(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-552800
(P2023-552800A)
(43)公表日　令和5年12月19日(2023.12.19)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/12 (2006.01)		C12N	15/12	ZNA	4B063
C12N 15/52 (2006.01)		C12N	15/52	Z	4B065
C12N 15/62 (2006.01)		C12N	15/62	Z	4C084
C07K 14/47 (2006.01)		C07K	14/47		4C087
C12N 9/04 (2006.01)		C12N	9/04	Z	4H045

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全33頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-534717(P2023-534717)
(86)(22)出願日　令和3年12月8日(2021.12.8)
(85)翻訳文提出日　令和5年8月3日(2023.8.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/062389
(87)国際公開番号　WO2022/125653
(87)国際公開日　令和4年6月16日(2022.6.16)
(31)優先権主張番号　63/122,886
(32)優先日　令和2年12月8日(2020.12.8)
(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,
最終頁に続く

(71)出願人　522266737
リペア・バイオテクノロジーズ・インコーポレイテッド
ＲＥＰＡＩＲ ＢＩＯＴＥＣＨＮＯＬＯＧＩＥＳ， ＩＮＣ．
アメリカ合衆国１３２１０ニューヨーク州シラキュース、イースト・ファイエット・ストリート８４１
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾 憲人
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷 道子
(74)代理人　100138911
弁理士　櫻井 陽子
(74)代理人　100218268
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ミトコンドリアベースのコレステロールの流動および異化の向上

(57)【要約】
本明細書の開示は、細胞、組織、または生体内でのコレステロール分解を高めるための組成物、方法、およびシステムである。多くの実施形態では、本開示は、ミトコンドリア内へのコレステロールの流動を高める1つ以上のタンパク質またはそれをコードする配列の使用を記載しており、ミトコンドリア内でコレステロールが細菌関連配列を含む1つ以上のタンパク質により分解される。本明細書で開示する組成物、方法、およびシステムは、患者の血中または細胞内の高レベルのコレステロールに関連する疾患、障害、および状態の予防または処置に有用である。

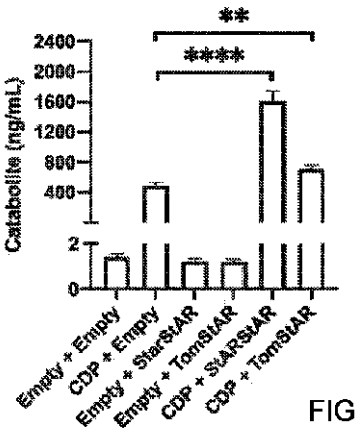


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ステロイド産生急性調節(StAR)タンパク質のコーディング配列; および
コレステロールデヒドロゲナーゼ(CholD)、3-ケトステロイドΔ1-デヒドロゲナーゼ(Δ1-KstD)、無酸素性コレステロール代謝B酵素(acmB)、3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ(KshAB)、３β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ2(HSD2)、P450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)の1つ以上を含むコレステロール分解タンパク質(CDP)のコーディング配列を含む、核酸組成物。
【請求項２】
StARタンパク質が配列番号７の残基63から188を含む、請求項１の核酸。
【請求項３】
StARタンパク質が配列番号７の残基63から188の重複を含む、請求項１または２の核酸。
【請求項４】
StARタンパク質がTOMM20タンパク質の少なくとも一部を含む、請求項１から３のいずれかの核酸。
【請求項５】
CDPがP450を含む、請求項１から４のいずれかの核酸。
【請求項６】
CDPがP450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む、請求項１から５のいずれかの核酸。
【請求項７】
StARタンパク質およびCDPが少なくとも1つのミトコンドリアシグナリングタンパク質を含む、請求項１から６のいずれかの核酸。
【請求項８】
核酸がさらに細胞特異的プロモーター配列を含む、請求項１から７のいずれかの核酸。
【請求項９】
核酸がリポナノ粒子に含まれている、請求項１から８のいずれかの核酸。
【請求項１０】
核酸がウイルスベクターに含まれている、請求項１から８のいずれかの核酸。
【請求項１１】
高コレステロールである対象の処置に使用するための、請求項１から１０のいずれかの核酸。
【請求項１２】
哺乳類細胞の形質転換に使用するための、請求項１から１１のいずれかの核酸。
【請求項１３】
哺乳類細胞がインビトロで形質転換される、請求項１２の核酸。
【請求項１４】
哺乳類細胞がインビボで形質転換される、請求項１２の核酸。
【請求項１５】
核酸がリポナノ粒子に含まれている、請求項１から１４のいずれかの核酸。
【請求項１６】
核酸が高コレステロールを患うか、またはそれを発症するリスクにある対象の細胞に含まれている、請求項１から１５のいずれかの核酸。
【請求項１７】
高コレステロールである対象中のコレステロールの減少に使用するための、請求項１から１６のいずれかの核酸。
【請求項１８】
操作されたステロイド産生急性調節(StAR)タンパク質またはその一部のコーディング配列; および

コレステロールデヒドロゲナーゼ(CholD)、3-ケトステロイドΔ1-デヒドロゲナーゼ(Δ1-KstD)、無酸素性コレステロール代謝B酵素(acmB)、3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ(KshAB)、3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ2(HSD2)、P450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)の1つ以上を含むコレステロール分解タンパク質(CDP)のコーディング配列を含む、哺乳類細胞。

【請求項１９】

StARタンパク質が配列番号７の残基63から188を含む、請求項１８の哺乳類細胞。

【請求項２０】

StARタンパク質が配列番号７の残基63から188の重複を含む、請求項１８または１９の核酸。

【請求項２１】

StARタンパク質がTOMM20タンパク質配列の少なくとも一部を含む、請求項１８から２０のいずれかの哺乳類細胞。

【請求項２２】

CDPがP450を含む、請求項１８から２１のいずれかの哺乳類細胞。

【請求項２３】

CDPがP450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む、請求項１８から２２のいずれかの哺乳類細胞。

【請求項２４】

StARタンパク質およびCDPが少なくとも1つのミトコンドリアシグナリングタンパク質を含む、請求項１８から２３のいずれかの哺乳類細胞。

【請求項２５】

StARまたはCDPのコーディング配列がさらに細胞特異的プロモーター配列を含む、請求項１８から２４のいずれかの哺乳類細胞。

【請求項２６】

StARまたはCDPのコーディング配列が哺乳類細胞のゲノム内に組み込まれている、請求項１８から２５のいずれかの哺乳類細胞。

【請求項２７】

StARまたはCDPのコーディング配列が哺乳類細胞のゲノム内に組み込まれていない、請求項１８から２５のいずれかの哺乳類細胞。

【請求項２８】

高コレステロールを患うか、またはそれを発症するリスクにある対象の処置に使用するための、請求項１８から２７のいずれかの哺乳類細胞。

【請求項２９】

対象中のコレステロール減少に使用するための、請求項１８から２８のいずれかの哺乳類細胞。

【請求項３０】

哺乳類細胞が、肝細胞、神経細胞、骨細胞、筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、免疫細胞、血球系細胞、およびそれらの幹細胞または前駆細胞から選択される、請求項１８から２９のいずれかの哺乳類細胞。

【請求項３１】

操作されたステロイド産生急性調節(StAR)タンパク質またはその一部; および
コレステロールデヒドロゲナーゼ(CholD)、3-ケトステロイドΔ1-デヒドロゲナーゼ(Δ1-KstD)、無酸素性コレステロール代謝B酵素(acmB)、3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ(KshAB)、3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ2(HSD2)、P450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)の1つ以上を含むコレステロール分解タンパク質(CDP)を含む、哺乳類細胞。

【請求項３２】

StARタンパク質が配列番号７の残基63から188を含む、請求項３１の哺乳類細胞。

【請求項３３】

StARタンパク質が配列番号７の残基63から188の重複を含む、請求項３１または３２の哺乳類細胞。
【請求項３４】
StARタンパク質がTOMM20タンパク質の少なくとも一部を含む、請求項３１から３３のいずれかの哺乳類細胞。
【請求項３５】
CDPがP450を含む、請求項３１から３４のいずれかの哺乳類細胞。
【請求項３６】
CDPがP450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む、請求項３１から３５のいずれかの哺乳類細胞。
【請求項３７】
StARタンパク質およびCDPが少なくとも1つのミトコンドリアシグナリングタンパク質を含む、請求項３１から３６のいずれかの哺乳類細胞。
【請求項３８】
細胞内のStARタンパク質およびCDPの全量の少なくとも10%がミトコンドリア膜に位置している、請求項３１から３７のいずれかの哺乳類細胞。
【請求項３９】
StARタンパク質またはCDPが哺乳類細胞のゲノム内に組み込まれた遺伝子によりコードされている、請求項３１から３８のいずれかの哺乳類細胞。
【請求項４０】
StARタンパク質またはCDPがゲノム外遺伝子によりコードされている、請求項３１から３９のいずれかの哺乳類細胞。
【請求項４１】
高コレステロールを患うか、またはそれを発症するリスクにある対象の処置に使用するための、請求項３１から３９のいずれかの哺乳類細胞。
【請求項４２】
対象中のコレステロール減少に使用するための、請求項３１から４０のいずれかの哺乳類細胞。
【請求項４３】
哺乳類細胞が、肝細胞、神経細胞、骨細胞、筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、免疫細胞、血球系細胞、およびそれらの幹細胞または前駆細胞から選択される、請求項１８から２９のいずれかの哺乳類細胞。
【請求項４４】
非天然の操作されたステロイド産生急性調節(StAR)タンパク質またはその一部を発現させること、および
コレステロールデヒドロゲナーゼ(CholD)、3-ケトステロイドΔ1-デヒドロゲナーゼ(Δ1-KstD)、無酸素性コレステロール代謝B酵素(acmB)、3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ(KshAB)、3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ2(HSD2)、P450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む1つ以上のコレステロール分解タンパク質(CDP)を発現させることを含む、
哺乳類細胞内でのコレステロール分解を向上する方法。
【請求項４５】
StARタンパク質が配列番号７の残基63から188を含む、請求項４４の方法。
【請求項４６】
StARタンパク質が配列番号７の残基63から188の重複を含む、請求項４４または４５の方法。
【請求項４７】
StARタンパク質がTOMM20タンパク質の少なくとも一部を含む、請求項４４から４６のいずれかの方法。
【請求項４８】

CDPがP450を含む、請求項４４から４７のいずれかの方法。
【請求項４９】
CDPがP450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む、請求項４４から４８のいずれかの方法。
【請求項５０】
StARタンパク質およびCDPが少なくとも1つのミトコンドリアシグナリングタンパク質を含む、請求項４４から４９のいずれかの方法。
【請求項５１】
StARタンパク質およびCDPが細胞特異的プロモーター配列から発現する、請求項４４から５０のいずれかの方法。
【請求項５２】
高コレステロールを患うか、またはそれを発症するリスクにある対象の処置に使用するための、請求項４４から５１のいずれかの方法。
【請求項５３】
高コレステロールである対象中のコレステロールの減少に使用するための、請求項４４から５２のいずれかの方法。
【請求項５４】
細胞内のStARタンパク質およびCDPの全量の少なくとも約10%がミトコンドリア膜に位置している、請求項４４から５３のいずれかの方法。
【請求項５５】
StARタンパク質またはCDPが哺乳類細胞のゲノム内に組み込まれた遺伝子から発現する、請求項４４から５４のいずれかの方法。
【請求項５６】
StARタンパク質またはCDPがゲノム外遺伝子由来である、請求項４４から５４のいずれかの哺乳類細胞。
【請求項５７】
高コレステロールを患うか、またはそれを発症するリスクにある対象の処置に使用するための、請求項４４から５６のいずれかの方法。
【請求項５８】
対象中のコレステロール減少に使用するための、請求項４４から５７のいずれかの方法。
【請求項５９】
細胞が、肝細胞、神経細胞、骨細胞、筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、免疫細胞、血球系細胞、およびそれらの幹細胞または前駆細胞から選択される、請求項４４から５８のいずれかの方法。
【請求項６０】
コレステロールがLDLである、請求項４４から５９のいずれかの方法。
【請求項６１】
コレステロールが7KCである、請求項４４から５９のいずれかの方法。
【請求項６２】
少なくとも1つの改変細胞を患者に投与することを含む、高コレステロールを発症するリスクにあるか、またはそれを患う対象を処置する方法であって、
改変細胞が、非天然の操作されたステロイド産生急性調節(StAR)タンパク質またはその一部、および、コレステロールデヒドロゲナーゼ(CholD)、3-ケトステロイドΔ1-デヒドロゲナーゼ(Δ1-KstD)、無酸素性コレステロール代謝B酵素(acmB)、3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ(KshAB)、3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ2(HSD2)、P450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む1つ以上のコレステロール分解タンパク質(CDP)を含む、方法。
【請求項６３】
StARタンパク質が配列番号７の残基63から188を含む、請求項６２の方法。

【請求項６４】
StARタンパク質が配列番号７の残基63から188の重複を含む、請求項６２または６３の方法。
【請求項６５】
StARタンパク質がTOMM20タンパク質の少なくとも一部を含む、請求項６２から６４のいずれかの方法。
【請求項６６】
CDPがP450を含む、請求項６２から６５のいずれかの方法。
【請求項６７】
CDPがP450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む、請求項６２から６６のいずれかの方法。
【請求項６８】
StARタンパク質およびCDPが少なくとも1つのミトコンドリアシグナリングタンパク質を含む、請求項６２から６７のいずれかの方法。
【請求項６９】
StARタンパク質およびCDPが細胞特異的プロモーター配列から発現する、請求項６２から６８のいずれかの方法。
【請求項７０】
高コレステロールである対象中のコレステロールの減少に使用するための、請求項６２から７６のいずれかの方法。
【請求項７１】
細胞内のStARタンパク質およびCDPの全量の少なくとも約10%がミトコンドリア膜に位置している、請求項６２から７１のいずれかの方法。
【請求項７２】
StARタンパク質またはCDPが哺乳類細胞のゲノム内に組み込まれた遺伝子から発現する、請求項６２から７２のいずれかの哺乳類細胞。
【請求項７３】
StARタンパク質またはCDPがゲノム外遺伝子由来である、請求項６２から７２のいずれかの方法。
【請求項７４】
患者の総コレステロールが200 mg/dlより高い、請求項６２から７３のいずれかの方法。
【請求項７５】
患者が非アルコール性脂肪性肝疾患を患っている、請求項６２から７４のいずれかの方法。
【請求項７６】
患者が非アルコール性脂肪性肝炎を患っている、請求項６２から７４のいずれかの方法。
【請求項７７】
改変細胞が、肝細胞、神経細胞、骨細胞、筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、免疫細胞、血球系細胞、およびそれらの幹細胞または前駆細胞由来である、請求項６２から７６のいずれかの方法。
【請求項７８】
患者血中の総コレステロール濃度を5%より大きく減少させる、請求項６２から７７のいずれかの方法。
【請求項７９】
少なくとも1つの非天然の操作されたステロイド産生急性調節(StAR)タンパク質またはその一部を哺乳類のミトコンドリア外膜に挿入することを含む、哺乳類のミトコンドリアの改変方法であって、
前記ミトコンドリアが、コレステロールデヒドロゲナーゼ(CholD)、3-ケトステロイド

Δ1-デヒドロゲナーゼ(Δ1-KstD)、無酸素性コレステロール代謝B酵素(acmB)、3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ(KshAB)、3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ2(HSD2)、P450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む1つ以上のコレステロール分解タンパク質(CDP)を含むものである、方法。

【請求項８０】

StARタンパク質が配列番号７の残基63から188を含む、請求項７９の方法。

【請求項８１】

StARタンパク質が配列番号７の残基63から188の重複を含む、請求項７９または８０の方法。

【請求項８２】

StARタンパク質がTOMM20タンパク質の少なくとも一部を含む、請求項７９から８１のいずれかの方法。

【請求項８３】

CDPがP450を含む、請求項７９から８２のいずれかの方法。

【請求項８４】

CDPがP450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む、請求項７９から８３のいずれかの方法。

【請求項８５】

StARタンパク質およびCDPが少なくとも1つのミトコンドリアシグナリングタンパク質を含む、請求項７９から８４のいずれかの方法。

【請求項８６】

StARタンパク質およびCDPが細胞特異的プロモーター配列から発現する、請求項７９から８５のいずれかの方法。

【請求項８７】

高コレステロールを患うか、またはそれを発症するリスクにある対象の処置に使用するための、請求項７９から８６のいずれかの方法。

【請求項８８】

高コレステロールである対象中のコレステロールの減少に使用するための、請求項７９から８７のいずれかの方法。

【請求項８９】

細胞内のStARタンパク質およびCDPの全量の少なくとも約10％がミトコンドリア膜に位置している、請求項７９から８８のいずれかの方法。

【請求項９０】

StARタンパク質またはCDPが哺乳類細胞のゲノム内に組み込まれた遺伝子から発現する、請求項７９から９０のいずれかの哺乳類細胞。

【請求項９１】

StARタンパク質またはCDPがゲノム外遺伝子由来である、請求項７９から８９のいずれかの方法。

【請求項９２】

高コレステロールを患うか、またはそれを発症するリスクにある対象の処置に使用するための、請求項７９から９１のいずれかの方法。

【請求項９３】

高コレステロールである対象中のコレステロールの減少に使用するための、請求項７９から９２のいずれかの方法。

【請求項９４】

細胞が、肝細胞、神経細胞、骨細胞、筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、免疫細胞、血球系細胞、およびそれらの幹細胞または前駆細胞から選択される、請求項７９から９３のいずれかの方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】
【０００１】
本開示のプロセス、方法、およびシステムは、高レベルのコレステロールまたはそのリスクにある対象を、ミトコンドリア内へのコレステロールの輸送とその中での分解を向上させることにより処置することを目的としている。
【０００２】
関連出願との相互参照
本願は、2020年12月8日に出願された“Enhancing mitochondrial-based flow and catabolism of cholesterol”と題する米国仮特許出願番号63/122,886の米国特許法第119条(e)の定めによる優先権の利益を主張し、参照によりその全体が本明細書に援用される。
【０００３】
配列表
本願は、ASCII形式で電子提出された配列表を含んでおり、参照によりその全体が本明細書に援用される。当該ASCII複製は、2021年12月7日に作成され、P289347_WO_01_SL.txtの名称で、52,905バイトのサイズである。
【背景技術】
【０００４】
高コレステロール(または高コレステロール血症)とは、偏った食生活、生活習慣、疾患(例えば糖尿病)または遺伝の結果である場合もある血中の高コレステロールレベルの存在のことである。細胞内の高コレステロール濃度はいくつかの疾患、例えば脂肪肝、動脈硬化などの特徴である。
【０００５】
アテローム性動脈硬化は、動脈壁内にコレステロールを多く含んだリポタンパク質が集積する結果起こる動脈狭窄に関連する。しばしば、循環器疾患(CVD)、心筋梗塞、脳卒中および抹消血管疾患を含む死を引き起こす前触れである。これら疾患のための現在の多くの治療は、低密度リポタンパク質(LDL)の循環レベルを減少させることにより、および/または高密度リポタンパク質(HDL)を増加させることにより、二次イベント(または高リスク個体における初期イベント)を予防することに焦点を当てており、それは、哺乳類細胞はコレステロールの合成が可能であるが分解(異化)できないという理由による。
【０００６】
必要とされているものは、脂質とコレステロールの過多を患う対象の脂質とコレステロールのレベルを減少させるための組成物および方法である。
【発明の概要】
【０００７】
コレステロールを異化可能に改変した改変哺乳類ミトコンドリア内へのコレステロール(様々な変性コレステロール化合物を含む)輸送を向上させるための組成物、方法、およびシステムが本明細書で開示される。多くの実施形態では、細胞はミトコンドリア膜を通過するコレステロールの流動が向上するように操作されている場合がある。その細胞はミトコンドリア膜を通過するコレステロール輸送を支援しうる1つ以上のタンパク質を含んでもよい。
【０００８】
開示する組成物を作製する方法、開示する組成物を使用する方法、および、高コレステロールであるか、または発症するリスクにある対象を処置するための方法も開示され、対象中のコレステロールの減少を支援しうる。様々な実施形態で、開示する組成物は高コレステロールのための処置をする必要がある対象に投与されうる。多くの実施形態で、開示するタンパク質を発現する核酸は、哺乳類の細胞のゲノムに組み込まれているか、またはゲノム外に存在しうる。開示する細胞は、肝細胞、神経細胞、骨細胞、筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、免疫細胞、血球系細胞、およびそれらの幹細胞または前駆細胞から選択しうる。

【０００９】
コレステロールの輸送および分解を向上させる改変哺乳類ミトコンドリアのための組成物、方法、およびシステムが本明細書で開示される。多くの実施形態では、哺乳類のミトコンドリアは、ミトコンドリア膜を通過するコレステロールの流動の向上を助けうる1つ以上の組換えおよび/または非内在性タンパク質を含むように操作されている。多くの実施形態ではミトコンドリアはコレステロール異化を支援しうる1つ以上のタンパク質も含みうる。開示する改変ミトコンドリアは、細胞内コレステロールの減少、ミトコンドリア膜を通過するコレステロール輸送の増加、および/または高コレステロールもしくは高コレステロール血症を発症するリスクにあるか、もしくはそれを患う患者もしくは対象の血中コレステロール濃度の減少、に有用でありうる。

【００１０】
別の側面では、哺乳類ミトコンドリアの改変方法は、少なくとも1つの非天然の操作されたステロイド産生急性調節(StAR)タンパク質またはその一部を哺乳類のミトコンドリア外膜に挿入することを含み、前記ミトコンドリアは、コレステロールデヒドロゲナーゼ(CholD)、3-ケトステロイドΔ1-デヒドロゲナーゼ(Δ1-KstD)、無酸素性コレステロール代謝B酵素(acmB)、3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ(KshAB)、3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ2(HSD2)、P450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む1つ以上のコレステロール分解タンパク質(CDP)を含む。

【００１１】
本明細書で開示する方法および組成物の様々な側面では、StARタンパク質は配列番号７の残基63から188、その重複、またはTOMM20タンパク質の少なくとも一部を含みうる。CDPはP450またはP450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含みうる。StARタンパク質およびCDPは少なくとも1つのミトコンドリアシグナリングタンパク質を含むことができ、および/または細胞特異的プロモーター配列から、および/またはゲノムに組み込まれた遺伝子またはゲノム外遺伝子から発現してもよく、および/または細胞内のStARタンパク質およびCDPの総量の少なくとも約10％はミトコンドリア膜内に位置しうる。開示する方法および組成物は、高コレステロールを患うか、またはそれを発症するリスクにある対象の処置に有用な場合があり、例えば高コレステロールである対象のコレステロールを減少させることによる。細胞は、肝細胞、神経細胞、骨細胞、筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、免疫細胞、血球系細胞、およびそれらの幹細胞または前駆細胞から選択してもよい。

【図面の簡単な説明】

【００１２】
【図１】図１は、StAR-StARまたはTom-StARの存在および非存在下におけるCDP発現細胞の培養液中の平均異化産物濃度を表している(n=3、独立した実験)。

【００１３】
【図２】図２は、図１の細胞中のチューブリン、CDP、StAR-StAR、およびTomStARのタンパク質発現レベルを示すそれぞれのウエスタンブロットである(n=3、独立した実験)。

【００１４】
【図３】図３は、CDPを発現するマウスRAW264.7細胞株内のStAR発現によりコレステロール分解とその後の異化産物産生がインビトロで大きく増加していることを示す棒グラフである。

【００１５】
【図４】図４は、図３に記述した細胞株内のタンパク質量を示すウエスタンブロットである。

【００１６】
【図５】図５は、本明細書で開示する様々なタンパク質の配列と核酸コーディング配列である。具体的には、P450-FdxR-Fdxのヒトタンパク質配列(配列番号１)がFlagタグと

ともに太字で記載されている: コレステロールデヒドロゲナーゼ、CholD(配列番号２)が示される; 3-ケトステロイドΔ1-デヒドロゲナーゼ、Δ1-KstD(配列番号３)が示される; 無酸素性コレステロール代謝B酵素、acmB(配列番号４)が示される; 3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ、KshAB(配列番号５)が示される; 3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ2、HSD2(配列番号６)が示される; ヒトStARタンパク質配列(配列番号７)が示される; ヒトTOMM20タンパク質配列(配列番号８)が示される; ヒトTom/Star融合タンパク質配列(配列番号９; Tom配列は太字で記載され、リンカー配列は色と下線で記述される)が示される; ヒトStAR/StAR融合タンパク質配列(色と下線のリンカー配列(配列番号１０)とともに); StAR mRNA完全配列(配列番号１１; 開始コドンは大文字で表示)が、下線のアミノ酸配列、大文字で記載された配列番号７の63-285に対応するコーディング配列とともに記載されている; およびTOMM20 mRNA全配列、CDS = 123-560(配列番号１２; 開始コドンが大文字で、停止コドンが赤で記載される)も示される。

【発明を実施するための形態】

【００１７】

本明細書の開示は、コレステロールがコレステロール異化酵素により触媒作用を受けるミトコンドリア内へのコレステロールの輸送を向上することで、対象の細胞および/または血流中のコレステロールを減少させる、組成物、方法、およびシステムである。

【００１８】

本明細書の開示は、高コレステロール血症および過剰なコレステロールの存在に関連する他の障害の管理を助ける類のないアプローチの開発である。ヒトはコレステロールを分解するための酵素を欠いているし、多くの哺乳類細胞は適切な貯蔵または代謝の方法を持たず過剰なコレステロールを取り込む。いくつかの場合では、マクロファージがコレステロールやコレステロールエステルを取り込むと泡沫細胞へと発達する。このコレステロールの集積は、動脈プラークの形成を導くこともあり、アテローム性動脈硬化を導きうる。それらの位置によっては、血行不良が原因で、プラークが虚血性心疾患、狭心症(胸痛)、間欠性跛行(運動に伴う足の痛み)または慢性腎臓病を引き起こす場合もある。さらに、血流に大きな影響を与える前でも、多くのプラークは不安定で破裂しやすい場合がある。これらの構造は、典型的にはプラークが破裂する(複雑プラーク)まで臨床的に症状がなく、下層組織を患部の血管を突然塞ぐ可能性のある血餅にさせる。

【００１９】

出願人は本明細書で、ヒト細胞をコレステロールの減少を支援するために操作しうると示す。多くの実施形態で、前記細胞はいかなる哺乳類細胞であってもよい。開示する細胞は、様々なタンパク質を発現するように操作してもよく、コレステロールの輸送と分解/異化を支援しうる。本明細書で使用するように、操作された細胞は1つ以上の非天然および/または外来性のコーディング配列またはタンパク質を伴った細胞であってもよく、例えば、操作された哺乳類細胞は1つ以上の哺乳類および/または細菌関連配列またはタンパク質を含んでいてもよい。本明細書で使用する、非天然、外来性、または非内在性は、多くの場合組換えによって細胞に導入される配列またはタンパク質を意味しうる。ほとんどの実施形態では、細菌関連とは、類似の細菌配列と約50%よりも高い同一性のタンパク質またはコーディング配列のことを意味しうる。多くの実施形態では、開示するタンパク質は融合タンパク質および/または改変タンパク質、例えば天然のタンパク質に見られる配列が欠けているタンパク質および/または重複しているタンパク質でありうる。

【００２０】

開示するタンパク質は、内在性遺伝子および/またはタンパク質に関して過剰発現させてもよい。一例では、内在性遺伝子またはタンパク質は、哺乳類のp450scc、StAR、またはTOMM20タンパク質でもよい。ほとんどの実施形態では、開示する前記タンパク質の過剰発現は内在性遺伝子またはタンパク質と比べて所定の試料において、重量またはモル量に基づき、2X、3X、4X、5X、10X、20X、100X、200Xまたはそれ以上での開示する遺伝子またはタンパク質となりうる。ほとんどの場合では、過剰発現は内在性タン

パク質の非誘導発現に関係する。いくつかの場合では、過剰発現は内在性タンパク質の誘導レベルに関係してもよく、発現は同様または同じであってもよい。ほとんどの実施形態では、コレステロールの分解に関する分解とは、コレステロールの様々な側鎖の除去および/または少なくとも1つの環の開環を意味している。

【００２１】

開示するコレステロール分解のためのコーディング配列およびタンパク質は細菌および/または哺乳類由来であってもよい。多くの実施形態では、開示するタンパク質は、コレステロール分解タンパク質(CDP)と呼ばれる場合があり、コレステロールデヒドロゲナーゼ(CholD; 配列番号２)、3-ケトステロイドΔ1-デヒドロゲナーゼ(Δ1-KstD; 配列番号３)、無酸素性コレステロール代謝B酵素(acmB; 配列番号４)、3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ(KshAB; 配列番号５)、3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ2(HSD2; 配列番号６)、P450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx; 配列番号１; uniprot番号 P05108、P22570、P10109)、およびステロイド産生急性調節タンパク質(StAR; 配列番号７)の1つ以上から選択してもよい。多くの実施形態では、開示するコーディング配列およびタンパク質は、本明細書で開示する配列と約80%より高い同一性を共有しうる。

【００２２】

開示するコーディング配列およびタンパク質は、細胞にインビボまたはインビトロで、例えばエレクトロポレーション、トランスフェクション、ウイルスベクター、ナノ粒子などを含む様々な方法により運ばれうる。いくつかの実施形態では、開示するコーディング配列およびタンパク質は1つ以上の核酸により、細胞、ベクター、粒子内にコードしてもよい。いくつかの実施形態では、前記粒子は脂質ナノ粒子(lipid nanoparticle)(またはリポナノ粒子(lipo nanoparticle; LNP))であってもよい。いくつかの実施形態では、ベクターはアデノウイルスまたはレンチウイルスなどのウイルスベクターでもよい。多くの実施形態では、コーディング配列は、コードされるタンパク質の特定の細胞または組織内における発現を支援しうるか、または全般的にまたは特定の細胞もしくは組織内において、コードされるタンパク質の高発現の支持を支援しうる、1つ以上のプロモーターおよび/またはエンハンサー配列を含むことがある。

【００２３】

まとめてまたは個別でコレステロール分解タンパク質(CDP)と呼びうる開示するタンパク質は、哺乳類のミトコンドリア、例えばその外膜、内膜、膜間腔、またはマトリクスに導かれうる。

【００２４】

「約(about)」または「およそ(approximately)」なる用語は、当業者の1人によって決定される特定の値に対する許容可能な誤差を意味し、部分的にはどのようにしてその値が測定されまたは決定されたかに依る。ある実施形態では、「約」または「およそ」なる用語は、1、2、3、または4標準偏差以内を意味している。ある実施形態では、「約」または「およそ」なる用語は、所定の値または範囲の30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、または0.05%以内を意味している。「約」または「およそ」なる用語が連続する2つ以上の数値の最初の数値の前にある場合は、「約」または「およそ」なる用語は連続する数値のそれぞれに適用される。

【００２５】

開示する組成物、コンストラクト、細胞、方法、およびシステムの投与は様々な方法を介してもよい。1つの実施形態では、投与は、「静脈内」投与であってもよく、それは患者の静脈内への例えば点滴(静脈へのゆっくりとした治療的な導入)による、前記組成物、コンストラクト、および/または細胞の導入のことをいう。他の実施形態では、投与は「皮下」投与であってもよく、導入は患者の皮膚下に行われる。「点滴」または「点滴すること」とは、治療目的のために静脈を通して体内へと溶液で導入することを意味する。一般的にこれは、例えば溶液を保持できるバッグである静脈内(IV)バッグを介してなされる。開示する組成物、コンストラクト、細胞、方法、およびシステムは、患者に「同時投

与」してもよく、例えば静脈内注射で少なくとも第2の治療薬を同じ投与の間に投与することによる。いくつかの実施形態では、同時投与は同時に行われ、他の場合には同時投与は連続的に行われる。

【００２６】

本明細書で使用する「予防」なる用語は、その必要がある対象に対して、本発明に従う組成物、コンストラクト、方法、またはシステムを投与することにより、本明細書で特定するような疾患またはそれに関連する少なくとも1つの症状の発生または再発を回避することを意味する。

【００２７】

「患者」または「対象」には、ヒト、サル、ネコ、イヌ、マウス、ラット、ウサギ、またはモルモットを含む様々な動物を含む。前記動物は非霊長類および霊長類(例えばサルおよびヒト)などの哺乳類であってもよい。1つの実施形態では、患者は幼児、子ども、青少年または成人などのヒトである。

【００２８】

「処置する」、「処置すること」、および「処置」なる用語は、本明細書で開示する事象、疾患、障害、または状況の少なくとも1つの症状、徴候、または進行を、一時的にまたは持続的のいずれか、部分的にまたは完全のいずれかで、取り除くこと、減少すること、抑制すること、または寛解させることを意味する。関連する分野では認知されるように、治療として利用される方法、組成物、およびシステムは、所定の疾患状態の重症度を減少する場合があるが、有用であるとみなされるために、それに関連するすべての症状を消失させる必要はない。同様に、予防的投与処置は、実行可能な予防的組成物、薬、方法、またはシステムを構成するために、状態の発症予防が完全に効果的である必要はない。単に、疾患の影響を減少すること（例えば、本明細書で開示するように、血中コレステロール濃度の減少、および/または関連する症状の数または重症度を減少、または別の処置の有効性を増大することにより、または別の有益な効果を生むことにより）、または対象に疾患が発生または悪化する可能性を減少することで十分である。

【００２９】

「有効量」なる用語は、疾患の処置または予防において治療的または予防的利益をもたらすために、または疾患に関連する症状を遅らせるか、または最小化するために十分である、本発明の化合物または他の活性成分の量を意味する。さらに、本発明の化合物に関する治療有効量とは、疾患の処置または予防での治療的利益をもたらす、治療薬単独、または他の治療との組み合わせの中の量を意味する。本発明の化合物に関して使用する場合、前記用語は、治療全体を改善する、症状または疾患の原因を減少または回避する、または治療有効性ならびに他の治療薬との相乗作用が向上する量を包含しうる。

【００３０】

「治療有効量」なる表現は、(i) 特定の疾患、状態または障害を処置する、(ii) 特定の疾患、状態または障害の1つ以上の症状を寛解するか、または取り除く、または(iii) 本明細書に記載される特定の疾患、状態、または障害の1つ以上の症状の発生を予防するか、または遅らせる、本発明の組成物の量を意味する。血中コレステロール過多の場合では、開示する組成物の治療有効量は、患者の血中のコレステロール濃度を減少しうる; 細胞内コレステロールを減少しうる; コレステロールプラークの成長および/または発達を阻害しうる(すなわち、ある程度まで減速させ、好ましくは停止する); 肝臓内の脂質集積を阻害しうる(すなわち、ある程度まで減速させ、好ましくは停止する); 肝臓内の脂質含有量を減少しうる; および/または高血中コレステロールに関連する1つ以上の症状をある程度まで軽減しうる。

【００３１】

本明細書で使用する「寛解」なる用語は、処置および/または組成物を必要とする患者または対象に対して、本開示に従い、1つ以上の処置および/または組成物を投与することによる、患者の疾患状態(例えば高血中コレステロール)のいかなる改善をも意味する。このような改善は、患者の疾患の進行の減速または停止、および/または少なくとも1つ

の疾患症状の重症度の低減、疾患症状の無い期間の頻度または持続時間の増大または疾患による機能障害または身体障害の予防、として観察されることがある。

【００３２】

標的細胞

CDPを発現させられる様々な組織および細胞タイプが、開示する組成物の標的となりうる。様々な実施形態で、前記細胞は、平滑筋、骨格筋、ならびに心筋細胞、神経細胞、腺細胞、骨細胞、免疫細胞、血球系細胞、およびそれらの幹細胞または前駆細胞を含むが限定されないすべての器官および組織の内皮および上皮細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、前記細胞は、多能性幹細胞であってもよく、例えば人工多能性幹細胞である。多くの実施形態では、前記組織は癌性または前癌性でもよく、皮膚ならびに腸癌(扁平上皮細胞)、腺癌(膵臓の腺上皮細胞起源)、胃腸癌(神経内分泌細胞)、膵臓癌、小細胞癌(神経内分泌細胞)、平滑筋肉腫(平滑筋細胞)およびリンパ腫(消化管器官/壁でみられるリンパ球)の1つ以上の細胞であってもよい。

【００３３】

様々な細胞および組織が開示する組成物および方法の標的となりうる。多くの実施形態では、開示する組成物は当業者の知る様々な方法により、具体的な細胞を標的としてもよい。いくつかの実施形態では、LNPは具体的な細胞を標的とすることを助ける1つ以上の分子、例えば標的細胞上の受容体または表面タンパク質に親和性のあるタンパク質を含んでもよい。

【００３４】

コレステロール分解酵素

本明細書では、様々なコレステロール、コレステロール関連遺伝子およびタンパク質を開示する。いくつかの実施形態では、開示する遺伝子およびタンパク質はコレステロールの輸送および/または代謝を支援することができる。ほとんどの実施形態では、開示する遺伝子およびタンパク質はミトコンドリア内で発現および/またはミトコンドリアを標的しうる。多くの実施形態では、開示する遺伝子およびタンパク質は細胞がコレステロールを分解および/または異化して開環することを可能にし、すると内在性タンパク質および酵素はさらにその分子を代謝しうる。

【００３５】

ミトコンドリア

ミトコンドリアはほとんどの真核細胞および真核生物で見られ、二重膜で構成されている。ミトコンドリアは細胞のエネルギーを供給し、シグナリング、セルサイクル、細胞増殖、ならびに分化、アポトーシス、および細胞死において役割を果たす。心臓、筋肉、脳、および肝細胞などのエネルギー高要求の細胞は数千個のミトコンドリア持っていることもある。

【００３６】

ミトコンドリアの二重膜構造は特殊化した区画を有しており、外膜、膜間腔、内膜、ならびにクリステおよびマトリクスである。これらの区画は、特殊化した機能を有しており、例えばATP合成である。マトリクスにはミトコンドリア独自のゲノムが存在している。

【００３７】

ステロイド産生急性調節タンパク質(StAR)

ステロイドおよびステロイドホルモンはコレステロールから合成される。ステロイド産生の最初のステップは、ミトコンドリア内膜(IMM)のマトリクス側に位置するP450sccによるコレステロール側鎖の切断である。典型的には、ステロイドホルモンを産生する細胞は、常時少量のホルモンしか貯蔵および保持していない。つまりステロイド分泌の増加は、そのステロイド合成の最初の増加によりなされる。しかし、ステロイドは細胞および生体内において広範で強い作用を持つ - それゆえにステロイド産生細胞は、過剰産生およびステロイド量超過に関連する病状を回避するために、ステロイドおよび前駆体の産生をしっかりと調節している。過剰産生を回避するために、合成は速やかに開始し、速やかに終了可能である。細胞がこの調整(数分以内に合成を10-100倍増加できる)を実行する

1つの方法は、ミトコンドリアマトリクス内へのコレステロールの流動を調整することにある。コレステロールはStARタンパク質によりミトコンドリア膜を通過して輸送される。

【００３８】

StARタンパク質は、ミトコンドリアを標的とするリーダーペプチド配列を含む37 kDaのタンパク質として合成される。ミトコンドリア膜内に挿入されると、リーダーペプチドが切断され、ミトコンドリア内部に位置する30 kDaのタンパク質となる。StAR遺伝子の変異は先天性リポイド副腎皮質過形成症をもたらしうる。副腎皮質過形成症を患う対象は極少量のステロイドを合成している。

【００３９】

StARはミトコンドリア内へのコレステロール輸入を支持する2つのさらなるタンパク質と相互作用しうる。TSPO、トランスロケータータンパク質は、ステロイドを産生するコレステロールのミトコンドリアへの輸送を支援する18kDaのタンパク質である。TSPO発現はマクロファージの変性LDL(modified LDLs)への暴露に応答して上方調節されることが研究で示されている。加えて、広範に発現しているPBR(末梢型ベンゾジアゼピン受容体)は、コレステロール輸送の調節に関わるミトコンドリア外膜タンパク質である。PBRを阻害すると、細胞のステロイド産生能が喪失する。

【００４０】

コレステロールから大量のステロイドを産生する能力を、StARの導入により、非ステロイド産生細胞(すなわち、典型的にはステロイドを産生しないか、または極少量のステロイドを産生する細胞)に付与することができる。具体的には、P450scc酵素系(すなわちH_2N-P450scc-アドレノドキシンレダクターゼ-アドレノドキシン-COOH)を遺伝子導入したステロイド非産生細胞は、極低レベルでコレステロールを代謝可能である。StARの存在(すなわちStARとP450scc酵素系の共発現)は、これらの細胞内におけるコレステロール変換を数倍増加させる。細胞のステロイド産生は、ミトコンドリア外膜(OMM)を通過するStARの輸送を減速させる助けとなりうる、OMMタンパク質(例えばミトコンドリアトランスロカーゼのTOM遺伝子(translocase, outer membrane))との融合またはStARドメインの重複のいずれかによって、ミトコンドリア外膜へStARを固定することによりさらに向上できることが研究で示されている。StARドメインの重複はStAR-StARタンパク質と呼ばれうる。StAR-StARはStARの残基1-188がStARの残基63-285に結合した融合タンパク質であり、従ってStARのプロテアーゼ耐性ドメイン(残基63-188)を二量体化する。

【００４１】

本発明の組成物および方法で使用するStARタンパク質は、StARタンパク質配列の様々な形態を含みうる。いくつかの実施形態では、開示するStARタンパク質は1つ以上の変異、トランケーション、欠失、重複、融合などを含んでもよく、または開示するタンパク質は、野生型または天然のStARタンパク質でもよい。いくつかの実施形態では、開示するタンパク質は、ミトコンドリア外膜通過の輸送時間を減少する改変をしてもよく、コレステロールのミトコンドリア内への輸入向上を助けうる。

【００４２】

本明細書で使用する場合、コレステロールなる用語はコレステリンまたはコレステリルアルコールを意味し、ステロールの式は$C_{27}H_{46}O$、IUPAC名はコレスト-5-エン-3-オール、および(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-ジメチル-17-[(2R)-6-メチルヘプタン-2-イル]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-ドデカヒドロ-1H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3-オールである。本明細書で使用する場合、コレステロールなる用語は、酸化コレステロール、$C_{27}H_{46}O_2$、オキシコレステロール、または5,6-エポキシコレステロール、7-ケトコレステロール(7KC)、コレスタン-3β,5α,6β-トリオールおよび7-α/βヒドロキシコレステロールなどを含むコレステロール誘導体も意味しうる。

【００４３】

コレステロールを分解しうる開示する遺伝子およびタンパク質は、コレステロールデヒドロゲナーゼ(CholD)、3-ケトステロイドΔ1-デヒドロゲナーゼ(Δ1-KstD)、無酸素性コレステロール代謝B酵素(acmB)、3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ(KshAB)、3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ2(HSD2)、P450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)およびその組み合わせから選択されうる。

【００４４】

開示する遺伝子、タンパク質、および酵素の1つ以上を、1つ以上のベクター、コンストラクト、またはカセットにパッケージしてもよい。様々な実施形態では、1つ以上のコレステロール分解酵素を含むカセットは、コレステロール異化カセット(CCC)と呼ばれうる。いくつかの実施形態では、前記カセットはコンストラクトであってもよく、本明細書で開示するタンパク質または開示する遺伝子のいずれかによりコードされるタンパク質と約80%以上の同一性をもつ少なくとも1つのタンパク質をコードする核酸配列を含んでもよい。多くの実施形態では、開示するタンパク質またはヌクレオチド配列との同一性パーセントは、約79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%より大きくてもよく、約100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、および81%より少なくてもよい。配列同一性は、約40 aa(アミノ酸残基)、50 aa、60 aa、70 aa、80 aa、90 aa、100 aa、110 aa、120 aa、130 aa、140 aa、150 aa、160 aa、170 aa、180 aa、190 aa、200 aaまたはそれ以上より大きく、約300 aa、200 aa、190 aa、180 aa、170 aa、160 aa、150 aa、140 aa、130 aa、120 aa、110 aa、100 aa、90 aa、80 aa、70 aa、または60 aaより小さいタンパク質配列について算出してもよい。多くの実施形態では、配列同一性は約80-150アミノ酸残基にかけて算出される。ほとんどのケースで、参照配列(すなわち配列番号１-１０)と比べて挿入または欠失したアミノ酸は、単一の非同一アミノ酸としてカウントしている。いくつかの実施形態では、例えば、例えば組成物が1つ以上のナノプラスミドまたはmRNAである場合など、1つ以上の組成物の送達がLNPを介する実施態様では、組成物は1つ以上のコレステロール分解タンパク質、例えば酵素およびコレステロール輸送タンパク質、例えばStARタンパク質またはStAR変異体を含んでもよい。当業者は本明細書で開示するタンパク質および核酸配列からmRNAを作製することができる。1つ以上の組成物が対象に投与しうる治療細胞に含まれている実施形態では、治療細胞は、コレステロール分解タンパク質、例えば酵素、およびコレステロール輸送タンパク質、例えばStARタンパク質またはStAR変異体をコードする核酸を含む1つ以上のベクター、コンストラクト、および/またはカセットにより投与されうる。上記ケースでは、前記核酸は、例えば、細胞のゲノム配列またはミトコンドリア配列内にコーディング配列を組み込むかまたは挿入する支援をする1つ以上のウイルスベクター(一例はレンチウイルス)により細胞に導入されうる。いくつかの実施形態では、核酸は組み込まれない場合もあり、開示するタンパク質は核内またはミトコンドリア内のゲノム外配列から発現する。

【００４５】

コレステロール関連疾患または障害

過剰な天然のLDLおよび増加したLDL:HDL比は、循環器系疾患、アテローム性動脈硬化、脳卒中、ならびに冠動脈性心疾患および心臓発作において、重大な役割を果たしていることが示されてきた。いくつかの実施形態では、高コレステロールのリスクにあるか、またはそれを患う対象または患者は、血液1デシリットルあたりコレステロール約200 mg(すなわち低密度リポタンパク質＋高密度リポタンパク質)より高い総コレステロール濃度および/または約5.2 mmol/Lより高い総コレステロールを有しうる。いくつかの実施形態では、高コレステロールのリスクにあるか、またはそれを患う対象または患者は、約100 mg/dlより高く、および/または約2.6 mM LDLより高いLDL濃度を有しうる。いくつかの実施形態では、高コレステロールのリスクにあるか、またはそれを患う対象ま

たは患者は、約50 mg/dlより低く、および/または約1.3 mM HDLより低いHDL濃度を有しうる。いくつかの実施形態では、高コレステロールのリスクにあるか、またはそれを患う対象または患者は、約150 mg/dlより高く、および/または約1.7 mMトリグリセリドより高いトリグリセリド濃度を有しうる。いくつかの実施形態では、高コレステロールのリスクにあるか、またはそれを患う対象または患者は、約4.0(すなわち4対1)または4.0より高いLDL:HDL比を有しうる。

【００４６】

アセチル化LDLはインビトロで化学的に修飾したLDLの形態であり、インビボには存在しない。アセチル化LDLと酸化LDLの両方が、マクロファージに取り込まれ、これらの細胞を泡沫細胞へと転換させる。ほとんどのケースでは、LDLのすべての構成成分は酸化しやすく、酸化形態のLDL(oxLDL)を生成する。動脈のマクロファージによるoxLDLの取り込みは、プラーク形成において中心的である。非修飾のLDLとは異なり、oxLDLはLDLスカベンジャー受容体を介して制御のない方法で動脈壁のマクロファージにより取り込まれる。オキシステロールは天然のコレステロールより10-100倍以上の反応性であり、その中で最も毒性が高いのは7-ケトコレステロール(7KC)であるが、oxLDLの中で最も多量でもある。

【００４７】

より高い循環7KCレベルは、将来の心血管イベントのリスクに大きく関わり、総死亡率を増大させることが研究で分かっている。7KCは炎症促進性、酸化促進性、アポトーシス促進性、ならびに線維形成性であり、細胞膜および血管拡張反応のための重要なイオン輸送経路を破壊し内皮細胞機能を変化させる分子である。いくつかの実施形態では、高コレステロールのリスクにあるか、またはそれを患う対象または患者は、約109.8 nmol/Lより高い7KC濃度を有しうる。

【００４８】

高コレステロールを患うか、またはそれを発症するリスクにある対象または患者は、高コレステロール血症であるとされうる。いくつかの実施形態では、高コレステロール血症は、血漿オキシステロールの割合、例えば血漿オキシステロール中の7-KCの割合を測定することにより評価しうる。高コレステロール血症患者では、7KCは血漿オキシステロールの約57%を占めることがある。7KCは、7KC代謝の直接産物である7-α/βヒドロキシコレステロール(血漿オキシステロールの21%)になる。動脈プラークでは、オキシステロールの55%が7KCであると報告され、2番目と3番目に最も多量であるのは、コレスタン-3β,5α,6β-トリオールおよび7-α/βヒドロキシコレステロールでそれぞれ13%と12%である。

【００４９】

上記のようにNASH(非アルコール性脂肪性肝炎)は過多コレステロールに関連する別の疾患である。コレステロールの恒常性と輸送が変化すると、肝臓に遊離コレステロールが蓄積することになり、肝細胞の損傷および非実質細胞の活性化を介してNAFLD（非アルコール性脂肪性肝疾患）の原因となる。特に、ミトコンドリア内および周辺への遊離コレステロールの過負荷はミトコンドリアの機能不全を誘導し、炎症、線維化、および肝細胞死を促進する。

【００５０】

他のコレステロール関連疾患には、肺胞蛋白症(PAP)、眼疾患、神経変性疾患、ニーマン・ピック病C型(NPC)、およびリソソーム酸性リパーゼ(LAL)欠損症が含まれる。なぜなら、コレステロール含量は肺性動物(lunged animals)において肺サーファクタントの流動性および機能を調整する役割を担っているからであり、その流動性は特に極端な温度下では素早く変化可能で、コレステロールのクリアランス減少はPAP発症を引き起こす一次欠陥である。眼疾患のケースでは、オキシステロールと特に7KCが、網膜細胞の変性を引き起こす。つまり、オキシステロールレベルの増加は、加齢黄斑変性(AMD)、脈絡膜新生血管(CNV)、緑内障、および白内障を含む様々な眼疾患において作用していることがある。

【００５１】
オキシステロールレベルの増加は、脳のコレステロール代謝の変化にもつながりうる。コレステロール代謝は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、および認知症進行を含むいくつかの脳障害の重要な要素である場合がある。７ＫＣを含むコレステロールの自動酸化でできる様々なオキシステロールは、アルツハイマー病患者の死後脳で特定されている。慢性てんかんも上記病態の多くを共有している場合がある。具体的には、てんかんとアテローム性動脈硬化には関連が示唆されている。つまり、本開示の組成物、細胞、および方法などのアテローム性動脈硬化の処置は、てんかんの作用を和らげるかもしれない。さらに、７ＫＣは神経細胞に対して高い細胞毒性を有し、様々な神経疾患の進行に関わっていると疑われている。驚くべきことに、コレステロールと違いオキシステロールは、血液脳関門(ＢＢＢ)を通過可能で、脳細胞内に蓄積でき、最終的に神経変性を引き起こす。
【００５２】
様々な他の疾患がコレステロールレベルの増加と関連しうる。例えば、ニーマン・ピック病Ｃ型(ＮＰＣ)の患者はコレステロールを除去できず、主に肝臓、膵臓、および脳内にコレステロールとオキシステロールの蓄積を引き起こす。７ＫＣプロファイルと疾患の重症度の正の相関が報告されている。加えて、リソソーム酸性リパーゼ(ＬＡＬ)欠損症の患者はリソソーム内にコレステロールエステルとトリグリセリドを蓄積し、高コレステロール血症、高脂血症、および/またはアテローム性動脈硬化の症状を示しうる。上記患者は血漿内に７ＫＣを含むとても高いレベルのオキシステロールも持つ。オキシステロール形成の増加は状態を悪化させる酸化ストレスをさらに増加させる。
【００５３】
開示する組成物および方法は、細胞、組織、および器官内の過多コレステロールおよび/または脂肪性沈着物に関連する疾患または状態に有用である。いくつかの実施形態では、疾患または状態は過多コレステロールおよび/または7-ケトコレステロールなどの1つ以上の酸化コレステロールの類の存在に関連しうる。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、脂肪肝疾患、アテローム性動脈硬化、心不全、脳卒中、虚血、冠動脈心疾患、眼疾患、神経変性および神経疾患、黄斑変性症などの眼疾患、肺機能不全などの1つ以上でもよい。
【００５４】
開示する組成物、細胞、方法および治療は、過多コレステロールに関連する様々な疾患、障害、または状態の処置、減少、または回復を支援しうる。1つの実施形態では、前記疾患、障害または状態は早期2型病変(すなわちマクロファージ泡沫細胞形成)、3型病変または前アテローム(preatheroma)(すなわち細胞外脂質の小さな貯蔵を有する)、4型病変またはアテローム(すなわち細胞外脂質のコアを有する)、5型病変または線維性アテローム(すなわち線維性肥厚を伴うアテローム)の1つ以上であってもよい。
【００５５】
開示する組成物、コンストラクト、細胞、方法、治療、およびシステムは患者血中のコレステロール濃度の減少を支援しうる。いくつかの実施形態では、血中コレステロール濃度の減少(例えば、ｍｇ/ｄｌなどの体積あたりの重さまたはｍｍｏｌ/Ｌなどのモル濃度)は、約1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、または90％より大きくてもよく、約100％、95％、90％、80％、70％、60％、50％、40％、30％、20％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、または2％より小さくてもよい。多くの実施形態では、処置に対するコレステロールレベルの減少は1つ以上のコレステロール異化産物の濃度または量の増加を反映し、例えば処置前の異化産物濃度に対する増加が、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、1.5Ｘ、2.0Ｘ、2.5Ｘ、3.0Ｘ、3.5Ｘ、4.0Ｘ、4.5Ｘ、5.0Ｘ、10Ｘ、20Ｘ、30Ｘ、40Ｘ、50Ｘ、60Ｘ、70Ｘ、80Ｘ、90Ｘ、100Ｘ、200Ｘ、300Ｘ、400Ｘ、500Ｘ、600Ｘ、700Ｘ、800Ｘ、またはそれ以上よりも大きい増加でもよく、約2000Ｘ、1500Ｘ、1000Ｘ、500Ｘ

、400X、300X、200X、100X、90X、80X、70X、60X、50X、40X、30X、20X、10X、5X、4X、3X、2X、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、または10%より小さい増加でもよい。

【００５６】

実施例

実施例１-コレステロール分解酵素とStARタンパク質の共発現

StARタンパク質と組み合わせたコレステロール分解酵素のコレステロール分解活性を試験するためのインビトロ実験を実施した。これらの実験では、ヒト293T腎臓上皮細胞を12ウェルプレート、DMEM、10% FBSに細胞3 x 10^5個/ウェルで播種した。75%コンフルエントにおいて、細胞にLipofectamine 3000でトランスフェクションした。次に、以下の条件で、50 μLのOpti-MEM中に等モル量のCDPまたは空プラスミドとStARStAR、TomSTaRまたは空プラスミドのいずれかをP3000とともに混合した。

1. 空プラスミド + 空プラスミド
2. CDPプラスミド + 空プラスミド
3. StARStARプラスミド + 空プラスミド
4. TomStARプラスミド + 空プラスミド
5. CDPプラスミド + StARStARプラスミド
6. CDPプラスミド + TomStARプラスミド

【００５７】

3X μLのLipofectamine試薬を50 μLのOpti-MEMと混合した。次に、DNA/P3000 チューブをLipofectamineチューブと混合し、室温で15分間インキュベートした。トランスフェクション混合物を液滴形式で前記細胞に添加し、48時間インキュベートした。

【００５８】

インキュベート期間の最後に、前記細胞培養液の異化産生物濃度をアッセイした。総細胞タンパク質をRIPAバッファで抽出し、総タンパク質濃度を標準的なBCAキットで定量した。

【００５９】

結果

以下の図１に示すように、293T腎臓上皮細胞内のCDP発現は、培地の異化産物濃度をベースラインレベル(空プラスミドのみ発現、すなわちCDPを発現していない細胞の培地)から約300倍に増加させた。CDPとの本融合タンパク質の共発現は、異化産物をCDP単独と比べて約4倍に増加させた。Tom20はミトコンドリア外膜(OMM)内に存在する50個のN末端残基と細胞質内に95個の残基を有している。StAR残基63-285のTom20のC末端への融合(すなわちTom-StAR)は、StARをOMMの細胞質側に配置させ、CDPと共発現させると、CDPを単独で発現する細胞と比べて約30%異化産物を増加させた。StAR-StARまたはTomStARのいずれか単独の発現は、異化産物濃度に影響を与えなかった。StAR-StARのcDNAによる細胞のトランスフェクションは、SDS-PAGEとウエスタンブロットにより約50 kDのバンドとして検出されるStAR-StARタンパク質の強い発現へとつながった（以下の図２を参照のこと）。興味深いことに、StAR-StARとCDP(抗FLAG抗体でFLAGタグタンパク質として検出)の共発現では、定常状態のStAR-StARタンパク質レベルの顕著な下方調節という結果になった。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、上記データは、ミトコンドリアマトリクス内へのCDP-基質とコレステロールの連続するStAR-StAR仲介輸送がStAR-StARタンパク質の不安定化および分解/消費につながったと示唆される。Tom-StARの下方調節はCDP共発現細胞では検出されず、いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、おそらくミトコンドリアマトリクスへのコレステロール輸送におけるTom-StARのより低い効率のためである。この効率の低下は、CDPとTom-StARを共発現した細胞は、CDPとStAR-StARを共発現した細胞と比べて、CDP由来の異化産物のレベルが有意に低いことにより証拠付けられた(前述の図１を参照のこと)。StAR-StARタンパク質のレベルは、StAR-StARとCDPを発

現した細胞と比べ、StAR-StARのみを発現した細胞の方が高く、そのことは、StAR-StAR活性レベルとその結果としての分解は、CDP非存在において、ミトコンドリアマトリクス内でのコレステロール蓄積レベルが増加することによる制限を受けたかもしれないと示唆される。CDPによるコレステロールからその異化産物への連続した変換は、ミトコンドリア内膜に沿ってコレステロール濃度勾配を増加させ、それによりミトコンドリア内へのStARStAR仲介コレステロール輸送をさらに刺激するものと推測している。

【００６０】

図１は、棒グラフ形式で本実験の結果を示している。具体的には、図１はグラフの下に記述するようにStAR-StARまたはTom-StARの存在および非存在下におけるCDP発現細胞の培養液中の平均異化産生物濃度を示している(n=3、独立した実験)。

【００６１】

図２は、チューブリンをコントロールとし、StAR-StARまたはTom-StARの存在および非存在下における、細胞内のCDPタンパク質レベルを表すそれぞれのウエスタンブロットを示している(n=3、独立した実験)。レーンは以下の通りである: 1, 空プラスミド + 空プラスミド; 2, CDPプラスミド + 空プラスミド; 3, StARStARプラスミド + 空プラスミド; 4, TomStAR プラスミド + 空プラスミド; 5, CDPプラスミド + StARStARプラスミド; 6, CDPプラスミド + TomStARプラスミド。

【００６２】

実施例２ - マウス細胞におけるコレステロール分解酵素とStARタンパク質の共発現

実施例２に記載するようにインビトロ実験を実施した。これらの実験では、マウスRAW264.7細胞を12ウェルプレート、DMEM、10% FBSに細胞3 x 10^5 個/ウェルで播種した。75%コンフルエントにおいて、細胞にLipofectamine 3000でトランスフェクションした。次に、以下の条件で、50 μLのOpti-MEM中に等モル量のCDPまたは空プラスミドおよびStARStARまたは空プラスミドのいずれかをP3000とともに混合した: 空プラスミド + 空プラスミド; CDPプラスミド + 空プラスミド; またはCDPプラスミド + StARStARプラスミド。

【００６３】

CDPとStARを共発現する細胞内で、コレステロール異化作用が大きく増加した。具体的には、異化産生物pg/細胞は、以下の通りであった。空 + 空, 2.83E-03; CDP + 空, 1.26E-01; およびCDP + StARStAR, 1.07E+00。上記結果はCDPの存在下では44.52倍増加に相当し、StARStARタンパク質の存在下ではさらに8.49倍増加に相当する。

【００６４】

請求項１。ステロイド産生急性調節(StAR)タンパク質のコーディング配列; およびコレステロールデヒドロゲナーゼ(CholD)、3-ケトステロイドΔ1-デヒドロゲナーゼ(Δ1-KstD)、無酸素性コレステロール代謝B酵素(acmB)、3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ(KshAB)、３β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ2(HSD2)、P450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)の1つ以上を含むコレステロール分解タンパク質(CDP)のコーディング配列を含む、核酸組成物。

【００６５】

請求項２。StARタンパク質が配列番号７の残基63から188を含む、請求項１の核酸。

【００６６】

請求項３。StARタンパク質が配列番号７の残基63から188の重複を含む、請求項１または２の核酸。

【００６７】

請求項４。StARタンパク質がTOMM20タンパク質の少なくとも一部を含む、請求項１から３のいずれかの核酸。

【００６８】

請求項５。CDPがP450を含む、請求項１から４のいずれかの核酸。

【００６９】

請求項６。CDPがP450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質

(P450-FdxR-Fdx)を含む、請求項１から５のいずれかの核酸。
【００７０】
請求項７。StARタンパク質およびCDPが少なくとも1つのミトコンドリアシグナリングタンパク質を含む、請求項１から６のいずれかの核酸。
【００７１】
請求項８。核酸がさらに細胞特異的プロモーター配列を含む、請求項１から７のいずれかの核酸。
【００７２】
請求項９。核酸がリポナノ粒子に含まれている、請求項１から８のいずれかの核酸。
【００７３】
請求項１０。核酸がウイルスベクターに含まれている、請求項１から８のいずれかの核酸。
【００７４】
請求項１１。高コレステロールである対象の処置に使用するための、請求項１から１０のいずれかの核酸。
【００７５】
請求項１２。哺乳類細胞の形質転換に使用するための、請求項１から１１のいずれかの核酸。
【００７６】
請求項１３。哺乳類細胞がインビトロで形質転換される、請求項１２の核酸。
【００７７】
請求項１４。哺乳類細胞がインビボで形質転換される、請求項１２の核酸。
【００７８】
請求項１５。核酸がリポナノ粒子に含まれている、請求項１から１４のいずれかの核酸。
【００７９】
請求項１６。核酸が高コレステロールを患うか、またはそれを発症するリスクにある対象の細胞に含まれている、請求項１から１５のいずれかの核酸。
【００８０】
請求項１７。高コレステロールである対象中のコレステロールの減少に使用するための、請求項１から１６のいずれかの核酸。
【００８１】
請求項１８。操作されたステロイド産生急性調節(StAR)タンパク質またはその一部のコーディング配列; および
コレステロールデヒドロゲナーゼ(CholD)、3-ケトステロイドΔ1-デヒドロゲナーゼ(Δ1-KstD)、無酸素性コレステロール代謝B酵素(acmB)、3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ(KshAB)、３β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ2(HSD2)、P450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)の1つ以上を含むコレステロール分解タンパク質(CDP)のコーディング配列を含む、哺乳類細胞。
【００８２】
請求項１９。StARタンパク質が配列番号７の残基63から188を含む、請求項１８の哺乳類細胞。
【００８３】
請求項２０。StARタンパク質が配列番号７の残基63から188の重複を含む、請求項１８または１９の核酸。
【００８４】
請求項２１。StARタンパク質がTOMM20タンパク質配列の少なくとも一部を含む、請求項１８から２０のいずれかの哺乳類細胞。
【００８５】
請求項２２。CDPがP450を含む、請求項１８から２１のいずれかの哺乳類細胞。

【００８６】
請求項２３。CDPがP450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む、請求項１８から２２のいずれかの哺乳類細胞。
【００８７】
請求項２４。StARタンパク質およびCDPが少なくとも1つのミトコンドリアシグナリングタンパク質を含む、請求項１８から２３のいずれかの哺乳類細胞。
【００８８】
請求項２５。StARまたはCDPのコーディング配列がさらに細胞特異的プロモーター配列を含む、請求項１８から２４のいずれかの哺乳類細胞。
【００８９】
請求項２６。StARまたはCDPのコーディング配列が哺乳類細胞のゲノム内に組み込まれている、請求項１８から２５のいずれかの哺乳類細胞。
【００９０】
請求項２７。StARまたはCDPのコーディング配列が哺乳類細胞のゲノム内に組み込まれていない、請求項１８から２５のいずれかの哺乳類細胞。
【００９１】
請求項２８。高コレステロールを患うか、またはそれを発症するリスクにある対象の処置に使用するための、請求項１８から２７のいずれかの哺乳類細胞。
【００９２】
請求項２９。対象中のコレステロール減少に使用するための、請求項１８から２８のいずれかの哺乳類細胞。
【００９３】
請求項３０。哺乳類細胞が、肝細胞、神経細胞、骨細胞、筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、免疫細胞、血球系細胞、およびそれらの幹細胞または前駆細胞から選択される、請求項１８から２９のいずれかの哺乳類細胞。
【００９４】
請求項３１。操作されたステロイド産生急性調節(StAR)タンパク質またはその一部;
および
コレステロールデヒドロゲナーゼ(CholD)、3-ケトステロイドΔ1-デヒドロゲナーゼ(Δ1-KstD)、無酸素性コレステロール代謝B酵素(acmB)、3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ(KshAB)、3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ2(HSD2)、P450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)の1つ以上を含むコレステロール分解タンパク質(CDP)を含む、哺乳類細胞。
【００９５】
請求項３２。StARタンパク質が配列番号７の残基63から188を含む、請求項３１の哺乳類細胞。
【００９６】
請求項３３。StARタンパク質が配列番号７の残基63から188の重複を含む、請求項３１または３２の哺乳類細胞。
【００９７】
請求項３４。StARタンパク質がTOMM20タンパク質の少なくとも一部を含む、請求項３１から３３のいずれかの哺乳類細胞。
【００９８】
請求項３５。CDPがP450を含む、請求項３１から３４のいずれかの哺乳類細胞。
【００９９】
請求項３６。CDPがP450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む、請求項３１から３５のいずれかの哺乳類細胞。
【０１００】
請求項３７。StARタンパク質およびCDPが少なくとも1つのミトコンドリアシグナリングタンパク質を含む、請求項３１から３６のいずれかの哺乳類細胞。

【０１０１】
請求項３８。細胞内のStARタンパク質およびCDPの全量の少なくとも10%がミトコンドリア膜に位置している、請求項３１から３７のいずれかの哺乳類細胞。
【０１０２】
請求項３９。StARタンパク質またはCDPが哺乳類細胞のゲノム内に組み込まれた遺伝子によりコードされている、請求項３１から３８のいずれかの哺乳類細胞。
【０１０３】
請求項４０。StARタンパク質またはCDPがゲノム外遺伝子によりコードされている、請求項３１から３９のいずれかの哺乳類細胞。
【０１０４】
請求項４１。高コレステロールを患うか、またはそれを発症するリスクにある対象の処置に使用するための、請求項３１から３９のいずれかの哺乳類細胞。
【０１０５】
請求項４２。対象中のコレステロール減少に使用するための、請求項３１から４０のいずれかの哺乳類細胞。
【０１０６】
請求項４３。哺乳類細胞が、肝細胞、神経細胞、骨細胞、筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、免疫細胞、血球系細胞、およびそれらの幹細胞または前駆細胞から選択される、請求項１８から２９のいずれかの哺乳類細胞。
【０１０７】
請求項４４。非天然の操作されたステロイド産生急性調節(StAR)タンパク質またはその一部を発現させること、および
コレステロールデヒドロゲナーゼ(CholD)、3-ケトステロイドΔ1-デヒドロゲナーゼ(Δ1-KstD)、無酸素性コレステロール代謝B酵素(acmB)、3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ(KshAB)、3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ2(HSD2)、P450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む1つ以上のコレステロール分解タンパク質(CDP)を発現させることを含む、
哺乳類細胞内でのコレステロール分解を向上する方法。
【０１０８】
請求項４５。StARタンパク質が配列番号７の残基63から188を含む、請求項４４の方法。
【０１０９】
請求項４６。StARタンパク質が配列番号７の残基63から188の重複を含む、請求項４４または４５の方法。
【０１１０】
請求項４７。StARタンパク質がTOMM20タンパク質の少なくとも一部を含む、請求項４４から４６のいずれかの方法。
【０１１１】
請求項４８。CDPがP450を含む、請求項４４から４７のいずれかの方法。
【０１１２】
請求項４９。CDPがP450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む、請求項４４から４８のいずれかの方法。
【０１１３】
請求項５０。StARタンパク質およびCDPが少なくとも1つのミトコンドリアシグナリングタンパク質を含む、請求項４４から４９のいずれかの方法。
【０１１４】
請求項５１。StARタンパク質およびCDPが細胞特異的プロモーター配列から発現する、請求項４４から５０のいずれかの方法。
【０１１５】
請求項５２。高コレステロールを患うか、またはそれを発症するリスクにある対象の処

置に使用するための、請求項４４から５１のいずれかの方法。
【０１１６】
請求項５３。高コレステロールである対象中のコレステロールの減少に使用するための、請求項４４から５２のいずれかの方法。
【０１１７】
請求項５４。細胞内のStARタンパク質およびCDPの全量の少なくとも約10%がミトコンドリア膜に位置している、請求項４４から５３のいずれかの方法。
【０１１８】
請求項５５。StARタンパク質またはCDPが哺乳類細胞のゲノム内に組み込まれた遺伝子から発現する、請求項４４から５４のいずれかの方法。
【０１１９】
請求項５６。StARタンパク質またはCDPがゲノム外遺伝子由来である、請求項４４から５４のいずれかの哺乳類細胞。
【０１２０】
請求項５７。高コレステロールを患うか、またはそれを発症するリスクにある対象の処置に使用するための、請求項４４から５６のいずれかの方法。
【０１２１】
請求項５８。対象中のコレステロール減少に使用するための、請求項４４から５７のいずれかの方法。
【０１２２】
請求項５９。細胞が、肝細胞、神経細胞、骨細胞、筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、免疫細胞、血球系細胞、およびそれらの幹細胞または前駆細胞から選択される、請求項４４から５８のいずれかの方法。
【０１２３】
請求項６０。コレステロールがLDLである、請求項４４から５９のいずれかの方法。
【０１２４】
請求項６１。コレステロールが7KCである、請求項４４から５９のいずれかの方法。
【０１２５】
請求項６２。少なくとも1つの改変細胞を患者に投与することを含む、高コレステロールを発症するリスクにあるか、またはそれを患う対象を処置する方法であって、
改変細胞が、非天然の操作されたステロイド産生急性調節(StAR)タンパク質またはその一部、および、
コレステロールデヒドロゲナーゼ(CholD)、3-ケトステロイドΔ1-デヒドロゲナーゼ(Δ1-KstD)、無酸素性コレステロール代謝B酵素(acmB)、3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ(KshAB)、３β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ2(HSD2)、P450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む1つ以上のコレステロール分解タンパク質(CDP)を含む、方法。
【０１２６】
請求項６３。StARタンパク質が配列番号７の残基63から188を含む、請求項６２の方法。
【０１２７】
請求項６４。StARタンパク質が配列番号７の残基63から188の重複を含む、請求項６２または６３の方法。
【０１２８】
請求項６５。StARタンパク質がTOMM20タンパク質の少なくとも一部を含む、請求項６２から６４のいずれかの方法。
【０１２９】
請求項６６。CDPがP450を含む、請求項６２から６５のいずれかの方法。
【０１３０】
請求項６７。CDPがP450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク

質(P450-FdxR-Fdx)を含む、請求項６２から６６のいずれかの方法。
【０１３１】
請求項６８。StARタンパク質およびCDPが少なくとも1つのミトコンドリアシグナリングタンパク質を含む、請求項６２から６７のいずれかの方法。
【０１３２】
請求項６９。StARタンパク質およびCDPが細胞特異的プロモーター配列から発現する、請求項６２から６８のいずれかの方法。
【０１３３】
請求項７０。高コレステロールである対象中のコレステロールの減少に使用するための、請求項６２から７６のいずれかの方法。
【０１３４】
請求項７１。細胞内のStARタンパク質およびCDPの全量の少なくとも約10％がミトコンドリア膜に位置している、請求項６２から７１のいずれかの方法。
【０１３５】
請求項７２。StARタンパク質またはCDPが哺乳類細胞のゲノム内に組み込まれた遺伝子から発現する、請求項６２から７２のいずれかの哺乳類細胞。
【０１３６】
請求項７３。StARタンパク質またはCDPがゲノム外遺伝子由来である、請求項６２から７２のいずれかの方法。
【０１３７】
請求項７４。患者の総コレステロールが200 mg/dlより高い、請求項６２から７３のいずれかの方法。
【０１３８】
請求項７５。患者が非アルコール性脂肪性肝疾患を患っている、請求項６２から７４のいずれかの方法。
【０１３９】
請求項７６。患者が非アルコール性脂肪性肝炎を患っている、請求項６２から７４のいずれかの方法。
【０１４０】
請求項７７。改変細胞が、肝細胞、神経細胞、骨細胞、筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、免疫細胞、血球系細胞、およびそれらの幹細胞または前駆細胞由来である、請求項６２から７６のいずれかの方法。
【０１４１】
請求項７８。患者血中の総コレステロール濃度を5％より大きく減少させる、請求項６２から７７のいずれかの方法。
【０１４２】
請求項７９。少なくとも1つの非天然の操作されたステロイド産生急性調節(StAR)タンパク質またはその一部を哺乳類のミトコンドリア外膜に挿入することを含む、哺乳類のミトコンドリアの改変方法であって、
前記ミトコンドリアが、コレステロールデヒドロゲナーゼ(CholD)、3-ケトステロイドΔ1-デヒドロゲナーゼ(Δ1-KstD)、無酸素性コレステロール代謝B酵素(acmB)、3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ(KshAB)、3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ2(HSD2)、P450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む1つ以上のコレステロール分解タンパク質(CDP)を含むものである、方法。
【０１４３】
請求項８０。StARタンパク質が配列番号７の残基63から188を含む、請求項７９の方法。
【０１４４】
請求項８１。StARタンパク質が配列番号７の残基63から188の重複を含む、請求項７

９または８０の方法。
【０１４５】
請求項８２。StARタンパク質がTOMM20タンパク質の少なくとも一部を含む、請求項７９から８１のいずれかの方法。
【０１４６】
請求項８３。CDPがP450を含む、請求項７９から８２のいずれかの方法。
【０１４７】
請求項８４。CDPがP450-フェレドキシンレダクターゼ-フェレドキシン融合タンパク質(P450-FdxR-Fdx)を含む、請求項７９から８３のいずれかの方法。
【０１４８】
請求項８５。StARタンパク質およびCDPが少なくとも1つのミトコンドリアシグナリングタンパク質を含む、請求項７９から８４のいずれかの方法。
【０１４９】
請求項８６。StARタンパク質およびCDPが細胞特異的プロモーター配列から発現する、請求項７９から８５のいずれかの方法。
【０１５０】
請求項８７。高コレステロールを患うか、またはそれを発症するリスクにある対象の処置に使用するための、請求項７９から８６のいずれかの方法。
【０１５１】
請求項８８。高コレステロールである対象中のコレステロールの減少に使用するための、請求項７９から８７のいずれかの方法。
【０１５２】
請求項８９。細胞内のStARタンパク質およびCDPの全量の少なくとも約10%がミトコンドリア膜に位置している、請求項７９から８８のいずれかの方法。
【０１５３】
請求項９０。StARタンパク質またはCDPが哺乳類細胞のゲノム内に組み込まれた遺伝子から発現する、請求項７９から９０のいずれかの哺乳類細胞。
【０１５４】
請求項９１。StARタンパク質またはCDPがゲノム外遺伝子由来である、請求項７９から８９のいずれかの方法。
【０１５５】
請求項９２。高コレステロールを患うか、またはそれを発症するリスクにある対象の処置に使用するための、請求項７９から９１のいずれかの方法。
【０１５６】
請求項９３。高コレステロールである対象中のコレステロールの減少に使用するための、請求項７９から９２のいずれかの方法。
【０１５７】
請求項９４。細胞が、肝細胞、神経細胞、骨細胞、筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、免疫細胞、血球系細胞、およびそれらの幹細胞または前駆細胞から選択される、請求項７９から９３のいずれかの方法。
【０１５８】
複数の実施形態を開示したが、本発明のさらに他の実施形態が、以下の詳細な記述から当業者に明らかになると思われる。明らかになった場合は、本発明は、本発明の精神および範囲からまったく逸脱することなく、様々な明白な側面で修正することができる。したがって、詳細な記述は、本質的に理解を助けるためのもので、限定的ではないとされるべきである。
【０１５９】
本明細書で開示するすべての参照は、特許または非特許に関わらず、それぞれが引用された時点でその全体が含まれていたかのように、本明細書に参照により援用される。参照と明細書が対立する場合、定義を含む本明細書が制御する。

【０１６０】

本開示はある程度詳細に記載されているものの、開示が実例を介して作成されたことは理解され、詳細または構成の変更は、添付の請求項で定義される開示の精神から逸脱することなく行いうる。

【図面】

【図１】

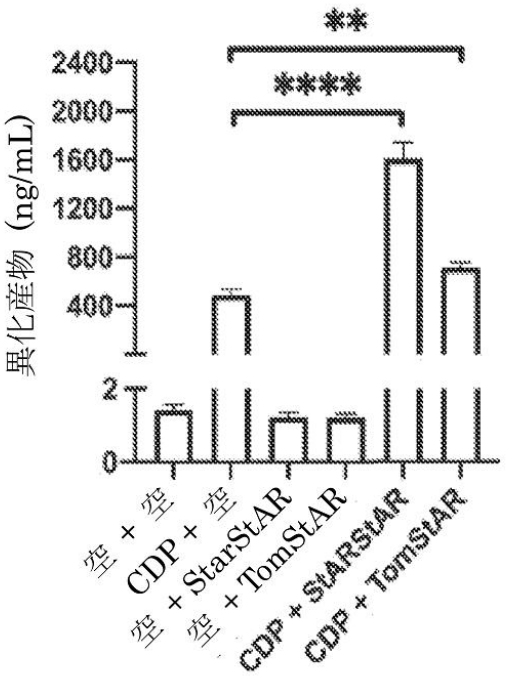
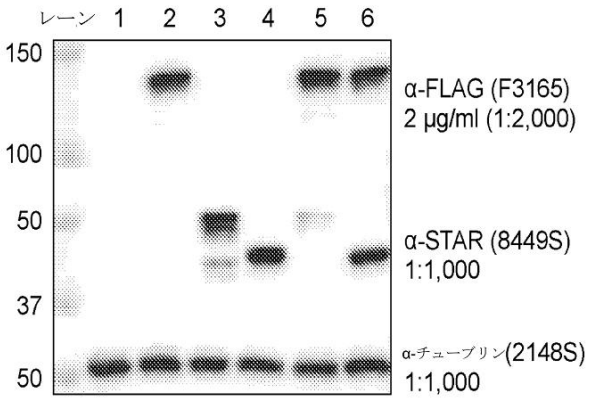


FIG. 1

【図２】



レーン 1: 空 + 空
レーン 2: CDP + 空
レーン 3: 空 + StARStAR
レーン 4: 空 + TomStAR
レーン 5: CDP + StARStAR
レーン 6: CDP + TomStAR

FIG. 2

【図３】

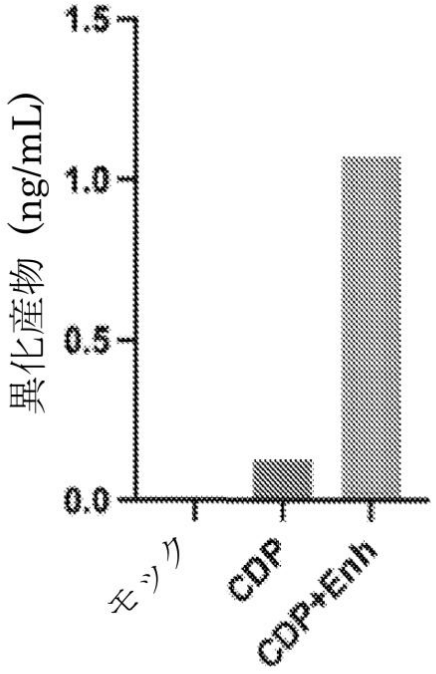


FIG. 3

【図４】

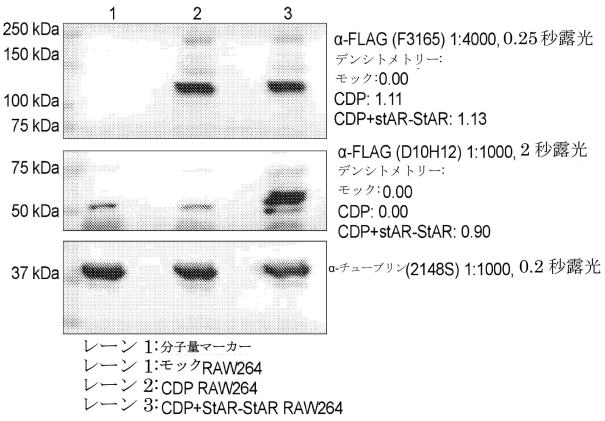


FIG. 4

【図５－１】

P450-FdxR-Fdx (w/Flag タグは太字)のヒトタンパク質配列 配列番号１

MLAKGLPPRSVLVKGCQTFLSAPREGLGRLRVPTGEGAGISTRSPRPFNEIPSPGDNGWLNLYH
FWRETGTHKVHLHHVQNFQKYGPIYREKLGNVESVYVIDPEDVALLFKSEGPNPERFLIPPWVAY
HQYYQRPIGVLLKKSAAWKKDRVALNQEVMAPEATKNFLPLLDAVSRDFVSVLHRRIKKAGSGNY
SGDISDDLFRFAFESITNVIFGERQGMLEEVVNPEAQRFIDAIYQMFHTSVPMLNLPPDLFRLFRTK
TWKDHVAAWDVIFSKADIYTQNFYWELRQKGSVHHDYRGILYRLLGDSKMSFEDIKANVTEMLA
GGVDTTSMTLQWHLYEMARNLKVQDMLRAEVLAARHQAQGDMATMLQLVPLLKASIKETLRLHP
ISVTLQRYLVNDLVLRDYMIPAKTLVQVAIYALGREPTFFFDPENFDPTRWLSKDKNITYFRNLGFG
WGVRQCLGRRIAELEMTIFLINMLENFRVEIQHLSDVGTTFNLILMPEKPISFTFWPFNQEATQQT
DGTSSTQEKTPQICVVGSGPAGFYTAQHLLKHPQAHVDIYEKQPVPFGLVRFGVAPDHPEVKNVI
NTFTQTAHSGRCAFWGNVEVGRDVTVPELREAYHAVVLSYGAEDHRALEIPGEELPGVCSARAF
VGWYNGLPENQELEPDLSCDTAVILGQGNVALDVARILLTPPEHLERTDITKAALGVLRQSRVKTV
WLVGRRGPLQVAFTIKELREMIQLPGARPILDPVDFLGLQDKIKEVPRPRKRLTELLLRTATEKPGP
AEAARQASASRAWGLRFFRSPQQVLPSPDGRRAAGVRLAVTRLEGVDEATRAVPTGDMEDLPC
GLVLSSIGYKSRPVDPSVPFDSKLGVIPNVEGRVMDVPGLYCSGWVKRGPTGVIATTMTDSFLTG
QMLLQDLKAGLLPSGPRPGYAAIQALLSSRGVRPVSFSDWEKLDAEEVARGQGTGKPREKLVDP
QEMLRLLGHTDGASSSSEDKITVHFINRDGETLTTKGKVGDSLLDVVVENNLDIDGFGACEGTLA
CSTCHLIFEDHIYEKLDAITDEENDMLDLAYGLTDRSRLGCQICLTKSMDNMTVRVPETVADARQS
IDVGKTSDYKDDDDK

コレステロールデヒドロゲナーゼ, CholD 配列番号２

MPTLYKKAGFQLGSLENLYFQGHHHHHHGTMAGFLNCCPGCCMEPGASDYKDDDDKMLRRMG
DASLTTELGRVLVTGGAGFVGANLVTTLLDRGHWVRSFDRAPSLLPAHPQLEVLQGDITDADVCA
AAVDGIDTIFHTAAIIELMGGASVTDEYRQRSFAVNVGGTENLLHAGQRAGVQRFVYTSSNSVVM
GGQNIAGGDETLPYTDRFNDLYTETKVVAERFVLAQNGVDGMLTCAIRPSGIWGNGDQTMFRKL
FESVLKGHVKVLVGRKSARLDNSYVHNLIHGFILAAAHLVPDGTAPGQAYFINDAEPINMFEFARP
VLEACGQRWPKMRISGPAVRWVMTGWQRLHFRFGFPAPLLEPLAVERLYLDNYFSIAKARRDLG
YEPLFTTQQALTECLPYYVSLFEQMKNEARAEKTAATVKPG

3-ケトステロイドΔ1-デヒドロゲナーゼ, Δ1-KstD 配列番号３

MQDWTSECDVLVVGSGGGALTGAYTAAAQGLTTIVLEKTDRFGGTSAYSGASIWLPGTQVQERA
GLPDSTENARTYLRALLGDAESERQDAYVETAPAVVALLEQNPNIEFEFRAFPDYYKAEGRMDTG
RSINPLDLDPADIGDLAGKVRPELDQDRTGQDHAPGPMIGGRALIGRLLAAVQSTGKAELRTESVL
TSLIVEDGRVVGAEVESGGETQRIKANRGVLMAAGGIEGNAEMREQAGTPGKAIWSMGPFGANT
GDAISAGIAVGGATALLDQAWFCPGVEQPDGSAAFMVGVRGGLVVDSAGERYLNESLPYDQFG
RAMDAHDDNGSAVPSFMIFDSREGGGLPAICIPNTAPAKHLEAGTWVGADTLEELAAKTGLPADA
LRSTVEKFNDAAKLGVDEEFHRGEDPYDAFFCPPNGGANAALTAIENGPFYAARIVLSDLGTKGG
LVTDVNGRVLRADGSAIDGLYAAGNTSASLSGRFYPGPGVPLGTAMVFSYRAAQDMAK

無酸素性コレステロール代謝 B 酵素, acmB 配列番号４

MPTLYKKAGFQLGSGTENLYFQGTMSIETNTYDVIVVGSGAGAMLAAARAHDLGLSVLVVEKSDK
YGGTSAVSGGAVWIPNNSQMQIKDSFDEALTYLKAATQGLVAEDRLLAYLESAPQMVEYINANMT
LQYFPCHRYPDYYQHLPGAKPGGRTMEPMLFDAALLGDEFANLRMAYTGTLLMGKASMTATEA
HVMLAKEPGWMLQVIKSLGRYYLDLPWRLKSRHDRKRGLGNAMAAGLRHALLERKVPLWLNTP
FESLITEGAENKRVTGIVVKRNGQTLQLTARRGVVLGAGGFERNQQMREQYLPKPTNAAWSATP
PHNTGDTIRAAMDIGARAELMDWAWWVPSIHVPGEAAQTGLFAERNLPGCIVVNGKGQRFINEA
SPYLEFGAAMYENHARSGSAVPAWLIFDGKFRYNYPMGPLMPGQIQPDRKAWLGKVYWRDDTL
EGLAKQIGVDAAGLKQSVELNNQYAQDGKDREFDKGGNVFDRYYGDYNVKPNPCLAPIGKPPYY
AMRVDAGDIGTKGGLLTDKDARVLDESDRPIEGLYCIGNNSASVMGKAYPGAGGTLGPAMTFGF
RAANHIAASKYPYDVPDYAG

FIG. 5

【図５－２】

3-ケトステロイド9α-ヒドロキシラーゼ, KshAB 配列番号５

MAPYSLLVTRLQKALGVRQYHVASVLCQRAKVAMSDYKDDDDKGGGGSMSIDTARSGSDDDVE
IREIQAAAAPTRFARGWHCLGLLRDFQDGKPHSIEAFGTKLVVFADSKGQLNVLDAYCRHMGGD
LSRGEVKGDSIACPFHDWRWNGKGKCTDIPYARRVPPIAKTRAWTTLERNGQLYVWNDPQGNP
PPEDVTIPEIAGYGTDEWTDWSWKSLRIKGSHCREIVDNVVDMAHFFYIHYSFPRYYFKNVFEGHT
ATQYMHSTGREDVISGTNYDDPNAELRSEATYFGPSYMIDWLESDANGQTIETILINCHYPVSNN
EFVLQYGAIVKKLPGVSDEIAAGMAEQFAEGVQLGFEQDVEIWKNKAPIDNPLLSEEDGPVYQLR
RWYQQFYVDVEDITEDMTKRFEFEIDTTRAVASWQKEVAENLAKQAEGSTATPGSGATNFSLLK
QAGDVEENPGPMAPYSLLVTRLQKALGVRQYHVASVLCQRAKVAMSGYPYDVPDYAGGGGSM
TAVQAPVTSRATVLTVSAVVQETADAVSLVFDVPDDRREDFTYRPGQFLTLRIPSDRTGSVARCY
SLASSPFTGEPPKVTVKRTAGGYGSNWLCDNIVAGRSIEVLPPAGVFTPADLTEKLVLFAGGSGIT
PVMSILESALHSGNRDVVLIYGNRDEKSVIFAEKLRELAARHAGALTVVHWLESVQGLPSPQQLAT
LISPFADHRAYMCGPGPFMDTVREGLLLAGVPKDRIHAEVFTSLSGDPFADVPLVEIDESDADATS
ATVQLDGEEHDLVWPRSATLVDVMLSKGLDVPYSCREGECGSCACTVVEGDVDSLPSAILDEED
IANGYVLACQARPKSDHVRIEF

3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ 2, HSD2 配列番号６

MGWSCLVTGAGGLLGQRIVRLLVEEKELKEIRALDKAFRPELREEFSKLQNRTKLTVLEGDILDEP
FLKRACQDVSVVIHTACIIDVFGVTHRESIMNVNVKGTQLLLEACVQASVPVFIYTSSIEVAGPNSY
KEIIQNGHEEEPLENTWPTPYPYSKKLAEKAVLAANGWNLKNGDTLYTCALRPTYIYGEGGPFLS
ASINEALNNNGILSSVGKFSTVNPVYVGNVAWAHILALRALRDPKKAPSVRGQFYYISDDTPHQSY
DNLNYILSKEFGLRLDSRWSLPLTLMYWIGFLLEVVSFLLSPIYSYQPPFNRHTVTLSNSVFTFSYK
KAQRDLAYKPLYSWEEAKQKTVEWVGSLVDRHKETLKSKTQ

ヒトStAR タンパク質配列 配列番号７

MLLATFKLCAGSSYRHMRNMKGLRQQAVMAISQELNRRALGGPTPSTWINQVRRRSSLLGSRLE
ETLYSDQELAYLQQGEEAMQKALGILSNQEGWKKESQQDNGDKVMSKVVPDVGKVFRLEVVVD
QPMERLYEELVERMEAMGEWNPNVKEIKVLQKIGKDTFITHELAAEAAGNLVGPRDFVSVRCAKR
RGSTCVLAGMATDFGNMPEQKGVIRAEHGPTCMVLHPLAGSPSKTKLTWLLSIDLKGWLPKSIIN
QVLSQTQVDFANHLRKRLESHPASEARC.

ヒトTOMM20 タンパク質配列 配列番号８

MVGRNSAIAAGVCGALFIGYCIYFDRKRRSDPNFKNRLRERRKKQKLAKERAGLSKLPDLKDAEA
VQKFFLEEIQLGEELLAQGEYEKGVDHLTNAIAVCGQPQQLLQVLQQTLPPPVFQMLLTKLPTISQ
RIVSAQSLAEDDVE

ヒトTom/Star 融合タンパク質配列(Tom 配列は太字; 下線はリンカー配列) 配列番号９

**MVGRNSAIAAGVCGALFIGYCIYFDRKRRSDPNFKNRLRERRKKQKLAKERAGLSKLPDLKDA
EAVQKFFLEEIQLGEELLAQGEYEKGVDHLTNAIAVCGQPQQLLQVLQQTLPPPVFQMLLTKLP
TISQRIVSAQSLAEDDVE**GSDDDDKLEETLYSDQELAYLQQGEEAMQKALGILSNQEGWKKESQ
QDNGDKVMSKVVPDVGKVFRLEVVVDQPMERLYEELVERMEAMGEWNPNVKEIKVLQKIGKDT
FITHELAAEAAGNLVGPRDFVSVRCAKRRGSTCVLAGMATDFGNMPEQKGVIRAEHGPTCMVLH
PLAGSPSKTKLTWLLSIDLKGWLPKSIINQVLSQTQVDFANHLRKRLESHPASEARC

ヒトStAR/StAR 融合タンパク質配列（下線はリンカー配列)配列番号１０

MLLATFKLCAGSSYRHMRNMKGLRQQAVMAISQELNRRALGGPTPSTWINQVRRRSSLLG
SRLEETLYSDQELAYLQQGEEAMQKALGILSNQEGWKKESQQDNGDKVMSKVVPDVGKVF
RLEVVVDQPMERLYEELVERMEAMGEWNPNVKEIKVLQKIGKDTFITHELAAEAAGNLVGP
RDFVSVRGSDDDDKLEETLYSDQELAYLQQGEEAMQKALGILSNQEGWKKESQQDNGDKV
MSKVVPDVGKVFRLEVVVDQPMERLYEELVERMEAMGEWNPNVKEIKVLQKIGKDTFITHE
LAAEAAGNLVGPRDFVSVRCAKRRGSTCVLAGMATDFGNMPEQKGVIRAEHGPTCMVLHP
LAGSPSKTKLTWLLSIDLKGWLPKSIINQVLSQTQVDFANHLRKRLESHPASEARC

FIG. 5 con't

【図５－３】

StAR1 mRNA 全配列 配列番号１１;ヌクレオチド配列の大文字は配列番号７の
下線のアミノ酸配列 63-285 に相当

gcagctgcgggactcagaggcgaagcttgaggggctcaggaaggacgaagaaccaccctgagagaagaggcagcagcagcggc
ggcagcagcagcggcagcgaccccaccactgccacatttgccaggaaacaATGctgctagcgacattcaagctgtgcgctgggagc
tcctacagacacatgcgcaacatgaaggggctgaggcaacaggctgtgatggccatcagccaggagctgaaccggagggccctggg
gggccccaccctagcacgtggattaaccaggttcggcggcggagctctctactcggttctcggCTGGAAGAGACTCTCTAC
AGTGACCAGGAGCTGGCCTATCTCCAGCAGGGGGAGGAGGCCATGCAGAAGGCCTTGGGC
ATCCTTAGCAACCAAGAGGGCTGGAAGAAGGAGAGTCAGCAGGACAATGGGGACAAAGTGA
TGAGTAAAGTGGTCCCAGATGTGGGCAAGGTGTTCCGGCTGGAGGTCGTGGTGGACCAGCC
CATGGAGAGGCTCTATGAAGAGCTCGTGGAGCGCATGGAAGCAATGGGGGAGTGGAACCC
CAATGTCAAGGAGATCAAGGTCCTGCAGAAGATCGGAAAAGATACATTCATTACTCACGAGC
TGGCTGCCGAGGCAGCAGGAAACCTGGTGGGGCCCCGTGACTTTGTGAGCGTGCGCTGTG
CCAAGCGCCGAGGCTCCACCTGTGTGCTGGCTGGCATGGCCACAGACTTCGGGAACATGCC
TGAGCAGAAGGGTGTCATCAGGGCGGAGCACGGTCCCACTTGCATGGTGCTTCACCCGTTG
GCTGGAAGTCCCTCTAAGACCAAACTTACGTGGCTACTCAGCATCGACCTCAAGGGGTGGCT
GCCCAAGAGCATCATCAACCAGGTCCTGTCCCAGACCCAGGTGGATTTTGCCAACCACCTG
CGCAAGCGCCTGGAGTCCCACCCTGCCTCTGAAGCCAGGTGTTGAagaccagcctgctgttcccaactg
tgcccagctgcactggtacacacgtcatcaggagaatccctactggaagcctgcaagtctaagatctccatctggtgacagtgggatgg
gtgggttcgtgtttagagtatgacactaggattcagattggtgaaagtttttagtaccaagaaaacagggatgaggctcttggattaaaagg
taacttcattcactgattagctatgacatgagggttcaggcccctaaaataattgtaaaacttttttctgggccctatgtacccacctaaaacc
atctttaaaatgctagtggctgatatgggtgtgggggatgctaaccacagggcctgagaagtctgctttatgggctcaagaatgccatgcg
ctggcagtacatgtgcacaaagcagaatctcagagggtctcctgcagcccctctgctcctcccggccgctgcacagcaacaccacagaa
caagcagcaccccacagtgggtgccttccagaaatatagtccaagctttctctgtggaaaaagacaaaactcattagtagacatgtttccct
attgctttcataggcaccagtcagaataaagaatcataattcacacaaacatcagtctttgttttaatattgtactgttaaaaaaatctatgcag
ctgggtgcagtggctcacgcctgtaatcccagcattttgggaggctgaggtaggcggatcacaaggtcaggagatcgagaccatcctgg
ccaacatggtgaaacccccgtctctactaaaaatacaaaaaattagctgggtgtggtggcgcaaacctgtagtcgtagctacttgggaggctg
aggcaggggaatcacttgaaccccggaggcggaggttgtagtgggccgagattgtgccactgcgctccagcgtgggcgacagagtga
gactccatctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaatctatgctagtagattacaacttcacactagaggagttctggacaaagctttaattagtc
aaactaaattaaggctcattaaaaggaaaggaactactgggaaattatgcaattcaataatttagactctgttaccaggatctttcataaaaa
tttaatttccataatcataacctaaatgagttcttaaagaattctataagcaatagctgattaatgggccctggaagatgaagattataactgttt
atttacctaattaaaaggaaaggcagtgccaaatatgagaggataaacaatattagttaacatttctgttatttatgatgccaattagtagtaa
gataattccacagctgtcaactttgtttggggctggcaacttctctgcttaaacaggctaaaagtttagtattctgggagaagtggctggaaga
agggggtaatatggtgaaagcaaattcccttcccaggagtcaagagaatttatgtgaggtggctcccgcctgtaatctcagcacttgggag
gccaaggcaggcaatcacctgagggcaggagaccagcctgactaacatggagaaacccccatctctactaaaaatac

【図５－４】

TOMM20 mRNA 全配列, CDS = 123-560 配列番号１２

ctttctgtgttcctggcccgcggccgtcgggtgtgagctgcgccgaccgtctgagggttcgtggcccaccgctccttcgcggtccctgccgc
caccgtccacgctcagcgttgtagagaa**agATGgtgggtcggaacagcgccatcgccgccggtgtatgcggggccctttttcatt**
gggtactgcatctacttcgaccgcaaaagacgaagtgaccccaacttcaagaacaggcttcgagaacgaagaaagaaaca
gaagcttgccaaggagagagctgggcttccaagttacctgaccttaaagatgctgaagctgttcagaagttcttccttgaaga
aatacagcttggtgaagagttactagctcaaggtgaatatgagaagggcgtagaccatctgacaaatgcaattgctgtgtggg
acagccacagcagttactgcaggtcttacagcaaactcttccaccaccagtgttccagatgcttctgactaagctcccaacaatt
agtcagagaattgtaagtgctcagagcttggctgaagatgatgtggaaTGAgaaacaaatgtcaacataataaaatctcagttaa
aaatattttaaaaattcttggtagttgagcagctctgggggaataagggcaaatatgcttgttatgaactacactgaaatctaccaaagttaat
gtttacttgtgtagatccatttgtctatttttatttttttcccagtgaaaagtgtattttgatagagaaactttcattctataaatacactatgagttacta
aaatatcatggatttgtttattcctgaaacatagttacatagttaaactgtacatatgacatggcttatgttaaaaatacccagtgctcagttttga
aagataggcaaaaaaaaaaaagtataggagaaactgaagaatgtacacttttttagagggcacattttgctgtaaatctggaaatttgata
gacttgactgtgtttgtgaaaactgagcattaaaggttttgattgatccttctttccatttaatctctgagacgtaaatatgtgaggtgtgctgctgt
gctgggttaacagcttccttcccttctgtgtagcagtcttgaaatgttctgtttaaatcagtaggcttaatgtgttctgggtatttatctcctgtatttta
aatatatgtagttgcaaatagcaccaggaattagatttctgtacaccccctaatctagcctgtgagctctgctagttaatgtgtgctcacttccct
ccatttgttacgtgagagaatgcgtctgctgatcactgaagtgtccctttagcttctgattcattgggttctgttgggcatctttaaatccacctaa
cctgaggaatgtatgtgggcaaccaggccctgcatttttttatattctgaatttgcatgcttgcctgacttagtatttctgaattgatgttttttttaatg
gtataactatcttgattttcactgaaattatatggttctgtcactactctgtaaattaatccgaaacttttaaggtaactgggatgatctgcttgtaaa
aatgcttgttgccttttgctttatcttcagtgtacctcctaatcctgcttcaacttgattatcttgtgaaacgatgagagtaagttgcaaccttgtgac
tgaaaactgaaaagagtggagcaggtgggacctcttattctcaaatagtgacatattctccgtagtcacagtttcagaactgagtaaggat
ccttggtactggtggcatctgttgaactgaggagcatttctcattgtaaagattgccttgttctgtctaaaagtctggagaaatcccaaagactt
ttcctatgtactaggcattttattttgattgacttacaaactcttcttaatcattatcaatctcggttttttgtggtgcagtggaaggagaaatagtct
agtttctgcctctgattagccgcacagccttgaacaaatcacatttcatctttgaacttacctctactgttagactaggcgactcacatttgagga
ctttctcgggtatcttgagggtttgtgatcctgaaccctaaacagtgctttttgttacacaggagggctttttttgggggatgaccagtacaga
catgccagttagttttactagtgggatcccaaatccaaagcagtgtagtggtgattggtcagtgactaaccaggcagctaagaagtcttagg
cagcagcccagacatgtatagaggggcagttagaggggagaacaggggtgggaaaggggagcaaggggcagatagctcagcaagga
aagaatgggctcagaaaaaggagggctggctggaggagtgaggggcagcttaagtttggggagggtagaaacgccgttcctgggga
actggagtgcagtatgagctgggtgtcacttggctctgaacatactggctttgctgtaatgcttgaaaaggcgttggtatcttcattttacagttc
attaacccaagtacgttttcttatttaaatgacaacttggtgcttaaaatgaggtaccacttttaaagctagctgtgtcgagttaaagaaaaa
atcagcagttttttctcccagaaatgtaattgccaaacactattcatccccatcttaagttttacaagggtgatgtaatcagcttgttgtagtgatgct
ggccaaatggtgctcagcaggtgagaacaaaaaaacccagatctcagtgaactaatacacagctgagcgtttccatgtgctaatgttg
cacacttactaaaaaacttggaaatggaaaataatgtattagtgcaacagttgatgtgcttctttgggcaaagatatagttttgttccacaattt
gtacttaaaagcgaaagaacattgaaaacatagacttactggctgtagcaatgctggcctgttaactgataactagaacttaggttcacgttt
atgtaaagtgtgtaaaacctagtagagctgcatagtcggcactcagtaaatgtttggttcctttgcccctggtaagtttatttttaccatcctccc
acctgccattctgactttattaaatcaacatgtggaccagagtgttaatgagatgttattgcagaagagattgagaaaattggtatatcatgca
gataacatacaaaatcttttgtaacgtaaaaaatgcagttttattattgcttgtgcctcaactgtttaagtgaatatttaaagggcttggagaaaa

FIG. 5 con't

FIG. 5 con't

【配列表】

<u>20235528000000001.app</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/62389

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - C12N 15/52, A61K 35/12, A61K 48/00, C12N 9/02 (2022.01)
CPC - C12N 15/52, A61K 35/12, A61K 48/00, C12N 9/0004, C12Y 101/03006

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,903,183 B1 (STOCCO et al.) 7 June 2005 (07.06.2005) Abstract; Col. 4, ln 1-21; Col. 5, ln 45-67; Col. 6, ln 1-2	1-3, 18-20, 31-33
Y	US 2020/0179452 A1 (UNIVERSITY OF SOUTH ALABAMA FOUNDATION FOR RESEARCH AND COMMERCIALIZATION) 11 June 2020 (11.06.2020) Abstract; para [0007]; claim 7	1-3, 18-20, 31-33
Y	US 2006/0110730 A1 (BOSE et al.) 25 May 2006 (25.05.2006) para [0007]; para [0010]	3, 20, 33

☐ 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	Date of mailing of the international search report
14 March 2022	MAR 28 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 Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/62389

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] 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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.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/US 21/62389

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.: 4-17, 21-30, 34-43, 47-61, 65-78, 82-94
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:
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 searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-3,18-20 and 31-33 directed to a nucleic acid composition comprising a coding sequence for Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) protein; and a coding sequence for a cholesterol degrading protein (CDP).

Group II: Claims 44-46, 62-64 and 79-81, directed to a method of enhancing cholesterol degradation in a mammalian cell comprising expressing non-native engineered StAR protein; and expressing one or more of a CDP.

----------continued on extra sheet----------

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying 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.:
1-3, 18-20, 31-33

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/US 21/62389

--continued from- Box III: Observations where unity of invention is lacking:

The inventions listed as Groups I and II 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:

Special Technical Features

Group I requires a nucleic acid composition comprising a coding sequence for an engineered StAR protein; and a coding sequence for a CDP, not required by Group II.

Group II requires a mammalian cell comprising a coding sequence for an engineered StAR protein; and a coding sequence for a CDP, not required by Group I.

Common Technical Features

The features shared by the inventions listed as Group I & II a coding sequence for Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) protein; and a coding sequence for a cholesterol degrading protein (CDP).

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by US 6,903,183 B1 to Stocco et al. (hereinafter 'Stocco') in view of US 2020/0179452 A1 to University of South Alabama Foundation For Research And Commercialization (hereinafter 'USAFRC').

Stocco discloses a coding sequence for Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) protein (Abstract- "Compositions and methods relating to the regulation of transport of cholesterol into the mitochondria of a cell and, therefore, for the regulation of steroidogenesis are provided. Compositions include nucleic acid molecules encoding a steroidogenic acute regulatory protein (StAR), StAR protein"); but does not teach a coding sequence for a cholesterol degrading protein (CDP).
However, Stocco teaches that the disclosed protein can be used for regulating cholesterol (Abstract).
USAFRC discloses expressing a cholesterol degrading protein (Abstract- " subjects may be administered one or more mammalian cells modified to express at least one sterol degrading enzyme derived from a bacterium"; claim 7- "wherein the protein is selected from cholesterol dehydrogenase (CholD)"). Since USAFRC teaches that the disclosed enzymes can be used for regulating cholesterol (para [0007]- "herein are methods to humanize and express the enzymes that aid in catalyzing cholesterol degradation"), it would have been obvious to one of ordinary skill in the art, to have combined the teachings of Stocco with USAFRC and use a combination of a coding sequence for StAR protein; and a coding sequence for a CDP, to achieve a desired cholesterol regulation, using routine experimentation.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I and II therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued)
Claims 4-17, 21-30, 34-43, 47-61, 65-78 and 82-94 are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*9/00 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/00	
Ｃ０７Ｋ	*19/00 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00	
Ｃ１２Ｎ	*15/88 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/88 Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/86 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/86 Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	
Ｃ１２Ｑ	*1/02 (2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/02	
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｐ	*3/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/06	
Ａ６１Ｋ	*35/12 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/12	
Ａ６１Ｋ	*35/407 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/407	
Ａ６１Ｋ	*35/30 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/30	
Ａ６１Ｋ	*35/32 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/32	
Ａ６１Ｋ	*35/34 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/34	
Ａ６１Ｋ	*35/44 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/44	
Ａ６１Ｋ	*35/15 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/15	
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17	
Ａ６１Ｐ	*1/16 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16	
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00 １０５	
Ａ６１Ｋ	*38/44 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/44	

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,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士　及川 健太郎

(72)発明者　トポルス，ムーラッド
カナダ、エム１アール・３ジー８、オンタリオ、スカボロー、アイバンホー・コート１

(72)発明者　リーズン
アメリカ合衆国１３２０６ニューヨーク州シラキュース、ピーオー・ボックス５５８

(72)発明者　ペルジガン デ オリヴェイラ，ギリエルメ シェルマン
ブラジル２２４７１－１５０リオ・デ・ジャネイロ州フア・アウミランチ・ギロベル１１０／４０８

(72)発明者　リディラ，マルク
アメリカ合衆国１３０３１ニューヨーク州カミラス、レブハーン・ドライブ１２３

(72)発明者　マッケンジー－リウ，デイビッド
アメリカ合衆国１３２１０ニューヨーク州シラキュース、イースト・ジェネシー・ストリート２４０６

(72)発明者　ストロー，ギャレット
アメリカ合衆国１３６５９ニューヨーク州ロレイン、カウンティ・ロード９３、２０６７０

Ｆターム（参考）　4B063 QA20 QQ02 QQ08 QQ13 QQ76 QR72 QR77 QR80 QS36 QS38 QX01
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA27 CA28 CA44 CA46
4C084 AA02 AA13 BA02 DC23 NA14 ZB21 ZC33
4C087 AA01 AA02 BB33 BB37 BB45 BB46 BB47 BB52 BB63 BB65 CA12 NA14 ZB21 ZC33
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA40 DA89 EA20 EA50 FA74