

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-551254  
(P2023-551254A)

(43)公表日 令和5年12月7日(2023.12.7)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85	Z 4 C 0 8 6
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z 4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/866 (2006.01)	C 1 2 N 15/866	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全33頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2023-532127(P2023-532127)  
 (86)(22)出願日 令和3年11月24日(2021.11.24)  
 (85)翻訳文提出日 令和5年7月21日(2023.7.21)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2021/060731  
 (87)国際公開番号 WO2022/115535  
 (87)国際公開日 令和4年6月2日(2022.6.2)  
 (31)優先権主張番号 63/118,060  
 (32)優先日 令和2年11月25日(2020.11.25)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)  
 (81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く

(71)出願人 520118865  
 プリベイル セラピューティクス, インコーポレーテッド  
 PREVAIL THERAPEUTICS, INC.  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10016, ニューヨーク, イースト 29 ストリート 430, スイート 940 Suite 940, 430 East 29th Street, New York, NY 10016, U.S.A.  
 (74)代理人 110003971  
 弁理士法人葛和国际特許事務所  
 (72)発明者 アベリオビック, アサ  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 100 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 神経変性疾患のための遺伝子治療

(57)【要約】

いくつかの側面において、本開示は、神経変性疾患、例えば、アルツハイマー病の処置のための組成物および方法に関する。いくつかの態様において、本開示は、A POE Christchurch(例として、APOE3chおよび/またはA POE2ch)タンパク質アイソフォームまたはこの一部をコードする導入遺伝子、APOE遺伝子またはこの一部を標的にする阻害性核酸、または上記のいずれかの組み合わせを含む、発現コンストラクトを提供する。いくつかの態様において、本開示は、アルツハイマー病を処置する方法を、発現コンストラクトを、これを必要とする対象へ投与することによって提供する。

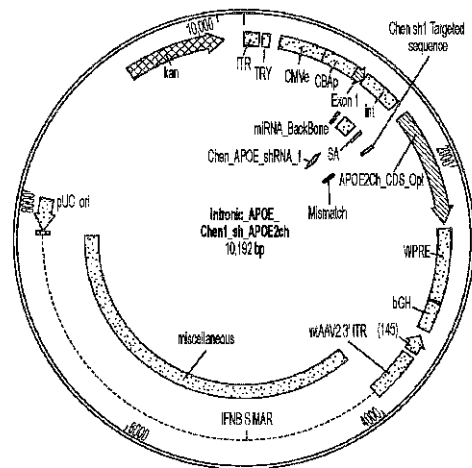


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

APOE Christchurchタンパク質をコードする核酸を含む発現コンストラクトを含む、単離された核酸。

## 【請求項 2】

APOE Christchurchタンパク質が、APOE2 Christchurchタンパク質である、請求項1に記載の単離された核酸。

## 【請求項 3】

APOE2 Christchurchタンパク質が、配列番号8と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含む、請求項2に記載の単離された核酸。

10

## 【請求項 4】

APOE2 Christchurchタンパク質をコードする核酸配列が、配列番号9と少なくとも80%同一の核酸配列を含む、請求項2または3に記載の単離された核酸。

## 【請求項 5】

APOE Christchurchタンパク質が、APOE3 Christchurchタンパク質である、請求項1に記載の単離された核酸。

## 【請求項 6】

APOE3 Christchurchタンパク質が、配列番号6のアミノ酸配列と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含む、請求項5に記載の単離された核酸。

## 【請求項 7】

APOE3 Christchurchタンパク質をコードする核酸配列が、配列番号7と少なくとも80%同一の核酸配列を含む、請求項5または6に記載の単離された核酸。

20

## 【請求項 8】

発現コンストラクトが、APOE遺伝子の発現または活性を阻害する阻害性核酸をコードする核酸配列をさらに含む、請求項1~7のいずれか一項に記載の単離された核酸。

## 【請求項 9】

発現コンストラクトが、APOE4の発現または活性を阻害する阻害性核酸をコードする核酸配列をさらに含む、請求項1~8のいずれか一項に記載の単離された核酸。

## 【請求項 10】

発現コンストラクトが、APOE2の発現または活性を阻害する阻害性核酸をコードする核酸配列をさらに含む、請求項1~9のいずれか一項に記載の単離された核酸。

30

## 【請求項 11】

発現コンストラクトが、APOE4およびAPOE2の発現または活性を阻害する阻害性核酸をコードする核酸配列をさらに含む、請求項1~8のいずれか一項に記載の単離された核酸。

## 【請求項 12】

阻害性核酸が、配列番号12~23のいずれか1つで表される配列によってコードされる、請求項8~11のいずれか一項に記載の単離された核酸。

## 【請求項 13】

発現コンストラクトが、APOE Christchurchタンパク質をコードする核酸配列へ作動可能に連結されている第1のプロモーターをさらに含む、請求項1~12のいずれか一項に記載の単離された核酸。

40

## 【請求項 14】

第1のプロモーターが、APOE遺伝子の発現または活性を阻害する阻害性核酸をコードする核酸配列へ作動可能に連結されている、請求項13に記載の単離された核酸。

## 【請求項 15】

発現コンストラクトが、APOE遺伝子の発現または活性を阻害する阻害性核酸をコードする核酸配列へ作動可能に連結されている第2のプロモーターをさらに含む、請求項13に記載の単離された核酸。

## 【請求項 16】

50

第1のプロモーターおよび/または第2のプロモーターが、独立して、ニワトリ-ベータアクチン(CBA)プロモーター、CAGプロモーター、CD68プロモーター、またはJeTプロモーターである、請求項13~15のいずれか一項に記載の単離された核酸。

【請求項17】

発現コンストラクトが、アデノ随伴ウイルス(AAV)逆方向末端反復(ITR)の脇に配置される、請求項1~16のいずれか一項に記載の単離された核酸。

【請求項18】

ITRが、AAV2 ITRである、請求項17に記載の単離された核酸。

【請求項19】

配列番号6~11のいずれか1つで表される配列を含む、請求項1~18のいずれか一項に記載の単離された核酸。 10

【請求項20】

請求項1~19のいずれか一項に記載の単離された核酸を含む、ベクター。

【請求項21】

プラスミドである、請求項20に記載のベクター。

【請求項22】

ベクターが、ウイルスベクターであり、任意に、ウイルスベクターが、組換えAAV(rAAV)ベクターまたはバキュロウイルスベクターである、請求項20に記載のベクター。

【請求項23】

以下:

(i) AAVカプシドタンパク質;および

(ii) 請求項1~19のいずれか一項に記載の単離された核酸、または請求項22に記載のベクター

を含む、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)。

20

【請求項24】

AAVカプシドタンパク質が、血液脳関門を横断することができ、任意に、カプシドタンパク質が、AAV9カプシドタンパク質またはAAVrh.10カプシドタンパク質である、請求項23に記載のrAAV。

【請求項25】

中枢神経系(CNS)の神経細胞および非神経細胞を形質導入する、請求項23または24に記載のrAAV。 30

【請求項26】

請求項1~19のいずれか一項に記載の単離された核酸、請求項20~22のいずれか一項に記載のベクター、または請求項23~25のいずれか一項に記載のrAAVを含む、宿主細胞。

【請求項27】

請求項1~19のいずれか一項に記載の単離された核酸、請求項20~22のいずれか一項に記載のベクター、または請求項23~25のいずれか一項に記載のrAAVを含む、組成物。

【請求項28】

薬学的に許容し得る担体をさらに含む、請求項27に記載の組成物。 40

【請求項29】

アルツハイマー病を有するかまたは有すると疑われる対象へ、請求項1~19のいずれか一項に記載の単離された核酸、請求項20~22のいずれか一項に記載のベクター、請求項23~25のいずれか一項に記載のrAAV、または請求項27または28に記載の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項30】

投与が、対象のCNSへの直接注射を含み、任意に、直接注射が、脳内注射、実質内注射、髄腔内注射、またはそのいずれかの組み合わせを含む、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

50

対象の CNS への直接注射が、対流強化送達 (CED) を含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 32】

投与が、末梢注射を含み、任意に、末梢注射が、静脈内注射を含む、請求項 29 ~ 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

対象が、常染色体優性遺伝性アルツハイマー病 (ADAD) を有するかまたは有すると疑われる、請求項 29 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

対象が、PSEN1 遺伝子において少なくとも 1 の突然変異を有する、請求項 29 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

PSEN1 遺伝子における突然変異が、プレセニン 1 タンパク質における E280A 突然変異を引き起こす、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

対象が、PSEN1 E280A 突然変異ホモ接合型である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 37】

対象が、APOE3 Christchurch 突然変異についてホモ接合性ではなく、ここで APOE3 Christchurch 突然変異が、APOE3 タンパク質において R136S 突然変異を引き起こす、請求項 29 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

投与が、投与を受けていない対象と比較して、軽度の認知機能障害 (MIC) の発症遅延をもたらす、請求項 29 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、35 U.S.C. 119(e) の下で、2020 年 11 月 25 日に提出された米国仮出願第 63/118,060 号、表題「GENE THERAPIES FOR NEURODEGENERATIVE DISEASE」の出願日の利益を主張し、これら各出願の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、FES-Web を介して ASCII フォーマットで提出された配列表を含有し、その全体は、参照により本明細書に組み込まれる。該 ASCII コピーは、2021 年 11 月 24 日に作成され、P109470016WO00-SEQ-LJG と名付けられ、24,073 バイトのサイズである。

【背景技術】

【0003】

背景

アルツハイマー病 (AD) は認知症の最も一般的な形態であり、米国だけで 500 万人以上の人が罹患している。アルツハイマー病は、ニューロン機能を阻害し、ニューロン間の接続を破壊し、最終的には細胞死をもたらす、脳全体にわたる異常なタンパク質沈着物の存在により特徴付けられる不可逆的で進行性の脳障害である。これらの沈着物は、アミロイド- のプラークおよびリン酸化タウタンパク質によって形成されるタングル (tangle) を含む。軽度の AD を有する患者 (patients) は、記憶喪失を経験し、徘徊、お金の取り扱いにおける困難、質問の繰り返し、および性格や行動の変化につながる。中等度の AD 患者は、増大した記憶喪失を示し、混乱して友人や家族の認識が困難になり、新しいことを学ぶことができなくなり、幻覚、妄想、およびパラノイアにつながる。重度の AD を有する患者はコミュニケーションをすることができず、彼らのケアは他人に完全に依存する。最終的に、タンパク質プラークおよびタングルは脳全体に広がり、著しい組織の萎縮につ

10

20

30

40

50

ながる。

【発明の概要】

【0004】

概要

ほとんどのアルツハイマー病(AD)のペイシエント(patients)は、遅発性ADを有しており、その症状は対象において60代半ばに現れる。アポリポタンパク質E(APOE)遺伝子は、遅発性ADの発症に関与している。APOEは、ADに対して保護的であるAPOE2、および遅発性ADを発症するリスクの増大に関連するAPOE4を含む、いくつかのアイソフォームを有する。APOE4の2コピーを保有するホモ接合体のペイシエント(例として、APOE4<sup>+/+</sup>であるペイシエント)は、APOE4の1コピー、およびAPOE2またはAPOE3のいずれかの1コピーを保有するヘテロ接合体のペイシエントと比較して、遅発性ADを発症するより大きなリスクにある。加えて、プレセニン1(PSEN1)突然変異(例として、PSEN1 E280A突然変異)は、常染色体優性遺伝性ADに関連する。APOE3 Christchurch突然変異(例として、APOE3 R136S突然変異)についてホモ接合であるPSEN1 E280A突然変異キャリアが、APOE3 Christchurch突然変異(例として、APOE3 R136S突然変異)のホモ接合態ではないPSEN1 E280A突然変異キャリアよりもはるかに遅く認知機能障害を発症することが見出された。

10

【0005】

本開示の側面は、AD(例として、ADAD)を有するかまたは有することが疑われる対象を処置するための組成物および方法に関する。本開示は、部分的には、APOE Christchurchタンパク質(例として、APOE3chタンパク質および/またはAPOE2chタンパク質)をコードする発現コンストラクトに基づく。いくつかの側面において、発現コンストラクトはまた、AD関連遺伝子(例として、APOE4、APOE3、および/またはAPOE2などのAPOE)を標的とする阻害性RNA(例として、shRNA、miRNA、amiRNAなど)をコードする。

20

【0006】

いくつかの側面において、本開示は、APOE Christchurchタンパク質をコードする核酸配列を含む発現コンストラクトを含む単離された核酸を提供する。

いくつかの態様において、APOE Christchurchタンパク質は、APOE2 Christchurchタンパク質である。いくつかの態様において、APOE2 Christchurchタンパク質は、配列番号8と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、APOE2 Christchurchタンパク質をコードする発現コンストラクトは、配列番号9と少なくとも80%同一の核酸配列を含む。いくつかの態様において、APOE Christchurchタンパク質は、APOE3 Christchurchタンパク質である。いくつかの態様において、APOE3 Christchurchタンパク質は、配列番号6のアミノ酸配列と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、APOE3 Christchurchタンパク質をコードする発現コンストラクトは、配列番号7と少なくとも80%同一の核酸配列を含む。

30

【0007】

いくつかの態様において、発現コンストラクトは、1以上のAPOE遺伝子アイソフォーム(例として、APOE4、APOE3、APOE2等)の発現または活性を阻害する阻害性核酸をコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの態様において、発現コンストラクトは、APOE4の発現または活性を阻害する阻害性核酸をコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの態様において、発現コンストラクトは、APOE2の発現または活性を阻害する阻害性核酸をコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの態様において、発現コンストラクトは、APOE3の発現または活性を阻害する阻害性核酸をコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの態様において、発現コンストラクトは、APOE4およびAPOE2の発現または活性を阻害する阻害性核酸をコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの態様において、発現コンストラクトは、APOE4、APOE3、およびAPOE2の発現または活性を阻害する阻害性核酸をコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの態様において、阻害性核酸は、配列番号12~23のいずれか1つで表される配列によってコードされる。

40

50

## 【0008】

いくつかの態様において、発現コンストラクトは、APOE Christchurchタンパク質をコードする核酸配列へ作動可能に(operably)連結されている第1のプロモーターをさらに含む。いくつかの態様において、第1のプロモーターは、1以上のAPOEアイソフォーム(例として、APOE4、APOE3、APOE2等)の発現または活性を阻害する阻害性核酸をコードする核酸配列へ作動可能に連結されている。いくつかの態様において、発現コンストラクトは、1以上のAPOEアイソフォーム(例として、APOE4、APOE3、APOE2等)の発現または活性を阻害する阻害性核酸をコードする核酸配列へ作動可能に連結されている第2のプロモーターをさらに含む。いくつかの態様において、第1のプロモーターおよび/または第2のプロモーターは、独立して、ニワトリ-ベータアクチン(CBA)プロモーター、CAGプロモーター、CD68プロモーター、またはJeTプロモーターである。

10

いくつかの態様において、発現コンストラクトは、アデノ随伴ウイルス(AAV)逆方向末端反復(ITR)の脇に配置される。いくつかの態様において、ITRは、AAV2 ITRである。

## 【0009】

いくつかの態様において、単離された核酸は、配列番号6~11のいずれか1つで表される配列を含む。

いくつかの側面において、本開示は、本明細書に記載の単離された核酸を含むベクターを提供する。いくつかの態様において、ベクターは、プラスミドである。いくつかの態様において、ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの態様において、ウイルスベクターは、組換えAAV(rAAV)ベクターまたはバキュロウイルスベクターである。

20

## 【0010】

いくつかの側面において、本開示は、(i)AAVカプシドタンパク質;および(ii)本明細書に記載のとおり単離された核酸またはベクターを含む組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)を提供する。

いくつかの態様において、AAVカプシドタンパク質は、血液脳関門を横断することができる。いくつかの態様において、AAVカプシドタンパク質は、AAV9カプシドタンパク質またはAAVrh.10カプシドタンパク質である。いくつかの態様において、rAAVは、中枢神経系(CNS)の神経細胞および非神経細胞を形質導入する。

## 【0011】

30

いくつかの側面において、本開示は、本明細書に記載のとおり単離された核酸、ベクター、またはrAAVを含む宿主細胞を提供する。

いくつかの側面において、本開示は、本明細書に記載のとおり単離された核酸、ベクター、またはrAAVを含む組成物を提供する。

いくつかの態様において、組成物は、薬学的に許容し得る担体をさらに含む医薬組成物である。

## 【0012】

いくつかの側面において、本開示は、アルツハイマー病を有するかまたは有することが疑われる対象へ、本明細書に記載のとおり単離された核酸、ベクター、rAAVまたは組成物を投与することを含む方法を提供する。

40

いくつかの態様において、投与は、対象のCNSへの直接注射を含む。いくつかの態様において、直接注射は、脳内注射、実質内注射、髄腔内注射、またはそれらのいずれかの組み合わせを含む。いくつかの態様において、対象のCNSへの直接注射は、対流強化送達(CED)を含む。いくつかの態様において、投与は、末梢注射を含む。いくつかの態様において、末梢注射は、静脈内注射を含む。

## 【0013】

いくつかの態様において、対象は、常染色体優性遺伝性アルツハイマー病(ADAD)を有するかまたは有すると疑われる。いくつかの態様において、対象は、PSEN1遺伝子において少なくとも1の突然変異を有する。いくつかの態様において、PSEN1遺伝子における突然変異は、プレセニン1タンパク質においてE280A突然変異を引き起こす。いく

50

つかの態様において、対象は、APOE3 Christchurch突然変異についてホモ接合性ではなく、ここでAPOE3 Christchurch突然変異は、APOE3タンパク質においてR136S突然変異を引き起こす。いくつかの態様において、投与は、投与を受けていない対象と比較して、軽度の認知機能障害(MIC)の発症遅延をもたらす。

【図面の簡単な説明】

【0014】

図面の簡単な記載

【図1】図1は、APOE Christchurchバリエーションタンパク質をコードするベクターの一態様を描く概略図を示す。

【図2-1】図2は、野生型APOE2、APOE2\_Christchurch、およびAPOE3\_Christchurchの多重配列アライメントを示す。配列番号3、8、および6は、上から下に示される。

【図2-2】図2は、野生型APOE2、APOE2\_Christchurch、およびAPOE3\_Christchurchの多重配列アライメントを示す。配列番号3、8、および6は、上から下に示される。

【発明を実施するための形態】

【0015】

詳細な記載

本開示は、部分的には、対象におけるAD関連遺伝子産物の組み合わせの発現のための組成物および方法に基づく。遺伝子産物は、タンパク質、タンパク質のフラグメント(例として、一部)、AD関連遺伝子を阻害する干渉核酸などであり得る。いくつかの態様において、遺伝子産物は、AD関連遺伝子によりコードされるタンパク質またはタンパク質フラグメントである。いくつかの態様において、遺伝子産物は、AD関連遺伝子を阻害する阻害性核酸(例として、shRNA、siRNA、miRNA、amiRNAなど)である。

【0016】

AD関連遺伝子は、遺伝子学的に、生化学的に、または機能的にアルツハイマー病(AD)に関連する遺伝子産物をコードする遺伝子を指す。例えば、E280A突然変異を含む少なくとも1コピーのプレセニン1(PSEN1)を有する個体は、常染色体優性遺伝性アルツハイマー病(ADAD)を発症するリスクが増大している。いくつかの態様において、APOE3 Christchurch突然変異ホモ接合性体(APOE3ch<sup>+/+</sup>)は、プレセニン1(PSEN1)E280A突然変異を有するADADのペイシェントにおいて神経保護的效果を呈する。他の場合において、少なくとも1コピーのAPOE4を有する個体は、遅発性ADを発症するリスクが増大している。別の例において、APOE2は、ADのマウスモデルにおいて神経保護的效果を呈する。本明細書に使用されるとき、用語「神経保護的」は、神経保護の不在(例として、神経保護剤またはタンパク質の不在)下の細胞または対象におけるニューロンの構造および/または機能の保護と比べた、細胞または対象におけるニューロンの構造および/または機能の保護を指す。

【0017】

単離された核酸およびベクター

単離された核酸は、DNAであっても、またはRNAであってもよい。いくつかの側面において、本開示は、APOE Christchurchタンパク質(例として、APOE2 Christchurchタンパク質および/またはAPOE3 Christchurchタンパク質)をコードする核酸配列を含む発現コンストラクトを含む単離された核酸を提供する。本開示の側面はまた、APOE Christchurchタンパク質(例として、APOE2 Christchurchタンパク質および/またはAPOE3 Christchurchタンパク質)をコードする核酸配列および1以上の内在性APOE遺伝子アイソフォーム(例として、APOE遺伝子のアイソフォーム2、3、および/または4)を標的にする1以上の阻害性核酸(例として、dsRNA、siRNA、miRNA、amiRNA等)をコードする核酸配列を含む、発現コンストラクトを含む単離された核酸に関する。

【0018】

APOEタンパク質は、アポリポタンパク質Eを指し、これは、トリグリセリドに富むり

ポタンパク質の異化において役割を果たす脂肪結合タンパク質である。APOE2、APOE3、およびAPOE4と称されるAPOEの3つの主要なアイソフォームが存在する。各アイソフォームは、アミノ酸130およびアミノ酸176(タンパク質のシグナルペプチドを除いた場合、夫々位置112および158とも称される)の2つの位置において他と異なる。APOE2は、Cys130/Cys176を含有する、III型高脂血症および他の疾患に関連することが観察されているが、神経保護の役割も果たす。APOE3はCys130/Arg176を含有し、最も一般的なAPOEアレルである。APOE4はArg130/Arg176を含有し、遅発性アルツハイマー病、アテローム性動脈硬化症、外傷性脳損傷(TBI)における好ましくない結果および他の疾患に関連していることが観察されている。ヒトにおいて、APOE遺伝子は19番染色体上に位置する。いくつかの態様において、APOE4は、配列番号1で表される核酸配列によってコードされる。いくつかの態様において、APOE2は、配列番号2で表される核酸配列によってコードされる。いくつかの態様において、APOE3は、配列番号4で表される核酸配列によってコードされる。

10

#### 【0019】

いくつかの側面において、本開示は、APOE3 Christchurch突然変異(例として、APOE3ch<sup>+/+</sup>)が、AD患者(例として、PSEN1 E280A突然変異キャリアであるAD患者)において神経保護の役割を担うという驚くべき発見に基づく。本明細書に記載のとおり、APOE Christchurch突然変異(APOEch)は、APOEコード配列のコードン154における突然変異に関連するR136Sアミノ酸置換を内包するAPOE突然変異タンパク質を指す。いくつかの態様において、本明細書に記載の単離された核酸は、APOE Christchurchタンパク質をコードする発現コンストラクトを含む。いくつかの態様において、APOE Christchurchタンパク質をコードする核酸配列は、コード最適化される。いくつかの態様において、単離された核酸は、APOE3 Christchurchタンパク質、またはそのフラグメントをコードする。用語「フラグメント」は、参照ポリペプチドまたは核酸分子(例として、野生型または完全長アイソフォーム)のポリペプチドまたは核酸分子の一部を指す。いくつかの態様において、フラグメントは、参照分子のいずれかの末端からの切断型であり、および参照分子(例として、野生型または完全長アイソフォーム)に対して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の配列同一性を有する。いくつかの態様において、フラグメントは、参照分子(例として、野生型または完全長アイソフォーム)の長さによって、アミノ酸またはヌクレオチドの欠失(例として、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上の欠失)を含有する。いくつかの態様において、単離された核酸は、配列番号6で表されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする。いくつかの態様において、単離された核酸は、APOE2 Christchurchタンパク質、またはそのフラグメントをコードする。いくつかの態様において、単離された核酸は、配列番号8で表されるアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする。タンパク質フラグメントは、APOEch遺伝子によってコードされるタンパク質のうち約50%、約60%、約70%、約80%、約90%または約99%を含んでいてもよい。いくつかの態様において、タンパク質フラグメントは、配列番号6または8で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質のうち50%と99.9%との間(例として、50%と99.9%との間のいずれかの値)を含む。

20

30

40

#### 【0020】

いくつかの態様において、遺伝子産物(例として、APOE Christchurchタンパク質を

50

コードする導入遺伝子)は、天然に存在する遺伝子のコード部分(例として、cDNA)によりコードされる。いくつかの態様において、遺伝子産物は、APOE Christchurch突然変異を内包するAPOE遺伝子によってコードされるタンパク質(またはそのフラグメント)である。いくつかの態様において、遺伝子産物は、APOE Christchurch突然変異を内包するAPOE3遺伝子(例として、APOE3ch)によってコードされるタンパク質(またはそのフラグメント)である。いくつかの態様において、APOE3ch遺伝子は、配列番号7で表されるとおりの核酸配列と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である核酸配列を含む。いくつかの態様において、遺伝子産物は、APOE Christchurch突然変異を内包するAPOE2遺伝子(例として、APOE2ch)によってコードされるタンパク質(またはそのフラグメント)である。いくつかの態様において、APOE3ch遺伝子は、配列番号9で表されるとおりの核酸配列と、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一の核酸配列を含む。いくつかの態様において、APOE Christchurchタンパク質をコードする核酸配列は、コドン最適化される。いくつかの態様において、APOE3chタンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、配列番号10で表されるとおりの核酸配列と、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である。いくつかの態様において、APOE2chタンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、配列番号11で表されるとおりの核酸配列と、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である。

10

20

30

40

50

#### 【0021】

いくつかの態様において、本明細書に記載のと通りの単離された核酸は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の障害性核酸(例として、dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA、amiRNA等)をコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの態様において、単離された核酸は、10より多くの障害性核酸をコードする。いくつかの態様において、1以上の障害性核酸の各々は、異なる遺伝子または遺伝子の一部を標的にする(例として、第1のmiRNAは、第1の遺伝子の標的配列を標的にし、および第2のmiRNAは、第1の標的配列とは異なる第2の遺伝子の標的配列を標的にする)。いくつかの態様において、1以上の障害性核酸の各々は、同じ遺伝子の同じ標的配列を標的にする(例として、単離された核酸は、複数のコピーの同じmiRNAをコードする)。

#### 【0022】

いくつかの態様において、単離された核酸は、AD関連遺伝子(例として、APOE遺伝子の1以上のAPOE4アイソフォーム、APOE3アイソフォーム、および/またはAPOE2アイソフォームなどの1以上の内在性のAPOE遺伝子産物)を標的にする(例として、それにハイブリダイズする、またはそれと相補性を有する領域を含む)障害性核酸である遺伝子産物をコードする。当業者は、第1の遺伝子産物(例として、APOEchタンパク質)および第2の遺伝子産物(例として、APOE遺伝子のAPOE4アイソフォームを標的とする障害性RNA)の発現の順序は、一般的に逆転され得ることを認識する(例として、障害性RNAは第1の遺伝子産物であり、APOE2は第2の遺伝子産物である)。

#### 【0023】

APOE遺伝子アイソフォーム(単数または複数)(例として、APOE4、APOE3および/またはAPOE2)を標的にする障害性核酸は、6と50との間のヌクレオチド長である相補性

を有する領域(例として、標的遺伝子、例えば、APOE4、APOE3および/またはAPOE2をコードする遺伝子にハイブリダイズする阻害性核酸の領域)を含んでもよい。いくつかの態様において、阻害性核酸は、約6と30との間、約8と20との間、または約10と19との間のヌクレオチド長であるAPOEと相補性を有する領域を含む。いくつかの態様において、阻害性核酸は、APOE配列のうち少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25個の連続したヌクレオチドと相補的である。いくつかの態様において、APOE遺伝子を標的にする阻害性核酸は、非アレルト異的である(例として、阻害性核酸は、APOE遺伝子のすべてのアイソフォームをサイレンシングする)。いくつかの態様において、阻害性核酸は、APOEの1以上の特異的アレル、例えば、APOE2、APOE3、および/またはAPOE4のうちの1以上を標的にする。いくつかの態様において、阻害性核酸は、APOE2chまたはAPOE3chアイソフォームを標的にしない(例として、その発現または活性を阻害しない)。

10

## 【0024】

いくつかの態様において、遺伝子産物(例として、阻害性RNA)は、標的遺伝子の一部にハイブリダイズする(例として、標的遺伝子、例えば、配列番号1で表される配列などの、APOEのAPOE4アイソフォームのうち5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、またはそれ以上の連続したヌクレオチドに相補的である)。いくつかの態様において、遺伝子産物(例として、阻害性RNA)は、標的遺伝子の一部にハイブリダイズする(例として、標的遺伝子、例えば、配列番号2で表される配列などの、APOEのAPOE2アイソフォームのうち5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、またはそれ以上の連続したヌクレオチドに相補的である)。いくつかの態様において、遺伝子産物(例として、阻害性RNA)は、標的遺伝子の一部にハイブリダイズする(例として、標的遺伝子、例えば、配列番号4で表される配列などの、APOEのAPOE3アイソフォームのうち5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、またはそれ以上の連続したヌクレオチドに相補的である)。

20

## 【0025】

いくつかの態様において、発現コンストラクトはモノシストロニックである(例として、発現コンストラクトは、第1の遺伝子産物および第2の遺伝子産物を含む単一の融合タンパク質をコードする)。いくつかの態様において、発現コンストラクトはポリシストロニックである(例として、発現コンストラクトは、2つの異なる遺伝子産物、例えば2つの異なるタンパク質またはタンパク質フラグメントをコードする)。

30

## 【0026】

ポリシストロニックな発現ベクターは、1つ以上(例えば、1、2、3、4、5、またはそれ以上)のプロモーターを含み得る。任意の適切なプロモーター、例えば、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、内因性プロモーター、組織特異的プロモーター(例えば、CNS特異的プロモーター)などを使用することができる。いくつかの態様において、プロモーターは、ニワトリベータ-アクチンプロモーター(CBAプロモーター)、CAGプロモーター(例えば、Alexopoulou et al.(2008) BMC Cell Biol. 9:2; doi: 10.1186/1471-2121-9-2に記載のもの)、CD68プロモーター、またはJeTプロモーター(例えばT ornoee et al.(2002) Gene 297(1-2):21-32に記載のもの)である。いくつかの態様において、プロモーターは、第1の遺伝子産物、第2の遺伝子産物、または第1の遺伝子産物と第2の遺伝子産物をコードする核酸配列に、作動可能に連結されている。いくつかの態様において、発現カセットは1つ以上の追加の調節配列を含み、これには、限定することなく、転写因子結合配列、イントロンスプライス部位、ポリ(A)付加部位、エンハンサー配列、リプレッサー結合部位、またはこれらの任意の組み合わせが含まれる。

40

## 【0027】

いくつかの態様において、第1の遺伝子産物をコードする核酸配列と第2の遺伝子産物をコードする核酸配列とは、内部リボソーム進入部位(IRES)をコードする核酸配列によって分離されている。IRES部位の例は、例えば、Mokrejs et al.(2006) Nucleic A

50

cids Res. 34(Database issue):D125-30に記載されている。いくつかの態様において、第1の遺伝子産物をコードする核酸配列と第2の遺伝子産物をコードする核酸配列とは、自己切断型ペプチドをコードする核酸配列によって分離されている。自己切断型ペプチドの例には、限定はされないが、T2A、P2A、E2A、F2A、BmCPV 2A、およびBmIFV 2A、およびLiu et al.(2017) Sci Rep. 7: 2193に記載されたものが含まれる。いくつかの態様において、自己切断型ペプチドはT2Aペプチドである。

【0028】

いくつかの態様において、ADなどの障害は、APOE4の少なくとも1つのコピーの発現に関連する。したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載の単離された核酸は、APOE4(例として、APOE)の発現を低減または予防する阻害性核酸を含む。阻害性核酸をコードする配列は、発現ベクターの非翻訳領域(例として、イントロン、5' UTR、3' UTRなど)に配置され得る。

【0029】

いくつかの態様において、阻害性核酸は、発現コンストラクトのイントロン、例えば、第1の遺伝子産物をコードする配列の上流のイントロンに配置される。阻害性核酸は、二本鎖RNA(dsRNA)、shRNA、siRNA、マイクロRNA(miRNA)、人工miRNA(amiRNA)、またはRNAアプタマーであることができる。一般に阻害性核酸は、標的RNA(例えば、mRNA)の約6~約30(例えば、6から30までの、両端の値を含む任意の整数)個の連続したヌクレオチドに結合する(例えば、ハイブリダイズする)。いくつかの態様において、阻害性核酸分子は、miRNAまたはamiRNA、例えば、APOEのAPOE4アイソフォーム(APOE4タンパク質をコードする遺伝子)を標的とするmiRNAである。いくつかの態様において、阻害性核酸分子は、miRNAまたはamiRNA、例えば、APOEのAPOE3アイソフォーム(APOE3タンパク質をコードする遺伝子)を標的にするmiRNAである。いくつかの態様において、阻害性核酸分子は、miRNAまたはamiRNA、例えば、APOEのAPOE2アイソフォーム(APOE2タンパク質をコードする遺伝子)を標的にするmiRNAである。いくつかの態様において、miRNAは、それがハイブリダイズするAPOE mRNAの領域とのいかなるミスマッチも含まない(例として、miRNAは「完全」である)。いくつかの態様において、阻害性核酸は、shRNA(例として、APOEを標的とするshRNA)、例えば、配列番号12~23のいずれか1つによってコードされる。いくつかの態様において、miRNAは、それがハイブリダイズするAPOE mRNAの領域と、少なくとも1つ(例として、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上)のミスマッチを含む。

【0030】

いくつかの態様において、阻害性核酸は、人工マイクロRNA(amiRNA)である。マイクロRNA(miRNA)は典型的には、植物および動物に見られる小さな非コードRNAを指し、遺伝子発現の転写および翻訳後調節に機能する。miRNAは、RNAポリメラーゼによって転写されて、プリmiRNAと呼ばれるヘアピンループ構造を形成する;これは、その後酵素(Drosha、Pasha、スプライセオソームなど)によって処理されてプレmiRNAヘアピン構造を形成し、これは次にダイサーにより処理されて、miRNA/miRNA\*二重鎖(\*はmiRNA二重鎖のパスセンジャー鎖を示す)を形成し、その一方の鎖は次にRNA誘導サイレンシング複合体(RISC)に組み込まれる。いくつかの態様において、本明細書に記載の阻害性RNAは、APOEのAPOE4アイソフォーム(APOE4タンパク質をコードする遺伝子)を標的とするmiRNAである。いくつかの態様において、本明細書に記載のとおり阻害性RNAは、APOEのAPOE3アイソフォーム(APOE3タンパク質をコードする遺伝子)を標的にするmiRNAである。いくつかの態様において、本明細書に記載のとおり阻害性RNAは、APOEのAPOE2アイソフォーム(APOE2タンパク質をコードする遺伝子)を標的にするmiRNAである。

【0031】

いくつかの態様において、APOE(例として、APOEのAPOE4アイソフォーム、APOE3アイソフォーム、またはAPOE2アイソフォーム)を標的とする阻害性核酸は、miRNA/miRNA\*二重鎖を含む。いくつかの態様において、miRNA/miRNA\*二重鎖のmiRNA鎖

は、配列番号12～23のいずれかによってコードされる配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの態様において、miRNA/miRNA\*二重鎖のmiRNA\*鎖は、配列番号12～23のいずれか1つによってコードされる配列を含むか、またはそれからなる。

【0032】

人工マイクロRNA(amiRNA)は、天然のmiRNAを修飾して、プレmRNAの天然の標的化領域を目的の標的化領域で置き換えることにより誘導される。例えば、天然に発現するmiRNAを足場または骨格(例えば、プリmiRNA足場)として使用でき、ステム配列を、目的遺伝子を標的とするmiRNAのそれに置き換える。人工前駆体マイクロRNA(プレamiRNA)は、通常、単一の安定した低分子RNAが優先的に生成されるように処理される。いくつかの態様において、本明細書に記載のrAAVベクターおよびrAAVは、amiRNAをコードする核酸を含む。いくつかの態様において、amiRNAのプリmiRNA足場は、プリMIR-21、プリMIR-22、プリMIR-26a、プリMIR-30a、プリMIR-33、プリMIR-122、プリMIR-375、プリMIR-199、プリMIR-99、プリMIR-194、プリMIR-155、およびプリMIR-451からなる群から選択されるプリmiRNAに由来する。いくつかの態様において、amiRNAは、例えばFowler et al. *Nucleic Acids Res.* 2016 Mar 18; 44(5): e48に記載されているように、APOE(例として、APOEのAPOE4アイソフォーム)を標的とする核酸配列、およびeSIBR amiRNA足場を含む。

10

【0033】

いくつかの態様において、APOE(例として、APOEのAPOE4アイソフォーム、APOE3アイソフォーム、またはAPOE2アイソフォーム)を標的とするamiRNAは、配列番号15、19、および23のいずれか1つによってコードされる配列を含むか、またはそれからなる。

20

本明細書に記載の単離された核酸は、それ自体で、またはベクターの一部として存在し得る。一般にベクターは、プラスミド、コスミド、ファージミド、細菌人工染色体(BAC)、またはウイルスベクター(例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レトロウイルスベクター、バキュロウイルスベクターなど)である。いくつかの態様において、ベクターは、プラスミド(例えば、本明細書に記載の単離された核酸を含むプラスミド)である。いくつかの態様において、ベクターは、組換えAAV(rAAV)ベクターである。rAAVは、rAAVベクターの「プラス鎖」または「マイナス鎖」のいずれかを含み得る。いくつかの態様において、rAAVベクターは、一本鎖である(例えば、一本鎖DNA)。いくつかの態様において、ベクターは、バキュロウイルスベクター(例として、*Autographa californica*核多角体病(AcNPV)ベクター)である。

30

【0034】

典型的には、rAAVベクターは、2つのAAV逆方向末端反復(ITR)配列の脇に配置される導入遺伝子(例として、以下:プロモーター、イントロン、エンハンサー配列、タンパク質コード配列、阻害性RNAコード配列、ポリAテール配列などの各々を1以上含む発現コンストラクト)を含む。いくつかの態様において、rAAVベクターの導入遺伝子は、本開示に記載の単離された核酸を含む。いくつかの態様において、rAAVベクターの2つのITR配列のそれぞれは、完全長ITR(例えば、長さが約145bpであり、機能的Rep結合部位(RBS)および末端分解部位(trs)を含む)である。いくつかの態様において、rAAVベクターのITRの1つは、切断されている(例えば、短縮されているかまたは完全長ではない)。いくつかの態様において、切断型ITRは、機能的末端分解部位(trs)を欠き、自己相補的AAVベクター(scAAVベクター)の生成のために使用される。いくつかの態様において、切断型ITRは、例えば、McCarty et al.(2003) *Gene Ther.* 10(26):2112-8に記載のITRである。

40

【0035】

本開示の側面は、野生型AAV ITRと比べて、例えば野生型AAV2 ITR(例えば、配列番号24)と比べて、1つ以上の修飾(例えば、核酸の追加、欠失、置換など)を有するITRを含む、単離された核酸(例えば、rAAVベクター)に関する。一般に野生型ITRは、自己アニーリングして回文構造の二本鎖T型ヘアピン構造(これは、2つのクロスアーム(それ

50

ぞれB/B'およびC/C'と呼ばれる配列によって形成される)、より長いステム領域(配列A/A'によって形成される)、および「D」領域と呼ばれる一本鎖末端領域からなる)を形成する、125ヌクレオチドの領域を含む。一般に、ITRの「D」領域は、A/A'配列によって形成されるステム領域と、rAAVベクターの導入遺伝子を含むインサートの間に配置される(例えば、ITRの末端に対してITRの「内側」に配置されるか、またはrAAVベクターの導入遺伝子インサートもしくは発現コンストラクトの近位に配置される)。「D」領域は、例えば、Ling et al.(2015) J Mol Genet Med 9(3)に開示されるように、カプシドタンパク質によるrAAVベクターのカプシド形成において、重要な役割を果たすことが観察されている。

#### 【0036】

本開示に記載の単離された核酸またはrAAVベクターはさらに、例えば、Francois, et al. 2005. J Virol The Cellular TATA Binding Protein Is Required for Rep-Dependent Replication of a Minimal Adeno-Associated Virus Type 2 p5 Elementに記載のような「TRY」配列を含み得る。いくつかの態様において、TRY配列は、単離された核酸またはrAAVベクターのITR(例えば、5' ITR)と発現コンストラクト(例えば、導入遺伝子をコードするインサート)との間に配置される。

#### 【0037】

いくつかの側面において、本開示は、本開示に記載の単離された核酸またはrAAVベクターを含む、パキウロウイルスベクターに関する。いくつかの態様において、パキウロウイルスベクターは、例えばUrabe et al.(2002) Hum Gene Ther 13(16):1935-43およびSmith et al.(2009) Mol Ther 17(11):1888-1896に記載されるような、Autographa californica核多角体病(AcNPV)ベクターである。

#### 【0038】

いくつかの側面において、本開示は、本明細書に記載の単離された核酸またはベクターを含む、宿主細胞を提供する。宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であり得る。例えば宿主細胞は、哺乳動物細胞、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞などであり得る。いくつかの態様において、宿主細胞は哺乳動物細胞、例えば、HEK293T細胞である。いくつかの態様において、宿主細胞は細菌細胞、例えば大腸菌細胞である。

#### 【0039】

rAAV

いくつかの側面において、本開示は、本明細書に記載の核酸をコードする導入遺伝子を含む、組換えAAV(rAAV)に関する(例えば、本明細書に記載のrAAVベクター)。「rAAV」という用語は一般に、1つ以上のAAVカプシドタンパク質によってカプシド化されたrAAVベクターを含む、ウイルス粒子を指す。本開示に記載のrAAVは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9およびAAV10から選択される血清型を有するカプシドタンパク質を含み得る。いくつかの態様において、rAAVは、非ヒト宿主由来のカプシドタンパク質、例えば、AAVrh.10、AAVrh.39などのアカゲザルAAVカプシドタンパク質を含む。いくつかの態様において、本開示に記載のrAAVは、野生型カプシドタンパク質のパリアントであるカプシドタンパク質を含み、これは例えば、それが由来する野生型AAVカプシドタンパク質に対して、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または10より多く(例えば、15、20、25、50、100など)のアミノ酸置換(例えば、変異)を含む、カプシドタンパク質パリアントである。

#### 【0040】

いくつかの態様において、本開示に記載のrAAVは、特にCSF空間にまたは直接脳実質に導入された場合に、CNSを通して容易に広がる。したがって、いくつかの態様において、本開示に記載のrAAVは、血液脳関門(BBB)を通過することができるカプシドタンパク質を含む。例えば、いくつかの態様において、rAAVは、AAV9またはAAVrh.10血清型を有するカプシドタンパク質を含む。rAAVの生成は、例えば、Samulski et al.(1989) J Virol. 63(9):3822-8およびWright(2009) Hum Gene Ther. 20(7): 698-706に記載されている。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 1 】

いくつかの態様において、本開示に記載のrAAV(例えば、AAVカプシドタンパク質によってカプシド化されてrAAVカプシド粒子を形成する、組換えrAAVゲノムを含むもの)は、バキュロウイルスベクター発現系(BEVS)で生成される。BEVSを使用したrAAVの生成は、例えば以下に記載されている:Urabe et al.(2002) Hum Gene Ther 13(16):1935-43、Smith et al.(2009) Mol Ther 17(11):1888-1896、米国特許第8,945,918号、米国特許第9,879,282号、および国際PCT公開WO 2017/184879。しかしながらrAAVは、任意の適切な方法を使用して(例えば、組換えrepおよびcap遺伝子を使用して)生成され得る。

## 【 0 0 4 2 】

## 医薬組成物

いくつかの側面において、本開示は、本明細書に記載の単離された核酸またはrAAVおよび薬学的に許容し得る担体を含む、医薬組成物を提供する。本明細書で使用する場合、「薬学的に許容し得る」という用語は、化合物の生物活性または特性を無効にせず、また比較的非毒性である、担体または希釈剤などの材料を指し、例えば材料は、望ましくない生物学的影響を引き起こしたり、またはそれが含まれている組成物の任意の成分と有害な様式で相互作用したりすることなく、個体に投与し得る。

## 【 0 0 4 3 】

本明細書で使用する場合、用語「薬学的に許容し得る担体」とは、薬学的に許容し得る材料、組成物または担体、例えば、液体または固体の充填剤、安定剤、分散剤、懸濁剤、希釈剤、賦形剤、増粘剤、溶媒または封入材料などであって、本発明内で有用な化合物をそれが意図する機能を果たすことができるようにペイシェント内にまたはペイシェントに運ぶかまたは輸送することに関連するものを、意味する。本発明の実施において使用される医薬組成物に含まれ得るさらなる成分は、当該分野で知られており、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences(Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA)に記載されている;これは参照により本明細書に組み込まれる。

## 【 0 0 4 4 】

本明細書で提供される組成物(例えば、医薬組成物)は、以下を含む任意の経路で投与することができる:経腸(例えば、経口)、非経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、皮下、脳室内(intraventricular)、経皮、皮内、直腸、膣内、腹腔内、局所的(粉末、軟膏、クリーム、および/または滴剤による)、粘膜、鼻腔、頬側、舌下;気管内注入、気管支注入、および/または吸入;および/または経口スプレー、鼻スプレー、および/またはエアロゾルとして。具体的に企図される経路は、経口投与、静脈内投与(例えば、全身静脈内注射)、血液および/またはリンパ供給による局所投与、および/または罹患部位への直接投与である。一般に、最も適切な投与経路は、様々な因子、例えば薬剤の性質(例えば、胃腸管の環境におけるその安定性)、および/または対象の状態(例えば、対象が経口投与に耐えることができるかどうか)などに依存するであろう。ある態様において、本明細書に記載の化合物または医薬組成物は、対象の眼への局所投与に好適である。

## 【 0 0 4 5 】

## 方法

本開示は部分的に、アルツハイマー病を処置するために一緒に(例として、相乗的に)作用する、対象におけるAD関連遺伝子産物の組み合わせの発現のための組成物に基づく。本明細書で使用される「処置する」または「処置すること」とは、(a)アルツハイマー病の発病を予防または遅延させること;(b)アルツハイマー病の重症度を低減すること;(c)アルツハイマー病に特徴的な症状の発症を低減または予防すること;(d)および/または、アルツハイマー病に特徴的な症状の悪化を予防すること、を指す。アルツハイマー病の症状には、例えば、認知機能障害(例として、認知症、幻覚、記憶喪失など)、運動機能障害(例として、日常のタスクの実施困難など)、ならびに感情的および行動的機能障害が含まれる。

## 【 0 0 4 6 】

10

20

30

40

50

結果的に、いくつかの側面において、本開示は、アルツハイマー病(例として、ADAD)を有するかまたは有すると疑われる対象へ本明細書に記載のとおり組成物(例として、単離された核酸またはベクターまたはrAAVを含む組成物)を投与することを含む方法を提供する。本明細書に使用されるとき、用語「投与すること」または「投与」は、組成物(例として、単離された核酸またはベクターまたはrAAVを含む組成物)を、生理学および/または薬理的に有用である様式で対象へ提供すること(例として、対象においてADなどの状態を処置すること)を意味する。いくつかの側面において、本開示は、アルツハイマー病(例として、ADAD)を有するか有すると疑われる対象を処置するための方法であって、本開示に記載されるとおりの組成物(例として、単離された核酸またはベクターまたはrAAVを含む組成物)を対象へ投与することを含む、該方法を提供する。

10

## 【0047】

いくつかの態様において、本明細書に記載のとおり組成物(例として、単離された核酸またはベクターまたはrAAVを含む組成物)の投与は、軽度の認知機能障害(MIC)の発症遅延をもたらす。軽度の認知機能障害(MIC)は、日常生活のほとんどの活動を独立して実施する能力を維持する対象(例として、ADベシエント)における記憶喪失または他の認知能力の喪失(言葉または視覚/空間知覚など)の初期段階である。いくつかの態様において、本明細書に記載のとおり組成物(例として、単離された核酸またはベクターまたはrAAVを含む組成物)の投与は、本明細書に記載の組成物を投与されない対象と比較して、1月より多く、2月より多く、3月より多く、4月より多く、5月より多く、6月より多く、7月より多く、8月より多く、9月より多く、10月より多く、11月より多く、12月より多く、1年より多く、2年より多く、3年より多く、4年より多く、5年より多く、6年より多く、7年より多く、8年より多く、9年より多く、または10年より多く、軽度の認知機能障害(MIC)の発症遅延をもたらす。いくつかの態様において、本明細書に記載のとおり組成物(例として、単離された核酸またはベクターまたはrAAVを含む組成物)の投与は、本明細書に記載の組成物を投与されていない対象と比較して、1月と3月との間、1月と6月との間、3月と6月との間、3月と9月との間、6月と9月との間、1月と12月との間、6月と12月との間、1年と2年との間、1年と3年との間、1年と4年との間、1年と5年との間、1年と6年との間、1年と7年との間、1年と8年との間、1年と9年との間、1年と10年との間、10年と20年との間、またはそれ以上、軽度の認知機能障害(MIC)の発症遅延をもたらす。

20

30

## 【0048】

対象は、典型的には、哺乳動物、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ブタ、ハムスター、ラット、マウス等である。いくつかの態様において、対象は、ヒトである。いくつかの態様において、対象は、プレセニン1(PSEN1)E280A突然変異アレルによって特徴付けられる。対象は、PSEN1 E280A突然変異アレルについて、ホモ接合(例として、PSEN1 E280A<sup>+/+</sup>)であっても、またはヘテロ接合(例として、PSEN1 E280A<sup>+/-</sup>)であってもよい。いくつかの態様において、プレセニン1(PSEN1)E280A突然変異を有する対象は、APOE3 Christchurch突然変異についてホモ接合ではない(例として、APOE3 R136S<sup>+/-</sup>またはAPOE3 R136S<sup>-/-</sup>)。

いくつかの態様において、対象は、APOE4アレルによって特徴づけられる。対象は、APOE4についてホモ接合(例として、APOE4<sup>+/+</sup>)であっても、またはヘテロ接合(例として、APOE4<sup>+/-</sup>)であってもよい。いくつかの態様において、対象は、APOE4についてヘテロ接合であり、対象の第2のAPOEアレルは、APOE2およびAPOE3から選択される。

40

## 【0049】

いくつかの態様において、組成物は、対象のCNSに直接的に、例えば対象の脳および/または脊髄への直接注射によって、投与される。CNS直接投与法の例には、限定はされないが、脳内注射、脳室内注射、槽内注射、実質内注射、髄腔内注射、および前述の任意の組み合わせが含まれる。いくつかの態様において、対象のCNSへの直接注射は、対象の中脳、線条体および/または大脳皮質における、導入遺伝子発現(例として、第1の遺伝

50

子産物、第2の遺伝子産物、および該当する場合は第3の遺伝子産物の発現)をもたらす。いくつかの態様において、CNSへの直接注入は、対象の脊髄および/またはCSFにおける導入遺伝子発現(例として、第1の遺伝子産物、第2の遺伝子産物、および該当する場合は第3の遺伝子産物の発現)をもたらす。

#### 【0050】

いくつかの態様において、対象のCNSへの直接注射は、対流強化送達(CED)を含む。対流強化送達は、脳の外科的露出および小径カテーテルを脳の標的領域に直接配置し、続いて治療剤(例として、本明細書に記載の組成物またはrAAV)を対象の脳に直接注入することを含む、治療戦略である。CEDは、例えば、Debinski et al.(2009) Expert Rev Neurother. 9(10):1519-27に記載されている。

10

いくつかの態様において、組成物は、例えば末梢注射により、対象の末梢に投与される。末梢注射の例には、皮下注射、静脈内注射、動脈内注射、腹腔内注射、またはこれらの任意の組み合わせが含まれる。いくつかの態様において、末梢注射は、動脈内注射、例えば対象の頸動脈への注射である。

#### 【0051】

いくつかの態様において、本開示に記載の組成物(例えば、単離された核酸またはベクターまたはrAAVを含む組成物)は、対象の末梢および直接的にCNSの両方で投与される。例えば、いくつかの態様において、対象は、動脈内注射(例えば、頸動脈への注射)および実質内注射(例えば、CEDによる実質内注射)によって、組成物を投与される。いくつかの態様において、CNSへの直接注射および末梢注射は同時である(例えば、同時に起こる)。いくつかの態様において、直接注射は、末梢注射の前(例えば、1分から1週間の間、またはそれより前)に行われる。いくつかの態様において、直接注射は、末梢注射の後(例えば、1分から1週間の間、またはその後)に行われる。

20

#### 【0052】

対象に投与される本開示に記載の組成物(例えば、単離された核酸またはベクターまたはrAAVを含む組成物)の量は、投与方法に応じて変化するであろう。例えば、いくつかの態様において、本明細書に記載のrAAVは、対象に、約 $10^9$ ゲノムコピー(GC)/kgと約 $10^{14}$ GC/kgとの間(例えば、約 $10^9$ GC/kg、約 $10^{10}$ GC/kg、約 $10^{11}$ GC/kg、約 $10^{12}$ GC/kg、約 $10^{12}$ GC/kg、または約 $10^{14}$ GC/kg)の力価で投与される。いくつかの態様において、対象は、高力価(例えば、 $>10^{12}$ ゲノムコピーGC/kgのrAAV)を、CSF空間への注射により、または実質内注射により投与される。

30

本開示に記載の組成物(例えば、単離された核酸またはベクターまたはrAAVを含む組成物)は、対象に1回または複数回(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、またはそれ以上)投与され得る。いくつかの態様において、組成物は対象に継続的に(例えば、慢性的に)、例えば注入ポンプを介して、投与される。

#### 【0053】

いくつかの態様において、本明細書に記載の組成物(例として、単離された核酸またはベクターまたはrAAVを含む組成物)は、別の好適な治療剤(例として、ADを処置するための治療剤)と組み合わせて対象に投与され得る。ADを処置するための他の好適な治療剤の非限定例は、アミロイド-抗体(例として、アデュカヌマブ、バピネオズマブおよびソラネズマブ)、ドネペジル、ガラントミン、リバスチグミン、メマンチン、スボレキサント等を包含する。

40

#### 【0054】

例

例1: 常染色体優性遺伝性アルツハイマー病(ADAD)におけるAPOE3 Christchurchホモ接合体の保護的役割

プレセニン1(PSEN1)E280A突然変異は、常染色体優性遺伝性アルツハイマー病(ADAD)を引き起こす。臨床の発病年齢および疾患経過にはいくらかのばらつきはあるものの、PSEN1 E280A突然変異についてのキャリアである患者は、44歳(95%CI、43~45)および49歳(95%CI、49~50)という中央値の年齢で、夫々軽度の認知機能障害(MC

50

1) および認知症を発症する。PSEN1 E280A突然変異を有する対象が、典型的な発病年齢の大体30年後である、70代になるまでMCIを発症しなかったことが発見された。対象の記憶欠損は最近の事象に限られ、および彼女の神経学的検査は正常であった。全ゲノム配列決定により、彼女のPSEN1 E280A突然変異を確認し、およびAPOE3において2コピーの希少なChristchurch(APOEch)突然変異(コドン154に相当する、アミノ酸136でのアルギニン セリン置換)を有することが明らかとなった。PSEN1 E280A突然変異が主要なリスク因子であり、およびAPOE3chホモ接合性が十中八九この対象についての遺伝的修飾因子であることが確認された。これに続く研究において、PSEN1 E280A突然変異を伴う1コピーのAPOE3ch突然変異を持つ対象は、45歳の平均年齢でMCIの発症から保護されなかった。APOE3chホモ接合性が、ADADの臨床的発病を先延ばしにするために必要であることが示唆される(例として、Arboleda-Velasquez et al., Resistance to autosomal dominant Alzheimer's disease in an APOE3 Christchurch homozygote: 症例報告、NATURE MEDICINE, VOL 25, NOVEMBER 2019, p.1680-1683を参照する)。

10

## 【0055】

遅発性アルツハイマー病についての主要な感受性遺伝子であるAPOEは、3つの一般的なアレル(APOE2、APOE3、およびAPOE4)を有する。APOE3は、これまでアルツハイマー病のリスクに関しては中立であると考えられていた。APOE2は、より低いリスクのアルツハイマー病および高齢での認知症の発病に関連し、およびAPOE4のそれぞれの追加のコピーは、より高いリスクおよび若年齢での発病に関連する。

20

## 【0056】

興味深いことに、APOE3chホモ接合体を有する対象は、APOE3chホモ接合体でないPSEN1 E280Aキャリアにおいてよりも、はるかに高いアミロイド- プラーク負荷を示した。高いアミロイド- プラーク負荷に関わらず、彼女のPHFタウ負荷および神経変性の大きさおよび空間広がり比較的制限された。この対象のタウ負荷は、内側側頭部および後頭部に制限され、アルツハイマー病の臨床ステージにおいて特徴的に影響を受ける他の領域は比較的温存されていた。さらに、アルツハイマー病の影響を優先的に受けることが知られている領域において、この対象のグルコースについての脳代謝率を保った。磁気共鳴画像法は、40代でMCIを発症した他のPSEN1 E280Aキャリアと比較して、この対象の脳萎縮が同程度であったことを示した。対象はまた、家族性アルツハイマー病についてのマーカーである、血漿ニューロフィラメント軽鎖(NfL)も低かった。これらの所見は、APOE3chホモ接合体が、高アミロイド- プラーク負荷にも関わらず、タウ病的状態および神経変性を制限することによって保護的役割を誘導することを示唆した。

30

## 【0057】

後に、野生型APOE3タンパク質におけるA 42凝集と比較して、APOE3chタンパク質の存在下では、A 42凝集が低減されることが確認された。APOE3chおよびAPOE2の存在下でのA 42凝集レベルは同様であった。これらの結果は、APOE3chが、A 42凝集をトリガーする能力が低いことを示唆する。

R136S突然変異は、リポタンパク質受容体(LDLR)およびヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)に結合する役割を有することが知られているAPOEの領域に位置する。先の報告は、APOE3と比較して、APOE2およびAPOE3chは、夫々98%および60%のLDLR結合の低減に関連することを示した。HSPGへのAPOEの結合は、HSPGがアミロイド-凝集およびニューロンの細胞外タウの取り込みを促進するのに必要であることが示唆されている。他のAPOEアイソフォームと比較して、APOE3chは最も低いヘパリン結合能を呈し、およびAPOE-HSPG相互作用の抗体ブロックはAPOE3chの保護的効果を再現したことが観察された。

40

## 【0058】

本開示は、少なくとも部分的には、PSEN1 E280A突然変異を有する対象におけるAPOE3chの保護的役割の発見に基づく。PSEN1 E280Aキャリア(例として、APOE3chホモ接合体ではないPSEN1 E280Aキャリア)へのAPOE3chの遺伝子治療送達は、MICの

50

発病を遅延させること、タウ病的状態を低減すること等の利益を与えるだろう。

この例は、APOE Christchurchタンパク質を過剰発現するためのAPOE Christchurchタンパク質をコードする発現コンストラクトを含む単離された核酸(例として、rAAVベクターおよび単離された核酸を含有するrAAVなどのベクター)を記載する。APOE Christchurchタンパク質は、組換えAPOE2 Christchurchタンパク質(APOE2ch)または組換えAPOE3 Christchurchタンパク質(APOE3ch)であり得る。APOE2chおよび/またはAPOE3chをコードする配列は、アイソフォームを問わず、野生型APOEを標的とするshRNAによって認識されないように、細胞中の内在性APOE2配列と十分に異なるようコドン最適化されている。

#### 【0059】

単離された核酸は、1以上のAPOE遺伝子アイソフォーム(例として、APOE4、および/またはAPOE3、および/またはAPOE2)を標的とする阻害性核酸についてのコード配列をさらに包含し得る。いくつかの態様において、この例に記載されるコンストラクトは、PSEN1 E280A突然変異のキャリアである、アルツハイマー病(AD)(例として、常染色体優性遺伝性アルツハイマー病)を有するかまたは有すると疑われる対象を処置するのに有用である。いくつかの態様において、対象は、APOE3 Christchurch突然変異(例として、APOE3 R136S<sup>+/+</sup>)についてホモ接合性ではない。

shRNAをコードする単離された核酸は、in vitroおよびin vivoでAPOE4および/またはAPOE2アイソフォーム、特に両方の発現をロックダウンするのに利用される。いくつかの態様において、shRNAは、非アレル特異的である(例として、それらはまた、他のAPOEアイソフォーム(例として、E2、E3、またはE4)の発現をロックダウンする能力もある)。

#### 【0060】

shRNAおよび導入遺伝子は、同じプロモーターまたは別のプロモーターに作動可能に連結され得る。shRNAは、別のプロモーター、典型的にはPol IIIプロモーター(例として、H1プロモーター)、またはPol IIプロモーター(例としてCBA、T7など)の下で発現する。一般に、shRNAは、コドン最適化されたAPOE2chおよび/またはAPOE3ch導入遺伝子を含むオープンリーディングフレームの上流のイントロン配列に配置されたPol Iプロモーターに作動可能に連結される。

#### 【0061】

単離された核酸を含む組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)は、トリプルプラスミドトランスフェクション用のHEK293細胞などの細胞を使用して生成される。ITR配列は、典型的には、以下:少なくとも1つのプロモーター/エンハンサー要素、3'ポリAシグナル、およびWPRE要素などの翻訳後シグナルの1つ以上を含む発現コンストラクトに隣接する。APOE2chおよび/またはAPOE3chタンパク質および1つ以上の阻害性核酸(例として、APOEのAPOE4および/またはAPOE2アイソフォームを標的とする阻害性核酸)などの複数の遺伝子産物は同時に発現される。発現された遺伝子の上流に効率的にスプライシングされる短いイントロン配列の存在は、発現レベルを改善し得る。shRNAおよび他の調節性RNAは、潜在的にこれらの配列内に含まれ得る。

#### 【0062】

例2: APOE4<sup>+/+</sup>細胞へのウイルス形質導入の細胞ベースアッセイ

細胞は、例えばADAD患者からの線維芽細胞、単球、またはhES細胞、または患者由来の人工多能性幹細胞(iPSC)として取得される。これらの細胞は、アミロイド-タンパク質を含むタンパク質性プラークと、タンパク質タウのねじれた鎖を含むタングルを蓄積する。

#### 【0063】

このような細胞モデルを使用して、ADADに関連する神経変性の特徴は、例えば、アミロイド-抗体または-リン酸化タウ抗体を利用して、プラークやタングルなどのタンパク質凝集体の蓄積の観点から定量化され、続いて蛍光顕微鏡を使用してイメージングされる。アミロイド-、リン酸化タウ、PSEN1 E280A、APOE3、APOE3ch、また

10

20

30

40

50

はAPOE4などのタンパク質マーカーのICCによるADADに関連する神経変性の特徴のイメージングも行われる。ウェスタンブロットティング、ELISA、および/またはqPCRが、これらの細胞におけるAPOE3ch発現レベルを定量するために使用される。

【0064】

治療エンドポイント(例として、ADADに関連する病的状態の低減)は、rAAVの形質導入の発現の文脈において測定され、活性と機能を確認および定量される。アミロイド-およびリン酸化タウのレベルも、ウェスタンブロットティング、ELISA、および/またはqPCRを使用して定量される。

【0065】

例3: ADAD患者の臨床試験

この例は、ADADを有する患者(例として、APOE3chホモ接合体でない、PSEN1 E280Aキャリア)において、本開示によって記載されるrAAVの安全性および有効性を査定するための臨床試験を説明する。

ADADの処置のための本開示のrAAVの臨床試験は、Grabowski et al.(1995) Ann. Intern. Med. 122(1):33-39に記載されているものと同様の研究設計を使用して行われる。rAAVは、CSF中に、実質内に、海馬に、または別の脳領域に、または末梢に送達される。

測定されるエンドポイントは、アミロイド- プラークのレベル、タウタンゲル、運動および認知エンドポイント、ならびにAPOE3ch、APOE4およびAPOE2タンパク質のレベルである。

【0066】

例4: アミロイド- 抗体と組み合わせたADAD患者における臨床試験

この例は、ADADを有する患者(例としてAPOE3chホモ接合体でない、PSEN1 E280Aキャリア)におけるアミロイド- 抗体(例として、パピネオズマブおよびソラネズマブ)と組み合わせて利用される、本開示によって記載されるrAAVの安全性および有効性を査定するための臨床試験を説明する。

ADADの処置のための、抗アミロイド- 抗体と組み合わせた本開示のrAAVの臨床試験は、Grabowski et al.(1995) Ann. Intern. Med. 122(1):33-39に記載されているものと同様の研究設計を使用して行われる。rAAVは、CSFに、実質内に、海馬に、または別の脳領域に、または末梢に送達される。

【0067】

いくつかの態様において、本開示のrAAVは、抗アミロイド- 抗体と相乗作用して、ADAD患者がアミロイド関連画像異常(ARIA)を発症する可能性を低減させ、これはAPOE遺伝子型と高度に相関する。ARIAは、具体的にはヒトモノクローナル抗体によるアミロイド修飾療法に関連する、AD患者に観察される一連の異常である。脳の浮腫を指すARIA-E、および脳微小出血を指すARIA-HのARIAの2種類が存在する。

【0068】

評価されるエンドポイントは、ARIAが発生したかどうかを決定するための処置前後の脳イメージング、ならびに本開示のrAAVがARIAの可能性、アミロイド- プラークのレベル、タウタンゲル、運動および認知エンドポイント、ならびにAPOE3ch、APOE4およびAPOE2タンパク質のレベルを低減するかどうかである。

【0069】

例5: APOE3ch<sup>+/+</sup>、APOE3ch<sup>+/-</sup>、およびAPOE3ch<sup>-/-</sup>であるPSEN1 E280A突然変異を有するADAD患者における臨床試験

この例は、APOE3ch<sup>+/-</sup>またはAPOE3ch<sup>-/-</sup>である患者と比較した、APOE3ch<sup>+/+</sup>ではない、PSEN1 E280A突然変異を有する患者の、脳卒中、冠動脈疾患、アテローム性動脈硬化症、頭部外傷からの回復不良、およびバイパス装置での外科手術からの認知回復を含む、他の病状の増大したリスクの改善における、本開示によって記載されるrAAVの有効性を査定するための臨床試験について説明する。

【0070】

10

20

30

40

50

ADの処置およびAPOE3ch<sup>+/-</sup>、またはAPOE3ch<sup>-/-</sup>であるPSEN1 E280A突然変異を有する患者に関連する他の状態の増大したリスクの改善のための、本開示のrAAVの臨床試験は、Grabowski et al.(1995) Ann. Intern. Med. 122(1):33-39に記載されているものと同様の研究設計を使用して行われる。rAAVは、CSFに、実質内に、海馬に、または別の脳領域に、または末梢に送達される。

本開示のrAAVによる処置の前後に評価されるエンドポイントは、血圧、血中コレステロールおよび血糖レベル、運動および認知エンドポイント、MRI、PET、および冠状動脈の超音波イメージング、認知的外傷(cognitive trauma)からの回復、ならびにバイパス装置での外科手術からの回復である。

【0071】

例6: PSEN1 E280A突然変異の患者キャリアにおけるADADの予防またはADADの処置  
この例は、PSEN1 E280A突然変異を有する対象がADを発症するリスクの低減、およびPSEN1 E280A突然変異を有する患者におけるADの処置における、本開示によって記載されるrAAVの有効性を査定するための臨床試験について説明する。PSEN1 E280A突然変異を有する患者は、APOE3ch<sup>+/-</sup>またはAPOE3ch<sup>-/-</sup>のいずれかであり得る。

【0072】

PSEN1 E280AのキャリアにおけるADの予防または処置のための本開示のrAAVの臨床試験は、Grabowski et al.(1995) Ann. Intern. Med. 122(1):33-39に記載されているものと同様の研究設計を使用して行われる。rAAVは、CSFに、実質内に、海馬に、または別の脳領域に、または末梢に送達される。

本開示のrAAVによる処置の前後に評価されるエンドポイントは、CSFおよび血液中のAPOE3ch、APOE4およびAPOE2のレベル、ならびに認知および運動エンドポイントである。

【0073】

例7: 内在性APOEサイレンシングおよびAPOE Christchurchタンパク質過剰発現に対するshRNAのin vitro検証

APOEに対するユニークなshRNAおよびAPOE Christchurchタンパク質(例として、APOE3chおよび/またはAPOE2ch)のコドン最適化されたコード配列を含有する複数のプラスミドをin vitroトランスフェクションスクリーニングで評価し、APOE(例として、APOE4および/またはAPOE2)ノックダウンとAPOE Christchurchタンパク質(例として、APOE3chおよび/またはAPOE2ch)の異種発現の程度を査定した。プラスミドは、ベクターにコードされたAPOE Christchurchタンパク質(例として、APOE3chおよび/またはAPOE2ch)に影響を与えることなく、内在性APOE遺伝子を選択的にノックダウンするように特別に設計された。複数のプラスミドは、qRT-PCRを介して、内在性APOEの低減およびコドン最適化されたAPOE Christchurchタンパク質(例として、APOE3chおよび/またはAPOE2ch)の発現を示す。shRNA候補は、APOE Christchurchタンパク質(例として、APOE3chおよび/またはAPOE2ch)の発現に影響を与えることなく、内在性APOEの有意な低減を示す。

【0074】

例8: 内在性APOEサイレンシングおよびAPOE Christchurchタンパク質(例として、APOE3chおよび/またはAPOE2ch)過剰発現に対するshRNAのin vivo検証

コドン最適化されたAPOE Christchurchタンパク質コード配列(例として、APOE3chおよび/またはAPOE2chコード配列)に影響を与えない内在性APOEの有意な低減を実証するshRNA候補は、さらなるin vivo研究のために選択される。APOE4ノックイン(KI)マウスモデルは、APOE4に対する候補shRNAのin vivoでの有効性を評価するために使用される。APOE4 KIマウスにおいて、両方のマウスApoeアレルがヒトAPOE-4で置き換えられる。マウス(n=5)は、側脳室内(intracerebroventricular)注射(ICV)を介してAPOE4に対する候補shRNAを運ぶベクターを受け取り、ヒトAPOE4 mRNAの体内分布を注射の60日後に分析する。

【0075】

10

20

30

40

50

均等物

本発明の少なくとも1つの態様のいくつかの側面をこのように説明してきたが、様々な変更、修正、および改善が当業者には容易に思い浮かぶであろうことを理解されたい。かかる変更、修正、および改善は、この開示の一部であることが意図されており、本発明の精神および範囲の内にあることが意図されている。したがって、前述の説明および図面は、例示としてのみのものである。

【0076】

本明細書では本発明のいくつかの態様を説明および図示してきたが、当業者は、本明細書に記載の機能を実行し、および/または結果および/または1つ以上の利点を取得するための、さまざまな他の手段および/または構造を容易に思い浮かべるであろうし、かかる変更および/または修正のそれぞれは、本発明の範囲内であると見なされる。より一般的には、当業者は、本明細書に記載のすべてのパラメータ、寸法、材料、および構成が例示であることを意味し、実際のパラメータ、寸法、材料、および/または構成は、本発明の教示が使用される特定の用途(単数または複数)に依存することを、容易に理解するであろう。当業者は、本明細書に記載される本発明の特定の態様に対する多くの均等物を認識し、または日常的な実験のみを使用して確認することができるであろう。したがって、前述の態様は例としてのみ提示され、添付の特許請求の範囲およびその均等物の範囲内で、本発明は、具体的に記載されおよび特許請求された以外の方法で実施できることを理解されたい。本発明は、本明細書に記載の個々の特徴、システム、物品、材料、および/または方法を対象とする。さらに、2つ以上のかかる特徴、システム、物品、材料、および/または方法の任意の組み合わせは、かかる特徴、システム、物品、材料、および/または方法が相互に矛盾しない場合、本発明の範囲内に含まれる。

10

20

【0077】

本明細書および特許請求の範囲で使用される不定冠詞「a」および「an」は、明確に逆が示されない限り、「少なくとも1つ」を意味すると理解されるべきである。

本明細書および特許請求の範囲で使用される「および/または」という語句は、そのように結合された要素の「いずれかまたは両方」、すなわち、ある場合には結合的に存在し、他の場合には分離的に存在する要素を意味すると理解すべきである。明確に逆が示されない限り、任意に他の要素も、「および/または」節で具体的に識別された要素以外に、具体的に識別された要素に関連するかどうかに関係なく存在し得る。したがって非限定的な例として、「含む」などのオープンエンドの言語と組み合わせて使用される場合の「Aおよび/またはB」への言及は、一態様では、BなしでAを指す(任意にB以外の要素を含む)ことができ;別の態様では、AなしでBを指す(任意にA以外の要素を含む)ことができ;さらに別の態様では、AおよびBの両方を指す(任意に他の要素を含む)ことができる;など。

30

【0078】

本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、「または」は、上記で定義された「および/または」と同じ意味を有すると理解されるべきである。例えば、リスト内の項目を分ける場合、「または」または「および/または」は、包括的、すなわち要素の数またはリストの少なくとも1つを含み、さらにまた複数も含み、および任意にリストされていない追加の項目を含むものとして解釈される。明確に逆の用語が示されている場合、例えば「1つのみ」または「正確に1つ」など、または特許請求の範囲で使用されている場合の「からなる」は、要素の数またはリストの正確に1つを含むことを指す。一般に、本明細書で使用される「または」という用語は、排他性の用語、例えば「いずれか」、「1つ」または「1つのみ」、または「正確に1つ」が先行する場合には、排他的選択肢(すなわち、一方または他方だが、両方ではない)を指すとして解釈されるべきである。特許請求の範囲で使用される場合の「から本質的になる」は、特許法の分野で使用される通常の意味を有するものとする。

40

【0079】

本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、1つ以上の要素のリストに関して「少なくとも1つ」という語句は、要素のリストの任意の1つ以上の要素から選択される少

50

なくとも1つの要素を意味すると理解されたい;ただし、要素のリスト内に具体的にリストされているすべてのそれぞれの要素の少なくとも1つを必ずしも含む必要はなく、要素のリスト内の要素の任意の組み合わせを除外することもない。この定義により、「少なくとも1つ」という句が参照する要素のリスト内で具体的に識別された要素以外の要素が、具体的に識別された要素に関連するかどうかに関係なく、任意に存在可能とされる。したがって、非限定的な例として、「AおよびBの少なくとも1つ」(または、同等に、「AまたはBの少なくとも1つ」、または同等に「Aおよび/またはBの少なくとも1つ」)は、一態様では、少なくとも1つ、任意に複数のAを含み、Bが存在しない(および任意にB以外の要素を含む);別の態様では、少なくとも1つ、任意に複数のBを含み、Aが存在しない(任意にA以外の要素を含む);さらに別の態様では、少なくとも1つ、任意に複数のAを含み、および少なくとも1つ、任意に複数のBを含む(および任意に他の要素を含む);など。

10

【0080】

特許請求の範囲、および上記の明細書において、「含む(comprising)」、「含む(including)」、「保持する(carrying)」、「有する」、「含有する」、「含む(involving)」、「保有する(holding)」などのすべての移行句は、オープンエンドとして、すなわち、限定することなく含むことを意味すると理解されたい。「からなる」および「本質的にからなる」という移行句のみが、米国特許庁の特許審査手続きマニュアルのSection 2111.03に記載されているように、それぞれクローズまたはセミクローズの移行句とする。

「第1」、「第2」、「第3」などの順序を示す用語の、クレーム要素を修飾するためのクレームにおける使用は、それ自体では、あるクレーム要素の他に対する優先権、先行、もしくは順序、または方法の行為が実行される時間的な順序を示すものではなく、しかし、特定の名前を有する一定のクレーム要素を、同じ名前(ただし順序用語のみが異なる)の別の要素から区別するためのラベルとしてのみ使用されて、クレーム要素を区別する。

20

明確に逆が示されない限り、1つ以上のステップまたは行為を含む本明細書で特許請求される任意の方法において、方法のステップまたは行為の順序は必ずしも、方法のステップまたは行為が示されている順序に限定されないことも、理解されるべきである。

【0081】

配列

いくつかの態様において、1つ以上の遺伝子産物(例として、第1、第2および/または第3の遺伝子産物)をコードする発現カセットは、配列番号1~24のいずれか1つで表される配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの態様において、遺伝子産物は、配列番号1~24のいずれか1つで表される配列の一部(例として、フラグメント)によってコードされる。当業者は、阻害性核酸をコードする核酸配列が、全ての「T」が「U」よって置き換えられている配列を記載し得ること、逆もまた同様であることを理解する。

30

【0082】

> ヒトAPOE4核酸配列(配列番号1)

ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTTCCTGGCAGGATGCCAGGCCAA  
GGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGT  
GGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAACTGGCACTGGGTGCTTTTGGGATTACCTGCGC  
TGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTCC  
CCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAAT  
CGGAACTGGAGGAACAACACTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCC  
AAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGCGCGG  
CCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGG  
AGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGGCTCCTCCGC  
GATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGGG  
CGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCTGGTGGAACAGG  
GCCGCGTGCGGGCGGCCACTGTGGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGG  
GCCAGGCCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGAC

40

50

CCGCGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGG  
 AGGAGCAGGCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAG  
 AGCTGGTTTCGAGCCCCTGGTGGAAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCGGGCTGGTGG  
 GAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACCCAGCGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCACT  
 GA

【 0 0 8 3 】

> ヒトAPOE2 核酸配列 (配列番号2)

ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGGATGCCAGGCCAA  
 GGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGT  
 GGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAAGTGGCACTGGGTGCGCTTTTGGGATTACCTGCGC  
 TGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTCAC  
 CCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAAT  
 CGGAACTGGAGGAACAACCTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCC  
 AAGGAGCTGCAGGCCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGG  
 CCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGG  
 AGCTGCGGGTGCGCCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGC  
 GATGCCGATGACCTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGGG  
 CGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCTGGTGGAACAGG  
 GCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGG  
 GCCAGGCCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGAC  
 CCGCGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGG  
 AGGAGCAGGCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAG  
 AGCTGGTTTCGAGCCCCTGGTGGAAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCGGGCTGGTGG  
 GAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACCCAGCGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCACT  
 GA

10

20

【 0 0 8 4 】

> ヒトApoE2 アミノ酸配列 (配列番号3)

MKVLWAALLVTFFLAGCQAKVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYL  
 RWVQTLSEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARL  
 SKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKRL  
 RDADDLQKCLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGLSLAGQPLQER  
 AQAWGERLRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLK  
 SWFEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

30

【 0 0 8 5 】

> ヒトAPOE3 核酸配列 (配列番号4)

AGAGACGACCCGACCCGCTAGAAGACTGGCCAATCACAGGCAGGAAGATGAAGGTT  
 CTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCA  
 AGCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCG  
 GCCAGCGCTGGGAAGTGGCACTGGGTGCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGTGCAG  
 AACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTCACCCAGGAACT  
 GAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACTGG  
 AGGAACAACCTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTG  
 CAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGGCCGCCTGGT  
 GCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGG  
 TCGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGAT  
 GACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGGAGGGCGCCGAGCG  
 CGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCTGGTGGAACAGGGCCCGGTGC  
 GGGCCGCCACTGTGGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCAGGCC  
 TGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGCGACCG  
 CCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAGGAGCAGG

40

50

CCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCC  
 GAGCCCCTGGTGGAAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCA  
 GGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCACTGAACGCCGA  
 AGCCTGCAGCCATGCGACCCACGCCACCCCGTGCCTCCTGCCTCCGCGCAGCCTG  
 CAGCGGGAGACCCTGTCCCCGCCCCAGCCGTCCTCCTGGGGTGGACCCTAGTTTAA  
 TAAAGATTACCAAGTTTTCACGCA

【 0 0 8 6 】

> ヒトApoE3アミノ酸配列(配列番号5)

MKVLWAALLVTFLAGCQAKVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYL  
 RWVQTLSEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARL  
 SKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVSLASHLRKLRKRL  
 RDADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQER  
 AQAWGERLRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLK  
 SWFEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

10

【 0 0 8 7 】

> ヒトApoE3 Christchurch突然変異体アミノ酸配列(配列番号6)

MKVLWAALLVTFLAGCQAKVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYL  
 RWVQTLSEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARL  
 SKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVSLASHLRKLRKRL  
 RDADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQER  
 AQAWGERLRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLK  
 SWFEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

20

【 0 0 8 8 】

> ヒトApoE3 Christchurch突然変異体核酸配列(配列番号7)

ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCTGGCAGGATGCCAGGCCAA  
 GGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGT  
 GGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAACTGGCACTGGGTGCTTTTGGGATTACCTGCGC  
 TGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTCAC  
 CCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAAT  
 CGGAACTGGAGGAACAACCTGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCC  
 AAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGG  
 CCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGG  
 AGCTGCGGGTGAGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGC  
 GATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGGG  
 CGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCCTGGTGGAACAGG  
 GCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGG  
 GCCCAGGCCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGAC  
 CCGCGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGG  
 AGGAGCAGGCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAG  
 AGCTGGTTTCGAGCCCCTGGTGGAAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCGGGGCTGGTGG  
 GAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCACT  
 GA

30

40

【 0 0 8 9 】

> ヒトApoE2 Christchurch突然変異体アミノ酸配列(配列番号8)

MKVLWAALLVTFLAGCQAKVEQAVETEPEPELRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYL  
 RWVQTLSEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRARL  
 SKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVSLASHLRKLRKRL  
 RDADDLQKCLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQER  
 AQAWGERLRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLK  
 SWFEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

50

【 0 0 9 0 】

> ヒトApoE2 Christchurch突然変異体核酸配列(配列番号9)

ATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGGATGCCAGGCCAA  
GGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGT  
GGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAAGTGGCACTGGGTGCTTTTTGGGATTACCTGCGC  
TGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTAC  
CCAGGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAAT  
CGGAACTGGAGGAACAAGTACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCC  
AAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGG  
CCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGG  
AGCTGCGGGTGAAGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGC  
GATGCCGATGACCTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGCGAGGG  
CGCCGAGCGCGGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCTGGTGGAACAGG  
GCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGG  
GCCAGGCCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGAC  
CCGCGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGG  
AGGAGCAGGCCAGCAGATACGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAG  
AGCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGG  
GAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACCAAGCGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCACT  
GA

10

20

【 0 0 9 1 】

> ヒトApoE3 Christchurch突然変異体のコドン最適化された核酸配列(配列番号10)

ATGAAGGTGCTGTGGGCCGCCCTGCTGGTGACCTTCCTGGCCGGCTGCCAGGCCAA  
aGTcGAaCAGGCCGTcGAGACCGAGCCCGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTG  
GCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAGCTGGCCCTGGGCCGCTTCTGGGACTACCTGCGCT  
GGGTGCAGACCCTGAGCGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTGAGCAGCCAGGTGACC  
CAGGAGCTGCGCGCCCTGATGGACGAGACCATGAAaGAaCTcAAaGctTAaAAGAGC  
GAGCTGGAGGAGCAGCTGACCCCGTGGCCGAGGAGACCCGCGCCCGCCTGAGCAA  
GGAGCTGCAGGCCGCCCAGGCCCGCCTGGGGCGCCGACATGGAGGACGTGTGCGGCC  
GCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGAGCACCGAGGAG  
CTGCGCGTGAGCCTGGCCAGCCACCTGCGCAAGCTGCGCAAGCGCCTGCTGCGCGA  
CGCCGACGACCTGCAGAAGCGCCTGGCCGTGTACCAGGCCGGCGCCCGCGAGGGCG  
CCGAGCGCGGCCCTGAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGCCCCCTGGTGGAGCAGGGC  
CGCGTGCAGCGCCGCCACCGTGGGCAGCCTGGCCGGCCAGCCCTGCAGGAGCGCGC  
CCAGGCCTGGGGCGAGCGCCTGCGCGCCCGCATGGAGGAGATGGGCAGCCGCACCC  
GCGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCCGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAG  
GAGCAGGCCAGCAGATCCGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTGAAGAG  
CTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAGGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGCCTGGTGGAGA  
AGGTGCAGGCCCGCGTGGGCACCAAGCGCCGCCCCCGTGCCAGCGACAACCACTAA

30

40

【 0 0 9 2 】

> ヒトApoE2 Christchurch突然変異体のコドン最適化された核酸配列(配列番号11)

ATGAAGGTGCTGTGGGCCGCCCTGCTGGTGACCTTCCTGGCCGGCTGCCAGGCCAA  
aGTcGAaCAGGCCGTcGAGACCGAGCCCGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTG  
GCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAGCTGGCCCTGGGCCGCTTCTGGGACTACCTGCGCT  
GGGTGCAGACCCTGAGCGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTGAGCAGCCAGGTGACC  
CAGGAGCTGCGCGCCCTGATGGACGAGACCATGAAaGAaCTcAAaGctTAaAAGAGC  
GAGCTGGAGGAGCAGCTGACCCCGTGGCCGAGGAGACCCGCGCCCGCCTGAGCAA  
GGAGCTGCAGGCCGCCCAGGCCCGCCTGGGGCGCCGACATGGAGGACGTGTGCGGCC  
GCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGAGCACCGAGGAG  
CTGCGCGTGAGCCTGGCCAGCCACCTGCGCAAGCTGCGCAAGCGCCTGCTGCGCGA

50

CGCCGACGACCTGCAGAAGTGCCTGGCCGTGTACCAGGCCGGCGCCCGCGAGGGCG  
 CCGAGCGCGGCCTGAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGCCCCCTGGTGGAGCAGGGC  
 CGCGTGC GCGCCGCCACCGTGGGCAGCCTGGCCGGCCAGCCCCTGCAGGAGCGCGC  
 CCAGGCCTGGGGCGAGCGCCTGCGCGCCCCGCATGGAGGAGATGGGCAGCCGCACCC  
 GCGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCCGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAG  
 GAGCAGGCCAGCAGATCCGCCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTGAAGAG  
 CTGTTTCGAGCCCCTGGTGGAGGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGCCTGGTGGAGA  
 AGGTGCAGGCCGCGCGTGGGCACCAGCGCCGCCCCCGTGCCCAGCGACAACCACTAA  
 【 0 0 9 3 】

> ApoE shRNA 1 核酸配列 (配列番号 12)

10

TTGTAGGCCTTCAACTCCTTC

> ApoE shRNA 1 核酸配列 (配列番号 13)

GAAGGAGTTGAAGGCCTACAA

> ループを有する ApoE shRNA 1 (配列番号 14)

TTGTAGGCCTTCAACTCCTTCCATCTGTGGCTTCACTGAAGGAGTTGAAGGCCTAC  
AA

【 0 0 9 4 】

> ApoE amiRNA 1 (配列番号 15)

ttgtcatcctcccacggtggccatttgttccatgtgagtgctagtaacaggccttgtgtcctTTGTAG  
 GCCTTCAACTCCTTCCATCTGTGGCTTCACTGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAGacaa  
 cagcatacagccttcagcaagcctcca

20

> ApoE shRNA 2 核酸配列 (配列番号 16)

ctccaccgcttgctccacctt

> ApoE shRNA 2 核酸配列 (配列番号 17)

aagggtggagcaagcgggtggag

【 0 0 9 5 】

> ループを有する ApoE shRNA 2 (配列番号 18)

ctccaccgcttgctccaccttAGTGAAGCCACAGATGaagggtggagcaagcgggtggag

> ApoE amiRNA 2 (配列番号 19)

tggaggcttgctgaaggctgtatgctgttgtcctccaccgcttgctccaccttAGTGAAGCCACAG  
 ATGaagggtggagcaagcgggtggagaggacacaaggcctgttactagcactcacatggaacaaatgg  
 ccaccgtgggaggatgacaa

30

> ApoE shRNA 3 核酸配列 (配列番号 20)

ttttaggccttcaactcc

> ApoE shRNA 3 核酸配列 (配列番号 21)

ggagttgaaggcctacaaa

【 0 0 9 6 】

> ループを有する ApoE shRNA 3 (配列番号 22)

ttttaggccttcaactccAGTGAAGCCACAGATGggagttgaaggcctacaaa

> ApoE amiRNA 3 (配列番号 23)

40

tggaggcttgctgaaggctgtatgctgttgtcctttaggccttcaactccAGTGAAGCCACAGAT  
 Gggagttgaaggcctacaaaaggacacaaggcctgttactagcactcacatggaacaaatggccacc  
 gtgggaggatgacaa

> 野生型 AAV2 ITR 核酸配列 (配列番号 24)

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT  
 GAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT  
 GAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA



【 図 2 - 2 】

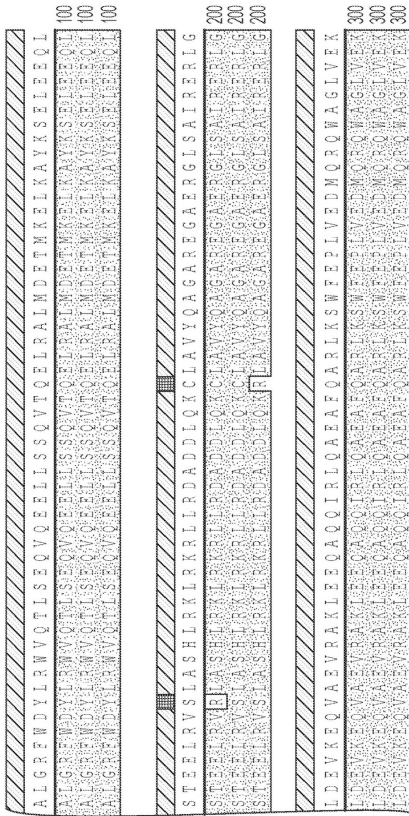


図 2 続き

10

20

30

40

50

【 配列表 】

202355125400001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US21/60731

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
**IPC** - A61P 25/28; C12N 15/79; C12N 15/86; C12N 15/63; A61K 47/62; A61K 47/42; A61K 48/00 (2021.01)  
**CPC** - A61P 25/28; C12N 15/79; C12N 15/86; C12N 15/63; A61K 47/62; A61K 47/42

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

**B. FIELDS SEARCHED**  
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 See Search History document  
 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
 See Search History document  
 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 See Search History document

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2002/0107213 A1 (Verinden, SFF et al.) 08 August 2002; paragraphs [0010], [0017], [0029]-[0032]	1, 2 --- 3, 4
Y	US 2006/0142200 A1 (Zannis, VI et al.) 29 June 2006; paragraphs [0015], [0016]; SEQ ID NOs: 9, 16	3, 4
A	US 2015/0183850 A1 (University of Iowa Research Foundation, et al.) 02 July 2015; entire document	1-4
A	WO 2020/112802 A1 (Prevall Therapeutics, Inc.) 04 June 2020; entire document	1-4

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "D" document cited by the applicant in the international application  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
24 March 2022 (24.03.2022)

Date of mailing of the international search report  
**APR 07 2022**

Name and mailing address of the ISA/US  
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450  
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer  
Shane Thomas  
Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/60731

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

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

10

a.  forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

20

3. Additional comments:

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US21/60731

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 10
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3.  Claims Nos.: 8-38  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
\*\*\* Please See Supplemental Page-\*\*\*.

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 30
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Groups I+, Claims 1-7 and APOE2 (APOE Christchurch protein), SEQ ID NO: 8 (APOE Christchurch protein sequence), SEQ ID NO: 9 (APOE Christchurch nucleic acid sequence) 40

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US21/60731

----Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking----

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-7 and APOE2 (APOE Christchurch protein), SEQ ID NO: 8 (APOE Christchurch protein sequence), SEQ ID NO: 9 (APOE Christchurch nucleic acid sequence) are directed towards isolated nucleic acids comprising an expression construct encoding an APOE Christchurch protein.

10

The isolated nucleic acids of Claims 1-4 are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass APOE2 (first exemplary APOE Christchurch protein), SEQ ID NO: 8 (first exemplary APOE Christchurch protein sequence), SEQ ID NO: 9 (first exemplary APOE Christchurch nucleic acid sequence).

Applicant is invited to elect additional APOE Christchurch protein(s), APOE Christchurch protein sequence(s), and APOE Christchurch nucleic acid sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO., such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional APOE Christchurch protein(s), APOE Christchurch protein sequence(s), and APOE Christchurch nucleic acid sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected APOE Christchurch protein(s), APOE Christchurch protein sequence(s), and APOE Christchurch nucleic acid sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be APOE3 (APOE Christchurch protein), SEQ ID NO: 6 (APOE Christchurch protein sequence), and SEQ ID NO: 7 (APOE Christchurch nucleic acid sequence).

No technical features are shared between the APOE Christchurch protein sequences and APOE Christchurch nucleic acid sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

20

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: an isolated nucleic acid comprising an expression construct comprising a nucleic acid encoding an APOE Christchurch protein; these shared technical features are previously disclosed by Wo 2013/172964 A1 (UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION) (hereinafter 'IOWA') in view of the online publication entitled 'Can an ApoE Mutation Halt Alzheimer's Disease?' to ALZFORUM NETWORKING FOR A CURE (hereinafter 'ALZFORUM').

IOWA disclose an isolated nucleic acid comprising an expression construct comprising a nucleic acid encoding an APOE protein (a vector comprising a nucleic acid encoding a protective ApoE isoform which infects cells so that the ApoE protein is secreted by the cell; page 2, lines 17-26). IOWA does not disclose an APOE Christchurch protein. ALZFORUM discloses an APOE Christchurch protein (an ApoE Christchurch protein; page 1, first-second paragraphs). It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have modified the expression construct comprising a nucleic acid encoding an APOE protein, as previously disclosed by IOWA, with an APOE Christchurch protein, as previously disclosed by ALZFORUM, for a superior expression construct which provides the benefit of encoding an APOE protein which is protective against Alzheimer's Disease (ALZFORUM reference; page 1, first-second paragraphs).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the IOWA and ALZFORUM references, unity of invention is lacking.

30

40

## フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N  
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,  
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K  
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N  
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,  
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

1 0、ニューヨーク、ブロードウェイ 1 1 0 7、アパートメント 1 5 エー

- (72)発明者 カマラカラン, シタルザン  
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 1 6、ニューヨーク、イースト 2 9 ス ストリート 4 3  
0、スイート 9 4 0、ケア オブ プリベイル セラピューティクス, インコーポレーテッド
- (72)発明者 シャイキンド, ベンジャミン  
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 1 6、ニューヨーク、イースト 2 9 ス ストリート 4 3  
0、スイート 9 4 0、ケア オブ プリベイル セラピューティクス, インコーポレーテッド
- (72)発明者 シュワルツ, エドモンド, シー .  
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 1 6、ニューヨーク、イースト 2 9 ス ストリート 4 3  
0、スイート 9 4 0、ケア オブ プリベイル セラピューティクス, インコーポレーテッド
- (72)発明者 セン, アニンディヤ, クマル  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 5 1、リビア、オーシャン アヴェニュー 3 8 2、  
# 1 3 0 8

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA93X AA95X AB01 BA02 CA24 CA44  
4C084 AA13 MA66 NA13 NA14 ZA16  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 MA66 NA13 NA14  
ZA16  
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA66 NA13 NA14 ZA16