



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0107243
(43) 공개일자 2022년08월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) C07K 14/775 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7021579
(22) 출원일자(국제) 2020년11월25일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년06월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/070822
(87) 국제공개번호 WO 2021/108809
국제공개일자 2021년06월03일
(30) 우선권주장
62/939,999 2019년11월25일 미국(US)

(71) 출원인
코넬 유니버시티
미국 뉴욕 14850 이타카 스위트 310 파인 트리 로
드 395 옛 코넬 유니버시티(씨티엘) 센터 포 테크
놀로지 라이선싱
(72) 발명자
크리스탈, 로널드 지.
미국 10021 뉴욕주 뉴욕 이스트 70티에이치 스트
리트 435 아파트먼트 34비
카민스키, 스티븐 엠.
미국 10471 뉴욕주 브롱스 텔라필드 애비뉴 5204
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) 발명의 명칭 APOE 유전자 요법

(57) 요약

위치 112, 136, 또는 158 중 적어도 하나에서 아르기닌 이외의 잔기를 갖는 포유류 아포지질단백질 E를 코딩하지
만, R112, R136 및 R158을 갖는 포유류 아포지질단백질 E 또는 C112, R136 및 C158을 갖는 포유류 아포지질단백
질 E는 아니거나, 또는 APOE4에 결합하거나 또는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 대한 APOE의 결합을 파괴하
는 항체를 코딩하는 발현 카세트를 포함하는 유전자 요법 벡터, 및 벡터를 사용하는 방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 48/0075 (2013.01)

A61P 25/28 (2018.01)

C07K 14/775 (2013.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 2310/141 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

(72) 발명자

스타일스, 케이티

미국 10461 뉴욕주 브롱스 에스플라네이드 애비뉴
1005 아파트먼트 4이

손디, 돌란

미국 10023 뉴욕 웨스트 엔드 애비뉴 310 아파트먼트 14비

명세서

청구범위

청구항 1

위치 112, 136, 또는 158 중 적어도 하나에서 아르기닌 이외의 잔기를 갖는 포유류 아포지질단백질 (apolipoprotein) E를 코딩하지만, R112, R136 및 R158을 갖는 포유류 아포지질단백질 E 또는 C112, R136 및 C158을 갖는 포유류 아포지질단백질 E는 아니거나, 또는 APOE4에 결합하거나 또는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 대한 APOE의 결합을 파괴하는 항체를 코딩하는 발현 카세트를 포함하는 유전자 요법 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아포지질단백질 E가 인간 아포지질단백질 E인, 유전자 요법 벡터.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 아포지질단백질 E의 아르기닌 이외의 잔기가 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 시스테인, 또는 글루타민인, 유전자 요법 벡터.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포지질단백질 E의 위치 112가 시스테인을 갖는 것인, 유전자 요법 벡터.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포지질단백질 E의 위치 136이 아르기닌 또는 세린을 갖는 것인, 유전자 요법 벡터.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포지질단백질 E의 위치 158이 아르기닌 또는 시스테인을 갖는 것인, 유전자 요법 벡터.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포지질단백질 E의 위치 112, 136 또는 158 중 2 개가 아르기닌을 갖는 것인, 유전자 요법 벡터.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포지질단백질 E의 위치 112가 아르기닌을 갖지 않는 것인, 유전자 요법 벡터.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포지질단백질 E의 위치 136이 아르기닌을 갖지 않는 것인, 유전자 요법 벡터.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아포지질단백질 E의 위치 158이 아르기닌을 갖지 않는 것인, 유전자 요법 벡터.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 유전자 요법 벡터인, 유전자 요법 벡터.

청구항 12

제11항에 있어서, 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스(AAV), 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터인, 유전자 요법 벡터.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 바이러스 유전자 요법 벡터가 rAAV 벡터인, 유전자 요법 벡터.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 AAV 벡터가 위형화된 것인, 유전자 요법 벡터.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 AAV 벡터가 AAVrh.10, AAV8, AAV9, AAV5, AAVhu.37, AAVhu.20, AAVhu.43, AAVhu.8, AAVhu.2, 또는 AAV7 캡시드로 위형화된 것인, 유전자 요법 벡터.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 AAV 벡터가 AAVrh.10, AAV8, 또는 AAV5로 위형화된 것인, 유전자 요법 벡터.

청구항 17

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 벡터가 AAV2, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9 또는 AAVrh.10인, 유전자 요법 벡터.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, APOE4 mRNA의 억제를 위해 APOE4에 상응하는 RNAi 서열을 갖는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는, 유전자 요법 벡터.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열이 제2 프로모터에 연결된 것인, 유전자 요법 벡터.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 제2 프로모터가 PolIII 프로모터인, 유전자 요법 벡터.

청구항 21

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNAi가 복수의 miRNA 서열을 포함하는 miRNA를 포함하는 것인, 유전자 요법 벡터.

청구항 22

제18항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNAi가 복수의 siRNA 서열을 포함하는 siRNA를 포함하는 것인, 유전자 요법 벡터.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 유전자 요법 벡터를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 벡터가 바이러스 벡터인, 약제학적 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 벡터가 rAAV 벡터인, 약제학적 조성물.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 벡터의 양이 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{16} 게놈 카피인, 약제학적 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 유전자 요법 벡터를 포함하는 유효량의 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 알츠하이머병을 예방, 억제 또는 치료하는 방법.

청구항 28

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 유전자 요법 벡터를 포함하는 유효량의 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 인지 저하를 예방 또는 억제하는 방법.

청구항 29

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 유전자 요법 벡터를 포함하는 유효량의 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 APOE4 발현과 연관된 질환을 예방, 억제 또는 치료하는 방법.

청구항 30

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 유전자 요법 벡터를 포함하는 유효량의 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 지질 장애를 예방, 억제 또는 치료하는 방법.

청구항 31

제27항, 제28항, 제29항, 또는 제30항에 있어서, 상기 포유동물이 E2/E4 이형접합체, E4/E4 동형접합체 또는 E3/E4 이형접합체인, 방법.

청구항 32

제27항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물이 인간인, 방법.

청구항 33

제27항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물을 전신으로 투여하는 것인, 방법.

청구항 34

제27항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물을 주사하는 것인, 방법.

청구항 35

제27항 내지 제32항 및 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물을 중추신경계에 투여하는 것인, 방법.

청구항 36

제27항 내지 제32항 및 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물을 뇌에 투여하는 것인, 방법.

청구항 37

제27항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 카테터를 이용하여 조성물을 투여하는 것인, 방법.

청구항 38

제27항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 지속 방출 조성물인, 방법.

청구항 39

제27항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터가 C112, S136 및 R158을 갖거나 또는 C112, S136 및 C158을 갖는 아포지질단백질 E를 암호화하는 것인, 방법.

청구항 40

제27항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터가 APOE4 mRNA의 억제를 위해 APOE4에 상응하는 RNAi 서

열을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 41

제27항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물에게 APOE4 mRNA의 억제를 위해 APOE4에 상응하는 RNAi 서열을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 조성물을 추가로 투여하는 것인, 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 제2 조성물이 리포솜을 포함하는 것인, 방법.

청구항 43

제41항에 있어서, 상기 제2 조성물이 나노입자를 포함하는 것인, 방법.

청구항 44

제27항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물에게 항-헤파란 항체 또는 APOE4에 결합하거나 또는 헤파란 술페이트 프로테오글리칸에 대한 APOE의 결합을 파괴하는 항체, 또는 항체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 조성물을 추가로 투여하는 것인, 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 항체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 46

제41항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 조성물을 전신으로 투여하는 것인, 방법.

청구항 47

제41항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 조성물을 국부로 투여하는 것인, 방법.

청구항 48

제27항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터가 AAV 벡터인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2019년 11월 25일에 출원된 미국 출원 번호 제62/939999호의 출원일에 대한 이익을 주장하며, 이의 개시내용이 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 알츠하이머병(AD)은 500 만명의 미국인에게 직접적으로 영향을 미치며 유병률 및 경제적 영향이 빠르게 증가하고 있다. 기존 약물은 기저 질환 과정에 거의 영향을 미치지 않으며 현재 이용가능한 예방 요법은 없다. 변이체 APOE4의 유전은 AD 발병에 대한 높은 위험을 전달하는 반면, APOE2 유전자의 유전은 보호되어, AD 발병 위험을 ~50%까지 감소시키고 발병 연령을 지연시킨다. APOE4는 AD에서 뇌 아밀로이드 부하 증가 및 더 큰 기억 손상과 연관되어 있다. 역으로, APOE2는 이들 효과를 약화시킨다. 이전 연구는 인간 APOE4를 발현하는 뮤린 모델의 CNS에 인간 APOE2 코딩 서열의 아데노 연관 바이러스(AAV) 유전자 전달이 아밀로이드-β 펩티드의 양 및 아밀로이드 부하를 감소시킴을 나타내었다(Zhao 등 2016). 인간에서, E4/E4 동형접합 유전자형을 갖는 AD 발병의 교차비는 14.9이고 E2/E4 이형접합체에서 2.6으로 감소된다. 최근 보고서는 APOE4가 아밀로이드 생산을 촉진하는 데 역할을 하는 것 외에도 비정상적인 뇌 기능과 연관되어 있음을 시사하였다.

발명의 내용

[0004] 본 개시내용은 예를 들어, 지단백질 수용체, 예를 들어, LDLR에 결합하거나, 또는 헤파란 술페이트 프로테오글

리칸(HSPG)에 결합하는 영역, 예를 들어, 위치 135 내지 151과 같은 영역에서 APOE4에 비해 보호되거나 또는 치환을 포함하는 포유류 아포지질단백질 E(APOE)을 코딩하는 발현 카세트를 포함하는 유전자 요법 벡터를 제공한다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터 내의 포유류 APOE는 위치 112, 136, 또는 158 중 적어도 하나에서 아르기닌, 히스티딘 또는 리신 이외의 잔기를 갖는다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터 내의 포유류 APOE는 위치 112 및 136에서 아르기닌 이외의 잔기를 갖는다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터 내의 포유류 APOE는 위치 136 및 158에서 아르기닌 이외의 잔기를 갖는다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터 내의 포유류 APOE는 위치 112, 136 및 158에서 아르기닌 이외의 잔기를 갖는다. 일 구현예에서, 아포지질단백질 E는 인간 아포지질단백질 E이다. 일 구현예에서, 아르기닌 이외의 잔기는 세린, 류신, 발린, 글리신, 이소류신, 알라닌, 트레오닌, 아스파라긴, 시스테인, 또는 메티오닌이다. 일 구현예에서, 아르기닌 이외의 잔기는 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 시스테인, 또는 글루타민이다. 일 구현예에서, 위치 112는 시스테인, 메티오닌, 발린, 트레오닌, 알라닌, 세린, 아르기닌, 글리신 또는 이소류신을 갖는다. 일 구현예에서, 위치 112는 시스테인을 갖는다. 일 구현예에서, 위치 136은 트레오닌, 시스테인, 메티오닌, 아르기닌 또는 세린을 갖는다. 일 구현예에서, 위치 136은 세린을 갖는다. 일 구현예에서, 위치 158은 시스테인, 메티오닌, 발린, 트레오닌, 알라닌, 세린, 아르기닌, 글리신 또는 이소류신을 갖는다. 일 구현예에서, 위치 158은 아르기닌 또는 시스테인을 갖는다. 일 구현예에서, 위치 112, 136 또는 158 중 2 개는 아르기닌을 갖는다. 일 구현예에서, 위치 112는 아르기닌을 갖지 않는다. 일 구현예에서, 위치 136은 아르기닌을 갖지 않는다. 일 구현예에서, 위치 158은 아르기닌을 갖지 않는다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터 내의 포유류 APOE는 위치 112에 Cys, 위치 136에 Ser 및 위치 158에 Cys를 갖는다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터 내의 포유류 APOE는 위치 112에 Cys, 위치 136에 Ser 및 위치 158에 Arg를 갖는다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 바이러스 유전자 요법 벡터이다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스(AAV), 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터이다. 일 구현예에서, 바이러스 유전자 요법 벡터는 rAAV 벡터이다. 일 구현예에서, AAV 벡터는 예를 들어, AAVrh.10, AAV8, AAV9, AAV5, AAVhu.37, AAVhu.20, AAVhu.43, AAVhu.8, AAVhu.2, 또는 AAV7 캡시드로 위형화된다. 일 구현예에서, AAV 벡터는 AAVrh.10, AAV8, 또는 AAV5로 위형화된다. 일 구현예에서, AAV 벡터는 AAV2, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9 또는 AAVrh.10이다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 APOE4 mRNA의 억제를 위해 APOE4에 상응하는 RNAi 서열을 갖는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 제2 유전자 요법 벡터는 APOE4 mRNA의 억제를 위해 APOE4에 상응하는 RNAi 서열을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 제2 프로모터에 연결된다. 일 구현예에서, 제2 프로모터는 PolIII 프로모터이다. 일 구현예에서, RNAi는 복수의 miRNA 서열을 포함하는 miRNA를 포함한다. 일 구현예에서, RNAi는 복수의 siRNA 서열을 포함하는 siRNA를 포함한다. 일 구현예에서, 벡터는 플라스미드이다. 일 구현예에서, 벡터 내의 포유류 아포지질단백질 유전자는 C112, S136 및 R158 또는 C112, S136 및 C158을 갖는다. 일 구현예에서, 제2 유전자 요법 벡터는 항-APOE4 또는 항-해파란 항체를 암호화하는 핵산 서열을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0005]

또한 유전자 요법 벡터를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 일 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일 구현예에서, 벡터는 rAAV 벡터이다. 일 구현예에서, 조성물 내의 벡터의 양은 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{16} 게놈 카피이다. 일 구현예에서, 조성물 내의 벡터의 양은 약 1×10^{12} 내지 약 1×10^{15} 게놈 카피이다. 일 구현예에서, 조성물 내의 벡터의 양은 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{13} 게놈 카피이다. 일 구현예에서, 조성물 내의 벡터의 양은 약 1×10^{13} 내지 약 1×10^{15} 게놈 카피이다. 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함한다.

[0006]

포유동물에서 치매, 또는 다른 타우병증 또는 인지 장애와 같은 이의 하나 이상의 증상을 예방 또는 치료하는 것을 포함하는 알츠하이머병을 예방, 억제 또는 치료하는 방법이 추가로 제공된다. 일 구현예에서, 투여 전에, 포유동물은 예를 들어, 연령 일치 포유동물 또는 알츠하이머병 또는 다른 타우병증 또는 인지 장애의 위험이 감소된 포유동물에 비해 뇌에서 증가된 아밀로이드 플라크 및/또는 증가된 타우를 갖거나 또는 가질 위험이 있다. 일 구현예에서, 포유동물은 인지 장애를 갖는다. 상기 방법은 유효량의 유전자 요법 벡터를 포함하는 조성물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 조성물은 벡터를 포함하는 리포솜을 포함한다. 일 구현예에서, 조성물은 벡터를 포함하는 나노입자를 포함한다. 일 구현예에서, 포유동물은 E2/E4 이형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E4/E4 동형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E3/E4 이형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E2/E3 이형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 인간이다. 일 구현예에서, 인간은 성인, 예를 들어, 20 세 이상, 예를 들어, 적어도 40, 50 또는 60 세이다. 일 구현예에서, 인간은 청소년, 예를 들어, 10 내지 20 세이다. 일 구현예에서, 인간은 어린이, 예를 들어, 10 세 미만이다. 일 구현예에서, 조성물은 출생 시 또는 출생 후 1, 2, 3, 4 또는 5 년 이내에 인간에게 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 전신

으로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 경구로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 정맥내로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 국부로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 주사된다. 일 구현예에서, 조성물은 중추신경계에 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 뇌에 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 지속 방출 조성물이다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터의 투여는 아밀로이드 플라크의 축적을 예방 또는 억제하는 데 효과적이다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터의 투여는 타우 병리를 예방 또는 억제하는 데 효과적이다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터의 투여는 아밀로이드 플라크의 축적을 예방 또는 억제하고 타우 병리를 예방 또는 억제하는 데 효과적이다.

[0007] 게다가, 포유동물에서 APOE4 발현과 연관된 질환을 예방, 억제 또는 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 유효량의 유전자 요법 벡터를 포함하는 조성물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 조성물은 벡터를 포함하는 리포솜을 포함한다. 일 구현예에서, 조성물은 벡터를 포함하는 나노입자를 포함한다. 일 구현예에서, 포유동물은 E2/E4 이형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E4/E4 동형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E3/E4 이형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E4/E4 동형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 인간이다. 일 구현예에서, 조성물은 전신으로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 경구로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 정맥내로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 국부로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 주사된다. 일 구현예에서, 조성물은 중추신경계에 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 뇌에 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 지속 방출 조성물이다.

[0008] 유효량의 유전자 요법 벡터를 포함하는 조성물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 해파린 슬레이트 프로테오글리칸에 대한 결합을 감소시키는 방법이 제공된다. 일 구현예에서, 조성물은 벡터를 포함하는 리포솜을 포함한다. 일 구현예에서, 조성물은 벡터를 포함하는 나노입자를 포함한다. 일 구현예에서, 포유동물은 E2/E4 이형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E4/E4 동형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E3/E4 이형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E4/E4 동형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 인간이다. 일 구현예에서, 조성물은 전신으로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 경구로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 정맥내로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 국부로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 주사된다. 일 구현예에서, 조성물은 중추신경계에 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 뇌에 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 지속 방출 조성물이다.

[0009] 일 구현예에서, 조성물은 카테터를 통해 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 뇌실내로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 두개내로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 요추 부위에 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 대수조에 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 천공을 통해 뇌에 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 C1-C2 아래에 투여된다.

[0010] 일 구현예에서, 조성물은 암호화된 유전자 산물, 예를 들어, 변형된 APOE 또는 해파란에 결합하는 항체의 발현이 포유동물에서 APOE4의 발현 수준과 유사하도록 투여된다. 일 구현예에서, 포유동물에서 분비된 벡터 암호화된 유전자 산물 대 분비된 APOE4의 비는 1:1이다. 일 구현예에서, 포유동물에서 분비된 벡터 암호화된 유전자 산물 대 분비된 APOE4의 비는 2:1이다. 일 구현예에서, 포유동물에서 분비된 벡터 암호화된 유전자 산물 대 분비된 APOE4의 비는 0.5:1이다. 일 구현예에서, 포유동물에서 분비된 벡터 암호화된 유전자 산물 대 분비된 APOE4의 비는 0.1:1이다. 일 구현예에서, 포유동물에서 분비된 벡터 암호화된 유전자 산물 대 분비된 APOE4의 비는 3:1이다. 일 구현예에서, 포유동물에서 암호화된 유전자 산물의 발현 수준은 인지 저하(악화)를 예방 또는 억제한다. 일 구현예에서, 포유동물에서 암호화된 유전자 산물의 발현 수준은 타우 엉킴 및 아밀로이드 축적을 감소시킨다.

[0011] 유효량의 유전자 요법 벡터를 포함하는 조성물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 지질 장애를 예방, 억제 또는 치료하는 방법이 제공된다. 일 구현예에서, 조성물은 벡터를 포함하는 리포솜을 포함한다. 일 구현예에서, 조성물은 벡터를 포함하는 나노입자를 포함한다. 일 구현예에서, 포유동물은 E2/E4 이형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E4/E4 동형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E3/E4 이형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E4/E4 동형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 인간이다. 일 구현예에서, 조성물은 전신으로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 경구로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 정맥내로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 국부로 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 주사된다. 일 구현예에서, 조성물은 중추신경계에 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 뇌에 투여된다. 일 구현예에서, 조성물은 지속 방출 조성물이다.

[0012] 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 내인성 APOE4를 표적하는 시스 또는 트랜스 인공 miRNA(들)에서 본원에 기

재된 바와 같이 변형된 인간 APOE 유전자를 암호화하는 AAV 발현 벡터를 포함한다. 이 벡터 시스템은 유전자 요법 벡터, 예를 들어, AAV 벡터로부터 유익한 APOE 유전자의 보충과 조합하여 유해한 내인성 APOE4의 발현을 침묵시킨다. 예시적인 microRNA 서열은 인간 APOE 코딩 서열을 코딩하는 벡터 이식유전자 플라스미드의 CAG 프로모터 인트론 또는 polyA 꼬리에 혼입되었다. 대안적으로, microRNA(들)는 PolIII 프로모터, 예를 들어, U6 프로모터와 APOE 발현 카세트의 polyA 부위에 뒤따르는 종결자 사이에 삽입될 수 있다. 벡터-유래 인간 APOE DNA 서열은 microRNA에 의해 억제되지 않도록 침묵 뉴클레오티드 변화를 포함할 수 있고 예를 들어, 전임상 검출 연구를 위한 검출용 HA 태그와 같은 태그를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 발현 작제물은 CNS에서 내인성 APOE 발현의 중요한 부위인 성상세포 및 교질 세포를 표적하는 혈청형의 AAV 캡시드(예를 들어 AAV9지만 다른 벡터일 수 있음) 내로 패키징된다.

[0013] 본원에 기재된 벡터는 인지 장애, 치매, 알츠하이머병, 예를 들어, 상염색체 우성, 후기 발병, 또는 조기 발병을 예방, 억제 또는 치료하는 데 이용될 수 있다. 일 구현예에서, 포유동물은 벡터 투여 후 감소된 섬유성 아밀로이드-베타 플라크 부담, 감소된 수준의 쌍을 이루는 나선형 필라멘트 타우, 또는 감소된 신경변성을 갖는다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 벡터는 예를 들어, 외상성 뇌손상, 뇌졸중, 일과성 허혈 발작, 치매, 크로이츠펠트-야콥병, 다발성 경화증, 프리온병, 픽병, 피질기저부 변성, 파킨슨병, 루이체 치매, 진행성 핵상마비; 권투 선수 치매(만성 외상성 뇌병증); 전측두엽 치매 및 17번 염색체와 연관된 파킨슨병; 라이티코-보디그병; 엉킴-우세 치매; 신경절교종 및 신경절세포종; 수막혈관주위세포종; 아급성 경화성 범뇌염; 납중독뇌병증, 결절성 경화증, 할러포르텐-스파츠병, 및 지질갈색소증; 은친화성 그레이브; 또는 전측두엽 변성과 연관된 인지 장애를 예방, 억제 또는 치료하는 데 이용될 수 있다.

[0014] 본원에 기재된 벡터는 또한 과지단백혈증, 예를 들어, 유형 I, 유형 2, 유형 3, 유형 4 또는 유형 5와 연관된 하나 이상의 증상을 예방, 억제 또는 치료하는 데 이용될 수 있다. 일 구현예에서, 투여되는 벡터의 양은 순환 콜레스테롤을 감소시키며, 예를 들어, VLDL 및/또는 LDL을 감소시키거나, 중간 밀도 지단백질을 감소시키거나, 콜레스테롤 및/또는 트리글리세리드의 혈장 수준을 감소시키거나, VLDL을 함유하는 트리글리세리드를 감소시키거나, 사구체 모세관에서 지질 축적을 감소시키거나, 사구체내 지단백질을 감소시키거나 또는 혈전을 감소시킨다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1. APOE 대립유전자, 유병률 및 알츠하이머병의 발병 연관 위험.
 도 2. 예시적인 바이러스 유전자 요법.
 도 3. 유전자 요법의 예시적인 투여 경로.
 도 4. 상이한 APOE 대립유전자, 유병률 및 알츠하이머병의 발병 연관 위험에 대해 선택된 아미노산 잔기.
 도 5. 상이한 APOE 대립유전자의 두 위치에서 뉴클레오티드 잔기.
 도 6. APOE3ch 돌연변이.
 도 7. APOE3ch 돌연변이의 영향.
 도 8. 헤파린에 대한 APOE3ch의 친화도.
 도 9. HSPG에 대한 APOE 또는 타우 결합의 가능한 메커니즘.
 도 10. 특정 APOE 대립유전자의 발현과 연관된 질환을 예방, 억제 또는 치료하기 위한 예시적인 유전자 요법 접근법.
 도 11. APOE 대립유전자와 우성 유형 III 과지단백혈증 및 지단백질 사구체병증의 연관성.
 도 12. APOE AD 감소 위험 변이체의 AAV-매개 전달을 사용한 유전자 요법. APOE4 동형접합체가 AD에 대해 15-20배 증가된 위험을 갖는다는 지식에 기반하여(Reiman 등, 2020; Corder 등, 1993; Hefferman 등, 2016), AD에 대한 위험을 감소시키기 위해 AAV 벡터를 사용하여 크라이스트처치 변이체와 함께 APOE2 및 APOE3 변이체의 코딩 서열을 전달하는 치료 전략이 이용된다.
 도 13. APOE 변이체, AD에 대한 위험, 및 APOE4로부터 보호하기 위한 제안된 유전자 요법. APOE2, 3 및 4는 공통 변이체이다(Hefferman 등, 2016; ALXFORUM, 2010). APOE3ChC는 조기 발병 AD19를 유발하는 PSEN 1-E290A 우성 변이체로부터 보호하는 APOE3 배경에 대한 크라이스트처치 돌연변이의 사례 보고서에서 PSEN 1-E290A에 중

접된 변이체이다. APOE3ChC 및 APOE2ChC 변이체는 APOE4 동형접합체에서 AD의 높은 위험을 완화하기 위한 요법일 수 있다. APOE2ChC 변이체는 자연에서 관찰되지 않았지만, APOE3ChC보다 더 효과적일 수 있다. *PSEN 1-E290A의 맥락에서 낮다.

도 14. PSEN1-E280 돌연변이가 있는 여성에서 APOE3ChC의 상대적 효과를 뒷받침하는 연구. 평균 피질 아밀로이드 플라크 부담(피즈버그 화합물 8, PET), 하측두 피질 PHF 타우 부담(플로라타우시피르 PET), 해마 부피(MRI) 및 설전부 글루코스 대사(플루테옥시글루코스 PET)에 대한 정량적 데이터가 제시된다. 검정색 점- 전형적인 젊은 나이에 MCI 발병 PSEN1 보균자; 회색 점- 아직 MCI가 발생하지 않은 PSEN1 보균자; PSEN1 보균자 + APOE3ChC 변이체가 있는 대상체(화살표가 있는 빨간색 점). 도면은 Arboleda-Velasquez 등(2019)으로부터 변형된다.

도 15. 크라이스트치치 돌연변이는 APOE의 해파린 결합을 손상시킨다. ELISA를 사용하여 해파린 칼럼에서 상이한 APOE 동형(isoform)의 NaCl 용리 패턴의 차이를 정량화하였다. 도면은 Arboleda-Velasquez 등(2019)으로부터 채택된다. 화살표는 APOEChC 변이체가 있는 대상체를 지칭한다.

도 16. AAVrh.10hAPOE2 벡터. AAVrh.10hAPOE2 벡터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 인핸서, 닭 β 액틴 프로모터, 스플라이스 공여자 및 인트론, 및 토끼 β -글로빈 스플라이스 수용자로 이루어진 구성적 CAG 프로모터 뒤에 있고, 토끼 β -글로빈 폴리아데닐화 신호(A_n)가 뒤따르는 인간 APOE2 이식유전자를 발현한다. hAPOE2 발현 카세트는 AAV2 도립된 말단 반복부(ITR)에 의해 플랭킹되고 레서스 아데노 연관 바이러스 벡터 혈청형 10(AAVrh.10) 캡시드 내로 패키징된다. 이 제안에 사용되는 모든 APOE 벡터는 APOE 코딩 서열을 제외하고 동일하다. AAVrh.10Null 벡터는 동일하지만 발현 카세트 AAVrh.10hAPOE2는 번역가능하지 않은 서열에 의해 대체된다.

도 17. 예로서 AAVrh.10hAPOE2를 사용하여, 예상된 분자량으로 정렬된 3 개의 AAV 캡시드 단백질과 연관된 3 개의 밴드를 나타내는 SDS 폴리악릴아미드 겔 전기영동이 제시된다.

도 18. AAVrh.10APOE2의 수조내 투여 후 비인간 영장류의 뇌에서 APOE2 단백질의 분포 평가. AAVrh.10hAPOE2(5×10^{13} gc, APOE2 이식유전자)가 투여된 NHP를 요법 후 8 주에 평가하였다. 오른쪽 반구를 1 cm^3 큐브로 세분하고 단백질 APOE2 수준을 ELISA에 의해 분석하였다. a. 뇌 절편에서 인간 APOE2 단백질. b. CSF($10 \mu\text{l}$ /시점)를 3 개 시점[투여 전(0 일), 및 투여 후 28 일 및 56 일]에서 3 마리의 NHP로부터 샘플링하고 SOS-PAGE에 의해 분석한 후 웨스턴에 의해 APOE2의 항체를 검출하였다. Rosenberg 등(2018) 참조.

도 19a-19b. PDAPP 마우스 모델에서 아밀로이드 병리의 해결. AAVrh.10hAPOE2 또는 대조군 AAVrh.10mCherry(10^{10} gc)를 9-개월령 PDAPP 마우스의 해마에 양측으로 투여하였다. 투여 8 주 후, 마우스를 희생시키고 왼쪽 반구의 해마를 절개하고, 균질화하고, RIPA(가용성 $A\beta$ 를 나타냄) 및 5.5 M 구아니딘(불용성 $A\beta$ 를 나타냄)으로 순차적으로 추출하였다. $A\beta$ 1-42, 및 $A\beta$ 1-40 수준을 ELISA에 의해 결정하였다. AAVrh.10hAPOE2 또는 AAVrh.10mCherry가 주사된 PDAPP 마우스의 해마에서 a) $A\beta$ 1-42의 조직 수준; 및 b) $A\beta$ 1-40의 조직 수준. n=그룹 당 10-12 마리 동물. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 제시된다. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Zhao 등(2016) 참조.

도 20a-20b. 2.5-개월령 APP.PS1/TRE4 마우스의 해마에서 $A\beta$ 수준에 대한 APOE2의 해마내 전달의 용량 의존적 효과. AAVrh.10hAPOE2(0.25×10^{10} , 0.5×10^{10} 또는 1×10^{10} gc) 또는 AAVrh.10mCherry(1×10^{10} gc)를 2.5-개월령 수컷 APP.PS1/TRE4 마우스의 해마에 양측으로 주사하였다. 투여 8 주 후, 마우스를 희생시켰다. 왼쪽 반구의 해마를 절개하고, 균질화하고, RIPA(가용성 $A\beta$ 를 나타냄) 및 5.5 M 구아니딘(불용성 $A\beta$ 를 나타냄)으로 순차적으로 추출하였다. 각 추출물에서 $A\beta$ 1-42 수준을 ELISA에 의해 결정하였다. a) 해마에서 불용성 $A\beta$ 1-42 수준(추출가능한 구아니딘)해마. b) 해마에서 가용성 $A\beta$ 1-42 수준(추출가능한 RIPA). n=그룹 당 3-5 마리 동물. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 제시된다; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Zhao 등(2016).

도 21a-21b. APP.PS1/TRE4 마우스의 뇌에서 APOE 및 $A\beta$ 수준에 대한 AAV9-hAPOE2의 시상내 전달. 10 주령 마우스에게 AAV9-hAPOE2 또는 AAV9-GFP를 양측 시상내 주사(10^{10} gc)에 의해 투여하고 8 주 후 희생시켰다. 왼쪽 반구로부터의 시상, 해마, 및 대뇌 피질을 절개하고 균질화하였다. a) APOE 및 b) $A\beta$ 1-42 수준을 ELISA에 의해 정량화하였다. Zhao 등으로부터 채택하였다.

도 22. 시험관내에서 APOE의 녹다운(Knockdown). U87 인간 성상교종 세포를 APOE를 표적화하는 siRNA 또는

비-표적화(NT) 대조군(5 pmol)으로 형질감염시켰다. 72 시간 후에 세포를 수집하고 내인성 *APOE* mRNA 수준을 RT-qPCR에 의해 정량화하였다. *APOE*의 코딩 서열을 표적화하는 4 개의 상이한 siRNA를 다중 siRNA 설계 알고리즘의 비교에 기반하여 생성하였다. 식별된 서열은 다음과 같았다: GGUGGAGCAAGCGUGGAGuu(서열번호:20); GGAGUUGAAGGCCUACAAUu(서열번호:21); GGAAGACAUGCAGCGCCAGuu(서열번호:22); 및 GCGCGCGAUGGAGGAGAUuu(서열번호:23).

도 23a-23b. hAPOE2-mirAPOE4 발현 카세트. a) mirAPOE4의 개략도. siRNA 표적화 서열(가이드 가닥) 및 설비 처리에 대해 선택된 불일치가 있는 안티센스 서열(운송 가닥)은 향상된 mir155 백본 내에 통합된다. b) AAV9-hAPOE2-mirAPOE4 발현 작제물의 개략도. 작제물은 구성적 CAG 프로모터[사이토메갈로바이러스(CMV) 인핸서, 닭 β 액틴 프로모터, 스플라이스 공여자 및 인트론, 및 토끼 β -글로빈 스플라이스 수용자] 뒤에 있고, 토끼 β -글로빈 폴리아데닐화(polyA) 신호가 뒤따르는 헤마글루티닌 태그(HA)에 융합된 인간 *APOE2* 코딩 서열을 함유한다. mirAPOE4 탠덤 반복부는 CAG 인트론 및/또는 이식유전자 정지 코돈과 polyA 서열 사이에 삽입된다. hAPOE2 발현 카세트는 AAV2 도입된 말단 반복부(ITR)에 의해 플랭킹되고 AAV9 캡시드 내에 패키징된다. 예를 들어, 하기와 같은 siRNA#2의 miR이 이용될 수 있다:

```
CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGATTTGTAGGCCTTCAACTCCT
GTTTGGCCACTGACTGACAGGAGTGAGGCCTACAAATCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCA
CATGGAACAAATGGCC (서열번호:24);
CTGGAGGCTTGCTTTGGGCTGTATGCTGATTTGTAGGCCTTCAACTCCTGTTTGGCCACTGACTGA
CAGGAGTTGAAGTCACAAATCAGGACACAAGGCCTTTATCAGCACTCACATGGAACAAATGGCCAC
CGTGGGAGGATGACAA (서열번호:25); 또는
CTGGAGGCTTGCTTTGGGCTGTATGCTGTTCCGATTTGTAGGCCTTCAAGTTTGGCCACTGACTGA
CTTGAAGTCACAAATCGGAACAGGACACAAGGCCTTTATCAGCACTCACATGGAACAAATGGCCAC
CGTGGGAGGATGACAA (서열번호:26).
```

도 24. 인트론 및 polyA에 위치한 miR의 녹다운 효율 테스트.

도 25. 녹다운 효율에 대한 루시퍼라제 결과.

도 26. *APOE* 표적화 부위 단독 대조군 테스트

도 27. 침묵 뉴클레오티드 변화에 따른 벡터-유래 *APOE2*에서 miRNA 표적 부위 식별.

도 28. pAAV-miRNA-*APOE*-HA 생성.

도 29. 생체내 연구.

도 30. 대조군에서 루시퍼라제 발현.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 하기 설명에서, 참조는 이의 일부를 형성하고, 실시될 수 있는 특정 구현예가 예시로서 제시된 도면을 참조하여 이루어진다. 이들 구현예는 당업자가 본 발명을 실시할 수 있도록 보다 상세하게 기재되어 있으며, 다른 구현예가 활용될 수 있고 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 논리적 변화가 이루어질 수 있음이 이해되어야 한다. 따라서, 예시적 구현예의 하기 설명은 제한적 의미로 받아들여져서는 안되며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구범위에 의해 정의된다.

[0017] 상세한 설명

[0018] 정의

[0019] "벡터"는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 또는 이와 회합하고, 시험관내 또는 생체내에서 폴리뉴클레오티드를 세포에 전달하는 것을 매개하는 데 사용될 수 있는 거대분자 또는 거대분자의 회합을 지칭한다. 예시적인 벡터는 예를 들어, 플라스미드, 바이러스 벡터, 리포솜 및 다른 유전자 전달 비히클을 포함한다. 때때로 "표적 폴리뉴클레오티드" 또는 "이식유전자"로 지칭되는 전달될 폴리뉴클레오티드는 유전자 요법에서 관심 코딩 서열(예컨대 관심 치료 단백질을 암호화하는 유전자), 백신 개발에서 관심 코딩 서열(예컨대 포유동물에서 면역 반응을 도출하는 데 적합한 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 발현하는 폴리뉴클레오티드), 및/또는 선택가능하거나 또는 검출가능한 마커를 포함할 수 있다.

[0020] 본원에 사용된 바와 같은 "형질도입," "형질감염," "형질전환" 또는 "형질도입하는"은 외인성 폴리뉴클레오티드

를 숙주 세포 내로 도입하여 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 세포 내 이식유전자의 발현으로 이어지는 과정을 지칭하는 용어이며, 외인성 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하기 위한 재조합 바이러스의 사용을 포함한다. 세포 내 폴리뉴클레오티드의 형질도입, 형질감염 또는 형질전환은 예를 들어, ELISA, 유세포 분석 및 웨스턴 블롯에 의한 단백질 발현(정상 상태 수준 포함), 혼성화 검정, 예를 들어, 노던 블롯, 서던 블롯 및 겔 이동 이동도 검정에 의한 DNA 및 RNA의 측정을 포함하나 이에 제한되지 않는 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 결정될 수 있다. 외인성 폴리뉴클레오티드의 도입을 위해 사용되는 방법은 바이러스 감염 또는 형질감염, 리포펙션, 형질전환 및 전기천공과 같은 잘 알려진 기술, 뿐만 아니라 다른 비바이러스 유전자 전달 기술을 포함한다. 도입된 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포에서 안정적으로 또는 일시적으로 유지될 수 있다.

[0021] "유전자 전달(Gene delivery)"은 유전자 이동을 위해 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입하는 것을 지칭하며, 표적화, 결합, 흡수, 수송, 국소화, 레플리콘 통합 및 발현을 포함할 수 있다.

[0022] "유전자 이동(Gene transfer)"은 표적화, 결합, 흡수, 수송, 국소화 및 레플리콘 통합을 포함할 수 있지만, 유전자의 후속 발현과 구별되고 이를 암시하지 않는, 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입하는 것을 지칭한다.

[0023] "유전자 발현" 또는 "발현"은 유전자 전사, 번역, 및 번역 후 변형의 과정을 지칭한다.

[0024] "감염성" 바이러스 또는 바이러스 입자는 바이러스 종이 영양성인 세포 내로 전달할 수 있는 폴리뉴클레오티드 구성성분을 포함하는 것이다. 용어가 반드시 바이러스의 임의의 복제 능력을 암시하는 것은 아니다.

[0025] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드를 포함하는 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태, 또는 이의 유사체를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 메틸화 또는 캡핑된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체와 같은 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 비-뉴클레오티드 구성성분에 의해 중단될 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 중합체 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 폴리뉴클레오티드는 상호교환가능하게 이중- 및 단일-가닥 분자를 지칭한다. 달리 명시되거나 또는 요구되지 않는 한, 폴리뉴클레오티드인 본원에 기재된 임의의 구현에는 이중-가닥 형태 및 이중-가닥 형태를 구성하는 것으로 알려져 있거나 또는 예측된 2 개의 상보적 단일-가닥 형태 각각을 모두 포함한다.

[0026] "단리된" 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 플라스미드, 바이러스, 폴리펩티드 또는 다른 물질은 물질 또는 유사한 물질이 자연적으로 발생하거나 또는 초기에 이로부터 제조되는 경우에도 존재할 수 있는 다른 구성성분의 적어도 일부가 없는 물질의 제제를 지칭한다. 따라서, 예를 들어, 단리된 물질은 정제 기술을 사용하여 공급원 혼합물로부터 풍부화함으로써 제조될 수 있다. 단리된 핵산, 펩티드 또는 폴리펩티드는 자연에서 발견되는 것과 상이한 형태인 형태 또는 설정으로 존재한다. 예를 들어, 주어진 DNA 서열(예를 들어, 유전자)은 이웃 유전자에 가까운 숙주 세포 염색체 상에서 발견되며; 특이적 단백질을 암호화하는 특이적 mRNA 서열과 같은 RNA 서열은 다수의 단백질을 암호화하는 수많은 다른 mRNA와의 혼합물로서 세포에서 발견된다. 단리된 핵산 분자는 단일-가닥 또는 이중-가닥 형태로 존재할 수 있다. 단리된 핵산 분자가 단백질을 발현하는 데 활용되는 경우, 분자는 최소한 센스 또는 코딩 가닥을 함유할 것이지만(즉, 분자는 단일-가닥일 수 있음), 센스 및 안티-센스 가닥을 둘 다 함유할 수 있다(즉, 분자는 이중-가닥일 수 있음). 풍부화는 용액 부피 당 중량과 같은 절대 기준으로 측정될 수 있거나, 또는 공급원 혼합물에 존재하는 잠재적으로 간섭하는 제2 물질과 관련하여 측정될 수 있다. 본 발명의 구현예의 증가하는 풍부화가 구상된다. 따라서, 예를 들어, 2-배 풍부화, 10-배 풍부화, 100-배 풍부화, 또는 1000-배 풍부화.

[0027] "전사 조절 서열"은 작동가능하게 연결된 유전자 또는 코딩 서열의 전사를 제어하는 게놈 영역을 지칭한다. 본 발명에서 사용하는 전사 조절 서열은 일반적으로 적어도 하나의 전사 프로모터를 포함하고 또한 전사의 하나 이상의 인핸서 및/또는 종결자를 포함할 수 있다.

[0028] "작동가능하게 연결된"은 2개 이상의 구성성분의 배열을 지칭하며, 여기서 그렇게 기재된 구성성분은 통합된 방식으로 기능하는 것을 허용하는 관계에 있다. 예시로서, 전사 조절 서열 또는 프로모터는 TRS 또는 프로모터가 코딩 서열의 전사를 촉진하는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 작동가능하게 연결된 TRS는 일반적으로 코딩 서열과 시스로 연결되지만, 반드시 이에 직접 인접할 필요는 없다.

[0029] "이중"은 비교되는 독립체와 유전자형적으로 별개의 독립체로부터 유래되는 것을 의미한다. 예를 들어, 유전자 조작 기술에 의해 상이한 세포 유형 내로 도입된 폴리뉴클레오티드는 이중 폴리뉴클레오티드이다(발현되는 경우, 이중 폴리펩티드를 암호화할 수 있음). 유사하게, 천연 코딩 서열로부터 제거되고 상이한 코딩 서열에

작동가능하게 연결된 프로모터와 같은 전사 조절 요소는 이중 전사 조절 요소이다.

- [0030] "종결자"는 번역 초과(read-through) 전사를 줄이거나 또는 방지하는 경향이 있는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다(즉, 종결자의 한쪽에서 기원하는 전사가 종결자의 다른 쪽으로 계속되는 것을 줄이거나 또는 방지함). 전사가 중단되는 정도는 전형적으로 염기 서열 및/또는 종결자 서열 길이의 함수이다. 특히, 수많은 분자 생물학적 시스템에서 잘 알려진 바와 같이, 일반적으로 "전사 종결 서열"로 지칭되는 특정 DNA 서열은 아마도 RNA 중합효소 분자가 전사되는 DNA로부터 정지 및/또는 분리되도록 함으로써 RNA 중합효소에 의해 번역 초과 전사를 방해하는 경향이 있는 특이적 서열이다. 이러한 서열-특이적 종결자의 전형적인 예는 폴리아데닐화("polyA") 서열, 예를 들어, SV40 polyA를 포함한다. 이러한 서열-특이적 종결자 이외에 또는 대신에, 프로모터와 코딩 영역 사이에 비교적 긴 DNA 서열의 삽입은 또한 일반적으로 개재 서열의 길이에 비례하여 코딩 영역의 전사를 방해하는 경향이 있다. 이 효과는 아마도 RNA 중합효소 분자가 전사되는 DNA에서 분리되게 되는 일부 경향이 항상 있기 때문에 생기고, 코딩 영역에 도달하기 전에 횡단될 서열의 길이를 증가시키는 것은 일반적으로 코딩 영역의 전사가 완료되거나 또는 아마 심지어 개시되기 전에 분리가 발생할 가능성을 증가시킬 것이다. 따라서 종결자는 단지 하나의 방향("단방향" 종결자) 또는 양쪽 방향("양방향" 종결자)으로부터 전사를 방지할 수 있고, 서열-특이적 종결 서열 또는 서열-비특이적 종결자 또는 둘 다로 구성될 수 있다. 다양한 이러한 종결자 서열은 당업계에 알려져 있으며; 본 발명의 맥락 내에서 이러한 서열의 예시적인 사용이 하기에 제공된다.
- [0031] "숙주 세포," "세포주," "세포 배양물," "패키징 세포주" 및 다른 이러한 용어는 예를 들어, 재조합 바이러스 또는 재조합 융합 폴리펩티드를 생산하기 위해 본 발명에서 유용한 인간 세포를 포함한 포유류 세포와 같은 고등 진핵생물 세포를 나타낸다. 이들 세포는 형질도입된 원래 세포의 자손을 포함한다. 단일 세포의 자손은 반드시 원래 모 세포와 (형태 또는 계놈 보체에서) 완전히 동일할 필요는 없을 수 있음이 이해된다.
- [0032] 폴리뉴클레오타이드에 적용되는 바와 같은 "재조합"은 폴리뉴클레오타이드가 클로닝, 제한 및/또는 절찰 단계의 다양한 조합, 및 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오타이드와 구별되는 작제물을 초래하는 다른 절차의 생성물임을 의미한다. 재조합 바이러스는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 바이러스 입자이다. 용어는 각각 원래 폴리뉴클레오타이드 작제물의 복제물 및 원래 바이러스 작제물의 자손을 포함한다.
- [0033] "제어 요소" 또는 "제어 서열"은 폴리뉴클레오타이드의 복제, 증복, 전사, 스플라이싱, 번역, 또는 분해를 포함하는, 폴리뉴클레오타이드의 기능적 조절에 기여하는 분자의 상호작용에 수반되는 뉴클레오타이드 서열이다. 조절은 과정의 빈도, 속도, 또는 특이성에 영향을 미칠 수 있고, 자연에서 향상 또는 억제될 수 있다. 당업계에 알려진 제어 요소는 예를 들어, 프로모터 및 인핸서와 같은 전사 조절 서열을 포함한다. 프로모터는 특정 조건 하에 RNA 중합효소에 결합하고 일반적으로 프로모터로부터 하류(3' 방향으로)에 위치한 코딩 영역의 전사를 개시할 수 있는 DNA 영역이다. 프로모터는 AAV 프로모터, 예를 들어, P5, P19, P40 및 AAV ITR 프로모터, 뿐만 아니라 이중 프로모터를 포함한다.
- [0034] "발현 벡터"는 관심 유전자 산물을 암호화하는 영역을 포함하는 벡터이며, 의도된 표적 세포에서 유전자 산물의 발현을 실행하는 데 사용된다. 발현 벡터는 또한 표적 내 단백질의 발현을 용이하게 하도록 암호화 영역에 작동가능하게 연결된 제어 요소를 포함한다. 제어 요소와 발현을 위해 작동가능하게 연결된 유전자 또는 유전자들의 조합은 때때로 "발현 카세트"로 지칭되며, 이들 중 다수는 당업계에 알려져 있고 이용가능하거나 또는 당업계에서 이용가능한 구성성분으로부터 용이하게 구축될 수 있다.
- [0035] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 용어는 또한 예를 들어, 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 아세틸화, 포스포닐화, 지질화, 또는 라벨링 구성성분과의 접합으로 변형된 아미노산 중합체를 포함한다.
- [0036] 용어 "외인성"은 세포 또는 유기체에서 단백질, 유전자, 핵산, 또는 폴리뉴클레오타이드와 관련하여 사용될 때 인공 또는 천연 수단에 의해 세포 또는 유기체 내로 도입된 단백질, 유전자, 핵산, 또는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 외인성 핵산은 상이한 유기체 또는 세포로부터 유래될 수 있거나, 또는 유기체 또는 세포 내에서 자연적으로 발생하는 핵산의 하나 이상의 추가 카피일 수 있다. 비제한적인 예로서, 외인성 핵산은 천연 세포의 것과 상이한 염색체 위치에 있거나, 또는 달리 자연에서 발견되는 것과 상이한 핵산 서열, 예를 들어, 프로모터를 하나의 유전자에서 상이한 유전자로부터의 유전자 산물에 대한 오픈 리딩 프레임까지 연결하는 발현 카세트에 의해 플랭킹된다.
- [0037] "형질변환된" 또는 "유전자이식"은 적어도 하나의 재조합 DNA 서열의 존재에 의해 변경 또는 증대된 임의의 숙주 세포 또는 세포주를 포함하는 것으로 본원에서 사용된다. 본 발명의 숙주 세포는 전형적으로 단리된 선행

DNA 서열로서 플라스미드 발현 벡터에서 DNA 서열로 형질감염, 또는 재조합 바이러스 벡터로 감염에 의해 생산된다.

[0038] 용어 "서열 상동성"은 2 개의 핵산 서열 사이의 염기 일치 비율 또는 2 개의 아미노산 서열 사이의 아미노산 일치 비율을 의미한다. 서열 상동성이 백분율, 예를 들어, 50%로 표현되는 경우, 백분율은 일부 다른 서열과 비교하여 선택된 서열의 길이에 대한 일치 비율을 나타낸다. 갭(2 개 서열 중 어느 하나에서)은 일치를 최대화하기 위해 허용되며; 15 개 염기 이하의 갭 길이, 6 개 염기 이하 예를 들어 2 개 염기 이하가 일반적으로 사용된다. 프로브 또는 치료제로서 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 경우, 표적 핵산과 올리고뉴클레오타이드 서열 사이의 서열 상동성은 일반적으로 20 개의 가능한 올리고뉴클레오타이드 염기 쌍 일치 중 17 개 이상의 표적 염기 일치(85%); 10 개의 가능한 염기 쌍 일치 중 9 개 이상의 일치(90%), 또는 20 개의 가능한 염기 쌍 일치 중 19 개 이상의 일치(95%)이다.

[0039] 2 개의 아미노산 서열은 서열 사이에 부분적 또는 완전 동일성이 있는 경우 상동성이다. 예를 들어, 85% 상동성은 2 개의 서열이 최대 일치를 위해 정렬된 경우 아미노산의 85%가 동일함을 의미한다. 갭(일치하는 2 개 서열 중 어느 하나에서)은 최대 일치; 5 개 이하 또는 2 개 이하의 갭 길이를 허용한다. 대안적으로, 2 개의 단백질 서열(또는 적어도 30 개 아미노산 길이의 서열로부터 유래된 폴리펩티드 서열)은 돌연변이 데이터 매트릭스 및 6 이상의 갭 패널티가 있는 프로그램 ALIGN을 사용하여 5 초과(표준 편차 단위)의 정렬 점수를 갖는 경우, 이 용어가 본원에 사용된 바와 같이 상동성이다. 2 개 서열 또는 이의 부분은 아미노산이 ALIGN 프로그램을 사용하여 최적으로 정렬된 경우 50% 이상 동일한 경우 더 상동성이다.

[0040] 용어 "에 상응하는"은 폴리뉴클레오타이드 서열이 참조 폴리뉴클레오타이드 서열의 전부 또는 일부에 구조적으로 관련되거나, 또는 폴리펩티드 서열이 참조 폴리펩티드 서열의 전부 또는 일부와 구조적으로 관련되는, 예를 들어, 이들이 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 이상, 예를 들어, 99% 또는 100%, 서열 동일성을 가짐을 의미하는 것으로 본원에서 사용된다. 대조적으로, 용어 "에 상보적인"은 상보적 서열이 참조 폴리뉴클레오타이드 서열의 전부 또는 일부에 상동성을 의미하는 것으로 본원에서 사용된다. 예시를 위해, 뉴클레오타이드 서열 "TATAC"는 참조 서열 "TATAC"에 상응하고 참조 서열 "GTATA"에 상보적이다.

[0041] 용어 "서열 동일성"은 2 개의 폴리뉴클레오타이드 서열이 비교 창에 걸쳐 동일함(즉, 뉴클레오타이드 간의 기준으로)을 의미한다. 용어 "서열 동일성의 백분율"은 2 개의 폴리뉴클레오타이드 서열이 비교 창에 걸쳐 동일함(즉, 뉴클레오타이드 간의 기준으로)을 의미한다. 용어 "서열 동일성의 백분율"은 비교 창에 걸쳐 2 개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하고, 동일한 핵산 염기(예를 들어, A, T, C, G, U, 또는 I)가 두 서열에서 발생하는 위치의 수를 결정하여 일치된 위치의 수를 산출하고, 일치된 위치의 수를 비교 창(즉, 창 크기)에서 위치의 총 수로 나누고, 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "실질적 동일성"은 폴리뉴클레오타이드 서열의 특성을 나타내며, 여기서 폴리뉴클레오타이드는 적어도 20 개 뉴클레오타이드 위치의 비교 창에 걸쳐, 빈번하게는 적어도 20-50 개 뉴클레오타이드의 창에 걸쳐 참조 서열과 비교하여 적어도 85 퍼센트 서열 동일성, 예를 들어, 적어도 90 내지 95 퍼센트 서열 동일성, 또는 적어도 99 퍼센트 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 여기서 서열 동일성의 백분율은 참조 서열을 비교 창에 걸쳐 참조 서열의 총 20 퍼센트 이하인 결실 또는 부가를 포함할 수 있는 폴리뉴클레오타이드 서열과 비교함으로써 계산된다.

[0042] "보존적" 아미노산 치환은 예를 들어, 극성 산성 아미노산으로서 아스파르트산-글루탐산; 극성 염기성 아미노산으로서 리신/아르기닌/히스티딘; 비극성 또는 소수성 아미노산으로서 류신/이소류신/메티오닌/발린/알라닌/글리신/프롤린; 극성 또는 비하전된 친수성 아미노산으로서 세린/ 트레오닌이다. 보존적 아미노산 치환은 또한 측쇄에 기반한 그룹화를 포함한다. 예를 들어, 지방족 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신이고; 지방족-하이드록실 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 세린 및 트레오닌이고; 아미드-함유 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 아스파라긴 및 글루타민이고; 방향족 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판이고; 염기성 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 리신, 아르기닌, 및 히스티딘이고; 황-함유 측쇄를 갖는 아미노산의 그룹은 시스테인 및 메티오닌이다. 예를 들어, 류신을 이소류신 또는 발린으로, 아스파르테이트를 글루타메이트로, 트레오닌을 세린으로 대체하거나, 또는 아미노산을 구조적으로 관련된 아미노산으로 유사하게 대체하는 것은 생성된 폴리펩티드의 특성에 대한 주요 효과를 갖지 않을 것으로 예상하는 것이 합리적이다. 아미노산 변화가 기능적 폴리펩티드를 초래하는지 여부는 폴리펩티드의 특이적 활성을 검정함으로써 용이하게 결정될 수 있다. 자연 발생 잔기는 공통 측쇄 특성에 기반하여 다음 그룹으로 나뉜다: (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile; (2) 중성 친수성: cys, ser, thr; (3) 산성: asp, glu; (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg; (5) 측쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및 (6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0043] 본 개시내용은 또한 비-보존적 치환을 갖는 폴리펩티드를 구상한다. 비-보존적 치환은 상기 기재된 부류의 하나의 구성원을 다른 것으로 교환하는 것을 수반한다.

[0044] 이론적 근거

[0045] 기존 약물은 AD의 기저 질환 과정에 거의 영향을 미치지 않고 현재 이용가능한 예방적 요법은 없다. AD에 대한 효과적인 요법이 없기 때문에, AD에 대한 효과적인 요법은 중요한 진전이 될 것이다(Conrado 등, 2020). 전 세계적으로, 65 세 초과 개인의 6%에 영향을 미치는 AD의 대략 3500만 건의 사례가 있으며(Fann 등, 2018), 연간 190만 명 사망의 주된 원인이다(Collaborators GBDD, 2019; Hebert 등, 2013). 미국에서는, 연간 122,000 명이상이 사망한다. 미국에서 AD 환자를 돌보는 데 추정되는 재정적 부담은 연간 3050억 달러이다. APOE4 대립 유전자는 전 세계 인구의 13.7%를 나타내고 AD 환자에서 훨씬 더 높은 빈도를 나타낸다(Safieh 등, 2019). APOE4의 유전은 조기 인지 저하, 조기 AD 발병 및 조기 사망과 함께 더 심각한 질환과 연관되어 있다(Safieh 등, 2019; Williams 2020; Raber 등, 2004). 아밀로이드, 타우 및 다른 병리에서 지시된 AD에 대한 요법에 많은 시도가 있었다. APOE4 대립유전자의 유전은 후기 발병 AD의 발생에 대한 가장 강력한 유전적 위험 인자를 나타내는 반면, APOE2 대립유전자는 보호된다. 내인성 APOE4 발현을 감소시키면서 APOE2를 영구적으로 전달하는 유전자 요법은 APOE4 동형접합 개체를 APOE4 발현이 저하된 APOE2/4 이형접합체로 효과적으로 전환시켜, AD 발생 위험을 실질적으로 줄일 수 있다. 추가의 APOE4 동형접합 개체는 증상 개시 몇 년 전에 그들의 유전자형에 따라 AAV 유전자 요법을 받을 수 있다. 본 전략은 APOE3ChC 변이체가 조기 발병 AD가 발생하는 PSEN1-E290A 혈통에서 개체를 보호하였다는 관찰을 활용하여 전략 개발을 나타낸다(Arboleda-Velasquez 등, 2019). APOE3ChC 및 APOE2ChC의 AAV-매개 유전자 이동은 아밀로이드 및/또는 타우 병리에서 효과적일 수 있으며, APOE2 단독의 AAV 전달보다 더 효과적일 수 있다.

[0046] APOE4가 아밀로이드 및 타우-기반 AD 병리에 대한 위험을 향상시킨다는 지식에 기반하여, APOE2를 사용한 CNS 유전자 요법이 마우스 모델에서 APOE4-기반 AD 병리를 예방할 수 있다는 것을 입증하였다(Zhao 등, 2016; Shi 등, 2017; Dodart 등, 2005; Hudry 등, 2013). 이 제안의 주요 혁신은 독특한 임상 관찰(Arboleda-Velasquez 등, 2019)을 더 효과적인 2세대 유전자 요법으로 전환하는 것이다. APOE 유전자형이 AD의 발병기전에서 중요한 역할을 한다는 것을 입증하는 광범위한 역학 데이터가 있으며, APOE2는 AD-관련된 병리의 발병 위험을 보호하고 APOE4는 증가시킨다(Corder 등, 1994; Raber 2004; Genin 등, 2011; Sando 등, 2008). 콜롬비아 PSEN1-E290A 혈통의 개체가 동형접합 APOE3ChC의 동형접합 공동 유전에 의해 조기 발병 AD 발생을 예방하였다는 관찰은 APOE4 동형접합체의 CNS의 유전적 변형에 기반한 APOE3ChC 유전자 요법을 야기하여 APOE4-구동된 AD-관련 병리의 높은 위험을 예방하였다. 추가로, APOE2를 사용한 유전자 요법이 E4-구동된 아밀로이드 관련 병리를 억제한다는 것을 입증하는 이전 연구에 기반하여, APOE2ChC 유전자 요법은 APOE4-구동된 아밀로이드 및 타우 병리를 둘 다 예방할 수 있으며 APOE2 또는 APOE3ChC보다 더 효과적으로 예방할 수 있다.

[0047] 예시적인 APOE 핵산 및 아미노산 서열

[0048] 아포지질단백질 E(APOE)는 체내에서 지방 대사에 수반되는 299 개 아미노산 단백질이다. 이는 트리글리세리드 풍부한 지단백질의 정상적인 처리에 중요한 저밀도 지단백질 수용체(LDLR)와 상호작용하고 지방에 결합하는 단백질 패밀리아이다. 말초 조직에서, APOE는 간 및 대식세포에 의해 생산되고, 콜레스테롤 대사를 매개한다. 중추신경계에서, APOE는 성상세포에 의해 생산되고 LDLR 패밀리의 구성원인 APO 수용체를 통해 콜레스테롤을 뉴런으로 수송한다. 3 개의 주요한 APOE 대립유전자인 APOE2(Cys 112, Cys 158), APOE3(Cys112, Arg158) 및 APOE4(Arg112, Arg158)가 있다.

[0049] 예시적인 인간 APOE 서열은 다음을 포함하나 이에 제한되지 않으며:

```
mkvltwaallv tllagcqakv eqavetepep elrqqtewqs gqrwelalgr fwdylrwwqt
lseqvqeell ssqvqeirla lmdetmkeik aykseleeeql tpvaeetrar lskelqaaqa
rigadmedvc grlvqyrgev qarnlgqstee lrvlshlr kirkrlrda ddiqlrlavy
qagaregaer glsairelrg plveqgrvra atvgslagqp lqeraqawge rlrarmeemg
srtrdrdev keqvaevrak leeqaqqirl qaeafqarik swfeplvedm qrqwagivek
vqaavgtsaa pvpsdnh(서열번호:1)
```

[0050]

[0051] 뿐만 아니라 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 이상, 예를 들어, 99% 또는 100%, 서열 동일성을 갖는 서열,

[0052] 여기서 일 구현예에서, APOE4는 31K, 46P, 79T, 130R, 163C, 292H 및/또는 314R을 가질 수 있고, APOE2는 43C,

152Q, 154C/S, 163C/P, 164Q, 172A, 176C, 242Q, 246C, 254E를 가질 수 있다.

[0053] 예시적인 인간 APOE 서열, 예를 들어, APOE2를 암호화하는 경우 침묵 뉴클레오타이드 치환을 위한 서열은 다음을 포함하나 이에 제한되지 않거나:

```
ggaactlga gclcagagag gacaagtcac ttgcccagg tcacacagct ggcaactggc
agagccagga ttacgccc ttgcaattga clccagaatc ctaacctaa cccagaagca
cggctcaag cccctggaaa ccacaatacc tgtggcagcc agggggaggt gctggaatct
catttcacat gtggggaggg ggctccctg tgcacaaggt cacaaccaa gaggaagctg
tgattaaaa ccaggtccca ttgcaaagc ctgactttt agcaggtgca tcatactgtt
cccacccctc ccatccact tctgtccagc cgcctagccc cactttttt tttttttt
ttgagacag tctccctct gctgaggctg gagtgcagtg gcgagatctc ggctcactgt
aacctccgcc tcccgggtc aagcgatct cctgcctcag cclcccaagi agctaggatt
acaggcgccc gccaccacgc ctggctaact ttgtatttt tagtagagat ggggtttcac
catgttgcc aggtctgtct caaactcctg accttaagtg atcgcaccac tgggctcc
caaagtgtg ggattacagg cgtgagctac cgcgccagc cctcccatc ccactictgt
ccagccccc agccctacti lcttctggg atccaggagt ccagatccc agcccccct
ccagattaca tcatccagg cacaggaaag gacagggtca ggaaaggagg actctgggag
gcagcctcca catlccctt ccacgttg cccccagaat ggaggagggt gctgggatta
ctggcgagg tgcctccct tctggggac tgtgggggt ggtcaaaaga cctctatgcc
ccacctctt cctccctg cctgtgtg cctggggcag ggggagaaca gccacctcg
tgactggggg ctggccagc cgcctctatc cctgggggag gggcggggac agggggagcc
ctataattg acaagtctg gatcctgag tctactcag cccagcgga ggtgaaggac
gtccttccc aggagccg (서열번호:2)
```

[0054]

또는

[0055]

```
ccccagcga ggtgaaggac gtccttccc aggagccgac tggccaatca caggcaggaa
gatgaaggt ctgtggctg cgtgtctgt cacattctg gcaggatgcc aggccaaggt
ggagcaagcg gtggagacag agccggagcc ctagctgcg cagcagaccg agtggcagag
cggccagcgc tgggaactgg cactgggtg ctttgggat tacctgcgt ggggtcagac
actgtctgag cagggtcagg aggagctgt cagctccaa gtcaccaag aactgaggc
gctgatggac gagaccatga aggagtgaa ggctacaaa tcggaactgg aggaacaact
gaccccgga gcgaggaga cgcgggcacg gctgtccaa gagctgcaga cggcgaggc
ccggtgggc ggggacatgg aggacgtgt cggccgctg gtgcaglac cggcgagggt
gcaggccatg ctggccaga gcaccgagga gctgcgggtg cgcctgcct cccactgcg
caagctgct aagcggctc tccgcgatc cgtgacctg cagaagcgcc tggcagtga
ccaggccggg gcccgagag gcgccgagc cggccicag gccatcccg agcgcctggg
gcccctggt gaacaggggc gcgtgcgggc cgcactgtg ggctccctg cggccagcc
gctacaggag cgggcccagg cctggggcga gcggctgcg gcgaggatg aggagatggg
cagtcggacc cgcgaccgcc tggacagggt gaaggagcag gtggcgagg tgcgcgcaa
gctggaggag caggcccagc agatacgct gcaggccgag gcttccagg cccgcctcaa
gagctggtc gagccctg tgaagacat gcagcgccag tggcgggc tggtgagaa
ggtgcaggct gcgtggga ccagcgccg cctgtgccc agcgacaatc actgaacgc
```

[0056]

```
gaagcctgca gccatgcgac cccacgcac ccgtgctc ctgctccgc gcagcctgca
gcgggagacc ctgtcccg cccagccgtc ctctgggt ggacctagt ttaataaaga
ttaccaagt ttacgc(서열번호:3)
```

[0057]

[0058]

또는

MKVLWAALLVTFLAGCQAKVEQAVETEPEPELRRQTEWQSGQRWELALGRFWDYLRWWQTLSEQVQE
ELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARLSKELQTAQARLGADMEDVCGRLVQY
RGEVQAMLGGSTEELRVRLASHLRKLRKLLRDPDDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQ
GRVRAATVGSAGQPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTDRLEDEVKEQVAEVRKLEEQAQIRLQA
EAFQARLKSWFEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH (서열번호:4)

[0059]

[0060]

뿐만 아니라 APOE를 암호화하는 서열에 대해 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 이상, 예를 들어, 99% 또는 100%, 서열 동일성을 갖는 서열을 갖는다.

[0061]

다른 예시적인 APOE 서열은 다음을 포함한다:

mkvliwaallv tflagcqakv eqavetepep elrqqtewqs gqrwelaigr fwdylrwwqt lseqvqeeli ssqvtqelra lmdetmkelk
aykseleeql tpvaeetrar lskelqaaqa rgadmedvc grlvqyrgev qamlgqstee lrvlshlr klrklrlda ddiqkravly
qagaregaer glsairerig plveqgrvra atvgslagqp lqeraqawge rlrarmeemg srtrdrdev keqvaevrak leeqaqqirl
qaeafqarik swfeplvedm qrwagivek vqaavgtsaa pvpsdnh (서열번호:5);
mkvliwaallv tflagcqakv eqavetepep elrqqtewqs gqrwelaigr fwdylrwwqt lseqvqeeli ssqvtqelra lmdetmkelk
aykseleeql tpvaeetrar lskelqaaqa rgadmedvc grlvqyrgev qamlgqstee lrvlshlr klrklrlda ddiqkravly
qagaregaer glsairerig plveqgrvra atvgslagqp lqeraqawge rlrarmeemg srtrdrdev keqvaevrak leeqaqqirl
qaeafqarik swfeplvedm qrwagivek vqaavgtsaa pvpsdnh (서열번호:6);
mkvliwaallv tflagcqakv eqavetepep elrqqtewqs gqrwelaigr fwdylrwwqt lseqvqeeli ssqvtqelra lmdetmkelk
aykseleeql tpvaeetrar lskelqaaqa rgadmedvc grlvqyrgev qamlgqstee lrvlshlr klrklrlda ddiqkravly
qagaregaer glsairerig plveqgrvra atvgslagqp lqeraqawge rlrarmeemg srtrdrdev keqvaevrak leeqaqqirl
qaeafqarik swfeplvedm qrwagivek vqaavgtsaa pvpsdnh (서열번호:7).

[0062]

[0063]

위치 112 및 158의 경우, E2는 2 개의 시스템인 잔기를 함유하고, E3은 시스템인 및 아르기닌을 함유하고, E4는 두 부위 모두에서 아르기닌 잔기를 함유한다. 일 구현예에서, AAV 벡터는 ApoE2 또는 ApoE3 배경에서 크라이스트처치 돌연변이를 발현하도록 제조된다. 벡터는 야생형 및 질환 모델 마우스에 도입될 수 있고, 효능의 발현 및 생물학적 척도가 결정된다.

[0064]

유전자 전달 벡터

[0065]

본 발명의 범위 내의 유전자 전달 벡터는 단리된 핵산, 예를 들어, 염색체외로 유지될 수 있는 플라스미드-기반 벡터, 및 리포솜, 예를 들어, 중성 또는 양이온성 리포솜, 예컨대 DOSPA/DOPE, DOGS/DOPE 또는 DMRIE/DOPE 리포솜에 존재하고/하거나, DNA-항-DNA 항체-양이온성 지질(DOTMA/DOPE) 복합체와 같은 다른 분자와 회합된 바이러스 및 비바이러스 벡터를 포함한 바이러스 벡터, 예를 들어, 재조합 아데노바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스바이러스, 폭스바이러스, 유두종 바이러스, 또는 아데노 연관 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 유전자 요법 벡터는 본원에 개시된 바와 같이, APOE, RNAi, 및/또는 항체 또는 이의단편을 암호화할 수 있다. 예시적인 바이러스 유전자 전달 벡터는 하기에 기재되어 있다. 유전자 전달 벡터는 두개내, 척추강내, 근육내, 협측, 직장, 정맥내 또는 관상동맥내 투여를 포함하나 이제 제한되지 않는 임의의 경로를 통해 투여될 수 있고, 세포로의 이동은 전기천공 및/또는 이온운동, 및/또는 세포의 매트릭스 또는 하이드로겔, 예를 들어, 하이드로겔 패치와 같은 스캐폴딩을 사용하여 향상될 수 있다. 일 구현예에서, 투과 강화제는 CNS로의 간접 전달을 향상시키는 데 이용되지 않는다.

[0066]

레트로바이러스 벡터

[0067]

레트로바이러스 벡터는 장기간 이식유전자 발현을 제공하는 숙주 게놈 내로 안정적이고 정확하게 통합하는 능력을 포함한 여러 독특한 특징을 나타낸다. 이들 벡터는 전신 감염 및 환자간 전파 위험을 최소화하도록 감염성 유전자 입자를 제거하기 위해 생체외에서 조작될 수 있다. 위험 레트로바이러스 벡터는 숙주 세포 형성을 변경할 수 있다.

[0068]

렌티바이러스

[0069]

렌티바이러스는 인간 면역결핍 바이러스 및 고양이 면역결핍 바이러스를 포함하는 레트로바이러스의 패밀리로부터 유래된다. 그러나, 분열 세포만을 감염시키는 레트로바이러스와는 달리, 렌티바이러스는 분열 및 비분열 세포를 둘 다 감염시킬 수 있다. 예를 들면, 인간 면역결핍 바이러스 게놈에 기반한 렌티바이러스 벡터는 생체내에서 심장 근세포를 효율적으로 형질도입할 수 있다. 렌티바이러스는 특이적 형성을 갖지만, 바이러스 외피를

수포성 구내염 바이러스로 위형화하는 것은 바이러스를 더 광범위한 범위로 산출한다(Schnepp 등, *Meth. Mol. Med.*, 69:427 (2002)).

[0070] 아데노바이러스 벡터

[0071] 아데노바이러스 벡터는 계놈으로부터 바이러스 유전자 발현을 담당하는 초기(E1A 및 E1B) 유전자를 결실시킴으로써 복제-부적격으로 만들 수 있고 염색체의 형태로 숙주 세포 내에 안정하게 유지된다. 이들 벡터는 복제 및 비복제 세포 둘 다를 형질감염시키는 능력을 가지며, 특히, 이들 벡터는 예를 들어, 직접 주사 또는 주입 후 생체내에서 심장 근세포를 효율적으로 감염시키는 것으로 나타났다. 아데노바이러스 벡터는 생체내에서 치료 유전자의 일시적인 발현을 초래하는 것으로 나타났으며, 7 일에 최고점에 달하고 대략 4 주 동안 지속된다. 이식 유전자 발현의 지속기간은 신경 특이적 프로모터를 활용하여 시스템에서 개선될 수 있다. 게다가, 아데노바이러스 벡터는 매우 높은 역가로 생산될 수 있어서, 작은 부피의 바이러스로 효율적인 유전자 이동을 허용한다.

[0072] 아데노 연관 바이러스 벡터

[0073] 재조합 아데노 연관 바이러스(rAAV)는 비병원성 파코바이러스로부터 유래되고, 본질적으로 세포 면역 반응을 재현하지 않고, 대부분의 시스템에서 수개월 동안 지속되는 이식유전자 발현을 생산한다. 더욱이, 아데노바이러스와 마찬가지로, 아데노 연관 바이러스 벡터는 또한 복제 및 비복제 세포를 감염시키는 능력을 가지며 인간에게 비병원성인 것으로 여겨진다. 더욱이, 이들은 지속된 심장 유전자 이동에 대해 유망한 것으로 보인다(Hoshijima 등, *Nat. Med.*, 8:864 (2002); Lynch 등, *Circ. Res.*, 80:197 (1997)).

[0074] AAV 벡터는 AAV 계놈이 캡시드와 상이한 공급원으로부터 유래되는 키메라 바이러스를 포함하여, AAV1, AAV2, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9 또는 AAVrh10을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0075] 플라스미드 DNA 벡터

[0076] 플라스미드 DNA는 종종 더 정교한 패키징 시스템의 부재를 나타내기 위해 "네이키드 DNA"로서 지칭된다. 생체내에서 심근 세포에 플라스미드 DNA의 직접 주사가 달성되었다. 플라스미드-기반 벡터는 비교적 비면역원성 및 비병원성이며, 세포 계놈에서 안정하게 통합할 가능성이 있어, 생체내에서 유사분열 후 세포의 장기간 유전자 발현을 초래한다. 예를 들어, 플라스미드 DNA의 근육 주사 후 분비된 혈관신생 인자의 발현은, 비교적 낮은 수준의 국소 이식유전자 발현에도 불구하고, 동물 모델에서 유의한 생물학적 효과를 입증하였으며 임상적으로 유망한 것으로 보인다(Isner, *Nature*, 415:234 (2002)). 또한, 플라스미드 DNA는 혈류에서 빠르게 분해되며; 따라서, 멀리 있는 기관 시스템에서 이식유전자 발현의 기회는 무시할 수 있다. 플라스미드 DNA는 거대분자 복합체, 예를 들어, 리포솜 또는 DNA-단백질 복합체의 일부로서 세포에 전달될 수 있으며, 예를 들어, 하기를 참조하고, 전달은 전기천공을 포함한 기술을 사용하여 향상될 수 있다.

[0077] 예시적인 비바이러스 제형

[0078] 예를 들어, 보호 APOE 발현을 위한 단리된 핵산, 항체 발현을 위한 벡터, 또는 RNAi 발현을 위한 벡터를 포함하는 생분해성 입자는 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), PLA 및 PGA의 공중합체(즉, 폴리락트산-코-글리콜산(PLGA)), 폴리-ε-카프로락톤(PCL), 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(3-하이드록시부티레이트), 폴리(p-디옥사논), 폴리프로필렌 푸마레이트, 폴리(오르토에스테르), 폴리올/디케텐 아세탈 부가 중합체, 폴리-알킬-시아노-아크릴레이트(PAC), 폴리(세박산 무수물)(PSA), 폴리(카르복시비스카르복시페녹시페녹시 핵손(PCPP) 폴리[비스(p-카르복시페녹시)메탄](PCPM), PSA, PCPP 및 PCPM의 공중합체, 폴리(아미노산), 폴리(슈도 아미노산), 폴리포스파젠, 폴리[(디클로로)포스파젠] 및 폴리[(오르가노)포스파젠]의 유도체, 폴리-하이드록시부티르산, 또는 S-카프로산, 엘라스틴, 또는 젤라틴을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는 생분해성 중합체성 분자를 포함할 수 있거나 또는 이로부터 형성될 수 있다. (예를 들어, Kumari 등, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75 (2010) 1-18; 및 미국 특허 번호 6,913,767; 6,884,435; 6,565,777; 6,534,092; 6,528,087; 6,379,704; 6,309,569; 6,264,987; 6,210,707; 6,090,925; 6,022,564; 5,981,719; 5,871,747; 5,723,269; 5,603,960; 및 5,578,709; 및 미국 공개 출원 번호 2007/0081972; 및 국제 출원 공개 번호 WO 2012/115806; 및 WO 2012/054425를 참조하며; 이의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다).

[0079] 생분해성 나노입자는 당업계에 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. (예를 들어, Nagavarma 등, *Asian J. of Pharma. And Clin. Res.*, Vol 5, Suppl 3, 2012, pages 16-23; Cismaru 등, *Rev. Roum. Chim.*, 2010, 55(8), 433-442; 및 국제 출원 공개 번호 WO 2012/115806; 및 WO 2012/054425를 참조하여; 이의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다). 나노입자를 제조하기 위한 적합한 방법은 용매 증발, 나노침전, 유화/용매 확산, 염석, 투석, 및 초임계 유체 기술을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는, 미리형성된 중합체의 분산을 활용하

는 방법을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 나노입자는 이중 에멀전(예를 들어, 수중유중수)를 형성하고 후속적으로 용매 증발을 수행함으로써 제조될 수 있다. 개시된 방법에 의해 수득된 나노입자는 원하는 경우 세척 및 동결건조와 같은 추가 처리 단계를 거칠 수 있다. 임의적으로, 나노입자는 보존제(예를 들어, 트레할로스)와 조합될 수 있다.

[0080] 전형적으로, 나노입자는 1 미크론 미만의 평균 유효 직경을 가지며, 예를 들어, 나노입자는 약 25 nm 내지 약 500 nm, 예를 들어, 약 50 nm 내지 약 250 nm, 약 100 nm 내지 약 150 nm, 또는 약 450 nm 내지 650 nm의 평균 유효 직경을 갖는다. 입자 크기(예를 들어, 평균 유효 직경)는 당업계에 알려진 방법에 의해 평가될 수 있으며, 이는 투과 전자 현미경(TEM), 주사 전자 현미경(SEM), 원자간력 현미경(AFM), 광자상관법(PCS), 나노입자 표면적 모니터(NSAM), 응축 입자 계수기(CPC), 미분형 이동도 분석기(DMA), 이동성 입자 주사 정립기(SMPS), 나노입자 추적 분석(NTA), X선 회절(XRD), 에어로졸 비행시간 질량 분광계(ATFMS), 및 에어로졸 입자 질량 분석기(APM)를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0081] 생분해성 나노입자는 표적 세포에 의한 흡수를 용이하게 하는 제타-전위를 가질 수 있다. 전형적으로, 나노입자는 0 초과의 제타-전위를 갖는다. 일부 구현예에서, 나노입자는 약 5 mV 내지 약 45 mV, 약 15 mV 내지 약 35 mV, 또는 약 20 mV 내지 약 40 mV의 제타-전위를 갖는다. 제타-전위는 전기영동 이동도 또는 동적 전기영동 이동도를 포함하는 특성을 통해 결정될 수 있다. 동전기적 현상 및 전기음향적 현상이 제타-전위를 계산하는데 활용될 수 있다.

[0082] 일 구현예에서, 비바이러스 전달 비히클은 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리락트산(PLA), 상이한 분자량(예를 들어, 2, 22 및 25 kDa)을 갖는 선형 및/또는 분지형 PEI, 폴리아미도아민(PAMAM) 및 폴리메토아크릴레이트와 같은 덴드리머; 양이온성 리포솜, 양이온성 에멀전, DOTAP, DOTMA, DMRIE, DOSPA, 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), DOPE, 또는 DC-콜레스테롤을 포함하나 이에 제한되지 않는 지질; 폴리-L-리신 또는 프로타민을 포함하나 이에 제한되지 않는 펩티드 기반 벡터; 또는 폴리(β -아미노 에스테르), 키토산, PEI-폴리에틸렌글리콜, PEI-만노스-텍스트로스, DOTAP-콜레스테롤 또는 RNAiMAX를 포함하나 이제 제한되지 않는 중합체를 포함한다.

[0083] 일 구현예에서, 전달 비히클은 다양한 폴리뉴클레오티드 유형과 복합체화되고 나노입자를 형성하는 능력을 갖는 당중합체-기반 전달 비히클인 폴리(글루코아미도아민)(PGAA)이다. 이들 물질은 다양한 탄수화물(D-글루카레이트(D), ~~매~~조-갈락타레이트(G), D-만나레이트(M), 및 L-타르타레이트(T))의 메틸에스테르 또는 락톤 유도체를 일련의 올리고에틸렌아민 단량체(1-4 개의 에틸렌아민 함유와 중합함으로써 생성된다(Liu 및 Reineke, 2006)). 이러한 탄수화물 및 중합체 반복 단위의 4 개 에틸렌아민으로 구성된 하위집합은 예외적인 전달 효율을 산출하였다.

[0084] 일 구현예에서, 전달 비히클은 폴리에틸렌아민(PEI), 폴리아미도아민(PAMAM), PEI-PEG, PEI-PEG-만노스, 텍스트란-PEI, OVA 접합체, PLGA 마이크로입자, 또는 PAMAM으로 코팅된 PLGA 마이크로입자, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 개시된 양이온성 중합체는 폴리아미도아민(PAMAM) 덴드리머를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 현재 개시된 나노입자를 제조하기에 적합한 폴리아미도아민 덴드리머는 3세대, 4세대, 5세대, 또는 적어도 6세대 덴드리머를 포함할 수 있다.

[0085] 일 구현예에서, 전달 비히클은 지질, 예를 들어, *N*-[1-(2,3-디올레오일옥시)프로필]-*N,N,N*-트리메틸암모늄(DOTMA), 2,3-디올레오일-*N*-[2-스페르민 카복사미드] 에틸-*N,N*-디메틸-1-프로판암모늄 트리플루오르아세테이트(DOSPA, 리포펙타민(Lipofectamine)); 1,2-디올레일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP); *N*-[1-(2,3-디미리스틀록시) 프로필]; *N,N*-디메틸-*N*-(2-하이드록시에틸) 암모늄 브로마이드(DMRIE), 3- β -[*N*-(*N,N'*-디메틸아미노에탄) 카바모일] 콜레스테롤(DC-Chol); 디옥타데실 아미도글리세릴 스페르민(DOGS, 트랜스펙탐(Transfectam)); 또는 이메틸디옥타데킬암모늄 브로마이드(DDAB)를 포함한다. 양이온성 지질의 양으로 하전된 친수성 헤드기는 일반적으로 3차 및 4차 아민과 같은 모노아민, 폴리아민, 아미디늄, 또는 구아니디늄 기로 이루어진다. 일련의 피리디늄 지질이 개발되었다(Zhu 등, 2008; van der Woude 등, 1997; Ilies 등, 2004). 피리디늄 양이온성 지질 이외에, 다른 유형의 헤테로환형 헤드기는 이미다졸, 피페리딘 및 아미노산을 포함한다. 양이온성 헤드기의 주요 기능은 정전기적 상호작용에 의해 음으로 하전된 핵산을 약간 양으로 하전된 나노입자에 응축시켜, 세포 흡수 및 엔도솜 탈출을 향상시키는 것이다.

[0086] DOTMA, DOTAP 및 SAINT-2, 또는 DODAC와 같은 2 개의 선형 지방산 쇄를 갖는 지질은 전달 비히클, 뿐만 아니라 *N,N*-디올레일-*N,N*-디메틸암모늄 클로라이드(DODAC)의 이량체인 테트라알킬 지질 쇄 계면활성제로서 이용될 수 있다. 모든 트랜스-배향된 지질은 소수성 쇄 길이(C_{16:1}, C_{18:1} 및 C_{20:1})에 관계없이 시스-배향된 대응물과 비교

하여 형질감염 효율을 향상시키는 것으로 보인다.

- [0087] 전달 비히클로서 유용한 양이온성 중합체의 구조는 키토산 및 선형 폴리(에틸렌이민)과 같은 선형 중합체, 분지형 폴리(에틸렌이민)(PEI)과 같은 분지형 중합체, 사이클로테스트린과 같은 원형-유사 중합체, 가교된 폴리(아미노산)(PAA)과 같은 네트워크(가교된) 유형 중합체, 및 덴드리머를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 덴드리머는 중심 코어 분자로 이루어지며, 이로부터 여러 고도로 분지된 아암(arm)이 '성장'하여 대칭 또는 비대칭 방식으로 나무-유사 구조를 형성한다. 덴드리머의 예는 폴리아미도아민(PAMAM) 및 폴리프로필렌이민(PPI) 덴드리머를 포함한다.
- [0088] DOPE 및 콜레스테롤은 통상적으로 양이온성 리포솜을 제조하기 위한 중성 공동-지질로 사용된다. 분지형 PEI-콜레스테롤 수용성 지질중합체 접합체는 양이온성 미셀로 자기-조립한다. 비이온성 중합체인 플루로닉(플록사머), 및 플루로닉 L61 및 F127의 조합인 SP1017이 또한 사용될 수 있다.
- [0089] 일 구현예에서, PLL과의 복합체 형성이 또한 캡슐화 효율을 증가시킬 수 있지만, PLGA 입자를 이용하여 캡슐화 빈도를 증가시킨다. 다른 양이온성 물질, 예를 들어, PEI, DOTMA, DC-Chol, 또는 CTAB를 사용하여 나노구체를 만들 수 있다.
- [0090] 일 구현예에서, 복합체는 플록사머의 하이드로겔, 폴리아크릴아미드, 폴리(2-하이드록시에틸 메타크릴레이트), 카르복시비닐-중합체(예를 들어, 카르보폴(Carbopol) 934, Goodrich Chemical Co.), 셀룰로스 유도체, 예를 들어, 메틸셀룰로스, 셀룰로스 아세테이트 및 하이드록시프로필 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈 또는 폴리비닐 알코올, 또는 이의 조합을 포함하나 이에 제한되지 않는 물질에 내포되거나 또는 적용된다.
- [0091] 일부 구현예에서, 생체적합성 중합체성 물질은 콜라겐, 예를 들어, 하이드록실화 콜라겐, 피브린, 폴리락트산-폴리글리콜산, 또는 폴리무수물과 같은 생분해성 중합체로부터 유래된다. 다른 예는 제한없이 친수성, 소수성, 또는 양친매성 여부에 관계없이 임의의 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트 공중합체(EVA), 폴리메틸 메타크릴레이트, 폴리아미드, 폴리카르보네이트, 폴리에스테르, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드, 폴리테트라플루오로에틸렌, N-이소프로필아크릴아미드 공중합체, 폴리(에틸렌 옥사이드)/폴리(프로필렌 옥사이드) 블록 공중합체, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(D,L-락티드-코-글리콜리드) 블록 공중합체, 폴리글리콜리드, 폴리락티드(PLLA 또는 PDLA), 폴리(카프로락톤)(PCL), 또는 폴리(디옥사논)(PPS)을 포함한다.
- [0092] 또 다른 구현예에서, 생체적합성 물질은 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리에틸렌 옥사이드 및 폴리프로필렌 옥사이드의 공중합체, 폴리글리콜산 및 폴리하이드록시알카노에이트의 조합, 젤라틴, 알기네이트, 폴리-3-하이드록시부티레이트, 폴리-4-하이드록시부티레이트, 및 폴리하이드록시옥타노에이트, 및 폴리아크릴로니트릴폴리비닐클로라이드를 포함한다.
- [0093] 일 구현예에서, 하기 중합체, 예를 들어, 천연 중합체 예컨대 전분, 키틴, 글리코사미노글리칸, 예를 들어, 히알루론산, 데르마탄 술페이트 및 크론드로틴 술페이트, 및 미생물 폴리에스테르, 예를 들어, 하이드록시알카노에이트 예컨대 하이드록시발레레이트 및 하이드록시부티레이트 공중합체, 및 합성 중합체, 예를 들어, 폴리(오르토에스테르) 및 폴리무수물이 이용될 수 있으며, 글리콜리드 및 락티드의 단독중합체 및 공중합체(예를 들어, 폴리(L-락티드, 폴리(L-락티드-코-D,L-락티드), 폴리(L-락티드-코-글리콜리드, 폴리글리콜리드 및 폴리(D,L-락티드), 폴(D,L-락티드-코글리콜리드), 폴리(락트산 폴리신) 및 폴리카프로락톤을 포함한다.
- [0094] 일 구현예에서, 생체적합성 물질은 단리된 세포외 기질(ECM)로부터 유래된다. ECM은 다양한 세포 집단, 조직 및/또는 기관의 내피 층, 예를 들어, 온혈 척추동물의 피부, 간, 소화기, 호흡기, 장, 비뇨기 또는 생식관의 진피를 포함한 임의의 기관 또는 조직 공급원으로부터 단리될 수 있다. 본 발명에 이용되는 ECM은 공급원의 조합으로부터 유래될 수 있다. 단리된 ECM은 시트, 미립자 형태, 겔 형태 등으로 제조될 수 있다.
- [0095] 생체적합성 스캐폴드 중합체는 실크, 엘라스틴, 키틴, 키토산, 폴리(d-하이드록시산), 폴리(무수물), 또는 폴리(오르토에스테르)를 포함할 수 있다. 보다 특히, 생체적합성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리(락트산), 폴리(글리콜산), 락트산 및 글리콜산의 공중합체, 락트산 및 글리콜산과 폴리에틸렌 글리콜의 공중합체, 폴리(E-카프로락톤), 폴리(3-하이드록시부티레이트), 폴리(p-디옥사논), 폴리프로필렌 푸마레이트, 폴리(오르토에스테르), 폴리올/디케텐 아세트알 부가 중합체, 폴리(세박산 무수물)(PSA), 폴리(카르복시비스카르복시페녹시페녹시헥손(PCPP) 폴리[비스(p-카르복시페옥소) 메탄](PCPM), SA, CPP 및 CPM의 공중합체, 폴리(아미노산), 폴리(슈도 아미노산), 폴리포스파젠, 폴리[(디클로로)포스파젠] 또는 폴리[(오르가노) 포스파젠]의 유도체, 폴리-하이드록시부티르산, 또는 S-카프로산, 폴리락티드-코-글리콜리드, 폴리락트산, 폴리에틸렌 글리콜, 셀룰로스, 산화된 셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴 또는 이의 유도체로부터 형성될 수 있다.

- [0096] 따라서, 중합체는 자연 발생 중합체, 합성 중합체, 또는 이의 조합을 포함한 중합체를 포함하는 임의의 광범위한 물질로 형성될 수 있다. 일 구현예에서, 스캐폴드는 생분해성 중합체를 포함한다. 일 구현예에서, 자연 발생 생분해성 중합체는 자연 발생 중합체로부터 유래된 합성 생분해성 중합체를 제공하도록 변형될 수 있다. 일 구현예에서, 중합체는 폴리(락트산)("PLA") 또는 폴리(락트산-코-글리콜산)("PLGA")이다. 일 구현예에서, 스캐폴드 중합체는 알기네이트, 키토산, 폴리(2-하이드록시에틸메타크릴레이트), 크실로글루칸, 2-메타크릴로일옥시에틸 포스포릴콜린의 공중합체, 폴리(비닐 알코올), 실리콘, 소수성 폴리에스테르 및 친수성 폴리에스테르, 폴리(락티드-코-글리콜리드), N-이소프로필아크릴아미드 공중합체, 폴리(에틸렌 옥사이드)/폴리(프로필렌 옥사이드), 폴리락트산, 폴리(오르토에스테르), 폴리무수물, 폴리우레탄, 2-하이드록시에틸메타크릴레이트 및 나트륨 메타크릴레이트의 공중합체, 포스포릴콜린, 사이클로데스트린, 폴리술폰 및 폴리비닐피롤리딘, 전분, 폴리-D,L-락트산-과라-디옥사논-폴리에틸렌 글리콜 블록 공중합체, 폴리프로필렌, 폴리(에틸렌 테레프탈레이트), 폴리(테트라플루오로에틸렌), 폴리-엡실론-카프로락톤, 또는 가교된 키토산 하이드로겔을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0097] 대안적으로, 핵산 또는 벡터는 적어도 약 0.0001 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 적어도 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.5 mg/kg, 적어도 약 0.01 mg/kg 내지 약 0.25mg/kg 또는 적어도 약 0.01 mg/kg 내지 약 0.25 mg/체중 kg의 투여량으로 투여될 수 있지만, 다른 투여량이 유익한 결과를 제공할 수 있다.
- [0098] 대안적으로, 핵산 또는 벡터는 적어도 약 0.0001 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 적어도 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.5 mg/kg, 적어도 약 0.01 mg/kg 내지 약 0.25 mg/kg 또는 적어도 약 0.01 mg/kg 내지 약 0.25 mg/체중 kg의 투여량으로 투여될 수 있지만, 다른 투여량이 유익한 결과를 제공할 수 있다.
- [0099] 약제학적 조성물
- [0100] 본 발명은 상기 기재된 유전자 이동 벡터(들) 및 약제학적으로 허용되는(예를 들어, 생리학적으로 허용되는) 담체를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이로 이루어진 조성물을 제공한다. 조성물이 유전자 이동 벡터 및 약제학적으로 허용되는 담체로 본질적으로 이루어진 경우, 조성물에 실질적으로 영향을 미치지 않는 추가의 구성성분(예를 들어, 애주번트(adjutant), 완충제, 안정화제, 항염증제, 가용화제, 보존제 등)이 포함될 수 있다. 조성물이 본 발명의 유전자 이동 벡터 및 약제학적으로 허용되는 담체로 이루어진 경우, 조성물은 임의의 추가 구성성분을 포함하지 않는다. 임의의 적합한 담체가 본 발명의 맥락 내에서 사용될 수 있고, 이러한 담체는 당업계에 알려져 있다. 담체의 선택은 부분적으로 조성물이 투여될 수 있는 특정 부위 및 조성물을 투여하는 데 사용되는 특정 방법에 의해 결정될 것이다. 조성물은 임의적으로 본원에 기재된 유전자 이동 벡터를 제외하고 멸균될 수 있다. 조성물은 저장을 위해 동결 또는 동결건조되고 사용 전에 적합한 멸균 담체에서 재구성될 수 있다. 조성물은 예를 들어, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2001)에 기재된 통상적인 기술에 따라 생성될 수 있다.
- [0101] 조성물에 적합한 제형은 수성 및 비수성 용액, 항산화제, 완충제, 및 세균발육저지제를 함유할 수 있는 등장성 멸균 용액, 및 현탁액, 가용화제, 증점제, 안정화제, 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함한다. 제형은 앰플 및 바이알과 같은 단일 용량 또는 다중 용량 밀봉 용기에 제시될 수 있고, 사용 직전에 멸균 액체 담체, 예를 들어, 물의 첨가만 필요한 동결-건조된(동결건조) 상태로 저장될 수 있다. 즉각적인 용액 및 현탁액은 이전에 기재된 종류의 멸균 분말, 과립, 및 정제로부터 제조될 수 있다. 일 구현예에서, 담체는 완충된 멸균 용액이다. 일 구현예에서, 본 발명의 유전자 이동 벡터는 투여 전에 손상으로부터 유전자 이동 벡터를 보호하도록 제형화된 조성물로 투여된다. 예를 들어, 조성물은 유리제품, 주사기, 또는 바늘과 같이 유전자 이동 벡터를 제조, 저장, 또는 투여하는 데 사용되는 장치에서 유전자 이동 벡터의 손실을 줄이도록 제형화될 수 있다. 조성물은 유전자 이동 벡터의 광 민감도 및/또는 온도 민감도를 감소시키도록 제형화될 수 있다. 이를 위해, 조성물은 상기 기재된 것들과 같은 약제학적으로 허용되는 액체 담체, 및 폴리소르베이트 80, L-아르기닌, 폴리비닐피롤리돈, 트레할로스, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 안정화제를 포함할 수 있다. 이러한 조성물의 사용은 유전자 이동 벡터의 저장 수명을 연장하고, 투여를 용이하게 하고, 본 발명의 방법의 효율을 증가시킬 것이다. 유전자 이동 벡터-함유 조성물을 위한 제형은 예를 들어, Wright 등, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 6(2): 174-178 (2003) 및 Wright 등, *Molecular Therapy*, 12: 171-178 (2005))에 추가로 기재되어 있다.
- [0102] 조성물은 또한 형질도입 효율을 향상시키도록 제형화될 수 있다. 게다가, 당업자는 본 발명의 유전자 이동 벡터가 다른 치료제 또는 생물학적 활성제와 함께 조성물에 존재할 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 이부프로펜 또는 스테로이드와 같은 염증을 제어하는 인자는 유전자 이동 벡터의 생체내 투여와 연관된 종창 및 염증

을 줄이기 위한 조성물의 일부일 수 있다. 면역계 자극제 또는 애쥬번트, 예를 들어, 인터류킨, 지질다당류, 및 이중-가닥 RNA. 항생제, 즉, 살균제 및 살진균제는 기존 감염을 치료하고/하거나 유전자 이동 절차와 연관된 감염과 같은 향후 감염 위험을 줄이기 위해 존재할 수 있다.

[0103] 주사가능한 데포 형태는 폴리락티드-폴리글리콜리드와 같은 생분해성 중합체에서 대상 화합물의 마이크로캡슐 기질을 형성함으로써 만들어진다. 약물 대 중합체의 비, 및 이용되는 특정 중합체의 속성에 따라, 약물 방출 속도가 제어될 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수물)을 포함한다. 데포 주사가능한 제형은 또한 신체 조직과 호환가능한 리소솜 또는 마이크로에멀전에 약물을 포획함으로써 제조된다.

[0104] 특정 구현예에서, 제형은 폴리아미드, 폴리카르보네이트, 폴리알킬렌, 아크릴산 및 메타크릴산 에스테르의 중합체, 폴리비닐 중합체, 폴리글리콜리드, 폴리실록산, 폴리우레탄 및 이의 공중합체, 셀룰로스, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리스티렌, 락트산 및 글리콜산의 중합체, 폴리무수물, 폴리(오르토)에스테르, 폴리(부트산), 폴리(발레르산), 폴리(락티드-코-카프로락톤), 다당류, 단백질, 폴리히알루론산, 폴리시아노아크릴레이트, 및 이의 블렌드, 혼합물, 또는 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 생체적합성 중합체를 포함한다.

[0105] 조성물은 스폰지, 생체적합성 메시워크(meshwork), 기계적 저장소, 또는 기계적 이식물과 같은 제어 또는 지속 방출을 허용하는 장치 내에 또는 상에 투여될 수 있다. 이식물(예를 들어, 미국 특허 번호 5,443,505 참조), 장치(예를 들어, 미국 특허 번호 4,863,457 참조), 예컨대 이식가능한 장치, 예를 들어, 기계적 저장소 또는 중합체성 조성물로 구성된 이식물 또는 장치는 본 발명의 유전자 이동 벡터의 투여에 특히 유용하다. 조성물은 또한 예를 들어, 겔 폼, 히알루론산, 젤라틴, 콘드로이틴 술페이트, 폴리포스포에스테르 예컨대 비스-2-하이드록시에틸-테레프탈레이트(BHET), 및/또는 폴리락티드산-글리콜산을 포함하는 지속 방출 제형의 형태로 투여될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 5,378,475 참조).

[0106] 포유동물에게 투여되는 조성물 내 유전자 이동 벡터의 용량은 포유동물의 크기(질량), 임의의 부작용 정도, 특정 투여 경로 등을 포함한 다수의 인자에 따라 달라질 것이다. 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 "치료 유효량"의 본원에 기재된 본 발명의 유전자 이동 벡터를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함한다. "치료 유효량"은 필요한 투여량 및 기간 동안 원하는 치료 결과를 달성하기에 효과적인 양을 지칭한다. 치료 유효량은 질환 또는 장애 정도, 개체의 연령, 성별, 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 도출하는 유전자 이동 벡터의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 특정 치료 효과를 달성하기 위한 조성물 내 유전자 이동 벡터의 용량은 전형적으로 세포 당 벡터 게놈 카피(gc/세포) 또는 체중 킬로그램 당 벡터 게놈 카피(gc/kg)의 단위로 투여된다. 당업자는 당업계에 잘 알려져 있는 이들 및 다른 인자에 기반하여, 특정 질환 또는 장애가 있는 환자를 치료하기에 적절한 유전자 이동 벡터 용량 범위를 용이하게 결정할 수 있다. 치료 유효량은 1×10^{10} 게놈 카피 내지 1×10^{13} 게놈 카피일 수 있다. 치료 유효량은 1×10^{11} 게놈 카피 내지 1×10^{14} 게놈 카피일 수 있다. 치료 유효량은 1×10^7 게놈 카피 내지 1×10^{10} 게놈 카피일 수 있다. 치료 유효량은 1×10^{14} 게놈 카피 내지 1×10^{17} 게놈 카피일 수 있다. 70 kg 인간을 가정하면, 용량 범위는 1.4×10^8 gc/kg 내지 1.4×10^{11} gc/kg, 1.4×10^9 gc/kg 내지 1.4×10^{12} gc/kg, 1.4×10^{10} gc/kg 내지 1.4×10^{13} gc/kg, 또는 1.4×10^{11} gc/kg 내지 1.4×10^{14} gc/kg일 수 있다.

[0107] 일 구현예에서, 조성물은 포유동물에게 1 회 투여된다. 조성물의 단일 투여는 최소한의 부작용으로 포유동물에서 지속적인 발현을 초래할 수 있는 것으로 여겨진다. 그러나, 특정 경우에, 조성물에 대한 세포의 충분한 노출을 보장하기 위해 조성물을 치료 기간 동안 다수 회 투여하는 것이 적절할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 치료 기간 동안 2 회 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 6, 8, 9, 또는 10 회 또는 그 이상) 포유동물에게 투여될 수 있다.

[0108] 본 개시내용은 상기 기재된 바와 같은 핵산 서열을 포함하는 치료 유효량의 유전자 이동 벡터를 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물을 제공한다.

[0109] 투여 경로, 투여량 및 투여 형태

[0110] 예를 들어, 본 발명에 따른 유전자 전달 벡터의 투여는 예를 들어, 수용자의 생리학적 상태 및 숙련된 의사에게 알려진 다른 인자에 따라 연속적이거나 또는 간헐적일 수 있다. 유전자 전달 벡터(들)의 투여는 미리 선택된 기간에 걸쳐 본질적으로 연속적일 수 있거나 또는 일련의 간격을 둔 용량일 수 있다. 국부 투여, 예를 들어,

두개내, 비강내 또는 척추강내, 및 전신 투여, 예를 들어, 혈액-뇌 장벽 전체에 걸쳐 바이러스를 사용하는 것이 둘 다 고려된다. 임의의 투여 경로, 예를 들어, 정맥내, 비강내 또는 기관지내, 폐 및 흉막내에 직접 투여가 이용될 수 있다. 일 구현예에서, 조성물은 흉막으로 전달될 수 있다.

[0111] 임의적으로 지속 방출을 위해 제형화될 수 있는 유전자 전달 벡터(들)를 포함하는 하나 이상의 적합한 단위 투여 형태는 두개내, 척추강내, 또는 비강내를 포함한 다양한 투여 경로, 또는 CNS에 전달하기 위한 다른 수단, 또는 직장, 협측, 질 및 설하, 경피, 피하, 정맥내, 근육내, 복강내, 흉강내, 또는 폐내 경로를 포함하여 경구, 또는 비경구로 투여될 수 있다. 제형은 적절한 경우 별개의 단위 투여 형태로 편리하게 제시될 수 있고 약학에 잘 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법은 벡터와 액체 담체, 고체 기질, 반고체 담체, 미분된 고체 담체 또는 이의 조합의 회합을 유발한 다음, 필요한 경우, 생성물을 원하는 전달 시스템 내에 도입하거나 또는 성형하는 단계를 포함할 수 있다.

[0112] 특정 결과를 달성하기 위해 투여되는 유전자 전달 벡터(들)의 양은 선택된 유전자 및 프로모터, 상태, 환자 특이적 매개변수, 예를 들어, 키, 체중 및 연령을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 인자에 따라 달라질 것이며, 예방이든 치료든 달성되어야 한다.

[0113] 본 발명의 벡터는 예를 들어, 뇌에 투여하기에 적합한 제형의 형태로 편리하게 제공될 수 있다. 적합한 투여 형식은 표준 절차에 따라 각각의 환자에 대해 개별적으로 의사에 의해 잘 결정될 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 이들의 제형은 표준 제형 논문, 예를 들어, Remington's Pharmaceuticals Sciences에 기재되어 있다. "약제학적으로 허용되는"이란 제형의 다른 성분과 호환가능하고, 이의 수용자에게 유해하지 않은 담체, 희석제, 부형제, 및/또는 염을 의미한다.

[0114] 본 발명의 벡터는 용액을 등장성으로 유발하는 부형제, 예를 들어, 4.5% 만니톨 또는 0.9% 나트륨 클로라이드과 함께 중성 pH, 예를 들어, 약 pH 6.5 내지 약 pH 8.5, 또는 약 pH 7 내지 8, 메타크레졸 0.1% 내지 0.75%, 또는 0.15% 내지 0.4% 메타크레졸과 같은 허용되는 보존제와 함께, 일반적으로 안전한 것으로 간주되는 나트륨 포스페이트와 같은 당염계에 잘 알려진 용액으로 완충된 pH로 용액에서 제형화될 수 있다. 원하는 등장성을 수득하는 것은 나트륨 클로라이드 또는 다른 약제학적으로 허용되는 제제 예컨대 텍스트로스, 보르산, 나트륨 타르트레이트, 프로필렌 글리콜, 폴리올(예컨대 만니톨 및 소르비톨), 또는 다른 무기 또는 유기 용질을 사용하여 달성될 수 있다. 나트륨 클로라이드는 나트륨 이온을 함유하는 완충액에 유용하다. 원하는 경우, 상기 조성물의 용액은 또한 저장 수명 및 안정성을 향상시키기 위해 제조될 수 있다. 본 발명의 치료적으로 유용한 조성물은 일반적으로 허용되는 절차에 따라 성분을 혼합함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 선택된 구성성분을 혼합하여 농축된 혼합물을 생산한 다음 pH를 제어하기 위한 물 및/또는 완충제 또는 긴장성을 제어하기 위한 추가 용질을 첨가함으로써 최종 농도 및 점도를 조정할 수 있다.

[0115] 벡터는 1 회 또는 다회 용량으로 효과적인 벡터의 양을 함유하는 투여 형태로 제공될 수 있다. 바이러스 벡터의 경우, 유효 용량은 적어도 약 10^7 개의 바이러스 입자, 예를 들어, 약 10^9 개의 바이러스 입자, 또는 약 10^{11} 개의 바이러스 입자의 범위 내에 있을 수 있다. 첨가되는 바이러스 입자의 수는 최대 10^{14} 개 일 수 있다. 예를 들어, 바이러스 발현 벡터가 이용되는 경우, 약 10^8 내지 약 10^{60} gc의 바이러스 벡터가 핵산 또는 패키징된 비리온으로서 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 0.5 내지 10 mL 당 바이러스 벡터의 약 10^9 내지 약 10^{15} 개의 카피가 핵산 또는 패키징된 비리온으로서 투여될 수 있다. 대안적으로, 핵산 또는 벡터는 적어도 약 0.0001 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 적어도 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.5 mg/kg, 적어도 약 0.01 mg/kg 내지 약 0.25mg/kg 또는 적어도 약 0.01 mg/kg 내지 약 0.25 mg/체중 kg의 투여량으로 투여될 수 있지만, 다른 투여량이 유익한 결과를 제공할 수 있다. 투여되는 양은 투여를 위해 선택된 핵산 또는 벡터, 질환, 포유동물의 중량, 신체 상태, 건강, 및/또는 연령을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자는 동물 모델 또는 당업계에서 이용가능한 다른 테스트 시스템을 이용하여 임상예에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 언급된 바와 같이, 투여될 정확한 용량은 참여 임상예에 의해 결정되지만, 1 mL 포스페이트 완충 염수 내에 있을 수 있다. 플라스미드 DNA 단독, 또는 다른 거대분자와 복합체화된 플라스미드 DNA의 전달을 위해, 투여될 DNA의 양은 수용자에게 유익한 효과를 초래하는 양일 것이다. 예를 들어, 0.0001 내지 1 mg 이상, 예를 들어, 최대 1 g의 개별 또는 분할 용량, 예를 들어, 0.001 내지 0.5 mg, 또는 0.01 내지 0.1 mg의 DNA가 투여될 수 있다.

[0116] 예를 들어, 바이러스 발현 벡터가 이용되는 경우, 약 10^8 내지 약 10^{60} gc의 바이러스 벡터가 핵산 또는 패키징

된 비리온으로서 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 0.5 내지 10 mL 당 약 10^9 내지 약 10^{15} 카피의 바이러스 벡터가 핵산 또는 패키징된 비리온으로서 투여될 수 있다. 대안적으로, 핵산 또는 벡터는 적어도 약 0.0001 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 적어도 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.5 mg/kg, 적어도 약 0.01 mg/kg 내지 약 0.25 mg/kg 또는 적어도 약 0.01 mg/kg 내지 약 0.25 mg/체중 kg의 투여량으로 투여될 수 있지만, 다른 투여량이 유익한 결과를 제공할 수 있다.

[0117] 일 구현예에서, 투여는 적절한 카테터 또는 바늘을 사용하여 두개내, 심실내, 수조내, 요추, 간내, 기관내 또는 기관지내 주사 또는 주입에 의해 이루어질 수 있다. 당업계에 알려진 바와 같이 다양한 카테터가 전달을 달성하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 다양한 범용 카테터, 뿐만 아니라 본 발명에 사용하기에 적합한 변형된 카테터가 상업적 공급처로부터 입수가 가능하다. 또한, 전달이 뇌 또는 폐의 특정 영역 내로의 직접 주사에 의해 달성되는 경우, 당업계에 알려진 바와 같이 해당 영역 내에 카테터를 도입하기 위해 다수의 접근법이 사용될 수 있다.

[0118] 예시로서, 리포솜 및 다른 지질-함유 유전자 전달 복합체가 하나 이상의 이식유전자를 전달하는 데 사용될 수 있다. 유전자 전달을 위한 이러한 복합체의 제조 및 사용 원리는 당업계에 기재되어 있다(예를 들어, Ledley, (1995); Miller 등, (1995); Chonn 등, (1995); Schofield 등, (1995); Brigham 등, (1993) 참조).

[0119] 유전자 전달 벡터를 함유하는 약제학적 제형은 잘 알려져 있고 용이하게 이용가능한 성분을 사용하여 당업계에 알려진 절차에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 제제는 통상의 부형제, 희석제, 또는 담체와 함께 제형화되고, 정제, 캡슐, 현탁액, 분말 등으로 형성될 수 있다. 본 발명의 벡터는 또한 예를 들면, 근육내, 피하 또는 정맥내 경로에 의한 비경구 투여에 적절한 엘릭시르 또는 용액으로서 제형화될 수 있다.

[0120] 벡터의 약제학적 제형은 또한 수용액 또는 무수 용액, 예를 들어, 동결건조된 제형, 또는 분산액의 형태, 또는 대안적으로 에멀전 또는 현탁액의 형태를 취할 수 있다.

[0121] 일 구현예에서, 벡터는 예를 들어, 주사, 예를 들어, 볼루스 주사 또는 카테터를 통한 연속 주사에 의한 투여를 위해 제형화될 수 있고, 앰플, 미리 충전된 주사기, 소량 주입 용기 또는 보존제가 첨가된 다중 용량 용기에서 단위 투여 형태로 제시될 수 있다. 활성 성분은 유성 또는 수성 비히클에서 현탁액, 용액, 또는 에멀전과 같은 형태를 취할 수 있고, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 사용 전에 적합한 비히클, 예를 들어, 멸균 무발열원수로 구성하기 위해 멸균 고체의 무균 단리에 의해 또는 용액으로부터 동결건조에 의해 수득된 분말 형태일 수 있다.

[0122] 이들 제형은 선행 기술에서 잘 알려진 약제학적으로 허용되는 비히클 및 애쥬번트를 함유할 수 있다. 예를 들어, 생리학적인 관점에서 허용되는 하나 이상의 유기 용매(들)를 사용하여 용액을 제조하는 것이 가능하다.

[0123] 흡입에 의한 상기도(비강) 또는 하기도로의 투여를 위해, 벡터는 취입기, 분무기 또는 가압 팩 또는 에어로졸 스프레이를 전달하는 다른 편리한 수단으로부터 편리하게 전달된다. 가압 팩은 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 가스와 같은 적합한 추진제를 포함할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투여량 단위는 계량된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다.

[0124] 대안적으로, 흡입 또는 취입에 의한 투여를 위해, 조성물은 건조 분말 형태, 예를 들어, 치료제와 락토스 또는 전분과 같은 적합한 분말 베이스의 분말 믹스를 취할 수 있다. 분말 조성물은 예를 들어, 캡슐 또는 카트리지, 또는, 예를 들어, 분말이 흡입기, 취입기 또는 계량된 용량 흡입기의 도움으로 투여될 수 있는 젤라틴 또는 블리스터 팩의 단위 투여 형태로 제시될 수 있다.

[0125] 비강내 투여를 위해, 벡터는 점비약, 액체 스프레이를 통해, 예컨대 플라스틱 병 분무기 또는 계량된 용량 흡입기를 통해 투여될 수 있다. 전형적인 분무기는 Mistometer(Wintrop) 및 Medihaler(Riker)이다.

[0126] 벡터의 국부 전달은 또한 예를 들어, 카테터 또는 바늘을 사용하여 질환 부위 또는 근처에 벡터를 투여하는 다양한 기술에 의해 이루어질 수 있다. 부위-특이적 또는 표적화된 국부 전달 기술의 예는 제한하려는 것은 아니지만 이용가능한 기술을 예시한다. 예는 국부 전달 카테터 예컨대 주입 또는 유치 카테터, 예를 들어, 바늘 주입 카테터, 셉트 및 스텐트 또는 다른 이식가능한 장치, 부위 특이적 담체, 직접 주사, 또는 직접 적용을 포함한다.

[0127] 본원에 기재된 제형 및 조성물은 또한 항균제 또는 보존제와 같은 다른 성분을 함유할 수 있다.

- [0128] 대상체
- [0129] 대상체는 인간을 포함한 임의의 동물일 수 있다. 인간 및 비인간 동물. 비인간 동물은 모든 척추동물, 예를 들어, 포유동물 및 비포유동물, 예컨대 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 소, 말, 닭, 양서류, 및 파충류를 포함하지만, 포유동물, 예컨대 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 소 및 말이 대상체일 수 있다. 대상체는 또한 가축 예컨대, 소, 돼지, 양, 가금류, 및 말, 또는 애완동물, 예컨대 개 및 고양이일 수 있다.
- [0130] 일 구현예에서, 대상체는 인간 대상체를 포함한다. 대상체는 일반적으로 의사와 같은 숙련된 기술자에 의해 병태로 진단된다.
- [0131] 본원에 기재된 본 발명의 방법은 임의의 종, 성별, 연령, 민족 집단, 또는 유전자형의 대상체에 대해 이용될 수 있다. 따라서, 용어 대상체는 남성 및 여성을 포함하고, 노인, 노인에서 성인으로 이행기 대상체 성인, 성인에서 청년으로 이행기 대상체, 및 청소년, 어린이, 및 유아를 포함한 청년을 포함한다.
- [0132] 인간 민족 집단의 예는 백인, 아시아인, 히스패닉계, 아프리카인, 아프리카계 미국인, 아메리카 원주민, 썬족, 및 태평양 제도민을 포함한다. 본 발명의 방법은 백인, 특히 북유럽 인구, 뿐만 아니라 아시아 인구와 같은 일부 민족 집단에 더 적절할 수 있다.
- [0133] 용어 대상체는 또한 상기 기재된 바와 같이 본 발명이 필요한 한 임의의 유전자형 또는 표현형의 대상체를 포함한다. 게다가, 대상체는 임의의 모발 색, 눈 색, 피부 색 또는 이의 임의의 조합에 대한 유전자형 또는 표현형을 가질 수 있다.
- [0134] 용어 대상체는 임의의 키, 체중, 또는 임의의 기관 또는 신체 부분 크기 또는 형상의 대상체를 포함한다.
- [0135] 예시적인 구현예
- [0136] 일 구현예에서, 위치 112, 136, 또는 158 중 적어도 하나에서 아르기닌 이외의 잔기를 갖는 포유류 아포지질단백질 E를 코딩하거나, 또는 결합 특이성을 갖거나 또는 9D11, 4E4(100 내지 150 개 잔기에 결합), 5B5, E29, 1343A(Arboleda-Velasquez 등, 2019), 또는 개시내용이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 8,741,298에 개시된 것으로부터 유래된 항체, 또는 헤파란 술페이트, 예를 들어, 헤파란 술페이트 프로테오글리칸(HSPG)에 결합하는 것으로부터 유래된 항체와 같이, APOE4에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 발현 카세트를 포함하는 유전자 요법 벡터가 제공된다. 일 구현예에서, 포유류 아포지질단백질 E는 APOE2, APOE3, 또는 APOE4가 아니라 포유동물에서 외인성으로 발현되는 경우 보호된, 예를 들어 인지 장애 또는 악화를 감소 또는 지연시키거나, 또는 HSPG에 대한 결합이 감소될 수 있는 변형된 APOE이다. 일 구현예에서, 벡터 내 아포지질단백질 E는 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 변형된 인간 아포지질단백질 E이다. 일 구현예에서, 아르기닌 이외의 벡터 내 APOE의 잔기는 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 시스테인, 또는 글루타민이다. 일 구현예에서, 벡터 내 APOE의 위치 112는 시스테인이다. 일 구현예에서, 벡터 내 APOE의 위치 136은 세린이다. 일 구현예에서, 벡터 내 APOE의 위치 158은 아르기닌 또는 시스테인이다. 일 구현예에서, 벡터 내 APOE의 위치 112, 136 또는 158 중 2 개는 아르기닌을 갖는다. 일 구현예에서, 벡터 내 APOE의 위치 112는 아르기닌을 갖지 않는다. 일 구현예에서, 벡터 내 APOE의 위치 158은 아르기닌을 갖지 않는다. 일 구현예에서, 유전자 요법은 바이러스 유전자 요법 벡터, 예를 들어, 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스(AAV), 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터이다. 일 구현예에서, 바이러스 유전자 요법 벡터는 rAAV 벡터이다. 일 구현예에서, AAV 벡터는 AAVrh.10, AAV8, AAV9, AAV5, AAVhu.37, AAVhu.20, AAVhu.43, AAVhu.8, AAVhu.2, 또는 AAV7 캡시드를 갖는다. 일 구현예에서, AAV 벡터는 AAV2, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9 또는 AAVrh.10이다. 벡터는 약제학적 조성물에 존재할 수 있다. 일 구현예에서, 조성물 내 바이러스 벡터의 양은 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{16} 게놈 카피이다.
- [0137] 벡터는 시험관내 또는 생체내에서 세포에 도입될 수 있다. 일 구현예에서, 포유동물에서 알츠하이머병을 예방, 억제 또는 치료하는 방법은 유효량의 유전자 요법 벡터를 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 포유동물에서 APOE4 발현과 연관된 질환을 예방, 억제 또는 치료하는 방법은 유효량의 유전자 요법 벡터를 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 포유동물에서 지질 장애를 예방, 억제 또는 치료하는 방법은 유효량의 유전자 요법 벡터를 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 포유동물은 E2/E4 이형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E4/E4 동형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E2/E2 동형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E3/E3 동형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E3/E4 이형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 E2/E3 이형접합체이다. 일 구현예에서, 포유동물은 인간이다. 일 구현예에서, 벡터는 전신으로 투여된다. 일 구현예에서, 벡터는 주사된다. 일 구현예에서, 벡터는 중추신경계

에 투여된다. 일 구현예에서, 벡터는 뇌에 투여된다. 일 구현예에서, 벡터는 C112, S136 및 R158을 갖거나 또는 C112, S136 및 C158을 갖는 아포지질단백질 E를 암호화한다.

[0138] 일 구현예에서, APOE2, APOE3, 또는 APOE4가 아니지만 변형되고 보호된 APOE를 암호화하는 오픈 리딩 프레임에 포함하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터, 및 3' 비번역 영역(3' UTR), 및 APOE4 mRNA의 역제를 위해 APOE4에 상응하는 RNAi 서열을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 요법 벡터. 일 구현예에서, 벡터는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열은 오픈 리딩 프레임에 대해 5' 또는 3'이다. 일 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열은 오픈 리딩 프레임에 대해 5' 및 3'이다. 일 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열은 상이한 벡터 상에 있다. 일 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일 구현예에서, 바이러스 벡터는 AAV, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스바이러스 또는 레트로바이러스 벡터이다. 일 구현예에서, AAV는 AAV5, AAV9 또는 AAVrh10이다. 일 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열은 제2 프로모터에 연결된다. 일 구현예에서, 제2 프로모터는 PolIII 프로모터이다. 일 구현예에서, RNAi는 복수의 miRNA 서열을 포함하는 miRNA를 포함한다. 일 구현예에서, RNAi는 복수의 siRNA 서열을 포함한 siRNA를 포함한다. 일 구현예에서, 오픈 리딩 프레임은 복수의 침묵 뉴클레오타이드 치환을 포함한다. 일 구현예에서, 벡터는 침묵 뉴클레오타이드 치환을 갖는 코돈의 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 갖는다. 일 구현예에서, 오픈 리딩 프레임은 펩티드 태그, 예를 들어, HA, 히스티딘 태그, AviTag, 말토스 결합 태그, Strep-태그, FLAG-태그, V5-태그, Myc-태그, Spot-태그, T7 태그, 또는 NE-태그를 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 벡터는 숙주 세포, 예를 들어, 포유동물, 또는 비인간 영장류 또는 인간과 같은 숙주 유기체 내에 있다. 숙주 포유동물은 예를 들어, 포유동물에서 알츠하이머병을 예방, 억제 또는 치료하기 위해, 또는 포유동물에서 APOE4 발현과 연관된 질환을 예방, 억제 또는 치료하기 위해 효과적인 양의 벡터를 투여받을 수 있다. 일 구현예에서, 벡터 및/또는 뉴클레오타이드 서열은 전신으로 투여된다. 일 구현예에서, 벡터 및/또는 뉴클레오타이드 서열은 경구로 투여된다. 일 구현예에서, 벡터 및/또는 뉴클레오타이드 서열은 정맥내로 투여된다.

[0139] 본 발명은 하기 비제한적인 실시예에 의해 추가로 기재될 것이다.

[0140] 실시예 1

[0141] 개요

[0142] 아밀로이드-베타(A β), 및 아밀로이드 플라크의 중추신경계(CNS) 축적, 타우의 비정상적인 인산화, 타우 엉킴, 염증 및 뉴런의 점진적인 손실을 특징으로 하는 알츠하이머병(AD)의 발병기전은 복잡하여, 점진적인 인지 저하를 초래한다¹. 유전학은 이러한 병원성 과정에 대한 위험에 중요한 역할을 한다(DeTure & Dickson, 2019; Holtzman 등, 2012; Safieh 등, 2019; Fernandez 등, 2019). 초기 발병 상염색체 우성 AD는 아밀로이드 단백질 전구체(APP) 및 APP 처리에 영향을 미치는 유전자인 프레세닐린(PSEN) 1 및 2에서 돌연변이에 의해 유발되어(Campion 등, 1999; Carmona 등, 2018), A β 펩티드의 생산을 변경시켜, 응집 및 플라크 형성을 초래한다(Carmona 등, 2018; Dai 등, 2018). 산발성 후기 발병 AD에 대한 주요 유전 인자는 지질 수송 단백질인 아포지질단백질 E(APOE)의 변이체이다(Tzioras 등, 2019; Wolters 등, 2019). APOE는 3 개의 공통 동형을 가지며, 공통 ϵ 3 동형은 AD에 대한 평균 위험과 연관되며, ϵ 4는 위험을 15-20배 증가시키는 반면 ϵ 2는 위험을 각각 ϵ 3 및 ϵ 4보다 66 내지 99% 더 낮게 감소시킨다(Wolters 등, 2019; Corder 등, 1994; Naj 등, 2011; Reiman 등, 2020). 생물학적 수준에서, APOE 유전자형(ϵ 4> ϵ 3> ϵ 2)은 인간 및 AD 마우스 모델에서 뇌 아밀로이드, p-타우 및 타우 엉킴의 시기 및 양을 예측한다(Tzioras 등, 2019; Shi 등, 2017; Abner 등, 2018). E2 및 E4에서의 차이는 아미노산 112 및 158에 의해 지시되며; APOE2(C112 C158)는 낮은 위험을 전달하고 APOE4(R112 R158)는 높은 위험을 전달한다(Corder 등, 1994; Reiman 등, 2020; Corder 등, 1993). 이 112-158 내에서 "알츠하이머의 위험 영역"은 LDL 수용체를 코딩하고 헤파란 프로테오글리칸에 결합한다(Mahley 등, 1999).

[0143] APOE4는 높은 위험을 전달하고 APOE2는 낮은 위험을 전달하므로, AAVrh.10hAPOE2가 있는 APOE4 동형접합체에서 AD-관련 병리의 발생을 예방/치료하기 위한 유전자 요법을 개발하기 위해, 인간 APOE2를 코딩하는 혈청형 rh.10 아데노 연관 바이러스(AAV) 유전자 이동 벡터를 제조하였다. AAVrh.10hAPOE2의 CNS 투여는 마우스 모델에서 APOE4-연관 A β 및 아밀로이드 부담을 예방하였으며(Zhao 등, 2016), 이는 AD에 대한 APOE4-연관 위험이 APOE4 동형접합체 뇌를 APOE2-APOE4 이형접합체 상태로 전환시키는 APOE2 유전자 요법을 사용하여 완화시킬 수 있다는 개념을 뒷받침한다(Zhao 등, 2016).

[0144] AD 위험을 매개하는 데 있어서 APOE 112-158 영역의 중요성은 PSEN1 E280 돌연변이의 여성 보균자 뿐만 아니라 크라이스트처치 R136S APOE3 변이체인 APOE3ChC에 대한 동형접합체의 보고서에 의해 강조되었다(Arboleda-Velasquez 등, 2019). 우성 PSEN1-E290A 유전자는 초기 발병 CNS A β 및 아밀로이드 축적이 있는 1,200 명 초

과 개인의 콜롬비아 가족을 모두 한정하며; 이형접합체는 40 대 중반에 치매가 발생한다(Lopera 등, 1997). 현재까지, APOE3ChC 및 PSEN1-E290A가 공동 유전된 여성은 70 세에 우수한 인지 상태에 있었으며, 혈통에서 전형적으로 인지 저하가 발생하는 나이를 훨씬 넘었다(Arboleda-Velasquez 등, 2019). 임상 평가는 아밀로이드 플라크의 축적을 나타내었지만, 낮은 수준의 타우 병리를 나타내어, APOE3ChC 변이체가 타우 병리의 발생을 차단한다는 개념으로 이어졌다. 이는 APOE3ChC가 APOE2 대립유전자처럼 행동하며; 둘 다 단단히 결합하는 APOE4와 비교하여 해파린에 좋지 않게 결합한다(APOE3ChC>APOE2)는 것을 입증하는 시험관내 실험으로 입증되었다(Mahley 등, 1999; Zhao 등, 2016; Rosenberg 등, 2018; Arboleda-Velasquez 등, 2019). APOE3ChC의 유전이 타우 병리의 PSEN1-E280A-구동된 발생을 예방하지만 아밀로이드 병리는 예방하지 않는다는 관찰(Arboleda-Velasquez 등, 2019)은, APOE4-구동된 아밀로이드 병리가 APOE2의 CNS로의 AAV-매개 전달에 의해 억제될 수 있음을 입증하는 유전자 요법 연구와 함께, AD 아밀로이드 및 타우 병리의 마우스 모델에서 APOE3ChC(크라이스트처치 변이체가 있는 APOE3)의 CNS로의 AAVrh.10-매개 전달이 타우 관련 병리를 억제하는지 여부 및 APOE2ChC(크라이스트처치 변이체가 있는 APOE2)의 전달이 아밀로이드 및 타우 병리를 둘 다 억제하는지 여부를 테스트하는 것으로 이어졌다. 인간 E4-기반 모델인 2 마리 마우스가 사용된다: APP 및 APOE4-연관 아밀로이드 병리를 나타내는 APP.PS1/TRE4(Zhao 등, 2016; Rosenberg 등, 2018; Arboleda-Velasquez 등, 2019; Lopera 등, 1997; Kim 등, 2011) 및 타우 및 APOE4 연관 타우 병리를 나타내는 P301S/E4(Liu 등, 2016; Allen 등, 2002).

[0145] 전략

[0146] 유전은 알츠하이머병에 대한 위험에서 중요한 역할을 한다(DeTure & Dickson, 2019; Holtzman 등, 2012; Safieh 등, 2019; Fernandez 등, 2019). 조기 발병 상염색체 우성 AD는 아밀로이드 단백질 전구체(APP) 및 APP의 처리에 영향을 미치는 유전자인 프레세닐린 1(PSEN1) 및 2(PSEN2)에서 돌연변이에 의해 유발되어(Campion 등, 1999; Carmona 등, 2018), A β 펩티드의 생산을 변경시켜, 응집 및 플라크 형성 증가를 초래한다(Carmona 등, 2018; Dai 등, 2018). 산발성 후기 발병 AD에 대한 주요 유전 인자는 지질 수송 단백질인 아포지질단백질 E(APOE)의 변이체이다(Tzioras 등, 2019; Wolters 등, 2019). APOE는 3 가지 공통 동형인 ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4를 가지며; 공통 ϵ 3 동형은 AD에 대한 평균 위험과 연관되고, ϵ 4는 위험을 증가시키고 AD 발병 연령을 줄이는 반면, ϵ 2는 위험을 감소시키고 발병 연령을 지연시킨다(Wolters 등, 2019; Corder 등, 1994; Naj 등, 2011). 생물학적 수준에서, APOE 유전자형 ϵ 4 > ϵ 3 > ϵ 2는 AD의 인간 및 마우스 모델에서 뇌 아밀로이드, p-타우 및 타우 엉킴의 시기 및 양을 예측한다(Tzioras 등, 2019; Shi 등, 2017; Abner 등, 2018). APOE 유전자의 상이한 변이체의 유전이 AD 위험, 발병 연령 및 중증도를 지시할 수 있다는 지식에 기반하여(DeTure & Dickson, 2019; Shinohara 등, 2016), APOE4 동형접합체에서 CNS-관련 알츠하이머의 병리를 줄이는 요법은 "APOE AD 감소 위험" 변이체를 CNS에 전달함으로써 달성될 수 있는 것으로 구상되었다. 이전 연구는 AAV 혈청형 rh.10(AAVrh.10)에 의해 매개되는 CNS로의 APOE2 전달이 AD의 마우스 모델에서 A β 및 아밀로이드 부담을 줄이는 것을 입증하였다(Zhao 등, 2016). 이들 마우스 모델에서 뇌 A β 부담을 줄이는 APOE2의 능력은 유전자 용량 및 기존 A β 1-42 침착의 양에 따라 달라졌으며, 이는 충분한 뇌 APOE2 수준이 질환 과정에서 초기에 달성될 수 있다면, AAV 벡터를 사용한 APOE2의 유전자 전달이 AD를 치료 또는 예방하기 위한 실행가능한 치료 접근법이었던 것을 시사한다(Zhao 등, 2016). 이 데이터는 수조내 경로를 사용하여 비인간 영장류의 CNS에서 높은 수준의 APOE2 발현을 전달하고 안전하게 달성하는 능력을 입증하는 연구(Rosenberg 등, 2018)와 함께, AAVrh.10hAPOE2의 수조내 투여로 APOE4 동형접합체를 치료하는 인간에서 최초로 진행중인 임상 연구로 이어졌다.

[0147] APOE4-구동된 AD-관련 병리의 발생을 완화하는 데 있어서 APOE2를 사용한 유전자 요법보다 더 효과적인 "APOE AD 감소 위험" 유전자 요법 전략이 구상된다. 접근법은 1,200 초과의 개인에게 영향을 미치는 가족 내 PSEN1 변이체인 콜롬비안 PSEN1-E290A 돌연변이에 중첩된 APOE3-크라이스트처치(APOE3ChC) 돌연변이의 결과에 대한 최근 보고서에 기반한다(Lopera 등, 1997; Acosta-Baena 등, 2011). PSEN1-E280A 돌연변이는 A β 생산 증가와 연관되어, 아밀로이드 축적으로 이어지며; 이형접합체는 40 대 중반에 치매를 발생시킨다(Lopera 등, 1997). 상염색체 우성 PSEN1 E280A 돌연변이, 뿐만 아니라 APOE3ChC 변이체에 대한 동형접합성인 이 혈통의 여성은 70 세에 우수한 인지 상태에 있으며 동일한 PSEN1 돌연변이가 있는 여성이 전형적으로 인지 저하를 나타내는 40 세를 훨씬 더 넘어 독립적으로 남아있다(Arboleda-Velsquez 등, 2019). 임상 평가는 유의한 아밀로이드 플라크의 축적을 입증하였지만, 낮은 타우/p-타우 병리는 APOE3ChC 돌연변이가 타우 병리의 발생을 차단할 수 있음을 시사한다(Arboleda-Velsquez 등, 2019). 흥미롭게도, APOE3ChC 변이체(R136S)는 공통 ϵ 2, 3 및 4 대립유전자와 동일한 APOE 단백질 영역(112-158)에 있으며, APOE의 이 영역이 AD에 대한 위험과 관련된다는 개념과 일치한다(Mahley 등, 1999).

- [0148] 타우 병리를 억제하는 APOE3ChC 변이체의 능력은 APOE3ChC가 APOE2 대립유전자처럼 행동하며; 둘 다 해파린에 좋지 않게 결합한다(APOE3ChC<APOE2)는 것을 입증하는 시험관내 실험으로 입증되었다(Mahley 등, 1999; Arboleda-Velsquez 등, 2019). 이러한 발견은 병원성 사건의 AD-관련 쇠가 아밀로이드 형성 후 APOE3ChC에 의해 끊어질 가능성이 있으며, 기전과 무관하게, 크라이스트처치 돌연변이가 보호되고, APOE4 동형접합체를 치료하는 데 사용될 수 있고, APOE2 대립유전자를 사용한 유전자 요법보다 더 효과적인 가능성이 있음을 시사한다(도 12-13). 관련 AD 마우스 모델에서 전달 시스템으로서 AAVrh.10 캡시드를 사용하여, APOE4 동형접합체에서 알츠하이머병의 치료로서 각각 크라이스트처치 돌연변이를 보유하는 APOE3 또는 APOE2의 CNS에 AAVrh.10-매개 전달이 AA Vrh.10hAPOE2보다 우수한 것으로 평가된다. 뮤린 모델에서 AAVrh.10hAPOE2가 아밀로이드 축적을 억제한다(Zhao 등, 2016)는 이전 입증, 및 크라이스트처치 변이체에 대한 임상 사례 보고서에 기반하여, AAVrh.10hAPOE3ChC는 타우를 억제하지만, 아밀로이드, 병리를 억제하지 않고, AAVrh.10hAPOE2ChC가 더 효과적 이어서, 아밀로이드 및 타우 병리를 둘 다 억제할 수 있는 가능성이 있다.
- [0149] PSEN1-APOE3ChC. 콜롬비아 PSEN1-E280 돌연변이와 함께 APOE3ChC 변이체가 유전된 개인에 대한 보고서는 단일 사례만을 나타내는 반면, 보고서에는 APOE3ChC가 "APOE AD 감소 위험" 변이체라는 결론을 뒷받침하는 추가 연구가 포함된다. 아밀로이드 PET 스캐닝은 CNS 아밀로이드 플라크의 상당한 축적을 나타내었지만, 매우 적은 타우 병리가 관찰되었고, 대부분 중앙 측두엽에 한정되었다. 게다가, 뇌 글루코스 대사는 거의 정상이었다(도 14). APOE3ChC 돌연변이가 타우 병리 발생을 차단한다는 개념은 APOE2 동형접합체로부터의 24 개의 부검 샘플에서 관찰된 Reiman 등(2020)에 의한 연구에서 APOE2가 타우 병리 감소와 연관되었다는 개념과 유사하다. 타우 병리를 억제하는 APOE3ChC 변이체의 능력은 APOE3ChC가 APOE2 대립유전자처럼 행동하며; E4, E2 및 E3ChC와 비교하여 둘 다 해파린에 좋지 않게 결합한다(결합: E4>E3>E2>E3ChC, 도 15)는 것을 입증하는 시험관내 실험에 의해 뒷받침되었다. HSPG는 아밀로이드 플라크의 증가, 뿐만 아니라 아밀로이드에 대한 소교세포 반응을 촉진하는 데 연관되었다(Hefferman 등, 2016; ALXFORUM, 2010; Snow 등, 1988; Liu 등, 2016; O'Callaghan 등, 2018). HSPG는 또한 타우 병리와 연관되어 있으며; HSPG는 타우 섬유가 뉴런에 부착하게 하여, 독성 형태 타우의 흡수 및 전파를 용이하게 하는 것으로 제안되었다(Rauch 등, 2018; Zhao 등, 2019). 시험관내 연구는 또한 APOE3이 잔기 130-143(크라이스트처치 돌연변이 영역 포함)에 대한 항체와 결합하여 해파린 결합에 의해 측정된 바와 같이 APOE3을 기능적으로 APOE3ChC로 전환시켰음을 입증하였다. 종합하면, 이러한 발견은 병원성 사건의 알츠하이머 관련 쇠가 아밀로이드 형성 후 APOE3ChC에 의해 끊어질 가능성이 있고, 기전과 무관하게, 크라이스트처치 돌연변이가 보호되므로, APOE4 동형접합체를 치료하는 데 사용됨을 시사한다.
- [0150] AD에 대한 APOE4-연관 위험. 지질 결합 단백질인 APOE는 CNS에서 콜레스테롤의 주요 담체이다(Puglielli 등, 2003; Williams 등, 2020). 이는 뇌에서 성상세포 및 소교세포에 의해 주로 생산된다(Flowers & Rebeck, 2020; Pitas 등, 1987; Holtzman 등, 2012). APOE 입자는 세포외 환경에서 형성되며(Mahley 등, 1999; Flowers & Rebeck, 2020); APOE 입자는 저밀도 지단백질 수용체 유전자 패밀리의 구성원인 APOE 수용체를 통해 콜레스테롤을 뉴런으로 수송한다(Liu 등, 2013; Mondadoori 등, 2007; Zhang 등, 2013). APOE 단백질(299 개 아미노산)은 힌지 영역에 의해 연결된 N-말단(1-167) 및 C-말단(206-299) 도메인을 갖는다(Safieh 등, 2019; Flowers & Rebeck, 2020). C-말단 영역은 저밀도 지단백질 수용체 결합 부위를 함유한다(도 2). CNS에서 콜레스테롤을 수송하는 역할 이외에도, APOE는 무수한 다른 기능을 갖는다(Holtzman 등, 2012; Castellano 등, 2011; Deane 등, 2008; Hashimoto 등, 2012; Hatters 등, 2006a; Hatters 등, 2006b; Li 등, 2012; Manelli 등, 2005; Walker 등, 2000; Yu 등, 2014; Zhao 등, 2009). 인간 APOE는 통상적으로 2 개의 잔기만 상이한 3 개의 동형(APOE2, 3, 및 4)으로 발현된다(Mahley 등, 1996; Zannis 등, 1981)(도 13). APOE4의 유전은 AD에 대한 가장 중요한 유전적 위험 인자이다. APOE3는 중성이고, E4 대립유전자는 위험을 증가시키고 발병 연령을 줄이고 E2는 위험을 감소시키고 발병 연령을 지연시킨다(Reiman 등, 2020; Mahley, 2016; Conejero-Goldberg 등, 2014; Nagy 등, 1995; Raber 등, 2004). 역학적 데이터는 APOE4 및 APOE2가 공동 우성이며, 즉, E2/E4 이형접합체가 E3/E4 이형접합체의 AD에 대한 위험보다 4-배 더 높은 대신에, E3/E3 동형접합체의 정상 위험에 더 가까우며(Corder 등, 1994; Liu 등, 2013; Genin 등, 2011), 즉, E2의 대략적으로 동등한 발현이 E4 대립유전자에 대한 유해한 효과를 상쇄한다(Corder 등, 1994; Farrer 등, 1997; Coon 등, 2007)는 것을 시사한다. E2 연구의 보호 효과의 역학적 연구로부터의 핵심 결론은 다음을 포함한다: E2 유전자형은 AD에서 현저히 불충분하고(Corder 등, 1994; Reiman 등, 2020); E2 대립유전자는 AD의 지연된 발병 연령과 연관되어 있고(Reiman 등, 2020; Benjamin 등, 1994); E2 담체는 AD-관련 병리를 줄이고(Reiman 등, 2020; Nagy 등, 1995); E2는 더 느린 인지 저하와 연관되어 있고(Small 등, 2004); E2 담체는 AD 발생에 대한 취약성 감소와 연관될 수 있는 더 강력한 백질 보전을 보유하고(Chiang 등, 2012); 정상적인 노인에서, E2 담체는 뇌척수액 p-타우 수준이 더 낮고 타우가 미미하게 더 낮다(Chiang 등, 2010). 실험 연구는 E2가 Aβ의 대사; 신경 복구 및 신경돌기 성장을 촉진

시키고; 항산화제 및 항염증제로서 작용함을 입증한다(Rebeck 등, 2002). 또한, 동물 및 임상 연구는 APOE 유전자형이 또한 뇌 아밀로이드 β (A β) 펩티드 침착 뿐만 아니라 아밀로이드 부담(E4>E3>E2)의 시기 및 양을 예측하며(Castellano 등, 2011; Raber 등, 2004; Bales 등, 2009; Holtzman 등, 2000; Reiman 등, 2009; Schmechel 등, 1993), 즉, APOE4가 아밀로이드 β 청소율을 손상시키고 아밀로이드 형성을 증가시킴을 나타내었다(70,71.(Liao et al., 2017; Hu 등, 2015). 마우스에서의 유전 연구는 내인성 ApoE 유전자의 표적화된 결실이 AD의 PDAPP 마우스 모델(이들 마우스는 돌연변이체 APP 이식유전자를 발현하여 인간 A β 의 높은 뇌 수준을 초래함)에서 섬유성 아밀로이드 및 총 뇌 A β 침착의 극적인 감소를 초래함을 나타내었다(Bales 등, 1997). PDAPP 마우스를 인간 APOE 표적화 대체(TRE) 마우스와 교배함으로써, APOE 동형-의존적 효과를 AD 환자에서 관찰된 것을 요약하는 방식으로 뇌 A β 침착 및 아밀로이드 부담(E4>E3>E2)에서 관찰하였으며(Castellano 등, 2011; Bales 등, 2009; Holtzman 등, 2000; Fagan 등, 2002), 이는 APOE 동형이 뇌 아밀로이드 부담을 결정하는 데 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 또한, 타우 병리-관련 P301S/E3, E2 및 E4 마우스에서의 연구는 ApoE가 아밀로이드- β 와 무관하게 타우 병리의 맥락에서 신경변성에 영향을 미침을 입증한다. ApoE4는 가중된 신경변성을 초래하는 반면 ApoE의 부재는 신경보호되었다(Shi 등, 2017).

[0151] APOE4-관련 CNS 병리에 대한 APOE2 유전자 요법. APOE2가 보호되는 역학적 데이터에 기반하여, APOE2를 APOE4 동형접합체의 CNS로 옮기면 E4 위험이 완화할 것이라는 가설을 평가하기 위한 유전자 요법 프로그램을 개발하였다(Zhao 등, 2016; Rosenberg 등, 2018). 이 접근법의 타당성에 대한 문헌의 증거는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 유전 AD 모델의 CNS에 APOE4 및 APOE2의 투여가 뇌 A β /아밀로이드 부담을 각각 증가 및 감소시켰음을 입증하는 Dodart 등(2005)의 연구에서 비롯되었다. APOE2가 뇌 A β /아밀로이드 부담을 감소시켰다는 발견은 Hudry와 동료들(2013)에 의해 AAV4 벡터를 사용하여 APOE2를 돌연변이체 APP 마우스의 측뇌실 내로 전달하는 것으로 반복되었다. CSF에 투여된 AAV8 벡터를 사용하여, Hu 등(2015)은 TRE4 마우스 모델에서 APOE2를 증가시키는 것이 AD를 치료하는 효과적인 전략인 반면; TRE4 마우스에서 APOE4를 증가시키는 것이 유해하였음을 밝혀내었다. 하기에 상세하게 기재된 바와 같이, 인간 APOE2를 코딩하는 AAVrh.10 혈청형 벡터는 2 가지 유전 모델에서 아밀로이드 부담을 줄인다(Zhao 등, 2016). 이들 APOE 대립유전자가 AD 위험을 결정하는 분자 기전과 관계없이, APOE2가 강력하게 보호되고 유전자 요법 벡터를 통해 마우스 뇌에 전달될 때 A β /아밀로이드 부담을 현저하게 감소시킨다는 사실을 고려하면, 바이러스 벡터를 통한 APOE2의 CNS 유전자 전달은 APOE4 동형접합 AD에 대한 치료 전략을 나타낸다.

[0152] AAVrh.10. AAVrh.10 혈청형은 레서스 원숭이로부터 유래된다. 이 혈청형은 실험적 동물(마우스, 비인간 영장류)의 CNS, CLN2 질환이 있는 어린이 및 알츠하이머병이 있는 성인에게 다양한 발현 카세트와 함께 투여되었다(clinicaltrials.gov; NCT01414985, NCT01161576, NCT03634007). AAVrh.10 벡터는 고도로 활성인 구성적 프로모터, 인트론 코딩 서열 및 AAV2 도립된 말단 반복부에 의해 플랭킹된 토끼 β -글로빈 polyA로 설계된다(예로서 AAVrh.10hAPOE2 벡터에 대한 상세한 내용은 도 16 참조). AAV9와 동등하지만 잠재적 독성이 적은 AAVrh.10 캡시드는 CNS에서 유전자 발현을 매개하는 데 매우 효과적이다(Rosenberg 등, 2018; Rosenberg 등, 2014; Sondhi 등, 2012; Tardieu 등, 2014; Zerah 등, 2015). 모든 벡터는 많은 동일성, 효능 및 순도의 측정을 위해 특성화된다. 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의한 순도는 벡터 생산에 사용되는 세포로부터 오염 단백질의 부재를 규명한다(도 17). 인간 APOE2를 코딩하는 벡터를 비인간 영장류(NHP)에게 수조내 투여하는 효과를 입증하는 것으로서 뇌척수액을 포함하여 CNS 전반에 걸쳐 벡터 유래 단백질의 광범위한 분포를 제공한다(도 18). 이러한 관찰은 인간 APOE 동형을 코딩하는 AAVrh.10 벡터의 CNS 투여가 CNS 전반에 걸쳐 코딩 APOE 동형을 효과적으로 분포시킬 수 있음을 뒷받침한다.

[0153] AA Vrh.10hAPOE2는 AD 동물 모델에서 병리를 개선한다. PDAPP 마우스는 인간 APP 돌연변이를 과발현하고 해마 및 대뇌 피질에서 연령-의존적 A β 및 아밀로이드 침착을 발생시키는 뇌 아밀로이드증의 잘 특성화된 마우스 모델이다(Games 등, 1995; Schenk 등, 1999). 생후 9 개월에, 해마에는 풍부한 A β 및 아밀로이드 플라크가 있다 80. AAVrh.10hAPOE2 벡터의 발현은 관련없는 유전자를 발현하는 유사한 바이러스 벡터로 처리된 대조군 동물에서 관찰된 아밀로이드 병리의 유의한 해결을 입증하였다(도 19)(Zhao 등, 2016). AAVrh.10hAPOE2 벡터를 사용한 APOE2의 발현은 PDAPP 마우스의 해마에서 불용성 A β 1-42(70.4% 감소, $p < 0.001$ vs mCherry 대조군) 및 가용성 A β 1-42(27.2% 감소, $p < 0.05$ vs mCherry 대조군) 수준의 현저한 감소를 초래하였다. 상대적으로 이미 낮은 수준의 가용성 A β 1-40은 변경되지 않았지만 불용성 A β 1-40은 또한 극적으로 감소되었다(61.2% 감소, $p < 0.001$ vs 대조군).

[0154] 뇌 A β 부담에 대한 APOE2 발현의 역할을 추가로 평가하기 위해, APP.PS1/TRE4 삼중 유전자이식 마우스에서 A β /아밀로이드 병리에 대한 AAVrh.10hAPOE2 용량의 영향을 또한 평가하였다. APP.PS1/TRE4 마우스는 APP 스웨덴

(APP^{swe}) 및 PS1 돌연변이 뿐만 아니라 인간 APOE4 유전자를 보유한다(Kim 등, 2011; Jankowsky 등, 2018). APP.PS1/TRE4 마우스는 대뇌 피질, 해마, 및 시상을 포함한 여러 뇌 영역에서 강력한 연령 의존적 A β 및 아밀로이드 병리가 발생한다. 아밀로이드 플라크는 생후 2 개월만큼 초기에 이들 마우스의 피질에서 관찰되고 발생하는 뇌 AJ3/아밀로이드 부담은 APOE4 발현에 의존한다(Kim 등, 2011). PDAPP 마우스에서의 관찰과 유사하게, 아밀로이드-베타 수준의 용량 의존적 억제 AAVrh.10hAPOE2의 해마내 전달로 처리된 APP.PS1/TRE4 마우스의 해마에서 관찰되었다(도 20).

[0155] APOE4-관련 AD 병리의 마우스 모델. 임상 목표는 APOE4 동형접합체의 CNS에서 아밀로이드 및 타우 병리 둘 다를 억제하는 것이며, 따라서 무린 모델을 무린 ApoE 녹아웃 및 인간 APOE4 녹인으로 선택하였다. APOE4-관련 아밀로이드 병리에 대한 하나의 무린 모델 및 또 다른 것은 APOE4-관련 타우 병리에 대한 것이다. APP.PS1/TRE4 마우스는 스웨덴 돌연변이(APP^{swe})가 있는 인간 β -아밀로이드(A β) 전구체 단백질(APP), 돌연변이체(L 166P) 인간 프레세닐린 1 및 내인성 마우스 ApoE 유전자를 대체하는 인간 APOE4 유전자를 발현한다. 이들 마우스는 높은 수준의 인간 A β 단백질 및 인간 AD-유사 아밀로이드 병리를 발현하고(Kim 등, 2011) AAVrh.10hAPOE2가 AD 아밀로이드 관련 병리를 억제할 것임을 입증하기 위해 이전 연구에서 사용되었다(Zhao 등, 2016)(도 20). P301S/E4 마우스는 인간 P301S 1N4R 타우, 무린 ApoE 유전자의 결실 및 인간 APOE4 유전자의 부가를 보유한다(Shi 등, 2017; Allen 등, 2002). 이들 마우스는 APOE4-관련 타우 병리를 가지며 타우 병리를 억제하는 유전자 요법 벡터의 능력을 평가하는 데 사용될 것이다. 이들 마우스는 또한 AD-관련 염증을 나타내는 소교세포 및 성상세포 활성화를 갖는다(Shi 등, 2017).

[0156] 접근법. 크라이스트처치 변이체(APOE3-R 136S)는 APOE2, 3 및 4를 한정하는 잔기 112 및 118, LDL 결합 영역(136-150) 및 프로테오글리칸 해파란 술페이트 결합 영역을 포함하는 APOE 112-158 "알츠하이머의 위험 영역" 내에 있다(도 13). APOE4-관련 마우스 모델에서 APOE4-연관 A β 및 아밀로이드 부담이 AAVrh.10APOE2의 CNS 투여로 예방될 수 있다는 입증은 AD에 대한 APOE4-연관 위험이 APOE2 코딩 서열을 전달하여 APOE4 동형접합체 뇌를 APOE2-APOE4 이형접합체 상태로 전환하는 유전자 요법을 사용함으로써 완화될 수 있다는 개념을 뒷받침한다(Zhao 등, 2016). PSEN1-E290A 구동된 AD-관련 타우 병리가 무효화된 APOE3ChC의 수반되는 동형접합 유전을 가진 PSEN1-E290A 혈통의 여성에 대한 보고서는 APOE3 또는 APOE2 배경에서 크라이스트처치 돌연변이를 전달하기 위해 AAVrh.10 벡터를 사용한 APOE4 동형접합체에 대한 2세대 유전자 요법을 개발하는 것이라는 이 제안의 초점을 맞추었다. 본 발명자들은 다음의 2 가지 인간 APOE4-관련 마우스 모델에서 이를 테스트할 것이다: 주로 아밀로이드 관련 병리를 입증하는 APP.PS1fFRE4 및 주로 타우 관련 병리를 입증하는 P301S/E4(Shi 등, 2017; Kim 등, 2011). APOE3 배경에서 크라이스트처치 변이체가 PSEN1-E290A 및 APOE3ChC의 이중 유전에 대한 사례 보고서와 동등한 마우스 모델에서 효과적이면, AAVrh.10APOE3ChC를 사용한 유전자 요법은 P301S/E4 마우스에서 타우 병리를 억제하여야 하지만 APP.PS1fFRE4 마우스에서 아밀로이드 병리는 억제하지 않아야 한다. 그러나, APP.PS1fFRE4 마우스에서 아밀로이드 병리를 억제하는 데 있어서 AAVrh.10hAPOE2의 효과에 기반하여(Zhao 등, 2016), 본 발명자들은 AAVrh.10hAPOE2ChC가 APP.PS1fFRE4 마우스에서 아밀로이드 병리 및 또한 PSEN1-E290A 마우스에서 타우 병리를 둘 다 억제할 것이라는 가설을 세운다. 가설이 맞다면, AAVrh.10hAPOEChC는 APOE4 동형접합체를 치료하기 위해 클리닉으로 이동하는 이상적인 2세대 후보가 될 것이다. 상이한 벡터(AAVrh.10hAPOE3ChC 및 AAVrh.10hAPOE3, 또는 AAVrh.10hAPOE2ChC 및 AAVrh.10hAPOE2)를 제외하고, 모든 것이 동일하다. 통계 분석은 각 실험 내에서 매개 변수의 비교, 및 별도로 AAVrh.10hAPOE3ChC 및 AAVrh.10hAPOE2ChC의 차이를 비교하는 것을 포함한다.

[0157] 각 마우스 모델(APP.PS1fFRE4, P301S/E4)에 대해 벡터 AAVrh.10hAPOE3ChC, AAVrh.10hAPOE3; AAVrh.10hAPOE2ChC, AAVrh.10hAPOE2; 둘 다에 대한 대조군, AAVrh.10Null(번역가능한 이식유전자 없음) 또는 PBS]을 생후 2 개월에 2 μ l로 해마에 양측으로 투여한다. 벡터를 0.4×10^{10} 게놈 카피(gc) 또는 1.0×10^{10} gc의 2 회 용량으로 투여한다. 평가는 5 및 9 개월에 이루어질 것이다. 10 마리 수컷 및 10 마리 암컷은 모든 데이터 지점(마우스 군주, 벡터 또는 PBS, 평가 시점; 표 I)에 대해 사용할 것이다. 벡터, 일반적인 병리, 아밀로이드, 타우 및 염증과 관련하여 수행할 평가는 표 II에 나열되어 있다. APP.PS1fFRE4 마우스에서 아밀로이드 관련 병리를 효과적으로 억제하는 AAVrh.10hAPOE2(Zhao 등, 2016), 및 PSEN1-E280A 혈통의 암컷 보균자에서 아밀로이드 병리를 허용하지만 타우 병리를 예방하는 APOE3ChC의 동형접합 유전의 사례 보고서(Arboleda-Velasquez 등, 2019)에 기반하여, 본 발명의 hAPOE3ChC 및 hAPOE2ChC 벡터는 둘 다 ChC 변이체가 없는 hAPOE3 및 hAPOE2 벡터보다 더 효과적일 가능성이 있고, hAPOE2ChC 작제물은 아밀로이드 및 타우 병리를 둘 다 예방하는 데 있어서 hAPOE3ChC 작제물보다 더 효과적일 가능성이 있다. 또한 다음을 테스트한다: (1) 보다 일반적인 병리에 대한 hAPOE3ChC 및 hAPOE2 벡터의 효과(AD-관련 CNS 구조의 정량적 부피, 일반적인 세포 기능의 전사체

분석); 및 (2) E4 변이체가 E2 및 E3 변이체보다 더 큰 선천성 면역-관련 염증과 연관되기 때문에(Vitek 등, 2009; Gale 등, 2014) AD-관련 염증(소교세포 및 성상세포 활성화, 전염증성 유전자의 전사체 분석).

표 I. 인간 APOE4-관련 AD 병리의 APP.PS1/TRE4 및 P301S/E4 마우스 모델의 APOE 변이체를 사용한 AAVrh.10-매개 요법

매개변수	변수
마우스 모델	APP.PS1/TRE4, P301S/E4
이식유전자 (AAVrh.10 벡터)	APOE3ChC, APOE3; APOE2ChC, APOE2; -Null, PBS ¹
경로, 용량	양측 해마, 0.4x10 ¹⁰ gc, 1x10 ¹⁰ gc2
벡터 투여 시 연령	2 개월 ²
평가 연령	5, 9 개월 ³
마우스 수/시점, 용량	10 M, 10F
총 마우스 수	880

각 마우스 모델을 PBS 또는 나열된 이식유전자를 코딩하는 AAVrh.10 벡터로 처리하고; 모든 투여는 2 개월에 각각 2 μ l의 나열된 용량으로 해마에 양측으로 이루어지고; CNS의 평가는 5 및 9 개월이며, 평가될 매개변수의 목록은 표 II를 참조한다.

표 II. 인간 APOE4-관련 AD 병리의 APP.PS1/TRE4 및 P301S/E4 마우스 모델에서 APOE 변이체의 효능 평가

매개변수	평가
벡터 관련	이식유전자 DNA, mRNA, 단백질(웨스턴, 면역조직화학)
일반적인 병리	정량적 부피, 일반적인 세포 기능의 전사체(RNAseq)
아밀로이드 관련	가용성, 불용성 A β -1-42, A β -1-40 (ELISA, 조직면역화학)
타우 관련	총 타우, p-타우(ELISA, 면역조직화학)
염증 관련	소교세포, 성상세포 활성화(CD68 면역조직화학, RNAseq 전염증성 유전자)

각 마우스 모델에 생후 2 개월에 AAVrh.10hAPOE3ChC, hAPOE3, hAPOE2ChC, hAPOE2, Null(0.4x10¹⁰ gc 또는 1x10¹⁰ gc; 양측, 해마) 또는 PBS를 투여하고 생후 5 및 9 개월에 평가한다. 각 벡터, 각 용량, 각 시점에 대해 10 마리 수컷, 10 마리 암컷; PBS 10M, 10F 각 시점; DNA, qPCR에 의한 mRNA, APOE 단백질을 정량적 웨스턴, 정량적 면역조직화학에 의해 평가하고; 이상/내후각 피질, 해마, 후측뇌질의 정량적 부피, 및 치상회의 두께를 평가하고; 일반적인 세포 기능 관련 정량적 전사체의 RNAseq를 평가하고; 가용성(RIPA) 및 불용성 A β -1-42 및 A β -1-40을 A β 의 ELISA 및 면역조직화학(해마의 양성 % 영역, A β 플라크 부담); 타우 및 p-타우의 ELISA 및 면역조직화학에 의해 평가하고(해마의 양성 % 영역, 타우 엉킴 정량화가 평가됨); 소교세포(CD68, Iba1) 및 성상세포(GFAP)의 정량화를 세포 카운트 및 해마의 % 영역, 전염증성 유전자의 RNAseq 정량적 전사체에 의해 평가한다.

방법.

벡터 관련. MVrh.10 벡터를 이전에 기재된 바와 같이 생산하고 정제한다((Sondhi 등, 2012; Sondhi 등, 2007). 간단히 말해서, HEK293T 세포를 발현 카세트 플라스미드 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드로 동시 형질감염시켜 벡터를 생산한다. 패키징 세포주인 HEK293T를 5% 소 태아 혈청, 100 U/ml 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신이 보충된 Dulbecco의 변형된 Eagles 배지에서 유지하고, 5% CO₂와 함께 37°C에서 유지한다. 세포를 CellSTACKS(Corning)에서 24 시간 동안 성장시킨 후 PEIpro 절차를 사용하여 플라스미드로 형질감염시킨다. 세포를 3 일 인큐베이션한 후 수확하고 5 회 동결/해동 주기로 용해시킨다. 생성된 세포 용해물을 50 U/ml의 벤조나제로 37°C에서 30 분 동안 처리한다. 세포 용해물을 오요딕산닐 밀도 구배 이어서 Q-HP 이온-교환 크로마토그래피로 정제한다. 정제된 AAVrh.10 벡터를 포스페이트 완충 염수(PBS)에 농축한다. TaqMan 정량적 증합 효소 연쇄 반응으로 벡터 게놈 역가를 결정한다. 정제된 벡터를 멸균 여과하고; 호기성 박테리아, 혐기성 박테리아, 또는 진균의 성장을 뒷받침하는 배지에서 성장에 대해 14 일 테스트하고; 내독소에 대해 테스트하고; 마이크로플라즈마가 없는 것으로 입증하였다.

마우스 모델. APP.PS1-21 마우스를 인간 APOE4 녹인 마우스와 교배하여 유래된 APP.PS1/TRE4 마우스 콜로니를

확립한다(Zhao 등, 2016). 인간 타우 돌연변이체 P301S 마우스를 인간 APOE4 녹인 마우스와 교배하여 P301S/E4 마우스를 생성한다. 마우스의 계놈을 관련 녹인 유전자의 PCR로 검증한다. 정위 수술에 의해 AAV 벡터의 뇌내 주사를 수행한다(Dodart 등, 2005). 간단히 말해서, 멸균 조건 하에, 마우스를 이소플루란으로 마취시키고 정위 프레임에 고정시킨다(David Kopf Instruments). 두개골을 절개하고, 고속 드릴을 사용하여 주사 바늘 크기의 천공을 만든다. AAV 제제(2 μ L, 표시된 용량의 gc)를 33-게이지 바늘(Hamilton) 및 주사기 펌프(KD Scientific)를 사용하여 0.2 μ L/분의 속도로 표적화된 뇌 영역 내에 양측으로 주사한다. 주사에 사용되는 정위 좌표는 다음과 같다: 브레그마에서 전후방으로 ± 1.7 mm; 브레그마에서 내측으로 ± 1.2 mm, 및 경막 아래에 등배측으로 ± 1.7 mm. 이는 마우스 뇌의 아틀라스에 기반한다⁹⁵. 각 주사 후, 역류를 최소화하기 위해 바늘을 5 분 동안 제자리에 남겨 둔 다음 천천히 빼낸다. 동물을 개별적으로 수용하고 완전히 의식을 회복할 때까지 모니터링한다. 생후 5 개월 및 9 개월에, 마우스를 케타민/크실라진으로 깊게 마취시키고 0.3% 헤파린화 염수(2500 IU/L)로 경심관류로 관류한다. 뇌를 빠르게 수집하고, 각 뇌를 조직학적 및 면역조직화학(IHC) 분석을 위해 처리된 1 개의 반뇌로 시상면을 따라 나누고, 다른 반뇌를 해마, 시상, 및 내후각 피질 내로 미세절개한 다음 드라이 아이스에서 빠르게 동결시키고 생화학적 분석을 위해 -80° 에서 저장한다.

[0165] 뇌를 48 시간 이상 동안 4% 파라포름알데히드에 후고정하고, 동결 전 48 시간 이상 동안 30% 수크로스로 옮기고, CM3050-S 저온유지장치(Leica)를 사용하여 절개한다. 일련의 관상 절편을 50 μ m 간격으로 준비한다. IHC 분석은 표준 방법을 사용하여 수행할 것이다(Bales 등, 2009; Holtzman 등, 2000; Bales 등, 1997). 자유-부유 절편을 세척하고 1차 항체와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션한다. 면역반응성(IR)은 Alexa Fluor 488 또는 594-접합된 2차 항체(1:200; Invitrogen) 또는 Vectastain ABC Elite 키트(벡터) 및 3,3'-디아미노벤지딘 용액을 사용하여 시각화한다. 1차 항체 염색의 특이성은 1차 상체가 생략된 경우 IR 신호의 결여로 확인한다. 아밀로이드 플라크를 검출하기 위해 티오플라빈-S 염색을 수행한다(Bales 등, 2009; Holtzman 등, 2000; Bales 등, 1997). 고정된 뇌 절편을 0.1 % 새롭게 만든 티오플라빈-S 용액(50% 에탄올 중)과 함께 8 분 동안 간단히 인큐베이션한 다음 80% 에탄올로 1 분 동안 세정한 후 H₂O로 각각 1 분 동안 3 회 세척한 다음 배지를 장착하여 커버슬립한다. 이미지는 에피형광 현미경(Nikon H550L)을 사용하여 촬영한다.

[0166] 벡터-유래 APOE. 벡터 DNA용으로 처리된 조직 균질물의 경우, DNeasy 혈액 및 조직 키트(cat #69506; Qiagen)를 약 50 mg의 균질화된 조직 샘플과 함께 사용할 것이다. 벡터 이식유전자 mRNA용으로 처리된 조직 균질물의 경우, RNeasy 지질 조직 미니 키트(Qiagen)를 ~50 mg의 균질화된 조직 샘플과 함께 사용할 것이다. 뇌 절편에서 벡터 DNA 및 이식유전자 mRNA 카피의 정량적 분석은 TaqMan-기반 분석(Applied Biosystems "Universal Master Mix II, no UNG" 시약) 및 인간-특이적 프라이머/프로브 세트(Applied Biosystems)를 사용하여 PCR로 수행하여 뮤린 계놈 DNA(정방향 프라이머: 5'-GTGGAGAAGGTGCAGGCT-3'(서열번호:10); 역방향 프라이머: 5'-AAGCGTAATCTGGAACATCGT-3'(서열번호:11); 프로브, 5'-CCCTGTGCCAGCGACAATC-3'(서열번호:12)의 배경에서 바이러스 계놈으로부터 인간 APOE2 또는 E3 또는 E4 cDNA의 3' 말단을 검출할 것이다. PCR은 QuantStudio6 Flex 시스템(Applied Biosystems)을 사용하여 수행한다(Rosenberg 등, 2018). APOE 수준은 샌드위치 ELISA를 사용하여 뇌에서 측정한다(Bales 등, 2009). 조직 균질물을 샘플 희석 완충액(0.4% 글리신을 함유하는 PBST)에 희석한다. 샘플을 항-APOE 항체(1:2000; Millipore)로 코팅된 96-웰 플레이트 내에 로딩하였다. 4°C에서 밤새 인큐베이션 후, 검출을 위해 비오티닐화 항-APOE 항체(1:10,000; Meridian Life Science)를 사용한다. HRP-접합된 스트렙타비딘(Research Diagnostics)과 인큐베이션 후 IR 신호를 TMB 기질(Thermo Scientific)로 현상하고 Synergy H1 Hybrid 플레이트 판독기(BioTek)에서 판독한다. APOE의 수준을 재조합 인간 APOE(Meridian Life Science)로 생성된 표준 곡선을 사용하여 계산한다. 뇌 균질물 내 APOE의 수준을 삼중으로 결정하고, 단백질 함량에 대해 정규화하고, APOE/ mg 단백질의 양으로 표현한다. 마우스 뇌 조직 균질물에서 APOE 및 다른 단백질 수준의 검사를 또한 웨스턴 분석으로 수행한다(Zhao 등, 2016; Sacramento 등, 2020). 조직 균질물 내 총 단백질 농도는 BCA 단백질 검정 키트(Thermo Scientific)를 사용하여 결정하였다. 나트륨 도데실 술페이트(SDS) 폴리아크릴아미드 겔 전기영동의 경우, 동일한 양의 단백질(25 mg) 샘플을 2% SDS 및 1 % β -머캅토에탄올을 함유하는 로딩 염료와 혼합하고, 90°C에서 10 분 동안 인큐베이션하고, 10% Tris-글리신 폴리아크릴아미드 겔에서 용해시킨다. 비변성 PAGE의 경우, 동일한 양의 단백질(25 μ g) 샘플을 0.04% 브로모페놀 블루, 4.0% 글리세롤, 및 100 mM Tris(pH 6.8)의 최종 농도로 비변성 로딩 염료와 혼합하고 4-12% 비변성 Tris-글리신 폴리아크릴아미드 겔(Invitrogen)에서 용해시킨다. 단백질을 100 V에서 폴리비닐리덴 디플루오라이드(Millipore) 막 위로 옮긴다. 23°C에서 1 시간 동안 Superblock(Thermo Scientific)으로 차단한 후, 막을 4°C에서 밤새 1 차 항체로 프로빙한 후, 23°C에서 1 시간 동안 중-특이적 HRP-접합된 2차 항체(1:8000; Invitrogen)로 프로빙한다. 향상된 화학발광(GE Healthcare Biosciences)을 사용하여 밴드를 식별한다. 변성 겔에서의 단백질 분자량을 만화경 분자량 마커 표준(Bio-Rad)과 비교하여 결정한다. 네이티브 겔에서의 입자 직경을 네이티브 고분자량 마

커 표준(GE Healthcare Biosciences)과 비교하여 결정한다. 신호 정량화를 Image Lab 소프트웨어(Bio-Rad)로 스캔한 자가조직방사선사진의 밀도측정 분석을 사용하여 수행한다. 로딩은 블롯을 스트립핑하고 β -액틴 항체(Sigma-Aldrich)로 재프로빙하여 정규화한다.

[0167] 일반적인 병리.

[0168] 체적 분석. 브레그마 +2.1 mm에서 부리모양으로 시작하여 브레그마 -3.9 mm에서 해마의 등쪽 끝까지 모든 6번째 관상 뇌 절편(절편 사이에 300 μ m)을 각 마우스에 대해 동결절단한다. 장착된 절편을 RT에서 20 분 동안 70% 에탄올 중 0.1% 수단 블랙으로 염색한 다음, 70% 에탄올에서 1 분 동안 3 회 세척한다. 절편을 Milli-Q 물에서 3 회 세척하고 Fluoromount로 커버슬립한다. 염색된 슬라이스를 NanoZoomer로 이미지화하고 관심 영역을 NOP 뷰어를 사용하여 각 슬라이스에서 추적하고 측정한다. 부피는 다음 식을 사용하여 계산한다: 부피 = (영역합) $\times$ 0.3 mm. 해마 및 후측뇌실의 경우, 정량화는 브레그마 -1.1에서 시작하여 브레그마 -3.9에서 끝난다. 이상/내후각 피질의 경우, 정량화는 브레그마 -2.3에서 시작하여 브레그마 -3.9에서 끝난다.

[0169] 신경층 두께 측정. 각 마우스로부터의 3 개의 절편(브레그마 -1.4, -1.7, 및 -2.0 mm)을 장착하고 RT에서 5 분 동안 크레실 바이올렛으로 염색한다. 그런 다음 슬라이스를 50%, 70%, 95%(3 회) 및 100% 에탄올(2 회)에서 1 분 동안 순차적으로 탈수한 다음, 크실렌에서 4 분 동안 세척하고(2 회), 사이토솔로 커버슬립한다(Coon 등, 2007)(Thermo Fisher Scientific, 8310-16). CA1 추체 세포층 및 치상회 과립 세포층의 두께는 모든 3 개 슬라이스의 2 개 스팟에서 세포층에 수직인 눈금을 그리고 각 마우스에 대한 평균 값을 취하여 측정한다.

[0170] RNAseq 전사체 분석. 총 RNA를 TRIzol 방법을 사용하여 추출하고 후속 정화를 RNeasy 칼럼(Qiagen)에서 수행하였다. RNA 양을 Nanodrop ND-1000(Thermo Scientific)으로 평가하고 RNA 품질을 Bioanalyzer(Agilent Technologies)로 평가하였다(Raman 등, 2009; Tumor Analysis, 2004). 총 RNA를 정제하고, 증폭시키고 Illumina HiSeq 2500(Illumina)을 사용하여 쌍형성-단부 서열분석 반응을 위해 Illumina 플로우셀 위에 로딩한다(Ryan 등, 2014). (0.5 μ g 총 RNA) TruSeq RNA Library Prep Kit v2를 사용하여 라이브러리를 제조한다. Illumina HiSeq 쌍형성-단부 판독값은 STAR(2.3.1z13_r470)을 사용하여 GRCh37/hg19 인간 참조 게놈 및 RefSeq 유전자 정의(2014-06-02)에 정렬한다. Cufflinks(2.2)를 사용하여 정렬된 판독값을 RefSeq 유전자 정의를 사용하여 서열분석된 백만 분획 당 엑손의 킬로베이스 당 단편(FPKM)으로 변환한다. FPKM이 0.125 초과인 유전자를 분석에 포함한다. 기능장애 유전자는 유전자 온톨로지(GO) 및 인간 단백질 참조 데이터 베이스(www.hprd.org)를 사용하여 기능적으로 주석을 단다. 수치 데이터의 비교를 위해 양측 스튜던트 t-검정을 사용하고 카이-제곱 검정을 사용하며 범주 데이터의 비교를 위해 Yates 교정을 사용한다. 파일은 Partek Genomics Suite 소프트웨어 버전 6.6, 2012(Partek)에서 처리한다. 1원 ANOVA를 사용하여 일치된 그룹을 비교하고, 2- 또는 3-원 ANOVA를 사용하여 변이원으로 식별된 매개변수에 따라 그룹을 비교한다. 0.05 미만의 p 값이 유의한 것으로 간주된다(p 값은 Benjamini-Hochberg 교정을 사용하여 다중 테스트에 대해 교정되었음). "일반적인 병리"와 관련하여, 정상 세포 기능 유전자 및 자가포식-관련 유전자는 Shi 등(2017) 연구에 상세히 기재된 바와 같이 평가한다.

[0171] 아밀로이드 관련. 아밀로이드/A13 부담의 정량화는 표준 방법을 사용하여 수행한다(Zhao 등, 2016; Bales 등, 2009; Holtzman 등, 2000; Bales 등, 1997). 간단히 말해서, 각각이 300 μ m로 분리된 마우스 당 4 개의 뇌 절편을 정량화를 위해 선택한다. 이들 절편은 마우스 뇌 아틀라스에서 브레그마 -1.4, -1.7, -2.0, 및 -2.3 mm 절편에 대략적으로 상응한다(Franklin 등, 2019). 뇌 A β 부담의 정량화는 비오틴닐화 3D6 항체로 면역염색 후 완료된다(Zhao 등, 2016). 이미지는 플라크를 강조하기 위해 임계값을 설정한 다음 ImageJ 소프트웨어(National Institutes of Health)의 "입자 분석" 기능에 의해 분석한다. 임계값 설정 후, 식별된 대상을 개별적으로 검사하여 식별된 각 대상이 플라크인지 확인한다. A β IR(A β 부담) 또는 티오플라빈-S(아밀로이드 부담)에 의해 커버된 표면적의 백분율을 지향층, 추상층, 방사층, 및 치상회를 포함하는 해마 형성의 특정 영역에 대해 결정한다. 그런 다음 A β 또는 티오플라빈-S 부담은 정량화된 총 영역의 %로 나타낸다. 4 개 조직 절편의 평균을 사용하여 각 마우스에 대한 플라크 부담을 정량화한다. 모든 분석은 맹검 방식으로 수행하며, 검사자는 임의의 동물의 처리 조건을 알지 못한다.

[0172] A β 수준은 표준 방법을 사용하여 샌드위치 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA)을 사용하여 마우스의 뇌 균질물에서 검정한다(Bales 등, 2009; Holtzman 등, 2000; Bales 등, 1997). 간단히 말해서, 뇌 조직을 RIPA 및 프로테아제 억제제의 각테일(1:1000; Roche)을 함유하는 5.5-M 구아니딘 완충액으로 연속적으로 균질화한다. RIPA 추출 후 측정된 A β 는 A β 의 가용성 풀을 나타내는 반면, 구아니딘 추출 후 측정된 A β 는 불용성 풀을 나타낸다. 균질물을 A β 1-40 또는 A β 1-42의 측정 전에 차가운 샘플 희석 완충액(포스페이트 완충 염수-0.05%

tween 20[PBST] 중 1% 소 혈청 알부민)으로 희석시킨다. 샘플을 포획 항체로서 Aβ1-42(21F12), 또는 Aβ1-40(2G3)의 C-말단 도메인을 특이적으로 인식하는 항체로 코팅된 플레이트 위에 로딩하고, 검출을 위해 비오틴화 3D6을 사용한다. 서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP)-접합된 스트렙타비딘(Research Diagnostics)과 인큐베이션 후 IR 신호를 TMB 기질(Thermo Scientific)을 사용하여 현상하고 Synergy H1 Hybrid 플레이트 판독기(BioTek)에서 판독한다. Aβ 수준을 재조합 인간 Aβ(American Peptide Company)로 생성된 표준 곡선을 사용하여 계산한다. 뇌 균질물 내 Aβ 수준을 삼중으로 결정하고, 단백질 함량에 대해 정규화하고, Aβ/mg 단백질의 양으로 표현한다. Aβ 올리고머를 3D6/비오틴-3D6 샌드위치 ELISA(Immuno-Biological Laboratories)로 정량화하며, 여기서 동일한 N-말단(잔기 1-16) 항체를 포획 및 검출 둘 다를 위해 사용한다.

[0173] 타우 관련. *ELISA.* 인간 총 타우, 및 p-타우를 Chai 등(2011)에 기재된 바와 같이 샌드위치 ELISA에 따라 pS202/T205-타우(ATS) 및 pT212/pS214-타우(AT100) 항체에 의해 정량화한다. 간단히 말해서, 96-웰 플레이트를 4°C에서 밤새 5 μg/ml ATS, 또는 2 μg/ml AT100(Thermo Fisher Scientific)으로 미리 코팅한 후 Starting Block 차단 완충액(Thermo Fisher Scientific)으로 차단한다. 샘플(S1 또는 P1)을 Superblock 완충액(Thermo Fisher Scientific)에 희석하고 비오틴화-HT7 항체(1:300; Thermo Fisher Scientific)와 함께 플레이트 위에 로딩한다. 23°C에서 1 시간 동안 인큐베이션 후, 샘플을 TBS/0.5% Tween 20 세척 완충액으로 9 회 세척한 후 30 분 동안 스트렙타비딘-HRP(Jackson ImmunoResearch)와 함께 인큐베이션한다. 그런 다음 플레이트를 30 분 동안 1-단계 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB) 기질(Thermo Fisher Scientific)과 함께 인큐베이션하고 2N H₂SO₄로 중단시켜 현상한 다음 450 nm에서 BioTek Synergy H1 Hybrid Reader를 사용하여 판독한다. ATS 또는 AT100 면역반응성 타우의 양은 인간 AD 뇌 균질물에서 유래된 표준 곡선을 사용하여 결정한다.

[0174] 염증 관련. 2 가지 뮤린 모델과 연관된 염증에 대한 유전자 요법의 정도 및 특성을 Shi 등(2017)에 의해 기재된 바와 같이 평가한다. 면역조직화학을 CD68-양성 및 Iba-1 소교세포 염색 및 성상세포 염색(GFAP)으로 평가한다. 또한, RNAseq 데이터를 Shi 등(2017)에 의해 사용된 동일한 전염증성 유전자를 사용하여 평가하며, 특히 전염증성 유전자 클러스터 1 및 성상세포 A1-특이적(염증 단독) 유전자에 초점을 맞춘다(Shi 등, 2017).

[0175] 통계적 고려사항. 벡터-유래 APOE, 일반적인 병리, 아밀로이드 관련, 타우 관련, 염증 관련(표 II) 범주 내에서 각 측정에 대해 다원 ANOVA 모델을 적용한다. 주요 ANOVA 모델은 다음 5 가지 인자를 포함한다: 마우스 모델(AAP.PS1/TRE4, P301S/E4), 벡터(AAVrh.10-APOE3ChC, -APOE3, AAVrh.10APOE2ChC, -APOE2, AAVrh.10Null), 용량(0.5x10¹⁰ 및 1x10¹⁰ gc), 시간(5 및 9 개월), 및 성별(M/F), 여기서 한번에 하나의 벡터를 요법 없음-PBS(그러나 달리 동일한 인자)와 비교하는 추가의 별도 ANOVA를 사용하여 PBS 대조군과 비교한 영향을 탐구한다. 중심 가설은 아밀로이드 관련 및 타우 관련 측정에 대해 다음 사전 대조가 있는 주요 ANOVA 모델로 평가된다: AA Vrh.1 0-APOE3ChC vs AA Vrh.1 0Null(목표 1) 및 AAVrh.10APOE2ChC vs AAVrh.10Null 및 AAVrh.10-APOE3ChC vs AAVrh.10APOE2ChC 이들 각각은 마우스 군주 사이, 각 마우스 군주 내 용량 사이, 및 각 마우스 군주 내 시점 사이에 적용된다. 이는 45 개(= 벡터 비교 x 인자 비교 x 측정)의 계획된 테스트를 포함하고 Bonferroni 교정을 사용하여 전체 0.05 유형 I 오류를 제어하는 유의성을 평가한다. 이 설계의 검정력에 대한 하한치에 근사치화하기 위한 경험적 벤치마크로서, 가용성 Aβ1-42에서 차이는 27 .2%이고 PDAPP 마우스 뇌 아밀로이드증 실험(도 8)에서 AAVrh.10hAPOE2를 대조군과 비교한 경우 각 그룹의 관찰된 표준 편차는 0.85 초과의 검정력을 생산하며, 여기서 불용성 Aβ1-42에 대한 경험적 차이 및 표준 편차를 고려하면 검정력이 훨씬 더 크며, 이는 전체 설계가 중심 가설을 평가하기에 적합함을 나타낸다. 이러한 사전 비교 뿐만 아니라, 탐색적인 사후 테스트 접근법(적절한 교정 포함)을 추가 적용하여 상이한 마우스 모델, 용량, 측정 시간에 대한 뇌 벡터 유래 APOE의 양을 평가하고, 또한 일반적인 병리 및 염증 관련 측정(부피 및 RNA-Seq)에 대해 광범위한 벡터가 얼마나 영향을 미치는지 탐구하고(예를 들어, AAVrh.10-APOE3ChC 및 AAVrh.10APOE2ChC를 서로 및 AAVrh.10-APOE3 및 AAVrh.10-APOE와 비교), 이러한 영향에 대한 마우스 모델, 벡터, 용량, 측정 시간 및 성별의 기여를 추정한다.

[0176] **실시예 2**

[0177] 개요

[0178] 퇴행성 뇌 질환이며 치매의 가장 흔한 원인인 알츠하이머병(AD)은 현재 580만 명의 미국인 및 전 세계 5000만 명의 사람들에게 영향을 미친다. AD 증상은 인지 및 기능적 능력의 점진적인 저하 및 세포외 베타-아밀로이드 플라크, 세포내 타우 엉킴, 만성 염증, 및 뇌 위축을 포함한 뇌 병리를 포함한다. 후기 발병 AD에 대한 감수성에 대한 가장 큰 유전적 위험 인자는 아포지질단백질 E(APOE) 대립유전자의 다형성에 관한 것이다. APOE4는 AD 환자에서 매우 빈번하게 발견되고 동형접합 유전은 AD 발병 위험이 14.5배 증가된 것과 연관된다.

대조적으로, *APOE2*는 AD 발병 위험을 감소시키고 질환 발병을 지연시키며, 예를 들어, AD 발병 위험을 50% 이상까지 줄이고 발병 연령을 지연시킨다. 역학적 데이터에 기반하여, *APOE4*는 AD에서 뇌 아밀로이드 부하 증가 및 더 큰 기억 손상과 연관되는 반면, *APOE2*는 이러한 효과를 약화시킨다. 인간에서, *APOE4/4* 동형접합 유전자형이 있는 AD가 발병하는 교차비는 14.5이고 *APOE2/4* 이형접합체에서 2.6으로 줄어든다. 따라서, *APOE4*의 존재는 보호된 *APOE2*가 보충된 경우에도 여전히 위험을 구성한다. 게다가, *APOE4*는 β -아밀로이드 생산을 촉진하는 역할과는 별개로 선천성 면역 활성화 증가, 뉴런에서 차등 신호전달, 타우 병리의 악화, 및 비정상적인 뇌 기능과 연관되어 있다.

[0179] 아데노 연관 바이러스(AAV) 벡터를 사용하여 AD 무린 모델의 CNS에 *APOE2*를 직접 전달하는 것은 유의한 *APOE2* 발현을 제공하고 가용성 및 불용성 아밀로이드- β 펩티드 및 아밀로이드 부담 수준을 감소시킬 수 있다. 그러나, *APOE2* 보충 조차도, *APOE4*의 존재는 *APOE2/4* 이형접합체가 AD 발병 위험을 2.6배 증가시키기 때문에 여전히 위험 증가를 구성한다. 일 구현예에서, *APOE4* 동형접합체 내 유해한 내인성 *APOE4*의 수준을 동시에 감소시키면서 변형된 *APOE2* 또는 *APOE3*인 보호된 *APOE2*의 발현을 도입하기 위한 AAV-기반 유전자 요법이 제공된다. 일 구현예에서, 내인성 *APOE4*를 표적화하는 인공 microRNA(miRNA)는 인간 *APOE2* 유전자에 대한 cDNA(h*APOE2*-mir*APOE4*)와 함께 AAV 발현 카세트 내로 도입된다. 일 구현예에서, AAV9 혈청형 캡시드는 발현 카세트 패키징에 이용되는 데, 이는 *APOE*의 주요 절차인 생산자인 정상세포, 뿐만 아니라 소교세포 및 뉴런의 효율적인 형질 도입을 매개하기 때문이다. 돌연변이체 인간 타우 및 인간 *APOE4*를 발현하고 높은 인산화된 타우 부담, 만성염증, 및 광범위한 신경변성을 갖는 확립된 P301S/E4 AD 마우스 모델을 사용하여 요법 효능을 평가한다. AAV9-h*APOE2*-mir*APOE4*를 사용한 전략을 평가하기 위해, AAV 작제물을 시험관내에서 *APOE2* 코딩 서열의 전달 및 내인성 *APOE4* 발현의 침묵에 대해 테스트한다. 또한, 내인성 *APOE4*의 감소에 따른 *APOE2*의 증대가 생체내에서 타우 병리, 신경변성, 및 신경염증으로부터 보호되는지 여부를 결정한다.

[0180] 해마내 또는 시상내 경로에 의한 2 가지 무린 모델의 중추신경계(CNS)에 인간 *APOE2* 코딩 서열의 아데노 연관 바이러스(AAV) 혈청형 rh.10 및 혈청형 9 전달은 뇌 전체에 걸쳐 유의한 수준의 인간 *APOE2* 발현을 산출하였다. 또한, 가용성 및 불용성 아밀로이드- β 펩티드 및 아밀로이드 부담의 양은 뇌 부분에서 줄어들었다. 그러나, *APOE2*만 제공함으로써 *APOE4/4*에서 *APOE2/4*로 뇌를 유전적으로 변형시키는 것은 *APOE4*의 존재 위험을 완전히 완화시키지 않는다. AAV 유전자 요법을 사용하여 보호된 *APOE2*의 전달과 함께 내인성 *APOE4*의 발현 감소는 *APOE2* 단독을 사용한 유전자 요법보다 *APOE4* 동형접합체의 위험을 감소시킬 수 있다.

[0181] 인간 *APOE2* 및 *APOE4*에 대한 코딩 서열은 2 개의 뉴클레오타드가 상이하다. 억제제를 위해 내인성 *APOE4* mRNA를 표적하는 인공 microRNA(miRNA) 서열을 설계하였다. 인공 miRNA를 인간 정상교종 세포주에서 *APOE* 발현을 침묵시키는 능력에 대해 시험관내에서 스크리닝한다. 선택된 miRNA를 miRNA에 의해 침묵될 수 없는 변형된 인간 *APOE2* cDNA와 함께 AAV 발현 카세트 내에 통합한다. *APOE2*를 함유하는 선택된 AAV 발현 카세트 및 *APOE4*를 표적화하는 인공 miRNA를 CNS 내 *APOE*의 주요 생산자인 정상세포에 대한 발현을 표적화하기 위해 AAV9 캡시드 내에 패키징한다.

[0182] P301S/E4 AD 무린 모델 마우스는 인간 돌연변이체 타우 및 인간 *APOE4*를 둘 다 발현하고 소교세포 활성화로부터 높은 수준의 인산화 타우, 뇌 위축, 및 신경염증을 발생시킨다. CNS 내 *APOE*는 주로 정상세포로부터 발현되기 때문에, 이 연구에서 정상세포 뿐만 아니라 소교세포 및 뉴런을 효율적으로 형질도입하는 AAV9 벡터가 사용된다. AAV9-h*APOE2*-mir*APOE4* 및 AAV9-h*APOE2* 벡터를 수조내 경로에 의해 P301S/E4 마우스의 CNS에 직접 투여한다. 마우스를 시간 경과에 따른 행동 및 인지 기능의 변화에 대해 평가한다. 희생시킨 후, 마우스를 뇌에서 벡터-유래 h*APOE2* 및 내인성 h*APOE4*의 발현 뿐만 아니라 β -아밀로이드, 총 및 인산화 타우 수준 및 병리, 소교세포 활성화, 및 뇌 위축에 대해 평가할 것이다.

[0183] 전략. 알츠하이머의 증상은 기억 상실, 혼란, 성격 및 기분 변화를 포함한 인지 및 기능 능력의 점진적인 저하, 및 기본 활동을 수행하는 능력 상실을 포함한다¹. AD와 연관된 뇌 병리는 세포외 베타-아밀로이드(A β) 플라크 및 세포내 신경섬유성 타우 엉킴의 축적을 포함한다. 신경교세포 활성화로 인한 만성 신경염증 및 뇌 위축으로 이어지는 세포 손실이 진행성 AD 뇌에 존재한다(Association As., 2019).

[0184] 후기 발병 AD의 감수성에 대한 가장 강한 유전적 위험 인자는 아포지질단백질 E(*APOE*) 대립유전자의 다형성에 관한 것이다. *APOE*는 3 개의 동형을 갖는다: *APOE2*, *APOE3*, 및 *APOE4*. *APOE3*은 가장 흔한 대립유전자인 반면 *APOE4*의 대립유전자 빈도는 대략 15%이고 *APOE2*는 8%이다(Farrer 등, 1997). 그러나, *APOE4*가 있는 AD 환자의 빈도는 40-65%이다(Farrer 등, 1997; Corder 등, 1993; Ward 등, 2012). *APOE4*는 인지 저하의 가속화 속도와 중증도 및 AD 발병의 초기 연령과 연관되어 있다. 대조적으로, *APOE2*는 AD 발병 위험을 50%까지 감소시키고 발

병을 최대 10 년까지 지연시킨다(Corder 등, 1993; Corder 등, 1997; Sando 등, 2008; Shinohara 등, 2016).

[0185] APOE는 말초 및 중추신경계(CNS) 둘 다에서 지질 수송에 주요한 역할을 하는 분비 단백질이다. APOE 동형은 2 개의 아미노산 위치 112 및 158에서만 상이하다(APOE2: Cys/Cys, APOE3: Cys/Arg, APOE4: Arg/Arg). 그러나, 이러한 차이는 APOE의 구조 및 기능에 완전히 영향을 미친다(Hatters & Peters-Libeu, 2006). APOE의 혈청 및 뇌 농도는 동형 간에 상이하다(APOE2 > APOE3 > APOE4). 일반적으로 고밀도 지단백질(HDL)과 연관된 APOE2 및 APOE3 및 저밀도 및 초저밀도 지단백질(LDL, VLDL)과 연관된 APOE4의 지질 상태는 차이가 있다(Hatters & Peters-Libeu, 2006; Dong 등, 1994). 추가로, APOE 동형은 저밀도 지단백질 수용체-관련 1(LRP1), 헤파란 수페이트 프로테오글리칸(HSPG), 및 LDL 수용체(LDLR)를 포함한 수용체에 차등적으로 결합하며 APOE2는 APOE3 또는 APOE4보다 더 낮은 친화도를 갖는다(Bu, 2009, Arboleda-Velasquez 등, 2019).

[0186] APOE는 AD에서 발견된 병리 및 신경변성에서 수많은 역할을 한다. 세포의 Aβ 플라크는 AD 병리의 특징이다. Aβ 침착은 APOE4 담체에 더 풍부하다(Dorey 등, 2014). APOE4는 Aβ 생산을 향상시키고, 리소좀 분해 및 혈액 뇌 장벽 전체에 걸쳐 수송을 손상시킴으로써 Aβ 청소율을 줄이고, 독성 기능 이득을 나타내는 Aβ 응집 및 올리고머 안정화를 촉진한다(Jiang 등, 2008; Du 등, 2009; Nielsen 등, 2010; Rodriguez 등, 2014; Zekonyte 등, 2016; Lin 등, 2018; Wang 등, 2018). 과인산화된 타우는 AD 질환의 후기 단계에서 발견된 신경섬유성 엉킴의 주요 구성요소이다(Hampel 등, 2010). APOE4 발현은 타우 병리를 악화시킨다(Shi 등, 2017). APOE4는 다른 동형보다 타우에 대한 더 약한 결합을 나타내고(Strittmatter 등, 1994; Fleming 등, 1996), 뉴런에서 APOE4의 발현은 타우 인산화를 증가시킬 수 있다(Wang 등, 2018; Brecht 등, 2004; Harris 등, 2004). APOE는 또한 면역조절 기능을 가지며 더 큰 면역 반응은 APOE4 대립유전자와 연관되어 있다(Shi & Holtzman, 2018). 최근 연구는 CNS에서 선천성 면역 활성화가 AD에서 신경염증 및 후속 신경 손실 및 뇌 위축에 중요한 역할을 하고, 소교세포 활성화가 APOE4의 존재에 의해 촉진됨을 나타내었다(Rodriguez 등, 2014; Shi 등, 2017; Shi 등, 2019). APOE4는 APOE2보다 더 높은 친화도로 뉴런의 수용체에 결합하고 시냅스 형성 및 증가된 아밀로이드 전구체 단백질(APP) 전사를 포함하여 다중 신호전달 경로의 향상된 활성화를 자극한다(Ohkubo 등, 2001; Huang 등, 2017; Huang 등, 2019). 손상된 뉴런의 이러한 수용체에 결합하는 APOE4는 또한 옹소닌으로 작용하여 소교세포 발현된 APOE 결합 파트너인 '골수 세포 상에서 발현된 촉발 수용체-2'(TREM2)와의 상호작용을 통해 소교세포에 의한 신경 식세포작용을 촉진하여 향상된 신경 손실 및 뇌 위축으로 이어질 수 있다(Atagi 등, 2015; Bailey 등, 2015; Yeh 등, 2016; Jendresen 등, 2017). 또한, APOE4는 정상 성상세포 및 소교세포 항상성 기능을 방해한다(Fernandez 등, 2019). 임상적으로, APOE4는 가속화된 인지 저하와 연관되는 반면 APOE2는 보호된다(Shinohara 등, 2016; Helkala 등, 1996; Staehelin 등, 1999; Wilson 등, 2002). 따라서, APOE4는 AD 발생과 연관된 여러 과정에서 중추적인 역할을 하며 개입을 위한 주요 표적이다.

[0187] 인간 유전 데이터는 APOE4 및 APOE2 대립유전자가 반우성 유전을 가짐을 나타낸다(Corder 등, 1994; Genin 등, 2011). APOE4 동형접합 개체는 AD 발병 위험이 14.5-배 증가하는 반면, APOE2/4 개체는 위험이 2.6-배만 증가하며, 이는 보호된 APOE2 대립유전자의 존재가 APOE4 대립유전자의 유해한 효과를 부분적으로 완화할 수 있음을 나타낸다. AD 발병 위험은 APOE2/4 이형접합체에서 실질적으로 감소하지만, APOE2/3 또는 APOE2/2 유전자형이 있는 개체에서보다 여전히 상당히 더 높다(각각 AD 발병 위험이 1.8- 및 7.7-배 감소됨(Genin 등, 2011). 이 유전 데이터는 CNS에서 APOE2 증가와 함께 APOE4의 수준 감소가 AD 발병 위험이 높은 APOE4 보균자에 대한 요법에 유익할 것임을 시사한다.

[0188] APOE4를 발현하는 인간 유도 다능성 줄기 세포 유래 뉴런은 Aβ 생산 증가, 더 높은 수준의 타우 인산화, 및 유전자 편집을 통해 APOE4를 APOE3으로 전환함으로써 교정된 더 많은 변성을 가졌다(Lin 등, 2018; Wang 등, 2018). 본 발명자들 및 다른 그룹의 이전 연구는 바이러스 벡터에 의한 APOE2의 CNS로의 전달이 모두 AD41-43의 마우스 모델에서 APOE2 발현을 증가시키고 뇌 Aβ 및 아밀로이드 부담을 감소시킴을 입증하였다. 전달된 APOE2의 용량 및 기존 Aβ 1-42 침착의 양은 치료 효능을 결정하는 데 있어서 중요한 인자였다(Zhao 등, 2016). 그러나, 이러한 이전 연구에서, 내인성 APOE4는 여전히 존재하였다.

[0189] 개시된 요법은 AD로 이어지기 전에 질환 과정을 예방하거나 또는 중단하기 위해 증상이 개시하기 훨씬 전에 APOE4 동형접합체에 전달될 수 있다.

[0190] 연구. 이전 연구는 해마내 또는 시상내 경로에 의해 2 개의 AD 무런 모델의 CNS에 인간 APOE2 코딩 서열의 AAV 혈청형 rh.10 및 혈청형 9 전달을 테스트하였다. 인간 APOE2는 인간 아밀로이드 전구체 단백질(APP) 및 프레세닐린 1(PS1) 돌연변이 및 무런 APOE43 대신 인간 APOE4를 발현하는 Aβ 아밀로이드증의 APP.PS1/TRE4 AD 무런 모델에서 AAV9-APOE2 벡터의 시상내 전달을 사용하여 뇌 전체에 걸쳐 높은 수준으로 발현되었다(도 21a).

또한, *APOE2* 증대는 이 AD 마우스에서 $A\beta$ 및 아밀로이드 부하를 감소시켰다(Zhao 등, 2016)(도 21b). 하나의 전략은 내인성 *APOE4*를 표적화하는 인공 microRNA(miRNA)를 인간 *APOE2* 유전자에 대한 cDNA와 함께 AAV 발현 카세트 내로 암호화하는 것이다.

[0191] 표적 서열 선택. *APOE4* 서열을 다중 알고리즘을 사용하여 작은 간섭 RNA(siRNA)에 대한 최상의 표적화 서열에 대해 평가하고 표적의 상호작용에 대한 가능성을 최소화하기 위해 스크리닝하였다. 선택된 siRNA의 녹다운 능력을 U87 인간 성상교종 세포주에서 내인성 APOE에 대해 시험관내에서 테스트하였다(도 22). siRNA 서열은 *APOE4*에 특이적이지 않고 모든 *APOE* 동형의 발현을 억제할 것이다. 최상의 siRNA 서열은 AAV 벡터에서 발현을 위해 인공 miRNA 카세트 내로 통합하기 위해 선택되었다.

[0192] 유전자 요법의 효과는 타우 병리, 신경염증, 및 신경변성에 초점을 맞춘다. AAV 벡터는 발현을 하향조절하기 위해 내인성 *APOE4* mRNA를 표적화하는 인공 miRNA와 함께 인간 *APOE2*의 지속적인 발현을 전달한다(hAPOE2-mirAPOE4). AAV9는 뇌에서 APOE의 주요 생산자인 성상세포, 뿐만 아니라 소교세포 및 뉴런을 효율적으로 형질 도입하고 이 연구에 사용될 것이다(Xu 등, 2006; Foust 등, 2009; Gray 등, 2011; Gong 등, 2015; Vagner 등, 2016; Zhang 등, 2014; Zhang 등, 2-2014). 이 AAV 유전자 요법은 *APOE4* 동형접합체에서 APOE4에 비해 향상된 APOE2 발현을 제공하고, 신경섬유성 타우 엉킴을 줄이고, 소교세포 활성화를 감소시키고, 해마 및 피질 병리를 줄이고, 행동을 개선한다.

[0193] 내인성 *APOE4* 발현을 침묵시키고 시험관내에서 *APOE2* 코딩 서열을 전달하는 AAV 작제물. U87 인간 성상교종 세포에서 APOE의 발현을 효과적으로 녹다운시키는 siRNA 서열을 식별하였다. 이들 서열은 모든 대립유전자 서열에 공통인 *APOE*의 분절을 표적한다. 가장 효과적인 siRNA 서열을 선택하고 향상된 mir155 인공 miRNA 백본 내로 혼입시켜 mirAPOE4를 산출한다(Fowler 등, 2016)(도 23a). 헤어핀 줄기 및 GC 함량의 불일치 배치는 세포에서 miRNA 처리에 영향을 미칠 수 있으므로(Fowler 등, 2016; Fang & Bartel, 2015), 가장 효과적인 설계를 보장하기 위해 시험관내에서 APOE를 녹다운하는 능력에 대해 mirAPOE4의 여러 반복을 테스트한다. 최적화된 mirAPOE4의 2 내지 4 개 탠덤 카피를 AAV 발현 카세트 프로모터(하이브리드 CMV/닭 β -액틴; CAG)에 존재하는 인트론 또는 이식유전자(mCherry 또는 hAPOE2-HA) 정지 코돈과 폴리아데닐화 신호 사이의 개재 서열 내로 클로닝하여 발현 카세트에서 mirAPOE4의 최적 수 및 위치를 결정한다(Mueller 등, 2012)(도 23b). AAV mirAPOE4 발현 카세트 플라스미드는 배양 배지 및 세포를 수확하기 전에 72 시간 동안 U87 세포를 형질감염시켜 APOE의 발현을 줄이는 능력에 대해 시험관내에서 테스트한다. *APOE* mRNA의 발현은 RT-qPCR에 의해 평가하고 분비된 APOE 단백질은 웨스턴 블롯 및 ELISA에 의해 평가한다.

[0194] 동시에, 침묵 돌연변이는 벡터 유래 *APOE2* 발현이 침묵될 수 없도록 선택된 mirAPOE4에 대한 인식 부위에서 인간 *APOE2* cDNA의 코딩 서열에서 이루어진다. 벡터-유래 인간 *APOE2*는 검출을 용이하게 하기 위해 C-말단 헤마글루티닌(HA) 태그를 갖는다. mirAPOE4의 존재 하에 벡터-유래 hAPOE2-HA의 발현은 동시-형질감염으로 확인하고 hAPOE2-HA 발현의 분석은 항-HA 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅으로 확인한다. 최적화된 hAPOE2-mirAPOE4 카세트는 AAV9 혈청형 캡시드 내에 패키징되어 있다. AAV9는 뇌에서 APOE의 주요 생산자인 성상세포, 뿐만 아니라 소교세포 및 뉴런을 효율적으로 형질도입한다. hAPOE2-HA 및 mirAPOE4를 발현하는 AAV9 벡터의 기능성은 생체내 실험을 진행하기 전에 시험관내에서 확인한다.

[0195] *APOE2*의 증대는 내인성 *APOE4*의 감소와 상관관계가 있을 수 있으며 생체내에서 타우 병리, 신경변성, 및 신경염증으로부터 보호한다. CNS에 AAV9-hAPOE2의 투여는 뇌 전체에 걸쳐 APOE 수준을 증가시켰고 인간 *APOE4*의 맥락에서 $A\beta$ 아밀로이드증의 APP.PS1/TRE4 AD 마우스 모델에서 $A\beta$ 1-42 수준을 감소시켰다(Zhao 등, 2016; Kim 등, 2011)(도 21). $A\beta$ 부하와 무관하게 AD 뇌 위축 및 인지 기능장애에서 신경섬유성 타우 엉킴 및 선천성 면역 반응의 중요성 때문에(Arboleda-Velasquez 등, 2019; Shi 등, 2017; Shi 등, 2019; Josephs 등, 2008; Mattsson 등, 2018), 타우 병리, 소교세포 활성화, 및 신경변성이 결정된다. P301S/E4 마우스는 전측두엽 치매와 연관된 P301S 돌연변이를 함유하는 1N4R 인간 타우, 및 마우스 *APOE*를 대체하는 인간 *APOE4*를 과발현한다(Shi 등, 2017; Yoshiyama 등, 2007). P301S/E4 마우스는 인간 *APOE3* 또는 *APOE2*를 발현하는 마우스보다 더 높은 뇌 인산화된 타우 부담 및 더 광범위한 신경변성 및 신경염증을 갖지만(Shi 등, 2017; Shi 등, 2019), 아밀로이드 플라크 형성을 나타내지는 않는다(Shi 등, 2017; Yoshiyama 등, 2007; Haurigot 등, 2013). P301S 1N4R 타우 B6/C3 마우스(Jackson Laboratories 008169) 및 인간 *APOE4* 녹인 마우스(TRE4 - Taconic 1549: B6.129P2-Apoetm3(APOE*4)Mae N8)는 P301S 및 TRE4 마우스를 교배함으로써 공개된 모델을 재현할 수 있다.. C57B1/6 마우스는 야생형 대조군으로서 사용된다.

[0196] P301S/E4 마우스에서 수조내(IC) 경로에 의한 투여 후 내인성 *APOE4*에 대한 인간 *APOE2* + miRNA를 발현하는

AAV9-hAPOE2-mirAPOE4의 벡터-매개 전달의 영향을 평가한다. IC 경로는 최소 침습 투여로 뇌 전반에 걸쳐 넓은 벡터 분포를 제공한다(Haurigot 등, 2013; Hinderer 등, 2018; Rosenberg 등, 2018; Markmann 등, 2018). AAV9-hAPOE2, AAV9-mCherry-mirAPOE4, AAV9-null, 및 요법 없음(PBS)은 대조군으로 사용된다. 마우스를 매달 행동 및 신경학적 평가에 대해 평가한다. 희생시킨 후, 마우스를 투여 후 1 및 7 개월에 벡터-유래 hAPOE2 및 내인성 APOE4 발현, A β 펩티드 부담, 총 가용성 및 불용성 타우 부담, 과인산화된 타우 엉킴, 소교세포 활성화, 및 뇌 신경변성에 대해 평가한다(총 연령: 각각 3 및 9 개월)(표 3).

표 3. 마우스 연구

마우스 모델 (유전자형)	벡터	투여 용량 및 경로	평가될 매개변수
P301S/E4	AAV9-hAPOE2		• 행동 및 신경학적 평가 (매월) • hAPOE4 및 hAPOE2의 뇌 발현 • 가용성 및 불용성 Aβ 수준 • 뇌 균질물에서 인산화된 타우 및 총 타우 수준의 평가 • 신경염증성 엉킴의 CNS 평가 • 소교세포 활성화 • 해마 및 피질의 병리^{13,14}
	AAV9-hAPOE2-mirAPOE4		
	AAV9-mCherry-mirAPOE4		
	10 ¹¹ gc, 수조내(IC) 경로를 통해		
	요법 없음 (PBS)	없음 (PBS, IC)	
C57Bl/6 (대조군)	요법 없음 (PBS)	없음 (PBS, IC)	
2 개 군주	5 개 벡터	1 개 경로	생후 3 및 9 개월에 부검

8 주령 성체 마우스, 처리 코호트 당 n=16 마리 수컷 및 n=16 마리 암컷(n= 총 192 마리). 모든 마우스는 잠재적인 연구 편향을 피하기 위해 모든 그룹에 걸쳐 시차를 두고 투여된 동물로 코호트 그룹에 무작위로 할당된다. 연구자들이 처리 상태에 대해 맹검을 유지하도록 처리 식별자 없이 케이지에 번호를 매긴다.

처리 코호트는 인간 타우 및 APOE4 유전자 대체가 있는 이중 돌연변이체 마우스주(P301S/E4)를 수반한다. 동일한 유전적 배경을 가진 야생형 대조군인 C57Bl/6 군주는 '요법 없음' 대조군에 사용된다.

테스트된 벡터는 다음을 포함한다: AAV9-hAPOE2, AAV9-hAPOE2-mirAPOE4, AAV9-mCherry-mirAPOE4, AAV9-null, 또는 요법 없음(PBS).

모든 벡터는 IC 경로를 통해 CSF 내에 10¹¹ 게놈 카피(gc) 또는 PBS(10 μ l)로 투여된다. 이 용량을 인간에게 전달하기에 안전한 용량(10¹⁴ gc)으로 확장한다(Sharma & McNeill, 2009).

건강 확인을 처음 2 주 동안 주 당 3 회 수행한 다음, 이후에 모든 생존 마우스에 대해 매주 수행하며, 임의의 비정상적이거나 또는 변경된 행동에 대해 관찰한다. 매주 건강 확인의 일환으로, 마우스의 무게를 재고 처리 코호트에 대해 맹검인 직원이 기록한다.

마우스를 2 가지 시점(생후 3 및 9 개월, 벡터 투여 후 1 및 7 개월)에서 희생시키고, 각 코호트의 절반을 희생시킨다(n=8M/8F). 부검 동안, 마우스 CSF를 먼저 대수조로부터 샘플링한 다음, 마우스를 차가운 PBS로 관류하고 뇌를 수집하고 액체 질소에 급속 동결하고 -80°C에서 저장한다. 뇌의 절반을 벡터 DNA, mRNA, 및 단백질을 검정에 사용한다. 나머지 반구를 고정하고 면역조직화학(IHC), 면역형광(IF), 또는 병리를 위해 50 μ M 슬라이스에서 관상으로 절개한다.

매월 간격으로, 마우스는 행동 및 신경학적 평가를 받는다. 마우스 이동을 모니터링하고 기록하기 위해 적외선 빔 어레이가 장착된 개방 필드 챔버에서 마우스 보행 활동 및 서거나/뛰는 능력을 평가한다⁶⁴. 다음으로, 마우스를 새로운 대상을 도입하고 24 시간 후 신규 대상 인식을 사용하여 인지 능력에 대해 테스트한다. 테스트는 개방 필드 챔버의 내부에서 수행하고 새로운 대

상을 탐색하는 시간을 기록할 것이다(Webster et al., 2013). AD 마우스는 나이가 들수록 이 테스트에서 성능 감소를 보인다. 모든 테스트는 변경된 행동을 검사하기 위해 맹검 상태의 직원에 의해 비디오로 녹화한다.

hAPOE2-HA 및 hAPOE4 단백질은 hAPOE4 및 hAPOE2 HA 태그에 특이적인 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅/ELISA에 의해 여러 영역의 뇌 조직 샘플에서 검출되고; mRNA는 대립유전자 특이적 프로브를 사용한 RTqPCR에 의해 검출된다(Zhong et al., 2016).

해마, 시상, 및 대뇌 피질의 미세절개된 절편을 균질화하고 RIPA(가용성 Aβ) 및 5.5 M 구아니딘 (불용성 Aβ)으로 순차적으로 추출한다. Aβ1-42/1-40 수준을 ELISA에 의해 정량화한다(Zhao et al., 2016).

뇌 용해물을 웨스턴 블롯팅에 의해 총 타우(BT2) 및 인산화-타우(CP13)에 대한 항체로 프로빙한다(Sacramento et al., 2020).

뇌 슬라이스를 IHC/IF에 대한 항-포스포-타우 항체로 염색한다(Shi et al., 2017; Sacramento et al., 2020).

소교세포 활성화를 IHC에 의해 CD68 양성 세포를 염색하여 뇌 절편에서 평가한다(Shi et al., 2017).

300 μM 간격의 여러 뇌 슬라이스를 뇌 부피 분석을 위해 0.1% 수단 블랙으로 염색한다. 해마, 후측뇌실, 및 이상/내후각 피질을 포함한 관심 영역을 이미징 소프트웨어에서 추적 및 측정한다. 해마 영역에서의 관찰 변화를 위해 CA1 추상 세포 층 및 치상회 과립 세포 층의 신경층 두께 측정을 위해 3 개의 절편을 크레일 바이올렛으로 염색한다. 측정은 모든 부위에서 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 기록하고 평균낸다(Shi et al., 2017).

AAV9 벡터 자체의 신경 독성을 3 개 절편 각각에 대해 양성으로 염색된 세포의 백분율을 평가함으로써 크레일 바이올렛 염색된 뇌 절편에서 평가한다.

[0199]

[0200]

통계. 연구는 3 개의 독립적인 실험에 대해 삼중으로 수행하고, 데이터는 달리 언급되지 않는 한 평균 ± 표준 편차(SD)로 제시될 것이다. 그룹 간 차이는 다중 비교를 위해 일원 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 분석한다. 목표 2 연구는 코호트 당 n=8 마리 마우스로 수행될 것이다(8M/8F). 변동 계수가 두 그룹에 대해 35%이면, 그룹 당 n=8을 사용하여 그룹 간 2.8-배 차이를 허용한다(p<0.05, 검정력=0.95). 생화학적 측정을 위한 그룹 간 차이는 다중 비교를 위한 ANOVA로 분석한다. 행동 평가는 다중 비교에 따라 이원 반복 측정 ANOVA로 분석한다.

[0201]

예시적인 변형된 APOE2 서열:

```
ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGG
AGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGCGCAGAGCGGCCA
GCGCTGGGAACCTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGTGCAGACACTGTCTGAGCA
GGTGCAAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCAGGTCACCCAGGAAGTGAAGGCGCTGATGGACGAGACCA
TGAAAGAACTCAAGGCTTATAAGAGCGAGCTGGAGGAACAAGTGAACCCGGTGGCGGAGGAGACG
CGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACG
TGTGCGGCGCCTGTGTGAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGA
GCTGCGGGTGCCTCGCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATG
ACCTGCAGAGTGCCTGCGAGTGTACAGGCGGGGCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCTCAG
CGCCATCCGCGAGCGCTGCGGGCCCTGTGTGAACAGGGCCGCTGCGGGCCGCCACTGTGGGC
TCCCTGGCCGCGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCAGGCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGA
TGGAGGAGATGGGCAGCCGACCCGCGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGT
GCGCGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATACGCTGCAGGCCGAGGCTTCCAGGCCCGC
CTCAAGAGCTGGTTGAGCCCTGGTGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGCTGGTGGAGAA
GGTGCAAGCTGCCGTGGGCGACGCGCCGCTGTGCCAGCGACAATCAC (서열번호:26);
```

```
ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGG
AGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGCGCAGAGCGGCCA
GCGCTGGGAACCTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGTGCAGACACTGTCTGAGCA
GGTGCAAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCAGGTCACCCAGGAAGTGAAGGCGCTGATGGACGAGACCA
TGAAAGAACTTAAAGCATATAAGAGTGAGCTGGAGGAACAAGTGAACCCGGTGGCGGAGGAGACGC
GGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGT
GTGCGGCGCCTGTGTGAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAG
CTGCGGGTGCCTCGCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGA
CCTGCAGAGTGCCTGGCAGTGTACAGGCGGGGCCCGCGAGGGCGCGGAGCGCGGCTCAGC
GCCATCCGCGAGCGCTGGGGCCCTGGTGAACAGGGCCGCTGCGGGCCGCCACTGTGGGCT
CCCTGGCCGCGCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCAGGCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGAT
GGAGGAGATGGGCAGCCGACCCGCGACCGCCTGCAGGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTG
CGCGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATACGCTGCAGGCCGAGGCTTCCAGGCCCGCT
CAAGAGCTGGTTCGAGCCCTGGTGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGCTGGTGGAGAAGG
TGCAGGCTGCCGTGGGCGACGCGCCGCTGTGCCAGCGACAATCAC (서열번호:27);
ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAA
GCGGTGGAGACAGAGCCGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGCGCAGAGCGGCCAGCGCT
```

[0202]

GGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGC
 AGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAA
 GAACTCAAAGCATATAAGAGTGAGCTGGAGGAACAACCTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGC
 ACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGC
 GGCCGCTGGTGCAGTACCGCGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGC
 GGGTGCCTCGCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTG
 CAGAAGTGCTGGCAGTGTACAGGCCGGGGCCCGCAGGGCGCCGAGCGCGGCTCAGCGCCA
 TCCGCGAGCGCCTGGGGCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCCCT
 GGCCGGCCAGCCGTACAGGAGCGGGCCAGGCCCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGA
 GGAGATGGGCGAGCCGACCCGCGACCCGCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGC
 GCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATACGCTGCAGGCCGAGGCCCTCCAGGCCCGCTCAA
 GAGCTGGTTCGAGCCCCCTGGTGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAAGGTGC
 AGGCTGCCGTGGGCACAGCGCGCCCTGTGCCAGCGACAATCAC (서열번호:28);
 ATGAAGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTACATTCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAA
 GCGGTGGAGACAGAGCCGAGCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCGCT
 GGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGC
 AGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAA
 GAACTTAAAGCTTATAAGAGTGAGCTGGAGGAACAACCTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGC
 ACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGC
 GGCCGCTGGTGCAGTACCGCGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGC
 GGGTGCCTCGCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTG
 CAGAAGTGCTGGCAGTGTACAGGCCGGGGCCCGCAGGGCGCCGAGCGCGGCTCAGCGCCA
 TCCGCGAGCGCCTGGGGCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCCCT
 GGCCGGCCAGCCGTACAGGAGCGGGCCAGGCCCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGA
 GGAGATGGGCGAGCCGACCCGCGACCCGCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGC
 GCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATACGCTGCAGGCCGAGGCCCTCCAGGCCCGCTCAA
 GAGCTGGTTCGAGCCCCCTGGTGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAAGGTGC
 AGGCTGCCGTGGGCACAGCGCGCCCTGTGCCAGCGACAATCAC (서열번호:29);

[0203]

ATGAAGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTACATTCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAA
 GCGGTGGAGACAGAGCCGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCGCT
 GGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGC
 AGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAA
 GAACTTAAAGCATATAAGAGCGAGCTGGAGGAACAACCTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGC
 ACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGC
 GGCCGCTGGTGCAGTACCGCGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGC
 GGGTGCCTCGCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTG
 CAGAAGTGCTGGCAGTGTACAGGCCGGGGCCCGCAGGGCGCCGAGCGCGGCTCAGCGCCA
 TCCGCGAGCGCCTGGGGCCCTGGTGGAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCCCT
 GGCCGGCCAGCCGTACAGGAGCGGGCCAGGCCCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGA
 GGAGATGGGCGAGCCGACCCGCGACCCGCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGC
 GCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATACGCTGCAGGCCGAGGCCCTCCAGGCCCGCTCAA
 GAGCTGGTTCGAGCCCCCTGGTGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAAGGTGC

[0204]

AGGCTGCCGTGGGCACACAGCGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCAC (서열번호:30);
 ATGAAGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAA
 GCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCGCT
 GGGAACTGGCACTGGGTGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGC
 AGGAGGAGCTGCTCAGCTCCAGGTACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAA
 GAACTCAAAGCTTATAAGAGTGAAGCTGGAGGAACAACCTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGC
 ACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGC
 GGCCGCTTGGTGCAGTACCGCGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGC
 GGGTGCCTCGCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTG
 CAGAAGTGCTGGCAGTGTACAGGCCGGGGCCCGCAGGGCGCCGAGCGCGGCTCAGCGCCA
 TCCGCGAGCGCTGGGGCCCTTGGTGAACAGGGCCGCGTGCAGGCCCGCACTGTGGGCTCCCT
 GGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCAGGCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGA
 GGAGATGGGCAGCGGACCCGCGACCGCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGC
 GCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATACGCTGCGAGGCCGAGGCCCTTCCAGGCCCGCTCAA
 GAGCTGGTTGAGCCCCCTGGTGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCGGGCTGGTGGAGAAGGTGC
 AGGCTGCCGTGGGCACACAGCGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCAC (서열번호:31);
 ATGAAGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAA
 GCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCGCT
 GGGAACTGGCACTGGGTGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGC
 AGGAGGAGCTGCTCAGCTCCAGGTACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAA
 GAACTCAAAGCATATAAGAGCGAGCTGGAGGAACAACCTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGC
 ACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGC
 GGCCGCTTGGTGCAGTACCGCGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGC
 GGGTGCCTCGCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTG
 CAGAAGTGCTGGCAGTGTACAGGCCGGGGCCCGCAGGGCGCCGAGCGCGGCTCAGCGCCA
 TCCGCGAGCGCTGGGGCCCTTGGTGAACAGGGCCGCGTGCAGGCCCGCACTGTGGGCTCCCT
 GGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCAGGCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGA
 GGAGATGGGCAGCGGACCCGCGACCGCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGC
 GCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATACGCTGCGAGGCCGAGGCCCTTCCAGGCCCGCTCAA
 GAGCTGGTTGAGCCCCCTGGTGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCGGGCTGGTGGAGAAGGTGC
 AGGCTGCCGTGGGCACACAGCGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCAC (서열번호:32); 또는

ATGAAGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAA
 GCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCGCT
 GGGAACTGGCACTGGGTGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGC
 AGGAGGAGCTGCTCAGCTCCAGGTACCCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAA
 GAACTTAAAGCTTATAAGAGCGAGCTGGAGGAACAACCTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGC
 ACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGC
 GGCCGCTTGGTGCAGTACCGCGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGC
 GGGTGCCTCGCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTG
 CAGAAGTGCTGGCAGTGTACAGGCCGGGGCCCGCAGGGCGCCGAGCGCGGCTCAGCGCCA
 TCCGCGAGCGCTGGGGCCCTGGTGAACAGGGCCGCGTGCAGGCCCGCACTGTGGGCTCCCT
 GGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCAGGCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGA

GGAGATGGGCAGCGGACCCGCGACCGCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGC
 GCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATACGCTGCGAGCCGAGGCCCTTCCAGGCCCGCTCAA
 GAGCTGGTTGAGCCCCCTGGTGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCGGGCTGGTGGAGAAGGTGC
 AGGCTGCCGTGGGCACACAGCGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCAC (서열번호:33).

[0208] 참고문헌

2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2020.

Abner et al., *J. Alzheimers Dis.*, **64**:1307 (2018).

Acosta-Baena et al., *Lancet. Neural.*, **10**:213 (2011).

Allen et al., *J. Neurosci.*, **22**:9340 (2002).

Arboleda-Velasquez et al., *Nat. Med.*, **25**:1680 (2019).

Association As. 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia.* 2019; 15:321-387.

Atagi et al., *J. Biol. Chem.*, **290**:26043 (2015).

Bailey et al., *J. Biol. Chem.*, **290**:26033 (2015).

Bales et al., *J. Neurosci.*, **29**:6771 (2009).

Bales et al., *Nat. Genet.*, **17**:263 (1997).

Benjamin et al., *Psychol. Aging*, **19**:592 (2004).

Brecht et al., *J. Neurosci.*, **24**:2527 (2004).

Bu, *Nat. Rev. Neurosci.*, **10**:333 (2009).

Campion et al., *Am. J. Hum. Genet.*, **65**:664 (1999).

Carmona et al., *Handb. Clin. Neural.*, **148**:395 (2018).

Castellano et al., *Sci. Transl. Med.*, **3**:89ra57 (2011).

Chai et al., *J. Biol. Chem.*, **286**:34457 (2011).

Chiang et al., *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, **33**:1392 (2012).

Chiang et al., *Neurology*, **75**:1976 (2010).

Collaborators GBDD, *Lancet Neural.*, **18**:88 (2019).

Conejero-Goldberg et al., *Mol. Psychiatry*, **19**:1243 (2014).

Conrado et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **107**:796 (2020).

Coon et al., *J. Clin. Psychiatry*, **68**:613 (2007).

Corder et al., *Nat. Genet.*, **7**:180 (1994).

Corder et al., *Science*, **261**:921 (1993).

Dai et al., *Oncotarget*, **9**:15132 (2018).

Deane et al., *J. Clin. Invest.*, **118**:4002 (2008).

DeTure & Dickson, *Mol. Neurodegener.*, **14**:32 (2019).

Dodart et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**:1211 (2005).

Dong et al., *J. Biol. Chem.*, **269**:22358 (1994).

Dorey et al., *Neurosci. Bull.*, **30**:317 (2014).

Du et al., *Neurosci. Lett.*, **464**:140 (2009).

Exceptionally low likelihood of alzheimer's dementia in APOE2 homozygotes [Internet]. 2019.

Fagan et al., *Neurobiol. Dis.*, **9**:305 (2002).

Fang and Bartel, *Mol. Cell.*, **60**:131 (2015).

[0209]

- Fann et al., Lancet. Psychiatry, 5:424 (2018).
- Farrer et al., JAMA, 278:1349 (1997).
- Fernandez et al., Front Aging Neurosci, 11:14 (2019).
- Fernandez et al., Neurosci, 11:14 (2019).
- Fleming et al., Exp. Neurol, 138:252 (1996).
- Flowers & Rebeck, Neurobiol. Dis., 136:104724 (2020).
- Foust et al., Nat. Biotechnol., 27:59 (2009).
- Fowler et al., Nucleic Acids Res., 44:e48 (2016).
- Franklin K, Paxinos G. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates; Compact Academic Press; 2019.
- Gale et al., J. Allergy Clin. Immunol, 134:127 (2014).
- Games et al., Nature, 373:523 (1995).
- Gatz et al., Nat. Rev. Neurosci, 19:583 (2018).
- Genin et al., Mol. Psychiatry, 16:903 (2011).
- Gong et al., Mol. Ther., 23:824 (2015).
- Gray et al., Mol. Ther., 19:1058 (2011).
- Hampel et al., Exp. Gerontol., 45:30 (2010).
- Harris et al., J. Biol. Chem, 279:44795 (2004).
- Hashimoto et al., J. Neurosci, 32:15181 (2012).
- Hatters et al., J. Mol. Biol., 361:932 (2006b).
- Hatters et al., Trends Biochem. Sci., 31:445 (2006a).
- Haugot et al., J. Clin. Invest., 123:3254 (2013).
- Hebert et al., Neurology, 80:1778 (2013).
- Heffernan et al., J. Mol. Neurosci, 60:315 (2016).
- Helkala et al., Neurosci. Lett., 204:177 (1996).
- Hinderer et al., Hum. Gene. Ther., 29:15 (2018).
- Holtzman et al., Cold Spring Harb. Perspect Med., 2:a006312 (2012).
- Holtzman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97:2892 (2000).
- Hu et al., Mol. Neurodegener., 10:6 (2015).
- Huang et al., Cell, 168:427 (2017).
- Huang et al., J. Neurosci, 39:7408 (2019).
- Hudry et al., Sci. Transl. Med., 5:212ra161 (2013).
- Jankowsky et al., Biomol. Eng., 17:157 (2001).
- Jendresen et al., J. Neuroinflammation, 14:59 (2017).
- Jiang et al., Neuron, 58:681 (2008).
- Josephs et al., Ann. Neurol, 63:204 (2008).
- Kim et al., J. Neurosci, 31:18007 (2011).
- Li et al., J. Biol. Chem, 287:44593 (2012).
- Liao et al., Curr. Opin. Lipidol., 28:60 (2017).
- Lin et al., Neuron, 98:1141 (2018).
- Liu et al., J. Neurosci, 36:12425 (2016).
- Liu et al., Nat. Rev. Neural, 9:106 (2013).

[0210]

- Liu et al., *Sci. Transl. Med.*, **8**:332ra344 (2016).
- Lopera et al., *JAMA*, **277**:793 (1997).
- Mahley et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, **777**:139 (1996).
- Mahley et al., *J. Lipid. Res.*, **40**:1933 (1999).
- Mahley, *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.*, **36**:1305 (2016).
- Manelli et al., *J. Mol. Neurosci.*, **23**:235 (2004).
- Markmann et al., *Exp. Neurol.*, **306**:22 (2018).
- Mattsson et al., *Alzheimers Res. Ther.*, **10**:77 (2018).
- Mondadori et al., *Cereb. Cortex*, **17**:1934 (2007).
- Mueller et al., *Mol. Ther.*, **20**:590 (2012).
- Nagy et al., *Neuroscience*, **69**:757 (1995).
- Naj et al., *Nat. Genet.*, **43**:436 (2011).
- Nielsen et al., *Glia*, **58**:1235 (2010).
- O'Callaghan et al., *J. Histochem. Cytochem.*, **66**:305 (2018).
- Ohkubo et al., *J. Biol. Chem.*, **276**:3046 (2001).
- Phillips, *IUBMB Life*, **66**:616 (2014).
- Pitas et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **917**:148 (1987).
- Prince et al., *Alzheimers Dement.*, **9**:63 (2013).
- Pugliese et al., *Nat. Neurosci.*, **6**:345 (2003).
- Raber et al., *Neurobiol. Aging*, **25**:641 (2004).
- Raman et al., *BMC Genomics*, **10**:493 (2009).
- Rauch et al., *Sci. Rep.*, **8**:6382 (2018).
- Rebeck et al., *J. Alzheimers Dis.*, **4**:145 (2002).
- Reiman et al., *Nat. Commun.*, **11**:667 (2020).
- Reiman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**:6820 (2009).
- Rodriguez et al., *J. Neuroinflammation*, **11**:111 (2014).
- Rosenberg et al., *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*, **25**:164 (2014).
- Rosenberg et al., *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*, **29**:24 (2018).
- Ryan et al., *PLoS One*, **9**:e88051 (2014).
- Sacramento et al., *Hum. Gene Ther.*, **31**:57 (2020).
- Safieh et al., *BMC Med.*, **17**:64 (2019).
- Sando et al., *BMC Neurol.*, **8**:9 (2008).
- Schenk et al., *Nature*, **400**:173 (1999).
- Schmechel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**:9649 (1993).
- Sharma & McNeill, *Br. J. Pharmacol.*, **157**:907 (2009).
- Shi & Holtzman, *Nat. Rev. Immunol.*, **18**:759 (2018).
- Shi et al., *J. Exp. Med.*, **216**:2546 (2019).
- Shi et al., *Nature*, **549**:523 (2017).
- Shinohara et al., *Ann. Neurol.*, **79**:758 (2016).
- Snow et al., *Am. J. Pathol.*, **133**:456 (1988).
- Sondhi et al., *Hum. Gene Ther. Methods*, **23**:324 (2012).
- Sondhi et al., *Mol. Ther.*, **15**:481 (2007).

[0211]

- Staehelein et al., *Acta Neurol. Scand.*, **100**:53 (1999).
- Strittmatter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**:11183 (1994).
- Sullivan et al., *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, **17**:303 (2008).
- Tardieu et al., *Hum. Gene Ther.*, **25**:506 (2014).
- Tatern et al., *J. Visualized Exp., JoVE*, **51**:51785 (2014).
- Tumor Analysis Best Practices Working G. Expression profiling--best practices for data generation and interpretation in clinical trials, *Nat. Rev. Genet.*, **5**:229 (2004).
- Tziouras et al., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **45**:327 (2019).
- Vagner et al., *Mol. Cell. Neurosci.*, **77**:76 (2016).
- Vitek et al., *Neurobiol. Aging*, **30**:1350 (2009).
- Walker et al., *Acta Neuropathol.*, **100**:36 (2000).
- Wang et al., *Nat. Med.*, **24**:647 (2018).
- Ward et al., *Neuroepidemiology*, **38**:1 (2012).
- Webster et al., *Alzheimer's research & therapy*, **5**:28 (2013).
- Wildsmith et al., *Anal. Biochem.*, **395**:116 (2009).
- Williams et al., *Mol. Neurodegener.*, **15**:8 (2020).
- Wilson et al., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **73**:672 (2002).
- Wolters et al., *PLoS One*, **14**:e0219668 (2019).
- World Health Organization. The Epidemiology and impact of dementia current state and future trends. 2015 https://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/dementia_thematicbrief_epidemiology.pdf [last accessed 6/3/20]
- Xu et al., *J. Neurosci.*, **26**:4985 (2006).
- Yeh et al., *Neuron*, **91**:328 (2016).
- Yoshiyama et al., *Neuron*, **53**:337 (2007).
- Yu et al., *Annu. Rev. Neurosci.*, **37**:79 (2014).
- Zannis & Breslow, *Biochemistry*, **20**:1033 (1981).
- Zekonyte et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**:1047 (2016).
- Zerah et al., *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.*, **26**:113 (2015).
- Zhang et al., *Genet. Test Mol. Biomarkers.*, **17**:47 (2013).
- Zhang et al., *J. Neurosci.*, **34**:11929 (2014).
- Zhang et al., *Neuron*, **89**:37 (2016).
- Zhao et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, (2019).
- Zhao et al., *J. Neurosci.*, **29**:3603 (2009).
- Zhao et al., *Neurobiol. Aging*, **44**:159 (2016).
- Zhong et al., *Mol. Neurodegener.*, **11**:2 (2016).

[0212]

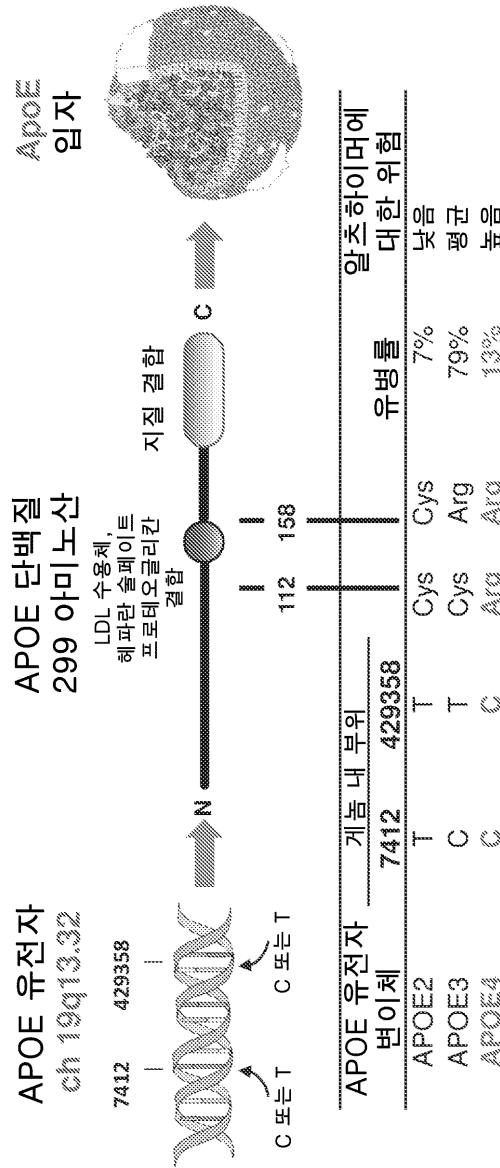
[0213]

모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 본원에 참조로 포함된다. 전술한 명세서에서 본 발명은 이의 특정 바람직한 구현예와 관련하여 기재되었고, 많은 세부사항이 예시 목적으로 제시되었지만, 본 발명이 추가의 구현예에 영향을 받기 쉽고 본원에 기재된 특정 세부사항이 본 발명의 기본 원리를 벗어나지 않고 상당히 변경될 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다.

도면

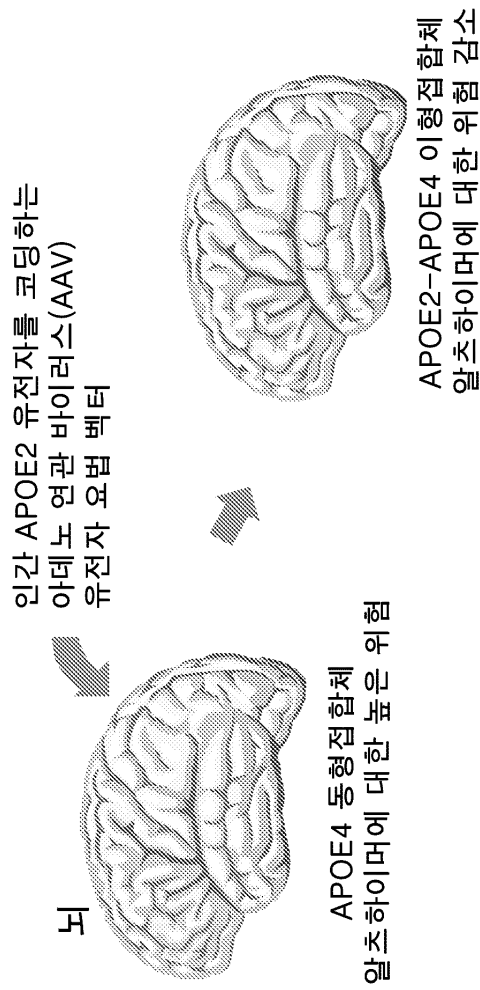
도면1

APOE4 유전자, 단백질 및 알츠하이머병에 대한 위험



도면2

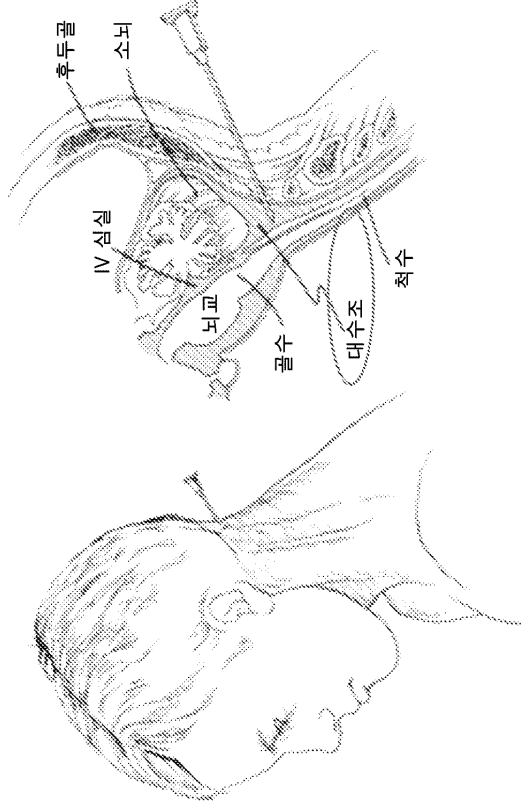
APOE4 뇌를 APOE2E4로 전환하는 APOE2 유전자 요법



- APOE2 유전자의 CNS로의 아데노 연관 바이러스 전달은 E4 뇌를 E2/E4 뇌로 유전적으로 전환시켜, APOE4 동형접합체에서 알프하이머병의 병리를 줄이거나 또는 예방할 것이다.

도면3

AAVrh.10APOE2는 수조내 경로에 의해 뇌 척수액에 직접 투여된다



● 대수조에 투여는 외래 환자 절차이다

도면4

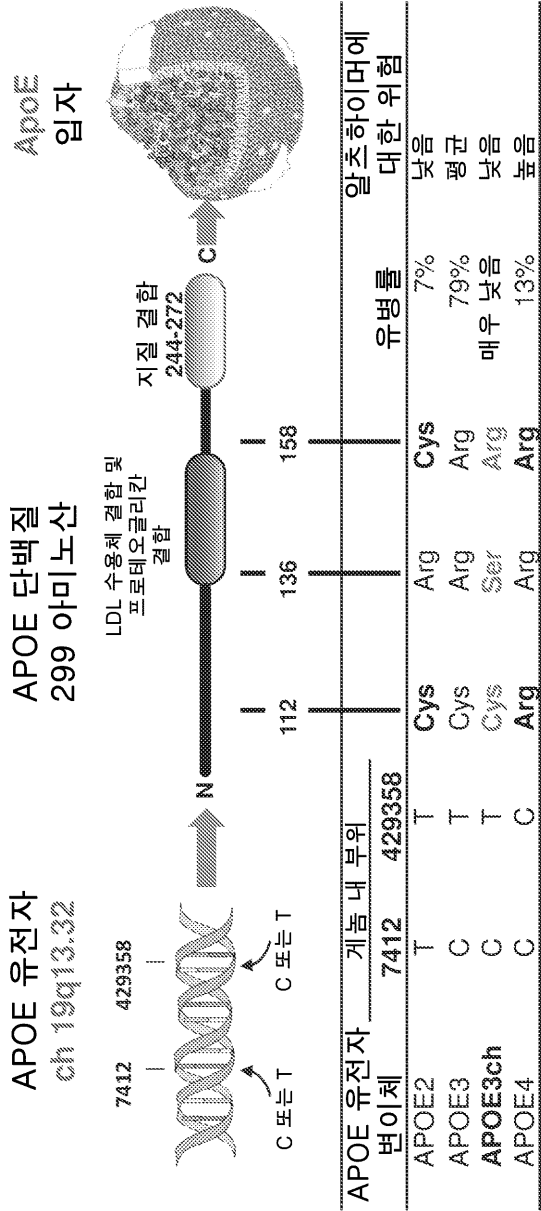
APOE3 크라이스트처치 알츠하이머병-보호적 APOE 돌연변이

APOE 유전자 변이체	아미노산			유병률	알츠하이머에 대한 위험
	112	136	158		
APOE2	Cys	Arg	Cys	7%	낮음
APOE3	Cys	Arg	Arg	79%	평균
APOE3Chc	Cys	Ser	Arg	매우 낮음	낮음
APOE4	Arg	Arg	Arg	13%	높음

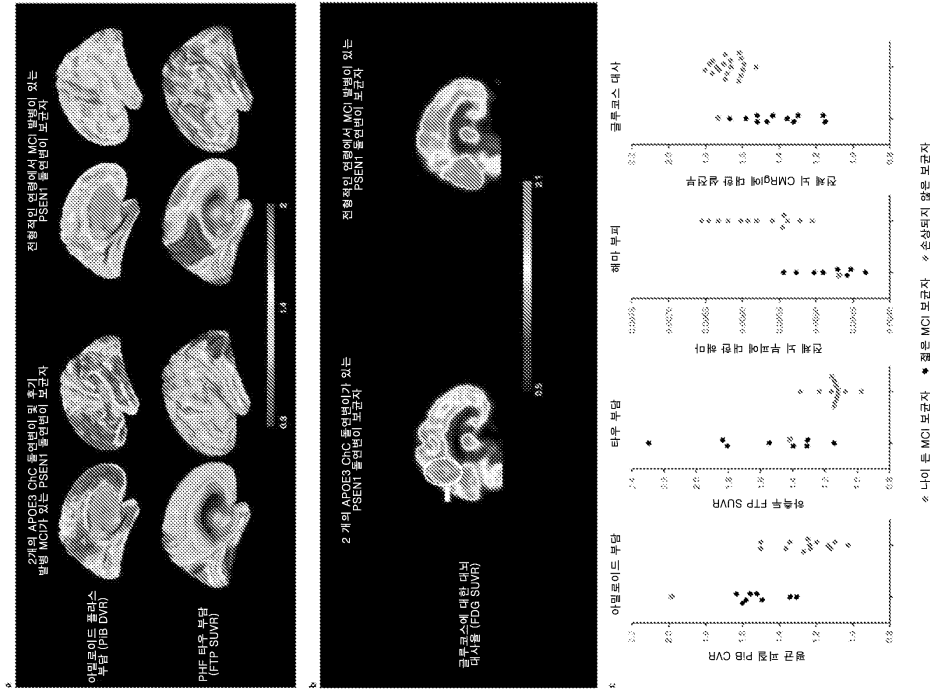
Arboleda-Velasquez et al 2019 Resistance to autosomal dominant Alzheimer's disease in an APOE3 Christchurch homozygote: a case report. Nature Medicine
 Zafocusky et al 2019 An Alzheimer's-disease-protective APOE mutation, Nature Medicine
 Reiman et al 2019 Exceptionally low likelihood of Alzheimer's dementia in APOE2 homozygotes. medRxiv

도면5

APOE3크라이스트처치 유전자 및 단백질



도면6



APOE3ch 돌연변이

- ※ 프레세닐린 1의 상염색체 우성 E280A 돌연변이(파이사 돌연변이)를 가진 콜롬비아 여성의 사례
- ※ 이 돌연변이의 전형적인 질환 발병 연령(40 세)을 지나 수십 년 동안(70 세) 인지적으로 좋음
- ※ 이 돌연변이는 신경변성 및 인지 저하와 연관된 Aβ 과잉 생산을 유발한다
- ※ 70 세에 그녀는 단기 기억이 있지만 독립한 채로 있다.
- ※ 아밀로이드 PET 스캐닝은 그녀의 뇌에서 인지적으로 손상된 젊은 돌연변이 보균자에서 볼 수 있는 것들보다 훨씬 더 높은 아밀로이드 플라크의 엄청난 증가를 입증하였다
- ※ 대부분 내측 측두엽에 국한된 매우 적은 타우 병리인 뇌 글루코스 대사는 거의 정상이다
- ※ 아밀로이드 형성 후 병원성 사건의 쇠가 끊어진 것과 같다
- ※ 메커니즘과 무관하게, 이 돌연변이를 APOE4 동형접합체를 치료하는 데 사용할 수 있을까?

도면7

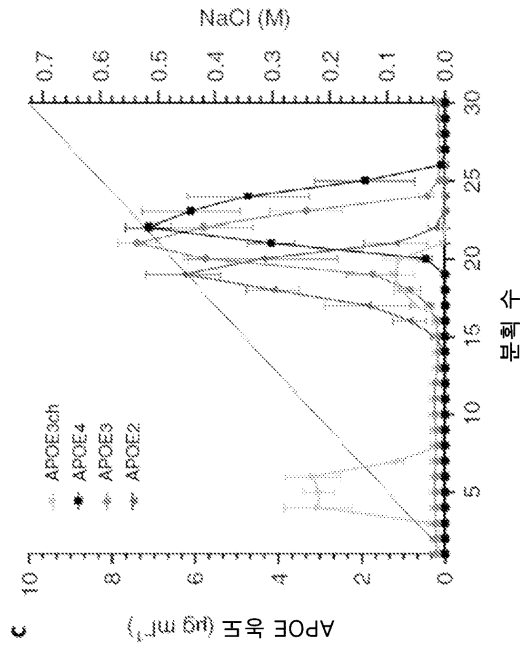
APOE3ch 돌연변이의 영향

- ※ 콜롬비아 여성은 크라이스트처치 돌연변이로 알려진 이 ApoE3 변이체의 2개 카피가 유전되었다
- ※ 크라이스트처치 돌연변이는 열성으로 보인다. 콜롬비아 혈통의 다른 4 명의 파시아 돌연변이 보균자는 단일 카피가 유전되었고, 모두 예상 연령에 인지 손상이 발생하였다
- ※ ApoEch 돌연변이는 2차 타우 병리를 차단하는 것으로 보인다 (최신 Reiman 연구는 24 개의 ApoE2 동형접합체의 부검 샘플에서 볼 수 있듯이 이것이 또한 ApoE2 동형접합체에 대한 사례임을 나타낸다)
- ※ 이 보호 효과는 ApoE2와 유사하지만 더 크다
- ※ 시험관내 실험은 ApoE3ch가 ApoE2 대립유전자처럼 행동하며; 두 동형이 모두 독성 형태 타우의 전파 및 흡수에 연루된 세포외 기질 분자에 상응하는 헤파린에 좋지 않게 결합함을 나타내었다
- ※ 헤파린에 결합: E4>E3.E2>>E3ch
- ※ 따라서 보호는 엉킴을 전파하는 것으로 여겨지는 HSPG에 대한 결합 손실과 상관될 수 있다.

도면8

헤파린에 대한 APOE3ch 결합의 낮은 친화도

- HSPG는 아밀로이드 플라크의 증가, 뿐만 아니라 아밀로이드에 대한 소교세포 반응을 촉진하는 데 연루되었다
- HSPG는 또한 타우 병리와 연관되었으며 이러한 끈적한 수용체는 타우 섬유가 뉴런에 부착되게 하여, 흡수 및 전파를 용이하게 하는 것으로 제안되었다
- aa 130-143(크라이스트처치 돌연변이 영역 포함)에 Ab와 결합된 ApoE3은 헤파린 결합에 의해 측정된 바와 같이 ApoE3를 ApoEch로 전환한다



ApoE3ch는 NaCl 농도가 가장 낮은 헤파린 칼럼으로부터 용출되었으며, 이는 다른 ApoE 동형과 비교하여 손상된 헤파린 결합을 나타낸다.

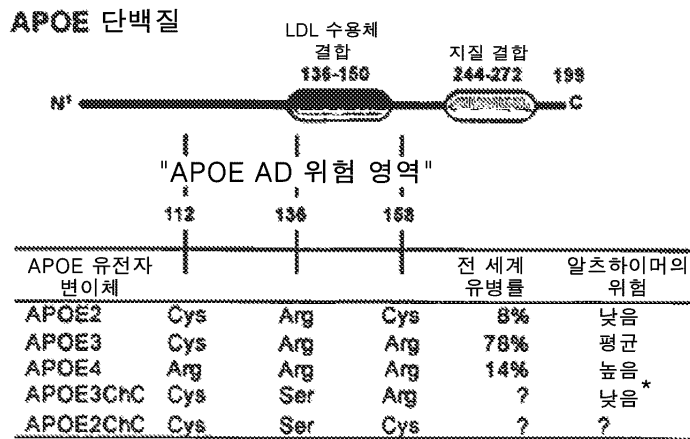
도면9

- ApoE는 HSPG에 대한 타우 결합을 용이하게 할 수 있으며, 이는 차례로 타우 병리에서 역할을 할 수 있다
- 크리스트처치 변이체의 HSPG 결합에 대한 더 약한 친화도는 타우 병리의 용이함을 방해하므로 오법에 대한 설계를 나타낼 수 있다
- 대안적으로, ApoE-HSPG 결합을 약화시키는 임의의 개입은 치료 잠재력을 가질 수 있다

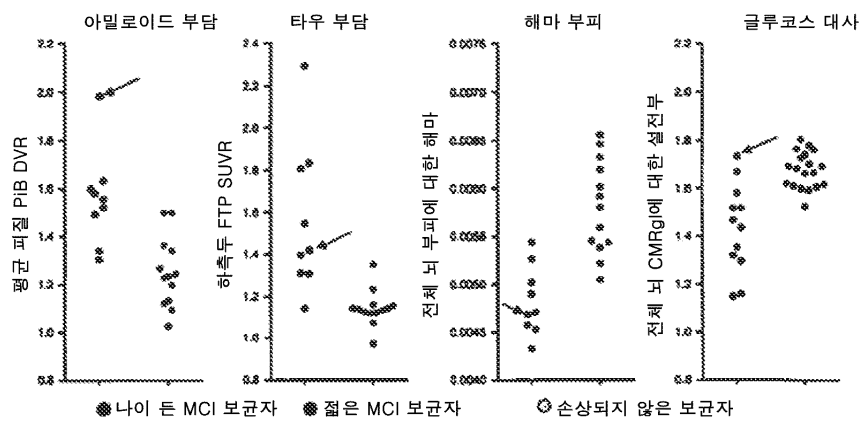
도면10

- AAV-APOE3ch를 사용한 유전자 요법
- AAV-APOE2ch를 사용한 유전자 요법
- AAV에 의해 전달된 항체와 표적 ApoE-HSPG 결합
- SiRNA를 사용하여 동일한 작제물에서 AAV-APOE3ch 전달과 함께 ApoE4를 침묵시킨다
- 유전자 요법은 주로 CNS에 국한되기 때문에 이상지질혈증은 개연성이 낮으며; 임의의 이상지질혈증은 현재 지질 요법으로 치료될 수 있다

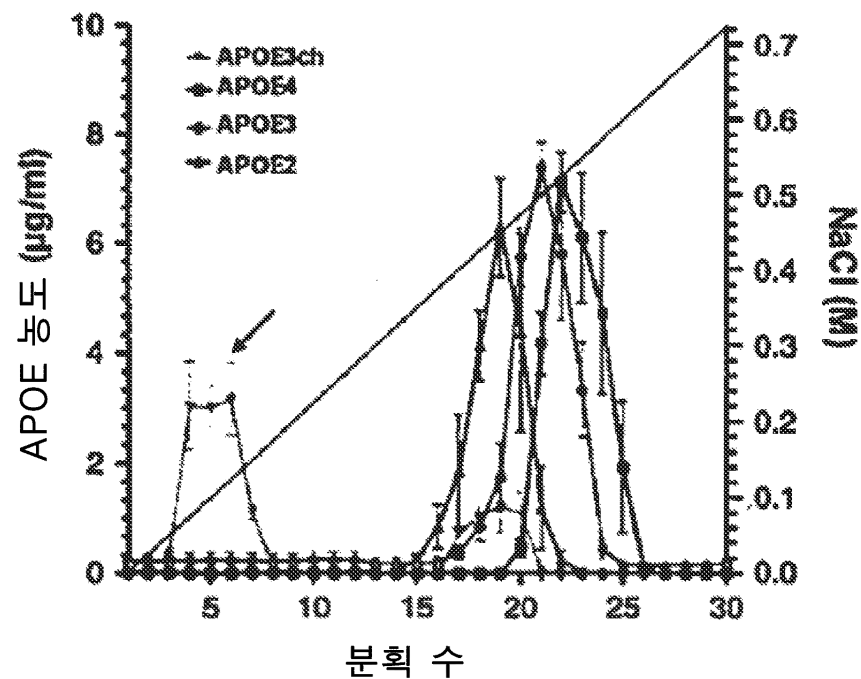
도면13



도면14

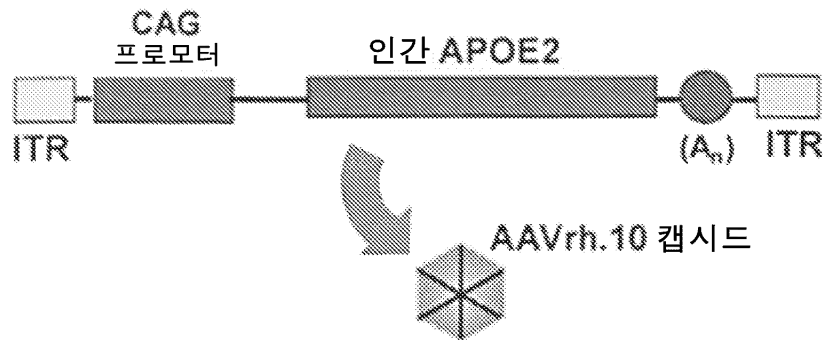


도면15

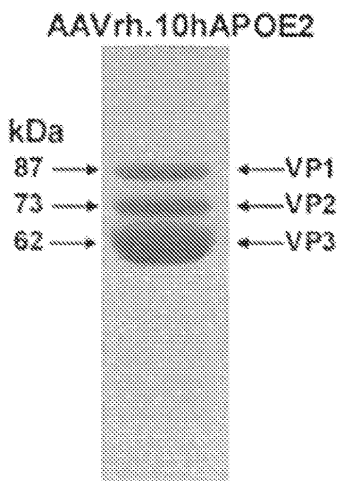


도면16

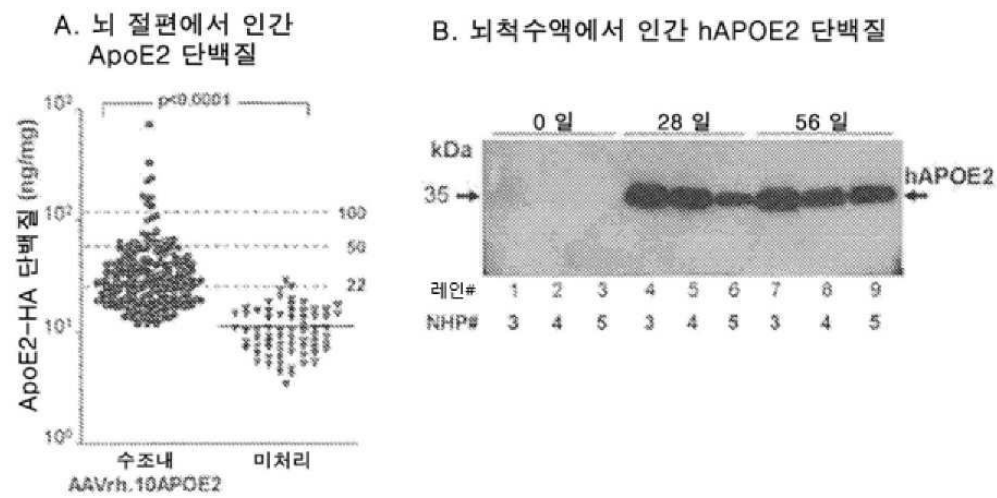
AAVrh.10hAPOE2 벡터



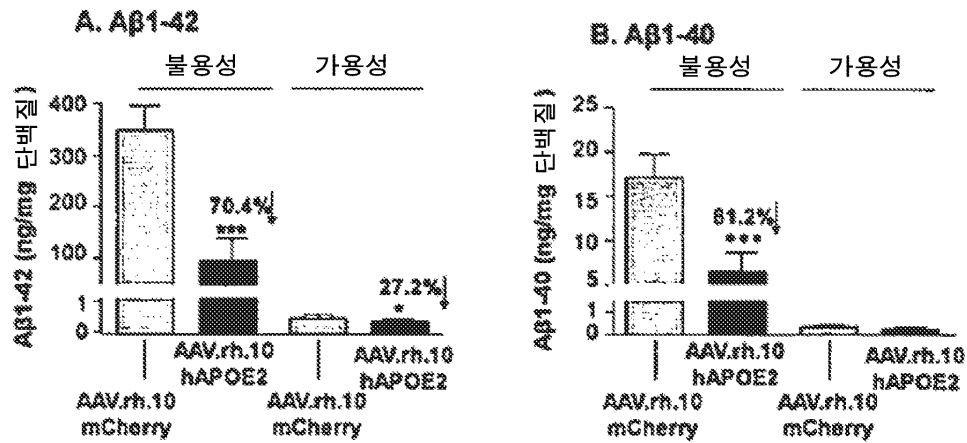
도면17



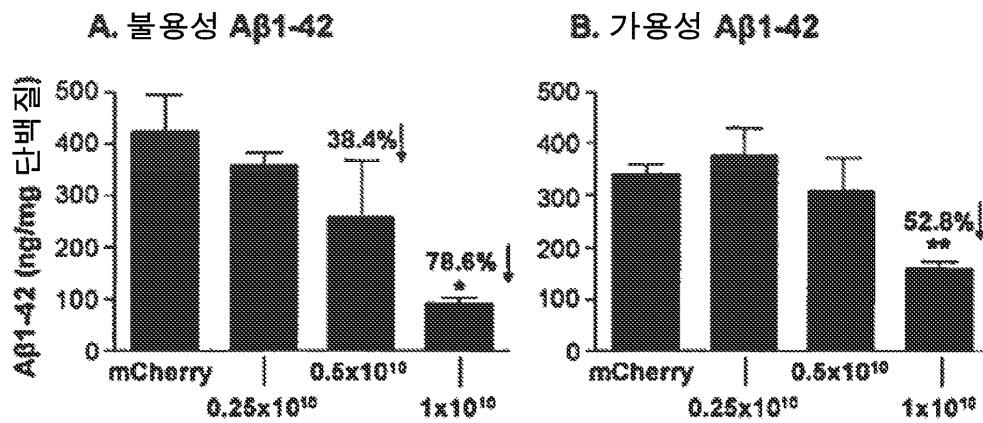
도면18



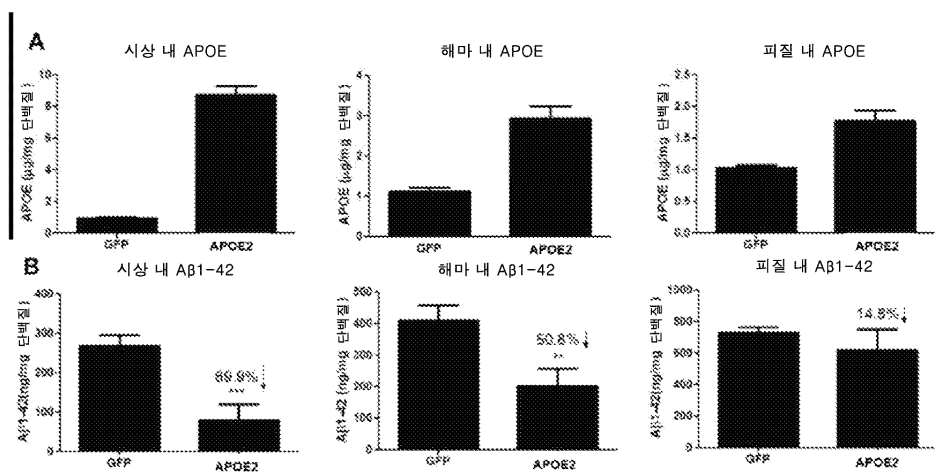
도면19



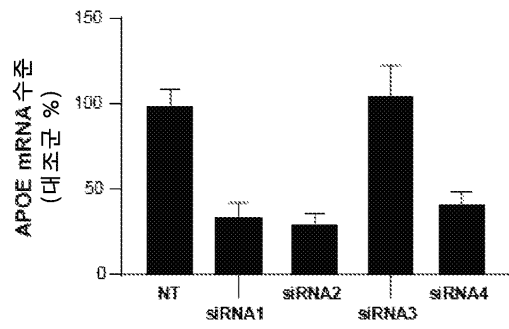
도면20



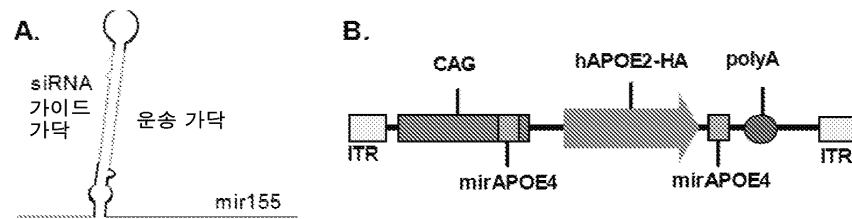
도면21



도면22



도면23

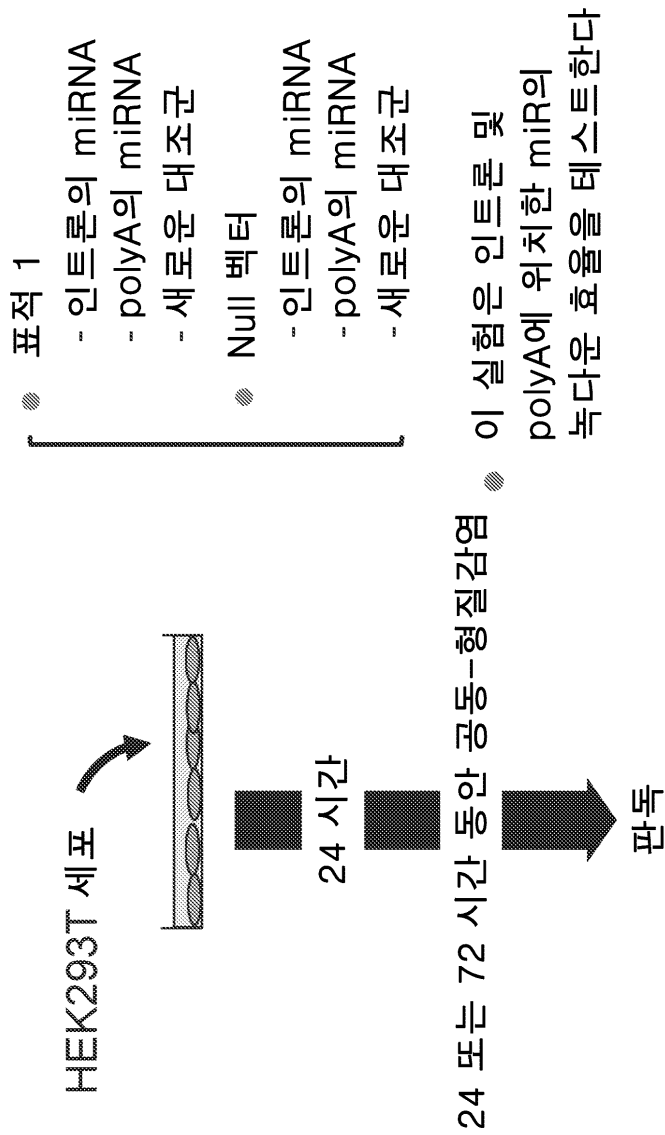


도면24

293T 형질감염

형질감염 계획

- pAAVcag-miRAPOE4를 표적 부위를 함유하는 pmirGLO 또는 벡터 단독과 공동-형질감염



도면25

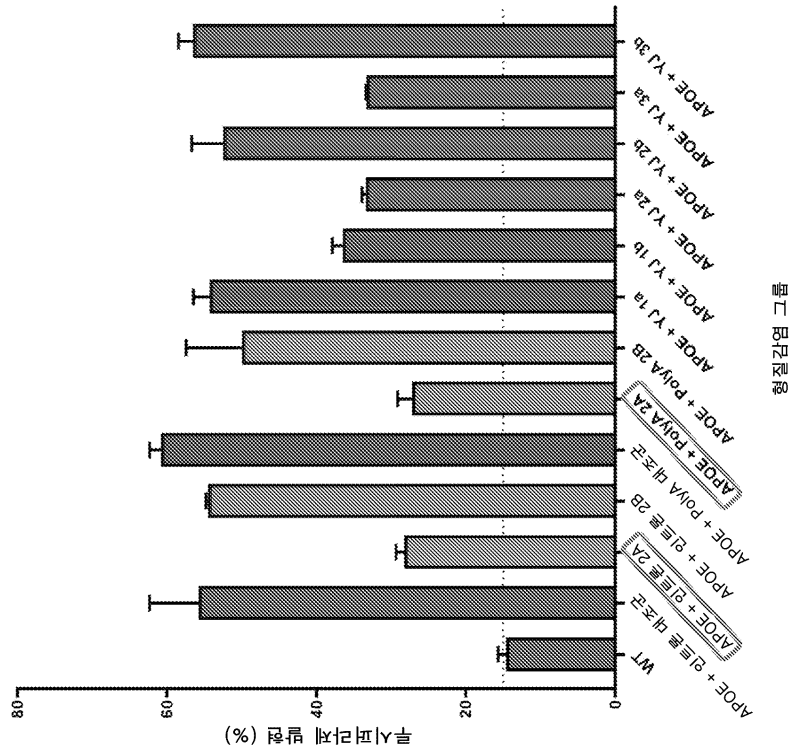
루시페라제 결과

결론

- 인트론 또는 polyA의 miR2A는 miR2B와 비교하여 더 큰 녹다움을 나타내는 것으로 보인다

대조군에 대한 설명

- 표적 부위가 루시페라제 발현을 감소시킬 수 있으므로 빈 벡터 대조군이 제거되었다
- pmirGLO 함유 표적 부위 단독으로 루시페라제 발현을 테스트하기 위해 또 다른 검정이 설정되었다.



도면26

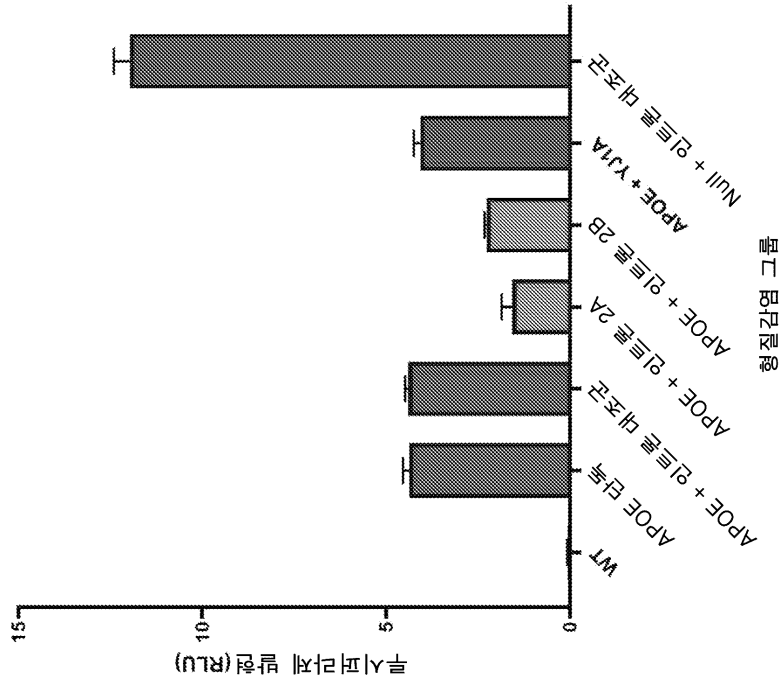
APOE 표적 부위 단독 대조군 테스트

이론적 근거

- 표적 부위만 함유하는 대조군 pmirGLO가 루시페라제 발현을 감소시키면, pmirGLOluc(null) 벡터는 음성 대조군으로 사용할 수 없다.
- 표적 부위는 mRNA의 안정성에 영향을 미칠 수 있거나, 수수께끼 결합 부위를 함유할 수 있거나 또는 번역 기계와 상호작용할 수 있다.

결론

- 인트론 또는 polyA의 miR2A는 miR2B와 비교하여 더 큰 녹다운을 나타내는 것으로 보인다



도면27

Bsal - BmgBI

이론적 근거

- miRNA 부위와 중첩하는 APOE2의 대략 200bp 조각

- 벡터-유래 APOE2의 miRNA 표적 부위를 칩목 뉴클레오티드 변경으로 대체

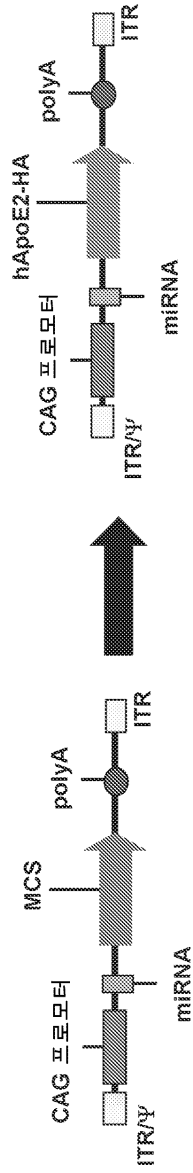
- 전달 중인 치료 APOE2가 또한 칩목되지 않을 것이다

M	K	V	L	W	A	A	L	L	V	F	L	A	G	C	O	A	W	V
Q	A	V	I	E	F	E	F	L	R	Q	I	E	R	Q	S			
G	C	R	W	E	L	A	L	G	R	F	W	D	V	L	R	N	V	I
L	S	E	Q	V	Q	E	K	L	L	S	Q	V	I	Q	E	L	R	A
L	M	D	E	T	M	K	E	L	R	A	Y	K	S	L	E	E	Q	L
I	F	V	A	E	T	R	A	R	L	S	K	E	L	Q	A	A	Q	A
R	L	G	A	D	M	E	D	V	R	G	L	V	Q	T	R	G	E	V
Q	A	M	L	G	S	I	E	L	R	V	R	L	A	S	H	L	R	
R	L	R	K	R	L	L	R	D	A	D	L	Q	R	L	A	V	X	
Q	A	G	A	R	E	R	A	E	R	G	L	S	A	I	R	E	R	L
F	L	V	E	Q	G	R	V	R	A	A	T	V	G	S	L	A	G	P
L	Q	E	R	A	Q	A	M	S	E	R	L	R	A	R	M	E	M	G
E	R	I	R	D	R	L	D	E	V	K	E	Q	V	A	E	V	R	A
L	E	E	Q	A	Q	I	R	L	Q	A	E	A	F	Q	A	R	L	K
S	W	F	E	F	L	V	E	D	M	Q	R	Q	W	A	G	L	V	R
V	Q	A	A	V	G	I	S	A	A	P	V	F	S	D	M	R		

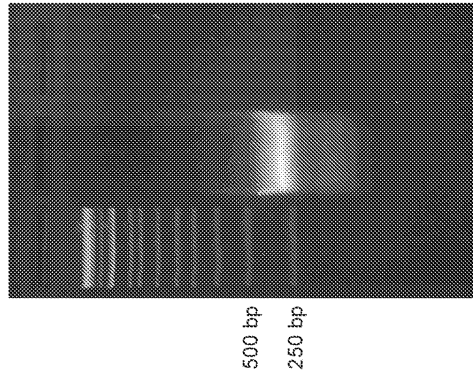
도면28

hApoE2-HA의 삽입

- pAAV-miRNA-APOE-HA를 생성하기 위한 전략
- APOE2를 miRAPOE4를 사용하여 pAAV 내로 클로닝



- BsaI-BmgBI 단편은 성공적으로 PCR 증폭됨 (~250 bp)
- BsaI-BmgBI는 가장 강력한 녹다운으로 pAAV-miRNA 내로 클로닝된다



도면29

생체내 연구

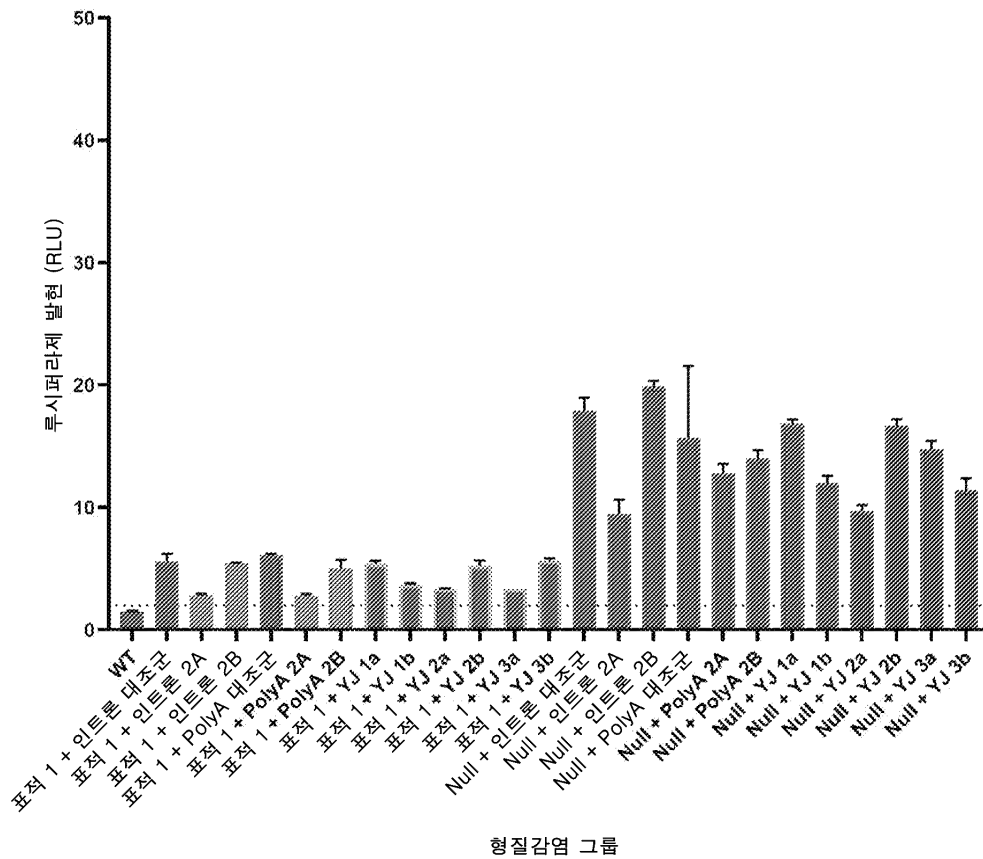
- P301S(Jax) 마우스를 TRE4 마우스와 번식
- 확인된 miR을 사용하여 AAV9 제조

표 1. 마우스 원리 증명 연구

마우스 모델 (유전자형) ²	벡터	투여 용량 및 경로	평가될 매개변수
P301S/E4	AAV9-hAPOE2	10 ¹¹ gc, 수조내(IC) 경로를 통해	● 행동 및 신경학적 평가 (매월) ● hAPOE4 및 hAPOE2의 뇌 발현 ● 가용성 및 불용성 Aβ 수준 ● 뇌 균질물에서 인산화된 타우 및 총 타우 수준의 평가 ● 신경섬유성 엉킴의 CNS 평가
	AAV9-hAPOE2-mirAPOE4		
	AAV9-mCherry-mirAPOE4		
	AAV9-null		
C57Bl/6 (대조군)	오범 없음 (PBS)	없음 (PBS, IC)	● 소교세포 활성화 ● 해마 및 피질의 병리
	오범 없음 (PBS)	없음 (PBS, IC)	
2 개 군주	5 개 벡터	1 개 경로	생후 3 및 9 개월에 부검

도면30

모든 대조군



형질감염 그룹

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Crystal, Ronald G.

Kaminsky, Stephen M.

Stiles, Katie M

Sondhi, Dolan

Cornell University

<120> APOE GENE THERAPY

<130> 1676.155W01

<140> PCT/US2020/070822

<141> 2020-11-25

<150> US 62/939,999

<151> 2019-11-25

<160> 34

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 317

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Val Leu Trp Ala Ala Leu Leu Val Thr Phe Leu Ala Gly Cys

1 5 10 15

Gln Ala Lys Val Glu Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu

20 25 30

Arg Gln Gln Thr Glu Trp Gln Ser Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu

35 40 45

Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln

50 55 60

Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala

65 70 75 80

Leu Met Asp Glu Thr Met Lys Glu Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu

85 90 95

Glu Glu Gln Leu Thr Pro Val Ala Glu Glu Thr Arg Ala Arg Leu Ser

100 105 110

Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp

115 120 125

Val Cys Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln Ala Met Leu

130 135 140

Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg

145 150 155 160

Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg

165 170 175

Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly Ala Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly Leu

180 185 190

Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val
195 200 205

Arg Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg
210 215 220

Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly

225 230 235 240
Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu
245 250 255

Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala
260 265 270

Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu
275 280 285

Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala
290 295 300

Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Asp Asn His
305 310 315

<210> 2

<211> 1098

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggaacttgat gctcagagag gacaagtcac ttgcccaagg tcacacagct ggcaactggc 60
agagccagga ttacgcacct ggcaatttga ctccagaatc ctaaccttaa ccagaagca 120
cggttcaag cccctggaaa ccacaatacc tgtggcagcc agggggaggt gctggaatct 180
catttcacat gtggggaggg ggctccctg tgcacaaggt cacaacaaa gaggaagctg 240
tgattaaaac ccaggtccca ttgcaaagc ctgcactttt agcaggtgca tcatactgtt 300

cccacccctc ccateccact tetgtccagc cgcctagccc cactttcttt tttttctttt 360
tttgagacag tctccctctt gctgaggctg gactgcagtg gcgagatctc ggctcactgt 420
aacctccgcc tcccgggttc aagcgattct cctgcctcag cctcccaagt agctaggatt 480
acaggcgccc gccaccagc ctggctaact ttgtatttt tagtagagat ggggtttcac 540
catgttggcc aggtctgtct caaactcctg accttaagtg attcgccac tgtggcctcc 600
caaagtgtg ggattacagg cgtgagctac cgccccagc ccctcccatc ccacttctgt 660

ccagccccct agccctactt tctttctggg atccaggagt ccagatcccc agccccctct	720
ccagattaca ttcatccagg cacaggaaag gacagggtca ggaaaggagg actctgggcg	780
gcagctcca cattccccct ccacgcttgg cccccagaat ggaggagggt gtctggatta	840
ctgggcgagg tgcctccct tcttggggac tgtggggggt ggtcaaaaga cctctatgcc	900
ccacctctt cctccctctg cctgtctgtg cctggggcag ggggagaaca gcccacctcg	960
tgactggggg ctggcccagc ccgcctatc cctgggggag ggggcgggac agggggagcc	1020
ctataattgg acaagtctgg gatccttgag tcctactcag cccagcgga ggtgaaggac	1080
gtccttcccc aggagccg	1098
<210> 3	
<211> 1157	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 3	
ccccagcgga ggtgaaggac gtccttcccc aggagccgac tggccaatca caggcaggaa	60
gatgaaggtt ctgtgggctg cgttctgtgt cacattcctg gcaggatgcc aggccaaggt	120
ggagcaagcg gtggagacag agccggagcc cgagctgcgc cagcagaccg agtggcagag	180
cggccagcgc tgggaactgg cactgggtcg cttttgggat tacctgcgt gggcgcagac	240
actgtctgag caggtgcagg aggagctgct cagctccaa gtcacccaag aactgagggc	300
gctgatggac gagaccatga aggagttgaa ggcctacaaa tcggaactgg aggaacaact	360
gaccccggtg gcggaggaga cgccggcacg gctgtccaag gagctgcaga cggcgcaggc	420
ccggctgggc gcggacatgg aggacgtgtg cggccgcctg gtgcagtacc gcggcgaggt	480
gcaggccatg ctcgccaga gcaccgagga gctgcgggtg cgctcgcct cccacctgcg	540
caagctgcgt aagcggctcc tccgcatcc cgatgacctg cagaagcgcc tggcagtgtg	600
ccaggccggg gcccgcgagg gcgccgagcg cgccctcagc gccatccgcg agcgcttggg	660
gcccctggtg gaacagggcc gcgtgcgggc cgccactgtg ggctccctgg ccggccagcc	720
gctacaggag cgggcccagg cctggggcga gcggctgcgc gcgcggatgg aggagatggg	780
cagtcggacc cgcgaccgcc tggacgaggt gaaggagcag gtggcggagg tgcgcgcca	840
gctggaggag caggcccagc agatacgctt gcaggccgag gccttccagg cccgcctcaa	900
gagctggttc gagccccctg tgggaagacat gcagcgccag tgggccgggc tgggtgagaa	960
ggtgcaggct gccgtgggca ccagcgccgc cctgtgccc agcgacaatc actgaacgcc	1020
gaagcctgca gccatgcgac cccacgccac cccgtgcctc ctgcctccgc gcagcctgca	1080

gcgggagacc ctgtcccgcc ccagccgct ctcctggggt ggaccctagt ttaataaaga 1140
ttcaccaagt ttcacgc 1157

<210> 4

<211> 317

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys Val Leu Trp Ala Ala Leu Leu Val Thr Phe Leu Ala Gly Cys

1 5 10 15

Gln Ala Lys Val Glu Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu

20 25 30

Arg Gln Gln Thr Glu Trp Gln Ser Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu

35 40 45

Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln

50 55 60

Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala

65 70 75 80

Leu Met Asp Glu Thr Met Lys Glu Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu

85 90 95

Glu Glu Gln Leu Thr Pro Val Ala Glu Glu Thr Arg Ala Arg Leu Ser

100 105 110

Lys Glu Leu Gln Thr Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp

115 120 125

Val Cys Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln Ala Met Leu

130 135 140

Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg

145 150 155 160

Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Pro Asp Asp Leu Gln Lys Arg

165 170 175

Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly Ala Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly Leu

180 185 190

Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val

195 200 205
 Arg Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg
 210 215 220
 Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly
 225 230 235 240
 Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu
 245 250 255
 Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala
 260 265 270
 Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu
 275 280 285
 Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala
 290 295 300
 Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Asp Asn His
 305 310 315
 <210> 5
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Met Lys Val Leu Trp Ala Ala Leu Leu Val Thr Phe Leu Ala Gly Cys
 1 5 10 15
 Gln Ala Lys Val Glu Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu
 20 25 30
 Arg Gln Gln Thr Glu Trp Gln Ser Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu
 35 40 45
 Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln
 50 55 60
 Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala
 65 70 75 80
 Leu Met Asp Glu Thr Met Lys Glu Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu

85	90	95	
Glu Glu Gln Leu Thr Pro Val Ala Glu Glu Thr Arg Ala Arg Leu Ser			
100	105	110	
Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp			
115	120	125	
Val Cys Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln Ala Met Leu			
130	135	140	
Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg			
145	150	155	160
Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg			
165	170	175	
Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly Ala Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly Leu			
180	185	190	
Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val			
195	200	205	
Arg Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg			
210	215	220	
Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly			
225	230	235	240
Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu			
245	250	255	
Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala			
260	265	270	
Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu			
275	280	285	
Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala			
290	295	300	
Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Asp Asn His			
305	310	315	
<210> 6			
<211> 317			

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Lys Val Leu Trp Ala Ala Leu Leu Val Thr Phe Leu Ala Gly Cys

1 5 10 15

Gln Ala Lys Val Glu Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu

20 25 30

Arg Gln Gln Thr Glu Trp Gln Ser Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu

35 40 45

Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln

50 55 60

Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala

65 70 75 80

Leu Met Asp Glu Thr Met Lys Glu Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu

85 90 95

Glu Glu Gln Leu Thr Pro Val Ala Glu Glu Thr Arg Ala Arg Leu Ser

100 105 110

Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp

115 120 125

Val Cys Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln Ala Met Leu

130 135 140

Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg

145 150 155 160

Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg

165 170 175

Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly Ala Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly Leu

180 185 190

Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val

195 200 205

Arg Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg

210 215 220

Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly

225 230 235 240
 Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu
 245 250 255
 Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala
 260 265 270

 Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu
 275 280 285
 Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala
 290 295 300
 Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Asp Asn His
 305 310 315
 <210> 7
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 Met Lys Val Leu Trp Ala Ala Leu Leu Val Thr Phe Leu Ala Gly Cys
 1 5 10 15

 Gln Ala Lys Val Glu Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu
 20 25 30
 Arg Gln Gln Thr Glu Trp Gln Ser Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu
 35 40 45
 Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln
 50 55 60
 Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala
 65 70 75 80
 Leu Met Asp Glu Thr Met Lys Glu Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu

 85 90 95
 Glu Glu Gln Leu Thr Pro Val Ala Glu Glu Thr Arg Ala Arg Leu Ser
 100 105 110
 Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp
 115 120 125

Val Cys Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln Ala Met Leu
130 135 140

Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg
145 150 155 160

Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg
165 170 175

Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly Ala Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly Leu
180 185 190

Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val
195 200 205

Arg Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg
210 215 220

Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly
225 230 235 240

Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu
245 250 255

Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala
260 265 270

Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu
275 280 285

Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala
290 295 300

Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Asp Asn His
305 310 315

<210> 8

<400> 8

000

<210> 9

<400> 9

000

<210> 10

<211> 18

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A synthetic oligonucleotide sequence
 <400> 10
 gtggagaagg tgcaggct 18
 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A synthetic oligonucleotide sequence
 <400> 11
 aagcgtaatc tggaacatcg t 21
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> A synthetic oligonucleotide sequence
 <400> 12
 ccctgtgccc agcgacaatc 20
 <210> 13
 <400> 13
 000
 <210> 14
 <400> 14
 000
 <210> 15
 <400> 15
 000
 <210> 16
 <400> 16
 000

<210> 17	
<400> 17	
000	
<210> 18	
<400> 18	
000	
<210> 19	
<400> 19	
000	
<210> 20	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> A synthetic oligonucleotide sequence	
<400> 20	
gguggagcaa gcgguggagu u	21
<210> 21	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> A synthetic oligonucleotide sequence	
<400> 21	
ggaguugaag gccuacaaau u	21
<210> 22	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> A synthetic oligonucleotide sequence	
<400> 22	
ggaagacaug cagcgccagu u	21
<210> 23	

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide sequence

<400> 23

gcgcgcggau ggaggagauu u 21

<210> 24

<211> 132

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide sequence

<400> 24

ctggaggctt gctgaaggct gtatgctgat ttgtaggcct tcaactcctg ttttggccac 60

tgactgacag gagtggaggcc tacaaatcag gacacaaggc ctgttactag cactcacatg 120

gaacaaatgg cc 132

<210> 25

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide sequence

<400> 25

ctggaggctt gctttgggct gtatgctgat ttgtaggcct tcaactcctg ttttggccac 60

tgactgacag gagtgaagt cacaaatcag gacacaaggc cctttatcag cactcacatg 120

gaacaaatgg ccaccgtggg aggatgacaa 150

<210> 26

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide sequence

<400> 26

ctggaggctt gctttgggct gtatgctgtt ccgatttgta ggccttcaag ttttggccac 60

tgactgactt gaagtcacaa atcggaacag gacacaaggc cctttatcag cactcacatg 120

gaacaaatgg ccaccgtggg aggatgacaa 150

<210> 27

<211> 951

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide sequence

<400> 27

atgaaggttc tgtgggctgc gttgctggc acattcctgg caggatgccca ggccaaggtg 60

gagcaagcgg tggagacaga gccggagccc gagctgcgcc agcagaccga gtggcagagc 120

ggccagcgct gggaactggc actgggtcgc ttttgggatt acctgcgctg ggtgcagaca 180

ctgtctgagc aggtgcagga ggagctgctc agctcccagg tcaccagga actgagggcg 240

ctgatggacg agaccatgaa agaacttaaa gcatataaga gtgagctgga ggaacaactg 300

accccggtgg cggaggagac gcgggcacgg ctgtccaagg agctgcaggc ggcgagggc 360

cggctgggcg cggacatgga ggacgtgtgc ggccgcctgg tgcagtaccg cggcgaggtg 420

caggccatgc tcggccagag caccgaggag ctgcgggtgc gcctgcctc ccacctgcgc 480

aagctgcgta agcggctcct ccgcgatgcc gatgacctgc agaagtgcct ggcaagtgtac 540

caggccgggg cccgcgaggg cgcagcgc gcctcagcg ccatccgca gcgcctgggg 600

cccctggtgg aacagggccg cgtgcgggcc gccactgtgg gctccctggc cggccagccg 660

ctacaggagc gggcccaggc ctggggcgag cggctgcgcg cgcggatgga ggagatgggc 720

agccggagcc gcgaccgctt ggacgaggtg aaggagcagg tggcggaggt gcgcgccaag 780

ctggaggagc agggccagca gatacgctg caggccgagg ccttcaggc ccgcctcaag 840

agctggttcg agcccctggt ggaagacatg cagcgccagt gggccgggct ggtggagaag 900

gtgcaggtg ccgtgggcac cagcgccgc cctgtgcca gcgacaatca c 951

<210> 28

<211> 951

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide sequence

<400> 28

atgaaggttc tgtgggctgc gttgctggtc acattcctgg caggatgcca ggccaaggtg	60
gagcaagcgg tggagacaga gccggagccc gagctgcgcc agcagaccga gtggcagagc	120
ggccacgcct gggaactggc actgggtcgc ttttgggatt acctgcgctg ggtgcagaca	180
ctgtctgagc aggtgcagga ggagctgctc agtcccagg tcaccagga actgaggcg	240
ctgatggacg agaccatgaa agaactcaaa gcatataaga gtgagctgga ggaacaactg	300
accccggtgg cggaggagac gcgggcacgg ctgtccaagg agctgcaggc ggcgaggcc	360
cggctggcg cggacatgga ggacgtgtgc ggccgcctgg tgcagtaccg cggcgaggtg	420
caggccatgc tcggccagag caccgaggag ctgcgggtgc gcctgcctc ccacctgcgc	480
aagctcgta agcggtcct cgcgatgcc gatgacctgc agaagtcct ggcagtgtac	540
caggccgggg cccgcgagg cgccgagcg gcctcagcg ccatccgga gcgcctgggg	600
cccctggtgg aacagggccg cgtgcgggcc gccactgtgg gctccctggc cggccagccg	660
ctacaggagc gggcccagc ctggggcgag cggctgcgcg cgcgatgga ggagatggc	720
agccggacc gcgaccgct ggacgaggtg aaggagcagg tggcgaggt gcgcgccaag	780
ctggaggagc aggccagca gatacgctg caggccagg ccttcaggc ccgcctcaag	840
agctggttcg agccctgtt ggaagacatg cagcgccagt gggccgggct ggtggagaag	900
gtgcaggctg ccgtgggcac cagcggccc cctgtgcca gcgacaatca c	951

<210> 29

<211> 951

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide sequence

<400> 29

atgaaggttc tgtgggctgc gttgctggtc acattcctgg caggatgcca ggccaaggtg	60
gagcaagcgg tggagacaga gccggagccc gagctgcgcc agcagaccga gtggcagagc	120
ggccacgcct gggaactggc actgggtcgc ttttgggatt acctgcgctg ggtgcagaca	180
ctgtctgagc aggtgcagga ggagctgctc agtcccagg tcaccagga actgaggcg	240
ctgatggacg agaccatgaa agaacttaaa gcttataaga gtgagctgga ggaacaactg	300
accccggtgg cggaggagac gcgggcacgg ctgtccaagg agctgcaggc ggcgaggcc	360

cggctgggcg cggacatgga ggacgtgtgc ggccgcctgg tgcagtaccg cggcgaggtg 420
caggccatgc tcggccagag caccgaggag ctgcgggtgc gcctcgctc ccacctgcgc 480
aagctgcgta agcggctcct ccgcgatgcc gatgacctgc agaagtcct ggcagtgtac 540
caggccgggg cccgcgaggg cgccgagcgc ggccctcagcg ccatccgca ggcctgggg 600
cccctggtgg aacagggccg cgtgcgggcc gccactgtgg gctccctggc cggccagccg 660
ctacaggagc gggcccaggc ctggggcgag cggctgcgcg cgcgatgga ggagatgggc 720

agccggaccc gcgaccgct ggacgaggtg aaggagcagg tggcggaggt gcgcgccaag 780
ctggaggagc agggccagca gatacgctg caggccgagg ccttcaggc ccgcctcaag 840
agctggttcg agcccctgtt ggaagacatg cagcgccagt gggccgggct ggtggagaag 900
gtgcaggctg ccgtgggcac cagcgccgcc cctgtgcca gcgacaatca c 951

<210> 30

<211> 951

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide sequence

<400> 30

atgaaggttc tgtgggctgc gttgtgtgtc acattcctgg caggatgcca ggccaaggtg 60
gagcaagcgg tggagacaga gccggagccc gagctgcgcc agcagaccga gtggcagagc 120

ggccagcgtc gggaactggc actgggtcgc ttttgggatt acctgcgctg ggtgcagaca 180
ctgtctgagc aggtgcagga ggagctgtc agctccagg tcaccagga actgagggcg 240
ctgatggacg agaccatgaa agaacttaaa gcatataaga gcgagctgga ggaacaactg 300
accccggttg cggaggagac gcgggcacgg ctgtccaagg agctgcaggc ggccgagggc 360
cggctgggcg cggacatgga ggacgtgtgc ggccgcctgg tgcagtaccg cggcgaggtg 420
caggccatgc tcggccagag caccgaggag ctgcgggtgc gcctcgctc ccacctgcgc 480
aagctgcgta agcggctcct ccgcgatgcc gatgacctgc agaagtcct ggcagtgtac 540

caggccgggg cccgcgaggg cgccgagcgc ggccctcagcg ccatccgca ggcctgggg 600
cccctggtgg aacagggccg cgtgcgggcc gccactgtgg gctccctggc cggccagccg 660
ctacaggagc gggcccaggc ctggggcgag cggctgcgcg cgcgatgga ggagatgggc 720
agccggaccc gcgaccgct ggacgaggtg aaggagcagg tggcggaggt gcgcgccaag 780
ctggaggagc agggccagca gatacgctg caggccgagg ccttcaggc ccgcctcaag 840
agctggttcg agcccctgtt ggaagacatg cagcgccagt gggccgggct ggtggagaag 900

gtgcaggctg ccgtgggcac cagcgccgcc cctgtgccca gcgacaatca c 951

<210> 31

<211> 951

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide sequence

<400> 31

atgaaggctt tgtgggctgc gttgctggc acattcctgg caggatgcc ggccaaggtg 60
gagcaagcgg tggagacaga gccggagccc gagctgcgcc agcagaccga gtggcagagc 120
ggccagcgct gggaactggc actgggtcgc ttttgggatt acctgcgctg ggtgcagaca 180
ctgtctgagc aggtgcagga ggagctgctc agctcccagg tcacccagga actgagggcg 240
ctgatggacg agaccatgaa agaactcaaa gcttataaga gtgagctgga ggaacaactg 300
accccgttgg cggaggagac gcgggcacgg ctgtccaagg agctgcaggc ggcgcaggcc 360

cggctgggcg cggacatgga ggacgtgtgc ggccgcctgg tgcagtaccg cggcgaggtg 420
caggccatgc tcggccagag caccgaggag ctgcgggtgc gcctcgctc ccacctgcgc 480
aagctgcgta agcggctcct ccgcgatgcc gatgacctgc agaagtgcct ggcaagtgtac 540
caggccgggg cccgcgaggg cgccgagcgc ggccctcagc ccatccgca ggcctgggg 600
cccctggtgg aacagggccg cgtgcgggcc gccactgtgg gctccctggc cggccagccg 660
ctacaggagc gggcccaggc ctggggcgag cggctgcgcg cgcgatgga ggagatgggc 720
agccggaccc gcgaccgct ggacgaggtg aaggagcagg tggcggaggt gcgcgccaag 780

ctggaggagc agggccagca gatacgctg caggccgagg ccttcaggc cgcctcaag 840
agctggttcg agccccgtt ggaagacatg cagcgccagt gggccgggct ggtggagaag 900
gtgcaggctg ccgtgggcac cagcgccgcc cctgtgccca gcgacaatca c 951

<210> 32

<211> 951

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A synthetic oligonucleotide sequence

<400> 32

atgaaggctt tgtgggctgc gttgctggc acattcctgg caggatgcc ggccaaggtg 60

gagcaagcgg tggagacaga gccggagccc gagctgcgcc agcagaccga gtggcagagc 120
ggccagcgct gggaactggc actgggtcgc ttttgggatt acctgcgctg ggtgcagaca 180

ctgtctgagc aggtgcagga ggagctgctc agctcccagg tcaccagga actgagggcg 240
ctgatggacg agaccatgaa agaactcaaa gcatataaga gcgagctgga ggaacaactg 300
accccggtgg cggaggagac gcgggcacgg ctgtccaagg agctgcaggc ggcgagggc 360
cggctgggcg cggacatgga ggacgtgtgc ggccgcctgg tgcagtaccg cggcgaggtg 420
caggccatgc tcggccagag caccgaggag ctgcgggtgc gcctgcctc ccacctgcgc 480
aagctgcgta agcggctcct ccgcgatgcc gatgacctgc agaagtcct ggcaagtgtac 540
caggccgggg cccgcgaggg cgccgagcgc ggccctcagc ccatccgca gcgcctgggg 600

cccctggtgg aacaggggcg cgtgcgggcc gccactgtgg gctccctggc cggccagccg 660
ctacaggagc gggcccaggc ctggggcgag cggctgcgcg cgcgatgga ggagatggc 720
agccggaccc gcgaccgct ggacgaggtg aaggagcagg tggcgaggt gcgcgccaag 780
ctggaggagc agggccagca gatacgctg caggccgagg ccttcagc ccgcctcaag 840
agctggttcg agccctggt ggaagacatg cagcgccagt gggccgggct ggtggagaag 900
gtgcaggctg ccgtgggcac cagcgccgc cctgtgcca gcgacaatca c 951

<210> 33
<211> 951
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A synthetic oligonucleotide sequence
<400> 33

atgaaggttc tgtgggctgc gttgctggtc acattcctgg caggatgcca ggccaagggtg 60
gagcaagcgg tggagacaga gccggagccc gagctgcgcc agcagaccga gtggcagagc 120
ggccagcgct gggaactggc actgggtcgc ttttgggatt acctgcgctg ggtgcagaca 180
ctgtctgagc aggtgcagga ggagctgctc agctcccagg tcaccagga actgagggcg 240
ctgatggacg agaccatgaa agaacttaaa gcttataaga gcgagctgga ggaacaactg 300
accccggtgg cggaggagac gcgggcacgg ctgtccaagg agctgcaggc ggcgagggc 360

cggctgggcg cggacatgga ggacgtgtgc ggccgcctgg tgcagtaccg cggcgaggtg 420
caggccatgc tcggccagag caccgaggag ctgcgggtgc gcctgcctc ccacctgcgc 480
aagctgcgta agcggctcct ccgcgatgcc gatgacctgc agaagtcct ggcaagtgtac 540

caggccgggg cccgcgaggg cgccgagcgc ggccctcagcg ccatccgcga gcgcctgggg	600
cccctggtgg aacagggccg cgtgcgggcc gccactgtgg gtcacctggc cggccagccg	660
ctacaggagc gggcccaggc ctggggcgag cggctgcgcg cgcggatgga ggagatgggc	720
agccggaccc gcgaccgcct ggacgaggtg aaggagcagg tggcggaggt gcgcgccaag	780
ctggaggagc agggccagca gatacgctg caggccgagg ccttcaggc ccgcctcaag	840
agctggttcg agcccctggt ggaagacatg cagcgccagt gggccgggct ggtggagaag	900
gtgcaggctg ccgtgggcac cagcgccgcc cctgtgccca gcgacaatca c	951
<210> 34	
<211> 951	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> A synthetic oligonucleotide sequence	
<400> 34	
atgaaggttc tgtgggctgc gttgtgtgtc acattcctgg caggatgcca ggccaaggtg	60
gagcaagcgg tggagacaga gccggagccc gagctgcgcc agcagaccga gtggcagagc	120
ggccagcgct gggaactggc actgggtcgc ttttgggatt acctgcgctg ggtgcagaca	180
ctgtctgagc aggtgcagga ggagctgtc agctcccagg tcaccagga actgaggcg	240
ctgatggacg agaccatgaa agaactcaaa gcttataaga gcgagctgga ggaacaactg	300
accccggtgg cggaggagac gcgggcacgg ctgtccaagg agctgcaggc ggcgagggc	360
cggctgggcg cggacatgga ggacgtgtgc ggccgcctgg tgcagtaccg cggcgaggtg	420
caggccatgc tcggccagag caccgaggag ctgcgggtgc gcctcgctc ccacctgcgc	480
aagctgcgta agcggctcct ccgcgatgcc gatgacctgc agaagtcct ggcaagtgtac	540
caggccgggg cccgcgaggg cgccgagcgc ggccctcagcg ccatccgcga gcgcctgggg	600
cccctggtgg aacagggccg cgtgcgggcc gccactgtgg gtcacctggc cggccagccg	660
ctacaggagc gggcccaggc ctggggcgag cggctgcgcg cgcggatgga ggagatgggc	720
agccggaccc gcgaccgcct ggacgaggtg aaggagcagg tggcggaggt gcgcgccaag	780
ctggaggagc agggccagca gatacgctg caggccgagg ccttcaggc ccgcctcaag	840
agctggttcg agcccctggt ggaagacatg cagcgccagt gggccgggct ggtggagaag	900
gtgcaggctg ccgtgggcac cagcgccgcc cctgtgccca gcgacaatca c	951