29833及び29914が、dCAS9-KRABエフェクターmRNAと共に送達したときMYC mRNAレベルを下方制御できたことを示したものであり、この遠位調節エレメントを使用して発癌性MYCを低減可能であることが強調される（図22）。

【1057】

実施例22：MC3 LNPを使用してガイドRNA+転写リプレッサー（dCas9）の組み合わせをMYC IGDスーパーエンハンサーにターゲティングすると、MYC発現が下方制御される

10

20

30

40

50

この例は、代替的な脂質MC3（実施例21のSSOPに対して）を利用してKRABエフェクタータンパク質を、MYC発現を調節する肺特異的スーパーエンハンサーにターゲティングすることによるMYC mRNA発現の下方制御について記載する。

【1058】

肺スーパーエンハンサー領域にわたってガイドRNA（表13）を設計し、酵素的にデッド型のCAS9にコンジュゲートしたKRABリプレッサータンパク質と組み合わせて試験した。MC3によるLNP送達を用いてエフェクターmRNA及びガイドRNAを共送達し、GFPのmRNA送達を陰性対照とした。NCSC細胞株A549を96ウェルプレート内の成長培地に播種した（約10000細胞／ウェル）。次にLNP製剤（2.5ug／ml）を細胞に加えてエフェクターmRNA／ガイドRNAをトランスフェクトし、次に72時間インキュベートした。Rneasy（登録商標）Plus 96ウェルキット（Qiagen）を製品のプロトコルに従い使用して、3バイオロジカルレプリケートからRNAを単離した。LunaScript（登録商標）RT SuperMixキット（NEB）を使用してRNAサンプルをcDNAに逆転写し、MYC specific TaqMan（商標）プライマー／プローブセットアッセイをTaqMan（商標）Fast Advancedマスターミックス（Thermo Scientific）と共に使用して定量的PCR（qPCR）により（テクニカルトリPLICATEで）分析した。GAPDH参照遺伝子の発現に対する相対的なMYC発現を $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて定量化し、未処理サンプルを検量用物質として使用した。

【1059】

これらのデータは、ガイドRNA GD-29833及び29914が、dCAS9-KRABエフェクターmRNAと共に送達したときMYC mRNAレベルを下方制御できたことを示したものであり、この遠位調節エレメントを使用して発癌性MYCを低減可能であることが強調される（図23）。この効果は、SSOP（実施例21）及びMC3脂質トランスフェクション（実施例22）の両方で見られた。

【1060】

実施例23：NSCLCにおいてガイドRNA＋転写リプレッサー（dCas9）の組み合わせをMYC IGDスーパーエンハンサーにターゲティングすると、MYC発現が下方制御される

この例は、様々な転写エフェクタータンパク質（EZH2、EZH2-KRAB、又はMQ1）を、MYC発現を調節する肺特異的スーパーエンハンサーにターゲティングすることによるMYC mRNA発現の下方制御について記載する。

【1061】

MYCスーパーエンハンサーにターゲティングされるガイドRNA（GD-29833及びGD-29914）について、酵素的にデッド型のCAS9にコンジュゲートしたヒストンメチルトランスフェラーゼEZH2（単独で、又はKRABと併せて）及びDNAメチルトランスフェラーゼMQ1を含むリプレッサータンパク質と組み合わせて試験した。エフェクターmRNA及びガイドRNAをSSOPによるLNP送達を用いて共送達し、GFPのmRNA送達を陰性対照とした。NCSC細胞株A549又はNCI-H2009を96ウェルプレート内の成長培地に播種した（約10000細胞／ウェル）。次にLNP製剤（2.5ug／ml）を細胞に加えてエフェクターmRNA／ガイドRNAをトランスフェクトし、次に72時間インキュベートした。Rneasy（登録商標）Plus 96ウェルキット（Qiagen）を製品のプロトコルに従い使用して、3バイオロジカルレプリケートからRNAを単離した。LunaScript（登録商標）RT SuperMixキット（NEB）を使用してRNAサンプルをcDNAに逆転写し、MYC特異的TaqMan（商標）プライマー／プローブセットアッセイをTaqMan（商標）Fast Advancedマスターミックス（Thermo Scientific）と共に使用して定量的PCR（qPCR）により（テクニカルトリPLICATEで）分析した。GAPDH参照遺伝子の発現に対する相対的なMYC発現を $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて定量化し、未処理サンプルを検量用物質として使用した。

【1062】

これらのデータから、2つの異なるNSCLC細胞株（A549及びNCI-H2009）で試験したガイドRNA GD-29833及び29914が、3つ全てのエフェクタータンパク質（EZH2、EZH2-KRAB、及びMQ1）と共に送達したとき、MYC mRNAレベルを有効に下方制御できたことが示された（図24A～図24B）。

【1063】

実施例24：ガイドRNA＋転写リプレッサー（dCas9）の組み合わせをMYC IGDスーパーエンハンサーにターゲティングすると、120時間でNSCLCのMYC発現がさらに下方制御される

この例では、肺癌細胞株（A549及びNCI-H2009）にスーパーエンハンサーターゲティングガイドをKRAB又はMQ1エフェクタータンパク質と共にトランスフェクトした後120時間で観察されるMYC mRNA発現の減少の増加を実証する。

【1064】

MYCスーパーエンハンサーにターゲティングされるガイドRNAをKRABリプレッサータンパク質又はMQ1 DNAメチルトランスフェラーゼと組み合わせて試験した。エフェクターmRNA及びガイドRNAをSSOPによるLNP送達を用いて共送達し、GFPのmRNA送達を陰性対照とした。NSCLC細胞株A549又はNCI-H2009を12ウェルプレート内の成長培地に播種した（約50000細胞／ウェル）。次にLNP製剤（2.5 µg／ml）を細胞に加えてエフェクターmRNA／ガイドRNAをトランスフェクトし、次に120時間インキュベートした。Rneasy（登録商標）Plus 96ウェルキット（Qiagen）を製品のプロトコルに従い使用して、3バイオロジカルレプリケートからRNAを単離した。LunaScript（登録商標）RT Super Mixキット（NEB）を使用してRNAサンプルをcDNAに逆転写し、MYC特異的TaqMan（商標）プライマー／プローブセットアッセイをTaqMan（商標）Fast Advancedマスターミックス（Thermo Scientific）と共に使用して定量的PCR（qPCR）により（テクニカルトリプリケートで）分析した。GAPDH参照遺伝子の発現に対する相対的なMYC発現を $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて定量化し、未処理サンプルを検量用物質として使用した。

【1065】

これらのデータから、ガイドRNA GD-29833及び29914をKRAB又はMQ1と共に送達すると、2つのNSCLC細胞株（A549及びNCI-H2009）において120時間でのMYC mRNAレベルを有意に下方制御することができたことが示された（図25A～図25B）。さらに、観察される下方制御は、NCI-H2009におけるZF9-MQ1処理によって観察される下方制御と同等である（図25B）。

【1066】

実施例25：dCAS9-MQ1をMYCスーパーエンハンサーに導くと、スーパーエンハンサー標的部位及びMYCプロモータ領域のDNAメチル化が増加することになる。

この例では、dCAS9-MQ1をMYCスーパーエンハンサーに導くと、標的部位及びMYCプロモータ領域のメチル化を生じさせることができることを実証する。

【1067】

CRISPR-dCas9システムを、それをエピジェネティックリプレッサー：MQ1にテザリングすることによって修飾した。これらの分子は、DNAのCpGヌクレオチドの転写抑制メチル化を調節する。エフェクターmRNA及びスーパーエンハンサーガイドRNA（29833及び29914）をSSOPによるLNP送達を用いて共送達し、GFP又はdCAS9-エフェクターなし構築物（dCAS9-NE）のmRNA送達を陰性対照とした。NSCLC細胞株NCI-H2009を6ウェルプレート内の成長培地に播種した（約100000細胞／ウェル）。次にLNP製剤（2.5 µg／ml）を細胞に加えてエフェクターmRNA／ガイドRNAをトランスフェクトし、次に72時間インキュベートした。Lucigen QuickExtract（商標）DNA抽出キットを使用してDNAを単離し、プロモータ及びスーパーエンハンサー領域の標的化したバ

10

20

30

40

50

イサルファイトシーケンシングを用いて、メチル化された領域を決定した。

【1068】

これらの研究は、dCas9-MQ1によりNSCLCの標的部位のメチル化が60%増加したこと、また、メチル化が遠位プロモータ領域に導かれた（約50%にまで増加した）ことも実証している（図26A～図26B）。

【1069】

実施例26：ガイドRNA+転写リプレッサーの組み合わせを（「デッド」CAS9によって）MYC IGDスーパーエンハンサーにターゲティングすると、NSCLC細胞株NCI-H2009のMYCタンパク質レベルが低下する

この例では、ガイドRNAをNSCLC細胞のMYCスーパーエンハンサーにターゲティングすることによるMYCタンパク質レベルの変化をイムノブロットング技法で実証する。

【1070】

肺癌細胞株のMYCスーパーエンハンサーに結合してそれをターゲティングするように設計したGD-29833をdCAS9-KRAB又はdCAS9-MQ1エフェクターmRNAと共送達した。肺癌細胞株NCI-H2009を12ウェルプレート内の成長培地に播いた（各ウェル50,000細胞）。次にLNP製剤（1ug/ml）を細胞に加えてガイド及びエフェクターmRNAをトランスフェクトし、次に96時間インキュベートした。dCAS9-エフェクターなし（dCAS9-NE）構築物を陰性対照として使用した。次に細胞をRIPA緩衝液で溶解させて、Pierce BCAタンパク質アッセイ（23225）を用いてタンパク質レベルを定量化した。各サンプルに等量のタンパク質をロードし、NuPAGE（商標）ミニゲルシステム（Thermo Fisher）を使用してサイズ別に分離した。次にInvitrogen iBlot（商標）2ゲル転写装置（Thermo Fisher）を使用してタンパク質をPVDF膜に転写した。膜をABCAm抗MYC抗体（ab32072）で一晩プローブした。Cell Signaling抗アクチン抗体（8H10D10）をローディング対照として使用した。次にシグナルを可視化し、MYC及びアクチン抗体種に対する蛍光二次抗体を使用したLIECORイメージングシステムを使用して定量化した。

【1071】

これらのデータから、ガイドを転写リプレッサーでMYC肺スーパーエンハンサーに導くと、MYCタンパク質レベルがNCI-H2009肺癌細胞株において96時間で最大50%低下することが示され（図27A～図27B）、mRNA発現レベルの低下と同等であった（実施例16）。

【1072】

実施例27：全細胞ライセートに存在するZF9-MQ1タンパク質は、Hep3B細胞株におけるMYCタンパク質の下方制御と相関する

この例は、ZF9-MQ1による処理後のHep3B細胞における時間の経過に伴うZF9-MQ1及びMYCタンパク質発現レベルの変化の決定について記載する。

【1073】

ZF9-MQ1処理の6、16及び48時間後にZF9-MQ1及びMYCタンパク質発現レベルを評価し（ウエスタンブロット）、処理開始から24時間後にLNPを取り除き、培地を交換した。RIPA緩衝液を使用してタンパク質を抽出し、BCAアッセイ（Thermo Fisher）を使用して全タンパク質を定量化した。全タンパク質をNuPAGE（商標）ビスートリスゲル（Thermo Fisher）、MOPSLランニング緩衝液に流し、iBlot（商標）2ゲル転写装置（Thermo Fisher）を使用して転写した。

【1074】

MYCウェスタン：β-アクチン抗体は、594nm波長で発光するフルオロフォアタグを付加した二次抗体で染色し、MYC抗体（Abcam）は、488nmの波長で発光するフルオロフォアタグを付加した二次抗体で染色した。近赤外（NIR）蛍光を用いる

O d y s s e y（登録商標）C L x イメージングシステム（L I - C O R）を使用してタンパク質画像を取得し、それをL I - C O Rソフトウェアによる定量化に使用した。各M Y C 及びアクチンバンドの曲線下面積（A U C）についてバックグラウンド面積を差し引き、次に全てを時点毎に陰性対照で正規化した。

【1075】

Z F 9 - M Q 1（赤血球凝集素 [H A] エピトープタグを付加した対照物質）ウェスタン：β - アクチン抗体は、594 nmの波長で発光するフルオロフォアタグを付加した二次抗体で染色し、H A 抗体は、488 nmの波長で発光するフルオロフォアタグを付加した二次抗体で染色した。N I R 蛍光を用いるO d y s s e y（登録商標）C L x イメージングシステム（L I - C O R）を使用してタンパク質画像を取得し、それを使用してL I - C O Rソフトウェアによって定量化した。各H A 及びアクチンバンドのA U Cについてバックグラウンド面積を差し引き、次に全てを時点毎に陰性対照で正規化した。

10

【1076】

データは、細胞をZ F 9 - M Q 1で処理した後に、全細胞ライセート中のZ F 9 - M Q 1タンパク質存在量及びM Y C タンパク質発現レベルの両方が減少すること（図28A～図28B）、及び全細胞ライセート中のZ F 9 - M Q 1タンパク質存在量がM Y C タンパク質の下方制御と相関することを示している（図28C）。

【1077】

実施例28：M Y C 発現及びメチル化状態の低下の持続時間

この実験では、Z F 9 - M Q 1による処理後のM Y C 発現の低下の持続性を評価する。加えて、この実験は、M Y C 発現と標的遺伝子座におけるD N A メチル化の増加との相関を実証し、及び評価する。

20

【1078】

生存能力の変化が最小限であり、しかし40～50%のM Y C 下方制御を実証した（実施例4）S K H E P - 1細胞株を利用して反応の持続性を評価した。S K - H E P - 1にL N P / Z F 9 - M Q 1又はZ F - エフェクターなし（陰性対照）をトランスフェクトし、次に24時間処理した後に新しい培地に交換した。指示される時点で、m R N A 及びゲノムD N A の抽出（Q i a g e n R N A / D N A キット）のため細胞を収集する。M Y C m R N A を評価するため、全細胞R N A を処理して相補D N A（c D N A）を（ポリAプライマーを使用して）作成し、次にそれを、ヒトM Y C m R N A 転写物に特異的なT a q M a n（商標）プローブ（T h e r m o F i s h e r）を使用した逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（R T - P C R）分析に使用した。ターゲティングした遺伝子座におけるメチル化状態を評価するため、標的バイサルファイトゲノムシーケンシングを用いて5 - メチルシトシンを単一D N A 塩基対の分解能で測定した。

30

【1079】

3日目、M Y C m R N A は、陰性対照（Z F - エフェクターなし）及び未処理細胞（図示せず）と比較したとき89%減少した。m R N A 発現の下方制御はゆっくりと増加し、15日目にM Y C 転写物の45%の下方制御が維持されていた（図29A）。加えて、Z F 9 - M Q 1の発現により、M Y C プロモータ領域にC p G メチル化がデノボで導かれた。M Y C の転写変化は15日目までのメチル化の割合と相関した（図29B）。

40

【1080】

実施例29：初代ヘパトサイトに対するバイシストロン性Z F 9 - M Q 1 __ Z F 3 - K R A B によるC - M Y C 発現及び細胞生存能力

この例では、バイシストロン性Z F 9 - M Q 1 __ Z F 3 - K R A B が初代ヘパトサイトにおけるM Y C m R N A 及び生存能力に及ぼす効果を判定する。

【1081】

凍結保存した初代ヒトヘパトサイト（L o n z a）を解凍し、予め温めておいた解凍培地に加え、24時間から播いた。細胞をプレーティング培地に再懸濁し、カウントして指定の濃度（106細胞/mL）に調製した。次に50 u L の細胞溶液を96ウェルプレートに（さらなる50 u L のプレーティング培地と共に）加えて総容積を100 u L にし、

50

一晚インキュベートした。LNP製剤化したmRNA（GFP、ZF-NE、ZF9-MQ1、ZF3-KRAB、ZF9-MQ1+ZF3-KRAB、又はバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB）を100μLのさらなる培地中の細胞に0.6μg/mL、1.25μg/mL、及び2.5μg/mL濃度で加えた。細胞を72時間インキュベートし、維持培地の交換を6時間から始めて、その後毎日行った。処理の72時間後にMYC mRNA発現レベル（RT-PCR）及び細胞生存能力（CellTiter-GLO（登録商標））を評価した。

【1082】

初代ヘパトサイトをZF9-MQ1、ZF9-MQ1+ZF3-KRAB、又はバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABで処理したところ、GFP、ZF-NE又はZF3-KRABと比較したときMYC mRNA発現の減少が示された（図30A）。全体的に見て、この処理によって示された生存能力への効果は最小限であり、MYC発現の減少による正常細胞への影響は、HCC細胞株と比較したとき小さいことが実証される（図30B）。

【1083】

別の実験では、凍結保存PHHを予め温めておいたヘパトサイト解凍培地で解凍し、室温にて100gで8分間スピンした。細胞ペレットをヘパトサイトプレーティング培地に再懸濁した。次に細胞をカウントし、そのベースライン生存能力を測定した。細胞希釈液を調製し、デュプリケート96ウェルプレートに50,000細胞を播いた。細胞を一晚インキュベートした。翌日、プレーティング培地を完全に取り除き、予め温めておいたヘパトサイト培養培地を加えた。細胞を、2.0、1.0、又は0.5μg/mLのバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB、ZF9-MQ1、ZF3-KRAB、ZF9-NE又は対照GFP mRNAによってトリプリケートで処理し、6時間インキュベートした。次に処理培地を取り除き、200μL新鮮ヘパトサイト培養培地に交換した。トランスフェクション後、細胞をさらに66時間インキュベートした（合計72時間）。処理後、1つのプレートをCellTiter-GLO（登録商標）試薬で溶解させて、Glo Max Discoveryプレートリーダーを使用して発光を定量化した。第2プレートの細胞から培地を吸引によって取り除き、細胞をRLT Plus溶解緩衝液で溶解させた。Rneasy（登録商標）Plus 96キットを製造者の指示に従い使用して、mRNA抽出を実施した。抽出後、LunaScript（登録商標）RT SuperMixキット（NEB）を使用してmRNAをcDNAに変換した。MYC（標的）及びGAPDH（参照）プローブによるΔΔCT qPCRを通じてcDNAを分析した。

【1084】

PHHをバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABで処理したところ、対照と比較したとき、MYC mRNAの減少が示された（図30C）。ZF9-MQ1（全ての用量）及びZF3-KRAB（2μg/mL）によっても同じくMYC mRNAは下方制御され、細胞生存能力に対する効果は最小限であった（図30D）。ZF9-NEはMYC mRNA又は生存能力に影響を及ぼさなかった（図30C～図30D）。全体的に見て、バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB処理は、生存能力に対して最小限の効果しか示さなかったことから、正常細胞におけるMYC発現の減少が細胞生存能力に影響しなかったことが実証された（図30A～図30D）。

【1085】

実施例30：ヌードマウスの皮下増殖NCI-H2009モデルにおけるZF9-MQ1+ZF3-KRABのインビボ有効性。

この例では、ZF9-MQ1+ZF3-KRABが、雌ヌードマウスに樹立したNCI-H2009腫瘍の成長を阻害することを実証する。

【1086】

雌ヌードマウスにおいて、NCI-H2009腫瘍細胞を左側腹部に移植することにより疾患を誘導した。平均腫瘍容積が約100～150mm³に達したとき治療を開始した

10

20

30

40

50

。マウスを各群の平均腫瘍容積がほぼ等しくなるように治療群に分割した。mRNAをMC3 LNPで送達した。マウスに、 3 mg/kg のZF9-MQ1+ZF3-KRABを5日毎に、又はMC3 LNP中の 3 mg/kg の非コードmRNAを5日毎に、又はシスプラチンを 1 mg/kg IPで15日毎に、又はPBSを5日毎に静脈内注射した。
【1087】

これらの結果から、ZF9-MQ1+ZF3-KRABで治療すると、3回の投与後に腫瘍サイズの統計的に有意な低下が示され、腫瘍容積が25日目に対照と比較して63%小さくなった(図31A)とともに、治療したマウスの体重に重大な効果はなかった(図31B)ことが示された。この研究では、ZF9-MQ1+ZF3-KRAB治療に伴いシスプラチンによる治療と同等の腫瘍容積への効果があった(図31A)。

10

【1088】

実施例31: Fox Chase CB17 SCIDマウスの同所性増殖Hep 3BモデルにおけるZF9-MQ1+ZF3-KRAB共製剤のインビボ有効性。

この例では、雌Fox Chase CB17 SCIDマウスの同所性Hep 3B-lucモデルにおいて、ZF9-MQ1+ZF3-KRAB共製剤の投与後の長期抗腫瘍有効性及び持続性を実証する。

【1089】

Hep-3B-luc細胞をSCIDマウスの肝左上葉に注射した。無作為化時の各群の平均腹側表示全身腫瘍関連生物発光(TABL)は、約 $2.8 \times 10^9\text{ p/s}$ であった。細胞の移植後7日目に、マウスを、PBS、ZF9-MQ1+ZF3-KRAB(高用量、即ち、 6 mg/kg)、ZF9-MQ1+ZF3-KRAB(中間用量、即ち 3 mg/kg)、ZF9-MQ1+ZF3-KRAB(低用量、即ち 3 mg/kg)による治療の各12匹のマウスの4群、及びソラフェニブによる治療の6匹のマウスの1群に無作為に割り付けた。治療は、腫瘍細胞の移植後8日目に開始した(グラフ上では1日目の投与として示される)。マウスをPBS(5日毎に4用量、次に3日毎に2用量)、LNP(MC3)ZF9-MQ1+ZF3-KRAB(1.5 mg/kg 5日毎)で静脈内治療し、LNP(MC3)ZF9-MQ1+ZF3-KRAB(3 mg/kg 5日毎)で静脈内治療し、LNP(MC3)ZF9-MQ1+ZF3-KRAB(6 mg/kg 5日毎)で静脈内治療し、及びソラフェニブ(連日 50 mg/kg)で経口治療した。全ての動物を毎日秤量し、目視で評価した。腫瘍サイズを生物発光により週2回測定した。

20

30

【1090】

これらの結果から、ZF9-MQ1+ZF3-KRABによる治療が、2回の投与後に腫瘍サイズの有意な阻害に関連したことが示された。 1.5 mg/kg 用量で治療すると、23日目までに陰性対照と比較して約63%の腫瘍成長が阻害されることになり、 3 mg/kg で治療すると、23日目までに陰性対照と比較して約54%の腫瘍成長が阻害されることになった(図32A)。同様に、 6 mg/kg 用量のZF9-MQ1+ZF3-KRABによる治療に伴い、2回の投与後に腫瘍サイズが統計的に有意に低下した結果、23日目に陰性対照と比較して腫瘍容積が63%小さくなった(図32A)。 3 mg/kg のZF9-MQ1+ZF3-KRABによる治療は、ソラフェニブによる治療に等しかった(図32A)。ZF9-MQ1+ZF3-KRABで治療したマウスに重大な体重減少は見られなかった(図32B)。ソラフェニブで治療したマウスには、当初体重の下落が見られ、後に全体的に見て体重は増加したが、これは腫瘍量の増加に起因した可能性がある(図32B)。これらのデータによれば、本研究でZF9-MQ1+ZF3-KRABによる治療が良好に忍容されたことが示唆された。

40

【1091】

実施例32: ZF9-MQ1及びZF3-KRABをコードするバイシストロン性mRNAによりMYC発現及び細胞生存能力は低下する

この例では、バイシストロン性構築物ZF9-MQ1__ZF3-KRABの有効性を単一の構築物ZF3-KRAB及びZF9-MQ1、及びZF3-KRABとZF9-MQ1との共製剤と比較する。これらの構築物は、脂質ナノ粒子(LNP)中に封入したmR

50

NAによって肝細胞癌細胞に送達する。

【1092】

ZF9-MQ1、ZF3-KRAB、バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB、及び共製剤化したZF9-MQ1及びZF3-KRAB構築物を、それぞれのmRNAをLNPに封入することによって調製した。96ウェルプレートの各ウェルに10,000細胞を播種することによってHep3B細胞をトランスフェクトし、0.6 µg/mL及び2 µg/mL mRNA/LNPでさらに処理した。

【1093】

トランスフェクションから48時間後に、MYC mRNA及び細胞生存能力を分析した。生存能力は、PromegaからのCellTiter-GLO（登録商標）アッセイキットを製造者のプロトコルに従い使用して測定した。RNeasy（登録商標）Plus 96ウェルキット（Qiagen）を製造者のプロトコルに従い使用して、3バイオロジカルレプリケートからRNAを単離した。LunaScript（登録商標）RT SuperMixキット（NEB）を使用してRNAサンプルをcDNAに逆転写し、MYC特異的TaqMan（商標）プライマー／プローブセットアッセイをTaqMan（商標）Fast Advancedマスターミックス（Thermo Scientific）と共に使用した定量的PCR（qPCR）により（テクニカルトリPLICATEで）分析した。GAPDH遺伝子の発現に対する相対的なMYC発現をΔΔCt法を用いて（TaqMan（商標）プライマー／プローブを使用して）定量化した。未処理細胞を使用してMYCの発現を正規化した。

【1094】

これらのデータから、バイシストロン性構築物ZF9-MQ1__ZF3-KRABにより、Hep3B細胞のMYC mRNA及び細胞生存能力が、単一の構築物（ZF3-KRAB又はZF9-MQ1）単独よりも大きい程度まで下方制御されたことが示された（図33A～図33B）。バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABにより、0.6 µg/mL及び2 µg/mL濃度の両方で総MYC mRNAレベルは48時間で99%低下した（図33A）。バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABにより、Hep3B細胞の生存能力は、2 µg/mL及び0.6 µg/mL濃度の両方で、それぞれ約80%及び27%低下した（図33B）。さらに、バイシストロン性構築物による処理は、ZF3-KRAB及びZF9-MQ1構築物の共製剤と等しく有効であった。

【1095】

実施例33：全HCC亜型でバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABによりMYC mRNA及びHCC細胞生存能力は用量依存的に低下する

この例では、全HCC亜型S1及びS2におけるバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABの効力を判定する。HCC S1亜型細胞株SKHEP-1、SNU-449及びSNU-182並びにS2亜型細胞株Hep3B及びHepG2をバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABで処理した。本発明者らは、72時間の治療後における段階希釈濃度のバイシストロン性構築物ZF9-MQ1__ZF3-KRABのMYC mRNA及び細胞生存能力を判定した。

【1096】

HCC細胞を96ウェルプレート内の成長培地に播種した（約10,000細胞／ウェル）。次にLNP製剤（2.5 µg/mLから始まる）を各3ウェルに加え、次に後続のウェルに10用量ポイントにわたって約1：2で希釈してmRNAをトランスフェクトし、次に72時間インキュベートした。生存能力及びRNA用に種々のレプリケートプレートを回収した。生存能力は、PromegaからのCellTiter-GLO（登録商標）アッセイキットを製造者のプロトコルに従い使用して測定した。RNeasy（登録商標）Plus 96ウェルキット（Qiagen）を製造者のプロトコルに従い使用して、3バイオロジカルレプリケートからRNAを単離した。LunaScript（登録商標）SuperMixキット（NEB）を使用してRNAサンプルをcDNAに逆転写し、MYC特異的TaqMan（商標）プライマー／プローブセットアッセイをTaqM

an (商標) Fast Advanced マスターミックス (Thermo Scientific) と共に使用して定量的 PCR (qPCR) により (テクニカルトリプリケートで) 分析した。GAPDH 遺伝子の発現に対する相対的な MYC 発現を $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて (TaqMan (商標) プライマー/プローブを使用して) 定量化した。未処理細胞を使用して MYC の発現を正規化した。

【1097】

結果から、全 HCC 亜型でバイシストロン性 ZF9-MQ1__ZF3-KRAB 処理が細胞生存能力に効果を示したことが指摘される (図 34A~図 34C)。MYC mRNA の阻害の EC50 値は 1 未満~20 ng/mL の範囲であり、S1 亜型と S2 亜型との間に傾向はなかった (図 34D)。同様に、50% の細胞生存能力の喪失も、MYC mRNA EC50 と比較してより高い値の範囲 (120~200 ng/mL) に変わった。MYC mRNA 発現又は細胞生存能力のいずれにも、S1 亜型と S2 亜型との間で有意差はなかった。3つの S1 亜型及び2つの S2 亜型 HCC 腫瘍細胞株の EC50 値により、バイシストロン性 ZF9-MQ1__ZF3-KRAB が両方の HCC 亜型に対して有効であったことが実証された (図 34D)。

10

【1098】

実施例 34: バイシストロン性 ZF9-MQ1__ZF3-KRAB による HCC 細胞のアポトーシス誘導

この例は、バイシストロン性 ZF9-MQ1__ZF3-KRAB が HCC 細胞の細胞アポトーシスに及ぼす効果について記載する。CellTiter-GLO (登録商標) などの生存能力アッセイは、ATP レベルに基づきウェル内に残る細胞の相対数を評価するに過ぎず、細胞増殖の喪失と細胞死との間を区別しない。

20

【1099】

この例では、蛍光タグを付加した抗アネキシン V タンパク質抗体 (アネキシン V FITC) 及びヨウ化プロビジウム (PI) を使用して、3つの HCC 細胞株: Hep 3B、Hep G2、及び SK-HEP-1 におけるバイシストロン性 ZF9-MQ1__ZF3-KRAB のトランスフェクション後のアポトーシス細胞を定量化した。未処理細胞に加えて、非コード mRNA を陰性対照として使用した。HCC 細胞を 12 ウェルプレート内の成長培地に播いた (各ウェル 50,000 細胞)。次に LNP 製剤 (1 μ g/mL) を細胞に加えて mRNA をトランスフェクトし、48 時間インキュベートした。細胞を回収し、BD アネキシン V: FITC アポトーシス検出キット (BD B556570) を使用して染色し、フローサイトメトリーにより分析した。アネキシン V FITC 及び PI が陽性の細胞をアポトーシス性と分類した。

30

【1100】

これらのデータによれば、バイシストロン性 ZF9-MQ1__ZF3-KRAB で 48 時間処理したとき、Hep 3B 及び Hep G2 細胞株に 75% 超のアポトーシス細胞が検出され、SK-HEP-1 細胞株に 15% のアポトーシス細胞が検出されたことが示された (図 35)。未処理細胞 (5~20% のバックグラウンドアポトーシス) と比較して、細胞は非コード mRNA 対照の影響を受けなかった (図 35) ことから、バイシストロン性 ZF9-MQ1__ZF3-KRAB が培養下の HCC 細胞株の細胞アポトーシスを誘導できることが指摘される。

40

【1101】

実施例 35: バイシストロン性 ZF9-MQ1__ZF3-KRAB により MYC mRNA レベルは持続性のある形で低下する

この例では、バイシストロン性 ZF9-MQ1__ZF3-KRAB SSOP LNP の 1 回の処理後に、バイシストロン性 ZF9-MQ1__ZF3-KRAB が MYC mRNA の下方制御に及ぼす持続性を判定した。バイシストロン性 ZF9-MQ1__ZF3-KRAB は、メチル化及び抑制性ヒストンマークを MYC IGD に導くことによって MYC を抑制する。それらの修飾が有効であり得る持続時間を決定するため、SK-HEP-1 細胞を利用し、これは、この細胞がバイシストロン性 ZF9-MQ1__ZF3-KR

50

ABによる処理後に細胞生存能力に最小限の効果しか呈しなかったことに伴うものであった。この研究の目的は、1回のバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB処理がMYC mRNA抑制を約2週間にわたって維持できたかどうかを決定することであった。

【1102】

SK-HEP-1細胞を6ウェルプレート内の2mLの成長培地に各ウェル200,000細胞で播いた。次に細胞を0.6μg/mLのバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB又は対照非コードmRNA LNPで処理した。バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABによる処理後1日目、細胞をトリプシン処理し、3つのサンプル；RNA抽出用の1サンプル、ゲノムDNA (gDNA) 抽出用の1サンプル、将来の時点のために確保される1サンプルに分割した。処理後3、6、9、及び12日目に、この過程を繰り返した。15日目について、残りの細胞をRNA及びgDNA抽出用に等分した。Rneasy (登録商標) Plus 96ウェルキット (Qiagen) を製造者のプロトコルに従い使用して、3バイオロジカルレプリケートからRNAを単離した。LunaScript (登録商標) RT SuperMixキット (NEB) を使用してRNAサンプルをcDNAに逆転写し、MYC特異的TaqMan (商標) プライマー/プローブセットアッセイをTaqMan (商標) Fast Advancedマスターミックス (Thermo Scientific) と共に使用して定量的PCR (qPCR) により (テクニカルトリプリケートで) 分析した。GAPDH遺伝子の発現に対する相対的なMYC発現をΔΔCt法を用いて (TaqMan (商標) プライマー/プローブを使用して) 定量化した。未処理細胞を使用してMYCの発現を正規化した。

10

20

【1103】

このデータから、バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABの媒介によるMYC遺伝子発現調節の持続性が実証された。SKHEP1細胞における1回のバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB処理後、MYC mRNAレベルは1日目に低下し、治療後15日まで抑えられたままであった (図36)。

【1104】

実施例36：バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABにより、HCC細胞株におけるMYC mRNA及びタンパク質発現並びに細胞生存能力は低下する

複数のHCC細胞でバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABの薬力学を理解するため、HCC細胞におけるMYC mRNA及びタンパク質の発現レベル、細胞生存能力、並びにバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABの発現をバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABによる処理の6~96時間後に評価した。

30

【1105】

Hep 3B又はSK-HEP-1細胞を2組の96ウェルプレートに各ウェル10,000細胞で、及び6ウェルプレートに各ウェル400,000細胞で、各時点について培養培地に播いた。96ウェルプレートは、細胞生存能力及びmRNA分析用に、1μg/mLのバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB又は非コードmRNAのいずれかによってトリプリケートで処理した。6ウェルプレートは、タンパク質分析用に、1μg/mLのバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB又は非コードmRNAのいずれかによってデュプリケートで処理した。細胞を処理後6、24、48、72、又は96時間にわたってインキュベートし、各時点で一部の細胞を陰性対照として未処理のまま残した。各時点で、一方の96ウェルプレートをCellTiter-GLO (登録商標) で溶解させて、GLOMAX (登録商標) を使用して発光を定量化した。第2の96ウェルプレートは、Rneasy (登録商標) Plus 96キットを使用してmRNA抽出用にRLT Plus溶解緩衝液で溶解させた。溶解したサンプルをRNAカラムに結合させて、緩衝液で洗浄し、及び溶出させた。次にmRNAをRT LunaScript (登録商標) でcDNAに変換した。次にcDNAをMYC (標的) 及びGAPDH (参照) プローブによるΔΔCT qPCRで分析した。6ウェルプレートからの細胞は、各時点でタンパク質単離のためRIPA緩衝液で溶解させた。全タンパク質をPi

40

50

ierce BCAタンパク質アッセイ（23225）を使用して定量化した。各サンプルに等量のタンパク質をロードし、NuPAGE（商標）ミニゲルシステム（Thermo Fisher）を使用してサイズ別に分離した。次にiBlot（商標）2ゲル転写装置（Thermo Fisher）を使用してタンパク質をPVDF膜に転写した。膜を抗MYC抗体（Abcam ab32072）で一晩ブローブした。抗β-アクチン抗体（Cell Signaling 8H10D10）をローディング対照として使用した。次にシグナルを可視化し、MYC及びβ-アクチン一次抗体に対する蛍光二次抗体を使用したLI-CORイメージングシステムを使用して定量化した。

【1106】

両方の細胞株において、低分子非コードmRNA又は未処理細胞と比較したとき、バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABにより6時間でMYC mRNA及びタンパク質発現が減少し、96時間後までそのままであった（図37）。両方の細胞株において、バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABによる処理の48時間後に細胞生存能力の減少が観察された（図37）。低分子非コード陰性対照は細胞生存能力に何ら効果を及ぼさなかった。

【1107】

実施例37：HAタグ付加タンパク質によって可視化したとき、バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB mRNAはZF9-MQ1及びZF3-KRABの両方を発現する

この例では、バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB mRNA/LNPによってコードされるタンパク質の発現をウエスタンブロット分析で確認した。細胞の内部では、バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABは2つのZFタンパク質（ZF3-KRAB及びZF9-MQ1）を産生するが、本実験では、それらにHAタグを付加して、HCC細胞のトランスフェクション後のタンパク質発現の定量化を可能にした。

【1108】

Hep 3B又はSK-HEP-1細胞を各時点について6ウェルプレート内の培養培地に各ウェル400,000細胞で播いた。この6ウェルプレートをタンパク質分析用に1µg/mLのバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABによってデュプリケートで処理した。細胞を6又は24時間のいずれかにわたってインキュベートした。次に細胞をRIPA緩衝液で溶解させて、Pierce BCAタンパク質アッセイ（23225）を用いて全タンパク質レベルを定量化した。各サンプルに等量のタンパク質をロードし、NuPAGE（商標）ミニゲルシステム（Thermo Fisher）を使用してサイズ別に分離した。次にiBlot（商標）2ゲル転写装置（Thermo Fisher）を使用してタンパク質をPVDF膜に転写した。膜をAbcam HA抗体で一晩ブローブした。抗β-アクチン抗体（Cell Signaling 8H10D10）をローディング対照として使用した。シグナルを可視化し、MYC及びβ-アクチン抗体に対する蛍光二次抗体を使用したLI-CORイメージングシステムを使用して定量化した。

【1109】

トランスフェクション後6時間及び24時間の両方で、バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB mRNAによってコードされるZF3-KRAB及びZF9-MQ1の両方のタンパク質をウエスタンブロットでHAタグにより可視化した（図38）。両方の時点でZF3-KRAB及びZF9-MQ1の両方の構築物の蓄積が観察された。

【1110】

実施例38：バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABによりHCC細胞のソラフェニブ反応が増加する

この例では、バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABがHCC細胞株における小分子ソラフェニブ（マルチキナーゼ阻害薬）の有効性に及ぼす効果を判定した。ソラフェニブはHCCの標準治療として使用され、高いMYCレベルは、ソラフェニブ抵抗

10

20

30

40

50

性の予測となり得る。バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 _ Z F 3 - K R A B が、その M Y C 下方制御を通じて H C C を再びソラフェニブ感受性にし得ると仮定された。用量反応アッセイを利用して、バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 _ Z F 3 - K R A B 処理によってソラフェニブの I C ₅₀ を減少させることができるかどうかを判定した。

【 1 1 1 1 】

バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 _ Z F 3 - K R A B とソラフェニブとの間の相乗作用の可能性を判定するため、Hep 3 B 又は S K - H E P - 1 細胞を 9 6 ウェルプレートに各ウェル 1 0 , 0 0 0 細胞で播いた。次に細胞を 1 : 2 の段階希釈で 0 . 1 ~ 2 5 μ M の用量範囲のソラフェニブによって処理した。次にバイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 _ Z F 3 - K R A B を担持する脂質混合物を一部のウェルに 0 . 1 又は 0 . 6 μ g / m L の用量で加えた。一組の細胞をソラフェニブ単独で処理することにより、対照として使用した。7 2 時間の処理後、細胞を C e l l T i t e r - G L O (登録商標) 試薬で溶解させて、発光を G l o M a x を使用して定量化した。未処理値の平均を取り、各実験ルシフェラーゼ値をこの平均で除すことにより、相対細胞生存率を計算した。

【 1 1 1 2 】

【表 7 0 】

表 19: バイシストロン性 ZF9-MQ1_ZF3-KRAB がソラフェニブ IC₅₀ に及ぼす効果

Hep3B		SKHEP-1	
バイシストロン性 ZF9-MQ1_ZF3-KRAB 濃度	ソラフェニブ IC ₅₀	バイシストロン性 ZF9-MQ1_ZF3-KRAB 濃度	ソラフェニブ IC ₅₀
0 μg/ml	4.4 μM	0 μg/ml	12.3 μM
0.1 μg/ml	4.25 μM	0.1 μg/ml	12.3 μM
0.6 μg/ml	2.9 μM	0.6 μg/ml	10.7 μM

【 1 1 1 3 】

このデータから、ソラフェニブを 0 . 6 μ g / m l バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 _ Z F 3 - K R A B と組み合わせて投与したとき、ソラフェニブの I C ₅₀ が S K H E P 1 において 1 2 . 3 から 1 0 . 7 μ M に低下し (図 3 9 A 及び表 1 9)、Hep 3 B において 4 . 4 から 2 . 9 μ M に低下した (図 3 9 B 及び表 1 9) ことが示された。ソラフェニブを 0 . 1 μ g / m l バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 _ Z F 3 - K R A B と組み合わせて投与したとき、Hep 3 B 又は S K - H E P - 1 細胞においてはソラフェニブの I C ₅₀ に有意な変化はなかった (図 3 9 A ~ 図 3 9 B)。ソラフェニブとバイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 _ Z F 3 - K R A B との組み合わせは、ソラフェニブ単独よりも有効性が高かった (図 3 9 A ~ 図 3 9 B)。このデータによれば、バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 _ Z F 3 - K R A B とソラフェニブとの間の相乗活性が示唆された。

【 1 1 1 4 】

実施例 3 9 : バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 _ Z F 3 - K R A B により H C C 細胞の J Q 1 反応が増加する

この例では、複数の H C C 細胞株における J Q 1 (B E T 阻害薬) と組み合わせたバイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 _ Z F 3 - K R A B の有効性を判定する。B E T タンパク質は、M Y C 転写に重要であることが示されている。最近の世代の B E T 阻害薬は、現在、血液学的適応に関して臨床で評価中である ; しかしながら、その毒性プロファイルにより、その使用は制限されている。B E T 阻害薬の用量レベルを下げて効力が増加し得るような組み合わせ治療があれば、B E T 阻害薬の忍容性を改善することができるであろう。

【1115】

バイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABとJQ1との間の相乗作用の可能性を判定するため、Hep3B又はSK-HEP-1細胞を96ウェルプレートに各ウェル10,000細胞で播いた。次に細胞を1:2の段階希釈で0.1~25μMの用量範囲のJQ1によって処理した。次にバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABを担持する脂質混合物を一組のウェルに0.1又は0.6μg/mLの用量で加えた。一組の細胞をJQ1単独で処理することにより、対照として使用した。72時間の処理後、細胞をCellTiter-GLO（登録商標）試薬で溶解させて、発光をGloMaxを使用して定量化した。未処理値の平均を取り、各実験ルシフェラーゼ値をこの平均で除すことにより、相対細胞生存率を計算した。

【1116】

【表71】

表 20: バイシストロン性ZF9-MQ1 ZF3-KRABがJQ1 IC50に及ぼす効果

Hep3B		SKHEP-1	
バイシストロン性ZF9-MQ1_ZF3-KRAB濃度	JQ1 IC ₅₀	バイシストロン性ZF9-MQ1_ZF3-KRAB濃度	JQ1 IC ₅₀
0 μg/ml	6.6 μM	0 μg/ml	>25 μM
0.1 μg/ml	0.6 μM	0.1 μg/ml	1.9 μM
0.6 μg/ml	0.2 μM	0.6 μg/ml	1.1 μM

【1117】

0.6μg/mLのバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB+JQ1の組み合わせにより、JQ1のIC₅₀はSK-HEP1において25超から1.1μMに低下し（図40A及び表20）、Hep3Bにおいて6.6から0.2μMに低下した（図40B及び表20）。0.1μg/mLのバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRAB+JQ1の組み合わせにより、JQ1のIC₅₀はSK-HEP1において25超から1.9μMに低下し（図40A及び表20）、Hep3Bにおいて6.6から0.6μMに低下した（図40B及び表20）。このデータによれば、バイシストロン性構築物ZF9-MQ1__ZF3-KRABとJQ1との間の相乗活性が示唆された。

【1118】

実施例40：MYCゲノム遺伝子座をターゲティングするように設計されたマウスサロゲート構築物のスクリーニング

この例、肝細胞癌マウスモデルHepa1-6を使用して、マウスにおいてMYC IGDをターゲティングする構築物を判定した。これらの構築物（ZF15-MQ1、ZF16-MQ1及びZF17-MQ1）は、マウスゲノムをターゲティングするバイシストロン性ZF9-MQ1__ZF3-KRABのサロゲートとして開発した。本発明者らは、これらの構築物がMYC mRNA発現を下方制御し及びマウスHCC細胞生存能力を低下させる能力を判定した。

【1119】

マウスサロゲート構築物のパネル（ZF15-MQ1、ZF16-MQ1及びZF17-MQ1）を作成し、Hepa1-6細胞で、mRNA抽出又は細胞生存能力分析用に各ウェル10,000細胞をデュプリケートプレートに播種することによってスクリーニングした。96ウェルプレートを0.6又は1.2μg/mLの候補ZFによってトリプリ

ケートで処理した。細胞を72時間インキュベートした。インキュベーション期間後、一方の96ウェルプレートはCellTiter-GLO（登録商標）で溶解させて、発光をGloMax（登録商標）Discoveryプレートリーダーを使用して定量化した。第2の96ウェルプレートは、RNeasy（登録商標）Plus 96キットを使用してmRNA抽出用にRLT Plus溶解緩衝液で溶解させた。溶解したサンプルをRNAカラムに結合させて、緩衝液で洗浄し、及び溶出させた。次にmRNAをRT LunaScript（登録商標）でcDNAに変換した。次にcDNAをMYC（標的）及びGAPDH（参照）プローブによる $\Delta\Delta CT$ qPCRによって分析した。

【1120】

このスクリーニングによれば、ZF17-MQ1がマウスMYC mRNAの下方制御を示し（図41A）、それが生存能力の減少に対応した（図41B）ことが指摘された。

【1121】

実施例41：マウスサロゲート構築物ZF17-MQ1がHCC細胞生存能力並びにMYC mRNA及びタンパク質発現に及ぼす効果

この例では、肝細胞癌マウスモデルHepa1-6を使用して、MYC mRNA及びタンパク質発現並びにマウスHCC細胞生存能力を下方制御するZF17-MQ1構築物の効果を判定した。

【1122】

ZF17-MQ1又はGFP mRNAで96時間処理してMYC mRNA及び細胞生存能力を分析した。mRNA抽出又は細胞生存能力分析用にHepa1-6細胞を各ウェル10,000細胞でデュプリケートプレートに播種した。96ウェルプレートを0.6又は1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のZF17-MQ1によってトリプリケートで処理した。インキュベーション後、一方の96ウェルプレートはCellTiter-GLO（登録商標）で溶解させて、発光をGloMax（登録商標）Discoveryプレートリーダーを使用して定量化した。第2の96ウェルプレートは、RNeasy（登録商標）Plus 96キットを使用したmRNA抽出用にRLT Plus溶解緩衝液で溶解させた。溶解したサンプルをRNAカラムに結合させて、緩衝液で洗浄し、及び溶出させた。次にmRNAをRT LunaScriptでcDNAに変換した。次にcDNAをMYC（標的）及びGAPDH（参照）プローブによる $\Delta\Delta CT$ qPCRによって分析した。

【1123】

24及び48時間処理した後、12ウェルプレートにおいて100,000細胞にZF17-MQ1又は対照GFP mRNAをトランスフェクトすることにより、MYCタンパク質レベルを分析した。細胞をRIPA緩衝液中に溶解させて、Pierce BCAタンパク質アッセイ（23225）を使用して全タンパク質レベルを定量化した。各サンプルに等量のタンパク質をロードし、NuPAGE（商標）ミニゲルシステム（Thermo Fisher）を使用してサイズ別に分離した。次にiBlot（商標）ゲル転写装置（Thermo Fisher）を使用してタンパク質をPVDF膜に転写した。膜を抗MYC抗体（Abcam ab32072）で一晩プローブした。抗 β -アクチン抗体（Cell Signaling 8H10D10）をローディング対照として使用した。次にシグナルを可視化し、MYC及び β -アクチン抗体に対する蛍光二次抗体を使用したLI-CORイメージングシステムを使用して定量化した。

【1124】

このデータは、ZF17-MQ1がMYC IGDのターゲティングによってバイシストロン性ZF9-MQ1—ZF3-KRABのマウスサロゲートとして働くことが可能であったことを示した。マウスHCC細胞Hepa1-6のZF17-MQ1処理では、24及び48時間でMYCタンパク質の有意な下方制御が示された（図42A）。マウスHCC細胞Hepa1-6のZF17-MQ1処理では、96時間でMYC mRNAの有意な下方制御が示され（図42C）、96時間で細胞生存能力の低減が示された（図42D）。

【1125】

10

20

30

40

50

実施例 42 : Z F 1 7 - M Q 1 の有効性を示す H e p a 1 - 6 皮下同系モデル

この例では、免疫適格動物における Z F 1 7 - M Q 1 の有効性を実証する。具体的には、H e p a 1 - 6 を同系レシピエント C 5 7 B L / 6 正常マウスに移植する。

【 1 1 2 6 】

雌 C 5 7 B L / 6 マウスにおいて H e p a 1 - 6 腫瘍細胞を左側腹部に移植することにより疾患を誘導した。平均腫瘍容積が約 150 mm^3 に達したとき治療を開始した。マウスを治療群 (P B S 又は Z F 1 7 - M Q 1 用に各 9 匹のマウス、ソラフェニブ用に 6 匹のマウス) に各群の平均腫瘍容積がほぼ等しくなるように分割した。マウスに P B S 又は 3 mg / kg の Z F 1 7 - M Q 1 を静脈内注射した。 50 mg / kg の陽性対照標準治療薬物ソラフェニブを強制経口投与によって毎日与えた。 Z F 1 7 - M Q 1 は 5 日毎に 4 用量投与し、次に 2 週間の休薬期間を与え、治療をさらに 2 回再開した。全ての動物を毎日秤量し、目視で評価した。腫瘍サイズをノギスで週 3 回測定した。

10

【 1 1 2 7 】

これらの結果から、 Z F 1 7 - M Q 1 により、4 用量後に動物腫瘍量が有意に低下したことが示された (図 4 3) 。休薬期間に続き、マウスを再治療すると、約 4 週間後に完全な腫瘍枯渇が得られた (図 4 3) 。これらのデータから、免疫適格動物に行った H C C 異種移植の腫瘍量を Z F 1 7 - M Q 1 が有効に低減できたことが示された。

【 1 1 2 8 】**実施例 43 : H C C に対する可能性のある新規治療法としての M Y C 癌遺伝子のエピジェネティック調節**

20

この例は、 M Y C m R N A 及び細胞生存能力を測定することによる H C C 細胞株 (H e p 3 B 、 H e p G 2 、 S K - H E P - 1 、 S N U - 1 8 2 及び S N U - 4 4 9) におけるバイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 - Z F 3 - K R A B の特徴付けについて記載する。

【 1 1 2 9 】

H C C 細胞株 (H e p 3 B 、 H e p G 2 、 S K - H E P - 1 、 S N U - 1 8 2 及び S N U - 4 4 9) において M Y C m R N A 及び細胞生存能力を測定することによりバイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 - Z F 3 K R A B 構築物を特徴付けた。バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 - Z F 3 K R A B を持続性のあるエピジェネティック変化 (例えば、 D N A / クロマチンメチル化) 及びトランスクリプトーム変化 (例えば、 R N A - s e q) に関して試験した。 M Y C タンパク質レベル及び経路シグナル伝達の変化を様々なプロテオミクス方法を用いて測定した。最後に、皮下 (s u b Q) 及び同所性 H C C モデルにおいて腫瘍容積、腫瘍関連生物発光 (B L I) 及び免疫組織化学 (I H C) を評価することによりバイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 - Z F 3 K R A B の活性をインビボで分析した。

30

【 1 1 3 0 】

本発明者らは、バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 - Z F 3 - K R A B を含め、 M Y C I G D 上の複数の遺伝子座をターゲティングする、且つ正常細胞は温存しながらも、 H C C 細胞における M Y C m R N A 、タンパク質及び細胞生存能力の低減に有効であった構築物を同定した。 H C C 細胞では、バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 - Z F 3 K R A B の阻害 E C 5 0 中央値は、 M Y C m R N A について 0.001 ng / mL 未満及び細胞生存能力について 120 ng / mL である。重要なことに、バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 - Z F 3 K R A B の効果は 2 週間を過ぎても持続し、持続性のある M Y C m R N A 抑制を提供した。無胸腺ヌードマウスの H e p 3 B s u b Q モデルにおいて L N P 中のバイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 - Z F 3 K R A B を 3 及び 6 mg / kg Q 5 D で静脈内送達すると、 23 日目までに陰性対照と比較してそれぞれ 54 % 及び 63 % の統計的に有意な腫瘍成長阻害 (T G I) が実証された。バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 - Z F 3 K R A B で治療したマウスには、陰性対照又はソラフェニブ治療マウスと比較して体重 (B W) の有意な減少がなかった。バイシストロン性 Z F 9 - M Q 1 - Z F 3 K R A B 及び対照治療腫瘍の I H C では、 M Y C 及び増殖マーカーである K i 6 7 の有意な下方制御、並びにアポトーシスマーカーであるカスパーゼ 3 の上方制御が示された。 H e p 3 B 同

40

50

所性モデルでは、 3 mg/kg バイシストロン性 ZF9-MQ1 __ ZF3KRAB Q5 Dは、BWの低下なく、 50 mg/kg QDのソラフェニブと同等のBLI低下を示した。

【1131】

実施例44：LL2細胞においてマウスサロゲート構築物がMYC発現及び細胞生存能力に及ぼす効果

本実施例は、LL2細胞においてマウスサロゲート構築物（ZF15-MQ1、ZF16-MQ1、及びZF17-MQ1）がMYC発現及び細胞生存能力に及ぼす効果を判定することに関する。

【1132】

mRNA抽出又は細胞生存能力分析用にLL2細胞を各ウェル5,000細胞でデュプリケート96ウェルプレートに播種した。96ウェルプレートを $0.625\text{ }\mu\text{g/mL}$ （mRNA及び生存能力の読み取り用）及び $1.25\text{ }\mu\text{g/mL}$ （mRNA及び生存能力の読み取り）のZF15-MQ1、ZF16-MQ1、又はZF17-MQ1負荷LNPによってトリプリケートで処理し、インキュベートした。6ウェルプレートを各ウェル200,000細胞で播種し、 $1.25\text{ }\mu\text{g/mL}$ の上記の構築物をトランスフェクトした（ウエスタンブロットの読み取り用）。GFPで処理した細胞を陰性対照として使用した。インキュベーション後、一方の96ウェルプレートをCellTiter-GLO（登録商標）で溶解させて、発光をGloMax（登録商標）Discoveryプレートリーダーを使用して定量化した。第2の96ウェルプレートは、Rneasy（登録商標）Plus 96キットを使用してmRNA抽出用にRLT Plus溶解緩衝液で溶解させた。溶解したサンプルをRNAカラムに結合させて、緩衝液で洗浄し、及び溶出させた。次にRT LunascriptでポリAプライマーを使用してmRNAをcDNAに変換した。次に、マウスMYC mRNA転写物に特異的なTaqMan（商標）プローブ（Thermo Fisher）を使用した逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）分析にcDNAを使用した。GAPDH mRNA転写物レベルを全群の正規化に使用した。ウエスタンブロットのため、 β -アクチン抗体を、 594 nm 波長で発光するフルオロフォアタグを付加した二次抗体で染色し、MYC抗体（Abcam）を、 488 nm の波長で発光するフルオロフォアタグを付加した二次抗体で検出した。近赤外（NIR）蛍光を用いるOdyssey（登録商標）CLxイメージングシステム（LI-COR）を使用して、タンパク質画像を取得した。

【1133】

このデータから、ZF17-MQ1で処理した細胞が、未処理細胞又はGFP処理条件細胞と比較してLL2細胞におけるMYCタンパク質レベルの低下を示したことが示された（図44A）。未処理細胞で観察されたレベルと比較して、ZF17-MQ1及びZF16-MQ1では、LL2細胞におけるMYC mRNAレベルがそれぞれ99.9%超又は74%低下した（図44B）。さらに、3つ全ての構築物が、未処理細胞及びGFP処理細胞よりも大きい程度までLL2細胞の細胞生存能力を低下させることが可能であった（図44C）。未処理細胞と比較して、構築物ZF17-MQ1、ZF16-MQ1、及びZF15-MQ1では、LL2細胞において生存能力がそれぞれ最大74%、65%、及び30%低下した。

【1134】

実施例45：ZF17-MQ1処理したLL2及びCT26細胞ではMYC転写物が下方制御される

この例は、CT26及びLL2細胞でのMYC mRNA発現の下方制御及び細胞生存能力の低減におけるZF17-MQ1構築物の有効性の判定に関する。

【1135】

mRNA抽出又は細胞生存能力分析用に、CT26及びLL2細胞を各ウェル2,500細胞でデュプリケートプレートに播種した。96ウェルプレートを $1.25\text{ }\mu\text{g/mL}$ 及び $2.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ のZF17-MQ1負荷LNPによってトリプリケートで処理し、

10

20

30

40

50

インキュベートした。未処理細胞及びGFP処理細胞を対照として使用した。インキュベーション後、一方の96ウェルプレートはCellTiter-GLO（登録商標）で溶解させて、発光をGloMax（登録商標）Discoveryプレートリーダーを使用して定量化した。第2の96ウェルプレートは、Rneasy（登録商標）Plus 96キットを使用してmRNA抽出用にRLT Plus溶解緩衝液で溶解させた。溶解したサンプルをRNAカラムに結合させて、緩衝液で洗浄し、及び溶出させた。次にRT LunascriptでポリAプライマーを使用してmRNAをcDNAに変換した。次に、マウスMYC mRNA転写物に特異的なTaqMan（商標）プローブ（Thermo Fisher）を使用した逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）分析にcDNAを使用した。GAPDH mRNA転写物レベルを全群の正規化に使用した。

10

【1136】

このデータは、ZF17-MQ1により、LL2及びCT26細胞において未処理細胞及びGFP処理細胞（陰性対照）よりも大きい程度までMYC mRNAが下方制御され、及び細胞生存能力が低下したことを示した。未処理細胞で観察されるレベルと比較して、2.5 µg/mLのZF17-MQ1により、LL2及びCT26細胞におけるMYC mRNAレベルがそれぞれ93%及び85%低下した（図45A）。さらには、未処理細胞と比較して、これらの条件下では、ZF17-MQ1により、LL2及びCT26細胞における細胞生存能力がそれぞれ87%及び93%低下した（図45B）。

【1137】

実施例46：ZF17-MQ1処理したLL2及びCMT167細胞ではMYC転写物は下方制御される

20

この例は、CMT167及びLL2細胞でのMYC mRNA発現の下方制御及び細胞生存能力の低減におけるZF17-MQ1構築物の有効性の判定に関する。

【1138】

mRNA抽出又は細胞生存能力分析用に、CMT167及びLL2細胞を各ウェル5,000細胞でデュプリケートプレートに播種した。96ウェルプレートを1.0 µg/mLのGFP、非コードRNA、又はZF17-MQ1負荷LNPによってトリプリケートで処理し、インキュベートした。未処理細胞及びGFP処理細胞を対照として使用した。インキュベーション後、一方の96ウェルプレートをCellTiter-GLO（登録商標）で溶解させて、発光をGloMax（登録商標）Discoveryプレートリーダーを使用して定量化した。第2の96ウェルプレートは、Rneasy（登録商標）Plus 96キットを使用してmRNA抽出用にRLT Plus溶解緩衝液で溶解させた。溶解したサンプルをRNAカラムに結合させて、緩衝液で洗浄し、及び溶出させた。次にRT LunascriptでポリAプライマーを使用してmRNAをcDNAに変換した。次に、マウスMYC mRNA転写物に特異的なTaqMan（商標）プローブ（Thermo Fisher）を使用した逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）分析にcDNAを使用した。GAPDH mRNA転写物レベルを全群の正規化に使用した。

30

【1139】

このデータは、ZF17-MQ1によりMYC mRNAが下方制御されたとともに、CMT167及びLL2細胞の細胞生存能力が未処理細胞及びGFP処理細胞（陰性対照）よりも大きい程度まで低下することを示した。未処理細胞で観察されるレベルと比較して、ZF17-MQ1により、CMT167及びLL2細胞におけるMYC mRNAレベルがそれぞれ62%及び73%低下した（図46）。さらには、未処理細胞と比較して、これらの条件下では、ZF17-MQ1により、CMT167及びLL2細胞における細胞生存能力がそれぞれ54%及び57%低下した（図46）。

40

【1140】

実施例47：ZF9-MQ1は初代細胞生存能力に対してほとんど効果を示さない

この例では、ZF9-MQ1構築物が初代細胞生存能力に及ぼす効果を判定する。

【1141】

50

細胞生存能力分析用に、初代小気道上皮細胞、初代肺葉上皮細胞、及び初代肺線維芽細胞を各ウェル7, 500 (初代小気道上皮)又は5000 (初代肺葉上皮及び初代肺線維芽細胞)細胞でデュプリケートプレートに播種した。96ウェルプレートを1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のGFP又はZF9-MQ1負荷LNPによってトリプリケートで処理し、インキュベートした。未処理細胞及びGFP処理細胞を対照として使用した。インキュベーション後、一方の96ウェルプレートをCellTiter-GLO (登録商標)で溶解させて、発光をGloMax (登録商標) Discoveryプレートリーダーを使用して定量化した。第2の96ウェルプレートは、Rneasy (登録商標) Plus 96キットを使用してmRNA抽出用にRLT Plus溶解緩衝液で溶解させた。溶解したサンプルをRNAカラムに結合させて、緩衝液で洗浄し、及び溶出させた。次にRT Luna scriptでポリAプライマーを使用してmRNAをcDNAに変換した。次に、ヒトMYC mRNA転写物に特異的なTaqMan (商標)プローブ (Thermo Fisher) を使用した逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 分析にcDNAを使用した。GAPDH mRNA転写物レベルを全群の正規化に使用した。

10

20

30

40

50

【1142】

このデータは、ZF9-MQ1により、初代小気道上皮細胞、初代肺葉上皮細胞、及び初代肺線維芽細胞のMYC mRNAレベルが未処理細胞と比較してそれぞれ94%、96%、96%レベルだけ下方制御されたことを示した (図47)。しかしながら、生存能力は、対照細胞と比較して16%、9%、及び22%低下したに過ぎなかったことから、H2009癌細胞における先行の知見と対照的に、ZF9-MQ1が正常肺上皮細胞又は線維芽細胞の細胞生存能力に対しては僅かな効果しか有しなかったことが示唆される。

【1143】

実施例48: ZF9-MQ1とJQ1の共治療はA549生存能力に相加を上回る効果を示した

この例では、様々な濃度のJQ1阻害薬と組み合わせて使用したときのZF9-MQ1構築物がA549細胞生存能力に及ぼす効果を判定する。

【1144】

細胞生存能力分析のため、A549細胞を各ウェル4, 000細胞でデュプリケートプレートに播種した。96ウェルプレートを漸増濃度のBET阻害薬JQ1 (最高6.25 μM までの濃度) と組み合わせた0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のGFP又はZF9-MQ1負荷LNPによってトリプリケートで処理し、インキュベートした。未処理細胞及びGFP処理細胞を対照として使用した。72時間のインキュベーション後、一方の96ウェルプレートをCellTiter-GLO (登録商標)で溶解させて、発光をGloMax (登録商標) Discoveryプレートリーダーを使用して定量化した。

【1145】

このデータから、ZF9-MQ1及びJQ1が、各々別個に、A549細胞の細胞生存能力を阻害したことが示された (図48A)。組み合わせたとき、ZF9-MQ1 (0.5又は1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及びJQ1 (最高6.25 μM までの濃度) は、その個別の活性によって予測されるものと比べてA549生存能力の阻害に対して相加を上回る効果を示したことから、ZF9-MQ1とJQ1との組み合わせが相乗作用的にA549細胞の生存能力を阻害したことが示唆される (図48B~図48C)。

【1146】

実施例49: ZF9-MQ1とBET762の共治療はA549生存能力に相加を上回る効果を示した

この例では、様々な濃度のBET762阻害薬と組み合わせて使用したときのZF9-MQ1構築物がA549細胞生存能力に及ぼす効果を判定する。

【1147】

細胞生存能力分析のため、A549細胞を各ウェル4, 000細胞でデュプリケートプレートに播種した。96ウェルプレートを漸増濃度 (最高1.25 μM までの濃度) のBET阻害薬BET762と組み合わせた0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のGFP

又は Z F 9 - M Q 1 負荷 L N P によってトリプリケートで処理し、インキュベートした。未処理細胞及び G F P 処理細胞を対照として使用した。72 時間のインキュベーション後、一方の 96 ウェルプレートに C e l l T i t e r - G L O (登録商標) で溶解させて、発光を G l o M a x (登録商標) D i s c o v e r y プレートリーダーを使用して定量化した。

【1148】

このデータは、Z F 9 - M Q 1 及び B E T 7 6 2 が、各々別個に、A 5 4 9 細胞の細胞生存能力を阻害したことを示した (図 49 A)。組み合わせたとき、Z F 9 - M Q 1 (0.5 μ g/ml) 及び B E T 7 6 2 (0.5 μ g/ml Z F 9 - M Q 1 処理細胞について最高 1.25 μ M までの濃度及び 1.0 μ g/ml Z F 9 - M Q 1 処理細胞について最高 0.625 μ M までの濃度) は、その個別の活性によって予測されるものと比べて A 5 4 9 生存能力の阻害に対して相加を上回る効果を示した (図 49 B)。組み合わせたとき、Z F 9 - M Q 1 (1.0 μ g/ml) 及び B E T 7 6 2 (最高 0.625 μ M までの濃度) は、その個別の活性によって予測されるものと比べて A 5 4 9 生存能力の阻害に対して相加を上回る効果を示した (図 49 C)。このデータから、Z F 9 - M Q 1 と B E T 7 6 2 との組み合わせが相乗作用的に A 5 4 9 細胞の生存能力を阻害したことが示唆された (図 49 B ~ 図 49 C)。

10

【1149】

実施例 50: Z F 9 - M Q 1 とピラブレシブの共治療は A 5 4 9 生存能力に相加を上回る効果を示した

20

この例では、様々な濃度の B E T 阻害薬ピラブレシブと組み合わせ使用したときの Z F 9 - M Q 1 構築物が A 5 4 9 細胞生存能力に及ぼす効果を判定する。

【1150】

細胞生存能力分析のため、A 5 4 9 細胞を各ウェル 4,000 細胞でデュプリケートプレートに播種した。漸増濃度 (0.5 μ g/ml Z F 9 - M Q 1 処理細胞について最高 0.625 μ M までの濃度及び 1.0 μ g/ml Z F 9 - M Q 1 処理細胞について最高 0.313 μ M までの濃度) の B E T 阻害薬ピラブレシブと組み合わせた 0.5 μ g/ml 又は 1.0 μ g/ml の G F P 又は Z F 9 - M Q 1 負荷 L N P によって 96 ウェルプレートをトリプリケートで処理し、インキュベートした。未処理細胞及び G F P 処理細胞を対照として使用した。72 時間のインキュベーション後、一方の 96 ウェルプレートに C e l l T i t e r - G L O (登録商標) で溶解させて、発光を G l o M a x (登録商標) D i s c o v e r y プレートリーダーを使用して定量化した。

30

【1151】

このデータは、Z F 9 - M Q 1 及びピラブレシブが、各々別個に、A 5 4 9 細胞の細胞生存能力を阻害したことを示した (図 50 A)。組み合わせたとき、Z F 9 - M Q 1 (0.5 μ g/ml) 及びピラブレシブ (最高 0.625 μ M までの濃度) は、その個別の活性によって予測されるものと比べて A 5 4 9 生存能力の阻害に対して相加を上回る効果を示した (図 50 B)。組み合わせたとき、Z F 9 - M Q 1 (1.0 μ g/ml) 及びピラブレシブ (最高 0.313 μ M までの濃度) は、その個別の活性によって予測されるものと比べて A 5 4 9 生存能力の阻害に対して相加を上回る効果を示した (図 50 C)。このデータから、Z F 9 - M Q 1 とピラブレシブとの組み合わせが相乗作用的に A 5 4 9 細胞の生存能力を阻害したことが示唆された (図 50 B ~ 図 50 C)。

40

【1152】

実施例 51: Z F 9 - M Q 1 とトラメチニブの共治療は A 5 4 9 生存能力に相加を上回る効果を示した

この例では、様々な濃度の M E K 阻害薬トラメチニブと組み合わせ使用したときの Z F 9 - M Q 1 構築物が A 5 4 9 細胞生存能力に及ぼす効果を判定する。

【1153】

細胞生存能力分析のため、A 5 4 9 細胞を各ウェル 4,000 細胞でデュプリケートプレートに播種した。96 ウェルプレートを漸増濃度 (最高 0.05 μ M までの濃度) の M

50

E K 阻害薬トラメチニブと組み合わせた $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ の GFP 又は ZF9-MQ1 負荷 LNP によってトリプリケートで処理し、インキュベートした。未処理細胞及び GFP 処理細胞を対照として使用した。72 時間のインキュベーション後、一方の 96 ウェルプレートで CellTiter-GLO (登録商標) で溶解させて、発光を GloMax (登録商標) Discovery プレートリーダーを使用して定量化した。

【1154】

このデータから、ZF9-MQ1 及びトラメチニブが、各々別個に、A549 細胞の細胞生存能力を阻害したことが示された (図 51A)。組み合わせたとき、ZF9-MQ1 ($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) 及びトラメチニブ (最高 $0.05 \mu\text{M}$ までの濃度) は、その個別の活性によって予測されるものと比べて A549 生存能力の阻害に対して相加を上回る効果を示した (図 51B)。組み合わせたとき、ZF9-MQ1 ($1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$) 及びトラメチニブ (最高 $0.05 \mu\text{M}$ までの濃度) は、その個別の活性によって予測されるものと比べて A549 生存能力の阻害に対して相加を上回る効果を示した (図 51C)。このデータから、ZF9-MQ1 とトラメチニブとの組み合わせが相乗作用的に A549 細胞の生存能力を阻害したことが示唆された (図 51B~図 51C)。

10

【1155】

実施例 52: スーパーエンハンサー領域ターゲティング ZF-KRAB 構築物のパネルによる複数の細胞株における MYC 下方制御に関する研究

この例では、ZF9-MQ1 及びスーパーエンハンサー領域ターゲティングジンクフィンガー構築物 ZF9-MQ1、ZF54-KRAB、ZF61-KRAB、ZF67-KRAB、及び ZF68-KRAB のパネルが H2009、H460、及び H226 細胞における MYC 下方制御に及ぼす効果を判定する。

20

【1156】

mRNA 分析のため、H2009 及び H226 細胞を各ウェル 5,000 細胞でデュプリケートプレートに播種した。 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ の GFP、ZF9-MQ1、ZF54-KRAB、ZF67-KRAB、又は ZF68-KRAB 負荷 LNP によって 96 ウェルプレートをトリプリケートで処理し、インキュベートした。H226 細胞はまた、 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ の非コード RNA 負荷 LNP によってもトリプリケートで処理し、インキュベートした。mRNA 分析のため、H460 細胞を各ウェル 5,000 細胞でデュプリケートプレートに播種した。96 ウェルプレートを $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ の GFP、ZF9-MQ1、ZF61-KRAB、ZF67-KRAB、又は ZF68-KRAB 負荷 LNP によってトリプリケートで処理し、インキュベートした。未処理細胞及び GFP 処理細胞を対照として使用した。72 時間インキュベートした後、細胞を RNeasy (登録商標) Plus 96 キットを使用して mRNA 抽出用に RLT Plus 溶解緩衝液で溶解させた。溶解したサンプルを RNA カラムに結合させて、緩衝液で洗浄し、及び溶出させた。次に RT-Lunascript でポリ A プライマーを使用して mRNA を cDNA に変換した。次に、ヒト MYC mRNA 転写物に特異的な TaqMan (商標) プロブ (Thermo Fisher) を使用した逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 分析に cDNA を使用した。GAPDH mRNA 転写物レベルを全群の正規化に使用した。

30

40

【1157】

このデータは、ZF9-MQ1、ZF54-KRAB、ZF67-KRAB、及び ZF68-KRAB により MYC mRNA レベルが未処理細胞と比較して H2009 において少なくとも 42% (図 52A) 及び H226 細胞において少なくとも 27% (図 52B~図 52C) 下方制御されたことを示した。加えて、ZF9-MQ1、ZF61-KRAB、ZF67-KRAB、及び ZF68-KRAB により、MYC mRNA レベルが未処理細胞と比較して H460 細胞において少なくとも 26% 下方制御された (図 52D)。

【1158】

50

実施例 53：ZF54-KRABとZF9-MQ1との共治療により、ZF9-MQ1単独と比較してMYC mRNAレベルがさらに低減される

この例では、ZF9-MQ1とZF54-KRABとの組み合わせ処理がH2009細胞におけるMYC下方制御に及ぼす効果を判定する。

【1159】

mRNA分析のため、H2009細胞を各ウェル5,000細胞で96ウェルプレートに播種した。プレートの壁を漸増濃度のZF9-MQ1負荷LNPと組み合わせた1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のGFP、ZF9-MQ1負荷LNPによってトリプリケートで処理し、72時間インキュベートした。未処理細胞及びGFP処理細胞を対照として使用した。インキュベーション後、細胞をRneasy（登録商標）Plus 96キットを使用してmRNA抽出用にRLT Plus溶解緩衝液で溶解させた。溶解したサンプルをRNAカラムに結合させて、緩衝液で洗浄し、及び溶出させた。次にRT L unascriptでポリAプライマーを使用してmRNAをcDNAに変換した。次に、ヒトMYC mRNA転写物に特異的なTaqMan（商標）プローブ（Thermo Fisher）を使用した逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）分析にcDNAを使用した。GAPDH mRNA転写物レベルを全群の正規化に使用した。

10

【1160】

このデータから、試験した最も高い濃度では、ZF9-MQ1及びZF54-KRABにより、各々別個に、H2009細胞のMYC mRNAが未処理対照細胞と比べてそれぞれ99%又は62%下方制御されたことが示された。0.313 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満のZF9-MQ1を1又は2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ZF54-KRABと組み合わせたとき、いずれかの処理単独について観察されるよりも大きい程度までMYC mRNAが下方制御されることから、ZF9-MQ1及びZF54-KRABが各々、インビトロでのH2009細胞株におけるMYC mRNAレベルの下方制御に寄与したことが指摘される（図53）。

20

【1161】

実施例 54：ZF9-MQ1とZF54-KRABとの1:1の組み合わせは、少なくとも6日間まで全ての時点でMYC発現を抑制した

この例では、H1299細胞におけるMYC下方制御に対するZF9-MQ1とZF54-KRABとの組み合わせ処理の持続性を判定する。

【1162】

mRNA分析のため、H1299細胞を各ウェル10,000細胞で96ウェルプレートに播種した。96ウェルプレートの壁を1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のGFP、ZF54-KRAB、又はZF9-MQ1+ZF54-KRAB負荷LNPによってトリプリケートで処理し、インキュベートした。未処理細胞及びGFP処理細胞を対照として使用した。トランスフェクション後6時間、1日、2日、3日、又は6日で測定を行った。インキュベーション後、一方の96ウェルプレートは、Rneasy（登録商標）Plus 96キットを使用してmRNA抽出用にRLT Plus溶解緩衝液で溶解させた。溶解したサンプルをRNAカラムに結合させて、緩衝液で洗浄し、及び溶出させた。次にRT L unascriptでポリAプライマーを使用してmRNAをcDNAに変換した。次に、ヒトMYC mRNA転写物に特異的なTaqMan（商標）プローブ（Thermo Fisher）を使用した逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）分析にcDNAを使用した。GAPDH mRNA転写物レベルを全群の正規化に使用した。

30

40

【1163】

このデータから、ZF9-MQ1により、H1299細胞のMYC mRNAが48時間までに未処理対照細胞と比べて95%下方制御され、下方制御は144時間で対照レベルの90%に維持されていたことが示された。ZF9-MQ1+ZF54-KRABの組み合わせにより、MYC mRNAレベルが48時間で98%にまで低下し、下方制御は144時間で対照レベルの93%に維持されていた（図54）。さらに、このデータは、ZF9-MQ1及びZF9-MQ1をZF54-KRABと組み合わせると、H1299細胞のMYC mRNAレベルが少なくとも6日間にわたって下方制御されたことを示し

50

た（図 5 4）。

【 1 1 6 4 】

実施例 5 5：バイシストロン性 Z F 9－M Q 1 __ Z F 5 4－K R A B は M Y C レベルを Z F 9－M Q 1 よりも早く阻害する

この例では、バイシストロン性構築物 Z F 9－M Q 1 __ Z F 5 4－K R A B 及び Z F 5 4－K R A B __ Z F 9－M Q 1 の有効性を Z F 9－M Q 1 及び Z F 5 4－K R A B 構築物単独と比較して判定する。

【 1 1 6 5 】

mRNA 分析のため、H 2 0 0 9 細胞を各ウェル 5 , 0 0 0 細胞で 9 6 ウェルプレートに播種した。9 6 ウェルプレートの壁を 0 . 5 μ g / m L 又は 1 . 0 μ g / m L の G F P 、 Z F 9－M Q 1、Z F 5 4－K R A B、Z F 9－M Q 1 __ Z F 5 4－K R A B 又は Z F 5 4－K R A B __ Z F 9－M Q 1 負荷 L N P によってトリプリケートで処理し、インキュベートした。未処理細胞及び G F P 処理細胞を対照として使用した。トランスフェクション後 2 4 時間及び 4 8 時間で測定を行った。インキュベーション後、一方の 9 6 ウェルプレートは、R n e a s y（登録商標）P l u s 9 6 キットを使用して mRNA 抽出用に R L T P l u s 溶解緩衝液で溶解させた。溶解したサンプルを RNA カラムに結合させて、緩衝液で洗浄し、及び溶出させた。次に R T L u n a s c r i p t でポリ A プライマーを使用して mRNA を c D N A に変換した。次に、ヒト M Y C mRNA 転写物に特異的な T a q M a n（商標）プローブ（T h e r m o F i s h e r）を使用した逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（R T－P C R）分析に c D N A を使用した。G A P D H mRNA 転写物レベルを全群の正規化に使用した。

10

20

【 1 1 6 6 】

このデータから、H 2 0 0 9 細胞への導入から 2 4 時間後、Z F 9－M Q 1 及び Z F 5 4－K R A B により M Y C mRNA レベルが未処理細胞と比較して最大でそれぞれ 8 3 % 及び 5 5 % 下方制御されたことが示された。M Y C mRNA レベルはさらに、処理の 4 8 時間後に Z F 9－M Q 1 処理細胞において未処理対照の 9 6 % にまでさらに 1 3 % 低下したが、一方、Z F 5 4－K R A B では M Y C レベルのさらなる下方制御はなかった。Z F 9－M Q 1 __ Z F 5 4－K R A B 及び Z F 5 4－K R A B __ Z F 9－M Q 1 で処理した細胞の M Y C mRNA レベルは、処理後 2 4 時間で対照細胞のそれぞれ 9 5 % 及び 9 6 % にまで低下した。このデータから、これらの対照薬が M Y C mRNA レベルを Z F 9－M Q 1 よりも早く低下させることが可能であったため、H 2 0 0 9 細胞において 2 4 時間で Z F 9－M Q 1 処理した細胞と比較した処理細胞におけるより高度な M Y C 下方制御につながったことが指摘された。（図 5 5）。

30

【 1 1 6 7 】

実施例 5 6：H 4 6 0 S Q 腫瘍を担持するマウスにおいて Z F 9－M Q 1 治療が腫瘍成長の阻害に及ぼす効果

この例では、ヌードマウスに樹立した皮下 H 4 6 0 腫瘍の成長を Z F 9－M Q 1 が阻害することを実証する。

【 1 1 6 8 】

ヌードマウスにおいて、皮下 H 4 6 0 腫瘍細胞を左側腹部に移植することにより疾患を誘導した。平均腫瘍容積が約 1 0 0 ~ 1 5 0 m m ³ に達したとき治療を開始した。マウスを各群の平均腫瘍容積がほぼ等しくなるように治療群に分割した。P B S（ビヒクル）、ソラフェニブ（標準治療）、M C 3 L N P に製剤化した非コード RNA、又は M C 3 L N P に製剤化した Z F 9－M Q 1 mRNA で腫瘍を処理した。P B S、非コード RNA（配列番号 1 9 8）L N P 及び Z F 9－M Q 1 L N P は、3 m g / k g で 5 日毎に投与して与えた。ソラフェニブは 5 0 m g / k g で連日与えた。腫瘍の長さ及び幅を週 2 回測定した。腫瘍容積は（幅²×長さ）／ 2 として計算した。

40

【 1 1 6 9 】

これらの結果から、Z F 9－M Q 1 治療により、H 4 6 0 皮下腫瘍モデルで腫瘍成長が阻害されたことが示された。研究終了時の平均腫瘍容積は、P B S 治療群、mRNA 陰性

50

対照治療群、及びZF09-MQ1治療群において、それぞれ 1921mm^3 、 1829mm^3 、及び 702mm^3 であった。ソラフェニブ治療マウスの平均腫瘍容積(752mm^3)はZF9-MQ1-LNP治療マウスと区別不能であったことから、このモデルでZF9-MQ1が標準治療薬剤ソラフェニブと同程度又はより良好な活性を呈したことが指摘される。これらの結果から、陰性対照群と比較してZF9-MQ1負荷LNPがインビボH460皮下腫瘍モデルにおける腫瘍成長の阻害に有効であったことが実証された(図56)。

【1170】

均等物

本発明はその詳細な説明と併せて記載されているが、前述の説明は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲の限定でなく、その例示を意図していることが理解されるべきである。一部の態様、利点、及び改良は、以下の特許請求の範囲内にある。

【図面】

【図1A】

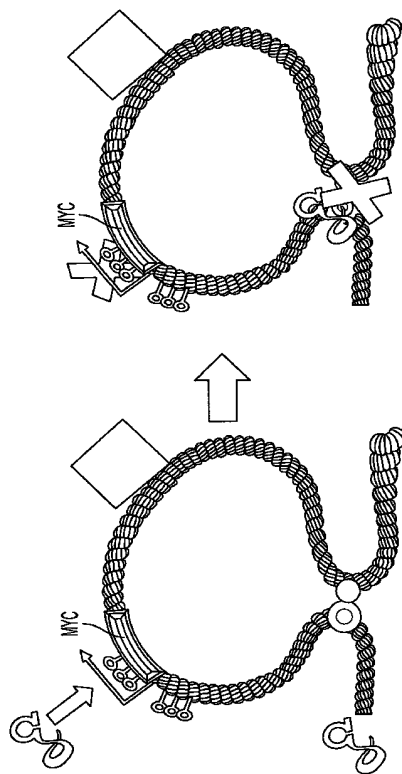


FIG. 1A

【図1B-1】

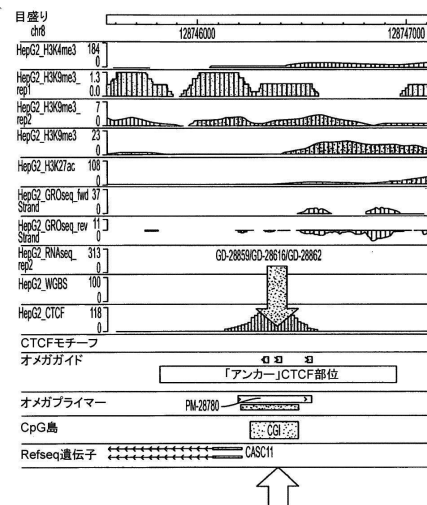


図1B

10

20

30

40

50

【図 1 B - 2】

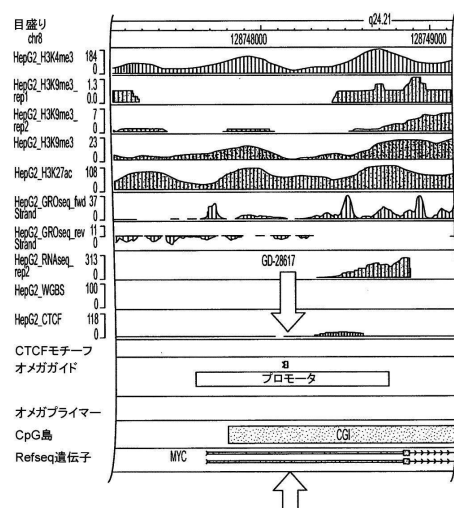


図1B
(続き)

【図 1 B - 3】

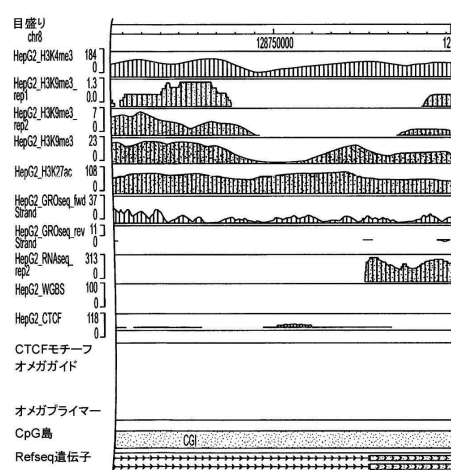
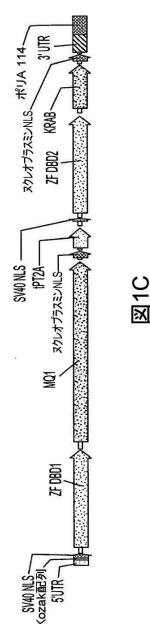


図1B
(続き)

10

20

【図 1 C】



1C

【図 2】

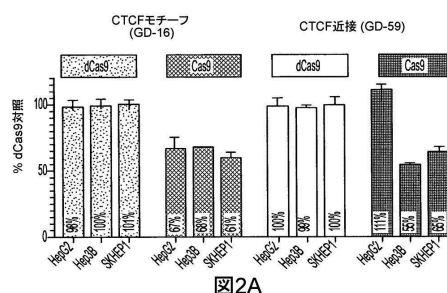


图2A

			GD-16	GD-59

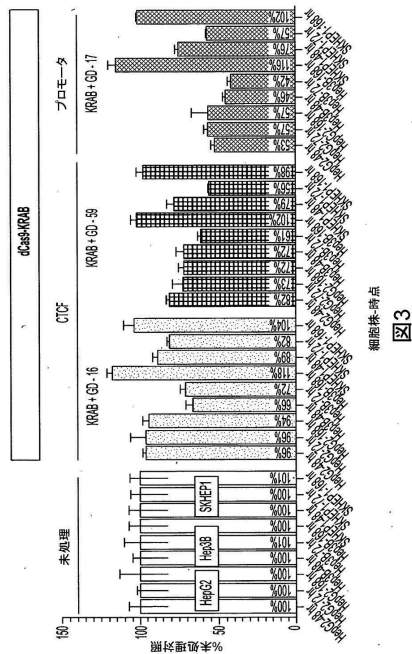
图 2B

30

40

50

【図 3】



【図 4 A - 1】

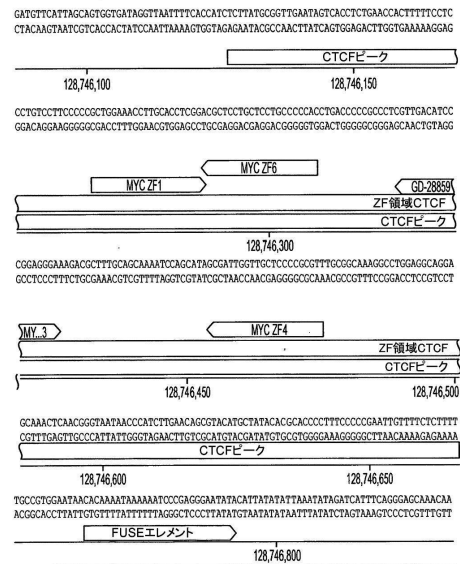


図4A

【図 4 A - 2】

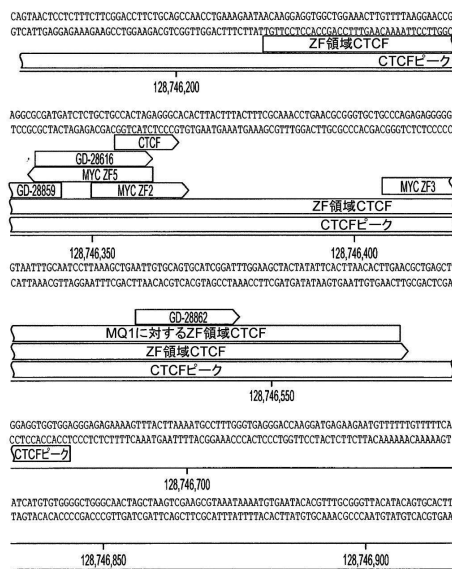
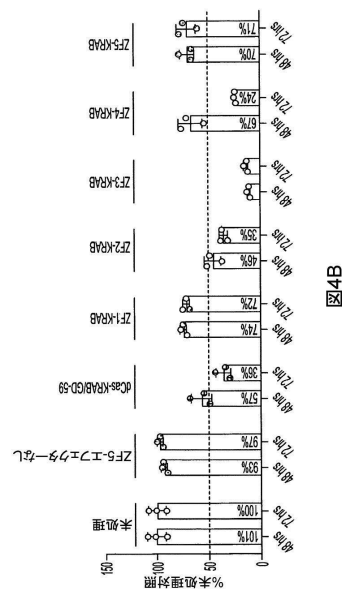
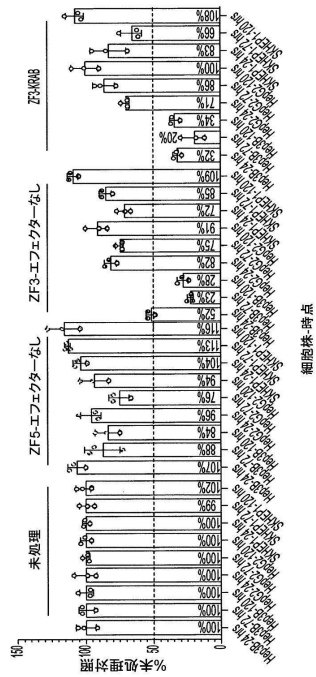


図4A
(続き)

【図 4 B】

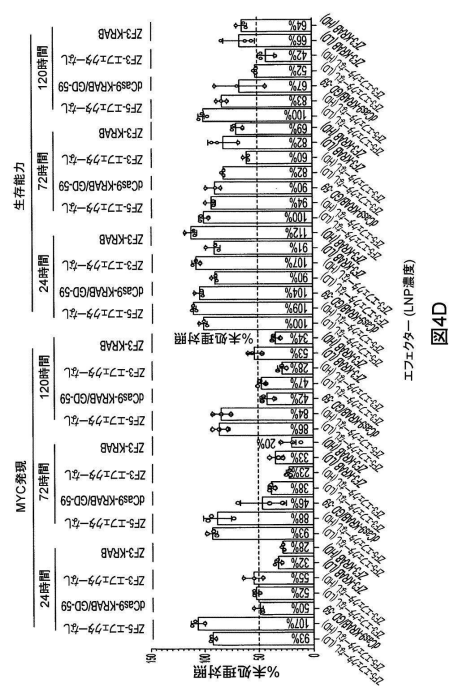


【図 4 C】



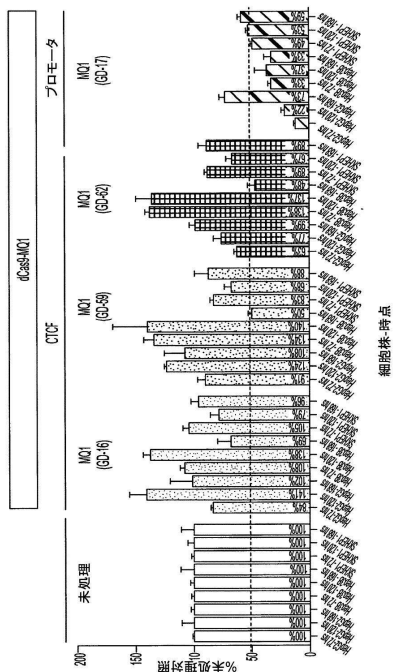
☒ 4C

【図 4 D】



☒ 4D

【図 5】

5 ☒

【図 6 A - 1】

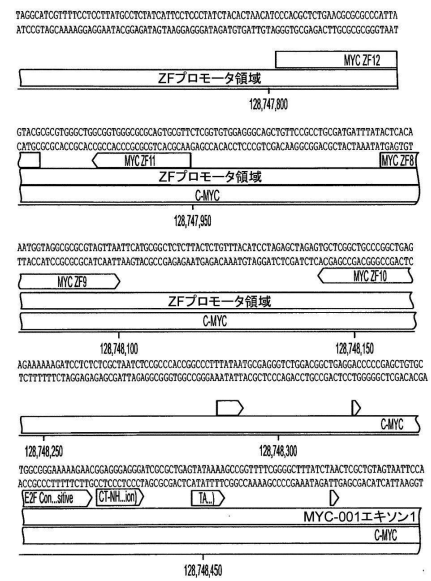


図6A

【図 6 A - 2】

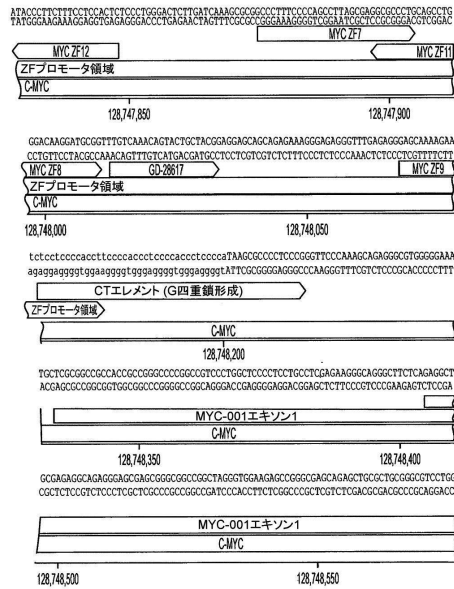
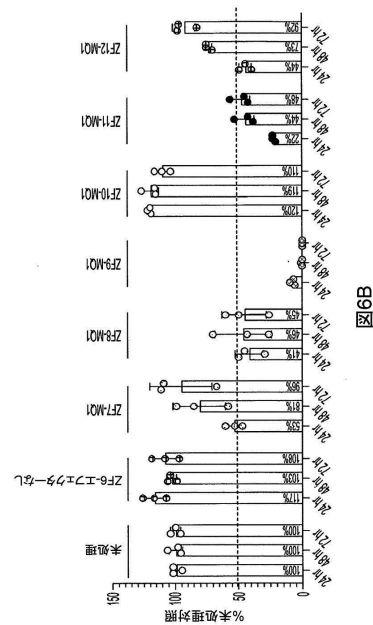


図6A
(続き)

【図 6 B】

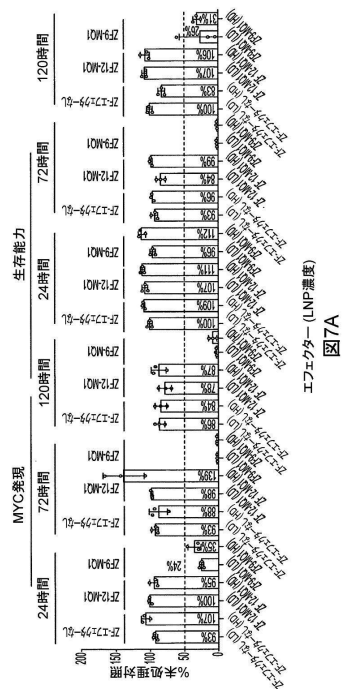


6B

10

20

【図 7 A】



7A

【圖 7 B】

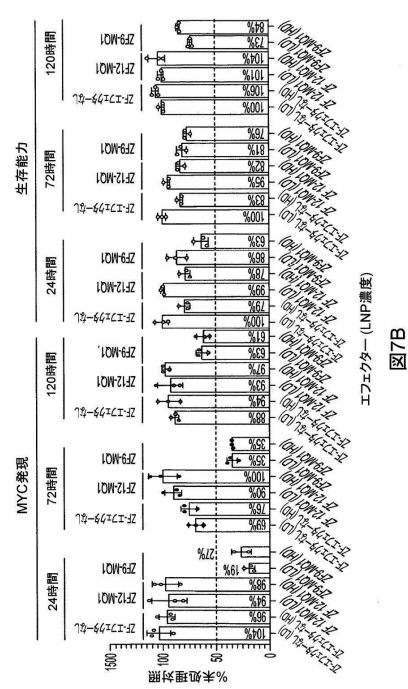


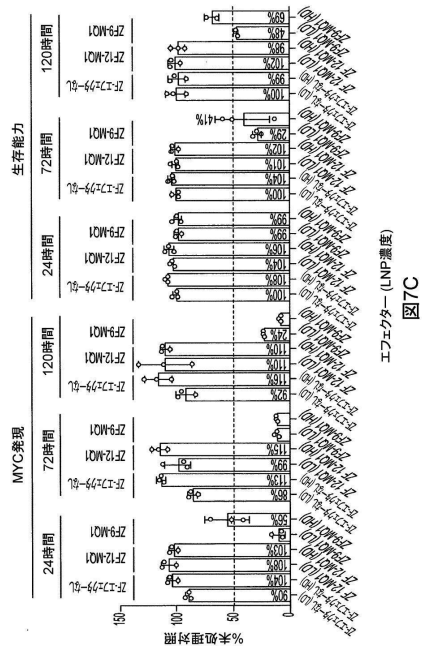
图7B

30

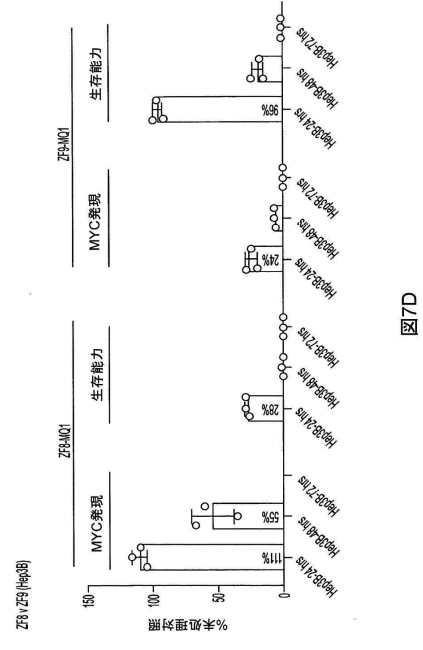
40

50

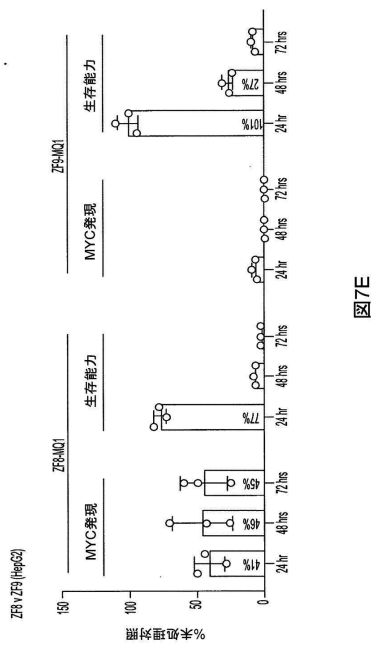
【図 7 C】



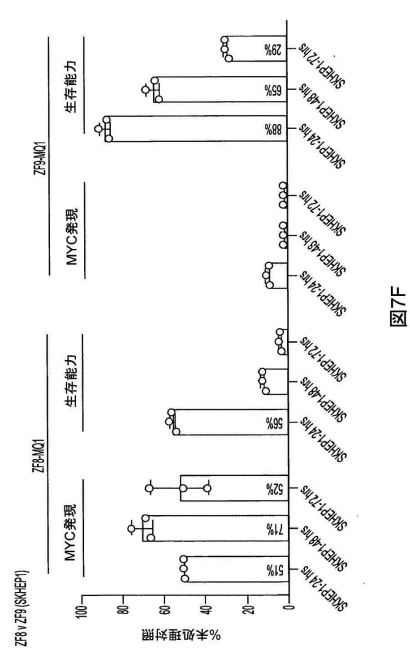
【図 7 D】



【図 7 E】



【図 7 F】



10

20

30

40

50

【図 7 G】

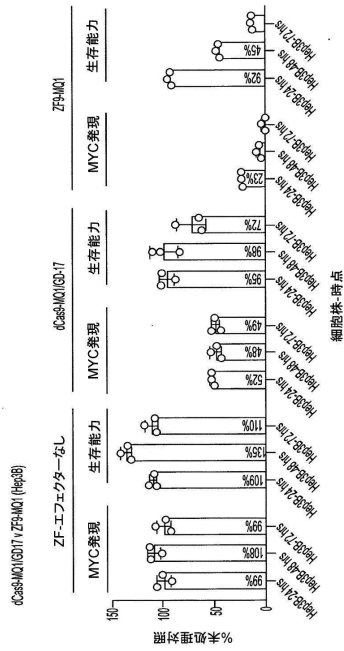


図7G

【図 7 H】

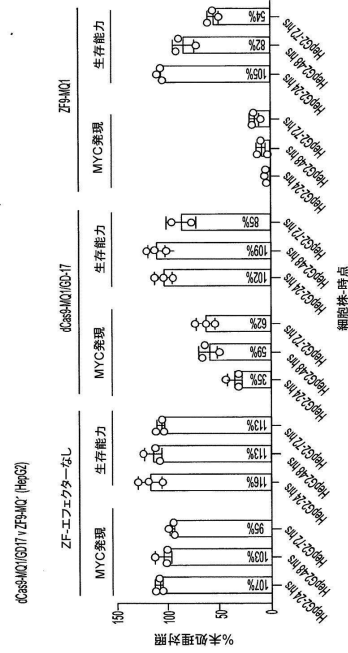


図7H

【図 7 I】

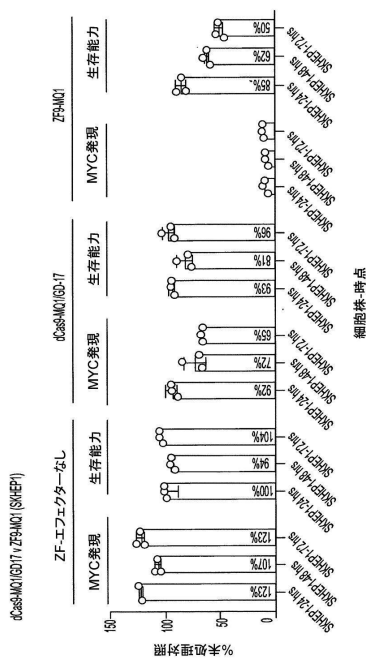


図7I

【図 8 A】

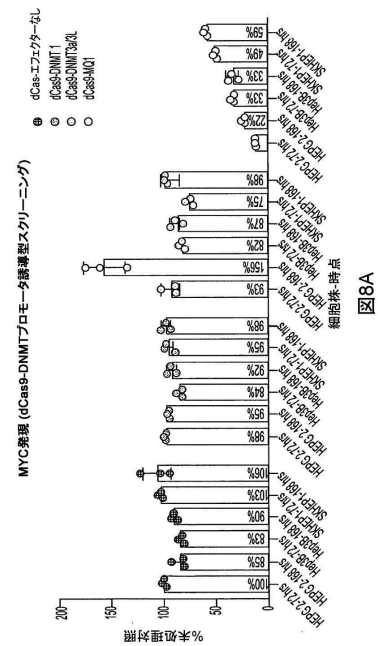


図8A

10

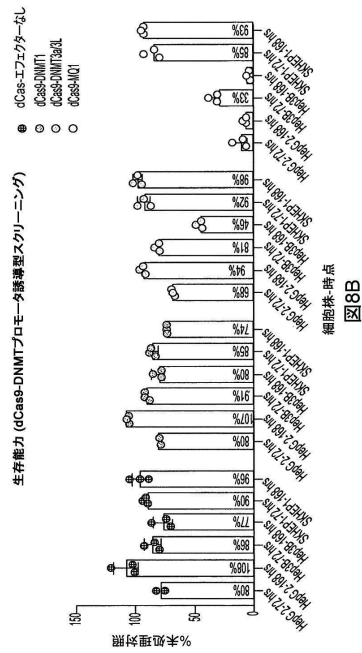
20

30

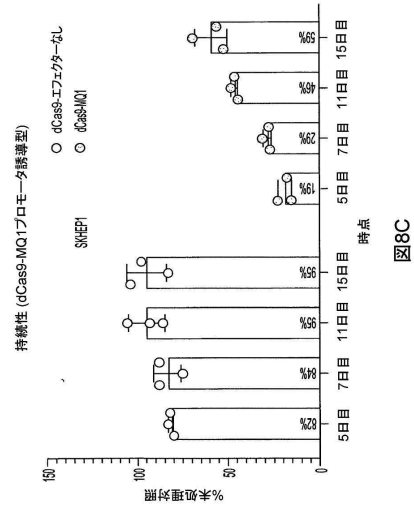
40

50

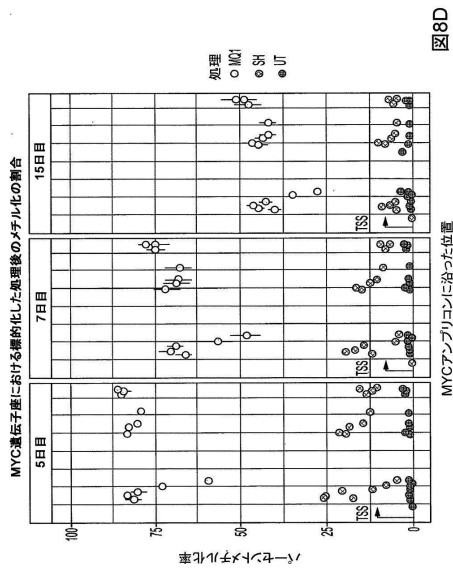
【図 8 B】



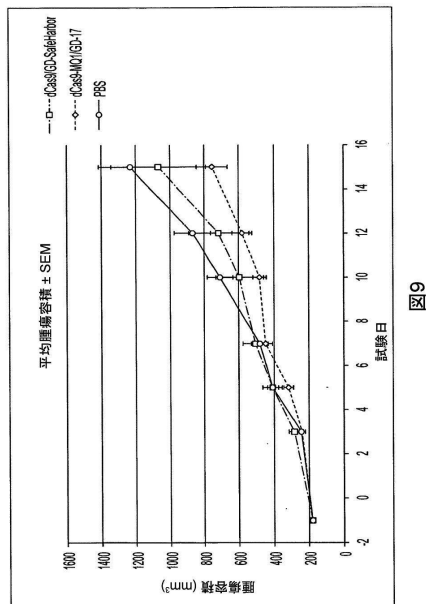
【図 8 C】



【図 8 D】



【図 9】



10

20

30

40

50

【図 10】

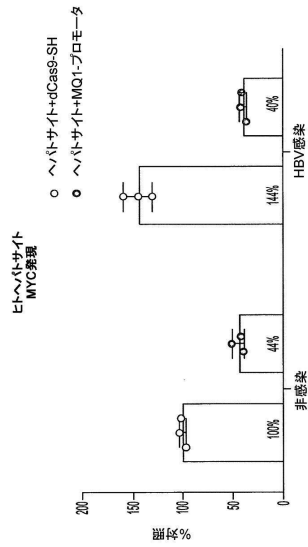


図 10

【図 11】

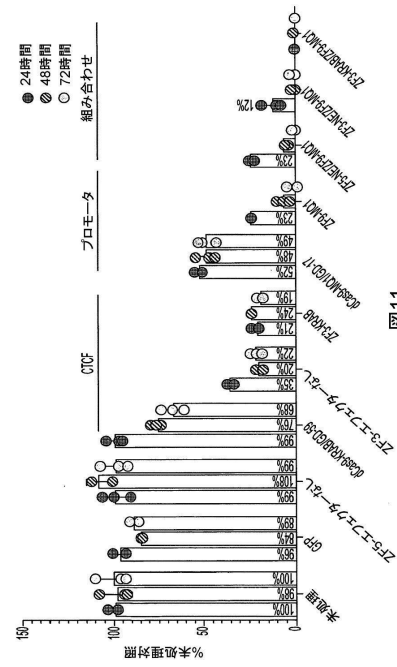


図 11

【図 12】

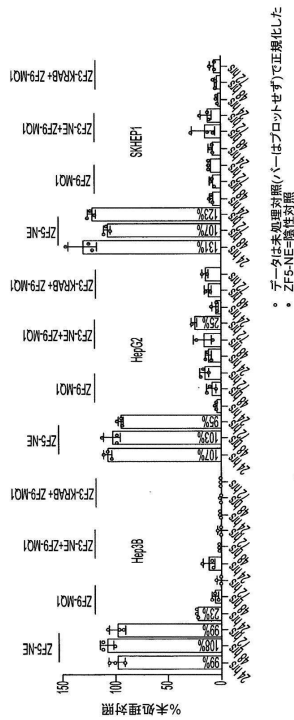


図 12

【図 13】

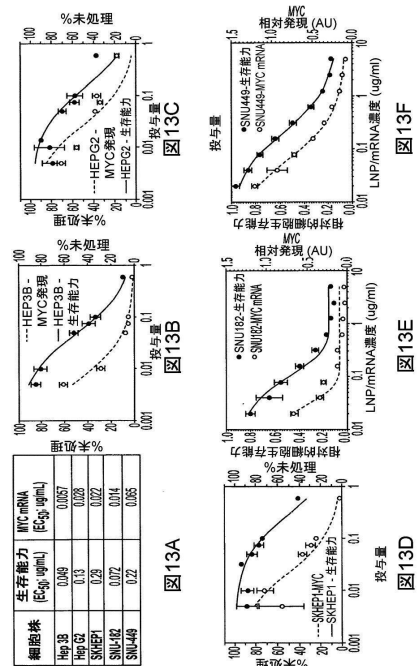


図 13A

図 13B

図 13C

図 13D

10

20

30

40

50

【図 1 4】

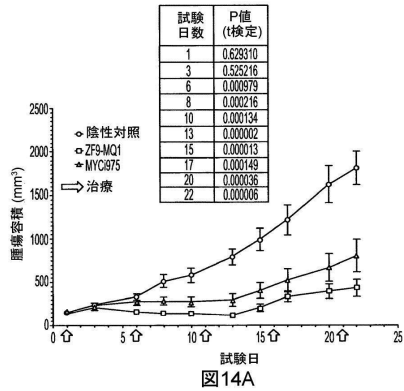


図14A

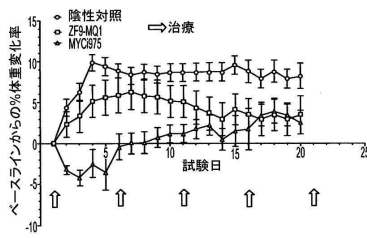


図14B

【図 1 5】

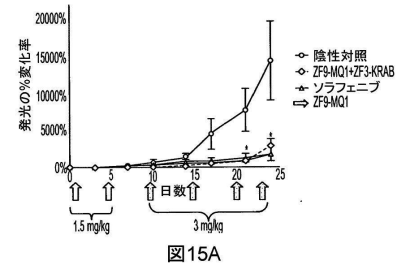


図15A

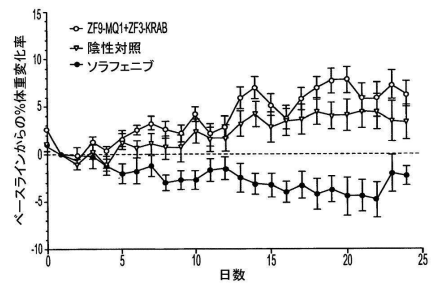


図15B

【図 1 6 A】

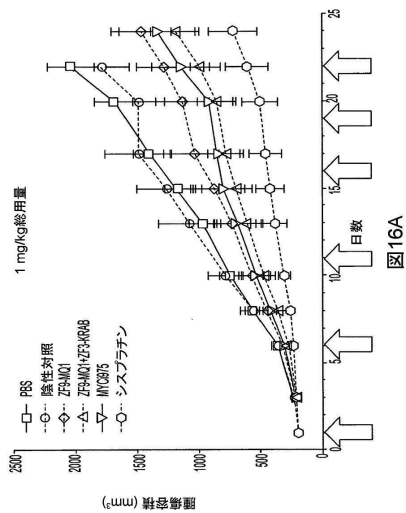


図16A

【図 1 6 B】

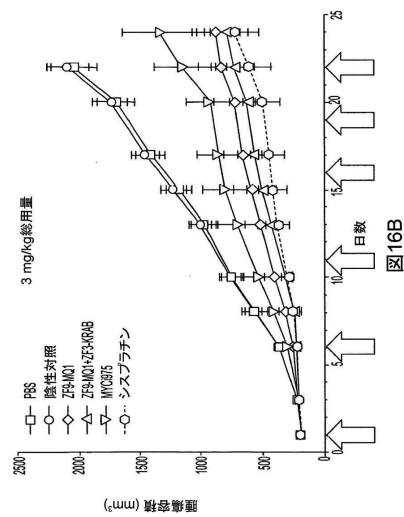


図16B

10

20

30

40

50

【図 18-2】

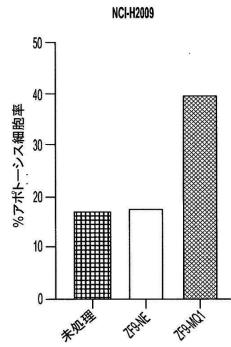


図18D

【図 19】

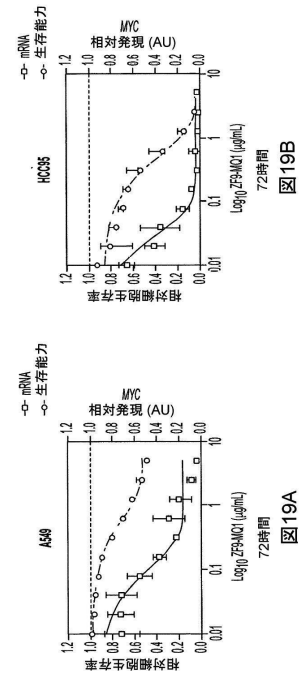


図19B

図19A

【図 20】

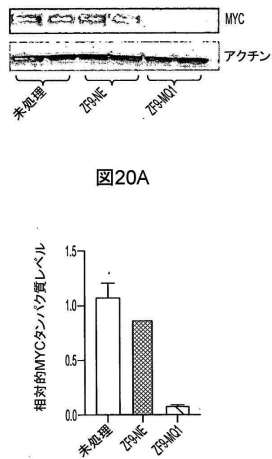


図20A

図20B

【図 21】

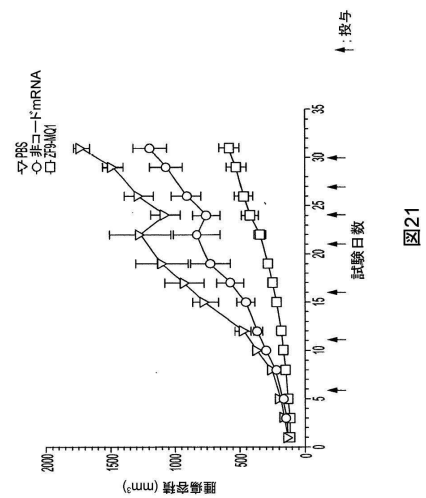


図21

10

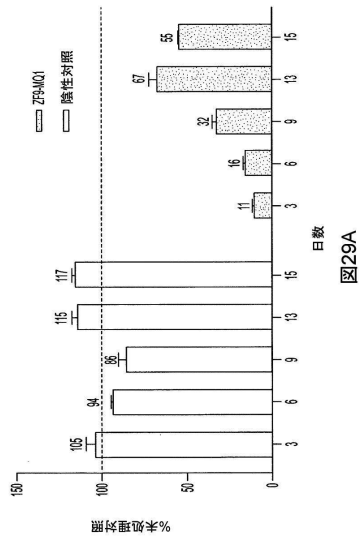
20

30

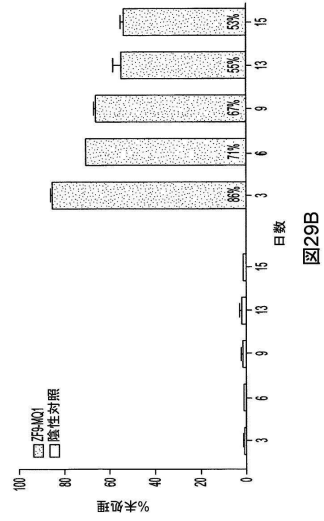
40

50

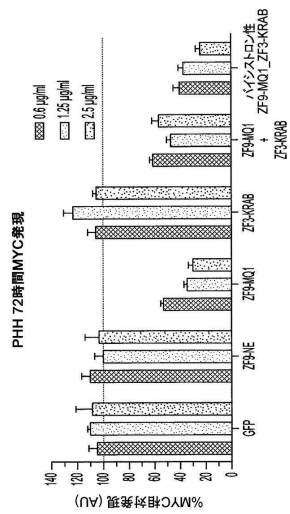
【図 29 A】



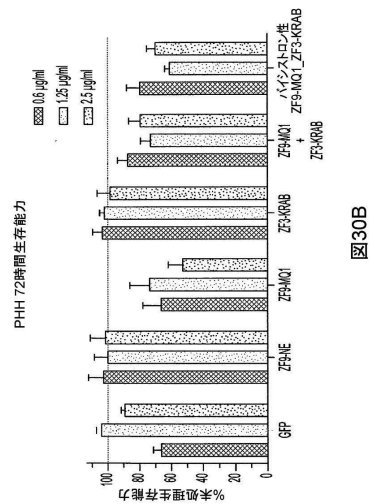
【図 29 B】



【図 30 A】



【図 30 B】



【図 30C】

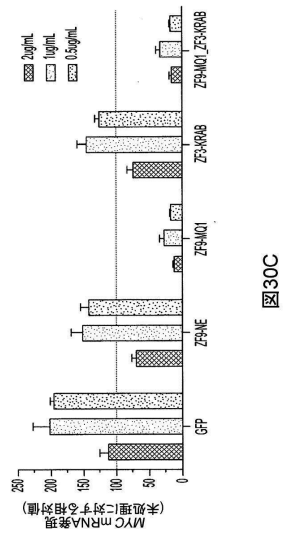


図30C

【図 30D】

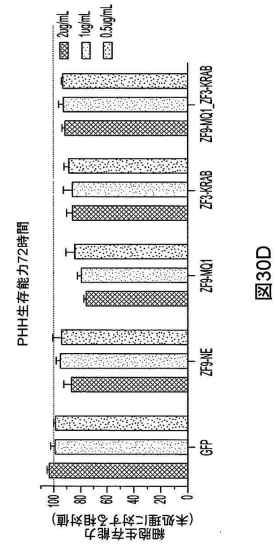


図30D

【図 31A】

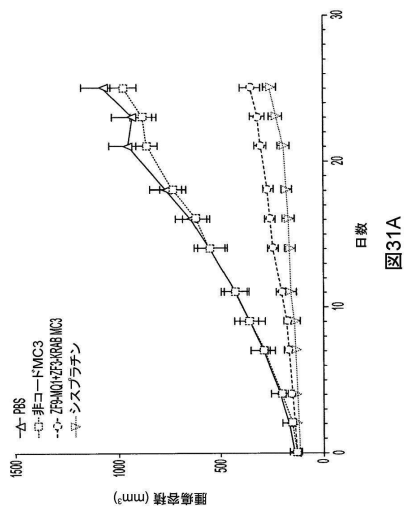


図31A

【図 31B】

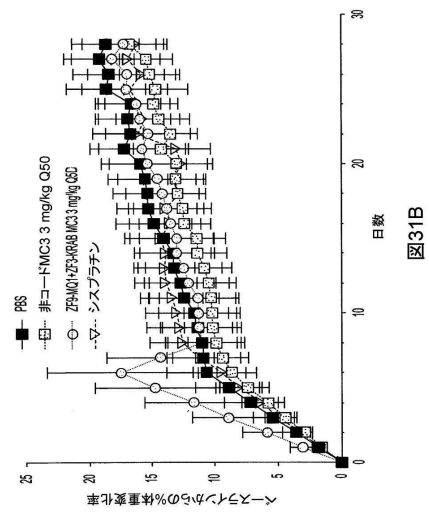
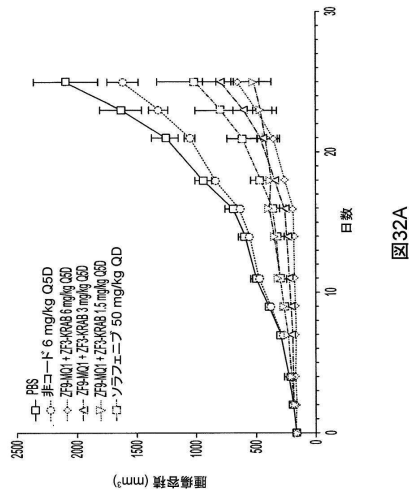
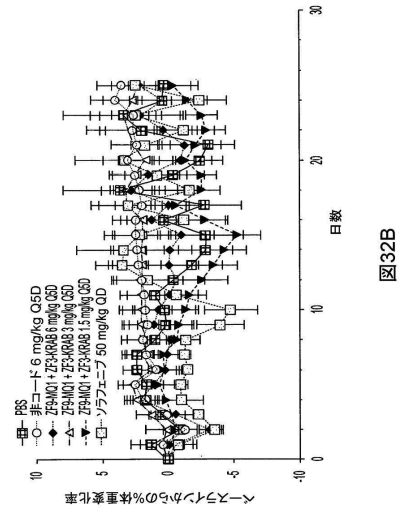


図31B

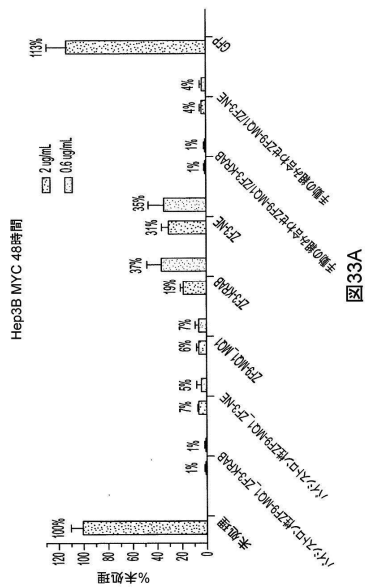
【図 3 2 A】



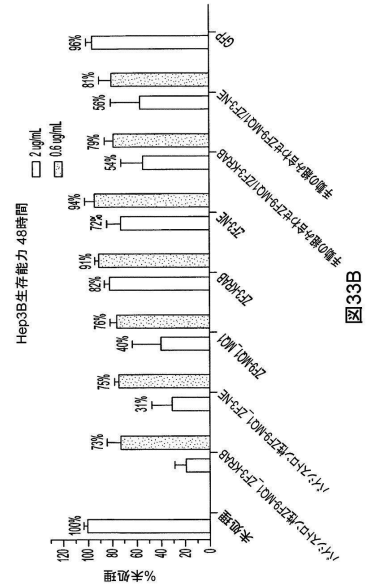
【図 3 2 B】



【図 3 3 A】



【図 3 3 B】



10

20

30

40

50

【図 3 4 - 1】

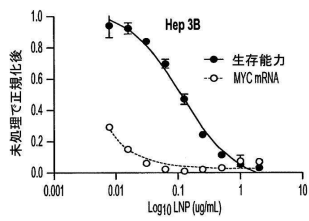


図34A

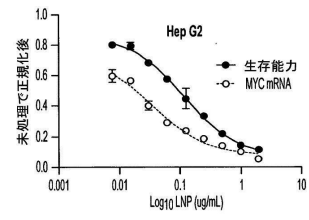


図 34B

【図 3 4 - 2】

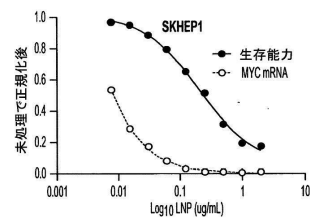


図34C

細胞株	垂型	生存能力 (EC50, ug/mL)	MYC mRNA (EC50, ug/mL)
SKHEP1	1	0.20	0.002
SNU-182	1	0.02	<0.001
SUN-449	1	NR	<0.001
Hep 3B	2	0.12	<0.001
Hep G2	2	0.12	0.037

図34D

【図 3 5】

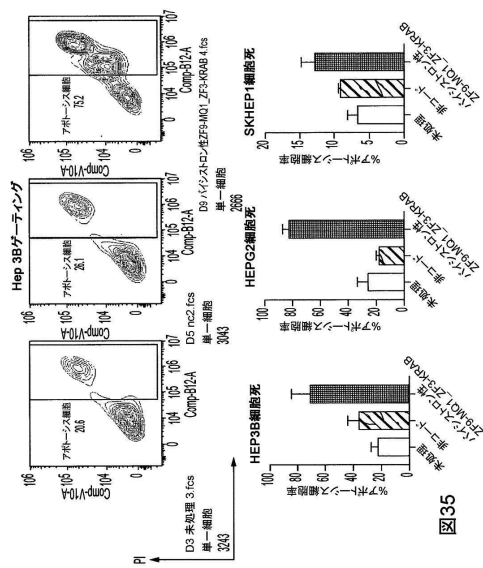


図 35

【図 3 6】

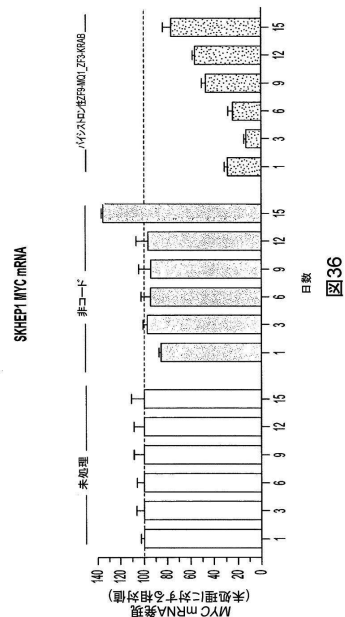


図36

10

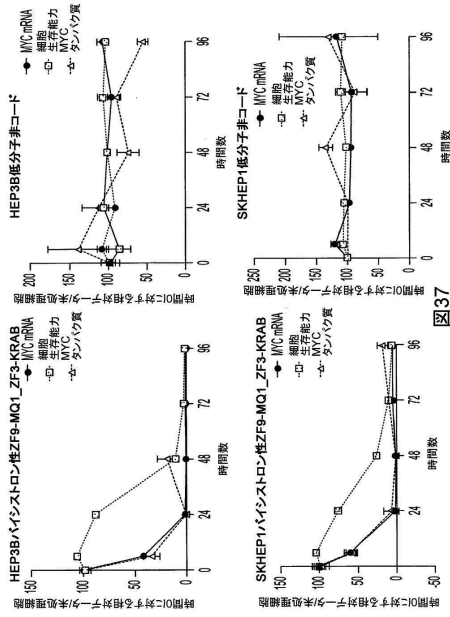
20

30

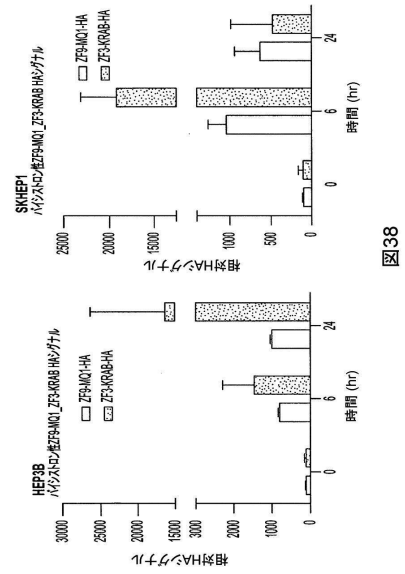
40

50

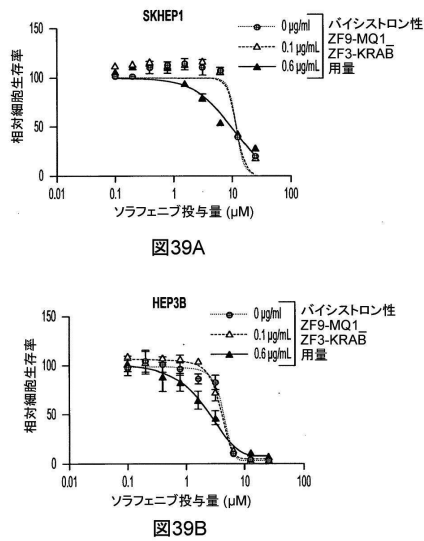
【図 37】



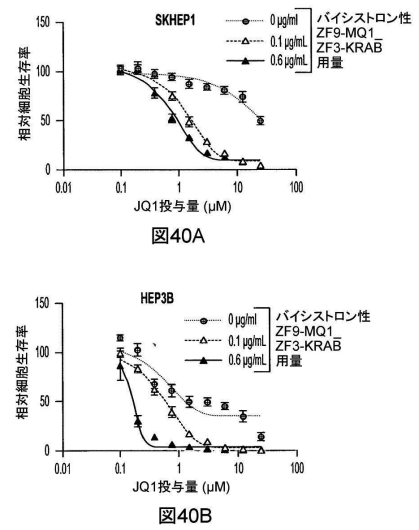
【図 38】



【図 39】



【図 40】



10

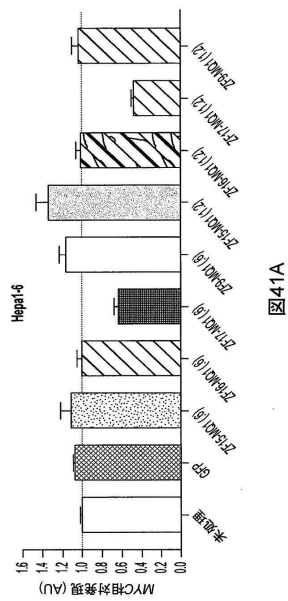
20

30

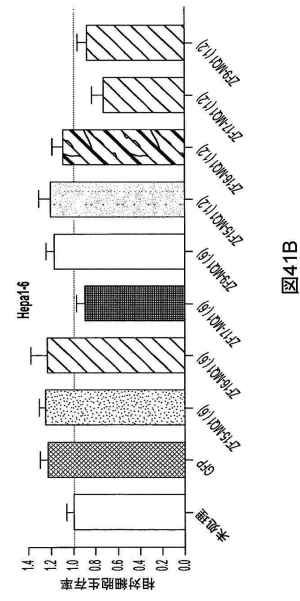
40

50

【図 4 1 A】



【図 4 1 B】



【図 4 2 - 1】

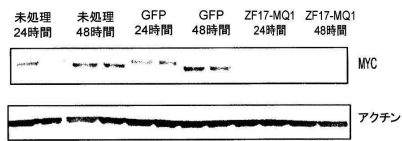


図42A

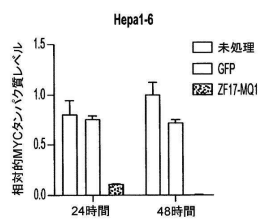


図42B

【図 4 2 - 2】

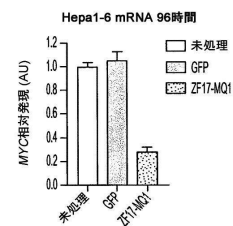


図42C

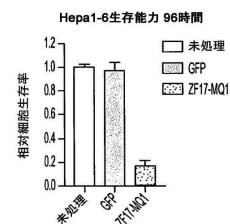


図42D

10

20

30

40

50

【図 4 3】

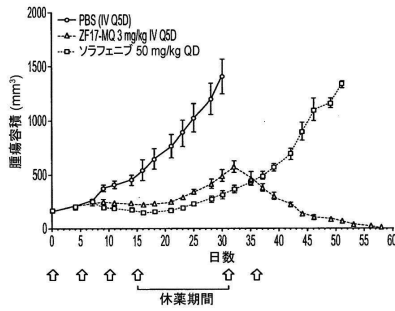


図43

【図 4 4】

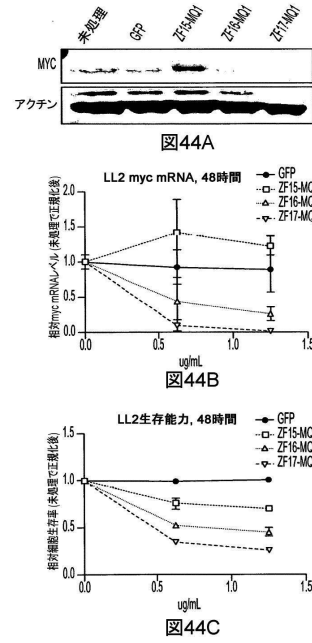


図44A

図44B

図44C

【図 4 5】

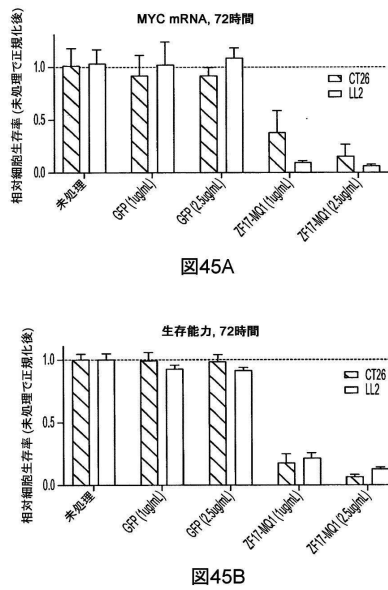


図45A

図45B

【図 4 6】

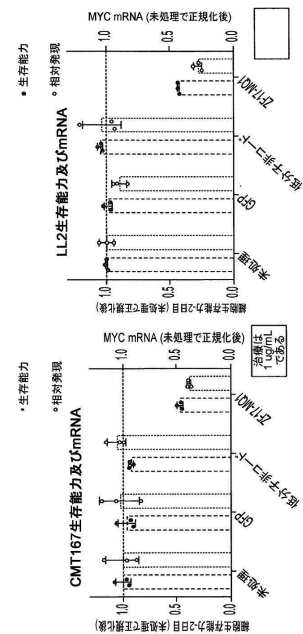


図46

10

20

30

40

50

【図 47】

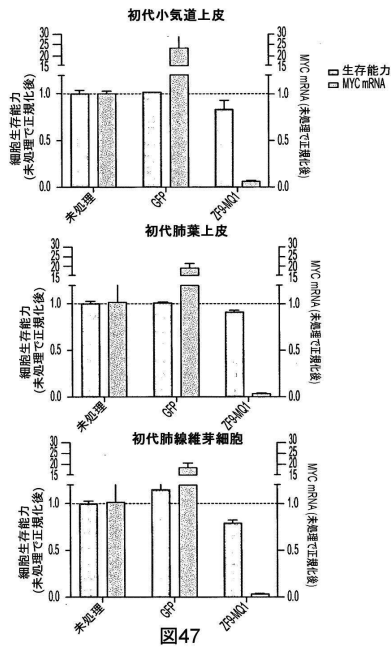


図47

【図 48】

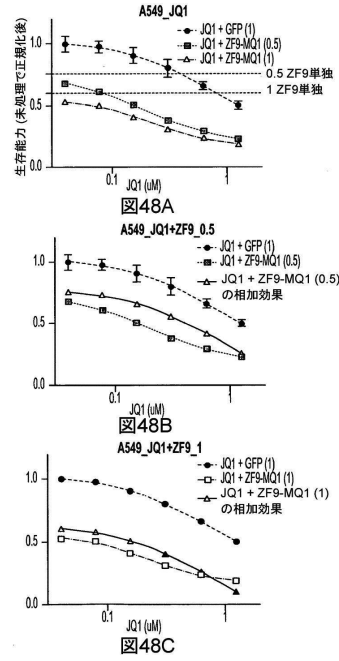


図48A

図48B

図48C

【図 49】

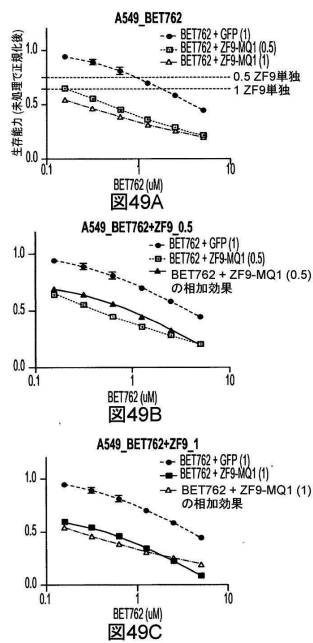


図49A

図49B

図49C

【図 50】

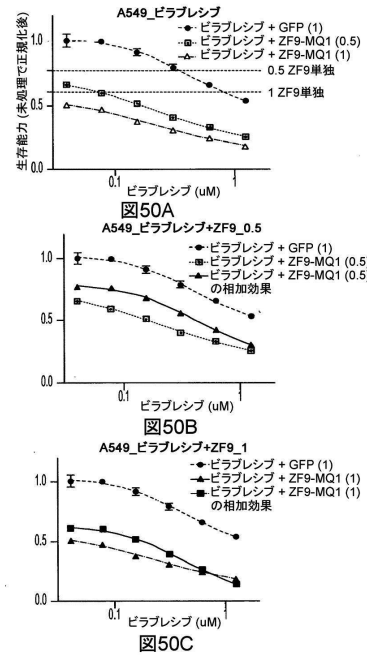


図50A

図50B

図50C

10

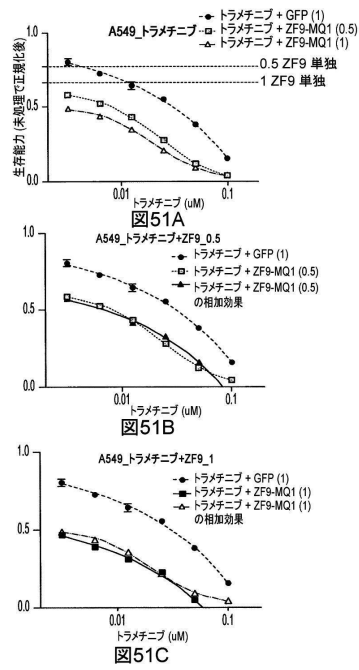
20

30

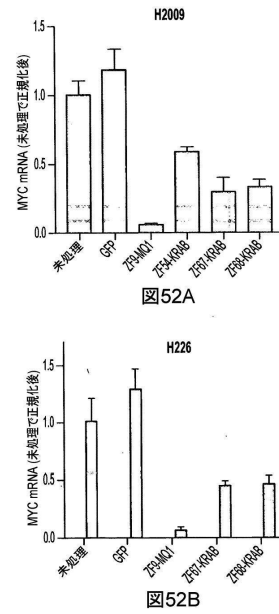
40

50

【図 5 1】



【図 5 2 - 1】



10

20

【図 5 2 - 2】

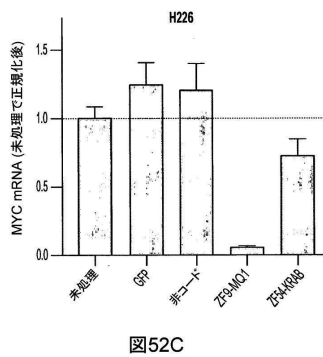


図52C

【図 5 2 - 3】

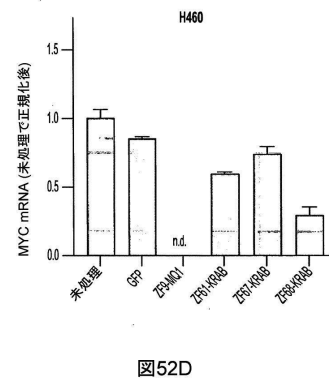


図52D

30

40

50

【図 5 3】

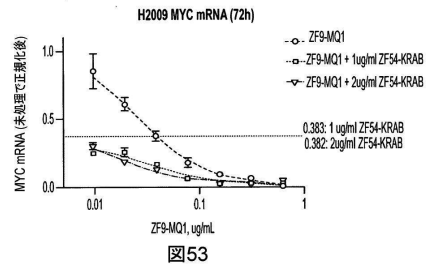


図53

【図 5 4】

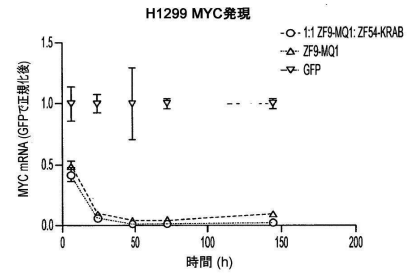


図54

10

20

【図 5 5】

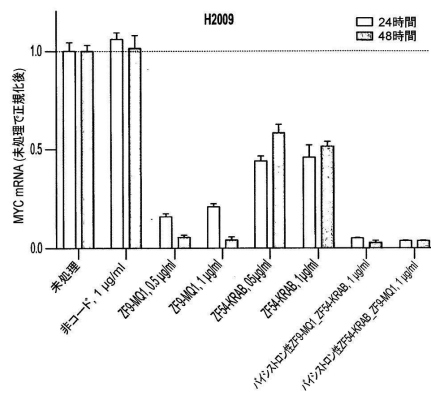


図55

【図 5 6】

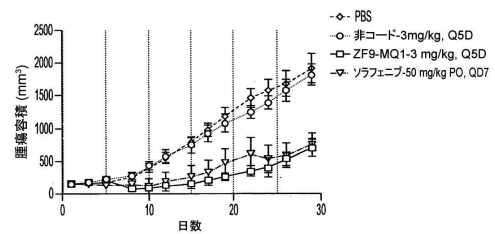


図56

30

40

50

【配列表】

2023553490000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/10058

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 38/45; A61K 38/17; C07K 14/46; C12N 9/10 (2022.01)

CPC - A61K 38/1709; A61K 38/45; C07K 14/4703; C12N 9/1007

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020/061598 A1 (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS V, INC.) 23 April 2020; page 4, lines 4-20; page 205, lines 1-3; page 288, lines 3-6; claim 2	1-3, 21, 32, 36-38
A	KR 101900278 B1 (KONKUK UNIVERSITY GLOCAL INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 19 September 2018; page 5, paragraph 9	1-3, 36
A	(BATTEY, J ET AL.). "Homo sapiens c-myc protein (MYC) gene, complete cds, alternatively spliced." Genbank entry (online). National Center for Biotechnology Information. Retrieved From The Internet: [URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AH002905.2]. 01 August 2016; pages 1-3	1-3, 36
A	WO 2020/163017 A1 (KLOGENIX LLC) 13 August 2020; paragraphs [0021], [00146]; Table 3	21, 32, 37-39
A	US 2013/0130922 A1 (VILNIUS UNIVERSITY et al.) 23 May 2013; paragraph [0067]	21, 32, 37-38
A	WO 2018/183808 A1 (AGENO VIR CORPORATION) 04 October 2018; page 6, lines 1-5	39

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 May 2022 (18.05.2022)

Date of mailing of the international search report

JUN 08 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/10059

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☐ forming part of the international application as filed:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/10059

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-10, 15-20, 24, 27-31, 35, 40-57
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***Please See Supplemental Page-***

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, claims 1-3, 21-23, 32-34, and 36-39, ZF9-MQ1+ZF3-KRAB (expression repression system), SEQ ID NO: 83 (target sequence).

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/10059

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, claims 1-3, 21-23, 32-34, and 36-39, ZF9-MQ1[DNA methyltransferase]+ZF3-KRAB (expression repression system), SEQ ID NO: 83 (target sequence) are directed to expression repressors, systems of expression repressors, and nucleic acid sequences encoding same.

The expression repressors, systems, and nucleic acids of Claims 1-3, 21 (in-part), 32 (in-part), and 36-39 (each in-part) are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched to the extent that they comprise an expression repression system encompassing ZF9-MQ1[DNA methyltransferase]+ZF3-KRAB (first exemplary expression repression system) targeting SEQ ID NO: 83 (first exemplary target sequence).

Applicant is invited to elect additional expression repression systems, and corresponding target sequences, where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional system(s) and target(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected system(s) and target(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be ZF9-MQ1[DNA methyltransferase]+ZF54-KRAB (expression repression system).

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general-inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

No technical features are shared between the distinct expression repression systems of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: an expression repressor comprising: a first targeting moiety that binds a genomic locus and a first effector moiety; an expression repression system comprising: a first expression repressor comprising a first targeting moiety and a first effector moiety; and a second expression repressor comprising a second targeting moiety and a second effector moiety; and a nucleic acid encoding said expression repression system; these shared technical features are previously disclosed by WO 2020/081598 A1 to Flagship Pioneering Innovations V, Inc. (hereinafter "Flagship").

Flagship discloses an expression repressor (a site-specific disrupting agent for reducing expression of a gene; claim 2) comprising: a first targeting moiety (comprising a targeting moiety; claim 2) that binds a genomic locus (that binds to a genomic sequence element; claim 2) and a first effector moiety (an effector, e.g. a disrupting moiety; page 205, lines 1-3); an expression repression system (site-specific disrupting agents, which may be administered with multiple targeting moieties, such as two or more Cas proteins, directed to different sites (expression repression system); page 222, lines 26-29; page 225, lines 8-12; claim 2) comprising: a first expression repressor comprising a first targeting moiety and a first effector moiety (an inactive dCas9 nuclease targeting one DNA site with one gRNA, linked to an effector domain; page 225, lines 4-12); and a second expression repressor comprising a second targeting moiety and a second effector moiety (an inactive dCas9 nuclease targeting a second DNA site with a second gRNA, linked to an effector domain; page 225, lines 4-12); and a nucleic acid encoding said expression repression system (a nucleic acid encoding such a nuclease; page 225, line 1).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Flagship reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	31/519 (2006.01)	A 6 1 K	31/519	
A 6 1 K	31/44 (2006.01)	A 6 1 K	31/44	
A 6 1 K	31/551 (2006.01)	A 6 1 K	31/551	
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 K	38/45 (2006.01)	A 6 1 K	38/45	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	

(32)優先日 令和2年12月15日(2020.12.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/137,097

(32)優先日 令和3年1月13日(2021.1.13)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ウィット, アビゲイル エリザベス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ 5 5, 8 ティーエイチ フロア

(72)発明者 ファレリ, ジェレミア デイル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ 5 5, 8 ティーエイチ フロア

(72)発明者 シャイデッガー, アダム ウォルター

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ 5 5, 8 ティーエイチ フロア

(72)発明者 セナベディス, ウィリアム トーマス ジュニア

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ 5 5, 8 ティーエイチ フロア

(72)発明者 ケネディ, ジョディ ミシエル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ 5 5, 8 ティーエイチ フロア

(72)発明者 ベラグザル, フーダ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ 5 5, 8 ティーエイチ フロア

(72)発明者 ヤラル, デフネ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ

5 5, 8 ティーエイチ フロア
(72) 発明者 リー, ユージーン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ
5 5, 8 ティーエイチ フロア
F ターム (参考) 4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA19 BA01 BA02 BA41 DC25 MA52
MA55 NA05 NA14 ZB072 ZB261 ZC202 ZC412 ZC511 ZC751
4C086 AA01 AA02 BC17 CB09 CB30 MA02 MA04 NA05 ZB26 ZC20
ZC75
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA89 EA20 FA74