

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7587423号
(P7587423)

(45)発行日 令和6年11月20日(2024.11.20)

(24)登録日 令和6年11月12日(2024.11.12)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	Z N A
A 6 1 K	38/48	(2006.01)	A 6 1 K	38/48	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76	

請求項の数 10 (全37頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-565341(P2020-565341)

(86)(22)出願日 令和1年5月22日(2019.5.22)

(65)公表番号 特表2021-525245(P2021-525245
A)

(43)公表日 令和3年9月24日(2021.9.24)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/033616

(87)国際公開番号 WO2019/226832

(87)国際公開日 令和1年11月28日(2019.11.28)

審査請求日 令和4年5月18日(2022.5.18)

(31)優先権主張番号 62/675,003

(32)優先日 平成30年5月22日(2018.5.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 503146324

ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホスピ
タル インコーポレイテッドThe Brigham and Wom
en's Hospital, Inc.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
2 1 1 5 ポストン フランシス ストリ
ート 7 5

(73)特許権者 592017633

ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ
ション
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ポ
ストン フルーツ ストリート 5 5

(74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アルツハイマー病のための遺伝子治療

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルツハイマー病の治療における使用のための医薬組成物であって、

前記医薬組成物が、

i) 野生型のプレセニン1 (P S 1) タンパク質をコードし、かつ、配列番号 5 または配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、ポリペプチド、および/またはi i) 配列番号 5 または配列番号 6 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含み、かつ、セクレターゼ活性を有するタンパク質をコードする、ポリペプチド
を含み、

前記対象が、P S E N 1 遺伝子における E 2 8 0 A、Y 1 1 5 H、L 1 6 6 P、C 4 1 0 Y、e x 9、G 5 4 8、D 2 5 7 A、R 2 7 8 I、L 4 3 5 F、G 3 8 4 A および L 3 9 2 V 変異、ならびに P S E N 1 遺伝子における N 1 4 1 I、G 2 0 6 A、H 1 6 3 R、A 7 9 V、S 2 9 0 C、A 2 6 0 P、A 4 2 6 P、A 4 3 1 E、R 2 6 9 H、L 2 7 1 V、C 4 1 0 Y、E 2 8 0 G、P 2 6 4 L、E 1 8 5 D および L 2 3 5 V 変異からなる群から選択される、1 つまたは複数の変異を有する、

前記医薬組成物。

【請求項 2】

アルツハイマー病の治療における使用のための医薬組成物であって、

前記医薬組成物が、

i) 野生型のプレセニン1 (P S 1) タンパク質をコードし、かつ、配列番号 1 または

10

20

配列番号2のヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド配列、および/または
 i i) 配列番号1または配列番号2と少なくとも90%同一のヌクレオチド配列を含み、
 かつ、セクレターゼ活性を有するタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド配列
 を含むベクターを含み、

前記ポリヌクレオチド配列が、脳において前記P S 1タンパク質および/または前記セ
 クレターゼ活性を有するタンパク質の発現を引き起こすプロモーターに動作可能に結合し、

前記対象が、P S E N 1 遺伝子におけるE 2 8 0 A、Y 1 1 5 H、L 1 6 6 P、C 4 1
 0 Y、 e x 9、G 5 4 8、D 2 5 7 A、R 2 7 8 I、L 4 3 5 F、G 3 8 4 AおよびL
 3 9 2 V変異、ならびにP S E N 1 遺伝子におけるN 1 4 1 I、G 2 0 6 A、H 1 6 3 R
 、A 7 9 V、S 2 9 0 C、A 2 6 0 P、A 4 2 6 P、A 4 3 1 E、R 2 6 9 H、L 2 7 1
 V、C 4 1 0 Y、E 2 8 0 G、P 2 6 4 L、E 1 8 5 DおよびL 2 3 5 V変異からなる群
 から選択される、1つまたは複数の変異を有する、

前記医薬組成物。

【請求項3】

前記ベクターがウイルスベクターである、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターであり、好ましくは
 、前記AAVベクターが、AAV9、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV
 5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV
 2/1、AAV2/2、AAV2/5、AAV2/6、AAV2/7、AAV2/8、A
 AV2/9、AAV2/rh10、AAV2/AAV11またはAAV2/AAV12か
 ら選択され、好ましくは、AAV9またはAAVrh10である、請求項3に記載の医薬
 組成物。

【請求項5】

前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、または

前記ウイルスベクターが、レトロウイルスベクターである、

請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項6】

前記プロモーターが、汎神経プロモーターであり、好ましくは、前記汎神経プロモータ
 ーが、シナプシンIプロモーターである；または前記プロモーターが、神経細胞サブタイ
 プ特異的プロモーターであり、好ましくは前記神経細胞サブタイプ特異的プロモーターが
 、アルファ-カルシウム/カルモジュリンキナーゼ2Aプロモーターである、請求項2か
 ら5のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項7】

前記アルツハイマー病が、孤発性アルツハイマー病である、または

前記アルツハイマー病が、遅発型もしくは早期発症型アルツハイマー病である、

請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項8】

ベクター内にある、または、エキソソーム、もしくは脂質をベースとするナノ粒子(L
 NP)と結合するか、もしくはこれによる送達のために製剤化される、請求項2または7
 に記載の医薬組成物。

【請求項9】

前記ポリヌクレオチドが、プロモーターに動作可能に結合し、

好ましくは、前記プロモーターが、汎神経プロモーターであり、好ましくは、前記汎神
 経プロモーターが、シナプシンIプロモーターである；または前記プロモーターが、神経
 細胞サブタイプ特異的プロモーターであり、好ましくは、前記神経細胞サブタイプ特異的
 プロモーターが、アルファ-カルシウム/カルモジュリンキナーゼ2Aプロモーターであ
 る、

請求項2、7および8のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項10】

10

20

30

40

50

前記医薬組成物は、前記ポリペプチド、または前記ポリヌクレオチドを含む前記ベクターが、治療を必要とする前記対象の CNS に投与されるように、好ましくは、静脈内送達；くも膜下腔内送達；大槽内送達；脳室内送達；または特定の脳領域、任意選択で、大槽、脳室、腰部髄腔内への定位的注射；海馬への直接注射により前記 CNS に投与されるように、用いられるものである、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権の主張

本出願は、2018年5月22日出願の米国特許仮出願第62/675,003号の利益を主張する。前述の全内容は、参照により本明細書に組み込む。

10

【0002】

連邦支援による研究または開発

本発明は、国立衛生研究所により与えられた認可番号 NS041783 および NS075346 の下、政府の援助により行った。政府は、本発明に対する特定の権利を有する。

【0003】

プレセニリン遺伝子治療構築物を使用して、アルツハイマー病 (AD) および他の神経変性疾患を治療するための組成物および方法を本明細書において、特に記載する。

【背景技術】

【0004】

アルツハイマー病 (Alzheimer disease) としても知られるアルツハイマー病 (Alzheimer's disease) は、神経変性認知症の大多数を占め、心疾患、がんおよび脳卒中に次ぐ、米国における第4の主要な死因である。これは、認知機能の進行性喪失、神経変性、神経原線維変化および患者の脳におけるアミロイド斑により特徴づけられる。進行速度は、患者によって異なるが、診断後の平均余命は、3~9年である。現在、アルツハイマー病のための治療は存在しない。

20

【発明の概要】

【0005】

アルツハイマー病 (AD) および他の神経変性疾患、障害または状態を有する対象を治療するのに使用可能な新規のアプローチを本明細書において記載する。プレセニリン遺伝子、PSEN1 および PSEN2 における変異は、高度に浸透性であり、家族性 AD (FAD) における同定されたすべての変異の約90%を占め、ADの病態形成におけるこれらの重要性を強調している。PSEN1 において260種を超える別個の変異が報告されており、これらは、顕性遺伝性であり、ほとんどはミスセンス変異である。病原性 PSEN1 変異は、シスで作用して変異 PS1 機能を障害し、トランスで作用して、野生型プレセニリン1 (PS1) 機能を阻害する (Heilig et al. J Neurosci 33:11606-717 (2013); Zhou et al. Proc Natl Acad Sci USA 114:12731-12736 (2017))。典型的には、これらの性質そのものによって、ドミナントネガティブ変異は、野生型タンパク質の発現により回復させることができない (Herskowitz, I. Nature, 329:219-222 (1987))。本開示は、確立した家族性アルツハイマー病モデルである、異種または同種接合ドミナントネガティブ Psen1 変異を保有する不死化 MEF に、野生型 PSEN1 cDNA を供給すると、このような細胞において障害されたセクレターゼ活性が回復したという予想外の発見に、少なくとも部分的に基づく。PSEN1 および PSEN2 遺伝子におけるドミナントネガティブ変異は、早期発症型家族性アルツハイマー病に関連していることが知られている。PS1 およびプレセニリン2 (PS2) タンパク質は、セクレターゼ複合体の一部であり、PSEN1 および PSEN2 遺伝子における変異は、アルツハイマー病患者におけるアミロイドベータ (A β) タンパク質の蓄積の一因となっていることが、一般に考えられている。したがって、本開示では、PSEN1 (PS1 発現のため) および/または PSEN2 (PS2 発現のため) をベースとする、アルツハイマー病および他の神経変性認知症に有効な遺伝子治療のための方法を提供し、この疾患領域における

30

40

50

大きな突破口を示す。

【 0 0 0 6 】

第1の態様では、神経変性疾患、障害または状態を治療するための方法であって、本明細書に記載する、例えば、P S 1またはP S 2タンパク質をコードする、P S E N 1および/またはP S E N 2遺伝子またはm R N Aを含むポリヌクレオチドを、治療を必要とする対象に投与するステップを含む、方法を本明細書において提供する。一部の実施形態では、神経変性疾患、障害または状態は、アルツハイマー病であり、例えば、P S E N 1および/またはP S E N 2遺伝子における1つまたは複数の変異により特徴づけられる、例えば、家族性アルツハイマー病である。一部の実施形態では、アルツハイマー病は、孤発性アルツハイマー病である。一部の実施形態では、アルツハイマー病は、遅発型または早期発症型アルツハイマー病である。一部の実施形態では、神経変性疾患、障害または状態は、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、ピック病、またはレヴィ小体認知症である。一部の実施形態では、神経変性疾患、障害または状態は、記憶喪失である。一部の実施形態では、神経変性疾患、障害または状態は、認知機能低下または認知機能障害である。一部の実施形態では、認知機能障害は、軽度認知機能障害(M C I)である。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ベクター、例えば、ウイルスベクターである。

10

【 0 0 0 7 】

また、P S 1および/またはP S 2タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列または治療的に活性なその断片であって、任意選択で、このポリヌクレオチド配列が、ベクター中に存在し、P S 1および/またはP S 2をコードするこの配列が、脳においてP S 1および/またはP S 2の発現を引き起こすプロモーターに動作可能に結合する、ポリヌクレオチド配列を本明細書において提供する。また、本明細書に記載する神経変性疾患、障害または状態の治療における使用のための、ポリヌクレオチド配列およびベクターの使用を本明細書において提供する。

20

【 0 0 0 8 】

一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(A A V)ベクターである。一部の実施形態では、A A Vベクターは、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V r h 1 0、A A V 1 1、A A V 1 2、A A V 2 / 1、A A V 2 / 2、A A V 2 / 5、A A V 2 / 6、A A V 2 / 7、A A V 2 / 8、A A V 2 / 9、A A V 2 / r h 1 0、A A V 2 / A A V 1 1またはA A V 2 / A A V 1 2から選択される。

30

【 0 0 0 9 】

一部の実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターである。

【 0 0 1 0 】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、プレセニン1(P S E N 1)遺伝子またはm R N Aをコードする。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、プレセニン2(P S E N 2)遺伝子またはm R N Aをコードする。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、プレセニン1(P S E N 1)およびプレセニン2(P S E N 2)遺伝子またはm R N Aをコードする。

40

【 0 0 1 1 】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、P S 1タンパク質、例えば、P S E N 1 m R N Aをコードし、野生型ヒトプレセニン1転写変異体1 m R N A(配列番号1)の配列または野生型ヒトプレセニン1転写変異体2 m R N Aの配列(配列番号2)と少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 1 2 】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、P S 2タンパク質、例えば、P S E N 2 m R N Aをコードし、野生型ヒトプレセニン2転写変異体1 m R N Aの配列(配列番号1)または野生型ヒトプレセニン2転写変異体2 m R N Aの配列(配列番号2)

50

と少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のヌクレオチド配列を含む。

【0013】

一部の実施形態では、PS1および/またはPS2タンパク質、例えば、プレセニン1(PSEN1)および/またはプレセニン2(PSEN2)遺伝子またはmRNAをコードするポリヌクレオチド配列は、プロモーターに動作可能に結合する。

【0014】

一部の実施形態では、プロモーターは、汎神経プロモーターである。一部の実施形態では、汎神経プロモーターは、シナプシンIプロモーターである。一部の実施形態では、汎神経プロモーターは、CMV前初期エンハンサー、およびCBAイントロン1/エキソン1からなる1.6kbのハイブリッドプロモーター(一般に「CAGGSプロモーター」と呼ばれる)である。

10

【0015】

一部の実施形態では、プロモーターは、神経細胞サブタイプ特異的プロモーター、例えば、アルファ-カルシウム/カルモジュリンキナーゼ2Aプロモーターである。

【0016】

一部の実施形態では、プロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)初期エンハンサー/プロモーター、ハイブリッドCMVエンハンサー/ニワトリアクチン(CBA)プロモーター、またはCMV初期エンハンサーエレメント、ニワトリアクチン遺伝子の第1のエキソンおよび第1のイントロン、ならびにウサギグロブリン遺伝子のスプライス受容部位を含むプロモーター(一般に「CAGプロモーター」と呼ぶ)である。

20

【0017】

一部の実施形態では、PS1および/またはPS2タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列、例えば、PSEN1および/またはPSEN2遺伝子またはmRNAは、治療を必要とする対象のCNSに投与される。

【0018】

一部の実施形態では、PS1および/またはPS2タンパク質をコードするポリヌクレオチド、例えば、PSEN1および/またはPSEN2遺伝子またはmRNAは、静脈内送達、くも膜下腔内送達、脳室内投与、定位的実質内投与、大槽内投与、脳室内送達、または特定の脳領域、例えば、大槽、脳室、腰部髄腔内への定位的注射(複数可)、海馬および/もしくは新皮質への直接注射によりCNSに投与される。

30

【0019】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、エキソソーム、または脂質をベースとするナノ粒子(LNP)と結合する(例えば、これを使用して送達のために製剤化する)。

【0020】

また、本明細書に記載する神経変性疾患、障害または状態を治療するための、本明細書に記載するベクターの使用を本明細書において提供する。一部の実施形態では、神経変性疾患、障害または状態は、アルツハイマー病である。一部の実施形態では、アルツハイマー病は、家族性アルツハイマー病である。一部の実施形態では、アルツハイマー病は、孤発性アルツハイマー病である。一部の実施形態では、アルツハイマー病は、遅発型アルツハイマー病である。一部の実施形態では、神経変性疾患、障害または状態は、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、ピック病、またはレヴィ小体認知症である。一部の実施形態では、神経変性疾患、障害または状態は、記憶喪失である。一部の実施形態では、神経変性疾患、障害または状態は、認知機能低下または認知機能障害である。一部の実施形態では、認知機能障害は、軽度認知機能障害(MCI)である。

40

【0021】

他に定義しない限り、本明細書において使用するすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般に理解されるものと同じの意味を有する。方法および材料は、本発明における使用のために本明細書において記載し、当技術分野において既知の適する他の方法および材料も、使用することができる。材料、方法、および実

50

施例は、単なる例示であり、制限することを意図しない。本明細書において言及するすべての公表文献、特許出願、特許、配列、データベースの項目、および他の参照は、これらの全体を参照により組み込む。矛盾する場合は、定義を含む本明細書により規制する。

【0022】

本発明の他の特徴および利点は、以下の発明を実施するための形態および図、ならびに特許請求の範囲により明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1A - B】孤発性AD脳の海馬錐体神経細胞におけるPS1およびPSEN2をコードするmRNAのレベルの低下を示す図である。Aは、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)前(上部)後(下部)のヒト海馬CA1錐体神経細胞の代表的な画像である。Bでは、定量的RT-PCR解析により、正常な認知能力を有する対照脳(n=8)と比較して、孤発性AD脳のCA1錐体神経細胞のPS1、PSEN2、ニカストリン(Nicastrin)(Nct)mRNAにおいて約30%の減少が示される(n=9、ブラスターゲIIII/IV)。PS1、PSEN2、ニカストリン(Nct)およびPen2 mRNAのレベルは、遍在性に発現するリボソームmRNAであるRPLP0 mRNAに対して正規化し、対照脳由来のmRNAの値は、100%として設定した。すべてのデータは、平均値±SEMとして表す。統計学的解析は、対応のない両側学生t検定を使用して実施した。* p < 0.05; ** p < 0.01; NS、有意差なし。

10

20

【図2A - B】Psen1 KI/+、KI/KIおよびPsen1 -/-細胞におけるセクレターゼ活性の低下を示す図である。Aでは、種々のPsen1遺伝子型を保有する胚に由来する不死化MEFからの細胞ライセートを使用したウエスタンブロッティングにより、NICD生成の減少によって示されるように、PS1 L435F KI/+、KI/KIおよびPS1 -/-細胞におけるセクレターゼ活性の低下が示される。MEFは、Hes1-Lucを1.25 μgおよびNotch-Eを5 ng用いてトランスフェクトした。PS1、NICD、およびチューブリンのN末端に特異的な抗体を使用した。Bでは、NICD(左のグラフ)およびPS1-NTF(右のグラフ)レベルの定量を示す。タンパク質レベルは、チューブリンに対して正規化し、+/+細胞におけるタンパク質レベルは、100%として表す。すべてのデータは、平均値±SEMとして表す。統計学的解析は、一元配置ANOVAをチューキーの事後検定とともに使用して実施した。+/+細胞と比較して、* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001。

30

【図3A】WT hPS1の導入により、障害されたセクレターゼ活性が、変異MEFにおいて回復することを示す図である。Aでは、NICD生成により測定したセクレターゼ活性が、変異MEF細胞において、PS用量依存的に低下する(WT > PS1異種接合KIまたはKO > 同種接合PS1 KIまたはKO > DKO)。Bでは、障害されたセクレターゼ活性が、WT hPS1により回復する。増加量のpCI-hPS1プラスミドDNAは、指示するように、異なる遺伝子型のMEFにトランスフェクトする。ウエスタン解析では、両PS1 NTFおよびNICDが、種々のPS変異MEFにおいて回復することを示した。異種接合L435F KI細胞は、KI/+またはPS1 L435F/+として標識する。N = 3による独立の実験。データは、平均値±SEMを表す。* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001(一元配置ANOVAとともにチューキーの事後検定分析)。

40

【図3B】WT hPS1の導入により、障害されたセクレターゼ活性が、変異MEFにおいて回復することを示す図である。Aでは、NICD生成により測定したセクレターゼ活性が、変異MEF細胞において、PS用量依存的に低下する(WT > PS1異種接合KIまたはKO > 同種接合PS1 KIまたはKO > DKO)。Bでは、障害されたセクレターゼ活性が、WT hPS1により回復する。増加量のpCI-hPS1プラスミドDNAは、指示するように、異なる遺伝子型のMEFにトランスフェクトする。ウエスタン解析では、両PS1 NTFおよびNICDが、種々のPS変異MEFにおいて回

50

復することを示した。異種接合 L 4 3 5 F K I 細胞は、K I / + または P S 1 L 4 3 5 F / + として標識する。N = 3 による独立の実験。データは、平均値 ± S E M を表す。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (一元配置 A N O V A とともにチューキーの事後検定分析)。

【発明を実施するための形態】

【0024】

定義

本開示をさらに容易に理解するために、特定の用語を最初に以下のとおり定義する。以下の用語および他の用語のさらなる定義は、本明細書を通して記載する。

【0025】

投与：

本明細書において使用する場合、用語「投与」は、対象または系への組成物の送達または適用を指す。動物対象（例えば、ヒト）への投与は、任意の適切な経路によってであり得る。例えば、一部の実施形態では、投与は、気管支（気管支滴下によるものを含む）、頰側、経腸、皮間、動脈内、皮内、胃内、髄内、筋肉内、鼻腔内、腹腔内、くも膜下腔内、静脈内、脳室内、粘膜、経鼻、経口、直腸内、皮下、舌下、局所、気管（気管内注入によるものを含む）、経皮、腔内および硝子体内投与であり得る。

【0026】

生物学的に活性：

本明細書において使用する場合、句「生物学的に活性」は、生物系（例えば、細胞培養物、生物等）における活性を有する任意の物質の特性を指す。例えば、生物に投与した場合、この生物に対する生物学的作用を有する物質は、生物学的に活性であると考えられる。また、生物学的活性は、*in vitro*でのアッセイ（例えば、*in vitro*での酵素アッセイ）により判定することができる。特定の実施形態では、タンパク質またはポリペプチドが生物学的に活性である場合、このタンパク質またはポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を共有するタンパク質またはポリペプチドの部分は、典型的に、「生物学的に活性」な部分と呼ぶ。一部の実施形態では、タンパク質は、対象に投与した場合、生物学的活性を呈する細胞培養系から生成および/または精製する。

【0027】

対照：

本明細書において使用する場合、用語「対照」は、結果を比較する標準であるという、当技術分野において理解される意味を有する。典型的には、対照は、変数を分離して、このような変数についての結論を出すことによる実験における完全性の拡大に使用する。一部の実施形態では、対照は、試験反応またはアッセイと同時に実施して比較物を提供する、反応またはアッセイである。一実験では、「試験」（すなわち、試験する変数）を適用する。第2の実験では、試験する変数である「対照」は、適用しない。一部の実施形態では、対照は、歴史的対照（すなわち、それまでに実施した試験またはアッセイ、またはそれまでに既知の量もしくは結果）である。一部の実施形態では、対照は、印刷されたか、もしくは保存された記録であるか、またはこれを含む。対照は、陽性対照または陰性対照であり得る。一部の実施形態では、対照は、差を調べるための試験試料との比較のため、または特性決定の目的のために使用する試料である「参照対照」であり得る。

【0028】

遺伝子治療：

本明細書において使用する場合、用語「遺伝子治療」は、核酸の対象への直接的または間接的投与を含む任意の治療を指す。特定の例では、治療的価値を有するタンパク質は、投与した核酸から発現する。

【0029】

同一性：

本明細書において使用する場合、用語「同一性」は、高分子間、例えば、核酸分子（例えば、DNA分子および/またはRNA分子）間および/またはポリペプチド分子間に全

10

20

30

40

50

体的関連性を指す。例えば、2つの核酸配列の同一性の割合の計算は、最適に比較する目的で2つの配列をアラインメントすることにより実施することができる（例えば、最適なアラインメントのために第1および第2の核酸配列の一方または両方にギャップを導入し、比較目的で非同一致配列を無視することができる）。特定の実施形態では、比較目的でアラインメントした配列の長さは、参照配列の少なくとも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%、少なくとも90%、少なくとも95%、または実質的に100%の長さである。次いで、対応するヌクレオチド位置のヌクレオチドを比較する。第1の配列における位置が、第2の配列における対応する位置と同一のヌクレオチドにより占有される場合、分子は、この位置において同一である。2つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要がある、ギャップの数および各ギャップの長さを考慮すると、2つの配列間の同一性の割合は、配列により共有される同一の位置の数の関数である。2つの配列間の配列の比較および同一性の割合の決定は、数学アルゴリズムを使用して達成することができる。例えば、2つのヌクレオチド配列間の同一性の割合は、メイヤーズおよびミラーのアルゴリズム（CABIOS, 1989, 4: 11-17）を使用して決定することができ、これは、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれており、PAM120残基重み付け表、ギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4を使用する。あるいは、2つのヌクレオチド配列間の同一性の割合は、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムを使用して決定ことができ、NWSgapdna.CMPマトリックスを使用する。例えば、Clustalのような他の種々の配列アラインメントプログラムが利用可能であり、配列同一性の決定に使用することができる。

10

20

【0030】

向上、増加/上昇（increase）、または減少/低下（reduce）：

本明細書において使用する場合、用語「向上」、「増加/上昇（increase）」もしくは「減少/低下（reduce）」、または文法的等価な用語は、ベースライン測定値、例えば、本明細書に記載する治療の開始前の同一の個体における測定値、または本明細書に記載する治療の非存在下での対照個体（または複数の対照個体）における測定値と関連する値を示す。「対照個体」は、治療する個体と同一型であり、ほぼ同一の重症度の例えば、アルツハイマー病を患っている個体であり、治療する個体とほぼ同年齢である（治療する個体および対照個体（複数可）の病期が比較可能であることを確実にするため）。

30

【0031】

神経変性：

本明細書において使用する場合、用語「神経変性」は、1つまたは複数の神経細胞が、損傷し、機能が低下し、機能不全となり、および/または死により失われるプロセスを意味する。神経変性は、急速と漸進の両型および中間型を包含する。したがって、神経変性疾患、状態、または症状は、疾患が神経細胞損傷および/または死と典型的に関連しているという点において特徴づけられるものである。

【0032】

対象：

本明細書において使用する場合、用語「対象」は、ヒトまたは任意の非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマまたは霊長類）を指す。ヒトは、出生前および出生後の形態を含む。多くの実施形態では、対象は、ヒトである。対象は、患者であってもよく、疾患の診断または治療のために医療機関を受診するヒトを指す。用語「対象」は、「個体」または「患者」と互換的に本明細書において使用する。対象は、疾患もしくは障害を患っているか、またはこれに感受性であり得るが、疾患もしくは障害の症状を呈するかどうかはわからない。

40

【0033】

～に罹患している：

疾患、障害、および/または状態（例えば、アルツハイマー病）「に罹患している」個体は、疾患、障害、および/または状態の1つまたは複数の症状と診断されているか、ま

50

たはこれらを呈する。

【0034】

～に感受性：

疾患、障害、および/もしくは状態「に感受性である」個体は、疾患、障害、および/もしくは状態の症状と診断されておらず、ならびに/またはこれらを示していない場合がある。一部の実施形態では、疾患、障害、および/または状態（例えば、アルツハイマー病）に感受性の個体は、（1）疾患、障害、および/または状態の発症と関連する遺伝子変異、（2）疾患、障害、および/または状態の発症と関連する遺伝子多型、（3）疾患、障害、および/または状態と関連するタンパク質の発現および/または活性の上昇および/または低下、（4）疾患、障害、および/または状態の発症と関連する習慣および/または生活様式、（5）疾患、障害、および/または状態の家族歴、（6）特定の細菌またはウイルスに対する反応、（7）特定の化学物質への曝露、のうちの1つまたは複数により特徴づけられ得る。一部の実施形態では、疾患、障害、および/または状態に感受性の個体は、疾患、障害、および/または状態を発症する。一部の実施形態では、疾患、障害、および/または状態に感受性の個体は、疾患、障害、および/または状態を発症しない。

10

【0035】

治療有効量：

本明細書において使用する場合、用語「治療有効量」は、任意の医学的処置に適用可能な合理的ベネフィット/リスク比で、治療した対象に治療作用を付与する、治療タンパク質の量を指す。治療作用は、客観的（すなわち、一部の試験またはマーカーにより測定可能）であるか、または主観的（すなわち、対象が作用の徴候を示すか、または作用を感じる）であり得る。特に、「治療有効量」は、例えば、疾患と関連する症状を回復させ、疾患の発症を予防もしくは遅延させ、および/または同様に、疾患の症状の重症度もしくは頻度を低減させることにより、所望の疾患もしくは状態を治療、回復、もしくは予防するのに、または検出可能な治療もしくは予防作用を示すのに有効な治療タンパク質または組成物の量を指す。治療有効量は、複数の単位用量を含み得る投薬レジメンにより、一般に投与する。特定の任意の治療タンパク質では、治療有効量（および/または有効な投薬レジメンにおける適切な単位用量）は、例えば、投与経路、他の医薬品との組合せに応じて、変化し得る。また、特定の任意の患者のための特定の治療有効量（および/または単位用量）は、治療する障害および障害の重症度；利用する特定の医薬品の活性；利用する特定の組成物；患者の年齢、体重、総体的健康、性別および食事；投与時間、投与経路、および/または利用する特定の融合タンパク質の排せつ率もしくは代謝率；治療の持続時間；ならびに医学的技術分野において周知のような同様の因子を含む多様な因子に依存し得る。

20

30

【0036】

治療：

本明細書において使用する場合、用語「治療（treatment）」（また「治療する（treat）」または「治療（treating）」）は、その広い意味において、特定の疾患、障害、および/または状態の1つまたは複数の症状、特徴、および/または原因を部分的または完全に、軽減、回復、緩和（relieve）、阻害、これらの発症を遅延、これらの重症度を低下、および/またはこれらの発症率を低下させる、物質（例えば、提供する組成物）の任意の投与を指す。一部の実施形態では、このような治療は、関連する疾患、障害および/もしくは状態の徴候を示さない対象、ならびに/または疾患、障害、および/もしくは状態の初期徴候のみを示す対象に投与し得る。あるいは、または加えて、一部の実施形態では、治療は、関連する疾患、障害および/または状態の1つまたは複数の確立された徴候を示す対象に投与し得る。一部の実施形態では、治療は、関連する疾患、障害、および/または状態に罹患していると診断された対象への治療であり得る。一部の実施形態では、治療は、関連する疾患、障害、および/または状態の発症リスクの上昇と統計学的に相関する、1つまたは複数の感受性因子を有することがわかっている対象への治療であり得る。

40

50

【0037】

一般的に言えば、「PS1」は、プレセニン1タンパク質を指し、「PS2」は、プレセニン2タンパク質を指すが、一部の例では、PS1またはPS2は、mRNAまたは遺伝子を指すために使用する。

【0038】

詳細な説明

本開示では、機能性プレセニン1 (PS1) および/またはプレセニン2 (PS2) の送達に基づく、アルツハイマー病ならびに他の神経変性疾患、障害および状態を有する対象を治療するための組成物および方法を、特に提供する。特に、本開示では、プレセニン1 (PS1) および/またはプレセニン2 (PS2) 遺伝子をコードするポリヌクレオチドを、治療を必要とする対象に提供することによる遺伝子治療を検討する。しかし、一部の実施形態では、プレセニン1 (PS1) および/またはプレセニン2 (PS2) タンパク質をまた、使用し得る。

10

【0039】

本発明の種々の態様は、以下の節において詳細に記載する。この節の使用は、本発明を制限することを意味しない。各節は、本発明の任意の態様に適用することができる。この適用では、「または」の使用は、他に述べない限り「および/または」を意味する。

【0040】

治療の方法

非限定的な例としては、本発明の方法は、例えば、PS1またはPS2における変異 (例えば、ドミナントネガティブ変異) と関連する神経変性疾患、例えば、アルツハイマー病に罹患しているか、またはこれに感受性の対象 (例えば、PS1もしくはPS2変異を保有する家族性AD患者または孤発性AD患者) において、野生型ヒトプレセニン1またはプレセニン2を発現させる遺伝子治療を含む。このような遺伝子治療の目的は、特に、家族性または孤発性AD患者の脳において、PS1またはPS2の発現を促進して、PS1またはPS2の発現および/または活性における欠陥を補正または克服することである。FAD患者では、本明細書に記載する遺伝子治療方法により、脳において野生型PS1またはPS2の発現の増加が生じ、PS1またはPS2の変異と関連するセクレターゼ活性の機能障害が回復することが期待される。

20

【0041】

プレセニン遺伝子、PS1およびPS2における変異は、高度に浸透性であり、家族性AD (FAD) における同定されたすべての変異の約90%を占め、ADの病態形成におけるこれらの重要性を強調している。PS1において260種を超える別個の変異が報告されており、これらは、顕性遺伝性であって、ほとんどはミスセンス変異である。病原性PS1変異は、シスで作用して変異PS1機能を障害し、トランスで作用して、野生型プレセニン1 (PS1) 機能を阻害する (Heilig et al. J Neurosci 33:11606-717 (2013); Zhou et al. Proc Natl Acad Sci USA 114:12731-12736 (2017))。典型的には、これらの性質そのものによって、ドミナントネガティブ変異は、野生型タンパク質の発現により回復させることができない (Herskowitz, I. Nature, 329:219-222 (1987))。しかし、驚くべきことに、本明細書に示すように、異種または同種接合PS1変異を保有する不死化MEFに、hPS1 cDNAをトランスフェクトすると、このような細胞において障害されたセクレターゼ活性が回復し (以下の実施例を参照)、驚くべきことに、野生型PS1タンパク質の高発現により、変異プレセニンタンパク質のドミナントネガティブ作用を克服することができることを示す。プレセニンは、セクレターゼ複合体の触媒サブユニットであり、ニカストリン、APH-1 (前咽頭欠損1) およびPEN2 (プレセニンエンハンサー2) をも含み、これらすべては、セクレターゼ複合体の会合、安定性および活性のために必要とされる。驚くべきことに、理論に拘束されることを望むものではないが、本発明のデータに基づいて、野生型プレセニンタンパク質により、セクレターゼ複合体における変異プレセニンタンパク質を置換可能であり得ることが考えられる。したがって、野生型PS1またはPS

30

40

50

2タンパク質の発現は、AD患者におけるセクレターゼの発現および/または活性の機能障害を回復させるのに使用することができる。

【0042】

本明細書に記載の方法および組成物は、同様に使用して、他の神経変性疾患、障害または状態を治療することができる。

【0043】

アルツハイマー病

本明細書に記載の方法は、それらに限定されないが、家族性および孤発性アルツハイマー、早期発症型または遅発型アルツハイマー病を含む、すべての型のアルツハイマー病を有する、発症している対象を治療するか、またはこのリスクを低下させるのに使用し得る。一部の実施形態では、本発明の方法は、プレセニン1 (PS1) および/またはプレセニン2 (PS2) における変異と関連する、早期発症型家族性アルツハイマー病 (AD) の発症を治療するか、またはこのリスクを低下させるのに使用し得る (Sherrington, et al., Nature 375:754-760 (1995); Rogaev, et al., Nature 376:775-778 (1995); Levy-Lahad, et al., Science 269:970-973 (1995); Hiltunen, et al., Eur. J. Hum. Genet. 8:259-266 (2000); Jonghe, et al., Hum. Mol. Genet. 8:1529-1540 (1999); Tysoe, et al., Am. J. Hum. Genet. 62:70-76 (1998); Crook, et al., Nat. Med. 4:452-455 (1998)、これらすべては、参照により本明細書に組み込む)。

【0044】

一部の実施形態では、本発明の方法は、PSEN1またはPSEN2アレルにおける変異、例えば、野生型PS1/PS2タンパク質に対するドミナントネガティブ作用を有する変異を有する対象を治療するのに使用し得る。例となる変異としては、C410Y、ex9、G548、D257A、L166P、R278I、L435F、G384A、Y115H、およびL392V、ならびにN141I、G206A、H163R、A79V、S290C、A260P、A426P、A431E、R269H、L271V、C1410Y、E280G、P264L、E185D、L235V、およびM146V変異が挙げられる(例えば、Heilig et al., J. Neurosci., 33(28):11606-11617 (2013); Watanabe et al., J. Neurosci. 32(15):5085-5096 (2012); Brouwers et al., 2008 Ann Med 40 (8): 562-83; Watanabe and Shen, PNAS November 28, 2017 114 (48) 12635-12637; Zhou et al., PNAS November 28, 2017 114 (48) 12731-12736; Hsu et al., Alzheimers Res Ther. 2018 Jul 18;10(1):67を参照)。野生型PSタンパク質に対するドミナントネガティブ作用を有し得る、さらに例となる変異としては、PSEN1においては: N32N; R35Q; D40del (delGAC); D40del (delACG); E69D; A79V; V82L; I83_M84del (delIM、I83/M84、I83/M84); I83T; M84V; L85P; P88L; V89L (G>T); V89L (G>C); C92S; V94M; V96F; V97L; T99A; F105C; F105I; F105L; F105V; R108Q; L113_I114insT (Intron4、InsTAC、p. 113+1delG、splice5); L113P; L113Q; Y115C; Y115D; Y115H; T116I; T116N; T116R; P117A; P117L; P117R; P117S; E120D (A>C); E120D (A>T); E120G; E120K; E123K; Q127_R128del (CAGA); InsG (G) (c. 379_382delXXXXinsG); H131R; S132A; L134R; N135D; N135S; N135Y; A136G; M139I (G>C); M139I (G>A); M139K; M139L; M139T; M139V; V142F; I143F; I143M; I143N; I143T; I143V; M146I (G>C); M146I (G>T); M146I (G>A); M146L (A>C); M146L (A>T); M146V; T147I; T147P; L150P; L153V; Y154C; Y154N; Y156F; Y156_R157insIY; R157S; H163P; H163R; H163Y; A164V; W165C (G>C); W165C (G>T); W165G; L166H; L16

10

20

30

40

50

6 P ; L 1 6 6 R ; L 1 6 6 V ; L 1 6 6 d e l ; I 1 6 7 d e l (T T A d e l) ; I
 1 6 7 d e l (T A T d e l) ; I 1 6 8 T ; S 1 6 9 d e l (S 1 6 9、 S e r 1 6
 9 d e l、 S 1 7 0) ; S 1 6 9 L ; S 1 6 9 P ; S 1 7 0 F ; S 1 7 0 P ; L 1 7 1
 P ; L 1 7 3 F (G > C) ; L 1 7 3 F (G > T) ; L 1 7 3 W ; L 1 7 4 d e l ; L 1
 7 4 M ; L 1 7 4 R ; F 1 7 5 S ; F 1 7 6 L ; F 1 7 7 L ; F 1 7 7 S ; S 1 7 8 P ;
 G 1 8 3 V ; E 1 8 4 D ; E 1 8 4 G ; V 1 9 1 A ; I 2 0 2 F ; G 2 0 6 A ; G 2 0 6
 D ; G 2 0 6 S ; G 2 0 6 V ; G 2 0 9 A ; G 2 0 9 E ; G 2 0 9 R ; G 2 0 9 V ; S 2
 1 2 Y ; I 2 1 3 F ; I 2 1 3 L ; I 2 1 3 T ; H 2 1 4 D ; H 2 1 4 N ; H 2 1 4 Y ;
 G 2 1 7 D ; G 2 1 7 R ; L 2 1 9 F ; L 2 1 9 P ; L 2 1 9 R ; R 2 2 0 P ; Q 2 2 2
 H ; Q 2 2 2 P ; Q 2 2 2 R ; Q 2 2 3 R ; L 2 2 6 F ; L 2 2 6 R ; I 2 2 9 F ; S 2
 3 0 I ; S 2 3 0 N ; S 2 3 0 R ; A 2 3 1 P ; A 2 3 1 T ; A 2 3 1 V ; L 2 3 2 P ;
 M 2 3 3 I (G > A) ; M 2 3 3 I (G > C) ; M 2 3 3 L (A > T) ; M 2 3 3 L (A
 > C) ; M 2 3 3 T ; M 2 3 3 V ; L 2 3 5 P ; L 2 3 5 R ; L 2 3 5 V ; F 2 3 7 I ;
 F 2 3 7 L ; I 2 3 8 M ; K 2 3 9 N ; T 2 4 5 P ; A 2 4 6 E ; A 2 4 6 P ; L 2 4 8
 P ; L 2 4 8 R ; L 2 5 0 F ; L 2 5 0 S ; L 2 5 0 V ; Y 2 5 6 S ; A 2 6 0 V ; V 2
 6 1 F ; V 2 6 1 L ; L 2 6 2 F ; L 2 6 2 V ; C 2 6 3 F ; C 2 6 3 R ; P 2 6 4 L ;
 G 2 6 6 S ; P 2 6 7 A ; P 2 6 7 L ; P 2 6 7 S ; R 2 6 9 G ; R 2 6 9 H ; L 2 7 1
 V ; V 2 7 2 A ; E 2 7 3 A ; E 2 7 3 G ; T 2 7 4 R ; A 2 7 5 V ; R 2 7 8 I ; R 2
 7 8 K ; R 2 7 8 S ; R 2 7 8 T ; E 2 8 0 A ; (P a i s a) ; E 2 8 0 G ; E 2 8 0
 K ; L 2 8 2 F ; L 2 8 2 R ; L 2 8 2 V ; F 2 8 3 L ; P 2 8 4 L ; P 2 8 4 S ; A 2
 8 5 V ; L 2 8 6 P ; L 2 8 6 V ; T 2 9 1 A ; T 2 9 1 P ; K 3 1 1 R ; E 3 1 8 G ;
 D 3 3 3 G ; R 3 5 2 C ; R 3 5 2 _ S 3 5 3 i n s R ; T 3 5 4 I ; R 3 5 8 Q ; S 3
 6 5 A ; S 3 6 5 Y ; R 3 7 7 M ; R 3 7 7 W ; G 3 7 8 E ; G 3 7 8 V ; G 3 7 8 f s
 ; L 3 8 1 F ; L 3 8 1 V ; G 3 8 4 A ; F 3 8 6 I ; F 3 8 6 S ; F 3 8 8 L ; S 3 9
 0 I ; S 3 9 0 N ; V 3 9 1 F ; V 3 9 1 G ; L 3 9 2 P ; L 3 9 2 V ; G 3 9 4 V ; A
 3 9 6 T ; N 4 0 5 S ; I 4 0 8 T ; A 4 0 9 T ; C 4 1 0 Y ; V 4 1 2 I ; I 4 1 6 T
 ; G 4 1 7 S ; L 4 1 8 F ; L 4 2 0 R ; L 4 2 4 F ; L 4 2 4 H ; L 4 2 4 R ; L 4 2
 4 V ; A 4 2 6 P ; A 4 3 1 E ; (J a l i s c o) ; A 4 3 1 V ; A 4 3 4 C ; A 4 3
 4 T ; L 4 3 5 F ; P 4 3 6 Q ; P 4 3 6 S ; I 4 3 7 V ; I 4 3 9 S ; I 4 3 9 V ; T
 4 4 0 d e l ; 8 6 9 - 2 A > G ; 8 6 9 - 2 2 _ 8 6 9 - 2 3 i n s 1 8 (E 9、
 9、 d e l t a E 9) ; I 2 3 8 _ K 2 3 9 i n s I ; S 2 9 0 C ; T 2 9 1 _ S 3 1 9
 d e l (E 9 F i n n、 9 F i n n、 9) ; S 2 9 0 C ; T 2 9 1 _ S 3 1 9 d e
 l (E 9、 9) ; S 2 9 0 C ; T 2 9 1 _ S 3 1 9 d e l A > G (E 9、 9)
 ; S 2 9 0 C ; T 2 9 1 _ S 3 1 9 d e l G > A (E 9、 9) ; S 2 9 0 C ; T 2
 9 1 _ S 3 1 9 d e l G > T (E 9、 9) ; または S 2 9 0 W ; S 2 9 1 _ R 3 7
 7 d e l (9 - 1 0、 D e l t a 9 - 1 0、 p . S e r 2 9 0 _ A r g 3 7 7 d e l i
 n s T r p、 g . 7 3 6 7 1 9 4 8 _ 7 3 6 8 2 0 5 4 d e l) (変異は、 U n i p r o
 t P 4 9 7 6 8 . 1 / G e n B a n k 参照番号 N M _ 0 0 0 0 2 1 . 4 に対して名付け
 られる) における変異、 および P S E N - 2 においては : T 1 8 M ; R 2 9 H ; G 3 4 S
 ; R 6 2 C ; R 6 2 H ; P 6 9 A ; R 7 1 W ; K 8 2 R ; A 8 5 V ; V 1 0 1 M ; K 1 1
 5 E f s * ; T 1 2 2 P ; T 1 2 2 R ; P 1 2 3 L ; E 1 2 6 f s ; E 1 2 6 K ; S 1 3
 0 L ; V 1 3 9 M ; N 1 4 1 I (V o l g a G e r m a n) ; N 1 4 1 Y ; L 1 4 3 H
 ; V 1 4 8 I ; K 1 6 1 R ; R 1 6 3 H ; H 1 6 9 N ; M 1 7 4 V ; S 1 7 5 C ; G 2 1
 2 V ; V 2 1 4 L ; Q 2 2 8 L ; Y 2 3 1 C ; I 2 3 5 F ; A 2 3 7 V ; L 2 3 8 F ; L
 2 3 8 P ; M 2 3 9 I ; M 2 3 9 V ; A 2 5 2 T ; A 2 5 8 T ; T 3 0 1 M ; K 3 0 6 f
 s ; P 3 3 4 A ; P 3 3 4 R ; P 3 4 8 L ; A 3 7 7 V ; V 3 9 3 M ; T 4 3 0 M ; また
 は D 4 3 9 A (変異は、 U n i p r o t P 4 9 8 1 0 . 1 / G e n B a n k 参照番号 N
 P _ 0 0 0 4 3 8 . 2 に対して名付けられる) の変異が挙げられるが、 これらに限定され
 ない。例えば、 S u n e t a l . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A . 2 0 1 7 ; 1 1 4 : E 4 7 6 - E 4 8 5 ; H e i l i g
 e t a l . , J N e u r o s c i . 2 0 1 3 J u l 1 0 ; 3 3 (2 8) : 1 1 6 0 6 - 1 7 ; Z h o u e t a l . , P N A S N o v e m b

10

20

30

40

50

er 28, 2017 114 (48) 12731-12736を参照されたい。一部の実施形態では、方法は、例えば、当技術分野において既知の方法を使用して、対象がこのような変異を有することを判定するステップを含み得る。

【 0 0 4 5 】

典型的には、健忘または軽度の錯乱の増加は、アルツハイマー病の初期の症状である。徐々に、アルツハイマー病と関連する認知機能障害により、記憶喪失、特に、近時記憶、見当識障害および空間関係の誤解；言語、記述、思考、推理における困難；うつ、不安、引きこもり、気分変動、他人への不信、易刺激性および攻撃性を生じる人格および行動における変化；睡眠習慣における変化、徘徊、抑制の喪失、妄想、ならびに最終的に死に至る。

10

【 0 0 4 6 】

他の神経変性疾患、障害または状態

アルツハイマー病に加えて、本発明の方法は、前頭側頭型認知症、種々の型の記憶喪失、それに限定されないが軽度認知機能障害 (M C I) を含む認知機能障害、または例えば、ドミナントネガティブアイソフォームを生成する変異による、 P S 1 の欠失と関連する他の状態を含む、他の神経変性疾患、障害または状態を治療するのに使用し得る。

【 0 0 4 7 】

プレセニン 1 (P S E N 1) および / またはプレセニン 2 (P S E N 2)

本明細書に記載の組成物および方法における使用に適する、プレセニン 1 (P S 1) またはプレセニン 2 (P S 2) をコードするポリヌクレオチドは、例えば、実施例の節に記載されているアッセイを含む *in vitro* の セクレターゼアッセイにより判定された (また、Watanabe et al., J. Neurosci. 32(15):5085-5096 (2012) を参照)、野生型タンパク質の相当なガンマセクレターゼ活性、例えば、少なくとも 50% のガンマセクレターゼ活性、または少なくとも 60、70、80、90、もしくは 95% の野生型タンパク質の活性を保持するタンパク質をコードする、完全長遺伝子またはこの部分もしくは断片を含み得る。一部の実施形態では、適する P S 1 または P S 2 をコードするポリヌクレオチドは、完全長野生型ゲノムまたは c D N A P S E N 1 または P S E N 2 配列と少なくとも 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 同一の配列を、それぞれ有する。一部の実施形態では、適する P S E N 1 または P S E N 2 遺伝子は、完全長野生型 P S 1 または P S 2 タンパク質配列と少なくとも 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 同一のタンパク質配列を、それぞれコードする。ヒト P S E N 1 / P S 1 または P S E N 2 / P S 2 の例となる野生型ゲノム、c D N A、およびタンパク質配列は、表 1 および以下に示す。他の種における使用のための配列は、当技術分野において既知である。P S 1 および P S 2 は、通常、活性型の N および C 末端断片に切断される。P S 1 は、処理して、N 末端断片 28 k D a および C 末端断片 18 k D a の 2 つの断片を生じ、主要な細胞内タンパク質切断が、大型の親水性ループの近位部の M e t 298 において、およびこの付近で生じる (Podlisny et al., Neurobiol Dis. 1997;3(4):325-37 ; Marambaud et al., EMBO J. 2002 Apr 15;21(8):1948-56)。また、このような切断された形態を含むか、またはこれをコードする配列、例えば、配列番号 5 のアミノ酸 1 ~ 291、1 ~ 292、1 ~ 293、1 ~ 294、1 ~ 295、1 ~ 296、1 ~ 297、1 ~ 298 もしくは 1 ~ 299 をコードする配列、または配列番号 6 ~ 8 の対応する断片は、本明細書に記載の方法および組成物において使用することができる。

20

30

40

【 0 0 4 8 】

50

【表 1】

表1:GenBank受託番号

アイソフォーム	mRNA	タンパク質	参照配列遺伝子
プレセニン1アイソフォームI-467	NM_000021.3 (配列番号1)	NP_000012.1 (配列番号5)	NG_007386.2 4965~9221の範囲
プレセニン1アイソフォームI-463	NM_007318.2 (配列番号2)	NP_015557.2 (配列番号6)	
プレセニン2アイソフォーム1	NM_000447.2 (配列番号3)	NP_000438.2 (配列番号7)	NG_007381.1 5001~30532の範囲
プレセニン2アイソフォーム2	NM_012486.2 (配列番号4)	NP_036618.2 (配列番号8)	

10

【0049】

> NM_000021.3 ヒト (Homo sapiens) プレセニン1 (PSEN1)、転写変異体1、mRNA (配列番号1)

【0050】

【化1】

AAATGACGACAACGGTGAGGGTTCTCGGGCGGGCCTGGGACAGGCAGCTCCGGGGTCCGCGGTTTTCACA
TCGGAAACAAAACAGCGGCTGGTCTGGAAGGAACCTGAGCTACGAGCCGCGGGCGGCAGCGGGGCGGCGGG
GAAGCGTATACCTAATCTGGGAGCCTGCAAGTGACAACAGCCTTTGCGGTCTTAGACAGCTTGGCCTGG
AGGAGAACACATGAAAGAAAGAACCCTCAAGAGGCTTTGTTTTCTGTGAAACAGTATTTCTATACAGTTGC
TCCAATGACAGAGTTACCTGCACCGTTGTCTACTTCCAGAATGCACAGATGTCTGAGGACAACCACCTG
AGCAATACTGTACGTAGCCAGAATGACAATAGAGAACGGCAGGAGCACAACGACAGACGGAGCCTTGGCC
ACCCTGAGCCATTATCTAATGGACGACCCAGGGTAACCTCCCGGCAGGTGGTGGAGCAAGATGAGGAAGA
AGATGAGGAGCTGACATTGAAATATGGCGCCAAGCATGTGATCATGCTCTTTGTCCCTGTGACTCTCTGC
ATGGTGGTGGTCTGGCTACCATTAAGTCAGTCAGCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTATA
CCCCATTACAGAAGATACCGAGACTGTGGGCCAGAGAGCCCTGCACTCAATTCTGAATGCTGCCATCAT
GATCAGTGTCATTTGTGTCATGACTATCCTCCTGGTGGTCTGTATAAATACAGGTGCTATAAGGTCATC
CATGCCTGGCTTATTATATCATCTCTATTGTTGCTGTTCTTTTTTTCATTCATTTACTTGGGGAAAGTGT
TTAAACCTATAACGTTGCTGTGGACTACATTACTGTTGCACTCCTGATCTGGAATTTTGGTGTGGTGGG
AATGATTTCCATTCACTGGAAAGGTCCACTTCGACTCCAGCAGGCATATCTCATTATGATTAGTGCCCTC
ATGGCCCTGGTGTTTATCAAGTACCTCCCTGAATGGACTGCGTGGCTCATCTTGGCTGTGATTTAGTAT
ATGATTTAGTGGCTGTTTTGTGTCCGAAAGGTCCACTTCGTATGCTGGTTGAAACAGCTCAGGAGAGAAA
TGAAACGCTTTTTCCAGCTCTCATTACTCCTCAACAATGGTGTGGTTGGTGAATATGGCAGAAGGAGAC
CCGGAAGCTCAAAGGAGAGTATCCAAAATTCAGTATAATGCAGAAAGCACAGAAAGGGAGTCACAAG
ACACTGTTGCAGAGAATGATGATGGCGGGTTCAGTGAGGAATGGGAAGCCCAGAGGGACAGTCATCTAGG
GCCTCATCGCTCTACACCTGAGTCACGAGCTGCTGTCCAGGAACCTTCCAGCAGTATCCTCGCTGGTGAA
GACCCAGAGGAAAGGGGAGTAAACTTGGATTGGGAGATTTCAATTTCTACAGTGTCTGGTTGGTAAAG
CCTCAGCAACAGCCAGTGGAGACTGGAACACAACCATAGCCTGTTTCGTAGCCATATTAATTGGTTTGTG
CCTTACATTATTACTCCTTGCCATTTTCAAGAAAGCATTGCCAGCTCTTCCAATCTCCATCACCTTTGGG

20

30

40

50

CTTGTTTTCTACTTTGCCACAGATTATCTTGTACAGCCTTTTATGGACCAATTAGCATTCCATCAATTTT
 ATATCTAGCATATTTGCGGTTAGAATCCCATGGATGTTTCTTCTTTGACTATAACAAAACTGGGGAGGA
 CAAAGGTGATTTTCTGTGTCCACATCTAACAAAGTCAAGATTCCCGGCTGGACTTTTGCAGCTTCCTTC
 CAAGTCTTCCTGACCACCTTGCACTATTGGACTTTGGAAGGAGGTGCCTATAGAAAACGATTTTGAACAT
 ACTTCATCGCAGTGGACTGTGTCCCTCGGTGCAGAACTACCAGATTTGAGGGACGAGGTCAAGGAGATA
 TGATAGGCCCGGAAGTTGCTGTGCCCATCAGCAGCTTGACGCGTGGTTCACAGGACGATTTCACTGACAC
 TGCGAACTCTCAGGACTACCGTTACCAAGAGGTTAGGTGAAGTGGTTTAAACCAAACGGAACCTCTTCATC
 TAAAACACAGTTGAAAAACAACCAATAATTCTGTATTAACGAATTCTGAACTTTTCAGGAGGTA
 GTGAGGAAGAGCAGGCACCAGCAGCAGAATGGGAATGGAGAGGTGGGCAGGGGTTCCAGCTTCCCTTTG
 ATTTTTTGTGTCAGACTCATCTTTTTTAAATGAGACTTGTTTTTCCCTCTCTTTGAGTCAAGTCAAATAT
 GTAGATTGCCTTTGGCAATCTTCTTCTCAAGCACTGACACTCATTACCGTCTGTGATTGCCATTTCTTC
 CCAAGGCCAGTCTGAACTGAGGTTGCTTTATCCTAAAAGTTTTAACCTCAGGTTCCAAATTCAGTAAAT
 TTTGGAAACAGTACAGCTATTTCTCATCAATTCTCTATCATGTTGAAGTCAAATTTGGATTTTCCACCAA
 ATTCTGAATTTGTAGACATACTTGTACGCTCACTTGCCCCAGATGCCTCCTCTGTCCTCATTCTTCTCTC
 CCACACAAGCAGTCTTTTTCTACAGCCAGTAAGGCAGCTCTGTCTGGTAGCAGATGGTCCCATTATTTCT
 AGGGTCTTACTCTTTGTATGATGAAAAGAATGTGTTATGAATCGGTGCTGTGAGCCCTGCTGTGAGACCT
 TCTTCCACAGCAAATGAGATGATGCCCAAAGACGGTAGAATTAAGAAGAGTAAAATGGCTGTTGAAGC
 ACTTTCTGTCTGGTATTTTGTTTTTGCTTTTGCACACAGTAGCTCAGAATTTGAACAAAATAGCCAAAA
 GCTGGTGGTTGATGAATTATGAACTAGTTGTATCAACACAAAGCAAGAGTTGGGGAAAGCCATATTTAAC
 TTGGTGAGCTGTGGGAGAACCCTGGTGGCAGAAGGAGAACCAACTGCCAAGGGGAAAGAGAAGGGGCCCTCC
 AGCAGCGAAGGGGATACAGTGAGCTAATGATGTCAAGGAGGAGTTTCAGGTTATTCTCGTCAGCTCCACA
 AATGGGTGCTTTGTGGTCTCTGCCCGCTTACCTTTCTCTCAATGTACCTTTGTGTGAACTGGGCAGTG
 GAGGTGCCTGCTGCAGTTACCATGGAGTTCAGGCTCTGGGCAGCTCAGTCAGGCAAAACACACAAACAGC
 CATCAGCCTGTGTGGGCTCAGGGCACCTCTGGACAAAGGCTTGTGGGGCATAACCTTCTTTACCACAGAG
 AGCCCTTAGCTATGCTGATCAGACCGTAAGCGTTTATGAGAACTTAGTTTCCCTCCTGTGGCTGAGGAGG
 GGCCAGCTTTTTCTTCTTTTGCCTGCTGTTTTCTCTCCCAATCTATGATATGATATGACCTGGTTTGGGG
 CTGTCTTTGGTGTTTAGAATATTTGTTTTCTGTCCCAGGATATTTCTTATAAGAACCTAACTTCAAGAGT
 AGTGTGCGAGTACTGATCTGAATTTAAATTAATAATGGCTTATATTAGGCAGTCACAGACAGGAAAAATA
 AGAGCTATGCAAAGAAAGGGGATTTAAAGTAGTAGGTTCTATCATCTCAATTCATTTTTTTCCATGAAA
 TCCCTTCTTCCAAGATTCATTCCTCTCTCAGACATGTGCTAGCATGGGTATTATCATTGAGAAAGCACA
 GCTACAGCAAAGCCACCTGAATAGCAATTTGTGATTGGAAGCATTCTTGAGGGATCCCTAATCTAGAGTA
 ATTTATTTGTGTAAGGATCCCAAATGTGTTGCACCTTTTCATGATACATTTCTTCTCTGAAGAGGGTACGT
 GGGGTGTGTATTTAAATCCATCCTATGTATTACTGATTGTCCTGTGTAGAAAGATGGCAATTATTTCTG
 TCTCTTTCTCCAAGTTTGTAGCCACATCTCAGCCACATTTGTTAGACAGTGTACAGAGAACCTATCTTTCTT
 TTTTTTTTTTTAAAGGACAGGATTTTGTGTGTTGCCAGGCTAGACTTGAACCTCTGGGCTCAAGTAA
 TCCACCTCAGCTGAGTAGCTGAGACTACAGCCCATCTTATTTCTTTAAATCATTTCATCTCAGGCAGAGA
 ACTTTTCCCTCAAACATTTCTTTTAGAATTAGTTCAGTCATTCTTAAACATCCAAATGCTAGTCTTCCA

10

20

30

40

50

CCATGAAAAATAGATTGTCACTGGAAAGAACAGTAGCAATTTCCATAAGGATGTGCCTTCACTCACACGG
 GACAGGCGGTGGTTATAGAGTCGGGCAAAACCAGCAGTAGAGTATGACCAGCCAAGCCAATCTGCTTAAT
 AAAAAAGATGGAAGACAGTAAGGAAGGAAAGTAGCCACTAAGAGTCTGAGTCTGACTGGGCTACAGAATAA
 AGGGTATTTATGGACAGAATGTCATTACATGCCTATGGGAATACCAATCATATTTGGAAGATTTGCAGAT
 TTTTTTTCAGAGAGGAAAGACTCACCTTCCTGTFTTTGGTTCTCAGTAGGTTTCGTGTGTTCCTAGAAT
 CACAGCTCTGACTCCAAATGACTCAATTTCTCAATTAGAAAAAGTAGAAGCTTTCTAAGCAACTTGGAAG
 AAAACAGTCATAAGTAAGCAATTTGTTGATTTTACTACAGAAGCAACAACTGAAGAGGCAGTGTTTTTAC
 TTTTCAGACTCCGGGATTCCTATTCTGTAGTCTCTCTGCTTTTAAAAACCCTCCTTTTGCAATAGATGCCC
 AAACAGATGATGTTTATTACTTGTATTTTACGTGGCCTCAGACAGTGTATGTATTCTCGATATAACTTGT
 AGAGTGTGAAATATAAGTTTAACTACCAAATAAGGTCTCCAGGGTTAGATGACTGCGGGAAGCCTTTGA
 TCCCAACCCCCAAGGCTTTGTATATTTGATCATTTGTGATCTAACCTGGAAGAAAAAGAGCTCAGAAAC
 CACTATGAAAAAATTTGTTTCAGTGTFTTTCTGTGTTCCCGTAGGTTCTGGAGTCTGAGGATGCAAAGATGA
 ATAAGATAAAATTCCTCAGAATGTAGTTATAATCTCTTGTFTTTCTGGTATATGCCATCTTTCTTTAACTTCT
 CTAAAATATTGGGTATTTGTCAAATAACCACTTTTAAACAGTTACCATTACTGAGGGCTTATACATTGGTG
 TTATAAAAAGTGAAGTTCAGAAATCAATCCATTCAGTAAAGTACTCCTTCTCTAAAATTTGCTGTTATG
 TCTATAAGGAACAGTTTGACCTGCCCTTCTCCTCACCTCCTCACCTGCCTTCCAACATTGAATTTGGAAG
 GAGACGTGAAAAATGGACATTTGGTTTTGGCCCTGGGCTGGAACTATCATATAATCATAGTTTGAGCC
 TAGAAGTGATCCTTGTGATCTTCTCACCTCTTTAAATTCACACAACACAAGAGATTA AAAACAGAGGTTT
 CAGCTCTTCATAGTGCCTTGTGAAATGGCTGGCCAGAGTGTACCAACAAAGCTGTCTCGGGCTCACAGC
 TCAGAGACATCTGCATGTGATCATCTGCATAGTCTCTCCTCTAACGGGAAACACCTCAGATTTGCATAT
 AAAAAAGCACCTTGGTGTGAAATGAACCCCTTTCTTGAACATCAAAGCTGTCTCCACAGCCTTGGGCA
 GCAGGGTGCCCTTAGTGGATGTGCTGGGTCCACCCTGAGCCCTGACATGTGGTGGCAGCATTGCCAGTT
 GGTCTGTGTGCTGTGTAGCAGGGACGATTTCCAGAAAGCAATTTTCTTTTGAATAACGTAATTTGTTG
 AGACTAGGCAGTTTCAAAGTCAGCTGCATATAGTAGCAAGTACAGGACTGTCTTGTFTTTGGTGTCTTGG
 GAGGTGCTGGGGTGAGGGTTTCAGTGGGATCATTTACTCTCACATGTTGTCTGCCTTCTGCTTCTGTGGA
 CACTGCTTTGTAATTTAGACAGACTGTGAATACACCTTTTTTATAAATACCTTTCAAATTTCTTGGT
 AAGATATAATTTTGATAGCTGATTGCAGATTTTCTGTATTTGTGAGATTAATAAAGACTGCATGAATCCA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAA

10

20

30

【 0 0 5 1 】

> NM_007318.2 ヒト (Homo sapiens) プレセニリン 1 (PSEN1)、転
 写変異体 2、mRNA (配列番号 2)

40

【 0 0 5 2 】

【 化 2 】

AAATGACGACAACGGTGAGGGTCTCGGGCGGGCCTGGGACAGGCAGCTCCGGGGTCCGCGGTTTCACA
 TCGGAAACAAAACAGCGGCTGGTCTGGAAGGAACCTGAGCTACGAGCCGCGGCGGCAGCGGGCGGGCGGG
 GAAGCGTATACCTAATCTGGGAGCCTGCAAGTGACAACAGCCTTTGCGGTCTTAGACAGCTTGGCCTGG
 AGGAGAACACATGAAAAGAAAGAACCTCAAGAGGCTTTGTTTTCTGTGAAACAGTATTTCTATACAGTTGC
 TCCAATGACAGAGTTACCTGCACCGTTGTCTACTTCCAGAATGCACAGATGTCTGAGGACAACCACCTG
 AGCAATACTAATGACAATAGAGAACGGCAGGAGCACAACGACAGACGGAGCCTTGGCCACCCTGAGCCAT

50

TATCTAATGGACGACCCCAGGGTAACTCCCGGCAGGTGGTGGAGCAAGATGAGGAAGAAGATGAGGAGCT
GACATTGAAATATGGCGCCAAGCATGTGATCATGCTCTTTGTCCCTGTGACTCTCTGCATGGTGGTGGTC
GTGGCTACCATTAAGTCAGTCAGCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTATAACCCATTACAG
AAGATACCGAGACTGTGGGCCAGAGAGCCCTGCACTCAATTCTGAATGCTGCCATCATGATCAGTGTCCAT
TGTGTGCATGACTATCCTCCTGGTGGTCTGTATAAATACAGGTGCTATAAGGTTCATCCATGCCTGGCTT
ATTATATCATCTCTATTGTTGCTGTTCTTTTTTTCATTCATTTACTTGGGGGAAGTGTAAAAACCTATA
ACGTTGCTGTGGACTACATTACTGTTGCACTCCTGATCTGGAATTTTGGTGTGGTGGGAATGATTTCCAT
TCACTGGAAAGGTCCACTTCGACTCCAGCAGGCATATCTCATTATGATTAGTGCCCTCATGGCCCTGGTG
TTTATCAAGTACCTCCCTGAATGGACTGCGTGGCTCATCTTGGCTGTGATTTTCACTATATGATTTAGTGG
CTGTTTTGTGTCGAAAGGTCCACTTCGTATGCTGGTTGAAACAGCTCAGGAGAGAAATGAAACGCTTTT
TCCAGCTCTCATTTACTCCTCAACAATGGTGTGGTGGTGAATATGGCAGAAGGAGACCCGGAAGCTCAA
AGGAGAGTATCCAAAAATTCCAAGTATAATGCAGAAAGCACAGAAAGGGAGTCACAAGACACTGTTGCAG
AGAATGATGATGGCGGTTTCACTGAGGAATGGGAAGCCAGAGGGACAGTCATCTAGGGCCTCATCGCTC
TACACCTGAGTCACGAGCTGCTGTCCAGGAACCTTCCAGCAGTATCCTCGCTGGTGAAGACCCAGAGGAA
AGGGGAGTAAACTTGGATTGGGAGATTTCATTTTCTACAGTGTCTGGTTGGTAAAGCCTCAGCAACAG
CCAGTGGAGACTGGAACACAACCATAGCCTGTTTTCGTAGCCATATTAATTGGTTTTGTGCCTTACATTATT
ACTCCTTGCCATTTTCAAGAAAGCATTGCCAGCTCTTCCAATCTCCATCACCTTTGGGCTGTTTTCTAC
TTTGCCACAGATTATCTTGTACAGCCTTTTTATGGACCAATTAGCATTCCATCAATTTTATATCTAGCATA
TTTGCGGTTAGAATCCCATGGATGTTTCTTCTTTGACTATAACAAAATCTGGGGAGGACAAAGGTGATTT
TCCTGTGTCCACATCTAACAAAGTCAAGATTCCCGGCTGGACTTTTGCAGCTTCCTTCCAAGTCTTCCCTG
ACCACCTTGCACTATTGGACTTTGGAAGGAGGTGCCTATAGAAAACGATTTTGAACATACTTCATCGCAG
TGGACTGTGTCCCTCGGTGCAGAAACTACCAGATTTGAGGGACGAGGTCAAGGAGATATGATAGGCCCGG
AAGTTGCTGTGCCCCATCAGCAGCTTGACGCGTGGTCACAGGACGATTTCACTGACACTGCGAATCTCA
GGACTACCGTTACCAAGAGGTTAGGTGAAGTGGTTTTAAACCAAACGGAATCTTTCATCTTAAACTACAG
TTGAAAATCAACCAATAATTCTGTATTAAGTGAATTTGAACTTTTTCAGGAGGTACTGTGAGGAAGAGC
AGGCACCAGCAGCAGAATGGGAATGGAGAGGTGGGCAGGGTTCCAGCTTCCCTTTGATTTTTTGCTGC
AGACTCATCCTTTTTAAATGAGACTTGTFTTCCCCTCTCTTTGAGTCAAGTCAAATATGTAGATTGCCTT
TGGCAATTCTTCTTCAAGCACTGACACTCATTACCGTCTGTGATTGCCATTTCTTCCCAAGGCCAGTC
TGAACCTGAGGTTGCTTTATCCTAAAAGTTTTAACCTCAGGTTCCAAATTCAGTAAATTTTGGAAACAGT
ACAGCTATTTCTCATCAATTTCTATCATGTTGAAGTCAAATTTGGATTTTCCACCAAATTTCTGAATTTG
TAGACATACTTGTACGCTCACTTGCCCCAGATGCCTCCTCTGTCTCTCTCTCTCCCACACAAGCAG
TCTTTTTCTACAGCCAGTAAGGCAGCTCTGTGCTGGTAGCAGATGGTCCCATTATTCTAGGGTCTTACTC
TTTGTATGATGAAAAGAATGTGTTATGAATCGGTGCTGTGAGCCCTGCTGTGAGACCTTCTTCCACAGCA
AATGAGATGTATGCCCAAAGACGGTAGAATTAAGAAGAGTAAATGGCTGTTGAAGCACTTTCTGTCTCT
GGTATTTGTTTTGCTTTTGCCACACAGTAGCTCAGAAATTTGAACAAATAGCCAAAAGCTGGTGGTTGA
TGAATTTAGAACTAGTTGTATCAACACAAAGCAAGAGTTGGGGAAAGCCATATTTAACTTGGTGTGAGCTGT
GGGAGAACCTGGTGGCAGAAGGAGAACCAACTGCCAAGGGGAAAGAGAAGGGGCCTCCAGCAGCGAAGGG

10

20

30

40

50

GATACAGTGAGCTAATGATGTCAAGGAGGAGTTTCAGGTTATTCTCGTCAGCTCCACAAATGGGTGCTTT
GTGGTCTCTGCCCGGTTACCTTTCTCTCAATGTACCTTTGTGTGAACTGGGCAGTGGAGGTGCCTGCT
GCAGTTACCATGGAGTTCAGGCTCTGGGCAGCTCAGTCAGGCAAAACACAAAACAGCCATCAGCCTGTG
TGGGCTCAGGGCACCTCTGGACAAAAGGCTTGTGGGGCATAACCTTCTTTACCACAGAGAGCCCTTAGCTA
TGCTGATCAGACCGTAAGCGTTTATGAGAACTTAGTTCCTCCTGTGGCTGAGGAGGGGCCAGCTTTTT
CTTCTTTTGCCTGCTGTTTTCTCTCCCAATCTATGATATGATATGACCTGGTTTGGGGCTGTCTTTGGTG
TTTAGAATATTTGTTTTCTGTCCCAGGATATTTCTTATAAGAACCTAACTTCAAGAGTAGTGTGCGAGTA
CTGATCTGAATTTAAATTTAAATTTGGCTTATATTAGGCAGTCACAGACAGGAAAAATAAGAGCTATGCAA
AGAAAGGGGGATTTAAAGTAGTAGGTTCTATCATCTCAATTCATTTTTTTCCATGAAATCCCTTCTTCCA
AGATTCATTCCCTCTCTCAGACATGTGCTAGCATGGGTATTATCATTGAGAAAAGCACAGCTACAGCAAAG
CCACCTGAATAGCAATTTGTGATTGGAAGCATTCTTGAGGGATCCCTAATCTAGAGTAATTTATTTGTGT
AAGGATCCCAATGTGTTGCACCTTTTCATGATACATTTCTTCTCTGAAGAGGGTACGTGGGGTGTGTGTA
TTTAAATCCATCCTATGTATTACTGATTGCCTGTGTAGAAAAGATGGCAATTATTCTGTCTCTTTCTCCA
AGTTTGAGCCACATCTCAGCCACATTGTTAGACAGTGTACAGAGAACCCTATCTTTCTTTTTTTTTTTTT
AAAGGACAGGATTTTGCTGTGTTGCCAGGCTAGACTTGAACCTCTGGGCTCAAGTAATCCACCTCAGCC
TGAGTAGCTGAGACTACAGCCATCTTATTTCTTTAAATCATTCTCAGGCAGAGAACTTTTCCCTCA
AACATTCTTTTTAGAATTAGTTCAGTCATTCCATAAACATCCAAATGCTAGTCTTCCACCATGAAAAATA
GATTGTCACTGGAAAGAACAGTAGCAATTTCCATAAGGATGTGCCTTCACTCACACGGGACAGGCGGTGG
TTATAGAGTCGGGCAAAACCAGCAGTAGAGTATGACCAGCCAAGCCAATCTGCTTAATAAAAAGATGGAA
GACAGTAAGGAAGGAAAGTAGCCACTAAGAGTCTGAGTCTGACTGGGCTACAGAATAAAGGGTATTTATG
GACAGAATGTCATTACATGCCTATGGGAATACCAATCATATTTGGAAGATTTGCAGATTTTTTTTCAGAG
AGGAAAGACTCACCTTCTGTTTTTGGTTCTCAGTAGGTTTCGTGTGTGTTCTCTAGAATCACAGCTCTGAC
TCCAAATGACTCAATTTCTCAATTAGAAAAAGTAGAAGCTTTCTAAGCAACTTGGAAGAAAACAGTCATA
AGTAAGCAATTTGTTGATTTTACTACAGAAGCAACAACCTGAAGAGGCAGTGTTTTTACTTTTCAGACTCCG
GGATTCCCATTCTGTAGTCTCTCTGCTTTTTAAAAACCCTCCTTTTGCAATAGATGCCCAAACAGATGATG
TTTATTACTTGTATTATTACGTGGCCTCAGACAGTGTATGTATTCTCGATATAAACTTGTAGAGTGTGAAAT
ATAAGTTTAACTACCAAATAAGGTCTCCCAGGGTTAGATGACTGCGGGAAGCCTTTGATCCCAACCCCA
AGGCTTTGTATATTTGATCATTTGTGATCTAACCTGGAAGAAAAGAGCTCAGAAACCACTATGAAAAA
ATTTGTTTCAGTGTCTTCTGTGTTCCCGTAGGTTCTGGAGTCTGAGGATGCAAAGATGAATAAGATAAATT
CTCAGAATGTAGTTATAATCTCTTGTCTTGGTATATGCCATCTTTCTTTAACTTCTCTAAAATATG
GTATTTGTCAAATAACCACTTTTAAACAGTTACCATTACTGAGGGCTTATACATTGGTGTATATAAAGTGA
CTTGATTGAGAAATCAATCCATTCAGTAAAGTACTCCTTCTCTAAATTTGCTGTTATGTCTATAAGGAAC
AGTTTGACCTGCCCTTCTCCTCACCTCCTCACCTGCCTTCCAACATTGAATTTGGAAGGAGACGTGAAAA
TTGGACATTTGGTTTTGCCCTTGGGCTGGAAACTATCATATAATCATAAGTTGAGCCTAGAAGTGATCC
TTGTGATCTTCTCACCTCTTTAAATTTCCACAACACAAGAGATTA AAAACAGAGTTTCAGCTCTTATA
GTGCGTTGTGAAATGGCTGGCCAGAGTGTACCAACAAAGCTGTCTATCGGGCTCACAGCTCAGAGACATCT
GCATGTGATCATCTGCATAGTCTCTCCTCTAACGGGAAACACCTCAGATTTGCATATAAAAAAGCACCC

10

20

30

40

50

TGGTGCTGAAATGAACCCCTTTCTTGAACATCAAAGCTGTCTCCACAGCCTTGGGCAGCAGGGTGCCTC
 TTAGTGGATGTGCTGGGTCCACCCTGAGCCCTGACATGTGGTGGCAGCATTGCCAGTTGGTCTGTGTGTC
 TGTGTAGCAGGGACGATTTCCCAGAAAGCAATTTTCCTTTTGAATACGTAATTGTTGAGACTAGGCAGT
 TTCAAAGTCAGCTGCATATAGTAGCAAGTACAGGACTGTCTTGTTTTTGGTGTCTTGGAGGTGCTGGGG
 TGAGGGTTTCAGTGGGATCATTACTCTCACATGTTGTCTGCCTTCTGCTTCTGTGGACACTGCTTTGTA
 CTTAATTCAGACAGACTGTGAATACACCTTTTTTATAAATACCTTTCAAATTCCTGGTAAGATATAATTT
 TGATAGCTGATTGCAGATTTTCTGTATTTGTCAGATTAATAAAGACTGCATGAATCCAAAAAAAAAAAAA
 AAAAA

10

【 0 0 5 3 】

> NM_000447.2 ヒト (Homo sapiens) プレセニン 2 (P S E N 2) 、 転
 写変異体 1、mRNA (配列番号 3)

【 0 0 5 4 】

20

30

40

50

【化 3】

GGGGCCTGGGCCGGCGCCGGGTCCGGCCGGGCGCTCAGCCAGCTGCGTAAACTCCGCTGGAGCGCGGCGG
CAGAGCAGGCATTTCCAGCAGTGAGGAGACAGCCAGAAGCAAGCTTTTGGAGCTGAAGGAACCTGAGACA
GAAGCTAGTCCCCCTCTGAATTTTACTGATGAAGAACTGAGGCCACAGAGCTAAAGTGACTTTTCCCA
AGGTCGCCCAGCGAGGACGTGGGACTTCTCAGACGTGAGGAGAGTGATGTGAGGGAGCTGTGTGACCATA
GAAAGTGACGTGTTAAAAACCAGCGCTGCCCTCTTTGAAAGCCAGGGAGCATCATTCATTTAGCCTGCTG
AGAAGAAGAAACCAAGTGTCCGGGATTTCAGACCTCTCTGCGGCCCAAGTGTTCGTGGTGCTTCCAGAGG
CAGGGCTATGCTCACATTCATGGCCTCTGACAGCGAGGAAGAAGTGTGTGATGAGCGGACGTCCCTAATG
TCGGCTGAGAGCCCCACGCCGCGCTCCTGCCAGGAGGGCAGGCAGGGCCCAGAGGATGGAGAGAACACTG
CCCAGTGGAGAAGCCAGGAGAACGAGGAGGACGGTGAGGAGGACCCTGACCGCTATGTCTGTAGTGGGGT
TCCCGGGCGGCCCGCCAGGCCTGGAGGAAGAGCTGACCCTCAAATACGGAGCGAAGCACGTGATCATGCTG
TTTGTGCCTGTCACTCTGTGCATGATCGTGGTGGTAGCCACCATCAAGTCTGTGCGCTTCTACACAGAGA
AGAATGGACAGCTCATCTACACGCCATTCACTGAGGACACACCCTCGGTGGGCCAGCGCCTCCTCAACTC
CGTGCTGAACACCCTCATCATGATCAGCGTCATCGTGGTTATGACCATCTTCTTGGTGGTGCTCTACAAG
TACCGCTGCTACAAGTTCATCCATGGCTGGTTGATCATGTCTTCACTGATGCTGCTGTTCCCTCTTCACCT
ATATCTACCTTGGGGAAGTGCTCAAGACCTACAATGTGGCCATGGACTACCCACCCTCTTGCTGACTGT
CTGGAACCTTCGGGGCAGTGGGCATGGTGTGCATCCACTGGAAGGGCCCTCTGGTGCTGCAGCAGGCCTAC
CTCATCATGATCAGTGCCTCATGGCCCTAGTGTTCATCAAGTACCTCCCAGAGTGGTCCGCGTGGGTCA
TCCTGGGCGCCATCTCTGTGTATGATCTCGTGGCTGTGCTGTGTCCCAAAGGGCCCTCTGAGAATGCTGGT
AGAAACTGCCAGGAGAGAAATGAGCCCATATTCCTGCCCCTGATATACTCATCTGCCATGGTGTGGACG
GTTGGCATGGCGAAGCTGGACCCCTCCTCTCAGGGTGCCCTCCAGCTCCCCTACGACCCGGAGATGGAAG
AAGACTCCTATGACAGTTTTTGGGGAGCCTTCATACCCCGAAGTCTTTGAGCCTCCCTTGACTGGCTACCC
AGGGGAGGAGCTGGAGGAAGAGGAGGAAAGGGGCGTGAAGCTTGGCCTCGGGGACTTCATCTTCTACAGT
GTGCTGGTGGCAAGGCGGCTGCCACGGGCAGCGGGGACTGGAATACCACGCTGGCCTGCTTCGTGGCCA
TCCTCATTGGCTTGTGTCTGACCCTCCTGCTGCTTGGCTGTGTTCAAGAAGGCGCTGCCCGCCCTCCCAT
CTCCATCACGTTCCGGGCTCATCTTTTACTTCTCCACGGACAACCTGGTGCGGCCGTTTCATGGACACCCTG
GCCTCCCATCAGCTCTACATCTGAGGGACATGGTGTGCCACAGGCTGCAAGCTGCAGGGAATTTTCATTG
GATGCAGTTGTATAGTTTTTACACTCTAGTGCCATATATTTTAAAGACTTTTCTTTCCTTAAAAAATAAG
TACGTGTTTACTTGGTGGAGGAGGAGGCAGAACCAGCTCTTTGGTGCCAGCTGTTTCATCACCAGACTTTG
GCTCCCCTTTGGGGAGCGCCTCGCTTCACGGACAGGAAGCACAGCAGGTTTATCCAGATGAACTGAGAA
GGTCAGATTAGGGCGGGGAGAAGAGCATCCGGCATGAGGGCTGAGATGCGCAAAGAGTGTGCTCGGGAGT
GGCCCTGGCACCTGGGTGCTCTGGCTGGAGAGGAAAAGCCAGTTCCTACGAGGAGTGTTCCTCAATGCT
TTGTCCATGATGTCCTTGTATTTTATTGCCTTTAGAAACTGAGTCCTGTTCTTGTACGGCAGTCACAC
TGCTGGGAAGTGGCTTAATAGTAATATCAATAAATAGATGAGTCCTGTTAGAATCTTGAAAA

10

20

30

40

【 0 0 5 5】

> NM_012486.2 ヒト (Homo sapiens) プレセニリン 2 (PSEN2)、転写変異体 2、mRNA (配列番号 4)

【 0 0 5 6】

【化 4】

GGGGCCTGGGCCGGCGCCGGGTCCGGCCGGGCGCTCAGCCAGCTGCGTAAACTCCGCTGGAGCGCGGGCGG
CAGAGCAGGCATTTCCAGCAGTGAGGAGACAGCCAGAAGCAAGCTTTTGGAGCTGAAGGAACCTGAGACA
GAAGCTAGTCCCCCTCTGAATTTTACTGATGAAGAACTGAGGCCACAGAGCTAAAGTGACTTTTCCCA
AGGTCGCCCAGCGAGGACGTGGGACTTCTCAGACGTGAGGAGAGTGATGTGAGGGAGCTGTGTGACCATA
GAAAGTGACGTGTTAAAAACCAGCGCTGCCCTCTTTGAAAGCCAGGGAGCATCATTCATTTAGCCTGCTG
AGAAGAAGAAACCAAGTGTCCGGGATTGAGACCTCTCTGCGGCCCAAGTGTTTCGTGGTGCTTCCAGAGG
CAGGGCTATGCTCACATTCATGGCCTCTGACAGCGAGGAAGAAGTGTTGATGAGCGGACGTCCCTAATG
TCGGCTGAGAGCCCCACGCCGCGCTCCTGCCAGGAGGGCAGGCAGGGCCCAGAGGATGGAGAGAACTG
CCCAGTGGAGAAGCCAGGAGAACGAGGAGGACGGTGAGGAGGACCCTGACCGCTATGTCTGTAGTGGGGT
TCCCGGGCGGCCGCCAGGCCTGGAGGAAGAGCTGACCCTCAAATACGGAGCGAAGCACGTGATCATGCTG
TTTGTGCCTGTCACTCTGTGCATGATCGTGGTGGTAGCCACCATCAAGTCTGTGCGCTTCTACACAGAGA
AGAATGGACAGCTCATCTACACGCCATTCACTGAGGACACACCCTCGGTGGGCCAGCGCCTCCTCAACTC
CGTGCTGAACACCCTCATCATGATCAGCGTCATCGTGGTTATGACCATCTTCTTGGTGGTGCTCTACAAG
TACCGCTGCTACAAGTTCATCCATGGCTGGTTGATCATGTCTTCACTGATGCTGCTGTTTCTTCACT
ATATCTACCTTGGGGAAGTGCTCAAGACCTACAATGTGGCCATGGACTACCCACCCCTCTTGCTGACTGT
CTGGAACCTTCGGGGCAGTGGGCATGGTGTGCATCCACTGGAAGGGCCCTCTGGTGTGCAGCAGGCCTAC
CTCATCATGATCAGTGCCTCATGGCCCTAGTGTTCATCAAGTACCTCCCAGAGTGGTCCGCGTGGGTCA
TCCTGGGCGCCATCTCTGTGTATGATCTCGTGGCTGTGCTGTGTCCCAAAGGGCCTCTGAGAATGCTGGT
AGAAACTGCCAGGAGAGAAATGAGCCCATATTCCCTGCCCTGATATACTCATCTGCCATGGTGTGGACG
GTTGGCATGGCGAAGCTGGACCCCTCCTCTCAGGGTGCCCTCCAGCTCCCCTACGACCCGGAGATGGAAG
ACTCCTATGACAGTTTTGGGGAGCCTTCATAACCCGAAGTCTTTGAGCCTCCCTTGACTGGCTACCCAGG
GGAGGAGCTGGAGGAAGAGGAGGAAAGGGGCGTGAAGCTTGGCCTCGGGGACTTCATCTTCTACAGTGTG
CTGGTGGGCAAGGGCGCTGCCACGGGCAGCGGGGACTGGAATACCACGCTGGCCTGCTTTCGTGGCCATCC
TCATTGGCTTGTGTCTGACCCTCCTGCTGCTTGTGTGTTCAAGAAGGCGCTGCCCGCCCTCCCCATCTC
CATCACGTTCCGGGCTCATCTTTTACTTCTCCACGGACAACCTGGTGCGGCCGTTTCATGGACACCCTGGCC
TCCCATCAGCTCTACATCTGAGGGACATGGTGTGCCACAGGCTGCAAGCTGCAGGGAATTTTCATTTGGAT
GCAGTTGTATAGTTTTTACTCTAGTGCCATATATTTTTAAGACTTTTCTTTCTTAAAAAATAAAGTAC
GTGTTTACTTGGTGAGGAGGAGGCAGAACCAGCTCTTTGGTGCCAGCTGTTTCATCACCAGACTTTGGCT
CCCGCTTTGGGGAGCGCCTCGCTTACGGACAGGAAGCACAGCAGGTTTATCCAGATGAACTGAGAAGGT
CAGATTAGGGCGGGGAGAAGAGCATCCGGCATGAGGGCTGAGATGCGCAAAGAGTGTGCTCGGGAGTGGC
CCCTGGCACCTGGGTGCTCTGGCTGGAGAGGAAAAGCCAGTTCCTACGAGGAGTGTTCCTCAATGCTTTG
TCCATGATGTCCTTGTATTTTATTGCCTTTAGAAACTGAGTCTGTTCTTGTACGGCAGTCACACTGC
TGGGAAGTGGCTTAATAGTAATATCAATAAATAGATGAGTCTGTTAGAATCTTGAAAA

10

20

30

40

【 0 0 5 7】

> NP_000012.1 プレセニリン 1 アイソフォーム I - 467 [ヒト (Homo sapiens)] (配列番号 5)

【 0 0 5 8】

【化5】

MTELPAPLSYFQNAQMSQEDNHLSTVRSQNDNRERQEHNDRRSLGHPEPLSNRQGNRQVVEQDEEED
 EELTLKYGAKHVIMLFVPTLCMVVVVATIKSVSFYTRKDGQLIYTPFTEDTETVGQRALHSILNAAIMI
 SVIVVMTILLVVLYKYRCYKVIHAWLI ISSLLLLFFFSFIYLGEVFKTYNVAVDYITVALLIWNFGVVG
 ISIHWKGPLRLQQAYLIMISALMALVFIKYLPEWTAWLILAVISVYDLVAVLCPKGPLRMLVETAQERNE
 TLFPALIYSSTMVWLVNMAEGDPEAQRVSKNSKYNAESTERESQDTVAENDDGGFSEWEAQRDShLGP
 HRSTPESRAAVQELSSSILAGEDPEERGVKLGDFIFYSVLVGKASATASGDWNTTIACFVAILIGLCL
 TLLLLLAIFFKKALPALPISITFGLVFYFATDYLVPFMDQLAFHQFYI

10

【0059】

> NP_015557.2 プレセニン1アイソフォームI - 463 [ヒト (Homo sa
 piens)] (配列番号6)

【0060】

【化6】

MTELPAPLSYFQNAQMSQEDNHLSTNDNRERQEHNDRRSLGHPEPLSNRQGNRQVVEQDEEEDDEELT
 LKYGAKHVIMLFVPTLCMVVVVATIKSVSFYTRKDGQLIYTPFTEDTETVGQRALHSILNAAIMISVIV
 VMTILLVVLYKYRCYKVIHAWLI ISSLLLLFFFSFIYLGEVFKTYNVAVDYITVALLIWNFGVVG
 MISIH WKGPLRLQQAYLIMISALMALVFIKYLPEWTAWLILAVISVYDLVAVLCPKGPLRMLVETAQERNETLFP
 ALIYSSTMVWLVNMAEGDPEAQRVSKNSKYNAESTERESQDTVAENDDGGFSEWEAQRDShLGP
 HRSTPESRAAVQELSSSILAGEDPEERGVKLGDFIFYSVLVGKASATASGDWNTTIACFVAILIGLCL
 TLLLLLAIFFKKALPALPISITFGLVFYFATDYLVPFMDQLAFHQFYI

20

【0061】

> NP_000438.2 プレセニン2アイソフォーム1 [ヒト (Homo sapiens)]
 (配列番号7)

【0062】

【化7】

MLTFMADSEEEVCDERTSLMSAESPTPRSCQEGRQGPEDGENTAQRWSQENEEDGEEDPDRYVCSGVPG
 RPPGLEEELTLKYGAKHVIMLFVPTLCMIVVVATIKSVRFYTEKNGQLIYTPFTEDTPSVGQRLLNSVL
 NTLIMISVIVVMTIFLVVLYKYRCYKFIHGWLIMSSMLLFLFTYIYLGEVLKTYNVAMDYPTLLLTWN
 FGAVGMVCIHWKGPLVLQQAYLIMISALMALVFIKYLPEWSAWVILGAVISVYDLVAVLCPKGPLRMLVET
 AQERNEPIFPALIYSSAMVWTVGMAKLDPSSQALQLPYDPEMEEDSYDSFGEPSYPEVFEPPLTGYPGE
 ELEEEERGVKLGDFIFYSVLVGKAAATGSGDWNTTLACFVAILIGLCLTLLLLLAVFKKALPALPISI
 TFGLIFYFSTDNLVRPFMDTLASHQLYI

40

【0063】

> NP_036618.2 プレセニン2アイソフォーム2 [ヒト (Homo sapiens)]
 (配列番号8)

【0064】

50

【化 8】

MLTFMADSEEEVCDERTSLMSAESPTPRSCQEGRQGPEDGENTAQWRSQENEEDGEEDPDRYVCSGVPG
 RPPGLEEELTLKYGAKHVIMLFVPVTLCMIVVATIKSVRFYTEKNGQLIYTPFTEDTPSVGQRLNLSVL
 NTLIMISVIVVMTIFLVVLYKYRCYKFIHGWLIMSSMLLFLFTYIYLGVELKTYNVAMDYPTLLLLTVWN
 FGAVGMVCIHWKGPLVLQAYLIMISALMALVFIKYLPEWSAWVILGAI SVYDLVAVLCPKGPLRMLVET
 AQERNEPIFPALIYSSAMVWTVGMAKLDPSSQALQLPYDPEMEDSYDSFGEPSYPEVFEPPLTGYPGEE
 LEEEEERGVKLGGLGDFIFYSVLVGKAAATGSGDWNTTLACFVAIILIGLCLTLLLLLAVFKKALPALPISIT
 FGLIFYFSTDNLVVRPFMDTLASHQLYI

10

【0065】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一性の割合を決定するために、最適に比較する目的で、配列をアラインメントする（例えば、最適なアラインメントのために、第1および第2のアミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップを導入し、比較する目的で、非相同配列を無視することができる）。比較する目的でアラインメントする参照配列の長さは、参照配列の少なくとも80%の長さであり、一部の実施形態では、少なくとも90%または100%の長さである。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列における位置が、第2の配列における対応する位置と同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占有される場合、分子は、この位置において同一である。2つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要がある、ギャップの数および各ギャップの長さを考慮すると、2つの配列間の同一性の割合は、配列により共有される同一の位置の数の関数である。別の実施形態では、2つのアミノ酸配列の同一性の割合は、両アミノ酸配列の対応する位置における同一のアミノ酸ファミリー内でのアミノ酸残基の保存の関数（例えば、正電荷、負電荷、極性および無電荷、疎水性）として評価することができる（例えば、両配列の特定の位置におけるバリン残基に代わるアラニン残基の存在は、高レベルの保存を示すが、両配列の特定の位置におけるアスパラギン酸残基に代わるアルギニン残基の存在は、低レベルの保存を示す）。

20

【0066】

例えば、2つのアミノ酸配列の同一性の割合は、ニードルマンおよびヴンシュのアルゴリズム（1970）*J. Mol. Biol.* 48:444-453）を使用して決定することができ、これは、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムに組み込まれており、プロッサムスコアマトリックスを使用し、例えば、ギャップペナルティについては初期値、ギャップ伸長ペナルティ4、およびフレームシフトギャップペナルティを使用する。

30

【0067】

変異プレセニン1

一部の実施形態では、PS1タンパク質は、変異を含む。一部の実施形態では、変異は、保存的置換である。このような変異は、イソロイシン（I）、バリン（V）、およびロイシン（L）のうちのいずれかと、このような疎水性アミノ酸のうちの他のいずれかとの置換、アスパラギン酸（D）とグルタミン酸（E）との置換およびこの逆、グルタミン（Q）とアスパラギン（N）との置換およびこの逆、ならびにセリン（S）とスレオニン（T）との置換およびこの逆を含む。また、他の置換は、タンパク質の3次元構造における、特定のアミノ酸の環境およびこの役割に応じて、保存的であると考えられることができる。例えば、グリシン（G）およびアラニン（A）は、アラニン（A）およびバリン（V）と同様に、しばしば互換的であり得る。比較的疎水性であるメチオニン（M）は、ロイシンおよびイソロイシン、ならびに場合によりバリンとしばしば交換することができる。リジン（K）およびアルギニン（R）は、アミノ酸残基の顕著な特徴がこの電荷であり、このような2つのアミノ酸残基の異なるpKが顕著でない位置において、しばしば互換的である。さらなる他の変異は、特定の環境において「保存的」であると考えられる（

40

50

例えば、Table III of US20110201052; pages 13-15 “Biochemistry” 2nd ED. Strayer ed (Stanford University); Henikoff et al., PNAS 1992 Vol 89 10915-10919; Lei et al., J Biol Chem 1995 May 19; 270(20):11882-6を参照)。

【0068】

一部の実施形態では、方法は、1つまたは複数のさらなる変異をヒトPS1配列(配列番号5または6)に導入するステップを含む。したがって、一部の実施形態では、配列は、ヒトPS1と少なくとも60%、70%、80%、90%または100%同一のヌクレオチド配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%または99%同一であり得る。一部の実施形態では、方法は、1つまたは複数のさらなる変異をヒトPS2配列(配列番号7または8)に導入するステップを含む。したがって、一部の実施形態では、配列は、ヒトPS2と少なくとも60%、70%、80%、90%または100%同一のヌクレオチド配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%または99%同一であり得る。

10

【0069】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一性の割合を決定するために、最適に比較する目的で、配列をアラインメントする(例えば、最適なアラインメントのために、第1および第2のアミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップを導入し、比較する目的で、非相同配列を無視することができる)。比較する目的でアラインメントする参照配列の長さは、典型的に、参照配列の少なくとも80%の長さであり、一部の実施形態では、少なくとも90%または100%の長さである。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列における位置が、第2の配列における対応する位置と同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占有される場合、分子は、この位置において同一である(本明細書において使用する場合、アミノ酸または核酸の「同一性」は、アミノ酸または核酸の「相同性」と等価である)。2つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要がある、ギャップの数および各ギャップの長さを考慮すると、2つの配列間の同一性の割合は、配列により共有される同一の位置の数の関数である。別の実施形態では、2つのアミノ酸配列の同一性の割合は、両アミノ酸配列の対応する位置における同一のアミノ酸ファミリー内でのアミノ酸残基の保存の関数(例えば、正電荷、負電荷、極性および無電荷、疎水性)として評価することができる(例えば、両配列の特定の位置におけるバリン残基に代わるアラニン残基の存在は、高レベルの保存を示すが、両配列の特定の位置におけるアスパラギン酸残基に代わるアルギニン残基の存在は、低レベルの保存を示す)。

20

30

【0070】

本発明の方法のために、配列の比較および2つの配列間の同一性の割合の決定は、ブロッサム62スコアマトリックスを使用し、ギャップペナルティ12、ギャップ伸長ペナルティ4、およびフレームシフトギャップペナルティ5を用いて達成することができる。

【0071】

送達ベクター

PS1またはPS2ポリペプチドをコードする核酸または治療的に活性なその断片は、遺伝子構築物に組み込んで、遺伝子治療プロトコールの一部として使用することができる。例えば、*in vivo*での送達のための発現ベクターの標的化、およびPS1またはPS2ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその活性断片の、特定の細胞型、特に、大脳皮質神経細胞における発現を本明細書において記載する。このような成分の発現構築物は、有効な任意の担体、例えば、遺伝子成分を細胞に*in vivo*で効果的に送達することが可能な、任意の製剤または組成物により投与することができる。方法は、遺伝子をウイルスベクター、好ましくは、アデノ随伴ウイルスに挿入するステップを含む。ウイルスベクターは、典型的に、細胞に直接形質導入する。

40

【0072】

CNS神経細胞への高度に効率的な形質導入が可能なウイルスベクターを利用することができ、これには任意の血清型のrAAV(例えば、AAV1~AAV12)ベクター、組換えまたはキメラAAVベクター、ならびにレンチウイルスまたは適する他のウイルス

50

ベクターを含む。一部の実施形態では、P S 1またはP S 2をコードするポリヌクレオチドは、C N Sにおける発現に適するプロモーターに動作可能に結合する。例えば、神経細胞サブタイプ特異的プロモーター、例えば、アルファ - カルシウム / カルモジュリンキナーゼ 2 A プロモーターを使用して、興奮性神経細胞を標的化し得る。あるいは、汎神経プロモーター、例えば、シナプシン I プロモーターを使用して、P S 1またはP S 2発現を引き起こし得る。例となる他のプロモーターとしては、サイトメガロウイルス (C M V) 初期エンハンサー / プロモーター ; ハイブリッド C M V エンハンサー / ニワトリ アクチン (C B A) プロモーター ; C M V 初期エンハンサーエレメント、ニワトリ アクチン遺伝子の第 1 のエキソンおよび第 1 のイントロン、ならびにウサギ グロブリン遺伝子のスプライス受容部位を含むプロモーター (一般に「 C A G プロモーター」と呼ぶ) ; または C M V 前初期エンハンサー、および C B A イントロン 1 / エキソン 1 からなる 1 . 6 k b のハイブリッドプロモーター (一般に C A G G S プロモーターと呼ばれる ; Niwa et al. Gene, 108:193-199 (1991)) が挙げられるが、これに限定されない。C A G G S プロモーター (Niwa et al., 1991) は、脳において、遍在性をもたらし、長期に発現することがわかっている (Klein et al., Exp. Neurol. 176:66-74 (2002)) 。核酸の細胞への *i n v i v o* での導入のための典型的な方法は、核酸、例えば、P S 1またはP S 2をコードする c D N A を含むウイルスベクターの使用による。特に、ウイルスベクターによる細胞の感染は、標的化細胞の大部分が核酸を受け取ることができるという利点を有する。加えて、例えば、ウイルスベクターに含まれる c D N A により、ウイルスベクター内でコードされた分子は、ウイルスベクター核酸を受け取った細胞において効率的に発現する。

10

20

【 0 0 7 3 】

核酸の送達に特に有用なウイルスベクター系は、アデノ随伴ウイルス (A A V) である。アデノ随伴ウイルスは、天然に存在する欠損ウイルスであり、効率的な複製、および増殖的生活環のためのヘルパーウイルスとして別のウイルス、例えば、アデノウイルスまたはヘルペスウイルスを必要とする (総説については、Muzyczka et al., Curr. Topics in Micro and Immunol.158:97-129 (1992) を参照) 。 A A V ベクターは、種々の細胞型に効率的に形質導入し、導入遺伝子の長期発現を *i n v i v o* で生じることができる。 A A V ベクターゲノムは、エピソームとして細胞内に持続することができるが、ベクターの組込みが、観察されている (例えば、Deyle and Russell, Curr Opin Mol Ther. 2009 Aug; 11(4): 442-447 ; Asokan et al., Mol Ther. 2012 April ; 20(4): 699-708 ; Flotte et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349-356 (1992) ; Samulski et al., J. Virol. 63:3822-3828 (1989) ; および McLaughlin et al., J. Virol. 62:1963-1973 (1989) を参照) 。 A A V ベクター、例えば、A A V 2 は、遺伝子の増強または置換のために大規模に使用されており、広範な動物モデルはもちろん臨床における治療有効性がわかっている。例えば、Mingozzi and High, Nature Reviews Genetics 12, 341-355 (2011) ; Deyle and Russell, Curr Opin Mol Ther. 2009 Aug; 11(4): 442-447 ; Asokan et al., Mol Ther. 2012 April; 20(4): 699-708 を参照されたい。わずか 3 0 0 塩基対の A A V を含む A A V ベクターは、パッケージングすることができ、組換えタンパク質発現を生じることができる。組換えレトロウイルスの生成のため、およびこのようなウイルスによる *i n v i t r o* または *i n v i v o* での細胞への感染のためのプロトコールは、当技術分野において既知であり、例えば、Ausubel, et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14 および他の標準的手引書に見出すことができる。脳における発現のための構築物を送達する A A V ベクターの使用は、例えば、Iwata et al., Sci Rep. 2013;3:1472 ; Hester et al., Curr Gene Ther. 2009 Oct;9(5):428-33 ; Doll et al., Gene Therapy 1996, 3(5):437-447 ; および Foley et al., J Control Release. 2014 Dec 28 ;196:71-8 に記載されている。

30

40

【 0 0 7 4 】

したがって、一部の実施形態では、核酸をコードする P S 1 または P S 2 は、遺伝子治療のためのベクター、例えば、A A V ベクターに存在する。一部の例では、A A V ベクタ

50

ーは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAV11およびAAV12からなる群から選択される。

【0075】

本明細書に記載するベクターは、シュードタイプベクターであり得る。シュードタイプピングにより、ベクターの標的細胞集団を調節するための機構がもたらされる。例えば、シュードタイプAAVベクターは、本明細書に記載の種々の方法において利用することができる。シュードタイプベクターは、1つのベクターのゲノム、例えば、1つのAAV血清型のゲノムを、第2のベクター、例えば、第2のAAV血清型のカプシドに含むベクターである。シュードタイプピングの方法は、当技術分野において周知である。例えば、ベクターは、ラブドウイルス水疱性口内炎ウイルス(VSV)血清型(インディアナおよびチャンドイプラ(Chandipura)株)、狂犬病ウイルス(例えば、種々のエブリン-ロキツニツキ-アベルセス(Evelyn-Rokitnicki-Abelseth)ERA株および攻撃ウイルス標準(CVS))、リッサウイルス属モコラ(Lyssavirus Mokola)ウイルス、狂犬病関連ウイルス、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、モコラウイルス(Mokola virus)(MV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、狂犬病ウイルス糖タンパク質(RV-G)、糖タンパク質B型(FuG-B)、FuG-Bの変異体(FuG-B2)またはモロニーマウス白血病(Moloney murine leukemia)ウイルス(MuLV)に由来するエンペロー糖タンパク質によりシュードタイプピングされ得る。ウイルスは、1つまたは複数の神経細胞または細胞群の形質導入のためにシュードタイプピングし得る。

【0076】

シュードタイプベクターの例示的な例としては、組換えAAV2/1、AAV2/2、AAV2/5、AAV2/6、AAV2/7、AAV2/8、AAV9、AAVrh10、AAV11およびAAV12血清型のベクターが挙げられるが、これらに限定されない。ヒトタンパク質または他のタンパク質をコードする導入遺伝子を含むように、このようなベクターを改変し得ることが当技術分野において知られている。特定の例では、本開示は、本明細書に開示する核酸を含むシュードタイプAAV9またはAAVrh10ウイルスベクターを含み得る。Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003を参照されたい。

【0077】

一部の例では、特定のAAV血清型のベクターは、目的の使用に基づいて、例えば、目的の投与経路に基づいて選択され得る。

【0078】

AAVベクター構築物の遺伝子治療における適用のための種々の方法は、当技術分野において既知であり、ヒト対象への投与のための修飾、精製、および調製の方法を含む(例えば、Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003を参照)。加えて、CNS細胞を標的化する、AAVをベースとする遺伝子治療は、記載されている(例えば、米国特許第6,180,613号および第6,503,888号を参照)。高力価AAVの調製は、例えば、米国特許第5,658,776号に記載のような当技術分野において既知の技術を使用して行うことができる。

【0079】

ベクター構築物は、ウイルスゲノムおよび導入遺伝子のすべてまたは一部を含むポリヌクレオチド分子を指す。一部の例では、遺伝子導入は、DNAウイルスベクター、例えば、アデノウイルス(Ad)またはアデノ随伴ウイルス(AAV)により媒介され得る。遺伝子治療の方法において有用な他のベクターは、当技術分野において既知である。例えば、本明細書において開示する構築物は、アルファウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、またはワクシニアウイルスを含み得る。

【0080】

アデノウイルスは、相対的に十分特徴づけられている群のウイルスであり、50種を超える血清型を含む(例えば、参照により本明細書に組み込む、国際公開第95/2707

10

20

30

40

50

1号を参照)。アデノウイルスは、分子生物学の技術の適用により扱い易く、宿主細胞ゲノムへの組込みを必要としない場合がある。野生型ウイルスの組換えおよび生成の可能性を低下させるベクターを含む組換えAd由来のベクターが、構築されている(例えば、参照により本明細書において組み込む、国際特許公開第95/00655号および第95/11984号を参照)。野生型AAVは、高い感染性を有し、高度な特異性で宿主ゲノムに組み込むことが可能である(例えば、Hermonat and Muzyczka 1984 Proc. Natl. Acad. Sci., USA 81:6466-6470およびLebkowski et al. 1988 Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996を参照)。

【0081】

非天然制御配列、遺伝子調節配列、プロモーター、非コード配列、イントロン、またはコード配列は、本明細書に開示の核酸に含むことができる。核酸タグもしくはシグナル伝達配列、またはタンパク質タグもしくはタンパク質シグナル伝達配列をコードする核酸の包含は、本明細書においてさらに検討する。典型的には、コード領域は、1つまたは複数の制御核酸成分と動作可能に結合する。

10

【0082】

本明細書において開示する核酸に含まれるプロモーターは、組織もしくは細胞型特異的プロモーター、複数の組織もしくは細胞型に対して特異的なプロモーター、臓器特異的プロモーター、複数の臓器に対して特異的なプロモーター、全身性もしくは遍在性プロモーター、またはほぼ全身性もしくは遍在性プロモーターであり得る。また、確率的発現、誘導性発現、条件的発現、または反対に非連続的、不規則、もしくは予測不可能な発現を有するプロモーターは、本開示の範囲内に含む。プロモーターは、上記の特性または当技術分野において既知の他のプロモーター特性のいずれかを含み得る。

20

【0083】

臨床環境では、治療遺伝子のための遺伝子送達系は、いくつかの方法のいずれかにより対象に導入することができ、このそれぞれは、当技術分野において知られている。例えば、遺伝子治療系の医薬調製物は、例えば、静脈内注射により全身的に導入することができ、標的細胞におけるタンパク質の特異的形質導入は、受容体遺伝子の発現を調節する転写制御配列による遺伝子送達媒体、細胞型もしくは組織型発現、またはこれらの組合せによりもたらされる、トランスフェクションの特異性によって、主に生じる。他の実施形態では、組換え遺伝子の最初の送達は、さらに制限され、対象への導入は、非常に局在的となる。例えば、遺伝子送達媒体は、カテーテルにより(米国特許第5,328,470号を参照)または例えば、任意選択で、大槽、脳室、腰部髄腔内への定位的注射、海馬への直接注射により導入することができる(例えば、Chen et al., PNAS USA 91:3054-3057 (1994))。一部の実施形態では、プレセニリンを発現するウイルスの送達方法は、静脈内、くも膜下腔内、脳室内、大槽内、および定位的実質内投与を含む。

30

【0084】

方法は、前臨床試験により、さらに最適化して、プレセニリン条件的二重ロックアウトマウスおよびFAD変異を発現するプレセニリン1ロックインマウスにおいて、神経変性、認知症、シナプス機能不全および分子変性の最良の回復を達成することができる。

【0085】

遺伝子治療構築物の医薬調製物は、許容される希釈剤に遺伝子送達系を本質的に含む得るか、または遺伝子送達媒体を包埋する徐放マトリックスを含み得る。あるいは、完全遺伝子送達系、例えば、レトロウイルスベクターが、組換え細胞からインタクトで生成可能である場合、医薬調製物は、1つまたは複数の細胞を含み、これにより遺伝子送達系を生成し得る。

40

【0086】

送達製剤および医薬組成物

一部の実施形態では、標的組織への*in vivo*での送達のための本明細書に記載のポリヌクレオチドは、被包性であるか、またはナノ粒子と結合する。ナノ粒子へパッケージングするための方法は、当技術分野において周知であり、例えば、Bose S, et al (Role

50

of Nucleolin in Human Parainfluenza Virus Type 3 Infection of Human Lung Epithelial Cells. *J. Virol.* 78:8146. 2004); Dong Y et al. Poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 26:6068. 2005); Lobenberg R. et al (Improved body distribution of 14C-labelled AZT bound to nanoparticles in rats determined by radioluminography. *J Drug Target* 5:171.1998); Sakuma S R et al (Mucoadhesion of polystyrene nanoparticles having surface hydrophilic polymeric chains in the gastrointestinal tract. *Int J Pharm* 177:161. 1999); Virovic L et al. Novel delivery methods for treatment of viral hepatitis: an update. *Expert Opin Drug Deliv* 2:707.2005); および Zimmermann E et al, Electrolyte- and pH-stabilities of a aqueous solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions in artificial gastrointestinal media. *Eur J Pharm Biopharm* 52:203. 2001)に記載されている。一部の実施形態では、1つまたは複数のポリヌクレオチドは、小胞、例えば、リポソームにより *in vivo* で標的組織に送達する (Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et al., *in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327を参照; 一般的に同書を参照)。一部の実施形態では、脂質をベースとするナノ粒子 (LNP) を使用する。例えば、Robinson et al., *Mol Ther.* 2018 Aug 1;26(8):2034-2046; 米国特許第 9 9 5 6 2 7 1 号明細書を参照されたい。

【0087】

本発明の方法および組成物は、微小胞またはその調製物を含み、これは、本明細書に記載の1つまたは複数の治療分子、例えば、ポリヌクレオチドまたはRNAを含み得る。「微小胞」は、用語として、本明細書において使用し、エキソソーム、微小粒子、および正常な生理学および病理学的両条件下で多くの細胞型により分泌される排出された微小胞を含む広範な細胞外小胞を含む、膜由来の微小胞を指す。例えば、欧州特許第 2 0 1 0 6 6 3 号明細書を参照されたい。本明細書に記載の方法および組成物は、あらゆるサイズの微小胞に適用することができ、一実施形態では、30 ~ 200 nm、一実施形態では、30 ~ 800 nm、一実施形態では、最大 2 μm である。また、本明細書に記載の方法および組成物は、あらゆる細胞外小胞に広く適用することができ、この用語は、エキソソーム、排出された微小胞、オンコスーム (oncosome)、エクソソーム、およびレトロウイルス様粒子を包含する。このような微小胞または調製物は、本明細書において記載する方法により生成する。この用語を本明細書において使用する場合、微小胞調製物は、同一の細胞源から入手/調製した微小胞の集団を指す。このような調製物は、例えば、*in vitro* で、本発明の核酸分子を発現する細胞を培養し、細胞により生成された微小胞を単離することにより生成する。このような微小胞を単離する方法は、当技術分野において既知であり (Thery et al., Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids, in *Current Protocols Cell Biology*, Chapter 3, 322, (John Wiley, 2006); Palmisano et al., (*Mol Cell Proteomics*. 2012 August; 11(8):230-43) および Waldenstrom et al., ((2012) *PLoS ONE* 7(4): e34653.doi: 10.1371/journal.pone.0034653))、この一部の例は、本明細書において記載する。微小胞を培養中の細胞から単離するためのこのような技術は、それらに限定されないが、スクロース勾配精製/分離および分画遠心分離を含み、本明細書に記載の方法または組成物における使用に適応し得る。例えば、欧州特許第 2 0 1 0 6 6 3 号明細書を参照されたい。

【0088】

一部の実施形態では、微小胞は、ドナー細胞の培養培地を、細胞を培地から分離するのに十分な期間 (例えば、約 15 分) 穏やかに遠心分離すること (例えば、約 300 g) により単離する。これにより上清に微小胞が残り、したがって微小胞調製物が得られる。一実施形態では、穏やかな遠心分離からの培養培地または上清を、細胞残屑を沈殿させるのに十分な期間 (例えば、約 30 分) さらに強力に遠心分離する (例えば、約 16,000

g)。これにより、微小胞が上清に残り、したがって微小胞調製物が得られる。一実施形態では、培養培地、穏やかに遠心分離した調製物、または強力に遠心分離した調製物は、ろ過に供し（例えば、 $0.22\ \mu\text{m}$ フィルターまたは $0.8\ \mu\text{m}$ フィルターを通して）、これにより、微小胞がフィルターを通過する。一実施形態では、ろ液は、微小胞を十分に沈殿させる期間（例えば、約80分間）最終的な超遠心分離に供する（例えば、約110,000g）。結果として得られるペレットは、微小胞を含み、さらなる使用のために有用な濃度が得られる大量のパフアーに再懸濁させて、これにより微小胞調製物が得られ得る。一実施形態では、微小胞調製物は、スクロース密度勾配精製により生成する。一実施形態では、微小胞は、DNAse（例えば、DNAse I）および/またはRNAse および/またはプロテイナーゼによりさらに処理して、外部から混入する任意のDNA、RNA、またはタンパク質をそれぞれ除去する。一実施形態では、微小胞調製物は、1つまたは複数のRNAse阻害物質を含む。

10

【0089】

微小胞調製物内に含まれる分子は、治療分子を含む。典型的には、調製物中の微小胞は、異種性集団であり、各微小胞は、調製物中の他の微小胞の分子と異なるか、または異なる分子の補体を含む。微小胞調製物中の治療分子の内容物は、定量的または定性的のいずれかにより表すことができる。このような方法の1つは、内容物を、微小胞調製物における総分子の割合として表すことである。例として、治療分子がmRNAである場合、内容物は、微小胞調製物の、総RNA内容物の割合として、あるいは総mRNA内容物の割合として表すことができる。同様に、治療分子がタンパク質である場合、内容物は、微小胞における総タンパク質の割合として表すことができる。一実施形態では、本明細書に記載の方法により生成した治療微小胞またはその調製物は、対照細胞（治療分子の発現を増加させるように科学的操作を受けていない同一源から得た細胞）から得た微小胞と比較した場合、検出可能で統計学的に有意な増加量の治療分子を含む。一実施形態では、治療分子は、対照細胞から得た微小胞における量よりも少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%多い量で存在する。さらに高レベルの濃縮をも達成し得る。一実施形態では、治療分子は、対照細胞微小胞よりも少なくとも2倍多く微小胞またはその調製物中に存在する。さらに高い倍率の濃縮をも得られ得る（例えば、3、4、5、6、7、8、9または10倍）。

20

【0090】

一実施形態では、相対的に高い割合の微小胞内容物は、治療分子である（例えば、分子の高発現または微小胞に対する特異的標的化により達成される）。一実施形態では、治療分子の微小胞内容物は、総（同種）分子内容物の少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%である（例えば、治療分子は、mRNAであり、微小胞の総mRNA内容物の約10%である）。さらに高レベルの濃縮をも達成し得る。一実施形態では、治療分子は、他のすべてのこのような（同種）分子よりも少なくとも2倍多く微小胞またはその調製物中に存在する。さらに高い倍率の濃縮をも得られ得る（例えば、3、4、5、6、7、8、9または10倍）。

30

【実施例】

【0091】

本発明は、以下の実施例においてさらに記載し、これらは、特許請求の範囲に記載する本発明の範囲を制限しない。

40

【0092】

[実施例1] 孤発性アルツハイマー病（AD）患者の錐体神経細胞は、PSEN1およびPSEN2 mRNAレベルの低下を示す

プレセニン（PS）タンパク質は、セクレターゼの触媒サブユニットであり、これは、A β ペプチドの生成に必要とされる。プレセニン1（PSEN1）およびプレセニン2（PSEN2）遺伝子における変異は、家族性アルツハイマー病（FAD）の症例の90%と関連する。FADおよび前頭側頭型認知症と関連するPSEN変異は、プレセニン発現およびプレセニン機能の喪失の原因となり、セクレターゼ活性の低下を生

50

じる (Xia et al., Neuron. 2015 Mar 4;85(5):967-81 ; Watanabe et al., J Neurosci. 2012 Apr 11;32(15):5085-96 ; Brouwers et al., 2008 Ann Med 40 (8): 562-83)。

【0093】

個々の錐体神経細胞を、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションを使用して採取し、ヒト脳1つあたり神経細胞300個を、RNA調製のために、ともに貯蔵した (Picopure RNA単離キット、Life Technologies社KIT0204)。SuperScript IIIワンステップRT-PCRシステムをPlatinum Taq DNAポリメラーゼとともに使用してqRT-PCRを実施した (Life Technologies社)。使用したプライマーの配列は、表2に列挙する。

10

【0094】

【表2】

表2.プライマーのリスト

UID	配列(5'-3')	配列番号	増幅した遺伝子
hPS1-F5	AGACCCGGAAGCTCAAAGGA	9	ヒトプレセニン1
hPS1-R5	TTCCTCACTGAACCCGCCAT	10	ヒトプレセニン1
hPS2-F5	AAGTGTCCGGGATTCAGACCTC	11	ヒトプレセニン2
hPS2-R5	TCGCTGTCAGAGGCCATGAA	12	ヒトプレセニン2
NCT-104	ACAGGTGGCCTTAAGAACTTCAT	13	ヒトニカストリン
NCT-204	CCACCTGGTTCCGTACAGAC	14	ヒトニカストリン
hPen2-F1	TCCTTGTCCCAGCCTACACA	15	ヒトPEN2
hPen2-R1	AGCACTATCACCCAGAAGAGGA	16	ヒトPEN2

20

【0095】

PSEN1およびPSEN2 mRNAのレベルは、孤発性AD患者の海馬CA1錐体神経細胞からレーザーにより解剖した錐体神経細胞において低下した (図1A~B)。

【0096】

[実施例2]異種および同種接合PSEN1変異を保有するMEFにおけるセクレターゼ活性の用量依存的低下

30

方法

不死化Psen変異MEFの生成

種々のPsen1遺伝子型を保有するマウス胚線維芽細胞(MEF)を、10%のFBSならびに1%のペニシリンおよびストレプトマイシンを添加した培地中に維持した。6ウェルプレート内に、CMV-SV40を1μg用いたトランスフェクションによりMEF300,000個を不死化した。CMV-SV40を用いてトランスフェクトしたMEFは、継代数約7代で分裂を停止したCMV-GFP(1μg)を用いてトランスフェクトしたMEFと比較した。

【0097】

NdEおよびhPS1のトランスフェクション

40

セクレターゼ活性が、種々の不死化Psen変異MEFにおいて障害されるかどうかを判定するために、リポフェクタミンLTX(ThermoFisher Scientific社15338030)を製造者の指示に従って使用して、CMV-NotchE(5ng)を6ウェルプレート内のMEFに一過性にトランスフェクトした。

【0098】

トランスフェクション後およそ24時間に、細胞をRIPAバッファー:50mMのトリスCl(pH7.6)、150mMのNaCl、1%のNP40、0.5%のデオキシコール酸ナトリウム、プロテアーゼ阻害物質カクテル(Sigma社)、1mMのDTTに溶解した。タンパク質(40μg)をNuPAGEゲル(Invitrogen社)に分け、ニトロセルロース膜に移した。一次抗体は、ウサギ抗切断Notch1 Val1

50

744 (Cell Signaling社)、マウスとヒトの両PS1を認識するウサギ抗PS1 NTF (Calbiochem社)、マウス抗cMyc (Sigma社)またはウサギ抗チューブリン (Cell Signaling社)であった。次いで、色素共役二次抗体 (Licor社の、ヤギ抗ウサギIRdye 800、ヤギ抗マウスIRdye 800またはヤギ抗ウサギIRdye 680)とともに膜をインキュベートした。シグナルは、Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Bioscience社)を用いて定量した。NICD生成により測定したセクレターゼ活性は、L435F KI/+MEFにおいて低下し、KI/KIおよびPS1-/-MEFにおいてさらに低下する(図3A)。

【0099】

[実施例3]異なるPS遺伝子型: PS1^{+/+}、PS1^{L435F/+}、PS1^{+/-}、PS1^{L435F/L435F}、PS1^{-/-}およびPS1^{-/-}; PS2^{-/-}を有するMEFにおけるセクレターゼ活性の用量依存的回復

PSEN1変異と関連する、低下したセクレターゼ活性が、野生型(WT)hPS1の導入により補正可能かどうかを判定するために、異なるPS遺伝子型、PS1^{+/+}、PS1^{L435F/+}、PS1^{+/-}、PS1^{L435F/L435F}、PS1^{-/-}およびPS1^{-/-}; PS2^{-/-}(DKO)を保有する胚由来の初代MEFを得た。不死化MEFを、CMV-Nde1Eを用いて一過性にトランスフェクトし、NICDおよびPS1 NTF/CTFのレベルを測定することによりセクレターゼ活性を評価した。NICDレベルは、PS1用量感受性に低下し、DKO細胞において検出不可能であった(図3A)。NICDレベルは、低下したが、PS1^{L435F/L435F}MEF(「L435F KI/KI」MEF)およびPS1^{-/-}MEFにおいて検出可能であったが(図3A)、denovoNICD生成は、L435F KI/KIおよびPS1^{-/-}胚性脳を使用したin vitroでのセクレターゼアッセイによって検出不可能であった(Xia et al., Neuron. 2015 Mar 4;85(5):967-81)。特定の理論に拘束されることを望むものではないが、出願人は、これが、胚性脳において通常発現するPS2が、MEFと比較して低レベルであり、L435F KI/KIおよびPS1^{-/-}脳において、MEFと比較して低い総PS活性が生じるためであり得るということに従う。この仮説を試験するために、PS1^{L435F/+}; PS2^{-/-}MEFにおいてセクレターゼ活性を測定し、PS1^{L435F/+}MEFと比較した。セクレターゼ活性は、PS1^{L435F/+}; PS2^{-/-}MEFにおいて、PS1^{L435F/+}MEFと比較して低かった(図3B)。

【0100】

種々のPS変異MEFにおける障害されたセクレターゼ活性が、WT hPS1の導入により回復可能かどうかを判定するために、異なる量(0、20、40、80ng)の野生型hPS1 cDNA(pCI-hPS1)を、CMV-Nde1EとともにMEFにトランスフェクトした。注目すべきことには、MEFにトランスフェクトした増加量のpCI-hPS1により、PS1タンパク質の蓄積、ならびに変異体(PS1^{L435F/+}、PS1^{L435F/+}; PS2^{-/-}およびDKO)MEFにおけるPS1 NTFおよびNICDレベルの回復が生じた(図3B)。このような結果は、外因性WT hPS1により、障害されたセクレターゼ活性が、種々のPS変異MEFにおいて回復可能であることを示す。

【0101】

他の実施形態

本発明を、この発明を実施するための形態とともに記載したが、前述の記載は例示することを意図し、本発明の範囲を制限せず、本発明は添付の特許請求の範囲により定義されることが理解される。他の態様、利点、および変更形態は、以下の特許請求の範囲内に存在する。

本発明は、以下の態様を提供しうる。

[1]

神経変性疾患、障害または状態を治療する方法であって、プレセニリン1(PS1)お

10

20

30

40

50

よび/またはプレセニリン2 (P S 2) タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、治療を必要とする対象に投与するステップを含み、前記対象が、ドミナントネガティブ P S 1 または P S 2 タンパク質アイソフォームをコードする、 P S E N 1 および/または P S E N 2 の少なくとも1つのアレルにおける1つまたは複数の変異を有する、方法。

[2]

前記神経変性疾患、障害または状態が、アルツハイマー病である、上記[1]に記載の方法。

[3]

前記アルツハイマー病が、家族性アルツハイマー病である、上記[2]に記載の方法。

[4]

前記対象が、 P S E N 1 遺伝子において、 E 2 8 0 A、 Y 1 1 5 H、 L 1 6 6 P、 C 4 1 0 Y、 e x 9、 G 5 4 8、 D 2 5 7 A、 R 2 7 8 I、 L 4 3 5 F、 G 3 8 4 A もしくは L 3 9 2 V 変異、または P S E N 1 遺伝子において、 N 1 4 1 I、 G 2 0 6 A、 H 1 6 3 R、 A 7 9 V、 S 2 9 0 C、 A 2 6 0 P、 A 4 2 6 P、 A 4 3 1 E、 R 2 6 9 H、 L 2 7 1 V、 C 1 4 1 0 Y、 E 2 8 0 G、 P 2 6 4 L、 E 1 8 5 D、 L 2 3 5 V もしくは M 1 4 6 V 変異を有する、上記[3]に記載の方法。

[5]

前記アルツハイマー病が、孤発性アルツハイマー病である、上記[3]に記載の方法。

[6]

前記アルツハイマー病が、遅発型または早期発症型アルツハイマー病である、上記[3]に記載の方法。

[7]

前記神経変性疾患、障害または状態が、前頭側頭型認知症である、上記[1]に記載の方法。

[8]

前記神経変性疾患、障害または状態が、記憶喪失である、上記[1]に記載の方法。

[9]

前記神経変性疾患、障害または状態が、認知機能低下または認知機能障害である、上記[1]に記載の方法。

[1 0]

前記認知機能障害が、軽度認知機能障害 (M C I) である、上記[9]に記載の方法。

[1 1]

ベクター、エキソソーム、または脂質をベースとするナノ粒子 (L N P) 中の前記ポリヌクレオチドを投与するステップを含む、上記[1]から[1 0]のいずれかに記載の方法。

[1 2]

前記ベクターが、ウイルスベクターである、上記[1 1]に記載の方法。

[1 3]

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターである、上記[1 2]に記載の方法。

[1 4]

前記 A A V ベクターが、 A A V 9、 A A V 1、 A A V 2、 A A V 3、 A A V 4、 A A V 5、 A A V 6、 A A V 7、 A A V 8、 A A V r h 1 0、 A A V 1 1、 A A V 1 2、 A A V 2 / 1、 A A V 2 / 2、 A A V 2 / 5、 A A V 2 / 6、 A A V 2 / 7、 A A V 2 / 8、 A A V 2 / 9、 A A V 2 / r h 1 0、 A A V 2 / A A V 1 1 または A A V 2 / A A V 1 2 から選択される、上記[1 3]に記載の方法。

[1 5]

前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、上記[1 1]に記載の方法。

[1 6]

前記ウイルスベクターが、レトロウイルスベクターである、上記[1 1]に記載の方法。

[1 7]

10

20

30

40

50

前記ポリヌクレオチドが、プレセニン 1 (P S E N 1) 遺伝子または m R N A を含む、上記 [1] から [1 6] のいずれかに記載の方法。

[1 8]

前記ポリヌクレオチドが、プレセニン 2 (P S E N 2) 遺伝子または m R N A を含む、上記 [1] から [1 7] のいずれかに記載の方法。

[1 9]

前記ポリヌクレオチドが、プレセニン 1 (P S E N 1) 遺伝子または m R N A 、およびプレセニン 2 (P S E N 2) 遺伝子または m R N A を含む、上記 [1] から [1 8] のいずれかに記載の方法。

[2 0]

P S 1 をコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 または配列番号 2 と少なくとも 6 0 % 、 6 5 % 、 7 0 % 、 7 5 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 同一のヌクレオチド配列を含む、上記 [1] から [1 9] のいずれかに記載の方法。

[2 1]

P S 2 をコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号 3 または配列番号 4 と少なくとも 6 0 % 、 6 5 % 、 7 0 % 、 7 5 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 同一のヌクレオチド配列を含む、上記 [1] から [2 0] のいずれかに記載の方法。

[2 2]

プレセニン 1 (P S 1) および / またはプレセニン 2 (P S 2) をコードする前記ポリヌクレオチドが、プロモーターに動作可能に結合する、上記 [1] から [2 1] のいずれかに記載の方法。

[2 3]

前記プロモーターが、汎神経プロモーターである、上記 [2 2] に記載の方法。

[2 4]

前記汎神経プロモーターが、シナプシン I プロモーターである、上記 [2 3] に記載の方法。

[2 5]

前記プロモーターが、神経細胞サブタイプ特異的プロモーターである、上記 [2 2] に記載の方法。

[2 6]

前記神経細胞サブタイプ特異的プロモーターが、アルファ - カルシウム / カルモジュリンキナーゼ 2 A プロモーターである、上記 [2 5] に記載の方法。

[2 7]

P S 1 および / または P S 2 をコードする前記ポリヌクレオチドが、治療を必要とする前記対象の C N S に投与される、上記 [1] から [2 6] のいずれかに記載の方法。

[2 8]

P S 1 および / または P S 2 をコードする前記ポリヌクレオチドが、静脈内送達により前記 C N S に投与される、上記 [2 7] に記載の方法。

[2 9]

P S 1 および / または P S 2 をコードする前記ポリヌクレオチドが、くも膜下腔内送達により前記 C N S に直接投与される、上記 [2 7] に記載の方法。

[3 0]

P S 1 および / または P S 2 をコードする前記ポリヌクレオチドが、大槽内送達により前記 C N S に直接投与される、上記 [2 7] に記載の方法。

[3 1]

P S 1 および / または P S 2 をコードする前記ポリヌクレオチドが、脳室内送達により前記 C N S に直接投与される、上記 [2 7] に記載の方法。

[3 2]

10

20

30

40

50

PS1および/またはPS2をコードする前記ポリヌクレオチドが、特定の脳領域、任意選択で、大槽、脳室、腰部髄腔内への定位的注射、海馬への直接注射により前記CNSに直接投与される、上記[27]に記載の方法。

[33]

対象の神経変性疾患、障害または状態の治療における使用のための、プレセニン1(PS1)および/またはプレセニン2(PS2)タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列であって、前記対象が、ドミナントネガティブPS1またはPS2タンパク質アイソフォームをコードする、PSEN1および/またはPSEN2の少なくとも1つのアレルにおける1つまたは複数の変異を有する、ポリヌクレオチド配列。

[34]

対象の神経変性疾患、障害または状態の治療における使用のための、プレセニン1(PS1)および/またはプレセニン2(PS2)タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含み、PS1および/またはPS2をコードする前記配列が、脳において前記PS1および/またはPS2の発現を引き起こすプロモーターに動作可能に結合するベクターであって、前記対象が、ドミナントネガティブPS1またはPS2タンパク質アイソフォームをコードする、PSEN1および/またはPSEN2の少なくとも1つのアレルにおける1つまたは複数の変異を有する、ベクター。

[35]

ウイルスベクターである、上記[34]に記載の使用のためのベクター。

[36]

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである、上記[35]に記載の使用のためのベクター。

[37]

前記AAVベクターが、AAV9、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2/1、AAV2/2、AAV2/5、AAV2/6、AAV2/7、AAV2/8、AAV2/9、AAV2/rh10、AAV2/AAV11またはAAV2/AAV12から選択され、好ましくは、AAV9またはAAVrh10である、上記[36]に記載の使用のためのベクター。

[38]

前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、上記[35]に記載の使用のためのベクター。

[39]

前記ウイルスベクターが、レトロウイルスベクターである、上記[35]に記載の使用のためのベクター。

[40]

前記プロモーターが、汎神経プロモーターである、上記[34]に記載の使用のためのベクター。

[41]

前記汎神経プロモーターが、シナプシンIプロモーターである、上記[40]に記載の使用のためのベクター。

[42]

前記プロモーターが、神経細胞サブタイプ特異的プロモーターである、上記[34]に記載の使用のためのベクター。

[43]

前記神経細胞サブタイプ特異的プロモーターが、アルファ-カルシウム/カルモジュリンキナーゼ2Aプロモーターである、上記[42]に記載の使用のためのベクター。

[44]

PS1をコードする配列が、配列番号1または配列番号2と少なくとも80%、85%、95%、96%、97%、98%、99%同一のヌクレオチド配列を含む、上記[33]

10

20

30

40

50

に記載の使用のためのポリヌクレオチド、または上記[34]から[43]のいずれかに記載の使用のためのベクター。

[45]

PS2をコードする配列が、配列番号3または配列番号4と少なくとも80%、85%、95%、96%、97%、98%、99%同一のヌクレオチド配列を含む、上記[33]に記載の使用のためのポリヌクレオチド、または上記[34]から[43]のいずれかに記載の使用のためのベクター。

[46]

前記神経変性疾患、障害または状態が、アルツハイマー病である、上記[33]に記載の使用のためのポリヌクレオチド、または上記[34]から[45]のいずれかに記載の使用のためのベクター。

10

[47]

前記アルツハイマー病が、家族性アルツハイマー病である、上記[46]に記載の使用のためのポリヌクレオチドまたはベクター。

[48]

前記アルツハイマー病が、孤発性アルツハイマー病である、上記[46]に記載の使用のためのポリヌクレオチドまたはベクター。

[49]

前記アルツハイマー病が、遅発型または早期発症型アルツハイマー病である、上記[46]に記載の使用のためのポリヌクレオチドまたはベクター。

20

[50]

前記神経変性疾患、障害または状態が、前頭側頭型認知症である、上記[33]に記載の使用のためのポリヌクレオチド、または上記[34]から[45]のいずれかに記載の使用のためのベクター。

[51]

前記神経変性疾患、障害または状態が、記憶喪失である、上記[33]に記載の使用のためのポリヌクレオチド、または上記[34]から[45]のいずれかに記載の使用のためのベクター。

[52]

前記神経変性疾患、障害または状態が、認知機能低下または認知機能障害である、上記[33]に記載の使用のためのポリヌクレオチド、または上記[34]から[45]のいずれかに記載の使用のためのベクター。

30

[53]

前記認知機能障害が、軽度認知機能障害(MCI)である、上記[33]に記載の使用のためのポリヌクレオチド、または上記[34]から[45]のいずれかに記載の使用のためのベクター。

[54]

エキソソーム、または脂質をベースとするナノ粒子(LNP)と結合するか、またはこれによる送達のために製剤化される、上記[33]または[44]から[53]に記載の使用のためのポリヌクレオチド。

40

【図面】

【図 1 A - B】

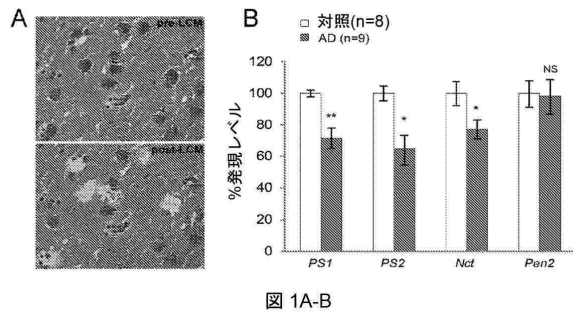


図 1A-B

【図 2 A - B】

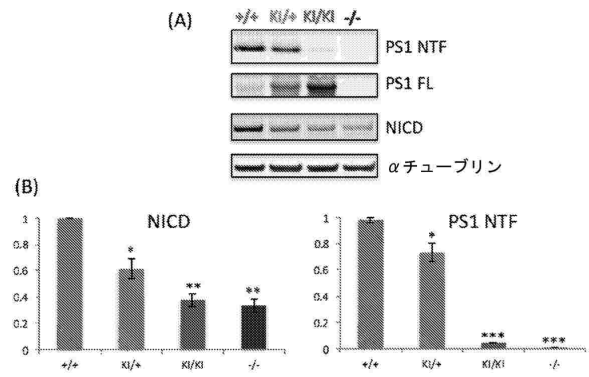


図 2A-B

10

【図 3 A】

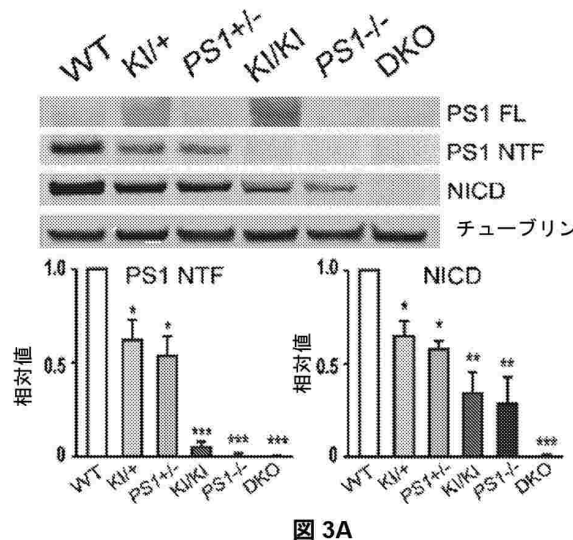


図 3A

【図 3 B】

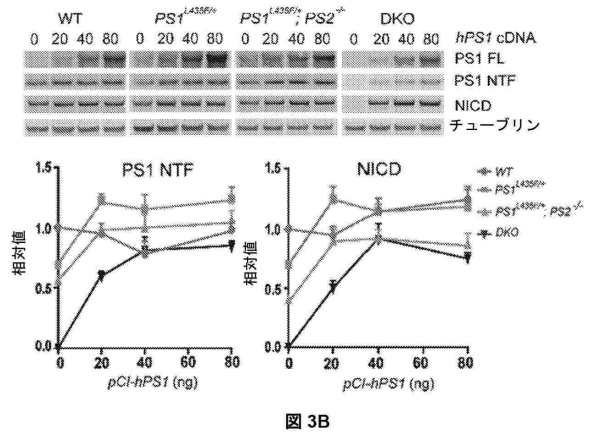


図 3B

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I	
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100186897

弁理士 平川 さやか

(74)代理人

鈴木 康仁

(72)発明者 シェン, ジー

アメリカ合衆国 0 2 4 4 5 マサチューセッツ州, ブルックライン, ウィンスロップ ロード 3 6

(72)発明者 ケレハー 三世, レイモンド ジェー .

アメリカ合衆国 0 2 4 4 6 マサチューセッツ州, ブルックライン, ビーコン ストリート 1 0
7 0 1 シー

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 特開 2 0 1 3 - 1 0 7 8 9 0 (J P , A)

特表 2 0 1 6 - 5 2 3 8 3 5 (J P , A)

特表 2 0 1 3 - 5 0 9 8 9 0 (J P , A)

'Homo sapiens presenilin 1 (PSEN1), transcript variant 1, mRNA' DATABASE NCBI Nucleotide [online] accession:NM_000021 (Version:NM_000021.3), 07-AUG-2008, [retrieved on 2023.03.09], retrieved from the internet: , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/195947402?report=gb&sat=12&satkey=6105349>'Homo sapiens presenilin 1 (PSEN1), transcript variant 2, mRNA' DATABASE NCBI Nucleotide [online] accession:NM_007318 (Version:NM_007318.2), 07-AUG-2008, [retrieved on 2023.03.09], retrieved from the internet: , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/195947396?sat=12&satkey=6105331>'Homo sapiens presenilin 2 (Alzheimer disease 4) (PSEN2), transcript variant 1, mRNA' DATABASE NCBI Nucleotide [online] accession:NM_000447 (Version:NM_000447.2), 17-AUG-2007, [retrieved on 2023.03.09], retrieved from the internet: , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/156105678?sat=11&satkey=9636665>'Homo sapiens presenilin 2 (Alzheimer disease 4) (PSEN2), transcript variant 2, mRNA' DATABASE NCBI Nucleotide [online] accession:NM_012486 (Version:NM_012486.2), 17-AUG-2007, [retrieved on 2023.03.09], retrieved from the internet: , <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/156105680?sat=11&satkey=9636666>

Alzheimer's & Dementia , 2012 , Vol.8, No.4S, Part 3 , p.105

J. Biol. Chem. , 2006年 , Vol.281, No.22 , pp.15330-15336

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q