

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-522402

(P2023-522402A)

(43)公表日 令和5年5月30日(2023.5.30)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6876	Z Z N A 4 C 0 7 6
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686	Z 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/88 (2006.01)	C 1 2 N 15/88	Z 4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全126頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 特願2022-564255(P2022-564255)	(71)出願人 521564467
(86)(22)出願日 令和3年4月23日(2021.4.23)	バイオーケストラ カンパニー, リミテッド
(85)翻訳文提出日 令和4年12月20日(2022.12.20)	大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン, ユソ
(86)国際出願番号 PCT/IB2021/053353	ンーグ, クァハクーロ, 1 2 5, ク
(87)国際公開番号 WO2021/214720	リップ, ベンチャーードン, 2 エフ
(87)国際公開日 令和3年10月28日(2021.10.28)	2 1 6
(31)優先権主張番号 63/014,633	(74)代理人 100078282
(32)優先日 令和2年4月23日(2020.4.23)	弁理士 山本 秀策
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	(74)代理人 100113413
(31)優先権主張番号 63/047,206	弁理士 森下 夏樹
(32)優先日 令和2年7月1日(2020.7.1)	(74)代理人 100181674
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	弁理士 飯田 貴敏
(31)優先権主張番号 63/064,305	(74)代理人 100181641
最終頁に続く	弁理士 石川 大輔
	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 M I R - 4 8 5 - 3 P の発現を用いた診断方法

(57)【要約】

本開示は、認知障害に罹患した対象を特定するためのm i R - 4 8 5 - 3 p 発現の使用に関する。いくつかの態様では、本明細書に開示される方法は、対象にm i R - 4 8 5 - 3 p 阻害剤を投与することをさらに含み、m i R - 4 8 5 - 3 p 阻害剤は認知障害を治療することができる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

認知障害に罹患したヒト対象を特定する方法であって、前記対象の上皮細胞または血清に由来する生体試料中の $miR-485-3p$ のレベルを測定することを含む、前記方法。

【請求項 2】

前記生体試料が、細胞外小胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

認知障害に罹患した対象を特定する方法であって、前記対象から得られた生体試料中の $miR-485-3p$ のレベルを測定することを含み、前記生体試料が細胞外小胞を含む、前記方法。

10

【請求項 4】

前記細胞外小胞が、前記対象の上皮細胞から得られる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記上皮細胞が、口腔粘膜上皮細胞である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞外小胞が、前記対象の血清から得られる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記細胞外小胞が、微小小胞を含む、請求項 2 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記細胞外小胞が、エクソソームを含む、請求項 2 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記対象の前記 $miR-485-3p$ のレベルが参照レベル（例えば、認知障害を有さない対象における $miR-485-3p$ の発現レベル、または前記対象における認知障害を有する前の $miR-485-3p$ 発現レベル）と比較して増加している、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記対象における前記 $miR-485-3p$ のレベルが、前記参照レベルと比較して、少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 100 %、少なくとも約 125 %、少なくとも約 150 %、少なくとも約 175 %、少なくとも約 200 %、少なくとも約 225 %、少なくとも約 250 %、少なくとも約 275 %、または少なくとも約 300 % 以上増加している、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記認知障害を治療するための治療薬を投与することをさらに含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

認知障害を治療する必要があるヒト対象の認知障害を治療する方法であって、ヒト対象の上皮細胞または血清に由来する生体試料中の $miR-485-3p$ のレベルが、参照レベル（例えば、認知障害を有さない対象における $miR-485-3p$ の発現レベルまたは前記対象における認知障害を有する前の $miR-485-3p$ レベル）と比較して増加しているものとして特定された前記対象に前記認知障害を治療するための治療薬を投与することを含む、方法。

40

【請求項 13】

前記生体試料が、細胞外小胞である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記細胞外小胞が、前記対象の上皮細胞から得られる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

50

前記上皮細胞が、口腔粘膜上皮細胞である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記細胞外小胞が、前記対象の血清から得られる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記細胞外小胞が、微小小胞を含む、請求項 13～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記細胞外小胞が、エクソソームを含む、請求項 13～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記生体試料中の $miR-485-3p$ のレベルが、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) アッセイを用いて測定される、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 20】

前記 PCR アッセイが、リアルタイム PCR を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記測定することが、 $miR-485-3p$ のサイクル閾値 (Ct) 値を決定することを含む、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記対象に関するさらなる因子を測定することをさらに含み、前記さらなる因子が、年齢、性別、教育年数 (EDU)、アポリポタンパク質 E (APOE) 遺伝子型、精神状態短時間検査 (MMSE) スコア、またはこれらの任意の組み合わせから選択される、請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 23】

前記さらなる因子が、性別及び教育年数である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記さらなる因子が、性別である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記性別が男性または女性を含み、男性が値 1 に関連付けられ、女性が値 2 に関連付けられる、請求項 22～24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

前記 APOE 遺伝子型が、(i) 値 1 に関連付けられた $E2/E3$ 、(ii) 値 1 に関連付けられた $E3/E3$ 、(iii) 値 2 に関連付けられた $E2/E4$ 、(iv) 値 2 に関連付けられた $E3/E4$ 、または (v) $E4/E4$ を含む、請求項 22～25 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 27】

前記教育年数が、0～16 の間の値を含む、請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

下式：

$(\text{ナイーブ Ct} \times (\text{性別} \times V1_{\text{性別}} + V2_{\text{性別}})) \times (\text{教育年数} \times V1_{\text{EDU}} + V2_{\text{EDU}})$ 、

(式中、 $V1$ 及び $V2$ は、前記特定のさらなる因子に関連付けられた回帰係数値である。) を用いて前記対象の診断スコアを計算することをさらに含む、請求項 22～27 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 29】

下式：

$(\text{ナイーブ CT} \times (\text{年齢} \times V1_{\text{年齢}} + V2_{\text{年齢}})) \times (\text{性別} \times V1_{\text{性別}} + V2_{\text{性別}}) \times (APOE \times V1_{APOE} + V2_{APOE}) \times (MMSE \times V1_{MMSE} + V2_{MMSE}) \times (\text{教育年数} \times V1_{EDU} + V2_{EDU})$ 、

(式中、 $V1$ 及び $V2$ は、前記特定のさらなる因子に関連付けられた回帰係数値である。) を用いて前記対象の診断スコアを計算することをさらに含む、請求項 22～27 のい 50

れか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

以下の式：

(ナイプ C T × (性別 × V 1 性別 + V 2 性別)) 、

(式中、V 1 及び V 2 は、前記特定のさらなる因子に関連付けられた回帰係数値である。

) を用いて前記対象の診断スコアを計算することをさらに含む、請求項 22～27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

前記測定することが、1 つ以上の m i R - 4 8 5 - 3 p プライマーを使用して前記生体試料中に存在する前記 m i R - 4 8 5 - 3 p を増幅することを含む、請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 32】

認知障害に罹患した対象における m i R - 4 8 5 - 3 p のレベルを決定する方法であって、1 つ以上の m i R - 4 8 5 - 3 p プライマーを用いて前記生体試料中に存在する前記 m i R - 4 8 5 - 3 p を増幅することにより、前記対象から得られた生体試料中の m i R - 4 8 5 - 3 p のレベルが参照レベル（例えば、認知障害を有さない対象における m i R - 4 8 5 - 3 p の発現レベルまたは前記対象における認知障害を有する前の m i R - 4 8 5 - 3 p レベル）と比較して増加しているかどうかを検出することを含む、前記方法。

【請求項 33】

前記対象における前記 m i R - 4 8 5 - 3 p のレベルが、前記参照レベルと比較して、少なくとも少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 100 %、少なくとも約 125 %、少なくとも約 150 %、少なくとも約 175 %、少なくとも約 200 %、少なくとも約 225 %、少なくとも約 250 %、少なくとも約 275 %、または少なくとも約 300 % 以上増加している、請求項 32 に記載の方法。

20

【請求項 34】

前記生体試料が、組織、細胞、血液、血清、唾液、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 32 または 33 に記載の方法。

30

【請求項 35】

前記生体試料が、細胞外小胞を含む、請求項 32～34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 36】

前記細胞外小胞が、前記対象の上皮細胞から得られる、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記上皮細胞が、口腔粘膜上皮細胞である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記細胞外小胞が、前記対象の血清から得られる、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 39】

前記細胞外小胞が、微小小胞を含む、請求項 35～38 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 40】

前記細胞外小胞が、エクソソームを含む、請求項 35～38 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 41】

前記 m i R - 4 8 5 - 3 p プライマーが、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 1 (G T C A T A C A C G G C T C T C C T C T C T) (配列番号 9 4)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 2 (T C A T A C A C G G C T C T C C T C T C) (配列番号 9 5)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 3 (C A T A C A C G G C T C T C C T C T C) (配列番号 9 6)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 4 (C A T A C A C G G C T C T C C T C T C T A) (配列番号 9 7)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 5 (C A T A C A C G G C T C T C G T C T C) (配列

50

、少なくとも14ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも16ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも18ヌクレオチド、少なくとも19ヌクレオチド、または少なくとも20ヌクレオチドを含む、請求項47または48に記載の方法。

【請求項50】

前記miR-485-3p阻害剤が、5'-UGUAUGA-3'（配列番号2）、5'-GUGUAUGA-3'（配列番号3）、5'-CGUGUAUGA-3'（配列番号4）、5'-CCGUGUAUGA-3'（配列番号5）、5'-GCCGUGUAUGA-3'（配列番号6）、5'-AGCCGUGUAUGA-3'（配列番号7）、5'-GAGCCGUGUAUGA-3'（配列番号8）、5'-AGAGCCGUGUAUGA-3'（配列番号9）、5'-GAGAGCCGUGUAUGA-3'（配列番号10）、5'-GGAGAGCCGUGUAUGA-3'（配列番号11）、5'-AGGAGAGCCGUGUAUGA-3'（配列番号12）、5'-GAGGAGAGCCGUGUAUGA-3'（配列番号13）、5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGA-3'（配列番号14）、5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGA-3'（配列番号15）、5'-UGUAUGAC-3'（配列番号16）、5'-GUGUAUGAC-3'（配列番号17）、5'-CGUGUAUGAC-3'（配列番号18）、5'-CCGUGUAUGAC-3'（配列番号19）、5'-GCCGUGUAUGAC-3'（配列番号20）、5'-AGCCGUGUAUGAC-3'（配列番号21）、5'-GAGCCGUGUAUGAC-3'（配列番号22）、5'-AGAGCCGUGUAUGAC-3'（配列番号23）、5'-GAGAGCCGUGUAUGAC-3'（配列番号24）、5'-GGAGAGCCGUGUAUGAC-3'（配列番号25）、5'-AGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'（配列番号26）、5'-GAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'（配列番号27）、5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'（配列番号28）、5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'（配列番号29）、及びAGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC（配列番号30）からなる群から選択される配列を含む、請求項47～49のいずれか1項に記載の方法。

【請求項51】

前記miRNA阻害剤が、5'-TGTAATGA-3'（配列番号62）、5'-GTGTATGA-3'（配列番号63）、5'-CGTGTATGA-3'（配列番号64）、5'-CCGTGTATGA-3'（配列番号65）、5'-GCCGTGTATGA-3'（配列番号66）、5'-AGCCGTGTATGA-3'（配列番号67）、5'-GAGCCGTGTATGA-3'（配列番号68）、5'-AGAGCCGTGTATGA-3'（配列番号69）、5'-GAGAGCCGTGTATGA-3'（配列番号70）、5'-GGAGAGCCGTGTATGA-3'（配列番号71）、5'-AGGAGAGCCGTGTATGA-3'（配列番号72）、5'-GAGGAGAGCCGTGTATGA-3'（配列番号73）、5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGA-3'（配列番号74）、5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGA-3'（配列番号75）、5'-TGTAATGAC-3'（配列番号76）、5'-GTGTATGAC-3'（配列番号77）、5'-CGTGTATGAC-3'（配列番号78）、5'-CCGTGTATGAC-3'（配列番号79）、5'-GCCGTGTATGAC-3'（配列番号80）、5'-AGCCGTGTATGAC-3'（配列番号81）、5'-GAGCCGTGTATGAC-3'（配列番号82）、5'-AGAGCCGTGTATGAC-3'（配列番号83）、5'-GAGAGCCGTGTATGAC-3'（配列番号84）、5'-GGAGAGCCGTGTATGAC-3'（配列番号85）、5'-AGGAGAGCCGTGTATGAC-3'（配列番号86）、5'-GAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'（配列番号87）、5'-AGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'（配列番号88）、5'-GAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'（配列番号89）、及び5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'（配列番号90）からなる群から選択される配列を有する、請求項47～49のいずれか1項に記載の方法

。

【請求項 5 2】

前記 $m i R-485-3 p$ 阻害剤が、 $5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'$ （配列番号 30）または $5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'$ （配列番号 90）と、少なくとも約 50%、少なくとも約 55%、少なくとも約 60%、少なくとも約 65%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、または少なくとも約 95% 同一であるヌクレオチド配列を含む、請求項 47～49 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記 $m i R-485-3 p$ 阻害剤が、 $5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'$ （配列番号 30）または $5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'$ （配列番号 90）と少なくとも 90% の同一であるヌクレオチド配列を含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記 $m i R-485-3 p$ 阻害剤が、1 個の置換または 2 個の置換を有する前記ヌクレオチド配列 $5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'$ （配列番号 30）または $5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'$ （配列番号 90）を含む、請求項 5 2 または 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記 $m i R-485-3 p$ 阻害剤が、前記ヌクレオチド配列 $5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'$ （配列番号 30）または $5'-AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC-3'$ （配列番号 90）を含む、請求項 5 2 または 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記 $m i R-485-3 p$ 阻害剤が、前記ヌクレオチド配列 $5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'$ （配列番号 30）を含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記 $m i R-485-3 p$ 阻害剤が、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドを含む、請求項 47～56 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドが、ロックド核酸（LNA）、アンロックド核酸（UNA）、アラビノ核酸（ABA）、架橋核酸（BNA）、またはペプチド核酸（PNA）を含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記 $m i R-485-3 p$ 阻害剤が骨格修飾を含む、請求項 47～57 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記骨格修飾が、ホスホロジアミダイトモルホリノオリゴマー（PMO）及び／またはホスホロチオエート（PS）修飾を含む、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記 $m i R-485-3 p$ 阻害剤がウイルスベクターによって送達される、請求項 47～60 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記ウイルスベクターが、AAV、アデノウイルス、レトロウイルス、またはレンチウイルスである、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記ウイルスベクターが、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、またはこれらの任意の組み合わせの血清型を有する AAV である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

10

20

30

40

50

前記 $m i R - 485 - 3 p$ 阻害剤が、送達剤によって送達される、請求項 47～60 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 65】

前記送達剤が、ミセル、エクソーム、脂質ナノ粒子、細胞外小胞、合成小胞、リポイド、リボソーム、リボプレックス、ポリマー化合物、ペプチド、タンパク質、細胞、ナノ粒子模倣体、ナノチューブ、コンジュゲート、またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

前記送達剤が、

$[WP] - L1 - [CC] - L2 - [AM]$ (式 I)

10

または

$[WP] - L1 - [AM] - L2 - [CC]$ (式 II)

(式中、

WP は、水溶性ポリマー部分であり、

CC は、カチオン性キャリア部分であり、

AM は、アジュバント部分であり、

L1 及び L2 は、独立して任意選択のリンカーである) を有するカチオン性キャリアユニットを含む、請求項 64 または 65 に記載の方法。

【請求項 67】

前記 $m i R N A$ 阻害剤と前記カチオン性キャリアユニットとが、互いに混合される際に互いに結合してミセルを形成することができる、請求項 66 に記載の方法。

20

【請求項 68】

前記結合が共有結合である、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

前記結合が非共有結合である、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 70】

前記非共有結合がイオン結合を含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

前記水溶性ポリマー部分が、ポリ(アルキレングリコール)、ポリ(オキシエチル化ポリオール)、ポリ(オレフィンアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(ヒドロキシアルキルメタクリルアミド)、ポリ(ヒドロキシアルキルメタクリレート)、ポリ(サッカライド)、ポリ(α -ヒドロキシ酸)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリグリセロール、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン(「POZ」)、ポリ(N-アクリロイルモルホリン)、またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項 66～70 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 72】

前記水溶性ポリマー部分が、ポリエチレングリコール(「PEG」)、ポリグリセロール、またはポリ(プロピレングリコール)(「PPG」)を含む、請求項 66～71 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 73】

40

前記水溶性ポリマー部分が、

【化 13】



, (式 I),

(式中、n は、1～1000 である)

を含む、請求項 66～72 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 7 4】

前記 n が、少なくとも約 1 1 0、少なくとも約 1 1 1、少なくとも約 1 1 2、少なくとも約 1 1 3、少なくとも約 1 1 4、少なくとも約 1 1 5、少なくとも約 1 1 6、少なくとも約 1 1 7、少なくとも約 1 1 8、少なくとも約 1 1 9、少なくとも約 1 2 0、少なくとも約 1 2 1、少なくとも約 1 2 2、少なくとも約 1 2 3、少なくとも約 1 2 4、少なくとも約 1 2 5、少なくとも約 1 2 6、少なくとも約 1 2 7、少なくとも約 1 2 8、少なくとも約 1 2 9、少なくとも約 1 3 0、少なくとも約 1 3 1、少なくとも約 1 3 2、少なくとも約 1 3 3、少なくとも約 1 3 4、少なくとも約 1 3 5、少なくとも約 1 3 6、少なくとも約 1 3 7、少なくとも約 1 3 8、少なくとも約 1 3 9、少なくとも約 1 4 0、または少なくとも約 1 4 1 である、請求項 7 3 に記載の方法。

10

【請求項 7 5】

前記 n が、約 8 0 ～約 9 0、約 9 0 ～約 1 0 0、約 1 0 0 ～約 1 1 0、約 1 1 0 ～約 1 2 0、約 1 2 0 ～約 1 3 0、約 1 4 0 ～約 1 5 0、約 1 5 0 ～約 1 6 0 である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記水溶性ポリマー部分が、直鎖状、分枝鎖状、または樹枝状である、請求項 6 6 ～7 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記カチオン性キャリア部分が、1 つ以上の塩基性アミノ酸を含む、請求項 6 6 ～7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7 8】

前記カチオン性キャリア部分が、少なくとも約 3 個、少なくとも約 4 個、少なくとも約 5 個、少なくとも約 6 個、少なくとも約 7 個、少なくとも約 8 個、少なくとも約 9 個、少なくとも約 1 0 個、少なくとも約 1 1 個、少なくとも約 1 2 個、少なくとも約 1 3 個、少なくとも約 1 4 個、少なくとも約 1 5 個、少なくとも約 1 6 個、少なくとも約 1 7 個、少なくとも約 1 8 個、少なくとも約 1 9 個、少なくとも約 2 0 個、少なくとも約 2 1 個、少なくとも約 2 2 個、少なくとも約 2 3 個、少なくとも約 2 4 個、少なくとも約 2 5 個、少なくとも約 2 6 個、少なくとも約 2 7 個、少なくとも約 2 8 個、少なくとも約 2 9 個、少なくとも約 3 0 個、少なくとも約 3 1 個、少なくとも約 3 2 個、少なくとも約 3 3 個、少なくとも約 3 4 個、少なくとも約 3 5 個、少なくとも約 3 6 個、少なくとも約 3 7 個、少なくとも約 3 8 個、少なくとも約 3 9 個、少なくとも約 4 0 個、少なくとも約 4 1 個、少なくとも約 4 2 個、少なくとも約 4 3 個、少なくとも約 4 4 個、少なくとも約 4 5 個、少なくとも約 4 6 個、少なくとも約 4 7 個、少なくとも約 4 8 個、少なくとも約 4 9 個、または少なくとも約 5 0 個の塩基性アミノ酸を含む、請求項 7 7 に記載の方法。

30

【請求項 7 9】

前記カチオン性キャリア部分が、約 3 0 個～約 5 0 個の塩基性アミノ酸を含む、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記塩基性アミノ酸が、アルギニン、リシン、ヒスチジン、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 7 7 ～7 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 8 1】

前記カチオン性キャリア部分が、約 4 0 個のリシンモノマーを含む、請求項 7 7 ～8 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記アジュバント部分が、免疫反応、炎症反応、及び／または組織微小環境を調節することができる、請求項 6 6 ～8 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

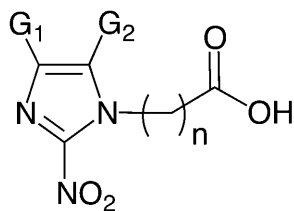
【請求項 8 3】

前記アジュバント部分が、イミダゾール誘導体、アミノ酸、ビタミン、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 6 6 ～8 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 4】

50

前記アジュバント部分が、下式：
【化 1 4】



, (式 I I),

10

(式中、G 1 及び G 2 のそれぞれは、H、芳香環、もしくは 1 ～ 1 0 アルキルであるか、または G 1 と G 2 はともに芳香環を形成し、n は 1 ～ 1 0 である)
を有する、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記アジュバント部分がニトロイミダゾールを含む、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記アジュバント部分が、メトロニダゾール、チニダゾール、ニモラゾール、ジメトリダゾール、プレトマニド、オルニダゾール、メガゾール、アザニダゾール、ベンズニダゾール、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 7】

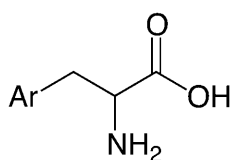
前記アジュバント部分が、アミノ酸を含む、請求項 6 6 ～ 8 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 8 8】

前記アジュバント部分が、下式：

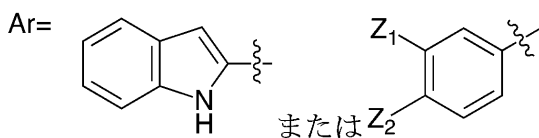
【化 1 5】



(式 I I I),

30

(式中、A r は、
【化 1 6】



40

であり、
Z 1 及び Z 2 のそれぞれは、H または O H である)
を有する、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記アジュバント部分が、ビタミンを含む、請求項 6 6 ～ 8 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 0】

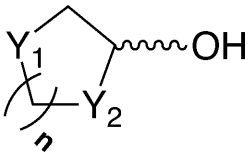
前記ビタミンが、環式環または環式ヘテロ原子環及びカルボキシル基またはヒドロキシル基を含む、請求項 8 9 に記載の方法。

50

【請求項 9 1】

前記ビタミンが、下式：

【化 1 7】



(式 I V) ,

10

(式中、Y 1 及び Y 2 のそれぞれは、C、N、O、または S であり、n は 1 または 2 である)

を有する、請求項 8 9 または 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記ビタミンが、ビタミン A、ビタミン B 1、ビタミン B 2、ビタミン B 3、ビタミン B 6、ビタミン B 7、ビタミン B 9、ビタミン B 1 2、ビタミン C、ビタミン D 2、ビタミン D 3、ビタミン E、ビタミン M、ビタミン H、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項 8 9 ～ 9 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記ビタミンが、ビタミン B 3 である、請求項 9 2 に記載の方法。

20

【請求項 9 4】

前記アジュバント部分が、少なくとも約 2 個、少なくとも約 3 個、少なくとも約 4 個、少なくとも約 5 個、少なくとも約 6 個、少なくとも約 7 個、少なくとも約 8 個、少なくとも約 9 個、少なくとも約 1 0 個、少なくとも約 1 1 個、少なくとも約 1 2 個、少なくとも約 1 3 個、少なくとも約 1 4 個、少なくとも約 1 5 個、少なくとも約 1 6 個、少なくとも約 1 7 個、少なくとも約 1 8 個、少なくとも約 1 9 個、または少なくとも約 2 0 個のビタミン B 3 を含む、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記アジュバント部分が、約 1 0 個のビタミン B 3 を含む、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 6】

約 1 2 0 個～約 1 3 0 個の P E G ユニットを有する水溶性バイオポリマー部分と、約 3 0 個～約 4 0 個のリシンを有するポリリシンを含むカチオン性キャリア部分と、約 5 個～約 1 0 個のビタミン B 3 を有するアジュバント部分と、を含む、請求項 6 4 ～ 9 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 9 7】

前記送達剤が、前記 m i R - 4 8 5 - 3 p 阻害剤と結合されることでミセルを形成する、請求項 6 4 ～ 9 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記結合が、共有結合、非共有結合、またはイオン結合である、請求項 9 7 に記載の方法。

40

【請求項 9 9】

前記ミセル中の前記カチオン性キャリアユニットと前記 m i R - 4 8 5 - 3 p 阻害剤とが、前記カチオン性キャリアユニットの正電荷と前記 m i R - 4 8 5 - 3 p 阻害剤の負電荷とのイオン比が約 1 : 1 となるように溶液中で混合される、請求項 9 7 または 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記カチオン性キャリアユニットが、酵素分解から前記 m i R - 4 8 5 - 3 p 阻害剤を保護することができる、請求項 6 6 ～ 9 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記認知障害が、前記対象の中枢神経系 (C N S) の領域内のアミロイドベータ蓄積の

50

増加に関連している、請求項 1 ～ 1 0 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記 CNS の前記領域が脳を含む、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

前記認知障害がアルツハイマー病を含む、請求項 1 ～ 1 0 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

miR-485-3p__FW1 (GTCATACACGGCTCTCCTCTCT) (配列番号 94)、miR-485-3p__FW2 (TCATACACGGCTCTCCTCTC) (配列番号 95)、miR-485-3p__FW3 (CATACACGGCTCTCCTCTCTC) (配列番号 96)、miR-485-3p__FW4 (CATACACGGCTCTCCTCTCTCTA) (配列番号 97)、miR-485-3p__FW5 (CATACACGGCTCTCTCGTCTCTC) (配列番号 98)、miR-485-3p__FW6 (CATACACGGCTCTCTCGTCTCTCTAA) (配列番号 99)、miR-485-3p__FW7 (GTCATACACGGCTCTCTCCTCTCTCTAA) (配列番号 100)、miR-485-3p__FW8 (GTCATACACGGCTCTCTCCTCTC) (配列番号 101)、miR-485-3p__FW9 (CATACACGGCTCTCTCCTCTCTCTAA) (配列番号 52)、miR-485-3p__FW10 (GTCATACACGGCTCTCTCCTCTCTG) (配列番号 102)、miR-485-3p__FW11 (TCATACACGGCTCTCTCCTCTCTCT) (配列番号 103)、miR-485-3p__FW12 (TCATACACGGCTCTCTCCTCTC) (配列番号 104)、miR-485-3p__FW13 (TCATACACGGCTCTCTCCTCTCTCTCTAA) (配列番号 105)、miR-485-3p__FW14 (CATACACGGCTCTCTCCTCTCTCTCTAA) (配列番号 106)、miR-485-3p__FW15 (ATACACGGCTCTCTCCTCTCTCTCTAA) (配列番号 107)、またはこれらの任意の組み合わせを含む miR-485-3p プライマーを含む、組成物。

【請求項 1 0 5】

前記 miR-485-3p プライマーが、miR-485-3p__FW7 を含む、請求項 1 0 4 に記載の組成物。

【請求項 1 0 6】

前記 miR-485-3p プライマーが、miR-485-3p__FW2 を含む、請求項 1 0 4 に記載の組成物。

【請求項 1 0 7】

前記 miR-485-3p プライマーが、miR-485-3p__FW1 を含む、請求項 1 0 4 に記載の組成物。

【請求項 1 0 8】

前記 miR-485-3p プライマーが、miR-485-3p__FW9 を含む、請求項 1 0 4 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本 PCT 出願は、2020 年 4 月 23 日に出願された米国特許仮出願第 63/014,633 号、2020 年 7 月 1 日に出願された同第 63/047,206 号、及び 2020 年 8 月 11 日に出願された同第 63/064,305 号の優先権の利益を主張するものであり、各出願の全体を本明細書に参照によって援用するものである。

【0002】

EFS-WEB を介して電子的に提出された配列表の参照

本出願とともに ASCII テキストファイル (ファイル名: 4366__025PC03__SeqListing__ST25.txt、サイズ: 81,709 バイト、作成日: 2

10

20

30

40

50

021年4月22日)の形で提出される、電子的に提出される配列表の全体を、参照によって本明細書に援用する。

【0003】

本開示は、対象のmiR-485-3pレベル(例えば、対象に由来する生体試料中の)を測定することを含む、認知障害(例えば、アルツハイマー病)に罹患した対象を特定する方法を提供する。本開示はさらに、miR-485-3pレベルが増加していることが特定された対象における認知障害を治療するための方法を提供する。

【背景技術】

【0004】

アルツハイマー病(AD)などの認知障害は、全世界で一般的かつ増加しつつある死亡率及び罹病率の原因となっている。2050年までには、全世界で1億人を越える人々がADを発症するものと推定されている。Gaugler et al., Alzheimer's Dement 12(4):459-509(2016); Pan et al., Sci Adv 5(2)(2019)。ADのコストは、全世界で8000億ドルを上回ると推定されている。今日まで、研究者はヒト対象におけるアミロイドβの産生及び／または凝集を効果的に阻害し、及び／またはアミロイドβのクリアランスを促進することができる化合物(例えば、抗体)の開発にほとんど成功していない。

したがって、AD及び同様の認知障害の既知の治療法は未だ存在していない。利用可能な治療選択肢は、疾患の基礎となる原因に対処するものではなく、様々な症状を緩和することに一般的に限定されたものである。さらに、有効な早期診断システムが存在しないため、認知障害に関連する症状の一部を緩和するうえで有用な治療選択肢は、疾患の発症からかなりの時間が経過してからでないと利用できるようにならない。また、認知障害の診断に利用可能な方法は、しばしば主観的なものであり(例えば、質問票)、有害である可能性があり(例えば、核脳画像診断用の放射性同位元素の使用)、及び／または高価である。したがって、認知障害の治療及び／または診断に対する新規でより効果的なアプローチが極めて望ましい。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Gaugler et al., Alzheimer's Dement 12(4):459-509(2016)

【非特許文献2】Pan et al., Sci Adv 5(2)(2019)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本明細書では、認知障害に罹患したヒト対象を特定する方法であって、対象の上皮細胞または血清に由来する生体試料中のmiR-485-3pのレベルを測定することを含む、方法が提供される。いくつかの態様では、生体試料は細胞外小胞である。

【0007】

本明細書では、認知障害に罹患した対象を特定する方法であって、対象から得られた生体試料中のmiR-485-3pのレベルを測定することを含み、生体試料が細胞外小胞を含む、方法も提供される。

【0008】

いくつかの態様では、細胞外小胞は、対象の上皮細胞から得られる。いくつかの態様では、上皮細胞は口腔粘膜上皮細胞である。いくつかの態様では、細胞は、対象の血清から得られる。特定の態様において、細胞外小胞は微小小胞を含む。いくつかの態様では、細胞外小胞はエクソソームを含む。

【0009】

いくつかの態様では、対象のmiR-485-3pのレベルが参照レベル(例えば、認知障害のない対象におけるmiR-485-3pの発現レベル、または対象における認知

10

20

30

40

50

障害を有する前の $miR-485-3p$ 発現レベル)と比較して増加している。特定の態様では、対象における $miR-485-3p$ のレベルは、参照レベルと比較して、少なくとも約 5%、少なくとも約 10%、少なくとも約 15%、少なくとも約 20%、少なくとも約 25%、少なくとも約 30%、少なくとも約 35%、少なくとも約 40%、少なくとも約 45%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 100%、少なくとも約 125%、少なくとも約 150%、少なくとも約 175%、少なくとも約 200%、少なくとも約 225%、少なくとも約 250%、少なくとも約 275%、または少なくとも約 300%以上増加している。

【0010】

10

いくつかの態様では、上記で提供される方法は、認知障害を治療するための治療を投与することをさらに含む。

【0011】

本明細書では、認知障害を治療する必要のあるヒト対象の認知障害を治療する方法であって、ヒト対象の上皮細胞または血清に由来する生体試料中の $miR-485-3p$ のレベルが、参照レベル（例えば、認知障害を有さない対象における $miR-485-3p$ の発現レベル、または対象における認知障害を有する前の $miR-485-3p$ レベル）と比較して増加しているものとして特定された対象に、認知障害を治療するための治療薬を投与することを含む、方法が提供される。

【0012】

20

いくつかの態様では、生体試料は細胞外小胞である。特定の態様では、細胞外小胞は、対象の上皮細胞から得られる。いくつかの態様では、上皮細胞は口腔粘膜上皮細胞である。いくつかの態様では、細胞は、対象の血清から得られる。いくつかの態様では、細胞外小胞は微小小胞を含む。いくつかの態様では、細胞外小胞はエクソソームを含む。

【0013】

いくつかの態様では、生体試料中の $miR-485-3p$ のレベルは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) アッセイを使用して測定される。特定の態様では、PCR アッセイはリアルタイム PCR を含む。いくつかの態様では、測定することは、 $miR-485-3p$ のサイクル閾値 (Ct) 値を決定することを含む。

【0014】

30

いくつかの態様では、上記の方法は、対象に関するさらなる因子を測定することをさらに含み、さらなる因子は、年齢、性別、教育年数 (EDU)、アポリポタンパク質 E (APOE) 遺伝子型、精神状態短時間検査 (MMSE) スコア、またはこれらの任意の組み合わせから選択される。

【0015】

いくつかの態様では、さらなる因子は性別及び教育年数である。特定の態様では、さらなる因子は性別である。いくつかの態様では、性別は男性または女性を含み、男性は値 1 に関連付けられ、女性は値 2 に関連付けられる。いくつかの態様では、APOE 遺伝子型は、(i) 値 1 に関連付けられた $E2/E3$ 、(ii) 値 1 に関連付けられた $E3/E3$ 、(iii) 値 2 に関連付けられた $E2/E4$ 、(iv) 値 2 に関連付けられた $E3/E4$ 、または (v) $E4/E4$ を含む。いくつかの態様では、教育年数は、0~16 の間の値を含む。

40

【0016】

いくつかの態様では、対象に関するさらなる因子を測定することを含む方法は、下式：(ナイーブ Ct $\times$ (性別 $\times V1_{性別} + V2_{性別}$)) $\times$ (教育年数 $\times V1_{EDU} + V2_{EDU}$)、(式中、 $V1$ 及び $V2$ は、前記特定のさらなる因子に関連付けられた回帰係数値である。)を用いて対象の診断スコアを計算することをさらに含む。いくつかの態様では、方法は、下式：(ナイーブ CT $\times$ (年齢 $\times V1_{年齢} + V2_{年齢}$)) $\times$ (性別 $\times V1_{性別} + V2_{性別}$) $\times$ (APOE $\times V1_{APOE} + V2_{APOE}$) $\times$ (MMSE $\times V1_{MMSE} + V2_{MMSE}$) $\times$ (教育年数 $\times V1_{EDU} + V2_{EDU}$)、(式中、 $V1$ 及び $V2$ は、特定のさ

50

らなる因子に関連付けられた回帰係数値である。)を用いて対象の診断スコアを計算することをさらに含む。いくつかの態様では、方法は、下式：(ナীব C T × (性別 × V 1 性別) + V 2 性別))、(式中、V 1 及び V 2 は、前記特定のさらなる因子に関連付けられた回帰係数値である。)を用いて対象の診断スコアを計算することをさらに含む。

【0017】

いくつかの態様では、対象の生体試料中の m i R - 4 8 5 - 3 p のレベルを測定することは、1つ以上の m i R - 4 8 5 - 3 p プライマーを使用して生体試料中に存在する m i R - 4 8 5 - 3 p を増幅することを含む。

【0018】

本明細書では、認知障害に罹患した対象における m i R - 4 8 5 - 3 p のレベルを決定する方法であって、1つ以上の m i R - 4 8 5 - 3 p プライマーを用いて生体試料中に存在する m i R - 4 8 5 - 3 p を増幅することにより、対象から得られた生体試料中の m i R - 4 8 5 - 3 p のレベルが参照レベル(例えば、認知障害を有さない対象における m i R - 4 8 5 - 3 p の発現レベルまたは対象における認知障害を有する前の m i R - 4 8 5 - 3 p レベル)と比較して増加しているかどうかを検出することを含む、方法も提供される。

【0019】

いくつかの態様では、対象における m i R - 4 8 5 - 3 p のレベルは、参照レベルと比較して、少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 100 %、少なくとも約 125 %、少なくとも約 150 %、少なくとも約 175 %、少なくとも約 200 %、少なくとも約 225 %、少なくとも約 250 %、少なくとも約 275 %、または少なくとも約 300 % 以上増加している。

【0020】

いくつかの態様では、生体試料は、組織、細胞、血液、血清、唾液、またはそれらの組み合わせを含む。特定の態様では、生体試料は細胞外小胞を含む。いくつかの態様では、細胞外小胞は、対象の上皮細胞から得られる。いくつかの態様では、上皮細胞は口腔粘膜上皮細胞である。いくつかの態様では、細胞は、対象の血清から得られる。特定の態様において、細胞外小胞は微小小胞を含む。いくつかの態様では、細胞外小胞はエクソソームを含む。

【0021】

いくつかの態様では、m i R - 4 8 5 - 3 p プライマーは、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 1 (G T C A T A C A C G G C T C T C C T C T C T) (配列番号 94)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 2 (T C A T A C A C G G C T C T C C T C T C) (配列番号 95)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 3 (C A T A C A C G G C T C T C C T C T C) (配列番号 96)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 4 (C A T A C A C G G C T C T C C T C T C T A) (配列番号 97)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 5 (C A T A C A C G G C T C T C G T C T C) (配列番号 98)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 6 (C A T A C A C G G C T C T C G T C T C T A A) (配列番号 99)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 7 (G T C A T A C A C G G C T C T C C T C T C T A A) (配列番号 100)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 8 (G T C A T A C A C G G C T C T C C T C) (配列番号 101)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 9 (C A T A C A C G G C T C T C C T C T C T A A A) (配列番号 52)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 10 (G T C A T A C A C G G C T C T C C T C T G) (配列番号 102)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 11 (T C A T A C A C G G C T C T C C T C T C T) (配列番号 103)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 12 (T C A T A C A C G G C T C T C C T C) (配列番号 104)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 13 (T C A T A C A C G G C T C T C C T C T C T A A) (配列番号 105)、m i R - 4 8 5 - 3 p __ F W 14 (C A T A C A C G G C T C T C C T C T C T A A) (配列番号 1

06)、miR-485-3p__FW15(ATACACGGCTCTCTCTCTA A)(配列番号107)、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様では、miR-485-3pプライマーは、miR-485-3p__FW7を含む。特定の態様では、miR-485-3pプライマーは、miR-485-3p__FW2を含む。いくつかの態様では、miR-485-3pプライマーは、miR-485-3p__FW1を含む。いくつかの態様では、miR-485-3pプライマーは、miR-485-3p__FW9を含む。

【0022】

いくつかの態様では、本明細書に開示される認知障害に罹患した対象におけるmiR-485-3pのレベルを決定する方法は、認知障害を治療することが可能な治療を投与することをさらに含む。

10

【0023】

いくつかの態様では、本明細書に開示される方法と併用できる治療は、miR-485-3p阻害剤(本明細書では「miRNA阻害剤」とも呼ばれる)を含む。

【0024】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤は、5'-UGUAUGA-3'(配列番号2)を含むヌクレオチド配列を含み、かつmiR-485-3p阻害剤は約6~約30ヌクレオチドの長さである。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤は、前記ヌクレオチド配列の5'末端の少なくとも1ヌクレオチド、少なくとも2ヌクレオチド、少なくとも3ヌクレオチド、少なくとも4ヌクレオチド、少なくとも5ヌクレオチド、少なくとも6ヌクレオチド、少なくとも7ヌクレオチド、少なくとも8ヌクレオチド、少なくとも9ヌクレオチド、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも11ヌクレオチド、少なくとも12ヌクレオチド、少なくとも13ヌクレオチド、少なくとも14ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも16ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも18ヌクレオチド、少なくとも19ヌクレオチド、少なくとも20ヌクレオチドを含み、及び/または、miR-485-3p阻害剤は、前記ヌクレオチド配列の3'末端の少なくとも1ヌクレオチド、少なくとも2ヌクレオチド、少なくとも3ヌクレオチド、少なくとも4ヌクレオチド、少なくとも5ヌクレオチド、少なくとも6ヌクレオチド、少なくとも7ヌクレオチド、少なくとも8ヌクレオチド、少なくとも9ヌクレオチド、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも11ヌクレオチド、少なくとも12ヌクレオチド、少なくとも13ヌクレオチド、少なくとも14ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも16ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも18ヌクレオチド、少なくとも19ヌクレオチド、または少なくとも20ヌクレオチドを含む。

20

30

【0025】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤は、5'-UGUAUGA-3'(配列番号2)、5'-GUGUAUGA-3'(配列番号3)、5'-CGUGUAUGA-3'(配列番号4)、5'-CCGUGUAUGA-3'(配列番号5)、5'-GCCGUGUAUGA-3'(配列番号6)、5'-AGCCGUGUAUGA-3'(配列番号7)、5'-GAGCCGUGUAUGA-3'(配列番号8)、5'-AGAGCCGUGUAUGA-3'(配列番号9)、5'-GAGAGCCGUGUAUGA-3'(配列番号10)、5'-GGAGAGCCGUGUAUGA-3'(配列番号11)、5'-AGGAGAGCCGUGUAUGA-3'(配列番号12)、5'-GAGGAGAGCCGUGUAUGA-3'(配列番号13)、5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGA-3'(配列番号14)、5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGA-3'(配列番号15)、5'-UGUAUGAC-3'(配列番号16)、5'-GUGUAUGAC-3'(配列番号17)、5'-CGUGUAUGAC-3'(配列番号18)、5'-CCGUGUAUGAC-3'(配列番号19)、5'-GCCGUGUAUGAC-3'(配列番号20)、5'-AGCCGUGUAUGAC-3'(配列番号21)、5'-GAGCCGUGUAUGAC-3'(配列番号22)、5'-AGAGCCGUGUAUGAC

40

50

− 3′（配列番号23）、5′−GAGAGCCGUGUAUGAC−3′（配列番号24）、5′−GGAGAGCCGUGUAUGAC−3′（配列番号25）、5′−AGGAGAGCCGUGUAUGAC−3′（配列番号26）、5′−GAGGAGAGCCGUGUAUGAC−3′（配列番号27）、5′−AGAGGAGAGCCGUGUAUGAC−3′（配列番号28）、5′−GAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC−3′（配列番号29）、及び5′−AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC−3′（配列番号30）からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0026】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤は、5′−TGTATGA−3′（配列番号62）、5′−GTGTATGA−3′（配列番号63）、5′−CGTGTATGA−3′（配列番号64）、5′−CCGTGTATGA−3′（配列番号65）、5′−GCCGTGTATGA−3′（配列番号66）、5′−AGCCGTGTATGA−3′（配列番号67）、5′−GAGCCGTGTATGA−3′（配列番号68）、5′−AGAGCCGTGTATGA−3′（配列番号69）、5′−GAGAGCCGTGTATGA−3′（配列番号70）、5′−GGAGAGCCGTGTATGA−3′（配列番号71）、5′−AGGAGAGCCGTGTATGA−3′（配列番号72）、5′−GAGAGAGCCGTGTATGA−3′（配列番号73）、5′−AGAGGAGAGCCGTGTATGA−3′（配列番号74）、5′−GAGAGGAGAGCCGTGTATGA−3′（配列番号75）、5′−TGTATGAC−3′（配列番号76）、5′−GTGTATGAC−3′（配列番号77）、5′−CGTGTATGAC−3′（配列番号78）、5′−CCGTGTATGAC−3′（配列番号79）、5′−GCCGTGTATGAC−3′（配列番号80）、5′−AGCCGTGTATGAC−3′（配列番号81）、5′−GAGCCGTGTATGAC−3′（配列番号82）、5′−AGAGCCGTGTATGAC−3′（配列番号83）、5′−GAGAGCCGTGTATGAC−3′（配列番号84）、5′−GGAGAGCCGTGTATGAC−3′（配列番号85）、5′−AGGAGAGCCGTGTATGAC−3′（配列番号86）、5′−GAGAGAGCCGTGTATGAC−3′（配列番号87）、5′−AGAGGAGAGCCGTGTATGAC−3′（配列番号88）、5′−GAGAGGAGAGCCGTGTATGAC−3′（配列番号89）、及び5′−AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC−3′（配列番号90）からなる群から選択される配列を有する。

【0027】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤の配列は、5′−AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC−3′（配列番号30）または5′−AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC−3′（配列番号90）と、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の配列同一性を有する。特定の態様では、miRNA阻害剤は、5′−AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC−3′（配列番号30）または5′−AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC−3′（配列番号90）と少なくとも90%の類似性を有する。いくつかの態様では、miRNA阻害剤は、1個の置換または2個の置換を有するヌクレオチド配列5′−AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC−3′（配列番号30）または5′−AGAGAGGAGAGCCGTGTATGAC−3′（配列番号90）を含む。いくつかの態様では、miRNA阻害剤は、ヌクレオチド配列5′−AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC−3′（配列番号30）または5′−AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC−3′（配列番号90）を含む。いくつかの態様では、miRNA阻害剤は、ヌクレオチド配列5′−AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC−3′（配列番号30）を含む。

【0028】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤は、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドは、ロックド核酸

(LNA)、アンロックド核酸(UNA)、アラビノ核酸(ABA)、架橋核酸(BNA)、またはペプチド核酸(PNA)を含む。

【0029】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤は、骨格修飾を含む。いくつかの態様では、骨格修飾は、ホスホロジアミダイトモルホリノオリゴマー(PMO)及び／またはホスホロチオエート(PS)修飾を含む。

【0030】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤はウイルスベクターによって送達される。いくつかの態様では、ウイルスベクターは、AAV、アデノウイルス、レトロウイルス、またはレンチウイルスである。いくつかの態様では、ウイルスベクターは、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、またはこれらの任意の組み合わせの血清型を有するAAVである。

【0031】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤は、送達剤によって送達される。いくつかの態様では、送達剤は、ミセル、エクソソーム、脂質ナノ粒子、細胞外小胞、合成小胞、リポイド、リポソーム、リポプレックス、ポリマー化合物、ペプチド、タンパク質、細胞、ナノ粒子模倣体、ナノチューブ、コンジュゲート、ウイルスベクター、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様では、送達剤は、

[WP]-L1-[CC]-L2-[AM] (式I)

または

[WP]-L1-[AM]-L2-[CC] (式II)

(式中、

WPは、水溶性バイオポリマー部分であり、

CCは、正に帯電した(すなわちカチオン性)キャリア部分であり、

AMは、アジュバント部分であり、

L1及びL2は、独立して任意選択のリンカーである)を有するカチオン性キャリアユニットを含む。

【0032】

いくつかの態様では、miRNA阻害剤とカチオン性キャリアユニットとは、互いに混合される際に互いに結合してミセルを形成することができる。特定の態様では、結合は、共有結合である。いくつかの態様では、結合は、非共有結合である。いくつかの態様では、miRNA阻害剤は、イオン結合を介してカチオン性キャリアユニットと相互作用する。いくつかの態様では、カチオン性キャリアユニットは、酵素分解からmiRNA阻害剤を保護することができる。

【0033】

いくつかの態様では、水溶性ポリマー部分は、ポリ(アルキレングリコール)、ポリ(オキシエチル化ポリオール)、ポリ(オレフィンアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(ヒドロキシアルキルメタクリルアミド)、ポリ(ヒドロキシアルキルメタクリレート)、ポリ(サッカライド)、ポリ(α -ヒドロキシ酸)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリグリセロール、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン(「POZ」)、ポリ(N-アクリロイルモルホリン)、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様では、水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール(「PEG」)、ポリグリセロール、またはポリ(プロピレングリコール)(「PPG」)を含む。

【0034】

いくつかの態様では、水溶性ポリマー部分は、

10

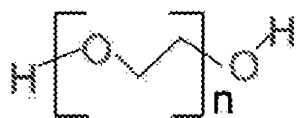
20

30

40

50

【化 1】



, (式 I),

(式中、 n は、 $1 \sim 1000$ である)
を含む。

【0035】

10

いくつかの態様では、 n は、少なくとも約 110、少なくとも約 111、少なくとも約 112、少なくとも約 113、少なくとも約 114、少なくとも約 115、少なくとも約 116、少なくとも約 117、少なくとも約 118、少なくとも約 119、少なくとも約 120、少なくとも約 121、少なくとも約 122、少なくとも約 123、少なくとも約 124、少なくとも約 125、少なくとも約 126、少なくとも約 127、少なくとも約 128、少なくとも約 129、少なくとも約 130、少なくとも約 131、少なくとも約 132、少なくとも約 133、少なくとも約 134、少なくとも約 135、少なくとも約 136、少なくとも約 137、少なくとも約 138、少なくとも約 139、少なくとも約 140、または少なくとも約 141 である。特定の態様では、 n は、約 80～約 90、約 90～約 100、約 100～約 110、約 110～約 120、約 120～約 130、約 140～約 150、または約 150～約 160 である。

20

【0036】

いくつかの態様では、水溶性ポリマー部分は、直鎖状、分枝鎖状、または樹枝状である。

【0037】

いくつかの態様では、カチオン性キャリア部分は、1つ以上の塩基性アミノ酸を含む。特定の態様では、カチオン性キャリア部分は、少なくとも約 3 個、少なくとも約 4 個、少なくとも約 5 個、少なくとも約 6 個、少なくとも約 7 個、少なくとも約 8 個、少なくとも約 9 個、少なくとも約 10 個、少なくとも約 11 個、少なくとも約 12 個、少なくとも約 13 個、少なくとも約 14 個、少なくとも約 15 個、少なくとも約 16 個、少なくとも約 17 個、少なくとも約 18 個、少なくとも約 19 個、少なくとも約 20 個、少なくとも約 21 個、少なくとも約 22 個、少なくとも約 23 個、少なくとも約 24 個、少なくとも約 25 個、少なくとも約 26 個、少なくとも約 27 個、少なくとも約 28 個、少なくとも約 29 個、少なくとも約 30 個、少なくとも約 31 個、少なくとも約 32 個、少なくとも約 33 個、少なくとも約 34 個、少なくとも約 35 個、少なくとも約 36 個、少なくとも約 37 個、少なくとも約 38 個、少なくとも約 39 個、少なくとも約 40 個、少なくとも約 41 個、少なくとも約 42 個、少なくとも約 43 個、少なくとも約 44 個、少なくとも約 45 個、少なくとも約 46 個、少なくとも約 47 個、少なくとも約 48 個、少なくとも約 49 個、または少なくとも約 50 個の塩基性アミノ酸を含む。

30

【0038】

40

いくつかの態様では、塩基性アミノ酸は、アルギニン、リシン、ヒスチジン、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様では、カチオン性キャリア部分は、約 40 個のリシンモノマーを含む。

【0039】

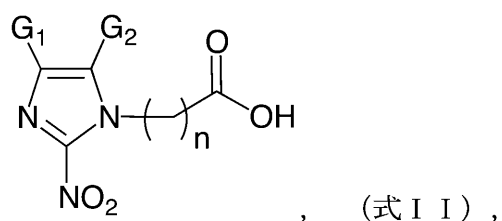
いくつかの態様では、アジュバント部分は、免疫反応、炎症反応、及び／または組織微小環境を調節することができる。いくつかの態様では、アジュバント部分は、イミダゾール誘導体、アミノ酸、ビタミン、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0040】

いくつかの態様では、アジュバント部分は、下式：

50

【化 2】



(式中、G 1 及び G 2 のそれぞれは、H、芳香環、もしくは 1 ～ 1 0 アルキルであるか、または G 1 と G 2 はともに芳香環を形成し、n は 1 ～ 1 0 である) を有する。

10

【0 0 4 1】

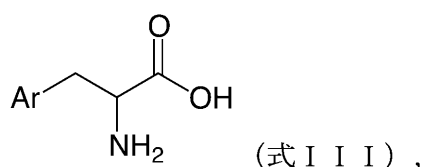
いくつかの態様では、アジュバント部分は、ニトロイミダゾールを含む。特定の態様では、アジュバント部分は、メトロニダゾール、チニダゾール、ニモラゾール、ジメトリダゾール、プレトマニド、オルニダゾール、メガゾール、アザニダゾール、ベンズニダゾール、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0 0 4 2】

いくつかの態様では、アジュバント部分は、アミノ酸を含む。いくつかの態様では、アジュバント部分は、下式：

20

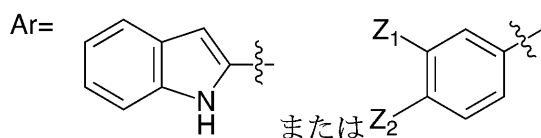
【化 3】



30

(式中、A r は、

【化 4】



であり、
Z 1 及び Z 2 のそれぞれは、H または O H である) を有する。

40

【0 0 4 3】

いくつかの態様では、アジュバント部分は、ビタミンを含む。特定の態様では、ビタミンは、環式環または環式ヘテロ原子環及びカルボキシル基またはヒドロキシル基を含む。

【0 0 4 4】

いくつかの態様では、ビタミンは、下式：

50

10



20

30

40

50

本明細書では、miR-485-3p_FW1 (GTCATACACGGCTCTCTCTCTCT) (配列番号94)、miR-485-3p_FW2 (TCATACACGGCTCTCCTCTCTC) (配列番号95)、miR-485-3p_FW3 (CATACACGGCTCTCTCCTCTCTC) (配列番号96)、miR-485-3p_FW4 (CATACACGGCTCTCTCCTCTCTA) (配列番号97)、miR-485-3p

20

30

【 0 0 5 3 】

40

50

【 0 0 5 4 】

50

【図 2 B】 m i R - 4 8 5 - 3 p 発現（リアルタイム P C R アッセイで測定される）を用いたヒト臨床スワブ試料中のアミロイド β 蓄積の検出の診断精度に対する性別及び教育年数の影響を示す。アミロイド β 蓄積ありの患者からの臨床スワブ試料を特定するうえで m

i R-485-3 p 発現、性別、及び教育年数の組み合わせを用いることの特異性及び感度を示している。受信者動作特性 (ROC) 分析を使用して、以下の値、すなわち、(i) 曲線下面積 (AUC)、(ii) 感度、(iii) 特異性、及び (iv) 精度を測定した。矢印で示される丸い点は、A に示されるカットオフ値における特異性及び感度を表す。丸い点に関連する AUC、精度、感度、及び特異性の数値も、B に示されている。

【0055】

【図3A】mi R-485-3 p 発現 (リアルタイムPCRアッセイで測定される) を用いたヒト臨床スワブ試料中のアミロイドβ蓄積の検出の診断精度に対する性別、年齢、精神状態短時間検査 (MMSE) スコア、APOE 遺伝子型及び教育年数の影響を示す。アミロイドβの蓄積ありの患者 (右) またはなしの患者 (左) からの臨床スワブ試料のスコアの比較を示す。スコアは、mi R-485-3 p のナイーブ Ct 値 (図1A参照)、性別、年齢、MMSE スコア、APOE 遺伝子型、及び教育水準の組み合わせに基づく回帰モデリングを使用して確立された。例えば、スコアの計算に使用される具体的な式については、実施例2を参照されたい。横の破線は、アミロイドPET陰性群と陽性群との間のカットオフ値を表す。

10

【図3B】mi R-485-3 p 発現 (リアルタイムPCRアッセイで測定される) を用いたヒト臨床スワブ試料中のアミロイドβ蓄積の検出の診断精度に対する性別、年齢、精神状態短時間検査 (MMSE) スコア、APOE 遺伝子型及び教育年数の影響を示す。アミロイドβ蓄積ありの患者からの臨床スワブ試料を特定するうえでmi R-485-3 p 発現 (すなわち、ナイーブ Ct 値)、性別、年齢、MMSE スコア、APOE 遺伝子型及び教育年数の組み合わせを用いることの特異性及び感度を示している。受信者動作特性 (ROC) 分析を使用して、以下の値、すなわち、(i) 曲線下面積 (AUC)、(ii) 感度、(iii) 特異性、及び (iv) 精度を測定した。矢印で示される丸い点は、A に示されるカットオフ値における特異性及び感度を表す。丸い点に関連する AUC、精度、感度、及び特異性の数値も、B に示されている。

20

【0056】

【図4】臨床スワブ試料中のmi R-485-3 p 発現 (すなわち、リアルタイムPCRアッセイを使用して決定されたナイーブ Ct 値) と、以下の患者の臨床因子、すなわち、年齢、性別、教育年数、APOE 遺伝子型、及びMMSEスコアのうちの1つ以上のものとの組み合わせに基づいた回帰モデリングの結果 (すなわち、精度 (%)) の比較を示す。

30

【0057】

【図5A】mi R-485-3 p 発現 (リアルタイムPCRアッセイで測定される) を用いたヒト臨床血漿試料中のアミロイドβ蓄積の検出の診断精度を示す。アミロイドβ陰性 (すなわち、アミロイドβ蓄積なし) (左) 及びアミロイドβ陽性 (すなわち、アミロイドβ蓄積あり) (右) 試料のmi R-485-3 p のリアルタイムPCRのナイーブサイクル閾値 (Ct) 値の比較を示す。実施例1で説明されるように、ナイーブ Ct 値は発現値に反比例している (すなわち、mi R-485-3 p 発現が高いほどナイーブ Ct 値が低い)。アミロイドβの蓄積は、アミロイドPETスキャンを使用して測定した。横の破線は、アミロイドPET陰性群と陽性群との間のカットオフ値を表す。

40

【図5B】mi R-485-3 p 発現 (リアルタイムPCRアッセイで測定される) を用いたヒト臨床血漿試料中のアミロイドβ蓄積の検出の診断精度を示す。アミロイドβ蓄積ありの患者からの臨床血漿試料を特定するうえでmi R-485-3 p 発現を使用することの特異性及び感度を示している。受信者動作特性 (ROC) 分析を使用して、以下の値、すなわち、(i) 曲線下面積 (AUC)、(ii) 感度、(iii) 特異性、及び (iv) 精度を測定した。矢印で示される丸い点は、A に示されるカットオフ値における特異性及び感度を表す。丸い点に関連する AUC、精度、感度、及び特異性の数値も、B に示されている。

【0058】

【図6A】mi R-485-3 p 発現 (リアルタイムPCRアッセイで測定される) を用

50

いたヒト臨床血漿試料中のアミロイドβ蓄積の検出の診断精度に対する性別の影響を示す。アミロイドβの蓄積ありの患者（右）またはなしの患者（左）からの臨床血漿試料のスコアの比較を示す。スコアは、miR-485-3pのナイーブCt値（図5A参照）と患者の性別の組み合わせに基づく回帰モデリングを使用して確立された。例えば、スコアの計算に使用される具体的な式については、実施例4を参照されたい。横の破線は、アミロイドPET陰性群と陽性群との間のカットオフ値を表す。

【図6B】miR-485-3p発現（リアルタイムPCRアッセイで測定される）を用いたヒト臨床血漿試料中のアミロイドβ蓄積の検出の診断精度に対する性別の影響を示す。アミロイドβ蓄積ありの患者からの臨床血漿試料を特定するうえでmiR-485-3p発現（すなわち、ナイーブCt値）と性別の組み合わせを用いることの特異性及び感度を示している。受信者動作特性（ROC）分析を使用して、以下の値、すなわち、（i）曲線下面積（AUC）、（ii）感度、（iii）特異性、及び（iv）精度を測定した。矢印で示される丸い点は、Aに示されるカットオフ値における特異性及び感度を表す。丸い点に関連するAUC、精度、感度、及び特異性の数値も、Bに示されている。

【図6C】miR-485-3p発現（リアルタイムPCRアッセイで測定される）を用いたヒト臨床血漿試料中のアミロイドβ蓄積の検出の診断精度に対する性別の影響を示す。Cは、A及びBに示されるデータの正規化された表現を示す。正規化された表現は、式： $2 - (\text{リアルタイムPCRのCt値}) \times 10^{10}$ によって計算した。

【図6D】miR-485-3p発現（リアルタイムPCRアッセイで測定される）を用いたヒト臨床血漿試料中のアミロイドβ蓄積の検出の診断精度に対する性別の影響を示す。Dは、A及びBに示されるデータに基づく性別のフィッティングスコアを示す。スコアは、正規化された表現の値及び患者固有の臨床情報を用いた回帰モデリング法から得られたフィッティング値である。Dにおいて、モデリングは性別及び正規化された表現の値を用いて行った。

【0059】

【図7】臨床血漿試料中のmiR-485-3p発現（すなわち、リアルタイムPCRアッセイを使用して決定されたナイーブCt値）と、以下の患者の臨床因子、すなわち、年齢、性別、教育年数、APOE遺伝子型、及びMMSEスコアのうちの1つ以上のものの組み合わせに基づいた回帰モデリングの結果（すなわち、精度（%））の比較を示す。

【0060】

【図8A】それぞれ異なる用量（すなわち、0.1、0.5、または1μM）のアミロイドβモノマー及びオリゴマーで処理したヒト由来口腔上皮細胞におけるmiR-485-3pの発現を示す。miR-485-3pの発現レベルは、コントロール（すなわち非処理細胞）に対して正規化して示されている（各図の左側に示されている棒グラフを参照）。各図において、右側のグラフは、miR-485-3pの発現とアミロイドβ処理の用量との正の相関を示している。示されるp値はピアソン相関のp値を表す。「C.C」は、ピアソン相関の相関係数を表す。miR-485-3pの発現を測定するためにリアルタイムPCRアッセイで以下のプライマーを使用した：5'-GTCAATAACACGGCTCTCTCTCTCTCT-3'（本明細書では「miR-485-3p_FW1」と呼ぶ。配列番号94）。

【図8B】それぞれ異なる用量（すなわち、0.1、0.5、または1μM）のアミロイドβモノマー及びオリゴマーで処理したヒト由来口腔上皮細胞におけるmiR-485-3pの発現を示す。miR-485-3pの発現レベルは、コントロール（すなわち非処理細胞）に対して正規化して示されている（各図の左側に示されている棒グラフを参照）。各図において、右側のグラフは、miR-485-3pの発現とアミロイドβ処理の用量との正の相関を示している。示されるp値はピアソン相関のp値を表す。「C.C」は、ピアソン相関の相関係数を表す。miR-485-3pの発現を測定するためにリアルタイムPCRアッセイで以下のプライマーを使用した：5'-GTCAATAACACGGCTCTCTCTCTCTCT-3'（本明細書では「miR-485-3p_FW1」と呼ぶ。配列番号94）。

10

20

30

40

50

10

10

20

20

30

40

40

40

50

50

つMMSE 25未満の患者を指す。AD (n=4) は、アルツハイマー病診断が「AD」、PET陽性、かつMMSE 25未満の患者を指す。Pは、スチューデントt検定の結果のp値を指す。

【図11B】アルツハイマー病の診断によるmiR-485-3p発現を示す。アルツハイマー病と診断された患者のうち、61歳以上の患者に対してのみ分析を行った。NC (n=10) は、アルツハイマー病診断が「NC」、PET陰性、かつMMSE 25以上の患者を指す。MCI (n=4) は、アルツハイマー病診断が「MCI」、PET陽性、かつMMSE 25未満の患者を指す。AD (n=4) は、アルツハイマー病診断が「AD」、PET陽性、かつMMSE 25未満の患者を指す。Pは、スチューデントt検定の結果のp値を指す。

10

【0064】

【図12A】ヒト対象におけるアミロイドβ蓄積の診断のための候補マーカーとしてのmiR-485-3pの特定を示す。AD患者及び正常コントロール対象（すなわち、ADではない対象）における異なるmiRNAの発現の比較を示す。miRNA発現は、AD患者と正常なコントロール対象との間の倍数変化として示されている（x軸）。y軸は、 $-\log_{10}$ スケールのp値を示す。各円は、個々のmiRNAを表す。横の点線は、0.05のp値を示す。縦の点線は、±1倍の変化を示す。

【図12B】ヒト対象におけるアミロイドβ蓄積の診断のための候補マーカーとしてのmiR-485-3pの特定を示す。アミロイドβ蓄積ありの個人（すなわち、AD患者、「(1)」）及びアミロイドβ蓄積なしの個人（すなわち、ADではない対象、「(2)」）からの血漿及びヒト口腔由来無細胞エキソソーム（HOCFE）の両方におけるmiR-485-3p発現の比較を示す。miR-485-3p発現は、2サイクル閾値 $\times 10^{13}$ として計算した。「Q」は $\log_{10}$ （p値）を指す。

20

【図12C】ヒト対象におけるアミロイドβ蓄積の診断のための候補マーカーとしてのmiR-485-3pの特定を示す。Bに示された結果の特異性（y軸）及び感度（x軸）の比較を示す。「AUC」は、ROC分析による曲線下面積を指す。

【0065】

【図13A】本開示で開示される異なる診断方法のAUCの比較を示す。AUCは、臨床情報のみを含むアルゴリズムを使用して生成された。miR-485-3p発現を定量化する例示的な方法は、実施例1に示されている（「マイクロRNAの定量化」を参照）。AUCを比較することにより、異なる診断パラメータを含むアルゴリズムを1位、2位、または3位にランク付けした。各図において、y軸は、異なる診断パラメータのそれぞれについて1位、2位、または3位にランクされたアルゴリズムの数を示す。

30

【図13B】本開示で開示される異なる診断方法のAUCの比較を示す。AUCは、臨床情報とmiR-485-3p発現についてのサイクル閾値（Ct）値の両方を含むアルゴリズムを使用して生成された。miR-485-3p発現を定量化する例示的な方法は、実施例1に示されている（「マイクロRNAの定量化」を参照）。AUCを比較することにより、異なる診断パラメータを含むアルゴリズムを1位、2位、または3位にランク付けした。各図において、y軸は、異なる診断パラメータのそれぞれについて1位、2位、または3位にランクされたアルゴリズムの数を示す。

40

【図13C】本開示で開示される異なる診断方法のAUCの比較を示す。AUCは、臨床情報と定量化されたmiR-485-3p発現との組み合わせを含むアルゴリズムを使用して生成された。miR-485-3p発現を定量化する例示的な方法は、実施例1に示されている（「マイクロRNAの定量化」を参照）。AUCを比較することにより、異なる診断パラメータを含むアルゴリズムを1位、2位、または3位にランク付けした。各図において、y軸は、異なる診断パラメータのそれぞれについて1位、2位、または3位にランクされたアルゴリズムの数を示す。

【0066】

【図14A】miR-485-3p発現（HOCFEで測定）と患者の年齢との間の関係を示す。患者試料をアミロイドβ蓄積（すなわち、アミロイドPET陽性またはアミロイ

50

ドPET陰性)に基づいて分け、miR-485-3pの発現を患者の年齢の関数として示す。アミロイドPET陽性患者とアミロイドPET陰性患者の両方の回帰直線を示す。総患者集団の回帰直線も示されている。各円は個々の患者を表す。

【図14B】miR-485-3p発現(HOCFEで測定)と患者の年齢との間の関係を示す。各年齢群からの患者について精度とAUC値の比較を示す。示されるように、年齢群は53歳～86歳までの範囲であった。赤い点線は、精度とAUC値の両方が顕著に高い年齢群を表す。上に示される棒グラフは、各年齢群におけるアミロイドPET陰性(棒の薄い灰色の部分)及びアミロイドPET陽性(棒の濃い灰色の部分)の患者の数を示している。

【図14C】miR-485-3p発現(HOCFEで測定)と患者の年齢との間の関係を示す。図の箱ひげ図は、61～73歳のアミロイドPET陰性患者及びアミロイドPET陽性患者におけるmiR-485-3p発現の比較を示す。右のグラフは、特異度と感度の値を示す。AUCはROC分析により測定した。

【0067】

【図15A】miR-485-3p発現に基づいてアミロイドβ蓄積を診断するうえで有用な例示的方法を示す。(1)細胞ペレット(「スワブのペレット」)から、及び(i)ヒト口腔由来無細胞エクソソーム(「スワブの上清エクソソーム」)からのスワブ試料からのRNA調製に使用される2つの例示的な方法の有効性を確認するウエスタンブロット分析を示す。細胞ペレットから調製するには、カルネキシンを小胞体(ER)のマーカーとして使用した。ヒト口腔由来無細胞エクソソームから調製するには、CD81をマーカーとして使用した。

【図15B】miR-485-3p発現に基づいてアミロイドβ蓄積を診断するうえで有用な例示的方法を示す。ヒト口腔由来無細胞エクソソーム(HOCFE)におけるmiR-485-3p発現を用いたアミロイドβ蓄積の診断に含まれる異なるステップの概略図を示す。要約すると、スワブ法を使用してHOCFEを採取した。次に、miR-485-3pの発現を、標準物質とPCR分析を使用して定量化した。次に、miR-485-3p発現レベルを、本明細書に提供される患者の臨床情報(例えば、年齢、性別、教育年数、MMSEスコア、APOE遺伝子型、及びCDR値)の1つ以上と組み合わせて分析した。分析は、交差検証法によって確認した。

【0068】

【図16A】miR-485-3p発現を使用したヒト対象におけるアミロイドβ蓄積の診断の精度に対する患者の臨床情報の影響を示す。患者の臨床情報を単独で、またはmiR-485-3p発現と組み合わせて考慮した場合のAUC(曲線下面積)値の比較を示す。「CFO」とは、臨床情報のみを指す。「Ct値」は、標準物質を使用して定量化されていないリアルタイムPCR分析を使用した結果(すなわちナイーブなサイクル閾値)を指す。「量」とは、標準物質を使用して定量化された結果を指す。「AUC」とは、特異性と感度の値の比較から得られる曲線下面積を指す。AUCはROC分析によって測定した。

【図16B】miR-485-3p発現を使用したヒト対象におけるアミロイドβ蓄積の診断の精度に対する患者の臨床情報の影響を示す。miR-485-3p発現を使用したアミロイドβ蓄積の診断の予測力に対する患者の年齢の影響を示す。示される異なる年齢群には、(i)60歳以下(「～60」)、(ii)61～70歳(「61～70」)、(iii)71～80歳(「71～80」)、(iv)81歳以上(「81～」)が含まれる。上の棒グラフは、異なる年齢群の精度データを示す。精度は以下のように決定できる:(患者の総数-偽陽性の数-偽陰性の数)/(患者の総数)。下の棒グラフは、各年齢群からのアミロイドβの蓄積なしの患者(「1」、すなわちアミロイドPET陰性)とアミロイドβの蓄積ありの患者(「2」、すなわち、アミロイドPET陽性)におけるmiR-485-3p発現(量)の比較を示す。示されるQ値は、スチューデントt検定を使用して測定されたp値の $-\log_{10}$ を指す。x軸に沿った「カウント」は、各年齢群のアミロイドPET陰性またはアミロイドPET陽性の患者からの試料数を指す。

【0069】

【図17A】miR-485-3p発現が特定の年齢群内の患者におけるアミロイドβ蓄積を正確に診断する能力を示す。A及びBでは、年齢群は60歳～約90歳までの範囲であった。C及びDでは、年齢群は約50歳～約85歳までの範囲であった。A及びCでは、精度及びAUC値の両方が、年齢の関数として患者について示されている。精度とAUC値の両方が有意に高いレベルである年齢群が注目される。上に示される棒グラフは、各年齢群におけるアミロイドPET陰性（棒の薄い灰色の部分）及びアミロイドPET陽性（棒の濃い灰色の部分）の患者の数を示している。B及びDは、73歳未満（B）または68歳以上（D）のアミロイドPET陰性患者及びアミロイドPET陽性患者におけるmiR-485-3p発現の比較を示す。右のグラフは、特異度と感度の値を示す。AUCはROC分析によって測定した。

10

【図17B】miR-485-3p発現が特定の年齢群内の患者におけるアミロイドβ蓄積を正確に診断する能力を示す。A及びBでは、年齢群は60歳～約90歳までの範囲であった。C及びDでは、年齢群は約50歳～約85歳までの範囲であった。A及びCでは、精度及びAUC値の両方が、年齢の関数として患者について示されている。精度とAUC値の両方が有意に高いレベルである年齢群が注目される。上に示される棒グラフは、各年齢群におけるアミロイドPET陰性（棒の薄い灰色の部分）及びアミロイドPET陽性（棒の濃い灰色の部分）の患者の数を示している。B及びDは、73歳未満（B）または68歳以上（D）のアミロイドPET陰性患者及びアミロイドPET陽性患者におけるmiR-485-3p発現の比較を示す。右のグラフは、特異度と感度の値を示す。AUCはROC分析によって測定した。

20

【図17C】miR-485-3p発現が特定の年齢群内の患者におけるアミロイドβ蓄積を正確に診断する能力を示す。A及びBでは、年齢群は60歳～約90歳までの範囲であった。C及びDでは、年齢群は約50歳～約85歳までの範囲であった。A及びCでは、精度及びAUC値の両方が、年齢の関数として患者について示されている。精度とAUC値の両方が有意に高いレベルである年齢群が注目される。上に示される棒グラフは、各年齢群におけるアミロイドPET陰性（棒の薄い灰色の部分）及びアミロイドPET陽性（棒の濃い灰色の部分）の患者の数を示している。B及びDは、73歳未満（B）または68歳以上（D）のアミロイドPET陰性患者及びアミロイドPET陽性患者におけるmiR-485-3p発現の比較を示す。右のグラフは、特異度と感度の値を示す。AUCはROC分析によって測定した。

30

【図17D】miR-485-3p発現が特定の年齢群内の患者におけるアミロイドβ蓄積を正確に診断する能力を示す。A及びBでは、年齢群は60歳～約90歳までの範囲であった。C及びDでは、年齢群は約50歳～約85歳までの範囲であった。A及びCでは、精度及びAUC値の両方が、年齢の関数として患者について示されている。精度とAUC値の両方が有意に高いレベルである年齢群が注目される。上に示される棒グラフは、各年齢群におけるアミロイドPET陰性（棒の薄い灰色の部分）及びアミロイドPET陽性（棒の濃い灰色の部分）の患者の数を示している。B及びDは、73歳未満（B）または68歳以上（D）のアミロイドPET陰性患者及びアミロイドPET陽性患者におけるmiR-485-3p発現の比較を示す。右のグラフは、特異度と感度の値を示す。AUCはROC分析によって測定した。

40

【0070】

【図18A】臨床情報、すなわち、年齢、教育、MMSEスコア、性別、APOEスコア、及びCDRスコアの有意なモデルの数（左のグラフ）、AUC（中央のグラフ）、及び誤差率（右のグラフ）をそれぞれ示す。これらの結果は、61歳以上の患者からの試料に基づいたものである。実施例8でさらに説明するように、本開示で説明するアルゴリズムを構築するため、AUC及び誤差率を回帰モデリングを使用して決定し、11次元（つまり、当該技術分野で、次数、位、または多項とも呼ばれる）まで無作為抽出を用いてシミュレーションを100回繰り返した。図に示される結果を用いて、アルゴリズムを構築するための最適な回帰次元（すなわち、図に示される白抜きの棒）を決定した。Aに示され

50

る有意なモデル値の数は、統計的に有意であった（すなわち、 p 値 < 0.05 ）シミュレーション（または試験）の数を指す。

【図 18 B】臨床情報、すなわち、年齢、教育、MMSE スコア、性別、APOE スコア、及び CDR スコアの有意なモデルの数（左のグラフ）、AUC（中央のグラフ）、及び誤差率（右のグラフ）をそれぞれ示す。これらの結果は、61 歳以上の患者からの試料に基づいたものである。実施例 8 でさらに説明するように、本開示で説明するアルゴリズムを構築するため、AUC 及び誤差率を回帰モデリングを使用して決定し、11 次元（つまり、当該技術分野で、次数、位、または多項とも呼ばれる）まで無作為抽出を用いてシミュレーションを 100 回繰り返した。図に示される結果を用いて、アルゴリズムを構築するための最適な回帰次元（すなわち、図に示される白抜きの棒）を決定した。

10

【図 18 C】臨床情報、すなわち、年齢、教育、MMSE スコア、性別、APOE スコア、及び CDR スコアの有意なモデルの数（左のグラフ）、AUC（中央のグラフ）、及び誤差率（右のグラフ）をそれぞれ示す。これらの結果は、61 歳以上の患者からの試料に基づいたものである。実施例 8 でさらに説明するように、本開示で説明するアルゴリズムを構築するため、AUC 及び誤差率を回帰モデリングを使用して決定し、11 次元（つまり、当該技術分野で、次数、位、または多項とも呼ばれる）まで無作為抽出を用いてシミュレーションを 100 回繰り返した。図に示される結果を用いて、アルゴリズムを構築するための最適な回帰次元（すなわち、図に示される白抜きの棒）を決定した。

【図 18 D】臨床情報、すなわち、年齢、教育、MMSE スコア、性別、APOE スコア、及び CDR スコアの有意なモデルの数（左のグラフ）、AUC（中央のグラフ）、及び誤差率（右のグラフ）をそれぞれ示す。これらの結果は、61 歳以上の患者からの試料に基づいたものである。実施例 8 でさらに説明するように、本開示で説明するアルゴリズムを構築するため、AUC 及び誤差率を回帰モデリングを使用して決定し、11 次元（つまり、当該技術分野で、次数、位、または多項とも呼ばれる）まで無作為抽出を用いてシミュレーションを 100 回繰り返した。図に示される結果を用いて、アルゴリズムを構築するための最適な回帰次元（すなわち、図に示される白抜きの棒）を決定した。

20

【図 18 E】臨床情報、すなわち、年齢、教育、MMSE スコア、性別、APOE スコア、及び CDR スコアの有意なモデルの数（左のグラフ）、AUC（中央のグラフ）、及び誤差率（右のグラフ）をそれぞれ示す。これらの結果は、61 歳以上の患者からの試料に基づいたものである。実施例 8 でさらに説明するように、本開示で説明するアルゴリズムを構築するため、AUC 及び誤差率を回帰モデリングを使用して決定し、11 次元（つまり、当該技術分野で、次数、位、または多項とも呼ばれる）まで無作為抽出を用いてシミュレーションを 100 回繰り返した。図に示される結果を用いて、アルゴリズムを構築するための最適な回帰次元（すなわち、図に示される白抜きの棒）を決定した。

30

【図 18 F】臨床情報、すなわち、年齢、教育、MMSE スコア、性別、APOE スコア、及び CDR スコアの有意なモデルの数（左のグラフ）、AUC（中央のグラフ）、及び誤差率（右のグラフ）をそれぞれ示す。これらの結果は、61 歳以上の患者からの試料に基づいたものである。実施例 8 でさらに説明するように、本開示で説明するアルゴリズムを構築するため、AUC 及び誤差率を回帰モデリングを使用して決定し、11 次元（つまり、当該技術分野で、次数、位、または多項とも呼ばれる）まで無作為抽出を用いてシミュレーションを 100 回繰り返した。図に示される結果を用いて、アルゴリズムを構築するための最適な回帰次元（すなわち、図に示される白抜きの棒）を決定した。

40

【0071】

【図 19 A】結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、いずれの年齢群にも限定されない）点を除いて、図 18 A、18 B、18 C、18 D、18 E、及び 18 F に示されたものと同じ結果を示す。

【図 19 B】結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、いずれの年齢群にも限定されない）点を除いて、図 18 A、18 B、18 C、18 D、18 E、及び 18 F に示されたものと同じ結果を示す。

【図 19 C】結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、いずれの年齢群

50

にも限定されない) 点を除いて、図 18 A、18 B、18 C、18 D、18 E、及び 18 F に示されたものと同じ結果を示す。

【図 19 D】結果が全患者からの試料に基づいたものである(すなわち、いずれの年齢群にも限定されない) 点を除いて、図 18 A、18 B、18 C、18 D、18 E、及び 18 F に示されたものと同じ結果を示す。

【図 19 E】結果が全患者からの試料に基づいたものである(すなわち、いずれの年齢群にも限定されない) 点を除いて、図 18 A、18 B、18 C、18 D、18 E、及び 18 F に示されたものと同じ結果を示す。

【図 19 F】結果が全患者からの試料に基づいたものである(すなわち、いずれの年齢群にも限定されない) 点を除いて、図 18 A、18 B、18 C、18 D、18 E、及び 18 F に示されたものと同じ結果を示す。

10

【0072】

【図 20 A】異なる患者の臨床情報が適用される順序が、60 歳以上の患者からのヒト臨床スワブ試料中の $miR-485-3p$ 発現に基づいてアミロイド β 蓄積を診断するための本明細書に開示されるアルゴリズムの診断精度に及ぼす影響を示す。異なる診断パラメータの様々な組み合わせを使用して構築された以下のアルゴリズム、すなわち、(i) $miR-485-3p$ 発現、年齢、性別、及び教育年数(「プレDX」)、(ii) $miR-485-3p$ 発現、年齢、性別、教育年数、APOE 遺伝子型、及び MMSE スコア(「プロDX1」)、及び(iii) $miR-485-3p$ 発現、年齢、性別、教育年数、APOE 遺伝子型、MMSE スコア、及び CDR スコア(「プロDX2」)について生成された平均 AUC (曲線下面積) 値の比較を示す。「AUC」とは、特異性と感度の値の比較から得られる曲線下面積を指す。AUC は ROC 分析により測定した。

20

【図 20 B】異なる患者の臨床情報が適用される順序が、60 歳以上の患者からのヒト臨床スワブ試料中の $miR-485-3p$ 発現に基づいてアミロイド β 蓄積を診断するための本明細書に開示されるアルゴリズムの診断精度に及ぼす影響を示す。B、C、及び D は、A に示される異なるアルゴリズム、すなわち、プレDX、プロDX1、及びプロDX2 の精度データをそれぞれ示す。B、C、及び D のそれぞれにおいて、y 軸は、 $miR-485-3p$ 発現と組み合わされた異なるタイプの臨床情報を示す。矢印は最も正確な組み合わせを表す。四角で囲まれた領域内に示される情報は、最も正確な組み合わせ(すなわち、赤い矢印で表される)の異なる臨床情報がアルゴリズムに適用された特定の順序を表す。B、C、及び D の y 軸は、アルゴリズムに適用される臨床情報のタイプを $miR-485-3p$ 発現の定量値とともに示す。適用された臨床情報は、アンダーバーで分割している。

30

【図 20 C】異なる患者の臨床情報が適用される順序が、60 歳以上の患者からのヒト臨床スワブ試料中の $miR-485-3p$ 発現に基づいてアミロイド β 蓄積を診断するための本明細書に開示されるアルゴリズムの診断精度に及ぼす影響を示す。B、C、及び D は、A に示される異なるアルゴリズム、すなわち、プレDX、プロDX1、及びプロDX2 の精度データをそれぞれ示す。B、C、及び D のそれぞれにおいて、y 軸は、 $miR-485-3p$ 発現と組み合わされた異なるタイプの臨床情報を示す。矢印は最も正確な組み合わせを表す。四角で囲まれた領域内に示される情報は、最も正確な組み合わせ(すなわち、赤い矢印で表される)の異なる臨床情報がアルゴリズムに適用された特定の順序を表す。B、C、及び D の y 軸は、アルゴリズムに適用される臨床情報のタイプを $miR-485-3p$ 発現の定量値とともに示す。適用された臨床情報は、アンダーバーで分割している。

40

【図 20 D】異なる患者の臨床情報が適用される順序が、60 歳以上の患者からのヒト臨床スワブ試料中の $miR-485-3p$ 発現に基づいてアミロイド β 蓄積を診断するための本明細書に開示されるアルゴリズムの診断精度に及ぼす影響を示す。B、C、及び D は、A に示される異なるアルゴリズム、すなわち、プレDX、プロDX1、及びプロDX2 の精度データをそれぞれ示す。B、C、及び D のそれぞれにおいて、y 軸は、 $miR-485-3p$ 発現と組み合わされた異なるタイプの臨床情報を示す。矢印は最も正確な組み

50

合わせを表す。四角で囲まれた領域内に示される情報は、最も正確な組み合わせ（すなわち、赤い矢印で表される）の異なる臨床情報がアルゴリズムに適用された特定の順序を表す。20B、20C、及び20Dのy軸は、アルゴリズムに適用される臨床情報のタイプをmiR-485-3p発現の定量値とともに示す。適用された臨床情報は、アンダーバーで分割している。

【0073】

【図21A】異なる患者の臨床情報が適用される順序が、61歳未満の患者からのヒト臨床スワブ試料中のmiR-485-3p発現に基づいてアミロイドβ蓄積を診断するための本明細書に開示されるアルゴリズムの診断精度に及ぼす影響を示す。プレDXアルゴリズムを使用して決定された精度データを示す。図のそれぞれにおいて、y軸は、miR-485-3p発現と組み合わせられた異なるタイプの臨床情報を示す。矢印は最も正確な組み合わせを表す。四角で囲まれた領域内に示される情報は、最も正確な組み合わせ（すなわち、赤い矢印で表される）の異なる臨床情報がアルゴリズムに適用された特定の順序を表す。

10

【図21B】異なる患者の臨床情報が適用される順序が、61歳未満の患者からのヒト臨床スワブ試料中のmiR-485-3p発現に基づいてアミロイドβ蓄積を診断するための本明細書に開示されるアルゴリズムの診断精度に及ぼす影響を示す。プロDX1アルゴリズムを使用して決定された精度データを示す。図のそれぞれにおいて、y軸は、miR-485-3p発現と組み合わせられた異なるタイプの臨床情報を示す。矢印は最も正確な組み合わせを表す。四角で囲まれた領域内に示される情報は、最も正確な組み合わせ（すなわち、赤い矢印で表される）の異なる臨床情報がアルゴリズムに適用された特定の順序を表す。

20

【図21C】異なる患者の臨床情報が適用される順序が、61歳未満の患者からのヒト臨床スワブ試料中のmiR-485-3p発現に基づいてアミロイドβ蓄積を診断するための本明細書に開示されるアルゴリズムの診断精度に及ぼす影響を示す。プロDX2アルゴリズムを使用して決定された精度データを示す。図のそれぞれにおいて、y軸は、miR-485-3p発現と組み合わせられた異なるタイプの臨床情報を示す。矢印は最も正確な組み合わせを表す。四角で囲まれた領域内に示される情報は、最も正確な組み合わせ（すなわち、赤い矢印で表される）の異なる臨床情報がアルゴリズムに適用された特定の順序を表す。

30

【0074】

【図22A】A及びBは、以下のアルゴリズム、すなわち、(i)プレDX、(ii)プロDX1、及び(iii)プロDX2について、それぞれAUC及び精度の値の比較を示す。Cは、異なる臨床情報がアルゴリズムの精度にどのように影響するかの比較を示す。精度に対する影響は精度補正率として示され、x軸に沿って示される特定の臨床情報と組み合わせた、及び組み合わせない場合のアルゴリズムの精度を比較する。A、B、及びCに示される結果は、61歳以上の患者からの試料に基づいたものである。D及びEは、結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、特定の年齢群に限定されない）点を除いて、A及びBに示したものと同一結果を示す。Fは、結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、特定の年齢群に限定されない）点を除いて、A及びBに示したものと同一結果を示す。

40

【図22B】A及びBは、以下のアルゴリズム、すなわち、(i)プレDX、(ii)プロDX1、及び(iii)プロDX2について、それぞれAUC及び精度の値の比較を示す。Cは、異なる臨床情報がアルゴリズムの精度にどのように影響するかの比較を示す。精度に対する影響は精度補正率として示され、x軸に沿って示される特定の臨床情報と組み合わせた、及び組み合わせない場合のアルゴリズムの精度を比較する。A、B、及びCに示される結果は、61歳以上の患者からの試料に基づいたものである。D及びEは、結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、特定の年齢群に限定されない）点を除いて、A及びBに示したものと同一結果を示す。Fは、結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、特定の年齢群に限定されない）点を除いて、A及びBに

50

示したものと同一結果を示す。

【図 2 2 C】A 及び B は、以下のアルゴリズム、すなわち、(i) プレ D X、(ii) プロ D X 1、及び (iii) プロ D X 2 について、それぞれ A U C 及び精度の値の比較を示す。C は、異なる臨床情報がアルゴリズムの精度にどのように影響するかの比較を示す。精度に対する影響は精度補正率として示され、x 軸に沿って示される特定の臨床情報と組み合わせた、及び組み合わない場合のアルゴリズムの精度を比較する。A、B、及び C に示される結果は、61 歳以上の患者からの試料に基づいたものである。D 及び E は、結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、特定の年齢群に限定されない）点を除いて、A 及び B に示したものと同一結果を示す。F は、結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、特定の年齢群に限定されない）点を除いて、A 及び B に示したものと同一結果を示す。

10

【図 2 2 D】A 及び B は、以下のアルゴリズム、すなわち、(i) プレ D X、(ii) プロ D X 1、及び (iii) プロ D X 2 について、それぞれ A U C 及び精度の値の比較を示す。C は、異なる臨床情報がアルゴリズムの精度にどのように影響するかの比較を示す。精度に対する影響は精度補正率として示され、x 軸に沿って示される特定の臨床情報と組み合わせた、及び組み合わない場合のアルゴリズムの精度を比較する。A、B、及び C に示される結果は、61 歳以上の患者からの試料に基づいたものである。D 及び E は、結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、特定の年齢群に限定されない）点を除いて、A 及び B に示したものと同一結果を示す。F は、結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、特定の年齢群に限定されない）点を除いて、A 及び B に示したものと同一結果を示す。

20

【図 2 2 E】A 及び B は、以下のアルゴリズム、すなわち、(i) プレ D X、(ii) プロ D X 1、及び (iii) プロ D X 2 について、それぞれ A U C 及び精度の値の比較を示す。C は、異なる臨床情報がアルゴリズムの精度にどのように影響するかの比較を示す。精度に対する影響は精度補正率として示され、x 軸に沿って示される特定の臨床情報と組み合わせた、及び組み合わない場合のアルゴリズムの精度を比較する。A、B、及び C に示される結果は、61 歳以上の患者からの試料に基づいたものである。D 及び E は、結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、特定の年齢群に限定されない）点を除いて、A 及び B に示したものと同一結果を示す。F は、結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、特定の年齢群に限定されない）点を除いて、A 及び B に示したものと同一結果を示す。

30

【図 2 2 F】A 及び B は、以下のアルゴリズム、すなわち、(i) プレ D X、(ii) プロ D X 1、及び (iii) プロ D X 2 について、それぞれ A U C 及び精度の値の比較を示す。C は、異なる臨床情報がアルゴリズムの精度にどのように影響するかの比較を示す。精度に対する影響は精度補正率として示され、x 軸に沿って示される特定の臨床情報と組み合わせた、及び組み合わない場合のアルゴリズムの精度を比較する。A、B、及び C に示される結果は、61 歳以上の患者からの試料に基づいたものである。D 及び E は、結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、特定の年齢群に限定されない）点を除いて、A 及び B に示したものと同一結果を示す。F は、結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、特定の年齢群に限定されない）点を除いて、A 及び B に示したものと同一結果を示す。

40

【0 0 7 5】

【図 2 3 A】K 倍交差検証後の患者の口腔スワブ試料における感度、特異性、及び A U C の値を示す。値は、(i) プレ D X（左のグラフ）、(ii) プロ D X 1（中央のグラフ）、及び (iii) プロ D X 2（右のグラフ）のいずれかのアルゴリズムを使用して決定された。A 及び B に示される結果は、2 つの独立した実験からのものである。

【図 2 3 B】K 倍交差検証後の患者の口腔スワブ試料における感度、特異性、及び A U C の値を示す。値は、(i) プレ D X（左のグラフ）、(ii) プロ D X 1（中央のグラフ）、及び (iii) プロ D X 2（右のグラフ）のいずれかのアルゴリズムを使用して決定された。A 及び B に示される結果は、2 つの独立した実験からのものである。

50

【0076】

【図24A】少なくとも61歳の患者からの臨床スワブ試料の診断スコア（左側の棒グラフ）を示す。スコアは、以下の診断パラメータの組み合わせに基づく回帰モデリングを使用して作成した：（i）miR-485-3pの発現及び年齢（A）、（ii）miR-485-3pの発現、年齢、性別、及び教育年数（本明細書では「プレDX」と呼ぶ）（B）、（iii）miR-485-3pの発現、年齢、性別、教育年数、APOE遺伝子型、及びMMSEスコア（本明細書では「プロDX1」と呼ぶ）（C）、（iv）miR-485-3pの発現、年齢、性別、教育年数、APOE遺伝子型、MMSEスコア、及びCDRスコア（本明細書では「プロDX2」と呼ぶ）（D）。患者試料のそれぞれを、アミロイドβの蓄積に基づいて分類した：（i）アミロイドβの蓄積なし（左の棒、すなわちアミロイドPET陰性）（n=19）、または（ii）アミロイドβの蓄積あり（右の棒、すなわちアミロイドPET陽性）（n=20）。miR-485-3pの発現を定量化するため、リアルタイムPCRを平均4.3回繰り返した。箱ひげ図を横切る横のグレーのボックスは、グレーゾーンを表す。グレーゾーンは、各試料のスコアの標準偏差の1/2を最初のカットオフ値に加算及び減算する部分とした。A、B、C、及びDのそれぞれにおいて、右側のROCグラフは、上述の診断パラメータの異なる組み合わせを使用した特異性（y軸）及び感度（x軸）を示している。受信者動作特性（ROC）分析を使用して、以下の値、すなわち、（i）曲線下面積（AUC）、（ii）感度、（iii）特異性、及び（iv）精度を測定した。ROC分析の統計値は、グレーゾーンの結果を除外することによって生成された。ドロップアウト比は、全体の結果のうち、グレーゾーンに含まれない結果の比率であった。矢印で示された丸い点は、グレーゾーンを除いた結果の中で精度が最も高かった特異性及び感度を表す。

10

20

【図24B】少なくとも61歳の患者からの臨床スワブ試料の診断スコア（左側の棒グラフ）を示す。スコアは、以下の診断パラメータの組み合わせに基づく回帰モデリングを使用して作成した：（i）miR-485-3pの発現及び年齢（A）、（ii）miR-485-3pの発現、年齢、性別、及び教育年数（本明細書では「プレDX」と呼ぶ）（B）、（iii）miR-485-3pの発現、年齢、性別、教育年数、APOE遺伝子型、及びMMSEスコア（本明細書では「プロDX1」と呼ぶ）（C）、（iv）miR-485-3pの発現、年齢、性別、教育年数、APOE遺伝子型、MMSEスコア、及びCDRスコア（本明細書では「プロDX2」と呼ぶ）（D）。患者試料のそれぞれを、アミロイドβの蓄積に基づいて分類した：（i）アミロイドβの蓄積なし（左の棒、すなわちアミロイドPET陰性）（n=19）、または（ii）アミロイドβの蓄積あり（右の棒、すなわちアミロイドPET陽性）（n=20）。miR-485-3pの発現を定量化するため、リアルタイムPCRを平均4.3回繰り返した。箱ひげ図を横切る横のグレーのボックスは、グレーゾーンを表す。グレーゾーンは、各試料のスコアの標準偏差の1/2を最初のカットオフ値に加算及び減算する部分とした。A、B、C、及びDのそれぞれにおいて、右側のROCグラフは、上述の診断パラメータの異なる組み合わせを使用した特異性（y軸）及び感度（x軸）を示している。受信者動作特性（ROC）分析を使用して、以下の値、すなわち、（i）曲線下面積（AUC）、（ii）感度、（iii）特異性、及び（iv）精度を測定した。ROC分析の統計値は、グレーゾーンの結果を除外することによって生成された。ドロップアウト比は、全体の結果のうち、グレーゾーンに含まれない結果の比率であった。矢印で示された丸い点は、グレーゾーンを除いた結果の中で精度が最も高かった特異性及び感度を表す。

30

40

【図24C】少なくとも61歳の患者からの臨床スワブ試料の診断スコア（左側の棒グラフ）を示す。スコアは、以下の診断パラメータの組み合わせに基づく回帰モデリングを使用して作成した：（i）miR-485-3pの発現及び年齢（A）、（ii）miR-485-3pの発現、年齢、性別、及び教育年数（本明細書では「プレDX」と呼ぶ）（B）、（iii）miR-485-3pの発現、年齢、性別、教育年数、APOE遺伝子型、及びMMSEスコア（本明細書では「プロDX1」と呼ぶ）（C）、（iv）miR-485-3pの発現、年齢、性別、教育年数、APOE遺伝子型、MMSEスコア、及

50

びCDRスコア（本明細書では「プロDX2」と呼ぶ）（D）。患者試料のそれぞれを、アミロイドβの蓄積に基づいて分類した：（i）アミロイドβの蓄積なし（左の棒、すなわちアミロイドPET陰性）（n=19）、または（ii）アミロイドβの蓄積あり（右の棒、すなわちアミロイドPET陽性）（n=20）。miR-485-3pの発現を定量化するため、リアルタイムPCRを平均4.3回繰り返した。箱ひげ図を横切る横のグレーのボックスは、グレーゾーンを表す。グレーゾーンは、各試料のスコアの標準偏差の1/2を最初のカットオフ値に加算及び減算する部分とした。A、B、C、及びDのそれぞれにおいて、右側のROCグラフは、上述の診断パラメータの異なる組み合わせを使用した特異性（y軸）及び感度（x軸）を示している。受信者動作特性（ROC）分析を使用して、以下の値、すなわち、（i）曲線下面積（AUC）、（ii）感度、（iii）特異性、及び（iv）精度を測定した。ROC分析の統計値は、グレーゾーンの結果を除外することによって生成された。ドロップアウト比は、全体の結果のうち、グレーゾーンに含まれない結果の比率であった。矢印で示された丸い点は、グレーゾーンを除いた結果の中で精度が最も高かった特異性及び感度を表す。

10

【図24D】少なくとも61歳の患者からの臨床スワブ試料の診断スコア（左側の棒グラフ）を示す。スコアは、以下の診断パラメータの組み合わせに基づく回帰モデリングを使用して作成した：（i）miR-485-3pの発現及び年齢（A）、（ii）miR-485-3pの発現、年齢、性別、及び教育年数（本明細書では「プロDX」と呼ぶ）（B）、（iii）miR-485-3pの発現、年齢、性別、教育年数、APOE遺伝子型、及びMMSEスコア（本明細書では「プロDX1」と呼ぶ）（C）、（iv）miR-485-3pの発現、年齢、性別、教育年数、APOE遺伝子型、MMSEスコア、及びCDRスコア（本明細書では「プロDX2」と呼ぶ）（D）。患者試料のそれぞれを、アミロイドβの蓄積に基づいて分類した：（i）アミロイドβの蓄積なし（左の棒、すなわちアミロイドPET陰性）（n=19）、または（ii）アミロイドβの蓄積あり（右の棒、すなわちアミロイドPET陽性）（n=20）。miR-485-3pの発現を定量化するため、リアルタイムPCRを平均4.3回繰り返した。箱ひげ図を横切る横のグレーのボックスは、グレーゾーンを表す。グレーゾーンは、各試料のスコアの標準偏差の1/2を最初のカットオフ値に加算及び減算する部分とした。A、B、C、及びDのそれぞれにおいて、右側のROCグラフは、上述の診断パラメータの異なる組み合わせを使用した特異性（y軸）及び感度（x軸）を示している。受信者動作特性（ROC）分析を使用して、以下の値、すなわち、（i）曲線下面積（AUC）、（ii）感度、（iii）特異性、及び（iv）精度を測定した。ROC分析の統計値は、グレーゾーンの結果を除外することによって生成された。ドロップアウト比は、全体の結果のうち、グレーゾーンに含まれない結果の比率であった。矢印で示された丸い点は、グレーゾーンを除いた結果の中で精度が最も高かった特異性及び感度を表す。

20

30

【0077】

【図25A】結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、いずれの特定の年齢群にも限定されない）点を除いて、図24A、24B、24C、及び24Dに示されたものと同じ結果を示す。

【図25B】結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、いずれの特定の年齢群にも限定されない）点を除いて、図24A、24B、24C、及び24Dに示されたものと同じ結果を示す。

40

【図25C】結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、いずれの特定の年齢群にも限定されない）点を除いて、図24A、24B、24C、及び24Dに示されたものと同じ結果を示す。

【図25D】結果が全患者からの試料に基づいたものである（すなわち、いずれの特定の年齢群にも限定されない）点を除いて、図24A、24B、24C、及び24Dに示されたものと同じ結果を示す。

【0078】

【図26A】ヒト臨床スワブ試料からのmiR-485発現を様々な臨床情報と組み合わ

50

せて、以下の認知障害、すなわち、(i) 正常な認知機能(「NC」)、(ii) 軽度認知障害(「MCI」)、及び(iii) アルツハイマー病(「AD」)を有する患者を診断する能力を示す。以下のパラメータの組み合わせに基づく回帰モデリングを使用して生成された診断スコアの比較を示す：(i) $miR-485-3p$ 発現及び年齢(一番左の棒グラフ、「量」)。(ii) $miR-485-3p$ の発現、年齢、性別、及び教育年数(左から2番目の棒グラフ、「 $PREDX$ 」)。(iii) $miR-485-3p$ の発現、年齢、性別、教育年数、APOE 遺伝子型、及びMMSE スコア(左から3番目の棒グラフ、「 $PREDX1$ 」)。(iv) $miR-485-3p$ の発現、年齢、性別、教育年数、APOE 遺伝子型、MMSE スコア、及びCDR スコア(左から4番目の棒グラフ、「 $PREDX2$ 」)。示された「NC」及び「MCI」群のそれぞれにおいて、左側のボックスはアミロイド β 蓄積なしの患者(すなわち、アミロイドPET陰性)からの試料を表し、右側のボックスはアミロイド β 蓄積ありの患者(すなわち、アミロイドPET陽性)からの試料を表す。「AD」群では、すべての患者がアミロイド β 蓄積について陽性であった(すなわち、アミロイドPET陽性)。示されるQ値は、スチューデントt検定を使用して測定されたp値の $-\log_{10}$ を指す。箱ひげ図を横切る横のグレーのボックスは、グレーゾーンを表す。グレーゾーンは、各試料のスコアの標準偏差の $1/2$ を最初のカットオフ値に加算及び減算する部分とした(方法を参照)。各円は個々の試料を表す。

10

【図26B】ヒト臨床スワブ試料からの $miR-485$ 発現を様々な臨床情報と組み合わせて、以下の認知障害、すなわち、(i) 正常な認知機能(「NC」)、(ii) 軽度認知障害(「MCI」)、及び(iii) アルツハイマー病(「AD」)を有する患者を診断する能力を示す。認知障害診断(すなわち、正常な障害(「NC」)または軽度認知障害(「MCI」)のいずれかを有すると診断された)に基づくアミロイド β 蓄積の予測について以下の値、すなわち、(i) 精度、(ii) AUC、(iii) 感度、及び(iv) 特異性の比較を示す。

20

【図26C】ヒト臨床スワブ試料からの $miR-485$ 発現を様々な臨床情報と組み合わせて、以下の認知障害、すなわち、(i) 正常な認知機能(「NC」)、(ii) 軽度認知障害(「MCI」)、及び(iii) アルツハイマー病(「AD」)を有する患者を診断する能力を示す。Aに記載した診断パラメータの組み合わせ、すなわち、(i) 「量」(1列目)、(ii) 「 $PREDX$ 」(2列目)、(iii) 「 $PREDX1$ 」(3列目)、及び(iv) 「 $PREDX2$ 」(4列目)に基づいて生成された特異性(y軸)及び感度(x軸)の値を示す。上の列は、正常な障害(「NC」)と診断された患者の臨床スワブ試料の結果を示し、下の列は、軽度認知障害(「MCI」)と診断された患者の臨床スワブ試料の結果を示している。Cに示される各グラフの陰付き部分は、ROC分析によって測定されたAUCを表す。矢印で示された丸い点は、グレーゾーンを除いた結果の中で精度が最も高かった特異性及び感度を表す。

30

【発明を実施するための形態】

【0079】

本開示は、一般に、認知障害に罹患した対象(例えば、ヒト対象)を特定することに関し、対象の $miR-485-3p$ レベル(例えば、対象に由来する細胞外小胞などの生体試料中の)を測定することを含む。いくつかの態様では、本明細書に開示される方法は、認知障害に罹患しているものとして特定された対象に $miR-485-3p$ 阻害剤治療を投与することをさらに含む。 $miR-485$ 阻害剤は、少なくとも1つの $miR-485$ 結合部位を含むヌクレオチド分子をコードするヌクレオチド配列を含んでおり、ヌクレオチド分子はタンパク質をコードしていない。いくつかの態様では、 $miRNA$ 結合部位(複数可)は、内因性 $miR-485$ に結合することができ、これにより対象の $miR-485-3p$ の発現レベル及び／または活性を阻害及び／または低減させる。

40

【0080】

記載される特定の組成物またはプロセスステップは無論のこと異なり得ることから、本開示をより詳細に記載するのに先立って、本開示は特定の組成物またはプロセスステップに限定されない点を理解されたい。本開示を読むことで当業者にとって明らかとなるよう

50

に、本明細書に記載及び例示される個々の態様の各々は、本開示の範囲または趣旨から逸脱することなく、他のいくつかの態様のいずれかの特徴から容易に分離するかまたはそれらの特徴と組み合わせることができる個別の構成要素及び特徴を有する。記載されるいずれの方法も、記載される事象の順序で、または論理的に可能な他の任意の順序で実施することが可能である。

【0081】

本明細書に示される見出しは本開示の様々な態様を限定するものではなく、本開示の態様は、本明細書の全体を参照することによって定義され得るものである。本開示の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるものである。本明細書で使用される用語は、あくまで特定の態様を説明することを目的としたものであって、限定することを目的としたものではない点も理解されるべきである。

10

【0082】

I. 用語

本開示をより容易に理解できるように、特定の用語を最初に定義する。本出願で使用する場合、本明細書に別段明記されない限り、以下の用語のそれぞれは、下記に記載する意味を有するものとする。追加の定義は、本出願の全体を通じて記載される。

【0083】

「a」または「an」なる用語で示される実体は、その実体の1つ以上を指し、例えば、「a nucleotide sequence (ヌクレオチド配列)」は、1つ以上のヌクレオチド配列を表すものとして理解される点に留意されたい。したがって、「a」(または「an」)、ならびに「one or more (1つ以上の)」、及び「at least one (少なくとも1つの)」は、本明細書では互換的に用いられる場合がある。各請求項は、あらゆる任意選択的な要素を除外するように起草される場合もある点にも留意されたい。したがって、この記載は、請求項の要素の記載との関連において「～だけの」、「～のみ」などといった除外的な語の使用に対する、または否定による限定の使用に対する先行詞としての役割を有するものとする。

20

【0084】

さらに、「及び／または」は、本明細書において使用される場合、2つの指定された特徴または構成要素の各々の、他方を伴うか、または伴わない具体的な開示とみなされるものである。したがって、本明細書で「A及び／またはB」などの語句で使用される「及び／または」という用語は、「A及びB」、「AまたはB」、「A」(単独)、及び「B」(単独)を含むことが意図される。同様に、「A、B、及び／またはC」といった語句で使用される「及び／または」という用語は、以下の態様、すなわち、A、B、及びC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；A及びC；A及びB；B及びC；A(のみ)；B(のみ)；ならびにC(のみ)のそれぞれを包含するものとする。

30

【0085】

本明細書において「含む (comprising)」という言葉で態様が説明されている場合は常に、「からなる (consisting of)」及び／または「から本質になる (consisting essentially of)」という用語で説明されている他の類似の態様も提供されることを理解されたい。

40

【0086】

別段に定義しない限り、本明細書において使用する全ての技術用語及び科学用語は、本開示が関連する技術分野における当業者により一般に理解されるものと同一の意味を有する。例えば、Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; 及び Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press が、本開示において使用される用語

50

の多くの一般的な辞書を当業者に提供している。

【0087】

単位、接頭辞、及び記号は、それらの国際単位系（SI）で承認された形式で示される。数値範囲は、その範囲を規定する数値を含むものとする。数値の範囲が記載されている場合、その範囲の記載された上限と下限との間にあるそれぞれの介在する整数値、及びそのそれぞれの分数もまた、そのような値の間のそれぞれの部分範囲とともに具体的に開示される点は理解されるべきである。任意の範囲の上限値及び下限値は独立してその範囲に含まれる場合も、その範囲から除外される場合もあるが、どちらかの限界値が含まれるか、どちらの限界値も含まれないか、または両方の限界値が含まれるそれぞれの範囲もまた、本開示に包含される。したがって、本明細書に記載される範囲は、記載される端点を含む、その範囲内のすべての値の簡略的な表記であるものとして理解される。例えば、1～10の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10からなる群からの任意の数、数の組み合わせ、または部分範囲を含むものとして理解される。

10

【0088】

値が明示的に記載されている場合、記載されている値とほぼ同じ数または量である値もまた、本開示の範囲内に含まれる点を理解されたい。ある組み合わせが開示される場合、その組み合わせの要素の部分的な組み合わせのそれぞれも具体的に開示され、本開示の範囲内に含まれる。逆に、異なる要素または要素群が個別に開示される場合、それらの組み合わせも開示される。ある開示の任意の要素が複数の選択肢を有するものとして開示される場合、各選択肢が単独で、または他の選択肢との任意の組み合わせとして除外されるその開示の例もまた、本明細書に開示される。つまり、ある開示の複数の要素がそのような除外を有することができ、そのような除外を有する要素のすべての組み合わせが本明細書に開示される。

20

【0089】

ヌクレオチドは、それらの広く認められている1文字の略号で呼称する。特に断らない限り、ヌクレオチド配列は5'から3'の方向に左から右に記載する。本明細書においてヌクレオチドは、IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される一般的に公知のヌクレオチドの1文字記号により表記される。したがって、「a」はアデニンを表し、「c」はシトシンを表し、「g」はグアニンを表し、「t」はチミンを表し、「u」はウラシルを表す。

30

【0090】

アミノ酸配列はアミノ末端からカルボキシ末端の方向に左から右に記載する。本明細書においてアミノ酸は、IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される、一般的に公知のアミノ酸の3文字記号または1文字記号により表記される。

【0091】

「約」という用語は、本明細書では、およそ、大体、おおよそ、またはその範囲内の意味で使用される。「約」という用語が数値範囲とともに使用される場合、記載される数値よりも上及び下の境界値を広げることによって、その範囲を修飾する。一般に、「約」という用語は、例えば、上または下に10パーセント（より高いまたはより低い）の変動で、明示される値の上及び下に数値を修正することができる。

40

【0092】

本明細書で使用する場合、「アデノ随伴ウイルス」（AAV）なる用語には、これらに限定されるものではないが、AAVタイプ1、AAVタイプ2、AAVタイプ3（タイプ3A及び3Bを含む）、AAVタイプ4、AAVタイプ5、AAVタイプ6、AAVタイプ7、AAVタイプ8、AAVタイプ9、AAVタイプ10、AAVタイプ11、AAVタイプ12、AAVタイプ13、AAVrh.74、ヘビAAV、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、ヒツジAAV、ヤギAAV、エビAAV、Gao et al. (J. Virol. 78:6381 (2004)) 及びMoris et al. (Virol. 33:375 (2004)) に開示されるAAV血清型及び系統群

50

、ならびに現在知られているかもしくは今後発見される他の任意のAAVが含まれる（例えば、FIELDS et al. VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (4th ed., Lippincott-Raven Publishers)を参照）。いくつかの態様では、「AAV」には、既知のAAVの誘導体が含まれる。いくつかの態様では、「AAV」には、改変された、または人工AAVが含まれる。

【0093】

「投与」、「投与すること」なる用語、及びその文法的変化形は、本開示のmiRNA阻害剤などの組成物を、薬学的に許容される経路により対象に導入することを指す。本開示のmiRNA阻害剤を含むミセルなどの組成物の対象への導入は、腫瘍内、経口、肺、鼻腔内、非経口（静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、もしくは皮下）、直腸、リンパ内、髄腔内、眼周または局所を含む任意の好適な経路によるものである。投与は、自己投与及び他者による投与を含む。適当な投与経路によって、組成物または薬剤はその目的とする機能を実行することができる。例えば、適当な経路が静脈内である場合、組成物は、組成物または薬剤を対象の静脈内に導入することによって投与される。

【0094】

本明細書で使用する場合、関心対象の1つ以上の値に適用される「ほぼ」という用語は、明示される参照値と同程度である値を指す。ある特定の態様では、「ほぼ」という用語は、特に明記しない限り、または他のことが文脈から明らかでない限り、明示される参照値の両方向に（数を超えるか、またはそれ未満の）10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下の範囲内の値の範囲を指す（かかる数がとり得る値の100%を超える場合を除く）。

【0095】

本明細書で使用される「～に罹患した」という用語は、「～に罹った」という用語と互換的に使用することができ、本明細書に開示される認知障害を有する状態を指す。いくつかの態様では、認知障害に罹患した対象は、認知障害に関連する1つ以上の症状（例えば、アルツハイマー病患者の記憶喪失）を示す。しかし、当業者には明らかであるように、対象は、本明細書に開示される疾患または障害に罹患している1つ以上の症状を示す必要はない（例えば、疾患または障害に対する遺伝的素因を有し得る）。

【0096】

本明細書で使用する場合、「～に関連した」という用語は、2つ以上の実体または性質間の密接な関係性のことを指す。例えば、本開示によって診断することができる疾患または状態を記述するために用いられる場合（例えば、miRNA、例えばmiR-485-3pの異常なレベルに関連した疾患または状態）、「～に関連した」という用語は、対象がmiRNA（例えば、miR-485-3p）の異常な発現レベルを示す場合に対象がその疾患または状態に罹っている（すなわち、罹患している）可能性が高いことを指す。いくつかの態様では、異常な発現は、疾患または状態を引き起こす。いくつかの態様では、異常な発現は疾患または状態を必ずしも引き起こさないが相関している。対象が、疾患または状態に関連したタンパク質及び／または遺伝子の異常な発現を示すかどうかを判定するために使用することができる適当な方法の非限定的な例は、本開示の他の箇所に示される。

【0097】

本明細書で使用される「異常なレベル」という用語は、本明細書に記載される疾患または状態（例えば、認知障害）を患っていない参照対象とは異なる（例えば、増加した）レベル（発現及び／または活性）を指す。いくつかの態様では、異常なレベル（例えば、miR-485-3pの）とは、参照対象（本明細書に記載される疾患または状態に罹っていない対象）における対応するレベルと比較して、少なくとも約0.1倍、少なくとも約0.2倍、少なくとも約0.3倍、少なくとも約0.4倍、少なくとも約0.5倍、少なくとも約0.6倍、少なくとも約0.7倍、少なくとも約0.8倍、少なくとも約0.9倍、少なくとも約1倍、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約20倍、少なくとも約30倍、少なく

とも約40倍、少なくとも約50倍、少なくとも約75倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍、少なくとも約750倍、または少なくとも約1,000倍以上、増加したレベルを指す。

【0098】

本明細書で使用される場合、「認知障害」という用語は、記憶、学習、認識、注意、コミュニケーション、運動協調及び／または知的能力の障害を含むがこれらに限定されない、精神プロセスに影響を及ぼすあらゆる障害を指す。いくつかの態様では、認知障害は、アルツハイマー病（AD）及び／または軽度認知障害（MCI）である。いくつかの態様では、「認知障害」は、AD、MCI、健忘症、皮質基底層症候群、認知症、レビー小体認知症、前頭側頭型認知症、原発性進行性失語症、進行性非流暢性失語症、進行性核上性麻痺、仮性老年症、意味性認知症、重度認知障害、皮質下認知症、血管性認知症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、及び／またはLogopenic型進行性失語症を指す。いくつかの態様では、認知障害はアミロイドβの蓄積に関連している。

10

【0099】

本明細書で使用する場合、「保存された」という用語は、比較されている2つ以上の配列の同じ位置において不変に見出されるものである、それぞれポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列のヌクレオチドまたはアミノ酸残基を指す。相対的に保存されているヌクレオチドまたはアミノ酸は、配列の他の部分で出現するヌクレオチドまたはアミノ酸と比べてより関連する配列の間で保存されているものである。

20

【0100】

いくつかの態様では、2つ以上の配列は、それらが互いに100%同一である場合、「完全に保存されている」または「同一である」と言われる。いくつかの態様では、2つ以上の配列は、それらが互いに少なくとも70%同一であるか、少なくとも80%同一であるか、少なくとも90%同一であるか、または少なくとも95%同一である場合、「高度に保存されている」と言われる。いくつかの態様では、2つ以上の配列は、互いに約70%同一である、約80%同一である、約90%同一である、約95%、約98%、または約99%同一である場合、「高度に保存された」と言われる。いくつかの態様では、2つ以上の配列は、それらが互いに少なくとも30%同一であるか、少なくとも40%同一であるか、少なくとも50%同一であるか、少なくとも60%同一であるか、少なくとも70%同一であるか、少なくとも80%同一であるか、少なくとも90%同一であるか、または少なくとも95%同一である場合、「保存されている」と言われる。いくつかの態様では、2つ以上の配列は、それらが互いに約30%同一であるか、約40%同一であるか、約50%同一であるか、約60%同一であるか、約70%同一であるか、約80%同一であるか、約90%同一であるか、約95%同一であるか、約98%同一であるか、または約99%同一である場合、「保存されている」と言われる。配列の保存は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの全長に適用することができ、または部分、領域、もしくはそれらの特徴に適用することができる。

30

【0101】

本明細書で使用する場合、「由来する」という用語は、特定の分子もしくは生物または情報（例えば、アミノ酸または核酸の配列）を使用して、特定の分子もしくは生物から単離されるか、製造される構成要素を指す。例えば、第2の核酸配列に由来する核酸配列は、第2の核酸配列のヌクレオチド配列と同一であるか、または実質的に類似するヌクレオチド配列を含み得る。ヌクレオチドまたはポリペプチドの場合、派生した種は、例えば、自然に生じる変異誘発、人為的定方向突然変異誘発、または人為的ランダム変異誘発により得られ得る。ヌクレオチドまたはポリペプチドを派生させるために使用される変異誘発は、意図的に定方向、もしくは意図的にランダムであるか、または各々の組み合わせである。最初のものに由来する異なるヌクレオチドまたはポリペプチドを作製するためのヌクレオチドまたはポリペプチドの変異誘発は、ランダム事象（例えば、ポリメラーゼの不忠実さにより引き起こされる）であり得、派生したヌクレオチドまたはポリペプチドの同定

40

50

は、例えば、本明細書において述べられる適切なスクリーニング法によりなされ得る。一部の態様では、第2のヌクレオチドまたはアミノ酸配列に由来するヌクレオチドまたはアミノ酸配列は、それぞれ第2のヌクレオチドまたはアミノ酸配列に対する少なくとも約50%、少なくとも約51%、少なくとも約52%、少なくとも約53%、少なくとも約54%、少なくとも約55%、少なくとも約56%、少なくとも約57%、少なくとも約58%、少なくとも約59%、少なくとも約60%、少なくとも約61%、少なくとも約62%、少なくとも約63%、少なくとも約64%、少なくとも約65%、少なくとも約66%、少なくとも約67%、少なくとも約68%、少なくとも約69%、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%の配列同一性を有し、ここで、第1のヌクレオチドまたはアミノ酸配列は、第2のヌクレオチドまたはアミノ酸配列の生物活性を保持する。

10

【0102】

本明細書で使用する場合、「コーディング領域」または「コーディング配列」とは、アミノ酸に翻訳可能なコドンからなるポリヌクレオチドの部分である。「終止コドン」(TAG、TGA、またはTAA)は通常はアミノ酸に翻訳されないがコーディング領域の一部とみなすことができる。ただし、すべてのランキング配列、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロンなどはコーディング領域の一部ではない。コーディング領域の境界は、得られるポリペプチドのアミノ末端をコードする5'末端の開始コドンと、得られるポリペプチドのカルボキシ末端をコードする3'末端の翻訳終止コドンとによって一般的に決定される。

20

【0103】

「相補的」及び「相補性」という用語は、ワトソン・クリック型塩基対形成則により互いに関連する2つ以上のオリゴマー(すなわち、それぞれが核酸塩基配列を含む)、またはオリゴマーと標的遺伝子との間を指す。例えば、核酸塩基配列「T-G-A(5'->3')」は、核酸塩基配列「A-C-T(3'->5')」に相補的である。相補性は「部分的」であってよく、その場合、所与の核酸塩基配列の核酸塩基のすべてより少ないものが塩基対形成則に従って他の核酸塩基配列と一致している。例えば、いくつかの態様では、所与の核酸塩基配列と他の核酸塩基配列との間の相補性は、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%であり得る。したがって、特定の態様では、「相補性」という用語は、標的核酸配列(例えば、miR-485の核酸配列)との少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の一致または相補性を指す。または例のような、「完璧な」または「完全な」(100%)相補性が、所与の核酸塩基配列と他の核酸塩基配列との間に存在し得る。いくつかの態様では、核酸塩基配列間の相補性の程度は、配列間のハイブリダイゼーションの効率及び強度に顕著な影響を与える。

30

40

【0104】

本明細書で使用する場合、「診断する」という用語(及びその派生語)は、対象が所定の疾患または状態に罹患しているか、罹っているか、またはリスクがあるか(例えば、遺伝的素因があるか)どうかを判定または予測し、それにより、治療に適した対象を特定するために使用することができる方法を指す。いくつかの態様では、治療は治療的(例えば、疾患または障害に関連する1つ以上の症状を示す対象に投与される)なものであってよ

50

い。いくつかの態様では、治療は予防的（例えば、疾患または障害の発症を予防及び／または低減するためにリスクのある対象に投与される）なものであってよい。本明細書に記載されるように、当業者は、1つ以上の診断マーカー（例えば、miR-485-3p）に基づいて診断を行うことができ、診断マーカーの存在、非存在、量、または量の変化によって、状態の存在、重症度、または非存在が示される。いくつかの態様では、miR-485-3p発現の増加（例えば、対象からの生体試料中の）は、認知障害（例えば、アルツハイマー病）の指標となる。「診断」という用語は、特定の疾患または障害の有無を100%の精度で判断できることを意味せず、または特定の経過もしくは転帰が発生する可能性が、発生しない可能性よりも高いことを意味するものではない。むしろ、当業者には、「診断」という用語は、対象に特定の疾患または障害が存在する確率が高いことを指すことが理解されよう。いくつかの態様では、「診断」という用語は、認知障害（例えば、本明細書に記載のもの）を有する対象を特定する1つ以上の診断方法を含む。

10

【0105】

「下流」という用語は、参照ヌクレオチド配列の3'側に存在するヌクレオチド配列を指す。ある特定の態様では、下流ヌクレオチド配列は、転写開始点に続く配列に関する。例えば、遺伝子の翻訳開始コドンは、転写開始部位の下流に存在する。

【0106】

「賦形剤」及び「キャリア」という用語は、互換的に使用され、化合物、例えば本開示のmiRNA阻害剤の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性物質を指す。

20

【0107】

本明細書で使用する場合、「発現」という用語は、ポリヌクレオチドが遺伝子産物、例えばRNAまたはポリペプチドを生成するプロセスを指す。発現には、マイクロRNA結合部位、小分子ヘアピンRNA（shRNA）、小分子干渉RNA（siRNA）、または他の任意のRNA産物へのポリヌクレオチドの転写が限定されることなく含まれる。発現には、メッセンジャーRNA（mRNA）へのポリヌクレオチドの転写、及びmRNAのポリペプチドへの翻訳が限定されることなく含まれる。発現によって、「遺伝子産物」が生成される。本明細書で使用する場合、遺伝子産物は、例えば遺伝子の転写によって生成されるRNAなどの核酸であってよい。本明細書で使用する場合、遺伝子産物は、核酸、遺伝子の転写によって生成されるRNAもしくはmiRNA、または転写産物から翻訳されたポリペプチドであってよい。本明細書に記載される遺伝子産物には、例えばポリアデニル化またはスプライシングなどの転写後修飾を有する核酸、または、例えばリン酸化、メチル化、グリコシル化、脂質の付加、他のタンパク質サブユニットとの会合、またはタンパク質分解開裂などの翻訳後修飾を有するポリペプチドがさらに含まれる。本明細書で使用する「発現」という用語は、「レベル」という用語と互換的に使用することができる。例えば、いくつかの態様では、「miR-485-3p発現」という用語は、「miR-485-3pレベル」という用語と同義であり得る。

30

【0108】

本明細書で使用する「細胞外小胞」または「EV」という用語は、内部空間を封入する膜を含む細胞由来の小胞を指す。細胞外小胞は、小胞が由来する細胞よりも小さい直径を有するすべての膜結合小胞（例えば、エクソソーム、ナノ小胞、微小小胞）を含む。例として、また、限定することなく、細胞外小胞は、アポトーシス小体、細胞のフラグメント、直接的または間接的操作による細胞由来の小胞（例えば、連続押出またはアルカリ溶液での処理による）、小胞化オルガネラ、及び生細胞により産生される小胞（例えば、直接原形質膜出芽または後期エンドソームの原形質膜との融合による）を含む。細胞外小胞は、生きているもしくは死んだ生物、外植された組織もしくは臓器、原核または真核細胞、及び／または培養された細胞に由来するものであってよい。いくつかの態様では、細胞外小胞は、口腔上皮細胞に由来する（例えば、ヒト臨床スワブ試料に由来する）。いくつかの態様では、細胞外小胞は、血清／血漿に由来する（例えば、ヒト血漿試料に由来する）。いくつかの態様では、細胞外小胞は、エクソソーム、微小小胞、ナノ小胞、またはそれ

40

50

らの組み合わせを含む。特定の態様において、細胞外小胞はエクソソームである。

【0109】

本明細書で使用される「エクソソーム」という用語は、約20nm～約300nmの直径を有する細胞由来の小胞を指す。エクソソームには、テトラスパニンなどの表面マーカー（例えば、CD9、CD37、CD44、CD53、CD63、CD81、CD82及びCD151）；インテグリン、ICAM-1、EpCAM、CD31などのターゲティングまたは接着マーカー；アネキシン、TSG101、ALIXなどの膜融合マーカー；ならびにRab5b、HLA-G、HSP70、LAMP2（リソソーム関連膜タンパク質）及びLIMP（リソソーム内在性膜タンパク質）などの他のエクソソーム膜貫通タンパク質を含む、他の小胞には存在しない特定の表面マーカーが含まれる。

10

【0110】

本明細書で使用される「微小小胞」（MV）という用語は、エクソソームよりも大きい直径を有するEV（すなわち、細胞由来の小胞）のタイプを指す。いくつかの態様では、微小小胞は、約10nm～約5000nm（例えば、約50nm～1500nm、約75nm～1500nm、約75nm～1250nm、約50nm～1250nm、約30nm～1000nm、約50nm～1000nm、約100nm～1000nm、約50nm～750nmなど）の直径を有する。

【0111】

本明細書で使用される「ナノ小胞」という用語は、約20nm～約250nm（例えば、約30nm～約150nm）の直径を有する細胞由来の小胞を指す。

20

【0112】

本明細書で使用される「ヒト口腔由来無細胞エクソソーム」（HOCFE）という用語は、ヒト口腔生体液から単離されたナノサイズの小体（例えば、エキソソーム）を指す。ヒトスワブ試料からHOCFEを単離する例示的な方法は、本開示の他の箇所に示される。

【0113】

本明細書で使用される「相同性」という用語は、ポリマー分子間の、例えば核酸分子間の全体的関連性を指す。一般に、「相同性」という用語は、2つの分子の進化的関係を意味する。したがって、相同な2つの分子は、共通の進化的祖先を有する。本開示との関連で、相同性という用語は、同一性及び類似性の両方を包含する。

30

【0114】

いくつかの態様では、ポリマー分子は、分子における少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%のモノマーが同一（厳密に同じモノマー）であるか、または類似する（保存的置換）場合、互いに「相同である」とみなされる。「相同である」という用語は、必然的に少なくとも2つの配列（ポリヌクレオチド配列）間の比較を指す。

【0115】

本開示との関連で、置換（それらがアミノ酸置換と称される場合でも）は、核酸レベルで行われ、すなわち、アミノ酸残基を代替アミノ酸残基で置換することは、第1のアミノ酸をコードするコドンで第2のアミノ酸をコードするコドンで置換することによって行われる。

40

【0116】

本明細書で使用する場合、「同一性」という用語は、ポリマー分子間の、例えば、ポリヌクレオチド分子間の全体的なモノマー保存性を指す。いかなる追加の修飾語もない「同一である」という用語、例えば、「ポリヌクレオチドAはポリヌクレオチドBと同一である」は、ポリヌクレオチド配列同士が100%同一（100%の配列同一性）であることを意味する。例えば、「70%同一である」と2つの配列を表現することは、例えば、「

50

70%配列同一性」を有するとそれらを表現することに等しい。

【0117】

2つのポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列の同一率(%)の計算は、例えば、最適な比較のために2つの配列をアラインメントすることにより実行され得る(例えば、最適なアラインメントのために第1及び第2のポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列の一方または両方にギャップが導入され得、同一でない配列が比較のために無視され得る)。ある特定の態様において、比較目的のためにアラインメントされた配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%である。次いで、対応するアミノ酸位のアミノ酸、またはポリヌクレオチドの場合は塩基が比較される。

10

【0118】

第1の配列におけるある位置が第2の配列における対応する位置と同じアミノ酸またはヌクレオチドにより占められる場合、分子はその位置で同一である。2つの配列間の同一率(%)は、2つの配列の最適なアラインメントのために導入される必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮した、配列により共有される同一の位置の数の関数である。配列の比較及び2つの配列間の同一率(%)の決定は、数学アルゴリズムを使用して達成され得る。

【0119】

異なる配列同士(例えば、ポリヌクレオチド配列)をアラインするために使用することができる適当なソフトウェアプログラムは様々なソースから入手可能である。配列同一率(%)を決定するための適当なプログラムの1つに、米国政府のNational Center for Biotechnology Information BLAST ウェブサイト(blast.ncbi.nlm.nih.gov)から入手可能なBLASTパッケージプログラムの一部であるbl2seqがある。Bl2seqは、BLASTNまたはBLASTPアルゴリズムのいずれかを使用して、2つの配列間の比較を行う。BLASTNが核酸配列を比較するために使用されるのに対して、BLASTPはアミノ酸配列を比較するために使用される。他の適当なプログラムとしては、例えば、バイオインフォマティクスプログラムパッケージEMBOSSの一部であり、European Bioinformatics Institute (EBI)よりworldwide web.ebi.ac.uk/Tools/psaにおいてやはり入手可能なNeedle、Stretcher、Water、またはMatcherがある。

20

30

【0120】

配列アラインメントは、当該技術分野において公知の方法、例えば、MAFFT、Clustal (ClustalW、Clustal X、またはClustal Omega)、MUSCLEなどを使用して実施され得る。

【0121】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチド参照配列と整列する単一のポリヌクレオチドまたはポリペプチド標的配列内の異なる領域は、それぞれ、それら自体の配列同一率(%)を有することができる。配列同一率(%)は、10分の1の位に四捨五入される点に留意されたい。例えば、80.11、80.12、80.13、及び80.14は、80.1に切り捨てられ、80.15、80.16、80.17、80.18、及び80.19は80.2に切り上げられる。また、長さの値は常に整数である点に留意されたい。

40

【0122】

ある特定の態様では、同一性パーセンテージ(%ID)または第1のアミノ酸配列(または核酸配列)の第2のアミノ酸配列(または核酸配列)に対する同一性パーセンテージ(%ID)は、 $\%ID = 100 \times (Y/Z)$ として計算され、式中、Yは、第1及び第2の配列のアラインメント(目視検査または特定の配列アラインメントプログラムによりアラインメントされる)において完全な一致と評価されたアミノ酸残基(または核酸塩基)の数であり、Zは、第2の配列における残基の総数である。第1の配列の長さが第2の配列

50

を超える場合、第1の配列の第2の配列に対する同一率(%)は、第2の配列の第1の配列に対する同一率(%)より高くなるであろう。

【0123】

当業者であれば、配列同一率(%)を計算するための配列アラインメントの生成が、一次配列データによってのみ行われるバイナリー配列間比較に限定されない点は理解されよう。配列アラインメントは、配列データを異種の供給源由来のデータ、例えば、構造データ(例えば、タンパク質結晶構造)、機能データ(例えば、変異の位置)、または系統学的データと統合することにより生成され得ることも理解されよう。異種のデータを統合して多重配列アラインメントを生成する好適なプログラムは、www.tcoffee.orgで利用可能であり、代替的に例えば、EBIから利用可能なT-Coffeeである。配列同一率(%)を計算するために使用される最終的なアラインメントは、自動または手動のいずれかで管理され得ることも理解されよう。

10

【0124】

本明細書で使用する場合、「単離された」、「精製された」、「抽出された」という用語、及びそれらの文法的変化形は、互換的に使用され、1つ以上の精製プロセスを受けた本開示の所望の組成物、例えば、本開示のmiRNA阻害剤の調製状態を指す。いくつかの態様では、本明細書で使用する場合、単離または精製は、夾雑物を含有する試料から本開示の組成物、例えば本開示のmiRNA阻害剤を取り出す、(例えば、画分を)部分的に取り出すプロセスである。

20

【0125】

いくつかの態様では、単離された組成物は、検出可能な望ましくない活性を有さないか、または代替的に、望ましくない活性のレベルもしくは量が許容可能なレベルまたは量以下である。他の態様では、単離された組成物は、許容可能な量及び／または濃度及び／または活性以上の量及び／または濃度の本開示の所望の組成物を有する。他の態様では、単離された組成物は、組成物が取得される出発物質と比較して濃縮される。この濃縮は、出発物質と比較して少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.9%、少なくとも約99.99%、少なくとも約99.999%、少なくとも約99.9999%、または99.9999%超であり得る。

30

【0126】

いくつかの態様では、単離された調製物は、残留する生物学的産物を実質的に含まない。いくつかの態様では、単離された調製物は、任意の混入している生物学的物質を100%、少なくとも約99%、少なくとも約98%、少なくとも約97%、少なくとも約96%、少なくとも約95%、少なくとも約94%、少なくとも約93%、少なくとも約92%、少なくとも約91%、または少なくとも約90%含まない。残留する生物学的産物は、非生物物質(化学物質を含む)または不要な核酸、タンパク質、脂質、もしくは代謝産物を含み得る。

【0127】

40

本明細書で使用する場合、「連結された」という用語は、共有結合または非共有結合によりそれぞれ第2のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列に結合された、第1のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列を指す。第1のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列は、第2のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列に直接的に結合もしくは並列され得るか、または代替的に介在配列が第1の配列から第2の配列までに共有結合により加わり得る。「連結された」という用語は、第1のポリヌクレオチド配列の第2のポリヌクレオチド配列への5'末端または3'末端での融合を意味するだけでなく、第2のポリヌクレオチド配列(または第1のポリヌクレオチド配列)における任意の2つのヌクレオチドへの第1のポリヌクレオチド配列(またはそれぞれ第2のポリヌクレオチド配列)全体の挿入も含む。第1のポリヌクレオチド配列は、ホスホジエステル結合またはリンカーにより第2

50

のポリヌクレオチド配列に連結され得る。リンカーは、例えば、ポリヌクレオチドであり得る。

【0128】

本明細書で使用する場合、「miRNA阻害剤」とは、miRNAの発現、機能、及び／または活性を減少させるか、変化させるか、及び／または調節することができる化合物を指す。miRNA阻害剤は、標的miRNA核酸配列と少なくとも部分的に相補的であるポリヌクレオチド配列であってよく、それにより、miRNA阻害剤は標的miRNA配列とハイブリダイズする。例えば、miR-485-3p阻害剤は、標的miR-485-3p核酸配列と少なくとも部分的に相補的であるヌクレオチド分子をコードしたヌクレオチド配列を含み、それにより、miR-485-3p阻害剤はmiR-485-3p配列とハイブリダイズする。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤のmiR-485-3p配列へのハイブリダイゼーションは、miR-485-3pの発現、機能、及び／または活性を減少、変化、及び／または調節する。

10

【0129】

「miRNA」、「miR」、及び「マイクロRNA」という用語は、互換的に使用され、RNAによる遺伝子調節に関与する真核生物において見出されるマイクロRNA分子を指す。この用語は、前駆体からプロセシングされた一本鎖RNA分子を指すために使用される。いくつかの態様では、「アンチセンスオリゴマー」という用語は、本開示のマイクロRNA分子を記述するために使用することもできる。本開示に関連するmiRNAの名称及びそれらの配列は、本明細書において提供される。マイクロRNAは、不完全な塩基対形成により標的mRNAを認識及びそれに結合し、標的mRNAの不安定化または翻訳阻害をもたらす、これにより、標的遺伝子発現を下方調節する。逆に、miRNA結合部位を含む分子（一般にmiRNAのシード領域に相補的な配列を含む分子）によるmiRNAの標的化は、miRNAにより誘発される翻訳阻害を低減または阻害し得、標的遺伝子の上方調節をもたらす。

20

【0130】

「ミスマッチ」または「複数のミスマッチ」という用語は、オリゴマー核酸塩基配列（例えば、miR-485-3p阻害剤）における塩基対形成則に従って標的核酸配列（例えば、miR-485-3p）と一致しない1つ以上の核酸塩基（連続しているまたは離れているにもかかわらず）を指す。多くの場合、完全な相補性が所望されるが、いくつかの態様では、標的核酸配列に対する1つ以上（好ましくは6つ、5つ、4つ、3つ、2つ、または1つ）のミスマッチが生じ得る。オリゴマー内の任意の位置でのバリエーションが含まれる。ある特定の態様では、本開示のアンチセンスオリゴマー（例えば、miR-485-3p阻害剤）は、末端近くでの核酸塩基配列のバリエーション、内部でのバリエーションを含み、存在する場合、通常、5'及び／または3'末端の約6、5、4、3、2、または1サブユニット以内に存在する。いくつかの態様では、1つ、2つ、または3つの核酸塩基が除去されてもよく、依然としてオンターゲットの結合を与えることができる。

30

【0131】

本明細書で使用する場合、「調節する」、「修飾する」という用語、及びそれらの文法的变化形は、一般に、特定の濃度、レベル、発現、機能、または行動に適用される場合、例えば、アンタゴニストまたはアゴニストとして作用するために、特定の濃度、レベル、発現、機能、または行動を増加または減少させること、例えば、直接または間接的に、促進すること／刺激すること／上方調節することまたはそれらに干渉すること／それらを阻害すること／それらを下方調節することにより変化させる能力を指す。場合によっては、修飾因子は、ある特定の濃度、レベル、活性、または機能を、コントロールと比較して、または一般に予想される活性の平均レベルと比較して、もしくは活性のコントロールレベルと比較して増加及び／または減少させ得る。いくつかの態様では、本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤は、miR-485-3pの発現、機能及び／または活性を調節することができる。

40

【0132】

50

サイクル閾値（Ct）を説明するために本明細書で使用される「ナイーブ」という用語は、未処理のCt値（すなわち、PCRアッセイから直接測定され、さらなる計算を行わない）を指す。

【0133】

「核酸」、「核酸分子」、「ヌクレオチド配列」、「ポリヌクレオチド」、及びそれらの文法的変化形は、互換的に使用され、一本鎖形態または二重螺旋のいずれかでのリン酸エステルポリマー形態のリボヌクレオシド（アデノシン、グアノシン、ウリジン、またはシチジン；「RNA分子」）もしくはデオキシリボヌクレオシド（デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、またはデオキシシチジン；「DNA分子」）、またはそれらの任意のホスホエステルアナログ、例えば、ホスホロチオネート及びチオエステルを指す。一本鎖核酸配列は、一本鎖DNA（ssDNA）または一本鎖RNA（ssRNA）を指す。二本鎖DNA-DNA、DNA-RNA、及びRNA-RNA螺旋が可能である。核酸分子及び特にDNAまたはRNA分子という用語は、分子の一次及び二次構造のみを指し、任意の特定の三次形態に限定されない。したがって、この用語は、とりわけ線形または環状DNA分子（例えば、制限フラグメント）、プラスミド、スーパーコイルDNA、及び染色体に見出される二本鎖DNAを含む。特定の二本鎖DNA分子の構造について述べる際、配列は、DNAの非転写鎖（すなわち、mRNAに相同な配列を有する鎖）に沿った5'～3'方向での配列のみを提供する通常の慣例に従って本明細書に記載され得る。「組換えDNA分子」は、分子生物学的操作を受けたDNA分子である。DNAとしては、限定されるものではないが、cDNA、ゲノムDNA、プラスミドDNA、合成DNA、及び半合成DNAが挙げられる。本開示の「核酸組成物」は、本明細書に記載されるような1つ以上の核酸を含む。

10

20

【0134】

「薬学的に許容されるキャリア」、「薬学的に許容される賦形剤」という用語、及びそれらの文法的変化形は、ヒトを含む動物に使用するための米国連邦政府の規制機関により承認されたか、または米国薬局方に列挙される薬剤のいずれか、ならびに対象への組成物の投与を禁止する程度まで望ましくない生理作用の発生を引き起こさず、投与される化合物の生物活性及び特性を抑制しない任意のキャリアまたは希釈剤を包含する。医薬組成物を調製するのに有用であり、一般に安全で、非毒性であり、望ましい賦形剤及び担体が含まれる。

30

【0135】

本明細書で使用する場合、「医薬組成物」という用語は、1種以上の他の化学成分、例えば、薬学的に許容されるキャリア及び賦形剤と混合もしくは混ぜ合わされたか、またはそれらの中に懸濁された、例えば、本開示のmiRNA阻害剤などの本明細書に記載される化合物のうちの1種以上を指す。医薬組成物の1つの目的は、本開示のmiRNA阻害剤を含む製剤の対象への投与を促進することである。

【0136】

本明細書で使用する場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、それらのアナログ、またはそれらの混合物が挙げられるヌクレオチドの任意の長さのポリマーを指す。

40

【0137】

いくつかの態様では、この用語は分子の一次構造を指す。したがって、この用語は、三本鎖、二本鎖、及び一本鎖デオキシリボ核酸（「DNA」）、ならびに三本鎖、二本鎖、及び一本鎖リボ核酸（「RNA」）を含む。この用語は、例えば、アルキル化及び／またはキャッピングにより修飾されたポリヌクレオチド及び未修飾形態のポリヌクレオチドも含む。

【0138】

いくつかの態様では、「ポリヌクレオチド」という用語は、ポリデオキシリボヌクレオチド（2-デオキシ-D-リボースを含有する）、スプライシングされたまたはスプライシングされていないにかかわらず、tRNA、rRNA、shRNA、siRNA、mi

50

R N A 及び m R N A を含む、ポリリボヌクレオチド（D-リボースを含有する）、プリンまたはピリミジン塩基の N-または C-配糖体である任意の他の種類のポリヌクレオチド、ならびに非ヌクレオチド骨格を含有する他のポリマー、例えば、ポリアミド（例えば、ペプチド核酸「P N A」）及びポリモルホリノポリマー、ならびに D N A 及び R N A において見出されるような塩基対形成及び塩基スタッキングを可能にする配置で核酸塩基を含有することを条件とする他の配列特異的合成核酸ポリマーを含む。

【0139】

本開示のいくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどのオリゴヌクレオチドであってよい。いくつかの態様では、オリゴヌクレオチドは、R N A である。いくつかの態様では、R N A は、合成 R N A である。いくつかの態様では、合成 R N A は、少なくとも 1 つの非天然核酸塩基を含む。いくつかの態様では、ある特定の種類のすべての核酸塩基が、非天然核酸塩基と置き換えられている（例えば、本明細書において開示されるポリヌクレオチドにおけるすべてのウリジンが、非天然核酸塩基、例えば、5-メトキシウリジンと置き換えられ得る）。

10

【0140】

「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」という用語は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを呼称するうえで本明細書で互換的に使用される。ポリマーは、修飾アミノ酸を含み得る。これらの用語は、自然に修飾された、または、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識成分との結合など、他の任意の操作もしくは改変などの介入により修飾されたアミノ酸ポリマーも包含される。例えば、1 つ以上のアミノ酸アナログ（例えば、ホモシステイン、オルニチン、p-アセチルフェニルアラニン、D-アミノ酸、及びクレアチンなどの非天然アミノ酸が挙げられる）、及び当該技術分野において公知の他の修飾を含有するポリペプチドも定義の範囲内に含まれる。本明細書で使用する場合、「ポリペプチド」という用語は、任意のサイズ、構造、または機能のタンパク質、ポリペプチド、及びペプチドを指す。

20

【0141】

ポリペプチドとしては、遺伝子産物、天然に存在するポリペプチド、合成ポリペプチド、上述のもののホモログ、オーソログ、パラログ、フラグメント及び他の等価物、バリエーション、ならびにアナログが挙げられる。

【0142】

ポリペプチドは、単一のポリペプチドであり得るか、またはダイマー、トリマー、もしくはテトラマーなどの多分子複合体であり得る。それらは、一本鎖または多連鎖ポリペプチドも含み得る。最も一般的に、ジスルフィド結合は、多鎖ポリペプチドに見られる。ポリペプチドという用語は、1 つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学的アナログであるようなアミノ酸ポリマーにも適用され得る。いくつかの態様では、「ペプチド」は、アミノ酸約 50 個以下の長さ、例えば、アミノ酸約 5 個、約 10 個、約 15 個、約 20 個、約 25 個、約 30 個、約 35 個、約 40 個、約 45 個、または約 50 個の長さであり得る。

30

【0143】

本明細書で使用する場合、「予防する」、「予防すること」という用語、及びそれらの変化形は、疾患、障害、及び／または状態の発症を部分的または完全に遅延させること；特定の疾患、障害、及び／または状態の 1 つ以上の症状、特徴、または臨床徴候の発症を部分的または完全に遅延させること；特定の疾患、障害、及び／または状態の 1 つ以上の症状、特徴、または徴候の発症を部分的または完全に遅延させること；特定の疾患、障害、及び／または状態の進行を部分的または完全に遅延させること；及び／または疾患、障害、及び／または状態に関連する病理を生じるリスクを減少させることを指す。いくつかの態様では、転帰の予防は、予防的治療によって実現される。

40

【0144】

本明細書で使用する場合、「プロモーター」及び「プロモーター配列」という用語は互換可能であり、コーディング配列または機能性 R N A の発現を制御することができる D N

50

A 配列を指す。一般的に、コーディング配列は、プロモーター配列の 3' 側に位置する。プロモーターは、天然遺伝子にその全体が由来してもよく、または自然界にみられる異なるプロモーターに由来する異なるエレメントで構成されてもよく、またはさらには、合成 DNA セグメントを含んでもよい。異なるプロモーターは、異なる組織または細胞タイプにおいて、または発生の異なる段階において、または異なる環境的もしくは生理学的条件に応じて、遺伝子の発現を誘導することができる点は、当業者には理解されよう。ほとんどの細胞タイプでほとんどの時間に遺伝子を発現させるプロモーターは一般的に「構成的プロモーター」と呼ばれる。特定の細胞タイプにおいて遺伝子を発現させるプロモーターは、一般的に「細胞特異的プロモーター」または「組織特異的プロモーター」と呼ばれる。発生または細胞分化の特定の段階で遺伝子を発現させるプロモーターは、一般的に「発生特異的プロモーター」または「細胞分化特異的プロモーター」と呼ばれる。プロモーターを誘導する薬剤、生物学的分子、化学物質、リガンド、光などによる細胞の曝露または処理後に誘導されて遺伝子を発現させるプロモーターは、一般的に「誘導性プロモーター」または「調節可能なプロモーター」と呼ばれる。多くの場合で調節配列の正確な境界は完全には定義されていないことから、異なる長さの DNA フラグメントが同じプロモーター活性を有し得る点もさらに認識されよう。

10

20

30

40

50

【0145】

プロモーター配列の境界はその 3' 末端では転写開始部位であり、バックグラウンドよりも高い検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最小の数の塩基またはエレメントを含むように上流 (5' 方向) に延びている。プロモーター配列内には、転写開始部位 (例えばヌクレアーゼ S1 によるマッピングによって簡便に定義される) ばかりでなく、RNA ポリメラーゼの結合に関与するタンパク質結合ドメイン (コンセンサス配列) も見出される。いくつかの態様では、本開示とともに使用することができるプロモーターには、組織特異的プロモーターが含まれる。

【0146】

本明細書で使用する場合、「予防」とは、疾患もしくは状態の発症を予防するために、または疾患もしくは状態に関連する症状を予防または遅延させるために使用される治療的行動または行動方針を指す。

【0147】

本明細書で使用する場合、「予防法」は、健康を維持し、疾患または状態の発症を予防するために、または疾患もしくは状態に関連する症状を予防もしくは遅延させるために取られる手段を指す。

【0148】

本明細書で使用する場合、「遺伝子調節領域」または「調節領域」という用語は、コーディング領域の上流 (5' 側のノンコーディング配列)、その内部、またはその下流 (3' 側のノンコーディング配列) に位置して、転写、RNA プロセッシング、または関連するコーディング領域の翻訳に影響を及ぼすヌクレオチド配列を指す。調節領域には、プロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化認識配列、RNA プロセッシング部位、エフェクター結合部位、またはステムループ構造が含まれ得る。コーディング領域が真核細胞内での発現のためのものである場合、ポリアデニル化シグナル及び転写終結配列がコーディング配列の 3' 側に通常は配置される。

【0149】

いくつかの態様では、本明細書に開示される miR-485-3p 阻害剤 (例えば、1 つ以上の miR-485-3p 結合部位を含む RNA をコードしたポリヌクレオチド) は、1 つ以上のコーディング領域と機能的に関連付けられたプロモーター及び／または他の発現 (例えば、転写) 制御エレメントを含むことができる。機能的関連付けにおいて、遺伝子産物のコーディング領域は、1 つ以上の調節領域 (複数可) と、その遺伝子産物の発現が調節領域の影響または制御下に置かれるようにして関連付けられる。例えば、コーディング領域とプロモーターとは、プロモーター機能の誘導が、そのコーディング領域によってコードされた mRNA の転写をもたらし、かつプロモーターとコーディング領域との

連結の性質が、プロモーターが遺伝子産物の発現を誘導する能力を妨げず、またはDNA鋳型が転写される能力も妨げない場合に、「機能的に関連付けられている」。プロモーター以外の他の発現制御エレメント、例えば、エンハンサー、オペレーター、リプレッサー、及び転写終結シグナルを、遺伝子産物の発現を誘導するようにコーディング領域と機能的に関連付けることもできる。

【0150】

本明細書で使用する場合、「類似性」という用語は、ポリマー分子間の、例えば、ポリヌクレオチド分子（例えばmiRNA分子）間の全体的関連性を指す。ポリマー分子同士の互いに対する類似率（%）の計算は、類似率（%）の計算が当該技術分野で理解される場所の保存的置換を考慮している点を除いて、同一率（%）の計算と同様にして行うことができる。類似率（%）は、用いられる比較尺度、すなわち、核酸同士が、例えばそれらの進化的な近さ、電荷、体積、柔軟性、極性、疎水性、芳香族性、等電点、抗原性、またはそれらの組み合わせのどれにしたがって比較されるかによって左右されることが理解される。

10

【0151】

「対象」、「患者」、「個体」、及び「宿主」なる用語、及びそれらの変化形は、本明細書において互換的に使用され、限定されるものではないが、ヒト、家庭用動物（例えば、イヌ、ネコなど）、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマなど）、及び実験動物（例えば、サル、ラット、マウス、ウサギ、モルモットなど）が挙げられる、診断、処置、または治療が所望される任意の哺乳動物対象、特にヒトを指す。本明細書に記載される方法は、ヒトの治療及び獣医学的用途の両方に適用可能である。

20

【0152】

本明細書で使用する場合、「治療有効量」という用語は、所望の治療効果、薬理学的、及び／または生理学的效果をもたらす必要がある対象において所望の治療効果、薬理学的、及び／または生理学的效果をもたらすのに十分な、本開示のmiRNA阻害剤を含む試薬または医薬化合物の量である。治療上有効量は、予防が治療とみなされ得る場合、「予防上有効量」であり得る。

【0153】

本明細書で使用する場合、「処置する」、「処置」、または「処置すること」という用語は、例えば、疾患または状態の重症度の低減、疾患経過の期間の低減、疾患または状態（例えば、糖尿病）に関連する1つ以上の症状の改善または除去、疾患または状態を必ずしも治療しない、疾患または状態を有する対象に対する有益な効果の提供を指す。この用語には、疾患もしくは状態またはその症状の予防または防止も含まれる。

30

【0154】

「上流」という用語は、参照ヌクレオチド配列の5'側に位置するヌクレオチド配列を指す。

【0155】

「ベクター」とは、宿主細胞内に核酸をクローニング及び／または導入するための任意の担体を指す。ベクターは、結合されたセグメントの複製をもたらすように別の核酸セグメントを結合させることができるレプリコンとすることができる。「レプリコン」とは、インビボで自律的な複製ユニットとして機能する（すなわち、それ自身の制御下で複製することができる）任意の遺伝子エレメント（例えば、プラスミド、ファージ、コスミド、染色体、ウイルス）のことを指す。「ベクター」という用語には、細胞に核酸をインビトロ、エクスピボ、またはインビボで導入するためのウイルス性及び非ウイルス性の担体が含まれる。例えば、プラスミド、改変真核生物ウイルス、または改変細菌ウイルスを含む数多くのベクターが当該技術分野で知られており、使用されている。適当なベクターへのポリヌクレオチドの挿入は、適当なポリヌクレオチドフラグメントを、相補的な粘着末端を有する選択されたベクターにライゲートすることによって行うことができる。

40

【0156】

ベクターは、ベクターを取り込んだ細胞の選択または特定を可能とする選択マーカーま

50

たはレポーターをコードするように操作することができる。選択マーカーまたはレポーターの発現によって、ベクターに含まれる他のコーディング領域を取り込んで発現する宿主細胞を特定し、及び／または選択することが可能となる。当該技術分野において知られ、使用されている選択マーカーの例としては、アンピシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ヒグロマイシン、ピアラホス除草剤、スルホンアミドなどに対する耐性を与える遺伝子、ならびに表現型マーカーとして用いられる遺伝子、すなわち、アントシアン調節遺伝子、イソペンテニル基転移酵素遺伝子などが挙げられる。当該技術分野において知られ、使用されているレポーターの例としては、ルシフェラーゼ（Luc）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、β-ガラクトシダーゼ（LacZ）、β-グルクロニダーゼ（Gus）などが挙げられる。選択マーカーはレポーターとみなすこともできる。

10

【0157】

II. 診断方法

本明細書では、認知障害の診断を必要とする対象において認知障害を診断する方法を開示する。いくつかの態様では、かかる方法は、認知障害に罹患した対象を特定することを含む。いずれの1つの理論にも束縛されるものではないが、出願人は、特定の認知障害を有する対象では、認知障害に罹患していない対象と比較して、miR-485-3pのレベルが高いことを明らかにした。したがって、いくつかの態様では、本開示は、認知障害に罹患した対象（例えば、ヒト対象）を特定する方法であって、対象のmiR-485-3pレベルを測定することを含み、参照（例えば、認知障害に罹患していない対象における対応する値、または認知障害の発症前の対象における対応する値）と比較した対象のmiR-485-3pレベルの増加が、対象が認知障害に罹患していることを示唆する、方法を提供する。

20

【0158】

いくつかの態様では、対象におけるmiR-485-3pのレベルは、参照（例えば、認知障害に罹患していない対象における対応する値または認知障害の発症前の対象における対応する値）と比較して、少なくとも約1%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約125%、少なくとも約150%、少なくとも約175%、少なくとも約200%、少なくとも約225%、少なくとも約250%、少なくとも約275%、少なくとも約300%、少なくとも約400%、少なくとも約500%、少なくとも約1,000%以上、増加している。

30

【0159】

本明細書に記載されるように、いくつかの態様では、miR-485-3pレベルは、対象の生体試料で測定される。したがって、いくつかの態様では、認知障害に罹患した対象を特定する方法は、miR-485-3p発現を測定する前に、対象から生体試料を得ることを含む。いくつかの態様では、生体試料は、目的の分子（例えば、miR-485-3p）の発現レベルを測定するために使用できる対象の任意の細胞、組織、及び／または体液を含む。いくつかの態様では、生体試料は、組織、細胞、血液、血清、血漿、唾液、脳脊髄液、硝子体内液、尿、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの態様では、生体試料は、対象の上皮細胞に由来する。特定の態様では、上皮細胞は、例えば、スワブ試料によって得ることができるものなどの口腔上皮細胞を含む。いくつかの態様では、生体試料は、対象の血清及び／または血漿に由来する。

40

【0160】

マイクロRNA（miRNA）は、多くの哺乳動物細胞タイプ（例えば、口腔上皮細胞）に存在するだけでなく、細胞外小胞（例えば、エクソソーム）内の体液によって輸送もされ得る。細胞外液に放出されると、エクソソームは他の細胞と融合し、そのカーゴをレシピエント細胞に移行させることができる。したがって、いくつかの態様では、miR-

50

485-3 p 発現を測定することができる生体試料は、細胞外小胞を含む。特定の態様において、細胞外小胞は微小小胞を含む。特定の態様では、細胞外小胞はエクソソームを含む。いくつかの態様では、細胞外小胞はナノ小胞を含む。

【0161】

本明細書に記載されるように、出願人は、miR-485-3 p の発現レベルと認知障害の1つ以上の特徴との間に正の相関があることを示した。例えば、いくつかの態様では、miR-485-3 p 発現量の増加は、対象におけるアミロイドβプラークの形成につながり得るアミロイドβ蓄積の増加と関連している。いくつかの態様では、miR-485-3 p の発現レベルが高いほど、対象におけるアミロイドβの蓄積は多い。

【0162】

いくつかの態様では、認知障害を診断する方法は、対象の認知障害の1つ以上の特徴の存在を評価すること（例えば、測定すること）を含み得る。したがって、いくつかの態様では、本開示は、認知障害の1つ以上の特徴の測定を必要とする対象における認知障害の1つ以上の特徴を測定する方法であって、対象のmiR-485-3 p レベルを測定することを含み、対象のmiR-485-3 p レベルが、認知障害の1つ以上の特徴と正の相関がある、方法を提供する。特定の態様では、認知障害の1つ以上の特徴の存在は、対象が認知障害に罹患していることを示す。いくつかの態様では、認知障害の1つ以上の特徴は、アミロイドβの蓄積を含む。したがって、いくつかの態様では、本明細書に開示される診断方法は、アミロイドβの蓄積に関連する認知障害に罹患した対象を特定するうえで有用であり得る。そのような認知障害の非限定的な例としては、アルツハイマー病（AD）、前頭側頭型認知症（FTD）、脳血管性認知症（CVD）、軽度認知障害（MCI）、レビー小体型認知症（DLB）、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

【0163】

いくつかの態様では、本明細書に開示される方法は、アルツハイマー病に罹患している対象を特定するために使用することができる。特定の態様では、アルツハイマー病は、前認知症型アルツハイマー病、早期アルツハイマー病、中度アルツハイマー病、進行型アルツハイマー病、早期発症型家族性アルツハイマー病、炎症性アルツハイマー病、非炎症性アルツハイマー病、皮質性アルツハイマー病、早期発症型アルツハイマー病、後期発症型アルツハイマー病、またはこれらの任意の組み合わせを含む。

【0164】

当業者には明らかであるように、対象のmiR-485-3 p 発現は、当該技術分野では周知の様々な手段によって測定することができる。miR-485-3 p 発現を測定するために使用できるアッセイの非限定的な例としては、PCR（例えば、リアルタイムPCR）、ノーザンブロット、液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）、質量分析法（MS）、次世代シーケンシング（NGS）（例えば、Ion Torrent）、ナノストリング、マイクロアレイ、ELISA（アプタマー）、RNA免疫沈降法（RIP）、RNA インサイチュールハイブリダイゼーション、RNA 蛍光インサイチュールハイブリダイゼーション（FISH）、及びそれらの組み合わせが挙げられる。いくつかの態様では、miR-485-3 p 発現は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）アッセイを使用して測定することができる。PCRアッセイを使用する場合、いくつかの態様では、miR-485-3 p の発現を測定するために、表1（下記）に示されるプライマーのいずれかを使用することができる。いくつかの態様では、miR-485-3 p プライマーは、miR-485-3 p__FW7を含む。いくつかの態様では、miR-485-3 p プライマーは、miR-485-3 p__FW2を含む。いくつかの態様では、miR-485-3 p プライマーは、miR-485-3 p__FW1を含む。いくつかの態様では、miR-485-3 p プライマーは、miR-485-3 p__FW9を含む。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. miR-485-3p プライマー配列

オリゴヌクレオチド名	配列 (5' → 3' 方向)
miR-485-3p __FW1	GTCATACACGGCTCTCCTCTCT (配列 番号 94)
miR-485-3p __FW2	TCATACACGGCTCTCCTCTC (配列番号 95)
miR-485-3p __FW3	CATACACGGCTCTCCTCTC (配列番号 9 6)
miR-485-3p __FW4	CATACACGGCTCTCCTCTCTA (配列番 号 97)
miR-485-3p __FW5	CATACACGGCTCTCGTCTC (配列番号 9 8)
miR-485-3p __FW6	CATACACGGCTCTCGTCTCTAA (配列 番号 99)
miR-485-3p __FW7	GTCATACACGGCTCTCCTCTCTAA (配列番号 100)
miR-485-3p __FW8	GTCATACACGGCTCTCCTC (配列番号 1 01)
miR-485-3p __FW9	CATACACGGCTCTCCTCTCTAAA (配 列番号 52)
miR-485-3p __FW10	GTCATACACGGCTCTCCTCTG (配列番 号 102)
miR-485-3p __FW11	TCATACACGGCTCTCCTCTCT (配列番 号 103)
miR-485-3p __FW12	TCATACACGGCTCTCCTC (配列番号 10 4)
miR-485-3p __FW13	TCATACACGGCTCTCCTCTCTAA (配 列番号 105)
miR-485-3p __FW14	CATACACGGCTCTCCTCTCTAA (配列 番号 106)
miR-485-3p __FW15	ATACACGGCTCTCCTCTCTAA (配列番 号 107)

【0165】

いくつかの態様では、miR-485-3p の発現（例えば、対象の生体試料中の）は、リアルタイムPCRアッセイを使用して測定される。かかる態様では、miR-485-3p のサイクル閾値（Ct）数を決定することにより、miR-485-3p 発現を評価することができる。本明細書で使用される場合、「サイクル閾値」（Ct）という用語は、産物の生成による蛍光の量が、ベースライン値を超える（すなわち、バックグラウンドレベルを超える）一定の閾値に達するリアルタイムPCRアッセイのサーマルサイクリングにおけるサイクル数（すなわち、増幅回数）を指す。Ctレベルは、試料中に存在するmiR-485-3p のレベルに反比例する（すなわち、Ctレベルが低いほど、試料

中に存在する $miR-485-3p$ のレベルが高い)。

【0166】

いくつかの態様では、認知障害（例えば、本明細書に記載されるもの）に罹患した対象における Ct 値は、参照（例えば、認知障害に罹患していない対象における対応する値または認知障害の発症前の対象における対応する値）と比較して、少なくとも約 1%、少なくとも約 2%、少なくとも約 3%、少なくとも約 4%、少なくとも約 5%、少なくとも約 6%、少なくとも約 7%、少なくとも約 8%、少なくとも約 9%、少なくとも約 10%、少なくとも約 15%、少なくとも約 20%、少なくとも約 25%、少なくとも約 30%、少なくとも約 35%、少なくとも約 40%、少なくとも約 45%、少なくとも約 50%、少なくとも約 55%、少なくとも約 60%、少なくとも約 65%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、または少なくとも約 95% 以上、減少している。

10

【0167】

いずれの 1 つの理論にも束縛されるものではないが、いくつかの態様では、本明細書に開示される診断方法は、対象における $miR-485-3p$ の発現と認知障害の 1 つ以上の特徴（例えば、アミロイド β の蓄積）の存在との間の関連に基づいて、認知障害に罹患した対象を特定することができる。いくつかの態様では、 $miR-485-3p$ のレベルと認知障害の 1 つ以上の特徴の存在とは正の相関がある。特定の態様では、1 つ以上の特徴の存在が高い場合、認知障害の重症度を示している。したがって、いくつかの態様では、本開示は、認知障害の重症度を決定する必要がある対象における認知障害の重症度を決定する方法であって、対象の $miR-485-3p$ レベルを測定することを含み、 $miR-485-3p$ レベルが重症度と正の相関がある、方法に関連する。

20

【0168】

本明細書に記載されるように、いくつかの態様では、対象の $miR-485-3p$ レベルを、対象に関する 1 つ以上の追加の臨床情報と組み合わせることにより、 $miR-485-3p$ 発現を使用して認知障害に罹患した対象を特定する診断精度を向上させることができる。使用できる追加の臨床情報の非限定的な例としては、年齢、性別、教育年数（またはレベル）、アポリポrotein E (APOE) 遺伝子型、精神状態短時間検査 (MMSE) スコア、認知障害、臨床認知症評価 (CDR) スコア、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

30

【0169】

追加の臨床情報の 1 つ以上のものを対象の $miR-485-3p$ レベルと組み合わせるために、異なる臨床情報について数値が確立されている（例えば、実施例 3 を参照）。いくつかの態様では、追加の臨床情報は年齢であり、年齢に関連付けられた値は、 $miR-485-3p$ 発現を測定した時点での対象の年齢である。いくつかの態様では、追加の臨床情報は患者の性別であり、男性は値「1」に関連付けられ、女性は値「2」に関連付けられる。いくつかの態様では、追加の臨床情報は、0～16 の範囲の値に関連付けられた患者の総教育年数である。修了した学年（つまり、小学校、中学校、高校、及び大学）の 1 年ごとに患者は教育年数として値「1」を受け取る。小学校の場合、患者は 1～6 までの値を受け取ることができる（つまり、小 1 から小 6 まで）。中学校の場合、患者は 1～3 までの追加の値を受け取ることができる（つまり、中 1 から中 3 まで）。高校の場合、患者は 1～3 までの追加の値を受け取ることができる（つまり、高 1 から高 2 まで）。大学の場合、患者は 1～4 までの追加の値を受け取ることができる。例えば、4 年制大学を卒業した患者は、教育年数の最大値 16 を受け取ることになる。高校を卒業したが大学に進学しなかった患者は、教育年数として 12 の値を受け取ることになる。小学校及びそれよりも高等教育に進学しなかった患者は、教育年数として値 0 を受け取る。

40

【0170】

いくつかの態様では、追加の臨床情報は、患者の APOE 遺伝子型であり、(i) $E2/E3=1$ 、(ii) $E3/E3=1$ 、(iii) $E2/E4=2$ 、(iv) $E3/E4=2$ 、及び (v) $E4/E4=4$ である。本明細書で使用する「アポリタンパク質 E

50

」(APOE)という用語は、血中リポタンパク質の5つの主なタイプ(A~E)のうちの1つを指す。APOE遺伝子は、E2、E3、及びE4の3つの異なる形態(対立遺伝子)で存在する。すべてのヒト対象は、これら3つの一部の組み合わせであるAPOE遺伝子のペアを受け継ぐ。APOE e4は、遅発性アルツハイマー病(すなわち、65歳以降に発症する)のリスク増加に関連していると記載されている(Liu et al., Nat Rev Neurol 9(2):106-118 (Feb. 2013))。

【0171】

いくつかの態様では、追加の臨床情報は、対象の精神状態短時間検査(MMSE)(フォルスタインテストとしても知られる)スコアである。「精神状態短時間検査」(MMSE)という用語は、認知障害を測定するために臨床及び研究環境で広く使用されている30点満点のアンケートを指す(Arevalo-Rodriguez et al., Cochrane Database Syst Rev (3):CD010783 (Mar. 2015))。いくつかの態様では、MMSEスコアは、表2(下記)に示すカテゴリーに基づいている。特定の態様において、24点以上のMMSEスコアは、正常な認知機能を示す。いくつかの態様では、MMSEスコアが9点以下の場合、重度の認知障害を示す。いくつかの態様では、10~18点のMMSEスコアは、中度の認知障害を示す。いくつかの態様では、19~23点のMMSEスコアは、軽度の認知障害を示す。

【表2】

表2. 精神状態短時間検査(MMSE)のカテゴリー

カテゴリー	可能なポイント	説明
時間に関する見当識	5	最も広いものから最も狭いものまで。時間に関する見当識は、将来の認知機能低下との相関が示されている。
場所に関する見当識	5	最も広いものから最も狭いものまで。これは通りに絞られることもあれば、階数に絞られることもある。
即時想起	3	名前付きプロンプトの繰り返し
注意と計算能力	5	シリアルセブン、または「world」を逆に綴る。英語が母国語ではない集団では、シリアルセブンの方がより適切である可能性が示唆されている
短期記憶	3	遅延再生
言語	2	鉛筆と時計の呼称を言う
復唱	1	文章を繰り返して言う
空間認知	6	図形的能力。示された図を描画することを含む

【0172】

いくつかの態様では、認知障害に罹患した対象を特定するために、対象のmiR-485-3p発現レベルを、上記の追加の臨床情報のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、または5つすべて(すなわち、年齢、性別、教育年数、APOE遺伝子型、及びMMSEスコア)と組み合わせて使用する。

【0173】

いくつかの態様では、対象のmiR-485-3p発現は、上記の追加の臨床情報の5つすべてと組み合わせて使用される。かかる態様では、組み合わせの診断精度は、下式を用いて特定の生体試料のスコアを計算することによって評価することができる:(나이브CT × (年齢 × V1年齢 + V2年齢)) × (性別 × V1性別 + V2性別) × (APOE × V1APOE + V2APOE) × (MMSE × V1MMSE + V2MMSE) × (教育年数 × V1EDU + V2EDU), (式中、V1及びV2は、特定の追加の臨床情報に関連した

回帰係数の値（すなわち、それぞれ回帰曲線の傾き及び切片）である）。

【0174】

いくつかの態様では、対象の $miR-485-3p$ 発現は、上記の追加の臨床情報のうちの2つと組み合わせて使用される。特定の態様では、追加の臨床情報は、性別及び教育年数を含む。かかる態様では、組み合わせの診断精度は、下式を用いて特定の生体試料のスコアを計算することによって評価することができる： $(\text{ナイーブCT} \times (\text{性別} \times V1_{\text{性別}} + V2_{\text{性別}})) \times (\text{教育年数} \times V1_{\text{EDU}} + V2_{\text{EDU}})$ 、（式中、 $V1$ 及び $V2$ は、特定の追加の臨床情報に関連付けられた回帰係数の値である。）。

【0175】

いくつかの態様では、対象の $miR-485-3p$ 発現は、上記の追加の臨床情報のうちの1つと組み合わせて使用される。特定の態様において、追加の臨床情報は性別である。かかる態様では、組み合わせの診断精度は、下式を用いて特定の生体試料のスコアを計算することによって評価することができる： $(\text{ナイーブCT} \times (\text{性別} \times V1_{\text{性別}}) + V2_{\text{性別}})$ 、（式中、 $V1$ 及び $V2$ は、特定の追加の臨床情報に関連付けられた回帰係数の値である。）。

【0176】

いくつかの態様では、 $miR-485-3p$ 発現と本明細書に記載の臨床情報のうちの1つ以上との組み合わせの診断精度は、表9に示される等式（本明細書では式またはアルゴリズムとも呼ばれる）のいずれかを使用して評価することができる。

【0177】

いくつかの態様では、上記の組み合わせのいずれか1つにおける認知障害に罹患した対象に由来する生体試料のスコアは、参照試料（例えば、認知障害に罹患していない対象または認知障害の発症前の対象からの）の対応するスコアよりも小さい。特定の態様では、認知障害に罹患した対象に由来する生体試料のスコアは、参照試料の対応するスコアと比較して、少なくとも約1%、少なくとも約2%、少なくとも約3%、少なくとも約4%、少なくとも約5%、少なくとも約6%、少なくとも約7%、少なくとも約8%、少なくとも約9%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%以上、小さい。

【0178】

いくつかの態様では、本明細書に開示される診断方法は、認知障害を診断するための他の方法と組み合わせて使用することができる。かかる追加の方法の非限定的な例としては、コンピュータ断層撮影法（CT）、磁気共鳴画像法（MRI）、または陽電子放出断層撮影法（PET）などの脳スキャンが挙げられる。いくつかの態様では、本明細書に開示される診断方法を使用して、例えば、脳卒中、腫瘍、パーキンソン病、睡眠障害、投薬の副作用、感染症、軽度の認知障害、または血管性認知症を含む非アルツハイマー型認知症などの、本明細書に記載される認知障害と同様の症状を引き起こし得る他の病状を除外することができる。

【0179】

III. 治療方法

本明細書に記載される診断に基づいて、認知障害（例えば、本明細書に記載されるもの）の治療、制御、改善、または軽減を必要とする対象における認知障害を治療、制御、改善、または軽減する方法も本明細書に開示される。したがって、いくつかの態様では、本明細書に開示される方法は、認知障害に罹患しているものとして特定された対象に治療を投与することを含む。いくつかの態様では、治療は、認知障害を治療、制御、改善、または軽減することができる。

【0180】

いくつかの態様では、治療は、本明細書に開示される認知障害に関連する1つ以上の症

10

20

30

40

50

状を治療、制御、改善、または軽減することができる任意の薬剤（例えば、治療薬）を含むことができる。本明細書に記載される認知障害に関連する症状の非限定的な例としては、記憶喪失、頻繁に同じ質問をしたり、同じ話を何度も繰り返すこと、よく知っている人や場所を認識するのが難しいこと、判断を下す（例えば、緊急時に何をすべきかが分かる）ことが難しいこと、気分または行動の変化、視覚障害、作業を計画して実行する（例えば、レシピに従う、または毎月の請求書を記録する）ことが困難であること、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

【0181】

いくつかの態様では、治療は、miR-485-3p活性を阻害する化合物（「miR-485-3p阻害剤」）を含む。本明細書に開示される方法で使用するmiR-485-3p阻害剤に関するさらなる開示は、本開示の他の箇所に示される（例えば、セクションIVを参照）。

10

【0182】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、対象におけるmiR-485-3p活性を、参照（例えば、miR-485-3p阻害剤で治療されていない対応する対象におけるmiR-485-3p活性）と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約6%、少なくとも約7%、少なくとも約8%、少なくとも約9%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%以上、減少させる。

20

【0183】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を本明細書に記載される対象に投与することは、対象におけるmiR-485-3pの発現及び／またはレベルを、参照（例えば、miR-485-3p阻害剤で治療されていない対応する対象におけるmiR-485-3pの発現及び／またはレベル）と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約6%、少なくとも約7%、少なくとも約8%、少なくとも約9%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%以上、減少させる。

30

【0184】

いくつかの態様では、miR-485-3pの活性及び／または発現の低下は、認知障害に罹患しているものとして特定された対象におけるアミロイドベータ（A β ）プラーク負荷を、参照（例えば、投与前の対象におけるアミロイドベータ（A β ）プラーク負荷またはmiR-485-3p阻害剤で治療されていない対応する対象におけるアミロイドベータ（A β ）プラーク負荷）と比較して、減少させることができる。本明細書で使用する場合、「アミロイドベータプラーク」とは、大きな凝集体及び数個のアミロイドベータペプチドの小さな会合体を含むアミロイドベータの異常な沈着のあらゆる形態を指し、アミロイドベータペプチドのあらゆる変異を含み得る。アミロイドベータ（A β ）プラークは、例えば、シナプス組成、シナプス形状、シナプス密度の異常、シナプス伝導性の喪失、樹状突起径の変化、樹状突起長さの変化、スパイン密度の変化、スパイン面積の変化、スパイン長さの変化、またはスパインヘッド径の変化などの神経細胞変化を引き起こすことが知られている。いくつかの態様では、本明細書に記載されるmiR-485-3p阻害剤を投与することは、対象（例えば、神経変性疾患に罹患している）におけるアミロイドベータプラーク負荷を、参照（例えば、miR-485阻害剤を投与しなかった対象）と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約

40

50

20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または約100%、低下させる。

【0185】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、認知障害の1つ以上の症状の発症または発症のリスクを、参照（例えば、miR-485阻害剤を投与しなかった対応する対象）と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または約100%低下させる。

10

【0186】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、参照（例えば、投与前の対象における記憶喪失またはmiR-485-3p阻害剤で治療していない対応する対象における記憶喪失）と比較して記憶喪失を低減させる。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を投与することは、記憶喪失または記憶喪失の発症のリスクを、参照（例えば、miR-485阻害剤を投与しなかった対応する対象）と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または約100%低下させる。

20

【0187】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、参照（例えば、投与前の対象における記憶保持またはmiR-485-3p阻害剤で治療されていない対応する対象における記憶保持）と比較して記憶保持を改善させる。いくつかの態様では、本開示のmiR-485-3p阻害剤を投与することは、記憶保持を、参照（例えば、miR-485阻害剤を投与しなかった対応する対象）と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、または少なくとも約300%以上、改善及び／または増加させる。

30

【0188】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、参照（例えば、投与前の対象における空間作業記憶またはmiR-485阻害剤で治療していない対応する対象における空間作業記憶）と比較して空間作業記憶を改善する。本明細書で使用する場合、「空間作業記憶」という用語は、短期間にわたる作業記憶における空間情報活動を維持する能力を指す。いくつかの態様では、空間作業記憶は、参照（例えば、miR-485阻害剤を投与しなかった対応する対象）と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、または少なくとも約300%以上、改善される。

40

50

【0189】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、対象におけるスカベンジャー細胞（例えば、グリア細胞）の食作用活性を、参照（例えば、投与前の対象における食作用活性またはmiR-485-3p阻害剤で治療されていない対応する対象における食作用活性）と比較して、増加させる。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を投与することは、対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）における神経細胞の樹状突起スパイン密度を、参照（例えば、miR-485阻害剤を投与しなかった対応する対象）と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、または約300%以上、増加させる。

10

【0190】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、神経発生を、参照（例えば、投与前の対象における神経発生またはmiR-485で治療されていない対応する対象における神経発生）と比較して増加させる。本明細書で使用する場合、「神経発生」という用語は、神経細胞が形成されるプロセスを指す。神経発生は、神経幹細胞及び前駆細胞の増殖、これらの細胞の新たな神経細胞タイプへの分化、ならびに新しい細胞の遊走及び生存を包含する。この用語は、主として出生前及び周産期の発生の正常な発生中に生じる神経発生、ならびに疾患、傷害、または治療介入後に生じる細胞再生を含むものとする。成人の神経発生は、「神経」または「神経系」発生とも呼ばれる。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を投与することは、対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）における神経発生を、参照（例えば、miR-485阻害剤を投与しなかった対応する対象）と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、または約300%以上、増加させる。

20

30

【0191】

いくつかの態様では、神経発生を増加及び／または誘導することは、神経幹細胞及び／または前駆細胞の増殖、分化、遊走、及び／または生存率の増加をとみなす。したがって、いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、対象の神経幹細胞及び／または前駆細胞の増殖を増加させることができる。特定の態様では、神経幹細胞及び／または前駆細胞の増殖は、参照（例えば、miR-485阻害剤を投与しなかった対応する対象）と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、または少なくとも約300%以上、増加する。いくつかの態様では、神経幹細胞及び／または前駆細胞の生存率は、参照（例えば、miR-485阻害剤を投与しなかった対応する対象）と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、または少なくとも約300%以上、増加する。

40

【0192】

いくつかの態様では、神経発生を増加及び／または誘導することは、神経幹細胞及び／または前駆細胞の数の増加をとみなす。特定の態様では、神経幹細胞及び／または前駆細胞

50

胞の数は、参照（例えば、miR-485阻害剤を投与しなかった対応する対象）と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、または少なくとも約300%以上、増加する。

【0193】

いくつかの態様では、神経発生を増加及び／または誘導することは、軸索、樹状突起、及び／またはシナプス発生の増加をとまなう。特定の態様では、軸索、樹状突起、及び／またはシナプス発生は、参照（例えば、miR-485阻害剤を投与しなかった対応する対象）と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、または少なくとも約300%以上、増加する。

【0194】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、対象におけるアミロイドベータプラーク負荷の発達を防止及び／または阻害することができる。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、対象におけるアミロイドベータプラーク負荷の発達の開始を遅延させることができる。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、アミロイドベータプラーク負荷の発達のリスクを低下させる。

【0195】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、対象におけるニューロンの樹状突起棘密度を、参照（例えば、投与前の対象におけるニューロンの樹状突起棘密度またはmiR-485-3p阻害剤で治療されていない対応する対象におけるニューロンの樹状突起棘密度）と比較して増加させる。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を投与することは、対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）における樹状突起スパイン密度を、参照（例えば、miR-485阻害剤を投与しなかった対応する対象）と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、または少なくとも約300%以上、増加させる。

【0196】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、対象における神経細胞の樹状突起スパインの喪失を、参照（例えば、投与前の対象における神経細胞の樹状突起スパインの喪失またはmiR-485-3p阻害剤で治療されていない対応する対象における神経細胞の樹状突起スパインの喪失）と比較して、減少させる。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を投与することは、対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）における神経細胞の樹状突起スパインの喪失を、参照（例えば、miR-485-3p阻害剤を投与しなかった対応する対象）と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、

少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、または約 100 % 減少させる。

【0197】

いくつかの態様では、miR-485-3p 阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、対象における神経炎症を、参照（例えば、投与前の対象における神経炎症または miR-485-3p 阻害剤で治療されていない対応する対象における神経炎症）と比較して、減少させる。特定の態様では、miR-485-3p 阻害剤を投与することは、神経炎症を、参照（例えば、miR-485-3p 阻害剤を投与しなかった対応する対象）と比較して、少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、または約 100 % 減少させる。いくつかの態様では、神経炎症の減少は、グリア細胞が産生する炎症性メディエーターの量が減少することを含む。したがって、特定の態様では、miR-485-3p 阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、グリア細胞が産生する炎症性メディエーターの量を、参照（例えば、miR-485 阻害剤を投与しなかった対応する対象）と比較して、少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、または約 100 % 減少させる。いくつかの態様では、グリア細胞が産生する炎症性メディエーターは、TNF- α を含む。いくつかの態様では、炎症性メディエーターは、IL-1 β を含む。いくつかの態様では、グリア細胞が産生する炎症性メディエーターは、TNF- α 及び IL-1 β の両方を含む。

【0198】

いくつかの態様では、miR-485-3p 阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、対象におけるオートファジーを増加させる。本明細書で使用する場合、「オートファジー」という用語は、細胞ストレス応答ならびに細胞恒常性を維持するために長寿命タンパク質、タンパク質凝集体、及び損傷したオルガネラの分解を担う生存経路のことを指す。いくつかの態様では、miR-485-3p 阻害剤を投与することは、オートファジーを、参照（例えば、miR-485-3p 阻害剤を投与しなかった対応する対象）と比較して少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 100 %、少なくとも約 150 %、少なくとも約 200 %、または少なくとも約 300 % 以上、増加させる。

【0199】

いくつかの態様では、miR-485-3p 阻害剤を対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）に投与することは、シナプス機能を、参照（例えば、投与前の対象におけるシナプス機能）と比較して改善する。本明細書で使用する場合、「シナプス機能」という用語は、細胞（例えば、神経細胞）のシナプスが別の細胞（例えば、神経細胞）に電気的または化学的信号を伝達する能力を指す。いくつかの態様では、miR-485-3p 阻害剤を投与することは、対象（例えば、認知障害を有するものとして特定された）におけるシナプス機能を、参照（例えば、miR-485 阻害剤を投与しなかった対

応する対象)と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、または少なくとも約300%以上、改善する。

【0200】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を対象(例えば、認知障害を有するものとして特定された)に投与することは、対象におけるシナプス機能の喪失を、参照(例えば、投与前の対象におけるシナプス機能の喪失またはmiR-485-3p阻害剤で治療されなかった対応する対象におけるシナプス機能の喪失)と比較して、予防、遅延、及び/または改善することができる。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤を投与することは、対象(例えば、認知障害を有するものとして特定された)におけるシナプス機能の喪失を、参照(例えば、対応する)と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または約100%予防、遅延、及び/または改善する。

【0201】

いくつかの態様では、本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤は、当該技術分野では周知の任意の適当な経路で投与することができる。特定の態様では、miR-485-3p阻害剤は、補足的投与、筋肉内投与、皮下投与、点眼、静脈内投与、腹腔内投与、皮内投与、眼窩内投与、脳内投与、頭蓋内投与、脳室内投与、脊髄内投与、心室内投与、髄腔内投与、大槽内投与、嚢内投与、腫瘍内投与、またはそれらの任意の組み合わせで投与される。

【0202】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤は、1つ以上のさらなる治療薬と併用することができる。いくつかの態様では、さらなる治療薬とmiR-485-3p阻害剤とは同時に投与される。特定の態様において、さらなる治療薬とmiR-485-3p阻害剤とは順次投与される。

【0203】

いくつかの態様では、本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤は副作用を生じない。特定の態様では、本開示のmiR-485-3p阻害剤は、対象に投与される際に体重に悪影響を及ぼさない。いくつかの態様では、本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤は、対象に投与される際に死亡率の増加をもたらさず、病理学的異常も引き起こさない。

【0204】

IV. 本開示で有用なmiRNA-485-3p阻害剤

本開示では、miR-485-3p活性を阻害することができる化合物を開示する(miR-485-3p阻害剤)。いくつかの態様では、本開示のmiR-485-3p阻害剤は、少なくとも1つのmiR-485-3p結合部位を含むヌクレオチド分子をコードするヌクレオチド配列を含んでおり、ヌクレオチド分子はタンパク質をコードしていない。本明細書に記載されるように、いくつかの態様では、miR-485-3p結合部位は、標的miRNA核酸配列(すなわち、miR-485-3p)と少なくとも部分的に相補的であるため、miR-485-3p阻害剤はmiR-485-3pの核酸配列とハイブリダイズする。

【0205】

いくつかの態様では、本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤のmiR-485-3p結合部位は、miR-485-3pの核酸配列と、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%の配列同一性を有する。特定の態様では、miR-485-3p結合部位は、miR-485-3pの核酸配列と完全に相補的である。

【0206】

miR-485-3pのヘアピン前駆体はmiR-485-3pを生成することができる。ヒト成熟miR-485-3pは、配列5'-GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU-3'（配列番号1；miRBaseアクセッション番号MIMAT0002176）を有する。miR-485-3pの5'-UCAUACA-3'（配列番号49）の5'末端配列はシード配列である。

10

【0207】

当業者には明らかであるが、ヒト成熟miR-485-3pは、他の種のもものと相当の配列類似性を有している。例えば、マウス成熟miR-485-3pは、ヒト成熟miR-485-3pと、5'末端及び3'末端のそれぞれで1個のアミノ酸が異なっている（すなわち、5'末端に余分な「A」があり、3'末端の「C」がない）。マウス成熟miR-485-3pは以下の配列を有する：

20

【化6】

5'-AGUCAUACACGGCUCUCCUCUCU-3'

（配列番号34；miRBaseアクセッション番号MIMAT0003129；下線部はヒト成熟miR-485-3pとの重複部分に相当する）。このような配列の類似性のため、いくつかの態様では、本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤は、例えば、ヒト及びマウスなどの1つ以上の種に由来するmiR-485-3pに結合することができる。

【0208】

いくつかの態様では、miR-485-3p結合部位は、miR-485-3pの配列（またはその部分配列）と相補的（例えば、完全に相補的）な一本鎖のポリヌクレオチド配列である。いくつかの態様では、miR-485-3pの部分配列は、シード配列を含む。したがって、特定の態様では、miR-485-3p結合部位は、配列番号49に記載される核酸配列と、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%の配列相補性を有する。特定の態様では、miR-485-3p結合部位は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のミスマッチを除いてmiR-485-3pと相補的である。さらなる態様では、miR-485-3p結合部位は、配列番号1に記載される核酸配列と完全に相補的である。

30

40

【0209】

miRNAのシード領域は、標的mRNAと緊密な二重鎖を形成する。多くのmiRNAは、標的mRNAの3'非翻訳領域（UTR）と不完全に塩基対合し、miRNAの5'近位の「シード」領域が対合特異性の大部分を与える。いずれの理論にも束縛されるものではないが、最初の9個のmiRNAヌクレオチド（シード配列を含む）がより高い特異性を与えるのに対して、この領域の3'側のmiRNAヌクレオチドはより低い配列特異性を与え、それにより、より高度のミスマッチした塩基対合を許容し、2～7位が最も重要であると考えられる。したがって、本開示の特定の態様では、miR-485-3p結合部位は、miR-485-3pのシード配列の全長にわたって完全に相補的（すなわち

50

、100%の相補性)な配列を含む。

【0210】

本開示との関連で使うことができるmiRNA配列及びmiRNA結合配列としては、これらに限定されるものではないが、本明細書に示される配列表の配列の全部または一部、ならびにmiRNA前駆体配列、またはこれらのmiRNAのうちの1つ以上のものの相補体が挙げられる。その配列が、示されるmiRNAの成熟配列またはその相補的配列と少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%同一であるようなmiRNAまたはその相補的配列を含めるために名前による特定のmiRNAまたはmiRNA結合部位を含む本開示のあらゆる態様も想到される。

10

【0211】

特定の態様では、本開示のmiRNA結合配列は、改変された配列がmiR-485-3pに依然として特異的に結合できる限り、本明細書で提供される配列表に示される配列の5'末端、3'末端、または5'末端及び3'末端の両方にさらなるヌクレオチドを含んでもよい。いくつかの態様では、本開示のmiRNA結合配列は、改変された配列がmiR-485-3pに依然として特異的に結合できる限り、提供される配列表に示される配列に対して、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のヌクレオチドにおいて異なり得る。

20

【0212】

miRNA結合分子またはmiRNAに関して本明細書に記載されるあらゆる方法及び組成物は、合成miRNA結合分子に関して実施することができる点も具体的に想到される。本開示のRNA配列に関連した開示は、対応するDNA配列に等しく適用できる点も理解されよう。

30

【0213】

いくつかの態様では、本開示のmiR-485阻害剤は、ヌクレオチド配列の5'末端に少なくとも1個のヌクレオチド、少なくとも2個のヌクレオチド、少なくとも3個のヌクレオチド、少なくとも4個のヌクレオチド、少なくとも5個のヌクレオチド、少なくとも6個のヌクレオチド、少なくとも7個のヌクレオチド、少なくとも8個のヌクレオチド、少なくとも9個のヌクレオチド、少なくとも10個のヌクレオチド、少なくとも11個のヌクレオチド、少なくとも12個のヌクレオチド、少なくとも13個のヌクレオチド、少なくとも14個のヌクレオチド、少なくとも15個のヌクレオチド、少なくとも16個のヌクレオチド、少なくとも17個のヌクレオチド、少なくとも18個のヌクレオチド、少なくとも19個のヌクレオチド、または少なくとも20個のヌクレオチドを含む。いくつかの態様では、miR-485阻害剤は、ヌクレオチド配列の3'末端に少なくとも1個のヌクレオチド、少なくとも2個のヌクレオチド、少なくとも3個のヌクレオチド、少なくとも4個のヌクレオチド、少なくとも5個のヌクレオチド、少なくとも6個のヌクレオチド、少なくとも7個のヌクレオチド、少なくとも8個のヌクレオチド、少なくとも9個のヌクレオチド、少なくとも10個のヌクレオチド、少なくとも11個のヌクレオチド、少なくとも12個のヌクレオチド、少なくとも13個のヌクレオチド、少なくとも14個のヌクレオチド、少なくとも15個のヌクレオチド、少なくとも16個のヌクレオチド、少なくとも17個のヌクレオチド、少なくとも18個のヌクレオチド、少なくとも19個のヌクレオチド、または少なくとも20個のヌクレオチドを含む。

40

【0214】

50

いくつかの態様では、本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤は、約6～約30ヌクレオチドの長さである。特定の態様では、本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤は、7ヌクレオチドの長さである。さらなる態様では、本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤は、8ヌクレオチドの長さである。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤は、9ヌクレオチドの長さである。いくつかの態様では、本開示のmiR-485-3p阻害剤は、10ヌクレオチドの長さである。特定の態様では、miR-485-3p阻害剤は、11ヌクレオチドの長さである。さらなる態様では、miR-485-3p阻害剤は、12ヌクレオチドの長さである。いくつかの態様では、本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤は、13ヌクレオチドの長さである。特定の態様では、本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤は、14ヌクレオチドの長さである。いくつかの態様では、本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤は、15ヌクレオチドの長さである。さらなる態様では、miR-485-3p阻害剤は、16ヌクレオチドの長さである。特定の態様では、本開示のmiR-485-3p阻害剤は、17ヌクレオチドの長さである。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤は、18ヌクレオチドの長さである。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤は、19ヌクレオチドの長さである。特定の態様では、miR-485-3p阻害剤は、20ヌクレオチドの長さである。さらなる態様では、本開示のmiR-485-3p阻害剤は、21ヌクレオチドの長さである。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤は、22ヌクレオチドの長さである。

10

20

【0215】

いくつかの態様では、本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤は、配列番号2～30から選択される配列と、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%同一であるヌクレオチド配列を含む。特定の態様では、miR-485-3p阻害剤は、配列番号2～30からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチド配列は1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のミスマッチを場合により含んでもよい。

30

【0216】

いくつかの態様では、miRNA阻害剤は、5'-UGUAUGA-3'（配列番号2）、5'-GUGUAUGA-3'（配列番号3）、5'-CGUGUAUGA-3'（配列番号4）、5'-CCGUGUAUGA-3'（配列番号5）、5'-GCCGUGUAUGA-3'（配列番号6）、5'-AGCCGUGUAUGA-3'（配列番号7）、5'-GAGCCGUGUAUGA-3'（配列番号8）、5'-AGAGCCGUGUAUGA-3'（配列番号9）、5'-GAGAGCCGUGUAUGA-3'（配列番号10）、5'-GGAGAGCCGUGUAUGA-3'（配列番号11）、5'-AGGAGAGCCGUGUAUGA-3'（配列番号12）、5'-GAGGAGAGCCGUGUAUGA-3'（配列番号13）、5'-AGAGGAGAGCCGUGUAUGA-3'（配列番号14）、または5'-GAGAGGAGAGCCGUGUAUGA-3'（配列番号15）を含む。

40

【0217】

いくつかの態様では、miRNA阻害剤は、5'-UGUAUGAC-3'（配列番号16）、5'-GUGUAUGAC-3'（配列番号17）、5'-CGUGUAUGAC-3'（配列番号18）、5'-CCGUGUAUGAC-3'（配列番号19）、5'-GCCGUGUAUGAC-3'（配列番号20）、5'-AGCCGUGUAUGAC-3'（配列番号21）、5'-GAGCCGUGUAUGAC-3'（配列番号22）、5'-AGAGCCGUGUAUGAC-3'（配列番号23）、5'-GAGAGCCGUGUAUGAC-3'（配列番号24）、5'-GGAGAGCCGUGUAUGAC-3'（配列番号25）、5'-AGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'（配列番号26）、

50

5' - G A G G A G A G C C G U G U A U G A C - 3' (配列番号27)、5' - A G A G G A G A G C C G U G U A U G A C - 3' (配列番号28)、5' - G A G A G G A G A G C C G U G U A U G A C - 3' (配列番号29)、または5' - A G A G A G G A G A G C C G U G U A U G A C - 3' (配列番号30)を有する。

【0218】

いくつかの態様では、miRNA阻害剤は、5' - T G T A T G A - 3' (配列番号62)、5' - G T G T A T G A - 3' (配列番号63)、5' - C G T G T A T G A - 3' (配列番号64)、5' - C C G T G T A T G A - 3' (配列番号65)、5' - G C C G T G T A T G A - 3' (配列番号66)、5' - A G C C G T G T A T G A - 3' (配列番号67)、5' - G A G C C G T G T A T G A - 3' (配列番号68)、5' - A G A G C C G T G T A T G A - 3' (配列番号69)、5' - G A G A G C C G T G T A T G A - 3' (配列番号70)、5' - G G A G A G C C G T G T A T G A - 3' (配列番号71)、5' - A G G A G A G C C G T G T A T G A - 3' (配列番号72)、5' - G A G G A G A G C C G T G T A T G A - 3' (配列番号73)、5' - A G A G G A G A G C C G T G T A T G A - 3' (配列番号74)、5' - G A G A G G A G A G C C G T G T A T G A - 3' (配列番号75)、5' - T G T A T G A C - 3' (配列番号76)、5' - G T G T A T G A C - 3' (配列番号77)、5' - C G T G T A T G A C - 3' (配列番号78)、5' - C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号79)、5' - G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号80)、5' - A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号81)、5' - G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号82)、5' - A G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号83)、5' - G A G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号84)、5' - G G A G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号85)、5' - A G G A G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号86)、5' - G A G G A G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号87)、5' - A G A G G A G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号88)、5' - G A G A G G A G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号89)、及び5' - A G A G A G G A G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号90)からなる群から選択される配列を有する。

【0219】

いくつかの態様では、本明細書に開示されるmiRNA阻害剤(すなわち、miR-485-3p阻害剤)は、5' - A G A G G A G A G C C G U G U A U G A C - 3' (配列番号28)または5' - A G A G G A G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号88)と少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%同一であるヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、miRNA阻害剤は、5' - A G A G G A G A G C C G U G U A U G A C - 3' (配列番号28)または5' - A G A G G A G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号88)と少なくとも90%の類似性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、miRNA阻害剤は、1個の置換または2個の置換を有するヌクレオチド配列5' - A G A G G A G A G C C G U G U A U G A C - 3' (配列番号28)または5' - A G A G G A G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号88)を含む。特定の態様では、miRNA阻害剤は、ヌクレオチド配列5' - A G A G G A G A G C C G U G U A U G A C - 3' (配列番号28)または5' - A G A G G A G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号88)を含む。

【0220】

いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤の配列は、5' - A G A G A G G A G A G C C G U G U A U G A C - 3' (配列番号30)または5' - A G A G A G G A G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号90)と、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の配列同一性を有する。特定の態様では、miRNA阻害剤は、5' - A

G A G A G G A G A G C C G U G U A U G A C - 3' (配列番号30) または 5' - A G A G A G G A G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号90) と少なくとも90%の類似性を有する。いくつかの態様では、miRNA阻害剤は、1個の置換または2個の置換を有するヌクレオチド配列 5' - A G A G A G G A G A G C C G U G U A U G A C - 3' (配列番号30) または 5' - A G A G A G G A G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号90) を含む。いくつかの態様では、miRNA阻害剤は、ヌクレオチド配列 5' - A G A G A G G A G A G C C G U G U A U G A C - 3' (配列番号30) または 5' - A G A G A G G A G A G C C G T G T A T G A C - 3' (配列番号90) を含む。いくつかの態様では、miRNA阻害剤は、ヌクレオチド配列 5' - A G A G A G G A G A G C C G U G U A U G A C - 3' (配列番号30) を含む。

10

【0221】

いくつかの態様では、本開示のmiR-485-3p阻害剤は、本明細書に開示される配列、例えば、配列番号2~30のいずれか1つと、N末端に少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、または少なくとも5個のさらなる核酸、C末端に少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、または少なくとも5個のさらなる核酸、またはその両方と、を含む。いくつかの態様では、本開示のmiR-485-3p阻害剤は、本明細書に開示される配列、例えば、配列番号2~30のいずれか1つと、N末端に1個のさらなる核酸及び／またはC末端に1個のさらなる核酸と、を含む。いくつかの態様では、本開示のmiR-485-3p阻害剤は、本明細書に開示される配列、例えば、配列番号2~30のいずれか1つと、N末端に1個または2個のさらなる核酸及び／またはC末端に1個または2個のさらなる核酸と、を含む。いくつかの態様では、本開示のmiR-485-3p阻害剤は、本明細書に開示される配列、例えば、配列番号2~30のいずれか1つと、N末端に1~3個のさらなる核酸及び／またはC末端に1~3個のさらなる核酸と、を含む。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤は、5' - G A G A G G A G A G C C G U G U A U G A C - 3' (配列番号29) を含む。特定の態様では、miR-485阻害剤は、5' - A G A G A G G A G A G C C G U G U A U G A C - 3' (配列番号30) を含む。

20

【0222】

いくつかの態様では、本開示のmiR-485-3p阻害剤は、1個のmiR-485-3p結合部位を含む。さらなる態様では、本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤は、少なくとも2個のmiR-485-3p結合部位を含む。特定の態様では、miR-485-3p阻害剤は、3個のmiR-485-3p結合部位を含む。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤は、4個のmiR-485-3p結合部位を含む。いくつかの態様では、miR-485-3p阻害剤は、5個のmiR-485-3p結合部位を含む。特定の態様では、miR-485-3p阻害剤は、6個以上のmiR-485-3p結合部位を含む。いくつかの態様では、すべてのmiR-485-3p結合部位は同じである。いくつかの態様では、すべてのmiR-485-3p結合部位は異なる。いくつかの態様では、少なくとも1つのmiR-485-3p結合部位が異なる。

30

【0223】

IV. a. i. 化学修飾されたポリヌクレオチド

40

いくつかの態様では、本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤は、少なくとも1つの化学修飾されたヌクレオシド及び／またはヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを含む。本開示のポリヌクレオチドが化学修飾されている場合、ポリヌクレオチドは、「修飾ポリヌクレオチド」と呼ぶことができる。

【0224】

「ヌクレオシド」は、糖分子（例えば、ペントースまたはリボース）またはその誘導体を、有機塩基（例えば、プリンまたはピリミジン）またはその誘導体（本明細書において「核酸塩基」とも称される）とともに含有する化合物を指す。「ヌクレオチド」は、リン酸基を含むヌクレオシドを指す。修飾されたヌクレオチドは、1つ以上の修飾された非天然ヌクレオシドを含むように、任意の有用な方法により、例えば、化学的に、酵素的に、

50

または組換えにより合成され得る。

【0225】

ポリヌクレオチドは、連結されたヌクレオシドの領域または複数の領域を含み得る。かかる領域は、可変的な骨格結合を有し得る。連結は、標準的なホスホジエステル結合であり得、その場合、ポリヌクレオチドはヌクレオチドの領域を含む。

【0226】

本明細書において開示される修飾されたポリヌクレオチドは、様々な異なる修飾を含み得る。いくつかの態様では、修飾されたポリヌクレオチドは、1種、2種、またはそれ以上（任意選択的に異なる）のヌクレオシドまたはヌクレオチド修飾を含有する。いくつかの態様では、修飾されたポリヌクレオチドは、1つ以上の所望の特性、例えば、未修飾ポリヌクレオチドと比較して改善された熱または化学安定性、低減された免疫原性、低減された分解、標的マイクロRNAに対する結合の増加、他のマイクロRNAまたは他の分子に対する低減された非特異的結合を示し得る。

【0227】

いくつかの態様では、本開示のポリヌクレオチド（例えば、miR-485-3p阻害剤）は、化学修飾されている。本明細書で使用する場合、ポリヌクレオチドに関して、「化学修飾」または必要に応じて「化学修飾された」という用語は、アデノシン（A）、グアノシン（G）、ウリジン（U）、チミジン（T）、またはシチジン（C）リボヌクレオシドまたはデオキシリボヌクレオシドに対する、限定されるものではないが、それらの核酸塩基、糖、骨格、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられるそれらの位置、パターン、パーセント、または集団のうちの1つ以上における修飾を指す。

【0228】

いくつかの態様では、本開示のポリヌクレオチド（例えば、miR-485-3p阻害剤）は、同じヌクレオシド種類のすべてもしくはいずれかの均一な化学修飾、または同じヌクレオシド種類のすべてもしくはいずれかにおける同じ出発修飾の漸減滴定（downward titration）によって生成される修飾の群、またはランダムな組み込みを伴うことを除いて同じヌクレオシド種類のすべてもしくはいずれかの測定されたパーセントの化学修飾を有し得る。さらなる態様では、本開示のポリヌクレオチド（例えば、miR-485-3p阻害剤）は、ポリヌクレオチド全体にわたって同じヌクレオシド種類のうちの2つ、3つ、または4つの均一な化学修飾を有し得る（例えば、すべてのウリジン及びすべてのシトシンなどが、同じように修飾される）。

【0229】

修飾されたヌクレオチドの塩基対形成は、標準的なアデニン-チミン、アデニン-ウラシル、またはグアニン-シトシン塩基対だけでなく、ヌクレオチド及び／または非標準的もしくは修飾塩基を含む修飾ヌクレオチドの間で形成される塩基対も包含し、ここで、水素結合ドナー及び水素結合アクセプターの配置が、非標準的塩基と標準的塩基との間、または2つの相補的な非標準的塩基構造間の水素結合を可能にする。かかる非標準的塩基対形成の1つの例は、修飾された核酸塩基イノシンとアデニン、シトシン、またはウラシルとの間の塩基対形成である。塩基／糖またはリンカーの任意の組み合わせが、本開示のポリヌクレオチドに組み込まれ得る。

【0230】

当業者は、特に注記される場合を除き、本出願に記載されるポリヌクレオチド配列は、代表的なDNA配列において「T」を列挙するが、配列がRNAを表す場合、「T」は「U」と置換されることを理解するであろう。例えば、本開示のTDは、RNAとして、DNAとして、またはRNA及びDNAユニットの両方を含むハイブリッド分子として投与され得る。

【0231】

いくつかの態様では、ポリヌクレオチド（例えば、miR-485-3p阻害剤）は、少なくとも2つ（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、8つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、18、20以上）の修飾された核酸塩

10

20

30

40

50

基の組み合わせを含む。

【0232】

いくつかの態様では、ポリヌクレオチドにおける核酸塩基、糖、骨格結合、またはそれらの任意の組み合わせは、少なくとも約5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%修飾される。

10

【0233】

(i) 塩基修飾

特定の態様では、化学修飾は、本開示（例えば、miR-485-3p阻害剤）のポリヌクレオチド内の核酸塩基に存在する。いくつかの態様では、少なくとも1つの化学修飾ヌクレオチドは、修飾されたウリジン（例えば、シュードウリジン（ψ）、2-チオウリジン（s2U）、1-メチルシュードウリジン（m1ψ）、1-エチルシュードウリジン（e1ψ）、または5-メトキシウリジン（mo5U））、修飾されたシトシン（例えば、5-メチルシチジン（m5C））、修飾されたアデノシン（例えば、1-メチルアデノシン（m1A）、N6-メチルアデノシン（m6A）、または2-メチルアデニン（m2A））、修飾されたグアノシン（例えば、7-メチルグアノシン（m7G）または1-メチルグアノシン（m1G））、またはそれらの組み合わせである。

20

【0234】

いくつかの態様では、本開示のポリヌクレオチド（例えば、miR-485-3p阻害剤）は、特定の修飾について均一に修飾される（例えば、完全に修飾される、配列全体にわたって修飾される）。例えば、ポリヌクレオチドは、同じ種類の塩基修飾、例えば、5-メチルシチジン（m5C）により均一に修飾され得、これは、ポリヌクレオチド配列におけるすべてのシトシン残基が、5-メチルシチジン（m5C）と置き換えられることを意味する。同様に、ポリヌクレオチドは、配列に存在する任意の種類のヌクレオチド残基について、修飾されたヌクレオチド、例えば、上記に記載されるもののいずれかとの置換により均一に修飾され得る。

30

【0235】

いくつかの態様では、本開示のポリヌクレオチド（例えば、miR-485-3p阻害剤）は、少なくとも2つ（例えば、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上）の修飾された核酸塩基の組み合わせを含む。いくつかの態様では、本開示のポリヌクレオチド（例えば、miR-485-3p阻害剤）における1種類の核酸塩基の少なくとも約5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%が、修飾された核酸塩基である。

40

【0236】

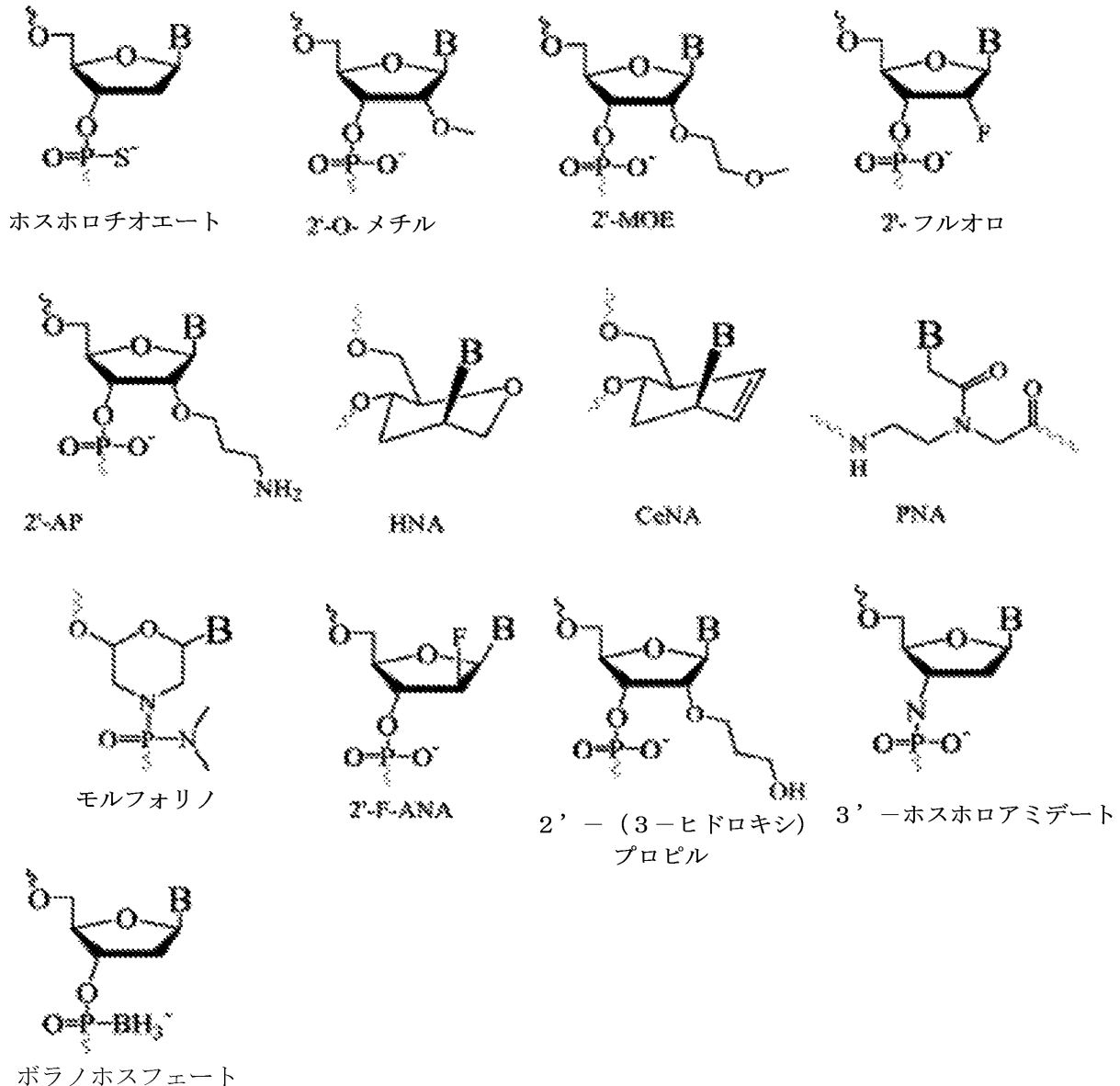
(ii) 骨格修飾

いくつかの態様では、本開示のポリヌクレオチド（すなわちmiR-485-3p阻害剤）は、ヌクレオチド間に任意の有用な結合を含むことができる。本開示の組成物において有用な、骨格修飾を含むそのような結合としては、これらに限定されるものではないが、以下のものが挙げられる：3'-アルキレンホスホネート、3'-アミノホスホロアミダート、アルケン含有骨格、アミノアルキルホスホロアミダート、アミノアルキルホスホトリエステル、ボラノホスフェート、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、キラルホスホネー

50

ト、キラルホスホロチオネート、ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、メチレン（メチルイミノ）、メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格、モルホリノ結合、 $-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ 、ヘテロ原子ヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオシド、ホスフィナート、ホスホロアミダート、ホスホロジチオエート、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合、ホスホロチオネート、ホスホトリエステル、PNA、シロキサノ骨格、スルファメート骨格、スルフィド、スルホキシド、及びスルホン骨格、スルホネート及びスルホンアミド骨格、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、ならびにチオノホスホロアミダート。

【化 7】



【0237】

いくつかの態様では、上記に開示される骨格結合の存在は、本開示のポリヌクレオチド（例えば、miR-485-3p阻害剤）の安定性及び分解に対する耐性を増加させる。

【0238】

いくつかの態様では、本開示のポリヌクレオチド（例えば、miR-485-3p阻害剤）における少なくとも約5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%

、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、または 100 % の骨格結合が修飾される（例えば、それらのすべてがホスホロチオエートである）。

【0239】

いくつかの態様では、本開示のポリヌクレオチド（すなわち、miR-485-3p 阻害剤）に含めることができる骨格修飾は、ホスホロジアミダイトモルホリノオリゴマー（PMO）及び／またはホスホロチオエート（PS）修飾を含む。

【0240】

（iii）糖修飾

本開示のポリヌクレオチド（例えば、miR-485-3p 阻害剤）に組み込まれ得る修飾されたヌクレオシド及びヌクレオチドは、核酸の糖に対して修飾され得る。いくつかの態様では、糖修飾は、miR-485-3p 核酸配列に対する miR-485-3p 阻害剤の結合の親和性を増加させる。LNA または 2'-置換糖などの親和性改善ヌクレオチド類似体を miR-485-3p 阻害剤に組み込むことによって、miR-485-3p 阻害剤の長さ及び／またはサイズを小さくすることができる。

【0241】

いくつかの態様では、本開示のポリヌクレオチド（すなわち、miR-485-3p 阻害剤）における少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、または 100 % のヌクレオチドが糖修飾（例えば、LNA）を含有する。

【0242】

いくつかの態様では、本開示のポリヌクレオチドにおける 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、または 22 ヌクレオチドユニットが糖修飾される（例えば、LNA）。

【0243】

一般に、RNA は、酸素を有する五員環である糖基リボースを含む。非限定的な例示的修飾ヌクレオチドとしては、リボースにおける酸素の（例えば、S、Se、またはアルキレン、例えば、メチレンまたはエチレンとの）置換；二重結合の付加（例えば、リボースのシクロペンテニルまたはシクロヘキセニルとの置換）；リボースの環縮小（例えば、シクロブタンまたはオキセタンの四員環の形成）；リボースの環拡大（例えば、追加の炭素またはヘテロ原子を有し、6 または七員環の形成、例えば、アンヒドロヘキシトール、アルトリトール、マンニトール、シクロヘキサニル、シクロヘキセニル、及びホスホロアミダイト骨格も有するモルホリノ）；多環式形態（例えば、トリシクロ）；及び「アンロックド」形態、例えば、グリコール核酸（GNA）（例えば、R-GNA または S-GNA、ここで、リボースは、ホスホジエステル結合に結合されたグリコールユニットと置き換えられる）、トレオース核酸（TNA、ここで、リボースは、 α -L-トレオフラノシル（3'→2'）と置き換えられる）、及びペプチド核酸（PNA、ここで、2-アミノエチル-グリシン結合が、リボース及びホスホジエステル骨格と置き換わる）が挙げられる。糖基は、リボースにおける対応する炭素と反対の立体化学配置を有する 1 つ以上の炭素も含有し得る。したがって、ポリヌクレオチド分子は、糖として、例えば、アラビノースを含有するヌクレオチドを含み得る。

【0244】

リボースの 2'-ヒドロキシ基（OH）は、いくつかの異なる置換基で修飾または置換され得る。2'-位での例示的な置換としては、限定されるものではないが、H、ハロ、任意選択的に置換された C₁~6 アルキル；任意選択的に置換された C₁~6 アルコキシ；

10

20

30

40

50

任意選択的に置換された $C_6 \sim 10$ アリールオキシ；任意選択的に置換された $C_3 \sim 8$ シクロアルキル；任意選択的に置換された $C_3 \sim 8$ シクロアルコキシ；任意選択的に置換された $C_6 \sim 10$ アリールオキシ；任意選択的に置換された $C_6 \sim 10$ アリール- $C_1 \sim 6$ アルコキシ、任意選択的に置換された $C_1 \sim 12$ (ヘテロシクリル) オキシ；糖（例えば、リボース、ペントース、または本明細書に記載されるいずれか）；ポリエチレングリコール (PEG)、 $-O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ （ここで、R は、H または任意選択的に置換されたアルキルであり、n は、0 ~ 20（例えば、0 ~ 4、0 ~ 8、0 ~ 10、0 ~ 16、1 ~ 4、1 ~ 8、1 ~ 10、1 ~ 16、1 ~ 20、2 ~ 4、2 ~ 8、2 ~ 10、2 ~ 16、2 ~ 20、4 ~ 8、4 ~ 10、4 ~ 16、及び 4 ~ 20）の整数である）；「ロックド」核酸 (LNA)（2'-ヒドロキシが、 $C_1 \sim 6$ アルキレンまたは $C_1 \sim 6$ ヘテロアルキレン架橋により、同じリボース糖の 4'-炭素に連結されており、ここで、例示的な架橋としては、メチレン、プロピレン、エーテル、アミノ架橋、アミノアルキル、アミノアルコキシ、アミノ、及びアミノ酸が挙げられる）が挙げられる。

10

【0245】

いくつかの態様では、本開示のポリヌクレオチド（すなわち、miR-485-3p 阻害剤）に存在するヌクレオチド類似体は、例えば、2'-O-アルキル-RNA ユニット、2'-OMe-RNA ユニット、2'-O-アルキル-SNA、2'-アミノ-DNA ユニット、2'-フルオロ-DNA ユニット、LNA ユニット、アラビノ核酸 (ANA) ユニット、2'-フルオロ-ANA ユニット、HNA ユニット、INA (インターカレーティング核酸) ユニット、2'-MOE ユニット、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様では、LNA は、例えば、オキシ LNA（例えば、 β -D-オキシ-LNA または α -L-オキシ-LNA）、アミノ LNA（例えば、 β -D-アミノ-LNA または α -L-アミノ-LNA）、チオ LNA（例えば、 β -D-チオ-LNA または α -L-チオ-LNA）、ENA（例えば、 β -D-ENA または α -L-ENA）、またはそれらの任意の組み合わせである。さらなる態様では、本開示のポリヌクレオチド（すなわち miR-485-3p 阻害剤）に含めることができるヌクレオチド類似体は、ロックド核酸 (LNA)、アンロックド核酸 (UNA)、アラビノ核酸 (ABA)、架橋核酸 (BNA)、及び／またはペプチド核酸 (PNA) を含む。

20

【0246】

いくつかの態様では、本開示のポリヌクレオチド（すなわち、miR-485-3p 阻害剤）は、修飾された RNA ヌクレオチド類似体（例えば、LNA）及び DNA ユニットの両方を含み得る。いくつかの態様では、miR-485-3p 阻害剤はギャップマーである。例えば、米国特許第 8,404,649 号、同第 8,580,756 号、同第 8,163,708 号、同第 9,034,837 号（これらのすべてが参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。いくつかの態様では、miR-485-3p 阻害剤はマイクロマーである。米国特許公開第 US 20180201928 号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

30

【0247】

いくつかの態様では、本開示のポリヌクレオチド（少なくとも、miR-485-3p 阻害剤）は、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼによる速やかな分解を防止するための修飾を含むことができる。修飾としては、これらに限定されるものではないが、例えば、(a) 末端修飾、例えば、5' 末端修飾（リン酸化、脱リン酸化、共役化、反転結合など）、3' 末端修飾（共役化、DNA ヌクレオチド、反転結合など）、(b) 塩基修飾、例えば、修飾塩基、安定化塩基、不安定化塩基、または広範なパートナーのレパートリーと塩基対合する塩基、または共役化塩基による置換、(c) 糖修飾（例えば、2' 位または 4' 位における）または糖の置換、ならびに (d) ホスホジエステル結合の修飾または置換を含む、ヌクレオチド間結合の修飾が挙げられる。

40

【0248】

V. ベクター及び送達システム

いくつかの態様では、本明細書に開示される miR-485-3p 阻害剤は、当該技術

50

分野では周知の任意の関連する送達システムを使用して投与することができる（例えば、認知障害に罹患しているものと特定される）。特定の態様では、送達システムはベクターである。したがって、いくつかの態様では、本開示は、本開示の m i R - 4 8 5 - 3 p 阻害剤を含むベクターを提供する。

【0249】

いくつかの態様では、ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの態様では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターである。いくつかの態様では、ウイルスベクターは、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、またはこれらの任意の組み合わせの血清型を有する A A V である。いくつかの態様では、アデノウイルスベクターは、第3世代アデノウイルスベクターである。A D E A S Y（商標）は、アデノウイルスベクターコンストラクトを作製するうえで圧倒的に最も一般的な方法である。このシステムは、シャトル（または導入）ベクター及びアデノウイルスベクターの2つのタイプのプラスミドで構成される。目的の導入遺伝子をシャトルベクターにクローニングし、検証し、制限酵素 P m e I で直鎖化する。次いで、このコンストラクトを、P A D E A S Y（商標）を含む B J 5 1 8 3 E . c o l i 細胞である A D E A S I E R - 1 細胞に形質転換する。P A D E A S Y（商標）は、ウイルス産生に必要なアデノウイルス遺伝子を含んだ約33 K b のアデノウイルスプラスミドである。シャトルベクターとアデノウイルスプラスミドとは、アデノウイルスプラスミド内への導入遺伝子の相同組み換えを促進する一致した左右のホモロジーアームを有している。標準的な B J 5 1 8 3 に、スーパーコイルを形成した P A D E A S Y（商標）とシャトルベクターを同時形質転換することもできるが、この方法は非組換えアデノウイルスプラスミドの高いバックグラウンドを生じる。次いで、組換えアデノウイルスプラスミドをサイズ及び適当な制限消化パターンについて検証し、導入遺伝子がアデノウイルスプラスミドに挿入され、他のパターンの組み換えが生じていないことを確認する。検証が済んだなら、組換えプラスミドを P a c I で直鎖化して I T R で挟まれた直鎖状 d s D N A コンストラクトを作製する。293または911細胞に直鎖化したコンストラクトをトランスフェクトすると、ウイルスをおよそ7〜10日後に回収することができる。この方法以外にも、本明細書に開示される方法を実施するために、本願が出願された時点で当該技術分野において周知のアデノウイルスベクターコンストラクトを作製するための方法を用いることができる。

【0250】

いくつかの態様では、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクター（例えば第3または第4世代のレンチウイルスベクター）である。レンチウイルスベクターは、1つの細胞株に3つの別々のプラスミド発現システムをトランスフェクトする一過性トランスフェクションシステムで通常は作製される。これらには、導入ベクタープラスミド（H I V プロウイルスの部分）、パッケージングプラスミドまたはコンストラクト、及び異なるウイルスの異種エンベロープ遺伝子（e n v）を含むプラスミドが含まれる。ベクターの3つのプラスミドコンポーネントをパッケージング細胞に入れた後、これを H I V シェル内に挿入する。ベクターのウイルス部分は挿入配列を含んでいるため、ウイルスは細胞系内で複製することはできない。現在の第3世代レンチウイルスベクターは、9つの H I V - 1 タンパク質のうちの3つのみ（G a g、P o l、R e v）をコードしており、これらは組換えによる複製能を有するウイルスの生成を防止するために別々のプラスミドから発現させられる。第4世代レンチウイルスベクターでは、レトロウイルスゲノムはさらに減らされている（例えば、T A K A R A（登録商標）L E N T I - X（商標）第4世代パッケージングシステムを参照）。

【0251】

当該技術分野では周知の任意の A A V ベクターを本明細書に開示される方法で 사용할ことができる。A A V ベクターは既知のベクターを含んでよく、それらのバリエーション、フラグメント、または融合体を含んでよい。いくつかの態様では、A A V ベクターは、A A V タイプ1（A A V 1）、A A V 2、A A V 3 A、A V V 3 B、A A V 4、A A V 5、A

AV6、AAV7、AAV8、AVV9、AVV10、AVV11、AVV12、AVV13、AAVrh.74、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、ヤギAVV、霊長類AAV、非霊長類AAV、ウシAAV、エビAVV、ヘビAVV、及びこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

【0252】

いくつかの態様では、AAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3A、AVV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AVV9、AVV10、AVV11、AVV12、AVV13、AAVrh.74、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、ヤギAVV、霊長類AAV、非霊長類AAV、ヒツジAAV、エビAVV、ヘビAVV、及びこれらの任意の組み合わせからなる群から選択されたAAVベクターから誘導される。

10

【0253】

いくつかの態様では、AAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3A、AVV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AVV9、AVV10、AVV11、AVV12、AVV13、AAVrh.74、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、ヤギAVV、霊長類AAV、非霊長類AAV、ヒツジAAV、エビAVV、ヘビAVV、及びこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される少なくとも2つのAAVベクターから誘導されるキメラベクターである。

【0254】

特定の態様では、AAVベクターは、当該技術分野では周知の少なくとも2つの異なるAAVベクターの領域を含む。

20

【0255】

いくつかの態様では、AAVベクターは、第1のAAV（例えば、AAV1、AAV2、AAV3A、AVV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AVV9、AVV10、AVV11、AVV12、AVV13、AAVrh.74、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、ヤギAVV、霊長類AAV、非霊長類AAV、ヒツジAAV、エビAVV、ヘビAVV、またはこれらの任意の組み合わせ）に由来する末端逆位配列と、第2のAAV（例えば、AAV1、AAV2、AAV3A、AVV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AVV9、AVV10、AVV11、AVV12、AVV13、AAVrh.74、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、ヤギAVV、霊長類AAV、非霊長類AAV、ヒツジAAV、エビAVV、ヘビAVV、またはこれらの任意の組み合わせ）に由来する第2の末端逆位配列と、を含む。

30

【0256】

いくつかの態様では、AAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3A、AVV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AVV9、AVV10、AVV11、AVV12、AVV13、AAVrh.74、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、ヤギAVV、霊長類AAV、非霊長類AAV、ヒツジAAV、エビAVV、ヘビAVV、及びこれらの任意の組み合わせからなる群から選択されたAAVベクターの部分を含む。いくつかの態様では、AAVベクターは、AAV2を含む。

40

【0257】

いくつかの態様では、AAVベクターは、スプライスアクセプター部位を含む。いくつかの態様では、AAVベクターは、プロモーターを含む。当該技術分野では周知の任意のプロモーターを本開示のAAVベクターで 사용할 ことができる。いくつかの実施態様では、プロモーターはRNA Pol IIIプロモーターである。いくつかの態様では、RNA Pol IIIプロモーターは、U6プロモーター、H1プロモーター、7SKプロモーター、5Sプロモーター、アデノウイルス2 (Ad2) VAIプロモーター、及びこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの態様では、プロモーターは、サイトメガロウイルス前初期遺伝子 (CMV) プロモーター、EF1aプロモーター、Sv40プロモーター、PGK1プロモーター、Ubcプロモーター、ヒトβアク

50

チンプロモーター、CAGプロモーター、TREプロモーター、UASプロモーター、Ac5プロモーター、ポリヘドリンプロモーター、CaMKIIaプロモーター、GAL1プロモーター、GAL10プロモーター、TEFプロモーター、GDSプロモーター、ADH1プロモーター、CaMV35Sプロモーター、またはUbiproモーターである。特定の態様では、プロモーターは、U6プロモーターを含む。

【0258】

いくつかの態様では、AAVベクターは、構成的に活性なプロモーター（構成的プロモーター）を含む。いくつかの態様では、構成的プロモーターは、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRIT）、アデノシンデアミナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、βアクチンプロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）、サルウイルス（例えば、SV40）、パピローマウイルス、アデノウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ラウス肉腫ウイルス、レトロウイルス末端反復配列（LTR）、マウス幹細胞ウイルス（MSCV）、及び単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーターからなる群から選択される。

【0259】

いくつかの態様では、プロモーターは、誘導性プロモーターである。いくつかの態様では、誘導性プロモーターは、組織特異的プロモーターである。特定の態様では、組織特異的プロモーターは、神経細胞、グリア細胞、または神経細胞及びグリア細胞の両方において、AAVベクターのコーディング領域の転写を誘導する。

【0260】

いくつかの態様では、AAVベクターは、1つ以上のエンハンサーを含む。いくつかの態様では、1つ以上のエンハンサーはAAV内に単独で、または本明細書に開示されるプロモーターとともに存在する。いくつかの態様では、AAVベクターは、3'UTRのポリ(A)テール配列を含むいくつかの態様では、3'UTRのポリ(A)テール配列は、bGHポリ(A)、アクチンポリ(A)、ヘモグロビンポリ(A)、及びこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの態様では、3'UTRのポリ(A)テール配列はbGHポリ(A)を含む。

【0261】

いくつかの態様では、本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤は、送達剤とともに投与される。使用することができる送達剤の非限定的な例としては、リポイド、リポソーム、リポプレックス、脂質ナノ粒子、ポリマー化合物、ペプチド、タンパク質、細胞、ナノ粒子模倣体、ナノチューブ、ミセル、またはコンジュゲートが挙げられる。

【0262】

したがって、いくつかの態様では、本開示は、本開示のmiRNA阻害剤（すなわちmiR-485-3p阻害剤）と、送達剤と、を含む組成物も提供する。いくつかの態様では、送達剤は、下式：

[WP] - L1 - [CC] - L2 - [AM] (式I)

または

[WP] - L1 - [AM] - L2 - [CC] (式II)

(式中、

WPは、水溶性バイオポリマー部分であり、

CCは、正に帯電した（すなわちカチオン性）キャリア部分であり、

AMは、アジュバント部分であり、

L1及びL2は、独立して、任意選択のリンカーである）を有するカチオン性キャリアユニットを含み、

カチオン性キャリアユニットは、約1:1のイオン比で核酸と混合される場合にミセルを形成する。したがって、いくつかの態様では、miRNA阻害剤とカチオン性キャリアユニットとは、互いに混合されると互いに（例えば、共有結合または非共有結合を介して）結合してミセルを形成することができる。

【0263】

10

20

30

40

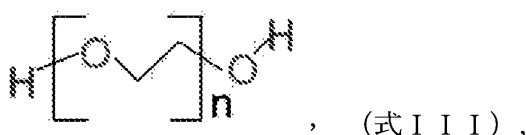
50

いくつかの態様では、本開示のmiRNA阻害剤（すなわち、miR-485-3p阻害剤）を含む組成物は、イオン結合を介してカチオン性キャリアユニットと相互作用する。

【0264】

いくつかの態様では、水溶性ポリマーは、ポリ（アルキレングリコール）、ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィンアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリルアミド）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）、ポリ（サッカライド）、ポリ（ α -ヒドロキシ酸）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリグリセロール、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン（「POZ」）、ポリ（N-アクリロイルモルホリン）、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様では、水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール（「PEG」）、ポリグリセロール、またはポリ（プロピレングリコール）（「PPG」）を含む。いくつかの態様では、水溶性ポリマーは、下式：

【化8】



（式中、nは、1～1000である）を有する。

【0265】

いくつかの態様では、nは、少なくとも約110、少なくとも約111、少なくとも約112、少なくとも約113、少なくとも約114、少なくとも約115、少なくとも約116、少なくとも約117、少なくとも約118、少なくとも約119、少なくとも約120、少なくとも約121、少なくとも約122、少なくとも約123、少なくとも約124、少なくとも約125、少なくとも約126、少なくとも約127、少なくとも約128、少なくとも約129、少なくとも約130、少なくとも約131、少なくとも約132、少なくとも約133、少なくとも約134、少なくとも約135、少なくとも約136、少なくとも約137、少なくとも約138、少なくとも約139、少なくとも約140、または少なくとも約141である。いくつかの態様では、nは、約80～約90、約90～約100、約100～約110、約110～約120、約120～約130、約140～約150、または約150～約160である。

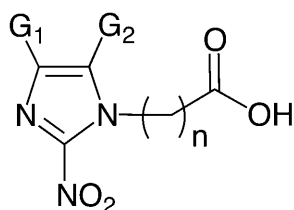
【0266】

いくつかの態様では、水溶性ポリマーは、直鎖状、分枝鎖状、または樹枝状である。いくつかの態様では、カチオン性キャリア部分は、1つ以上の塩基性アミノ酸を含む。いくつかの態様では、カチオン性キャリア部分は、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7、少なくとも8つ、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30、少なくとも31、少なくとも32、少なくとも33、少なくとも34、少なくとも35、少なくとも36、少なくとも37、少なくとも38、少なくとも39、少なくとも40、少なくとも41、少なくとも42、少なくとも43、少なくとも44、少なくとも45、少なくとも46、少なくとも47、少なくとも48、少なくとも49、または少なくとも50の塩基性アミノ酸を含む。いくつかの態様では、カチオン性キャリア部分は、約30～約50の塩基性アミノ酸を含む。いくつかの態様では、塩基性アミノ酸は、アルギニン、リシン、ヒスチジン、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様では、カチオン性キャリア部分は、約40個のリシンモノマーを含む。

【 0 2 6 7 】

いくつかの態様では、アジュバント部分は、免疫反応、炎症反応、及び／または組織微小環境を調節することができる。いくつかの態様では、アジュバント部分は、イミダゾール誘導体、アミノ酸、ビタミン、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様では、アジュバント部分は、下式：

【化 9】



，（式 I V） ，

10

（式中、G 1 及び G 2 のそれぞれは、H、芳香環、もしくは 1 ～ 1 0 アルキルであるか、または G 1 と G 2 はともに芳香環を形成し、n は 1 ～ 1 0 である）を有する。

【 0 2 6 8 】

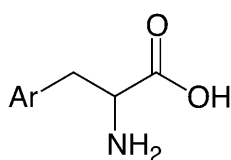
いくつかの態様では、アジュバント部分は、ニトロイミダゾールを含む。いくつかの態様では、アジュバント部分は、メトロニダゾール、チニダゾール、ニモラゾール、ジメトリダゾール、プレトマニド、オルニダゾール、メガゾール、アザニダゾール、ベンズニダゾール、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様では、アジュバント部分は、アミノ酸を含む。

20

【 0 2 6 9 】

いくつかの態様では、アジュバント部分は、下式：

【化 1 0】

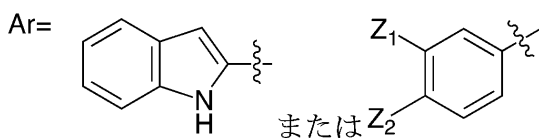


（式 V） ，

30

（式中、A r は、

【化 1 1】



40

であり、

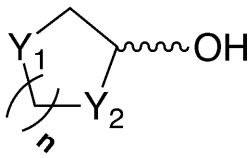
Z 1 及び Z 2 のそれぞれは、H または O H である）を有する。

【 0 2 7 0 】

いくつかの態様では、アジュバント部分は、ビタミンを含む。いくつかの態様では、ビタミンは、環式環または環式ヘテロ原子環及びカルボキシル基またはヒドロキシル基を含む。いくつかの態様では、ビタミンは、下式：

50

【化 1 2】



(式VI),

(式中、Y 1 及び Y 2 のそれぞれは、C、N、O、または S であり、n は 1 または 2 である) を有する。

【0 2 7 1】

いくつかの態様では、ビタミンは、ビタミン A、ビタミン B 1、ビタミン B 2、ビタミン B 3、ビタミン B 6、ビタミン B 7、ビタミン B 9、ビタミン B 1 2、ビタミン C、ビタミン D 2、ビタミン D 3、ビタミン E、ビタミン M、ビタミン H、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの態様では、ビタミンは、ビタミン B 3 である。

【0 2 7 2】

いくつかの態様では、アジュバント部分は、少なくとも約 2 個、少なくとも約 3 個、少なくとも約 4 個、少なくとも約 5 個、少なくとも約 6 個、少なくとも約 7 個、少なくとも約 8 個、少なくとも約 9 個、少なくとも約 1 0 個、少なくとも約 1 1 個、少なくとも約 1 2 個、少なくとも約 1 3 個、少なくとも約 1 4 個、少なくとも約 1 5 個、少なくとも約 1 6 個、少なくとも約 1 7 個、少なくとも約 1 8 個、少なくとも約 1 9 個、または少なくとも約 2 0 個のビタミン B 3 を含む。いくつかの態様では、アジュバント部分は、約 1 0 個のビタミン B 3 を含む。

【0 2 7 3】

いくつかの態様では、組成物は、約 1 2 0 個～約 1 3 0 個の P E G ユニットを有する水溶性バイオポリマー部分と、約 3 0 個～約 4 0 個のリシンを有するポリリシンを含むカチオン性キャリア部分と、約 5 個～約 1 0 個のビタミン B 3 を有するアジュバント部分と、を含む。

【0 2 7 4】

いくつかの態様では、組成物は、(i) 約 1 0 0 個～約 2 0 0 個の P E G ユニットを有する水溶性バイオポリマー部分と、(i i) アミン基を有する約 3 0 個～約 4 0 個のリシン (例えば、約 3 2 個のリシン) と、(i i i) それぞれがチオール基を有する約 1 5 個～2 0 個のリシン (例えば、それぞれがチオール基を有する約 1 6 個のリシン) と、(i v) ビタミン B 3 に融合された約 3 0 個～4 0 個のリシン (例えば、それぞれがビタミン B 3 に融合された約 3 2 個のリシン) と、を含む。いくつかの態様では、組成物は、水溶性ポリマーに結合された標的化部分、例えば L A T 1 標的化リガンド、例えばフェニルアラニンをさらに含む。いくつかの態様では、組成物中のチオール基は、ジスルフィド結合を形成する。

【0 2 7 5】

いくつかの態様では、組成物は、(1) (i) 約 1 0 0 個～約 2 0 0 個の P E G ユニットと、(i i) アミン基を有する約 3 0 個～約 4 0 個のリシン (例えば、約 3 2 個のリシン) と、(i i i) それぞれがチオール基を有する約 1 5 個～2 0 個のリシン (例えば、それぞれがチオール基を有する約 1 6 個のリシン) と、(i v) ビタミン B 3 に融合された約 3 0 個～4 0 個のリシン (例えば、それぞれがビタミン B 3 に融合された約 3 2 個のリシン) と、を含むミセルと、(2) m i R 4 8 5 阻害剤 (例えば、配列番号 3 0) と、を含み、m i R 4 8 5 阻害剤はミセル内に封入される。いくつかの態様では、組成物は、P E G ユニットに結合された標的化部分、例えば L A T 1 標的化リガンド、例えばフェニルアラニンをさらに含む。いくつかの態様では、ミセル中のチオール基は、ジスルフィド結合を形成する。

【0276】

本開示は、本開示のmiRNA阻害剤（すなわちmiR-485-3p阻害剤）を含むミセルであって、miRNA阻害剤と送達剤とが互いに結合した、ミセルも提供する。

【0277】

いくつかの態様では、結合は、共有結合、非共有結合、またはイオン結合である。いくつかの態様では、カチオン性キャリアユニットのカチオン性キャリア部分の正電荷は、溶液中で本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤と混合される際にミセルを形成するのに十分であり、溶液中のカチオン性キャリアユニットのカチオン性キャリア部分の正電荷とmiR-485-3p阻害剤（または阻害剤を含むベクター）の負電荷の全体的イオン比は、約1:1である。

10

【0278】

いくつかの態様では、カチオン性キャリアユニットは、酵素分解から本開示のmiRNA阻害剤（すなわち、miR-485-3p阻害剤）を保護することができる（本明細書に参照によりその全体を援用する、米国PCT公開第WO2020/261227号を参照）。

【0279】

V I . 医薬組成物

いくつかの態様では、本開示は、対象に投与するのに適した本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤（例えば、miR-485-3p阻害剤を含むポリヌクレオチドまたはベクター）を含む医薬組成物も提供する。医薬組成物は、一般的に、本明細書に記載されるmiR-485-3p阻害剤（例えば、ポリヌクレオチドまたはベクター）と、薬学的に許容される賦形剤またはキャリアとを、対象への投与に適した形態で含む。薬学的に許容される賦形剤またはキャリアは、投与される特定の組成物、及び組成物を投与するために使用される特定の方法により部分的に決定される。

20

【0280】

したがって、本開示のmiR-485-3p阻害剤を含む医薬組成物の多種多様な適当な製剤が存在する（（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18th ed. (1990)を参照）。医薬組成物は一般に、無菌状態で、米国食品医薬品局の適正製造基準（GMP）規制のすべてに完全に準拠したものとして製剤化される。

30

【0281】

V I I . キット

本開示は、本開示のmiRNA阻害剤（例えば、本明細書に開示されるポリヌクレオチド、ベクター、または医薬組成物）と、必要に応じて使用説明書、例えば本明細書に開示される方法に従った使用説明書と、を含むキットまたは製品も提供する。いくつかの態様では、キットまたは製品は、miR-485-3p阻害剤（例えば、本開示のベクター、例えばAAVベクター、ポリヌクレオチド、または医薬組成物）を1つ以上の容器に含む。いくつかの態様では、キットまたは製品は、miR-485-3p阻害剤（例えば、本開示のベクター、例えばAAVベクター、ポリヌクレオチド、または医薬組成物）と、パンフレットと、を含む。本明細書に開示されるmiR-485-3p阻害剤（例えば、本開示のベクター、ポリヌクレオチド、及び医薬組成物、またはこれらの組み合わせ）は、当該技術分野では周知の確立されたキット形式の1つに容易に組み込むことができる点は当業者には容易に認識されよう。

40

【0282】

以下の実施例は、例示のために示すものであって、限定のためのものではない。

【実施例】

【0283】

実施例1：材料及び方法

下記に述べる実施例では下記の材料及び方法のうちの1つ以上のものを用いる。

【0284】

50

臨床試料と情報

すべてのヒト由来試料は、韓国のKonyang University Hospital、Boramae Medical Center、Eulji Medical Center及びGyeongsang National University Hospitalで承認された国際審査委員会（IRB）に基づいて採用された患者から得た。合計で21人のアミロイドPET陰性患者と26人のアミロイドPET陽性患者を採用した。表3A（下記）は、これらの患者の1人以上の臨床情報を与える。

【表3-1】

表3A. 採用された患者の臨床情報

¹ 施設	組織 タイプ	ID	年齢	性別	² DX	³ アミロ イドPET の結果	⁴ MMSE	⁵ CDR	教育 年数	⁶ APO E 遺伝子型
施設1	スワ ブ	施設1 -1	6 6	男性	NC	陰性	27	0	16	E3/E4
施設1	スワ ブ	施設1 -2	8 0	男性	NC	陰性	23	0	16	E3/E3
施設1	スワ ブ	施設1 -3	7 3	女性	NC	陰性	27	0	6	E3/E3
施設1	スワ ブ	施設1 -4	7 8	女性	NC	陰性	26	0	0	E2/E3
施設1	スワ ブ	施設1 -5	6 8	女性	NC	陰性	26	0	0	E2/E3
施設1	スワ ブ	施設1 -6	7 3	女性	NC	陰性	25	0	6	E3/E4
施設1	スワ ブ	施設1 -7	7 6	女性	NC	陰性	27	0	10	E3/E3
施設1	スワ ブ	施設1 -8	8 1	女性	NC	陰性	23	0	7	E3/E3
施設1	スワ ブ	施設1 -9	6 9	女性	MC I	陰性	25	0. 5	2	E3/E3
施設1	スワ ブ	施設1 -10	5 8	男性	NC	陽性	29	0	16	E3/E3
施設1	スワ ブ	施設1 -11	7 8	男性	MC I	陽性	26	0. 5	12	E3/E3
施設1	スワ ブ	施設1 -12	8 6	女性	MC I	陽性	22	0. 5	7	E3/E3
施設1	スワ ブ	施設1 -13	7 0	女性	MC I	陽性	22	0. 5	7	E3/E4
施設1	スワ ブ	施設1 -14	7 6	男性	MC I	陽性	22	0. 5	0	E3/E4
施設1	スワ ブ	施設1 -15	6 5	男性	MC I	陽性	30	0. 5	12	E3/E4

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

¹ 施設	組織 タイプ	I D	年 齢	性別	² D X	³ アミロ イド P E Tの結果	⁴ MM S E	⁵ C D R	教育 年数	⁶ A P O E 遺伝子 型
施設 1	スワ ブ	施設 1 - 1 6	7 0	女性	M C I	陽性	2 4	0. 5	6	E 4 / E 4
施設 1	スワ ブ	施設 1 - 1 7	8 5	男性	A D	陽性	1 8	0. 5	6	E 3 / E 3
施設 1	スワ ブ	施設 1 - 1 8	7 4	女性	A D	陽性	1 7	0. 5	4	E 3 / E 3
施設 1	スワ ブ	施設 1 - 1 9	8 5	女性	A D	陽性	1 6	1	6	E 2 / E 4
施設 1	スワ ブ	施設 1 - 2 0	7 3	女性	A D	陽性	2 4	0. 5	1 6	E 4 / E 4
施設 2	スワ ブ、 血漿	施設 2 - 1	7 5	女性	N C	陰性	2 9	0	9	E 3 / E 3
施設 2	スワ ブ、 血漿	施設 2 - 2	8 1	女性	N C	陰性	2 3	0	6	E 3 / E 3
施設 2	スワ ブ、 血漿	施設 2 - 3	8 9	女性	N C	陰性	2 8	0	6	E 2 / E 3
施設 2	スワ ブ、 血漿	施設 2 - 4	7 5	女性	N C	陰性	2 7	0	9	E 2 / E 3
施設 2	スワ ブ、 血漿	施設 2 - 5	7 4	男性	A D	陽性	2 3	0. 5	6	E 4 / E 4
施設 3	スワ ブ	施設 3 - 1	6 0	女性	N C	陰性	3 0	0. 5	1 5	E 2 / E 4
施設 3	スワ ブ	施設 3 - 2	5 8	女性	N C	陰性	2 7	0. 5	5	E 3 / E 4
施設 3	スワ ブ、 血漿	施設 3 - 3	6 6	女性	N C	陰性	2 7	0. 5	6	E 2 / E 3
施設 3	スワ ブ、 血漿	施設 3 - 4	6 7	男性	M C I	陰性	2 6	0. 5	6	E 3 / E 3

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

¹ 施設	組織タイプ	I D	年齢	性別	² D X	³ ア ミロ イド P E Tの 結果	⁴ M M S E	⁵ C D R	教育 年数	⁶ A P O E 遺伝 子型
施設 3	スワ ブ、血 漿	施設 3 - 5	7 2	女性	M C I	陰性	2 5	0. 5	6	E 3 / E 3
施設 3	スワブ	施設 3 - 6	5 7	男性	N C	陽性	2 9	0. 5	1 6	E 3 / E 3
施設 3	スワ ブ、血 漿	施設 3 - 7	6 6	女性	N C	陽性	2 7	0	9	E 3 / E 3
施設 3	スワ ブ、血 漿	施設 3 - 8	7 0	男性	M C I	陽性	2 7	0. 5	1 6	E 3 / E 4
施設 3	スワ ブ、血 漿	施設 3 - 9	7 1	男性	M C I	陽性	2 6	0. 5	1 8	E 3 / E 4
施設 3	スワ ブ、血 漿	施設 3 - 1 0	6 4	男性	M C I	陽性	2 7	0. 5	1 2	E 3 / E 3
施設 3	スワ ブ、血 漿	施設 3 - 1 1	8 0	男性	A D	陽性	2 0	0. 5	6	E 3 / E 3
施設 3	スワブ	施設 3 - 1 2	6 1	男性	A D	陽性	2 0	0. 5	1 2	E 3 / E 3
施設 3	スワ ブ、血 漿	施設 3 - 1 3	7 8	男性	A D	陽性	2 3	1	1 2	E 3 / E 4
施設 3	スワブ	施設 3 - 1 4	5 3	男性	A D	陽性	1 6	1	1 2	E 3 / E 4
施設 3	スワブ	施設 3 - 1 5	6 8	女性	A D	陽性	2 7	1	6	E 4 / E 4
施設 3	スワ ブ、血 漿	施設 3 - 1 6	7 1	女性	A D	陽性	1 6	0. 5	1	E 3 / E 3
施設 4	血漿	施設 4 - 1	5 9	女性	N C	陰性				

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

¹ 施設	組織 タイプ	I D	年 齢	性別	² D X	³ アミロ イドP E Tの結果	⁴ MM S E	⁵ C D R	教育 年数	⁶ A P O E 遺伝子 型
施設 4	血漿	施設 4 - 2	6 1	男性	N C	陰性				
施設 4	血漿	施設 4 - 3	6 4	女性	N C	陰性				
施設 4	血漿	施設 4 - 4	8 4	女性	A D	陽性				
施設 4	血漿	施設 4 - 5	7 9	女性	A D	陽性				
施設 4	血漿	施設 4 - 6	8 8	男性	A D	陽性				

10

20

47人の患者の臨床情報。¹施設とは、試料が採取された病院を意味する。施設1は、Seoul National University Boramae Medical Centerである。施設2は、Eulji Medical Centerである。施設3は、Gyeongsang National University Hospitalである。²DXは、臨床専門医による認知機能及び各種臨床成績を用いた診断結果である。³アミロイドPETの結果は、核医学の専門家によって決定されたアミロイドPET CT画像の結果である。陰性は、アミロイドベータの蓄積がほとんどまたはまったく認められなかった結果を意味し、陽性は、アミロイドベータの蓄積が認められた結果を意味する。⁴MMSEは、mini mental state examination（精神状態短時間検査）の略である。⁵CDRは、clinical dementia rate（臨床認知症評価）の略語である。⁶APOE遺伝子型は、APOE遺伝子の生来の対立遺伝子型の遺伝子型決定から得られた結果である。

30

【0285】

リアルタイムPCRアッセイ実験では、3人のアミロイドPET陰性患者と8人のアミロイドPET陽性患者を採用した。表3B（下記）は、これらの患者から得られた試料の臨床情報を示す。

40

【表 4 - 1】

表 3 B. リアルタイムPCR実験で使用する臨床試料及び情報

¹ 施設	I D	年齢	性別	² D X	³ P E T	⁴ M M S E	⁵ C D R	⁶ E D U	⁷ A P O E
EM C	EMC 0 1 6	7 5	女性	N C	陰性	2 9	0	9	E 3 / E 3
EM C	EMC 0 1 9	7 4	男性	A D	陽性	2 3	0. 5	6	E 4 / E 4
EM C	EMC 0 2 0	8 1	女性	N C	陰性	2 3	0	6	E 3 / E 3
EM C	EMC 0 2 1	8 9	女性	N C	陰性	2 8	0	6	E 2 / E 3
EM C	EMC 0 2 2	8 2	男性	A D	陰性	2 1	0. 5	9	E 3 / E 4
EM C	EMC 0 2 3	7 5	女性	N C	陰性	2 7	0	9	E 2 / E 3
GN UH	GNUH 0 0 1	6 0	女性	N C	陰性	3 0	0. 5	1 5	E 2 / E 4
GN UH	GNUH 0 0 2	7 0	男性	M C I	陽性	2 7	0. 5	1 6	E 3 / E 4
GN UH	GNUH 0 0 3	6 7	男性	M C I	陰性	2 6	0. 5	6	E 3 / E 3
GN UH	GNUH 0 0 4	7 2	女性	M C I	陰性	2 5	0. 5	6	E 3 / E 3
GN UH	GNUH 0 0 5	6 8	女性	A D	陽性	2 7	1	6	E 4 / E 4
GN UH	GNUH 0 0 7	7 1	男性	M C I	陽性	2 6	0. 5	1 8	E 3 / E 4
GN UH	GNUH 0 0 8	5 7	男性	N C	陽性	2 9	0. 5	1 6	E 3 / E 3
GN UH	GNUH 0 1 0	7 1	女性	A D	陽性	1 6	0. 5	1	E 3 / E 3
GN UH	GNUH 0 1 1	5 8	女性	N C	陰性	2 7	0. 5	5	E 3 / E 4

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

¹ 施設	I D	年齢	性別	² D X	³ P E T	⁴ M M S E	⁵ C D R	⁶ E D U	⁷ A P O E
GN UH	GNUH 0 1 2	6 6	女性	N C	陰性	2 7	0. 5	6	E 2 ／E 3
GN UH	GNUH 0 1 3	6 6	女性	N C	陽性	2 7	0	9	E 3 ／E 3
GN UH	GNUH 0 1 4	6 4	男性	M C I	陽性	2 7	0. 5	1 2	E 3 ／E 3
GN UH	GNUH 0 1 5	8 0	男性	A D	陽性	2 0	0. 5	6	E 3 ／E 3
GN UH	GNUH 0 1 6	6 1	男性	A D	陽性	2 0	0. 5	1 2	E 3 ／E 3
GN UH	GNUH 0 1 7	7 8	男性	A D	陽性	2 3	1	1 2	E 3 ／E 4
GN UH	GNUH 0 1 8	5 3	男性	A D	陽性	1 6	1	1 2	E 3 ／E 4

10

20

30

40

50

¹施設：試料が入手された機関または病院。「EMC」はEulji Medical Centerである。「GNUH」はGyeongsang National University Hospitalである。²D X：(i) 正常な認知機能(NC)、(ii) 軽度認知障害(MCI)、または(iii) アルツハイマー病(AD)の専門家による診断結果。³ P E T：アミロイドβのPET (ポジトロン断層法) CT (コンピュータ断層撮影) 画像診断後の核医学専門医及び関連専門医による診断。⁴MMSE：精神状態短時間検査。⁵C D R：臨床的認知症評価。⁶E D U：教育年数。⁷A P O E：A P O E遺伝子型。

【0286】

アルツハイマー病の診断とアミロイドβのPET CT画像診断

医療機関でアミロイドβPET CT画像診断を用いてアミロイドβを測定した。画像診断結果をもとに、核医学専門医と神経内科医がアミロイドβPETの陽性及び陰性判定を行った。アミロイドβ蓄積ありの患者は、「アミロイドPET陽性」と分類した。それ以外の場合、患者は「アミロイドPET陰性」と分類した。アルツハイマー病の診断は専門医が行った。診断結果を以下のカテゴリー、すなわち、(i) 正常な認知機能(NC)、(ii) 軽度認知障害(MCI)、及び(iii) アルツハイマー病(AD)の1つに分類した。

【0287】

患者の口腔上皮細胞採取(スワブ試料)

口腔上皮細胞を採取するため、1本の綿スワブを使用して患者の口内を拭った(約5～10回)。各患者から合計10個の異なるスワブ試料を採取した。各スワブ試料を個別のe-tubeに採取した。その後、各チューブを患者IDでラベル付けし、さらなる分析まで-20℃で保存した。

【0288】

PCR増幅用オリゴヌクレオチド

本明細書に記載されるように、miR-485-3pの発現を、リアルタイムPCRを使用して定量化した。使用した異なるプライマーとプローブを表4（下記）に示す。

【表5】

表4. miR-485-3pのPCR増幅用プライマーとプローブ

オリゴヌクレオチド名	配列	PCR法
miR-485-3p __FW1	5'-GTCATACACGGCTCTCCTC TCT-3' (配列番号94)	リアルタイム
miR-485-3p __FW7	5'-GTCATACACGGCTCTCCTC TCTAA-3' (配列番号100)	リアルタイム
miR-485-3p __FW9	5'-CATACACGGCTCTCCTCCTC TAAA-3' (配列番号52)	リアルタイム
リバーズ	5'-GAATCGAGCACCAGTTACG -3' (配列番号60)	リアルタイム
蛍光プローブ	FAM-CGAGGTCGACTTCCTAG A-NFQ (配列番号108)	リアルタイム

10

20

【0289】

マイクロRNAの調製

製造者の指示に従って血清／血漿キット（Qiagen, Germany）miRNeasyを使用してマイクロRNAを抽出した。製造者の指示に従ってexorNeasy血清／血漿Midikit（Qiagen, Germany）を使用して、口腔上皮及び血漿のエクソソームからマイクロRNAを抽出した。次に、1 µgの抽出したマイクロRNAをmiScriptII RTキット（Qiagen, Hilden, Germany）を使用したcDNA合成に使用した。

【0290】

標準物質の調製

miR-485-3pの模倣体（配列：GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU（配列番号1）、miRDB; mirdb.org/index.htmlから得られるヒトマイクロRNA配列）をmiScriptII RTキット（Qiagen、カタログ番号218161）を使用してssDNAによって合成した。合成したssDNAの濃度を、Quantus（商標）Fluorometer（Promega, E6150）装置を使用して測定した。その後、MEGAquick-spin（商標）Plus全DNAフラグメント精製キット（Intron, 17290）を用いてssDNAを精製した。

30

【0291】

リアルタイムPCR

miRNAの発現を分析するため、CFX Connectシステム（Bio-Rad）でTOPreal（商標）qPCR 2X PreMix（Enzynomics, Korea）を使用してTaqMan miRNA分析により行った。TaqManプローブを使用して個々のcDNAのリアルタイムPCR測定を行って、Bio-RadリアルタイムPCRシステムにより二本鎖DNA生成量を測定した。cDNA試料を様々な濃度に希釈することにより、リアルタイムPCRを行った。次いで、10 ng / µLのcDNAを一般的なマイクロRNAの調製に使用し、2 ng / µLのcDNAをエクソソームマイクロRNAの調製に使用した。リアルタイムPCRを、以下のように行った：95℃で15分、40サイクル（95℃で10秒、55℃で1分、72℃で10秒）。実験は、各データポイントについて2回行った。データをBioRadソフトウェアからエクスポー

40

50

トし、分析プログラムにインポートした。

【0292】

マイクロRNAの定量化

本明細書に記載のmiR-485-3pプライマー（上記の表4を参照）を使用したリアルタイムPCRの結果を、サイクル閾値（Ct）値として出力した。次に、Ct値を、下式を用いて決定された発現値に置き換えた：発現値 = $2^{-\text{サイクルの閾値}} \times 10^{10}$ 。

【0293】

次に、標準物質を以下の量で予め秤量した。（1）0.01 pg、（2）0.03 pg、（3）0.05 pg、（4）0.07 pg、（5）0.09 pg、及び（6）0.20 pg。標準物質のCt値も、上記の式を用いて決定された式の値に置き換えた。標準物質の事前測定量と関連する発現値を用いて回帰式を各バッチについて得た。miRNA発現レベルを定量化するために、患者のmiR-485-3p発現値（前述）を上記で得られた回帰式に代入した。

【0294】

APOE遺伝子型の決定

本明細書に参照によりその全体を援用するZhong et al., Mol Neurodegener 11:2-4 (2016)に記載されるようにして、APOE遺伝子型の決定を行った。簡単に説明すると、約1 mLのDPBSを口腔臨床スワブ試料の入ったチューブに加え、ボルテックスした。その後、スワブを取り出し、チューブを13,000 rpmで3分間遠心分離した。上清を捨てて沈殿物を調製した。次に、HigenゲノムDNAprepキット（Biofact, GD141-100）を使用して、沈殿物からゲノムDNAを抽出した。プライマー、プローブ、及びqPCR混合物は、表5及び6（下記）に示すように調製した。E2、E3、及びE4の混合物を調製し、1 µLの抽出したゲノムDNAを混合物に加えた。次に、BioRad CFX96を使用してリアルタイムPCR増幅を行った。

【表6】

表5. APOE遺伝子型決定用のPCR反応混合物

PCR反応ミックス	体積 (ul)
2×マスターミックス (2QPP)	10
E2/E3/E4プライマー (10 p/F + R)	2
ApoEプローブ (10 p)	1
テンプレート (10~30 ng)	1
RNase非含有水	6
全混合物	20

10

20

30

40

50

【表 7】

表 6. APOE 遺伝子型決定用のプライマー情報

名称	配列 (5' - 3')	n t
E2-フォワード	GCGGACATGGAGGACGTGT (配列番号 109)	19
E2-リバース	CCTGGTACACTGCCAGGCA (配列番号 110)	19
E3-フォワード	CGGACATGGAGGACGTGT (配列番号 111)	18
E3-リバース	CTGGTACACTGCCAGGCG (配列番号 112)	18
E4-フォワード	CGGACATGGAGGACGTGC (配列番号 113)	18
E4-リバース	CTGGTACACTGCCAGGCG (配列番号 112)	18
ApoEプロブ	[FAM] CAGCTCCTCGGTGCTCTGG C [BHQ1] (配列番号 114)	20

10

20

【0295】

エクソソームRNAの検証のためのウエスタンブロッティング

口腔臨床スワブ試料の入ったチューブを本明細書に記載のように処理してペレット及び上清を得た。上清を、exoRNeasy血清／血漿Midikit (Qiagen, カタログ番号77144) を使用したエクソソームのさらなる抽出に使用した。細胞ペレット及びHOCFEをSDS-PAGEによって分画し、製造者のプロトコールに従って転写装置を使用してポリニフッ化ビニリデン膜に転写した。画分の純度は、図13Aに見ることができる。TBST (10mM Tris, pH8.0, 150mM NaCl, 0.5% Tween (登録商標) 20) 中、10%無脂肪乳と60分間インキュベートした後、膜をTBSTで1回洗浄し、CD81 (1:100) 及びカルネキシン (1:200) に対する抗体と4℃で12時間インキュベートした。膜を3回、10分間洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合したIgG軽鎖結合タンパク質の1:1000希釈液と1時間インキュベートした。プロットをTBSTで3回洗浄し、製造者のプロトコールに従ってECLシステム (Amersham Biosciences) で現像した。

30

【0296】

アミロイドβの調製と細胞処理

Aβ (アミロイドベータ) 1-42ヘキサフルオロプロパナール (HFIP) ペプチド (#AS-64129) をAnaSpec (Fremont, Ca, USA) より入手した。アミロイドβモノマーを生成するため、HFIPペプチドをDMSOに溶解して5mMのストック濃度とした。その後、ストックを無血清DMEMで100μMに希釈した。アミロイドβオリゴマーを生成するために、モノマーを4℃で24時間インキュベートした。

40

【0297】

ヒト初代口腔上皮細胞 (Cat #36063-01) は、Cellprogen (Torrance, California) より購入した。細胞 (5×10⁵ cells/well) を6ウェルプレートに一晩播いた。次いで、細胞を異なる濃度 (0.1、0.5、1μM) のアミロイドβモノマーまたはオリゴマーで処理し、6時間インキュベートした

50

。インキュベーション後、上清と細胞の両方を分析のために回収した。

【0298】

臨床情報を用いた予測モデル構築

本明細書に記載される関連値を計算するため、異なる臨床情報に次の値を割り当てた。

(i) 性別 (男性) = 1、女性 = 2)、(ii) APOE 遺伝子型 ($E2/E3 = 1$ 、 $E3/E3 = 1$ 、 $E2/E4 = 2$ 、 $E3/E4 = 2$ 、及び $E4/E4 = 4$)。年齢、教育年数 (0 ~ 18)、MMSE スコア、CDR はそのまま使用した。AUC が最も高く、誤差率が最も低い次元を決定するために、各臨床情報について 11 次元までの無作為抽出を用いてシミュレーションを 100 回繰り返した。モデルのすべての係数が正常に出力されるまで次元を適用した。したがって、値を決定することができる次元数は、異なる臨床情報間で異なった (図 18A ~ 18F 及び図 19A ~ 19F を参照)。無作為抽出後、ANOVA 検定の p 値が 0.05 以下の検定数を各検定ごとにカウントした。最適な寸法が決定された後、臨床情報を用いて miR-485-3p の量の値によりアルゴリズムを構築した。臨床情報を、任意の順序で重複しない症例数に適用した。

10

【0299】

各臨床情報が精度の変化にどのように影響するかを評価するために、下式を用いて「精度補正率」を計算した。精度補正率 (%) = $[(ACC1/ACC2) - 1] \times 100$ (ただし、「ACC1」は特定の臨床情報を含むアルゴリズムの精度を指し、「ACC2」は特定の臨床情報を含まないアルゴリズムの精度を指す)。

20

【0300】

交差検証とコンピュータによる無作為抽出

本明細書に開示されるアルゴリズムを検証及び／または修正するため、K 分割交差検証法を用いた。対象 41 人の患者群で、この群を患者 10 人の 3 群と患者 11 人の 1 群に分けた。対象 36 人の患者群 (年齢 > 60 歳) で、この群を患者 9 人の 4 群に分けた。3つの群を合わせてモデルを作成し、残りの 1 群で検証した。検証セットを交換しながら、同じプロセスを 4 回行った。無作為抽出は、すべての試料から 20 個の重複しない試料をランダムに 100 回繰り返すことによって行った。

【0301】

グレーゾーンの計算

数量またはスコア値の最大値と最小値との間の値を 500 個の値に分割することにより、最初のカットオフ値をシミュレートされた結果の値として導出した。シミュレーション結果の最も正確なカットオフ値は、最初のカットオフ値であった。次に、すべての試料の標準偏差の平均を計算し、2 で割った。上記で計算した標準偏差の平均値の $1/2$ に最初のカットオフ値を加算及び減算することによってグレーゾーンを求めた。グレーゾンの上限 = 最初のカットオフ値 + 試料の数量またはスコアの SD の平均値の $1/2$ 。グレーゾンの下限 = 最初のカットオフ値 - 試料の数量またはスコアの SD の平均値の $1/2$ 。

30

【0302】

統計学的検定

すべての統計分析は、R (バージョン 3.5.2) により行った。2 群間の統計的有意性の検定は対応なし t 検定によって行った。ROC (受信者動作特性) 分析を用いて AUC (曲線下面積) 値、感度、及び特異性を測定した。ROC 解析は、R パッケージの一種である「ROCR」と「pROC」を用いて行った。回帰モデリングは、R の「lm」コマンドを使用して分析した。

40

【0303】

実施例 2：標的マイクロ RNA の選択

本明細書に開示される認知障害 (例えば、アルツハイマー病) の診断に使用できる特定の miRNA を特定するため、異なる miRNA の発現量をアルツハイマー病 (AD) と診断された患者及び正常なコントロール対象 (すなわち、正常な認知機能) から得た血漿試料で qPCR を用いて測定した。図 12A に示されるように、コントロール対象から得た血漿試料における対応する発現量と比較して、AD 患者から得た血漿試料中の miR-

50

485-3pの発現量には統計的に有意な増加が認められた。試験したmiRNAのうち、他のmiRNAでは発現量にそのような有意差は認められなかった。

【0304】

上記の結果を確認するため、さらなる患者から血漿試料と口腔臨床スワブ試料の両方を採取した。やはり図12B及び12Cに示されるように、miR-485-3pの発現量は、コントロール対象（すなわち、アミロイドPET陰性）と比較して、AD患者（すなわち、アミロイドPET陽性）からの血漿試料において有意に高かった。miR-385-3pの発現量の差は、口腔臨床スワブ試料から調製したヒト口腔由来の無細胞エクソソームでさらに顕著であった。

【0305】

上記の結果は、特定の認知障害（例えば、アルツハイマー病）を有する患者におけるmiR-485-3p発現量の増加を示しており、miR-485-3pが適当なバイオマーカー候補であることを示唆するものである。

【0306】

実施例3：臨床情報の潜在的なバイアスの分析

患者の臨床情報が患者のアミロイドβの蓄積に関する潜在的なバイアスを示唆できるものかどうかを評価するため、以下の臨床情報を収集し、必要に応じて値を割り当てた：（i）診断時の年齢、（ii）性別（男性）=1、女性=2）、（iii）教育年数（0～16）、（iv）APOE遺伝子型（E2/E3=1、E3/E3=1、E2/E4=2、E3/E4=2、及びE4/E4=4）、（v）精神状態短時間検査（MMSE）スコア、（vi）認知障害（すなわち、正常な認知機能（「NC」）、軽度認知障害（「MCI」）；及びアルツハイマー病（「AD」））、及び（vii）臨床認知症評価（CDR）スコア。次に、アミロイドβの蓄積が確認された患者（すなわち、アミロイドPET陽性）及びアミロイドβの蓄積が確認されていない患者（すなわち、アミロイドPET陰性）について、それぞれの臨床情報を評価した。

【0307】

表7（下記）に示すように、正常な認知機能（NC）またはCDR値0と診断された患者群間では、アミロイドPET陽性の対象はアミロイドPET陰性の対象と比較して有意に少なかった。アミロイドPET陽性の対象と陰性の対象との間で、他の臨床情報に統計的な有意差は認められなかった。

10

20

30

40

50

【表 8 - 1】

表 7. 臨床情報の統計的結果

臨床情報	値	アミロイ ドPET 陰性の数	アミロイ ドPET 陽性の数	p 値	オッズ 比	95%信 頼区間
認知障害による診 断	NC	15	3	0.005	0.17	0.03-0.61
認知障害による診 断	MC I	3	9	0.239	2.25	0.56-11.95
認知障害による診 断	AD	0	11	—	—	—
CDR 値	0	12	2	0.007	0.14	0.02-0.62
CDR 値	0.5	6	17	0.158	2.17	0.72-7.18
CDR 値	1	0	4	—	—	—
性別	男性	3	14	0.058	3.47	0.93-17.65
性別	女性	15	9	0.148	0.48	0.16-1.34
診断時の年齢	51-60	2	3	0.868	1.15	0.16-10.73
診断時の年齢	61-70	5	8	0.730	1.24	0.34-4.85
診断時の年齢	71-80	8	9	0.826	0.88	0.28-2.84
診断時の年齢	81-90	3	3	0.779	0.79	0.12-5.07
教育年数	0	2	1	0.445	0.42	0.01-5.61
教育年数	1-6	9	8	0.530	0.70	0.22-2.23

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

臨床情報	値	アミロイ ドPET 陰性の数	アミロイ ドPET 陽性の数	p 値	オッズ 比	95%信 頼区間	
教育年数	7 - 9	3	3	0.77 9	0.7 9	0.12 - 5.07	
教育年数	10 - 1 2	1	6	0.13 9	4.1 4	0.60 - 114.3 3	10
教育年数	13 - 1 8	3	5	0.73 8	1.2 8	0.26 - 7.37	
MMSE スコア	15 - 1 9	0	5	—	—	—	
MMSE スコア	20 - 2 5	6	9	0.79 4	1.1 6	0.35 - 4.14	
MMSE スコア	26 - 3 0	12	9	0.32 3	0.5 9	0.20 - 1.73	20
APOE 遺伝子型	E2 /E 2	0	0	—	—	—	
APOE 遺伝子型	E2 /E 3	5	0	—	—	—	
APOE 遺伝子型	E3 /E 3	9	11	0.93 5	0.9 6	0.32 - 2.89	30
APOE 遺伝子型	E2 /E 4	1	1	0.86 5	0.7 9	0.02 - 32.14	
APOE 遺伝子型	E3 /E 4	3	7	0.42 3	1.7 6	0.41 - 9.66	
APOE 遺伝子型	E4 /E 4	0	4	—	—	—	

40

【0308】

上記の結果は、臨床情報のみを使用した場合、アミロイドβの蓄積に関連する認知障害（例えば、アルツハイマー病）などの認知障害を効果的に予測できないことを示唆している。

【0309】

実施例4：ヒト臨床スワブ試料におけるmiR-485-3p発現のリアルタイムPCR分析

認知障害（例えば、アルツハイマー病）の診断マーカーとしてのmiR-485-3p発現の使用の評価を開始するに当たって、リアルタイムPCRアッセイを使用して、アミ

50

ロイドβの蓄積あり、またはなしの患者からのヒト臨床スワブ試料におけるmiR-485-3p発現を比較した。本明細書に記載されているように、アミロイドβの蓄積は多くの認知障害に関連している。臨床スワブ試料に存在するmiR-485-3pを増幅するために、次のプライマーを使用した。5'-GTCAATACACGGCTCTCTCTCTCTCTAA-3'（本明細書で「miR-485-3p_FW7」と称する。配列番号100）。上記に示されるように、リアルタイムPCR用に調製したRNAはエクソソームRNAであった。

【0310】

図1Aは、臨床スワブ試料中のmiR-485-3p発現量のナイーブサイクル閾値（Ct）値を示す。ナイーブCt値は発現値に反比例する（すなわち、発現量が高いほどナイーブCtが低くなる）。示されるように、miR-485-3p発現量は、アミロイドβ陰性スワブ試料（すなわち、アミロイドβ蓄積なしの患者から得たもの）と比較して、アミロイドβ陽性スワブ試料（すなわち、アミロイドβ蓄積ありの患者から得たもの）で統計的に高かった。2つの群のスワブ試料におけるmiR-485-3p発現の差のAUC、精度、感度、及び特異性はそれぞれ、以下のとおりであった：（i）0.80、（ii）0.78、（iii）0.75、及び（iv）0.81（図1B参照）。

10

【0311】

上記の結果は、miR-485-3p発現が、アミロイドβ蓄積あり、またはなしの患者からの臨床スワブ試料を区別するのに使用できることを示唆している。

【0312】

20

実施例5：臨床情報を単独で考慮した場合、またはmiR-485-3p発現と組み合わせて考慮した場合の診断能力の比較

いくつかの研究では、患者の臨床情報のみを用いて、アミロイドベータの有無またはAD診断を予測するモデルが作成されている（本明細書に参照によりその全体を援用するKim et al., J Alzheimer's Dis 66:681-691 (2018)を参照）。そのようなモデルを本明細書に記載の方法（すなわち、1つ以上の臨床情報をmiR-485-3pの発現レベルと組み合わせるもの）と比較するため、（i）臨床情報のみ（CFO）、（ii）マイクロRNA（すなわち、miR-485-3p）のCt値、及び（iii）マイクロRNA（すなわち、miR-485-3p）の量の3つの異なる統計的方法を用いた。これらの方法のそれぞれについて、すべての症例の臨床情報の組み合わせのアルゴリズムを作成した。CFO法では、マイクロRNA情報を使用せずに患者の臨床情報のみを使用してアルゴリズムを作成した。Ct値及び量の方法では、Ct値とマイクロRNAの量との組み合わせをそれぞれCFO法に追加した。次に、結果のアルゴリズムのAUCを比較し、ランク付けした。

30

【0313】

図3Aに示されるように、臨床情報の組み合わせのみを考慮した場合、1,956個の可能なアルゴリズムのうち58個のアルゴリズムのみが第1位にランクされた。アルゴリズムの大部分は3位にランクされた。これに対して、量の統計的方法を用いた場合、60個を除くすべてのアルゴリズム（1,896個のアルゴリズム）が1位を獲得した。Ct値を用いた手法では、1100個を除くすべてのアルゴリズム（1,856アルゴリズム）が2位にランクされた。さらに、全体のAUC値を考慮した場合、臨床情報とCt値または量の値とを組み合わせた方法は、臨床情報のみを使用する方法と比較して有意に優れていた。本実施例で示される結果は、臨床情報のみを用いる当該技術分野の既存の方法と比較して、本開示に開示される診断方法の優位性を示すものである。

40

【0314】

実施例6：miR-485-3pの発現量を用いたヒト臨床スワブ試料中のアミロイドβ蓄積の検出に対する年齢の影響の分析

本明細書に開示されるmiR-485-3p発現量を用いて認知障害（例えば、アルツハイマー病）を診断する能力に対して、異なる臨床情報が有する影響をより効果的に評価するため、患者の年齢とヒト口腔由来無細胞エクソソーム（HOCFE）におけるmiR

50

－ 4 8 5 － 3 p 発現量との関係性を評価した。

【 0 3 1 5 】

図 1 4 A に示されるように、H O C F E における m i R － 4 8 5 － 3 p の発現量は、患者の年齢が増加するにつれて減少した。H O C F E 試料をアミロイド P E T 陰性患者と陽性患者に分けた場合でも、この逆相関関係は統計的に有意に保たれた。さらに、逆相関関係はアミロイド P E T 陽性患者ではより急激に進行した。しかしながら、アミロイド P E T 陰性の患者間では、m i R － 4 8 5 － 3 p の発現量は、年齢とともにより高い統計学的有意性を示した。

【 0 3 1 6 】

次に、上記の結果に基づいて、m i R － 4 8 5 － 3 p の発現量を用いて異なる年齢群の患者におけるアミロイド β 蓄積を予測する能力を評価した。患者を以下の群、すなわち、(i) 6 0 歳以下 (「 ~ 6 0 」) 、(i i) 6 1 ~ 7 0 歳 (「 6 1 ~ 7 0 」) 、(i i i) 7 1 ~ 8 0 歳 (「 7 1 ~ 8 0 」) 、(i v) 8 1 歳以上 (「 8 1 ~ 」) に分けた。図 1 6 B に示されるように、すべての年齢群において、アミロイド β の蓄積が確認された患者 (すなわち、アミロイド P E T 陽性) とアミロイド β の蓄積がないことが確認された患者 (すなわち、アミロイド P E T 陰性) との間で、m i R － 4 8 5 － 3 p の発現量に統計的な有意差が認められた。興味深いことに、6 1 歳未満の群では、アミロイド P E T 陽性患者と比較してアミロイド P E T 陰性患者で m i R － 4 8 5 － 3 p の発現量が増加していた。この関係は、他のすべての年齢群で逆であった (すなわち、アミロイド P E T 陽性対象で m i R － 4 8 5 － 3 p 発現量はより多かった) 。いずれか 1 つの理論に束縛されるものではないが、この現象は、特定の年齢を越えたアミロイド β 蓄積ありの患者において m i R － 4 8 5 － 3 p の発現量が急激に増加することによるものと考えられる。この現象は 6 0 歳以上の患者で顕在化し始め、年齢の増加とともに減少するように見えた。これに対して、アミロイド β 蓄積なしの (すなわち、アミロイド P E T 陰性) 患者では、m i R － 4 8 5 － 3 p の発現量は 6 0 歳以上から急速に減少し、年齢につれて減少したレベルを維持した。年齢による m i R － 4 8 5 － 3 p 発現量の不均衡は、アミロイド β 蓄積の予測の精度に影響を及ぼし、6 0 代の患者で最も高い統計的有意性を示した (図 1 6 B を参照) 。表 8 (下記) は、各年齢群について測定に用いた特異性及び感度の値を示している。

【 表 9 】

表 8. 各種アルゴリズムの公式

年齢範囲	特異性	感度
5 0 代	0. 9 1 6 7	0. 6 4 7 1
6 0 代	0. 8 4 6 2	1. 0 0 0 0
7 0 代	0. 9 7 4 4	0. 6 4 8 6
8 0 代	0. 8 7 5 0	1. 0 0 0 0

【 0 3 1 7 】

m i R － 4 8 5 － 3 p 発現量を使用したアミロイド β の蓄積の診断が、特定の年齢群内で最も正確かどうかを評価するため、年齢の基準を特定の年齢群の上または下に設定した。図 1 7 A 及び 1 7 B に示されるように、7 3 歳以下の年齢群で最も高い精度及び A U C が観察された。6 5 歳以下の年齢群では、m i R － 4 8 5 － 3 p の発現量は、アミロイド β 蓄積あり、またはなしの群との間で逆転し、精度が低かった。上記の傾向は、年齢基準を高くした別の独立した実験で確認され、7 1 歳以上の患者群では高い精度と A U C が一貫して維持され、7 2 歳以上の患者群で急速に減少するパターンを示した。7 9 歳以上の群では試料数が 1 0 以下に減少し、精度が大きく変動した (図 1 7 C を参照) 。2 つの基準 (ある年齢以上またはそれ以下) の包括的な試験結果は、特定の年齢以上の基準の結果

が、特定の年齢以下の結果よりも AUC 及び精度が高いことを示した（図 17B 及び 17D を参照）。

【0318】

特定の年齢群内での miR-485-3p 発現量の診断精度をさらに実証するため、患者を年齢に基づいて（低～高）分類し、次いでスライディングウィンドウにより 10 人の患者を選択して AUC 及び精度を測定した（図 14C を参照）。かかる分析にスライディングウィンドウを用いる方法は、当該技術分野では周知のものである（例えば、本明細書に参照によりその全体を援用する coleoguy.blogspot.com/2014/04/sliding-window-analysis.html を参照）。かかるアプローチにより、異なる年齢群の試料サイズに起因する変動が減少した。図 14C に示されるように、61 歳以下の患者では 73 歳の患者と比較して精度及び AUC は高かった。61～73 歳の年齢群では、miR-485-3p 発現量によるアミロイドβの蓄積の予測の精度は、100% に近かった。

10

【0319】

実施例 7：miR-485-3p の発現量を用いたヒト臨床スワブ試料中のアミロイドβ蓄積の検出に対する他の臨床情報の影響の分析

miR-485-3p の発現量を用いてアミロイドβの蓄積を検出する診断能力を向上させるために、臨床スワブ試料に関連する以下の臨床情報を患者から収集し、値を割り当てた：(i) 年齢、(ii) 性別（男＝1、女性＝2）、(iii) 教育年数（0～16）、(iv) APOE 遺伝子型（E2/E3＝1、E3/E3＝1、E2/E4＝2、E3/E4＝2、及び E4/E4＝4）、及び (v) 精神状態短時間検査（MMSE）スコア（上記の表 3 を参照）。次いで、miR-485-3p の発現量（すなわちナイーブなサイクル Ct 値）と上記の臨床情報の 1 つ以上のものとの様々な組み合わせを作成し、各組み合わせの診断精度を決定した。

20

【0320】

図 4 は、異なる可能な組み合わせの診断精度を示している。示されるように、臨床スワブ試料中の miR-485-3p 発現量を、試験したすべての追加の臨床情報（すなわち、年齢、性別、教育年数、APOE 遺伝子型、及び MMSE スコア）と組み合わせで評価した場合に最大の精度が観察された。すべての因子を組み合わせた場合、精度は 89.20% となり、miR-485-3p 発現量のみを使用した場合よりも 11.11% 高かった（図 3A 及び 3B を図 1A 及び 1B と比較）。

30

【0321】

アミロイドβの蓄積を検出するうえで試験したすべての臨床情報の組み合わせを用いる能力をさらに評価するため、下式を用いて異なる臨床スワブ試料のスコアを確立した：（ナイーブ Ct ×（年齢 × V1 年齢 + V2 年齢））×（性別 × V1 性別 + V2 性別）×（APOE × V1 APOE + V2 APOE）×（MMSE × V1 MMSE + V2 MMSE）×（教育年数 × V1 EDU + V2 EDU）（式中、V1 及び V2 は、特定の追加の臨床情報に関連付けられた回帰係数値である）。図 3A に示されるように、アミロイドβ蓄積なしの患者（左）とアミロイドβ蓄積ありの患者（右）の臨床スワブ試料のスコアには統計的な差があった。

40

【0322】

上記の結果は、試験したすべての臨床情報を使用することの重要性を示唆するものであるが、患者の APOE 遺伝子型及び MMSE スコアを決定するにはさらにコストがかかる。したがって、認知障害を診断する低コストの手段を提供するために、APOE 遺伝子型と MMSE スコアの両方を除外した様々な組み合わせの診断精度を比較した。図 4 に示されるように、miR-485-3p 発現、性別、及び教育年数の組み合わせは、APOE 遺伝子型と MMSE スコアを除外した組み合わせの中で最大の精度を示した。この組み合わせの精度は 82.95% であり、追加の臨床情報を考慮しなかった場合よりも 5.11% 高かった（図 2A 及び 2B を図 1A 及び 1B と比較）。

【0323】

50

この特定の組み合わせの診断能力（すなわち、 $miR-485-3p$ 発現量、性別、及び教育水準）を評価するため、下式を用いて異なる臨床スワブ試料のスコアを確立した：
 $(\text{ナীব C t} \times (\text{性別} \times V1_{\text{性別}} + V2_{\text{性別}})) \times (\text{教育年数} \times V1_{\text{EDU}} + V2_{\text{EDU}})$
 （式中、 $V1$ 及び $V2$ は、特定の追加の臨床情報に関連付けられた回帰係数値である）。
 図2Aに示されるように、アミロイドPET陽性スワブ試料（すなわち、アミロイド β 蓄積ありの患者からのもの）のスコアは、アミロイド β 蓄積なしの患者からの臨床スワブ試料と比較して有意に低かった。

【0324】

上記の結果を合わせると、追加の臨床情報（例えば、性別及び教育水準など）を組み合わせることで、 $miR-485-3p$ 発現量を用いてアミロイド β 蓄積ありの、またはなしの患者からの臨床スワブ試料を区別する能力を向上させることができることを示している。

【0325】

実施例8： $miR-485-3p$ の発現と臨床情報を組み合わせた診断能力のさらなる分析

上記の実施例7に示した結果に加えて、認知障害（例えば、アルツハイマー病）の診断において $miR-485-3p$ 発現量を1つ以上の臨床情報と組み合わせる能力を確認するためのさらなるアルゴリズムまたは式を構築した。詳細には、第1のアルゴリズムは、年齢、性別、及び教育を $miR-485-3p$ 発現量と組み合わせたものである（本明細書では「ブレDX」と呼ぶ。表9を参照）。第2のアルゴリズムは、年齢、性別、教育、APOE遺伝子型、及びMMSEスコアを $miR-485-3p$ 発現量と組み合わせたものである（本明細書では「プロDX1」と呼ぶ。表9を参照）。第3のアルゴリズムは、年齢、性別、教育、APOE遺伝子型、MMSEスコア、及び臨床認知症評価（CDR）スコアを $miR-485-3p$ 発現量と組み合わせたものである（本明細書では「プロDX2」と呼ぶ。表9を参照）。

【表10-1】

表9. 異なるアルゴリズムの式

アルゴリズムの種類	計算式
量	スコア = ($miR-485-3p$ の量 + 0.007) $\times 10^4$
ブレDX	スコア = ($miR-485-3p$ の量 $\times$ ($3.5e-02 \times$ 教育年数 ⁵ + $5.2e-02 \times$ 教育年数 ⁴ - $2e-02 \times$ 教育年数 ³ + $2.8e-03 \times$ 教育年数 ² - $1.6e-04 \times$ 教育年数 + $3.1e-06$) $\times$ ($-0.0027 \times$ 性別 + 0.008)) + $7e-0.7$) $\times 10^8$
プロDX1	スコア = ($miR-485-3p$ の量 $\times$ ($3.5e-02 \times$ 教育年数 ⁵ + $5.2e-02 \times$ 教育年数 ⁴ - $2e-02 \times$ 教育年数 ³ + $2.8e-03 \times$ 教育年数 ² - $1.6e-04 \times$ 教育年数 + $3.1e-06$) $\times$ ($0.001 \times$ APOE遺伝子型数値 + 0.002) $\times$ ($-4e-07 \times$ MMSE + $2.1e-05$) $\times$ ($-3.27 \times$ 性別数値 + $1.77e-10$)) + $8e-17$) $\times 10^{18}$

10

20

30

40

50

【表 10-2】

プロDX2	スコア = ((miR-485-3pの量 × (0.034 × CDR + 0.06) × (0.0015 × APOE遺伝子型数値 + 0.0016) × (-7e-07 × MMSE + 3.48e-05) × (1.85e-11 × 教育年数 + 1.51e-10) × (-7.6e-20 × 性別数値 + 2.2e-19)) + 7e-31) × 10 ³³	
量 (年齢 > 60)	スコア = (miR-485-3pの量 + 0.007) × 10 ⁴	10
プレDX (年齢 > 60)	スコア = ((miR-485-3pの量 × (-0.0188 × 性別数値) + 0.08)) + 0.001) × 10 ⁴	
プロDX1 (年齢 > 60)	スコア = ((miR-485-3p × (-0.0188 × 性別数値) + 0.08) × (-6.45e-05 × MMSE + 0.004) × (1.345e-06 × APOE遺伝子型数値 + 5.86e-06)) + 4e-6) × 10 ¹³	20
プロDX2 (年齢 > 60)	スコア = ((miR-485-3p × (0.033 × CDRの量) + 0.055) × (-7.65e-05 × MMSE) + 0.005) × (-2.87e-06 × 性別数値 + 1.456e-05) × (2.77e-5 × APOE) + 6e-11)) + 9e-23) × 10 ²⁴	

【0326】

上記のアルゴリズムを構築する前に、各臨床情報についてmiR-485-3pの定量値に回帰モデリング法を適用する際に適切な次元レベルを特定するための分析を行った。miR-485-3pの定量値と回帰モデリングを各臨床情報について11次元まで行い、各次元ごとに100回無作為抽出することで再現性を確認した。100回の無作為抽出実験において、p値が有意であった実験（シミュレーション）の回数を数え、各実験についてAUCを測定し、AUCの偏差値をAUCの平均値で割ることにより誤差率を計算した。以下の特性を有する次元を選択した：（i）統計的に有意な実験結果（すなわち、合計100回のシミュレーションのうち、p値<0.05であったシミュレーションの回数）、（ii）比較的高いAUC、及び（iii）比較的低い誤差率（図18A～18F及び19A～19Fを参照）。

【0327】

次元の値が選択された時点で、異なる臨床情報を上記のアルゴリズムに適用し、次いで、異なる組み合わせについて精度を決定した。図20B、20C、及び20Dに示されるように、特定の臨床情報は特定のアルゴリズムについて同じであったが、臨床情報を適用した順序が影響を及ぼしている。プレDXアルゴリズムでは、性別のみをmiR-485-3p発現量と組み合わせた場合に最高の精度が観察された（図20Bを参照）。プロDX1アルゴリズムでは、miR-485-3p発現量と組み合わせて性別、MMSEスコア、及びAPOE遺伝子型を（記載された順序で）アルゴリズムに適用した場合に、最も高い精度が観察された（図20Cを参照）。プロDX2アルゴリズムでは、miR-485-3p発現量と組み合わせてCDRスコア、MMSEスコア、性別、及びAPOE遺伝子型を（記載された順序で）アルゴリズムに適用した場合に、最も高い精度が観察された（図20Dを参照）。上記のアルゴリズムのそれぞれの全体的なAUC値を考慮すると、

最も多くの臨床情報タイプを適用したプロD X 2 アルゴリズムが最も高い平均 A U C 値を記録した（図 2 0 A を参照）。同様に、最も高い精度（0.9740）を持つアルゴリズムもプロD X 2 アルゴリズムを使用して測定された（図 2 0 D を参照）。同様の結果が、61 歳未満の患者のみ（図 2 1 A ～ 2 1 C を参照）または 60 歳以上の患者のみ（図 2 2 A ～ 2 2 F を参照）からの試料を使用して観察された。

【0328】

上記に加えて、上記のアルゴリズムについて精度に対する個々の臨床情報の影響を評価した。これを行うため、精度補正率を実施例 1 に記載されるようにして決定した。図 2 2 C 及び 2 2 F に示すように、C D R スコアは高い精度と相関があった。興味深いことに、年齢によって精度は向上せず、実際には精度を低下させるようであった。いずれか 1 つの理論に束縛されるものではなく、また、上記で述べたように、このような結果は、アミロイド P E T 陽性患者群での m i R - 4 8 5 - 3 p 発現量の急速な上昇と低下によるものと考えられる。

【0329】

実施例 9：認知障害を診断するための臨床情報と m i R - 4 8 5 - 3 p 発現の組み合わせ

最も高い精度を有するアルゴリズムを検証及び特定するために、K 分割交差検証法を用いた。例えば、本明細書に参照によりその内容の全体を援用する Jung et al., J Nonparametr Stat 27 (2): 167-179 (2015) を参照されたい。要約すると、患者試料を 4 群に均等に分割した。これらの群のうちの 3 群をトライアルセットとして使用し、1 群を検証セットとして使用した。その後、特定と検証の両方を各群について合計 4 回行った。検証後、前述の 3 つのアルゴリズム（すなわち、ブレD X、プロD X 1、及びプロD X 2）のすべてで高い A U C 値（最大 0.86）が得られた。最も高い A U C 値を有する K 番目のモデルを各アルゴリズムの最終モデルとして選択した（図 2 3 A 及び 2 3 B を参照）。各アルゴリズムの計算式を表 9（上記）に示す。異なるアルゴリズムの結果を、図 2 4 A ～ 2 4 D に示す。

【0330】

上記の結果は、様々な臨床情報と m i R - 4 8 5 - 3 p 発現量との組み合わせが、特定の認知障害（例えば、アルツハイマー病）の診断ツールとして有用である可能性を示唆している。

【0331】

実施例 10：ヒト血漿試料中の m i R - 4 8 5 - 3 p 発現量のリアルタイム P C R 分析

次に、m i R - 4 8 5 - 3 p 発現量を使用したヒト血漿試料中のアミロイド β 蓄積の検出能力を評価した。m i R - 4 8 5 - 3 p の発現量を、例えば実施例 2 で上記に述べたように、リアルタイム P C R を使用して測定した。

【0332】

図 5 A に示されるように、臨床スワブ試料と異なり、アミロイド P E T 陰性（すなわち、アミロイド β 蓄積なしの患者からのもの）とアミロイド P E T 陽性（すなわち、アミロイド β 蓄積ありの患者からのもの）の血漿試料の間でナイーブサイクル閾値（C t）値に有意差はみられなかった。臨床スワブ試料と比較して、A U C、精度、感度、及び特異性の値はいずれも有意に低かった（図 5 B と図 1 B を比較）。

【0333】

しかしながら、ヒト血漿試料中の m i R - 4 8 5 - 3 p の発現量を患者の性別情報のみと組み合わせた場合、アミロイド β 蓄積ありの患者及びなしの患者の血漿試料の間に顕著な差が認められた。例えば、次式を用いて異なる血漿試料のスコアを確立した：（ナイーブ C T × （性別 × V 1 性別 + V 2 性別））（式中、V 1 及び V 2 は、追加の臨床情報に関連付けられた回帰係数値である）。図 6 A に示されるように、アミロイド P E T 陰性血漿試料とアミロイド P E T 陽性血漿試料との間に統計的差が認められた。同様に、A U C、精度、感度、及び特異性の値はいずれも、血漿試料からの m i R - 4 8 5 - 3 p 発現量のみを使用した場合の対応する値と比較して有意に高かった（図 6 B と図 5 B を比較）。m i R - 4 8 5 - 3 p 発現量をアッセイから正規化し、図 6 C で比較した。性別のフィッテ

10

20

30

40

50

10

10

10

10

10

20

20

30

30

30

30

40

40

40

50

法（例えば、実施例 1 を参照）を用いて、最も高い精度を有する最適カットオフ値を決定し、グレーゾーンを確立した。

【0340】

図 24A～24D に示されるように、与えられた異なるアルゴリズムを使用して、高い AUC 値（0.92 以上）及び高い精度（0.91 以上）の両方が実現された。上記のデータと一致して、異なる臨床情報の数が増えるにしたがって、より高い AUC 値が観察された。年齢を制限しない場合、別の独立した実験で同様の結果が観察された（図 25A～25D を参照）。しかしながら、年齢を考慮した場合、61 歳以上の患者間で比較的高い AUC 及び精度が観察された（図 24A～24D を参照）。量の診断方法（表 3A を参照）では約 9 %、ブレ DX 法では約 9 %、プロ DX 1 法では約 11 %、及びプロ DX 2 法では約 6 % の精度の向上がみられた。AUC 値も 60 歳以上の患者群で高かった。また、年齢を 61 歳以上に限定した場合、感度は平均で 2 %、特異性は平均 15 % 増加した（表 3A を参照）。

10

【0341】

上記の結果は、異なる臨床情報と本明細書に記載の miR-485-3p 発現量とを組み合わせることの診断能力を裏付けるものである。

【0342】

実施例 13：miR-485-3p 発現量を用いた認知障害の診断

miR-485-3p 発現量による認知障害の予測能力を評価するため、認知障害の程度（すなわち、正常な認知機能（NC）、軽度の認知障害（MCI）、及びアルツハイマー病（AD））によるアルツハイマー病の診断に基づいて患者を分類した。異なる群からのアミロイド PET 陽性患者と陰性アミロイド PET 患者との間にはいくらかの偏りがあったが、示されたすべての診断方法（すなわち、以下のアルゴリズム、すなわち、量、ブレ DX、プロ DX 1、プロ DX 2 のうちの 1 つを使用。表 9 を参照）は強い統計的有意性を実現した（図 11A、11B、及び 26A～26C を参照）。詳細には、NC 及び MCI 患者群は、極めて高い統計的精度を示した（図 26A～26C を参照）。NC 患者群は、他の患者群と比較してすべての統計値にわたって高い結果を示した。さらに、61 歳未満の患者を含む NC 患者の群は、比較的低い予測力を示した。NC 患者群には、61 歳未満のほとんどの患者が含まれていた。

20

【0343】

上記の結果は、NC 及び MCI 患者群におけるアミロイド β 蓄積の高い予測力が、AD 発症に移行しつつある群内の患者を特定するための極めて有用な診断基準として使用できることを示している。

30

【0344】

特許請求の範囲を解釈するうえで、「発明の概要」及び「要約」のセクションではなく、「発明の詳細な説明」のセクションを用いることが意図されている点は認識されるべきである。発明の概要及び要約セクションは、本発明者（複数可）により意図される 1 つ以上であるが、すべてではない本開示の例示的態様を示し得、したがって、本開示及び添付の特許請求の範囲を如何様にも限定することを意図しない。

【0345】

本開示は、特定の機能及びそれらの関係の実施を示す機能的構成単位を用いて上記された。これらの機能的要素の境界は、説明の便宜上、本明細書では任意に定義されている。特定の機能及びそれらの関係性が適切に実施されている限り、代替的な境界を定義することもできる。

40

【0346】

具体的な態様の上記の具体的な説明は本開示の一般的な性質を余すところなく示しているため、他者は、当業者の技能の範囲内の知識を適用することで、不要な実験を行うことなく、本開示の一般的な概念から逸脱せずに、かかる具体的な態様を容易に改変し、及び／またはさまざまな用途に適合させることができる。したがって、そのような適合及び改変は、本明細書に示される教示及び助言に基づき、開示される態様の均等物の意味及び範囲

50

内に包含されるものとする。本明細書における語句または用語は、説明を目的としたものであって、限定を目的とするものではなく、本明細書における語句または用語は本明細書の教示及び助言を考慮することで当業者によって理解されるはずである。

【0347】

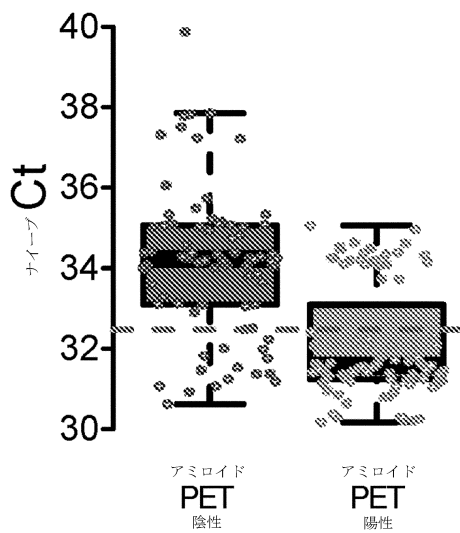
本開示の幅及び範囲は、上記に記載した例示的な態様のいずれによっても限定されるべきでなく、下記の請求項及びそれらの均等物のみにしたがって定義されるべきものである。

【0348】

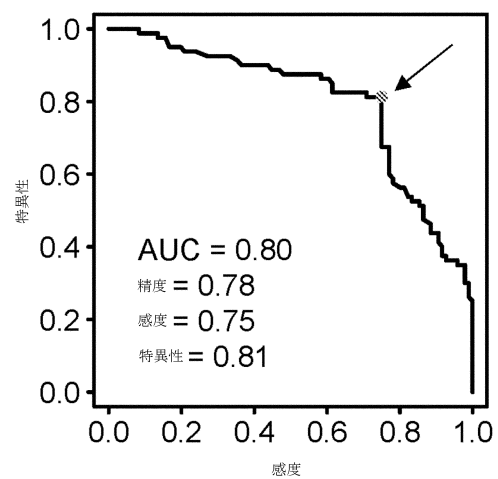
本出願全体を通じて引用され得る全ての引用参考文献（参考文献、特許、特許出願、及びウェブサイトを含む）の内容の全体を、あらゆる目的で、参照によって本明細書に明示的に援用し、また、それらに引用される文献も同様に援用する。

【図面】

【図1A】



【図1B】



10

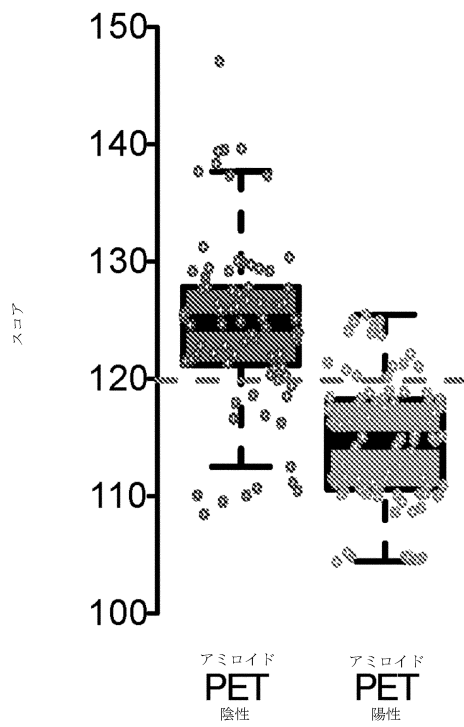
20

30

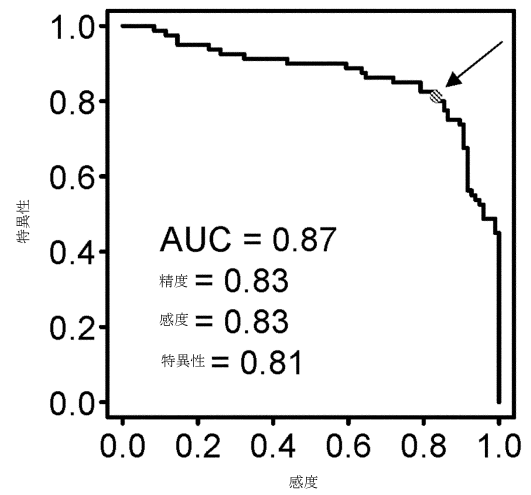
40

50

【図 2 A】



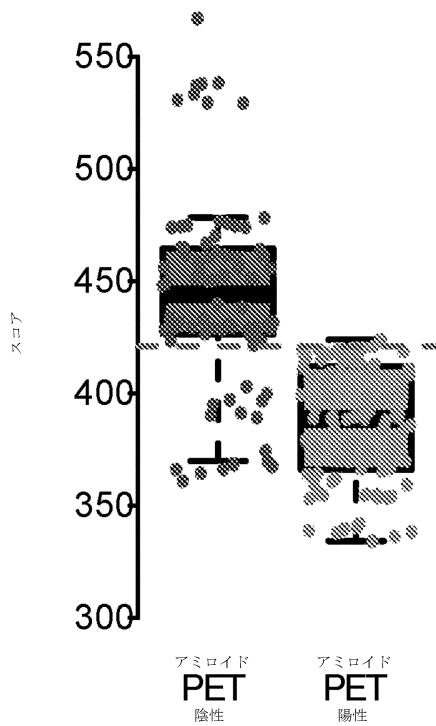
【図 2 B】



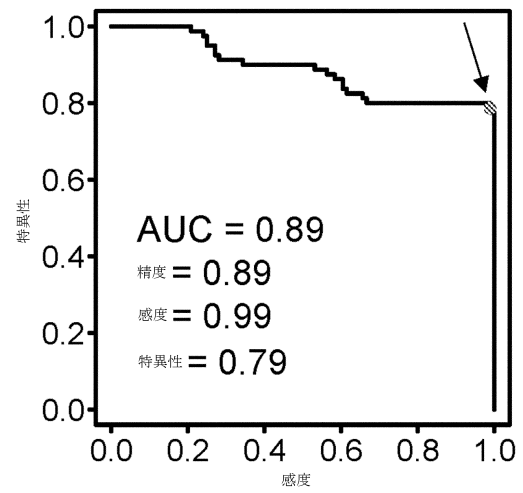
10

20

【図 3 A】



【図 3 B】

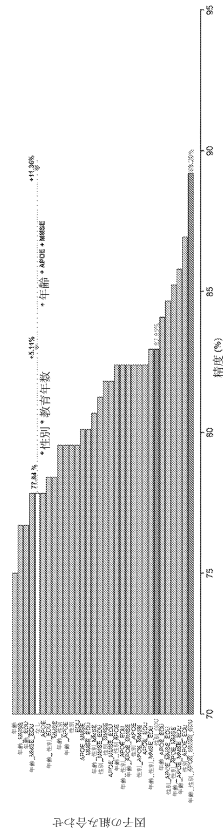


30

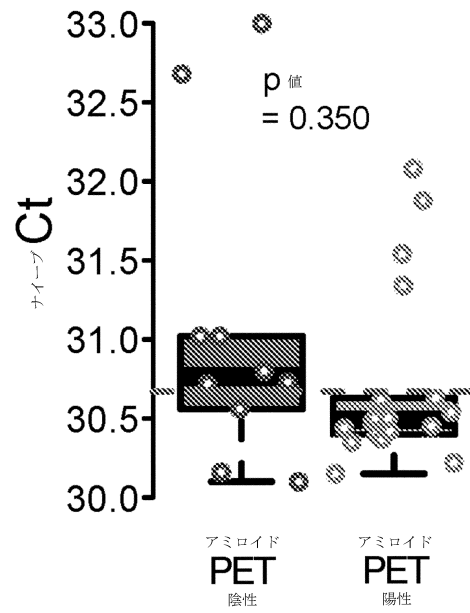
40

50

【図 4】



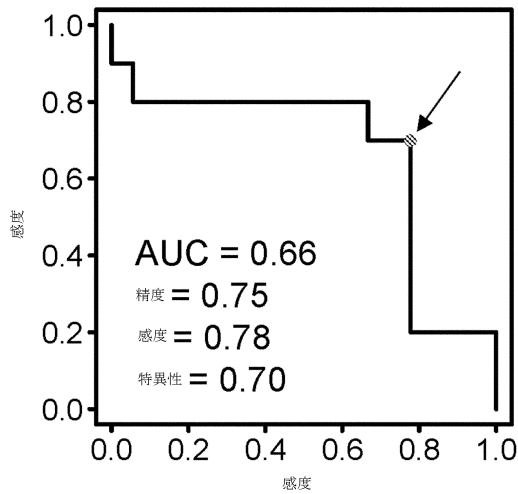
【図 5 A】



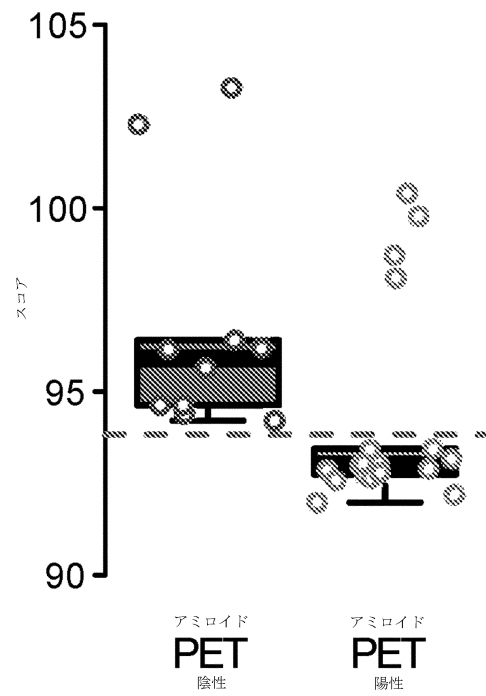
10

20

【図 5 B】



【図 6 A】

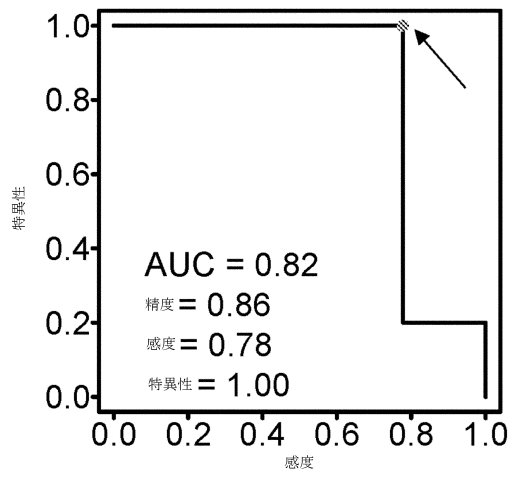


30

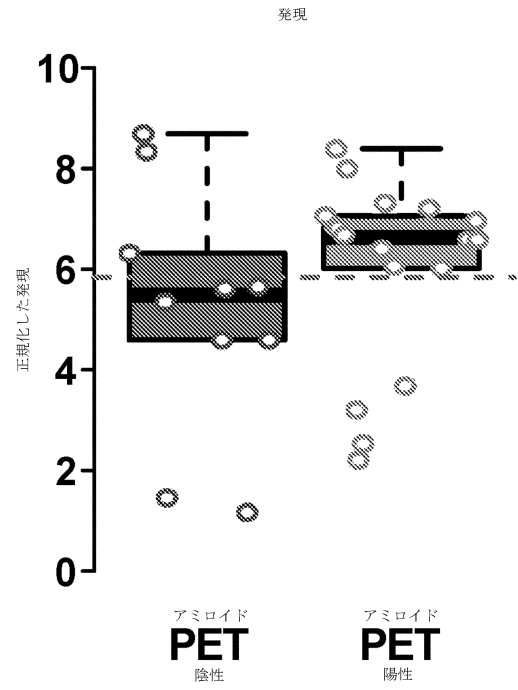
40

50

【図 6 B】



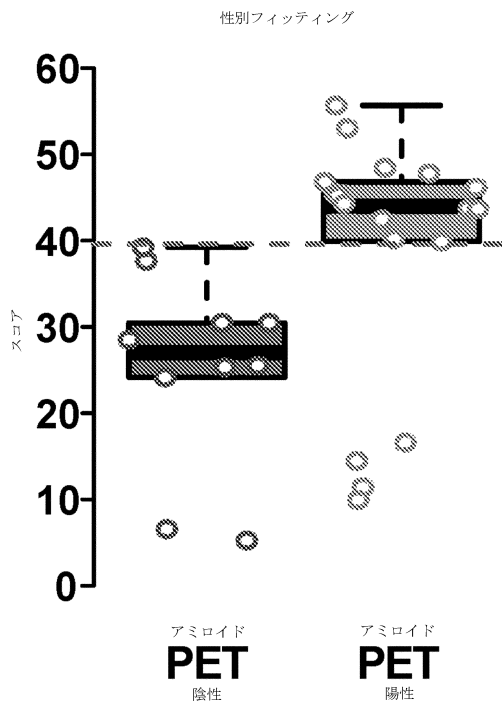
【図 6 C】



10

20

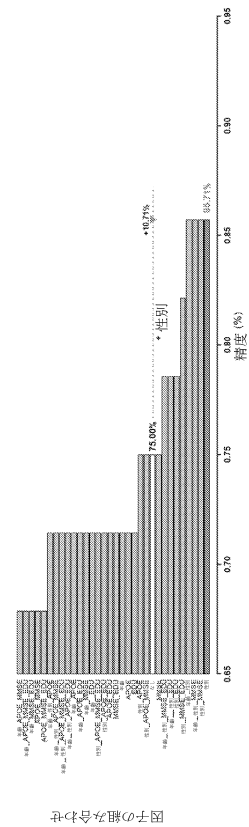
【図 6 D】



30

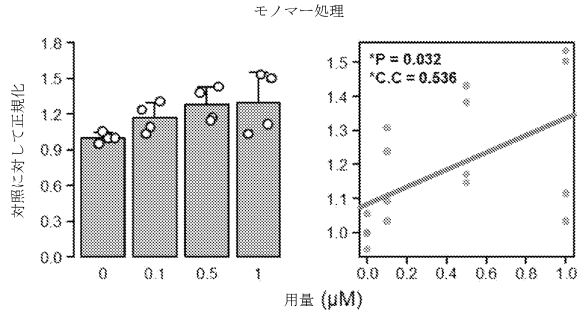
40

【図 7】

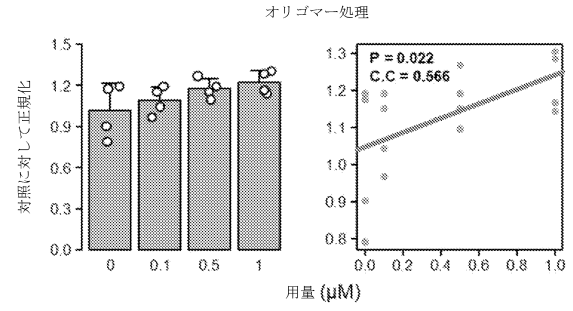


50

【図 8 A】

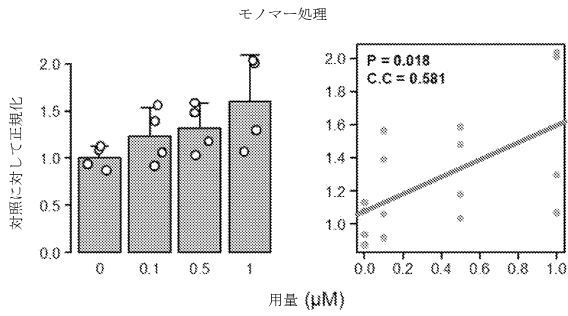


【図 8 B】

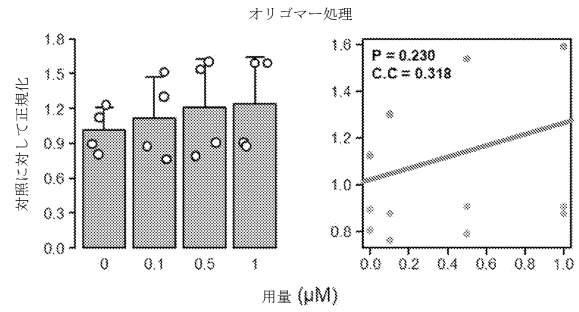


10

【図 8 C】

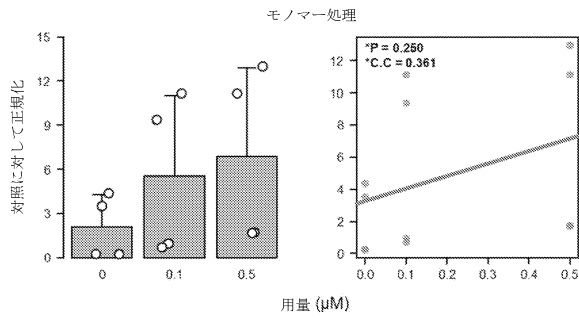


【図 8 D】

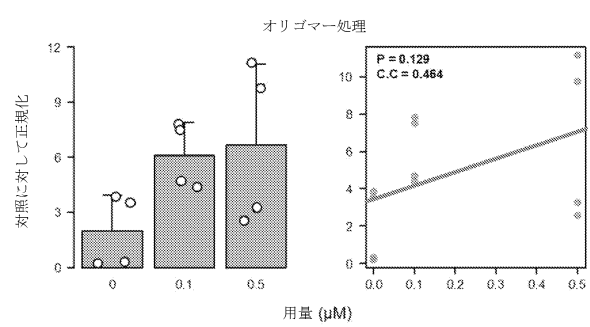


20

【図 9 A】



【図 9 B】

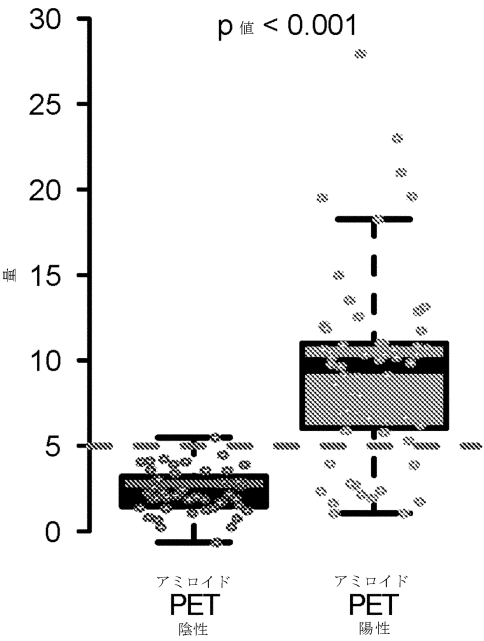


30

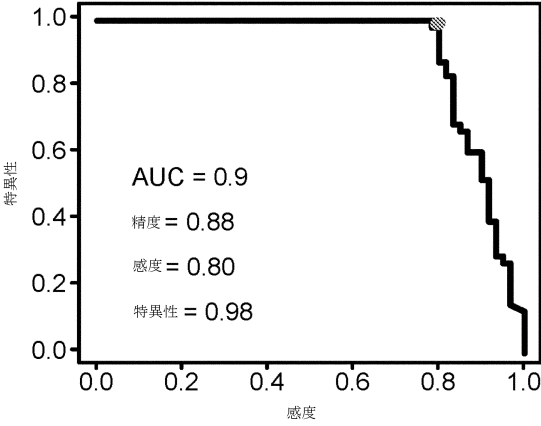
40

50

【図 1 0 A】



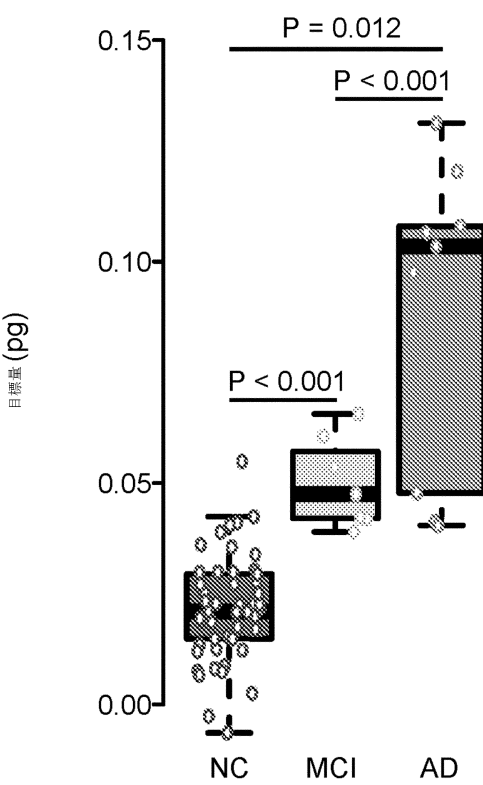
【図 1 0 B】



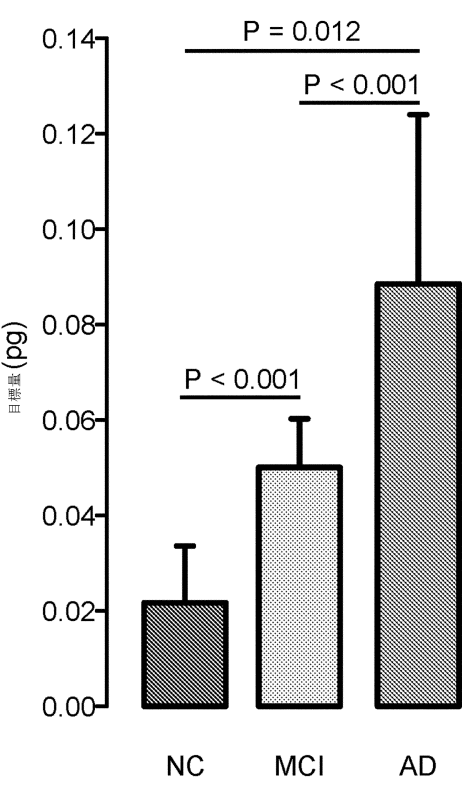
10

20

【図 1 1 A】



【図 1 1 B】

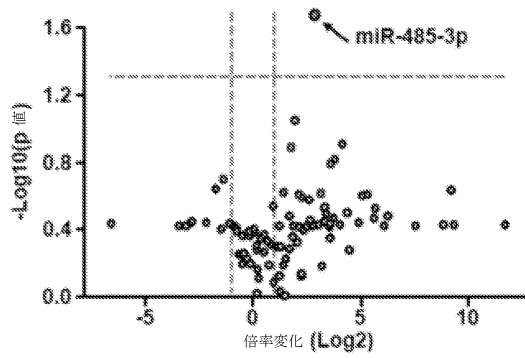


30

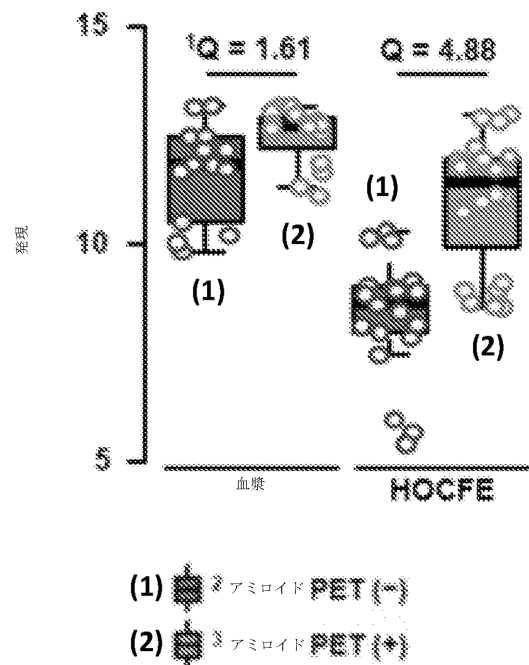
40

50

【図 1 2 A】



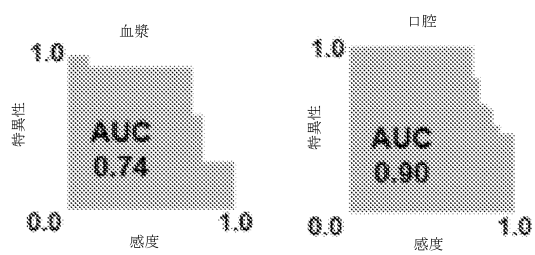
【図 1 2 B】



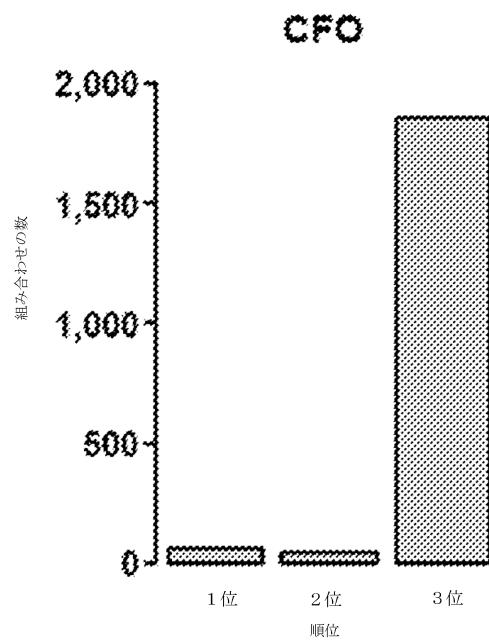
10

20

【図 1 2 C】



【図 1 3 A】

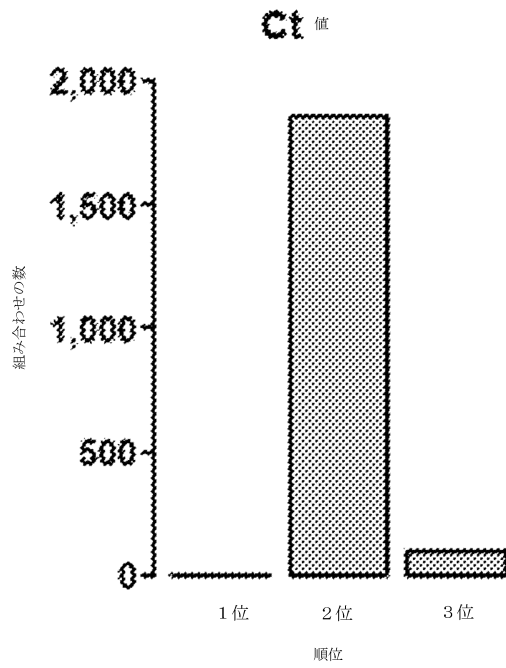


30

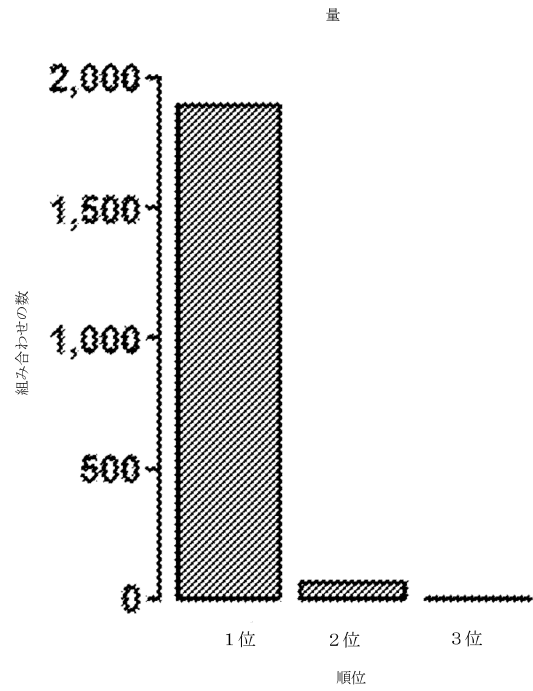
40

50

【図 1 3 B】



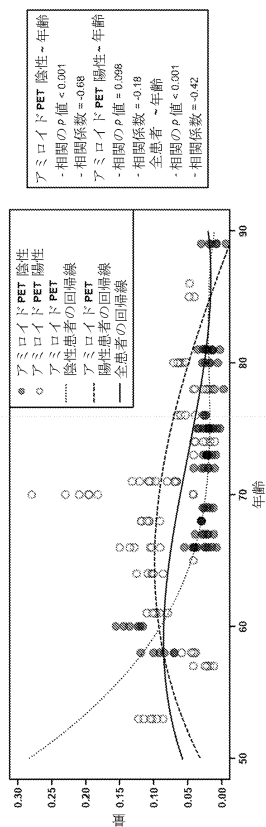
【図 1 3 C】



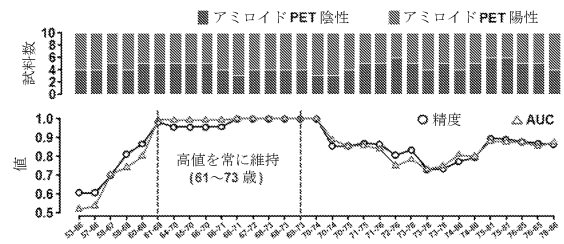
10

20

【図 1 4 A】



【図 1 4 B】

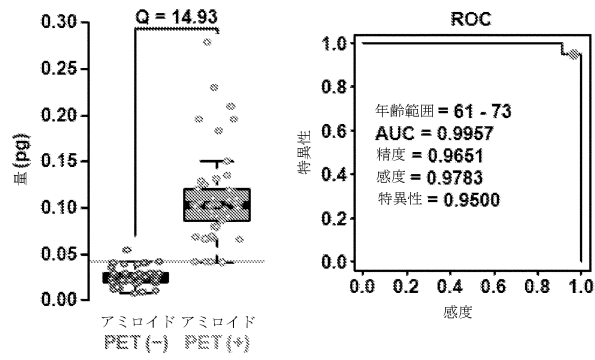


30

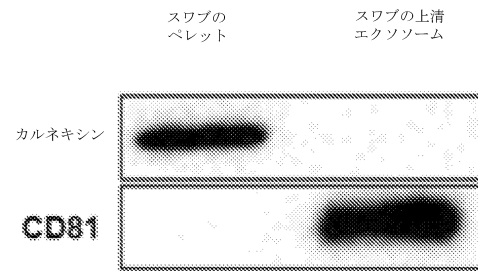
40

50

【図 14 C】

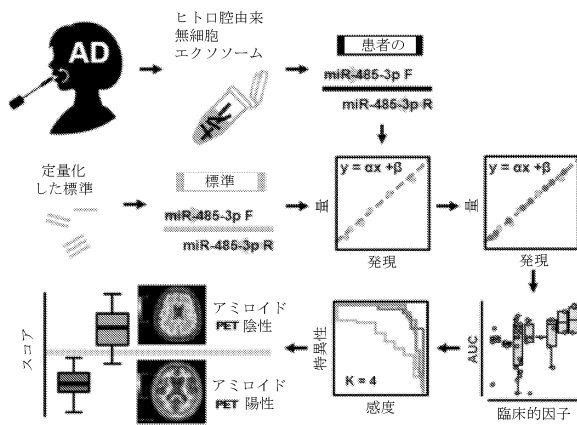


【図 15 A】

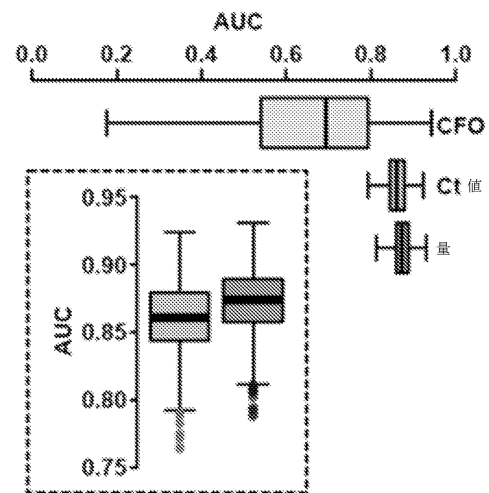


10

【図 15 B】



【図 16 A】



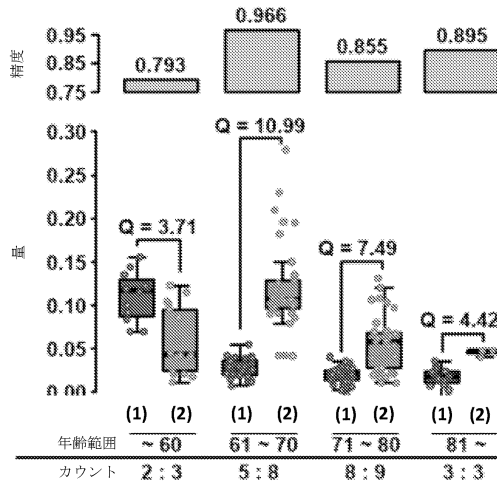
20

30

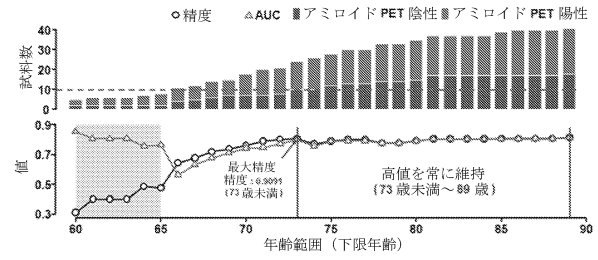
40

50

【図 16 B】

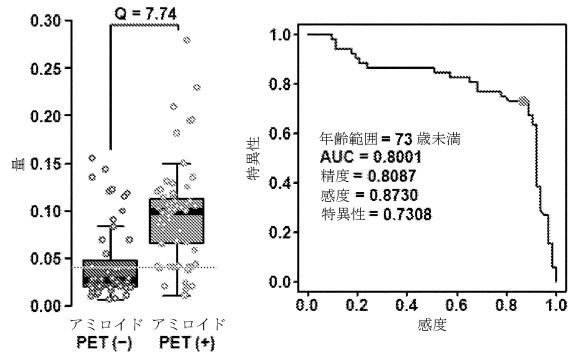


【図 17 A】

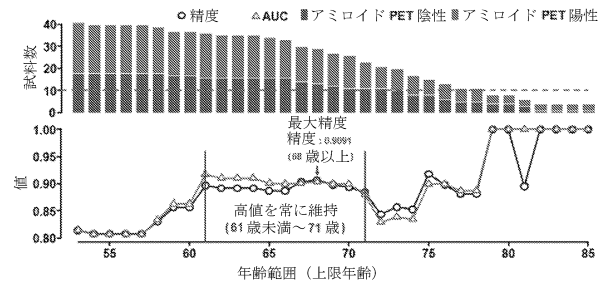


10

【図 17 B】



【図 17 C】



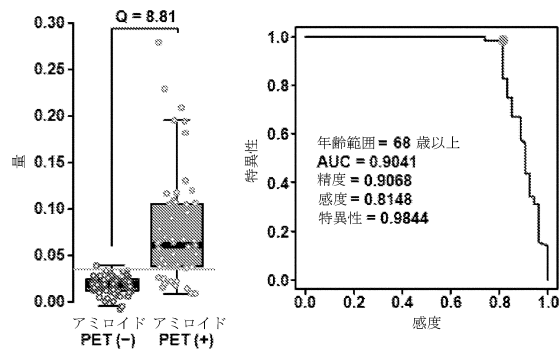
20

30

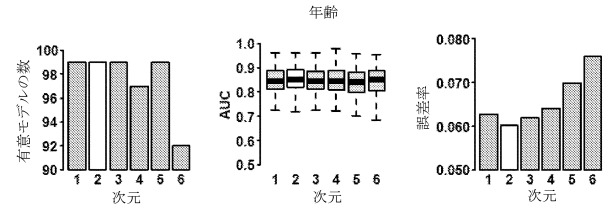
40

50

【図 17 D】

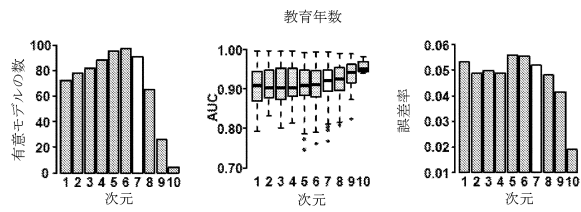


【図 18 A】

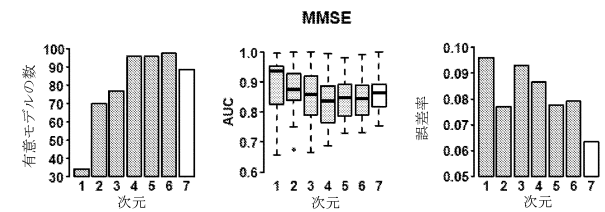


10

【図 18 B】

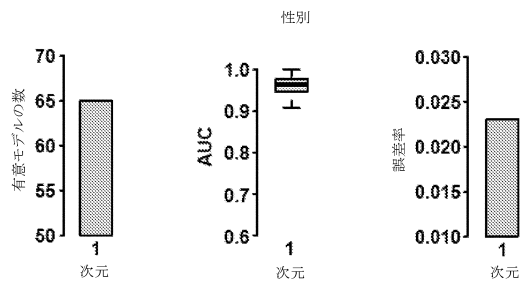


【図 18 C】

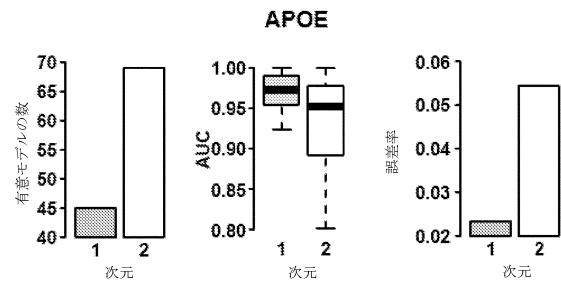


20

【図 18 D】



【図 18 E】

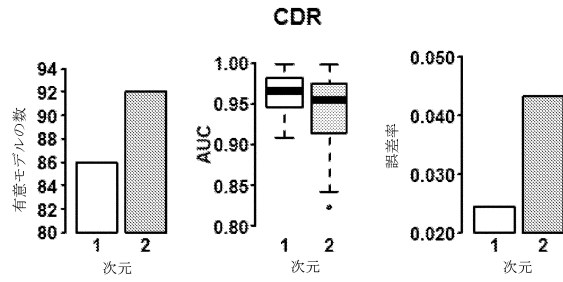


30

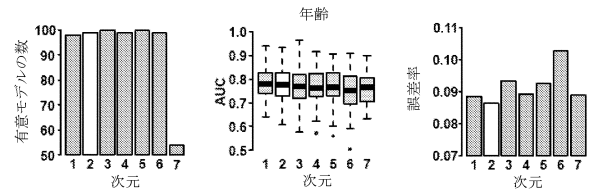
40

50

【図 18 F】

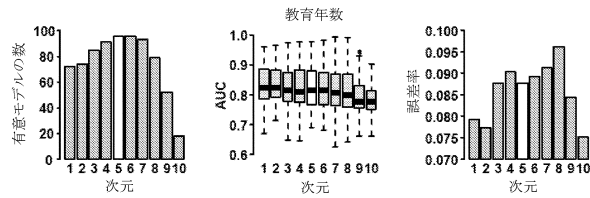


【図 19 A】

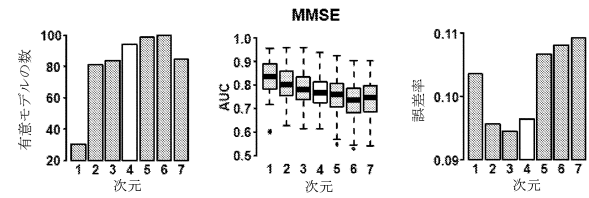


10

【図 19 B】

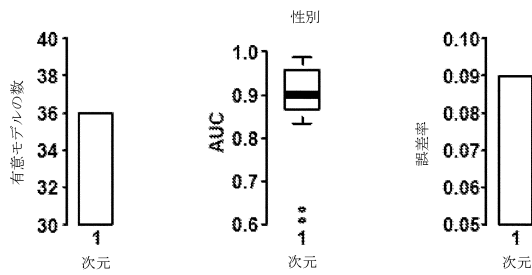


【図 19 C】

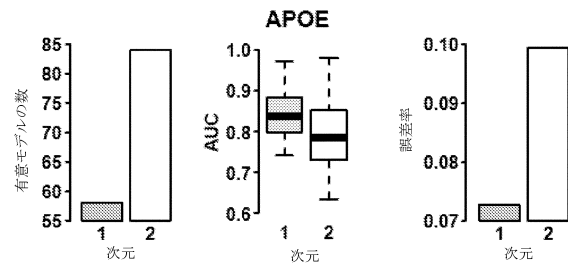


20

【図 19 D】



【図 19 E】

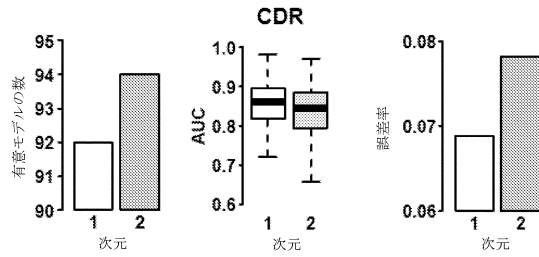


30

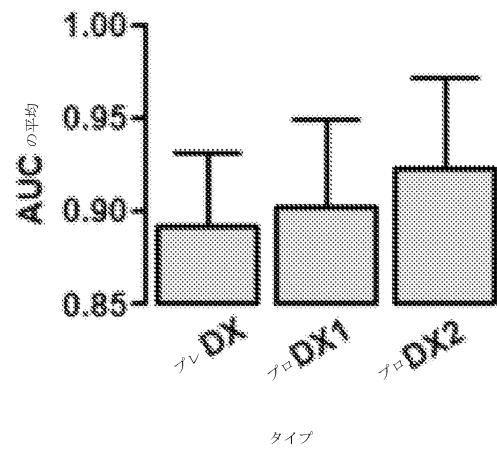
40

50

【図 19 F】

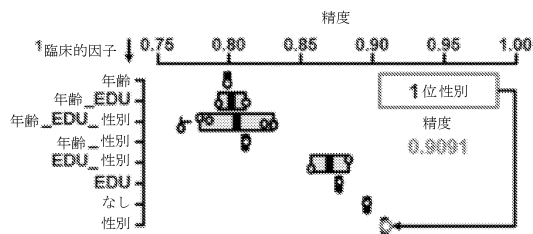


【図 20 A】

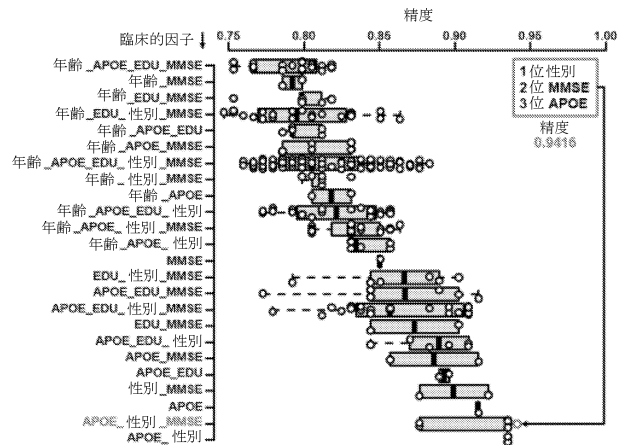


10

【図 20 B】



【図 20 C】



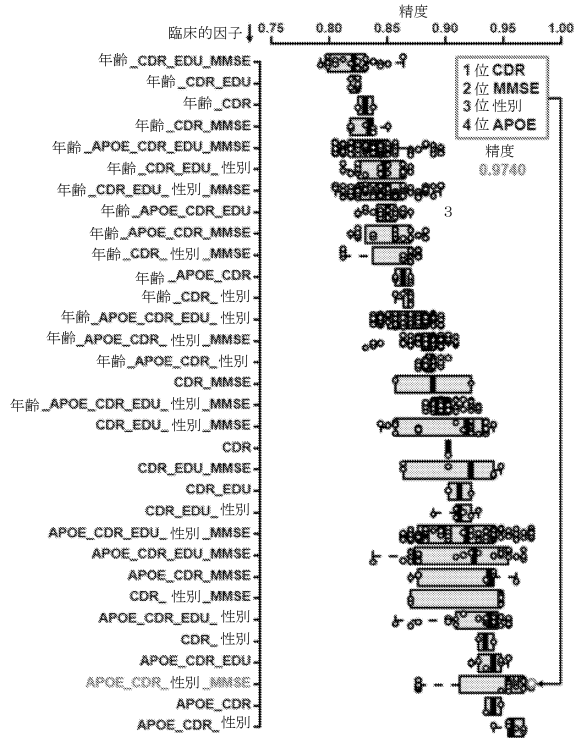
20

30

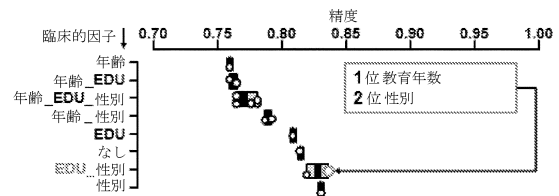
40

50

【図 20 D】



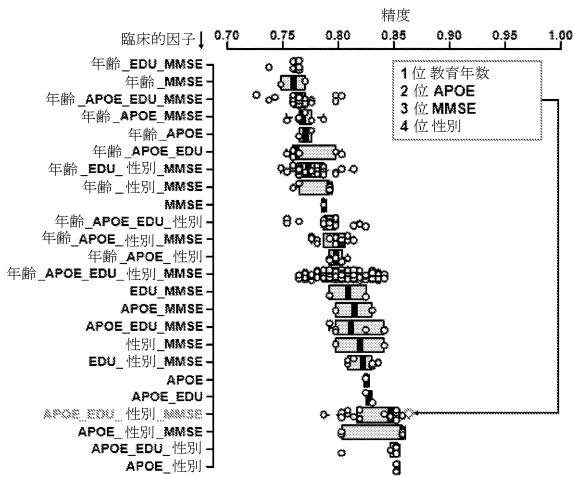
【図 21 A】



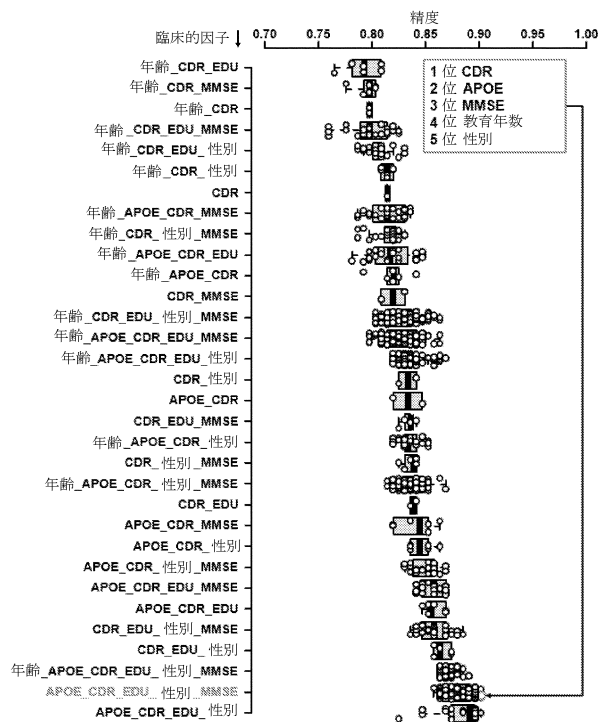
10

20

【図 21 B】



【図 21 C】

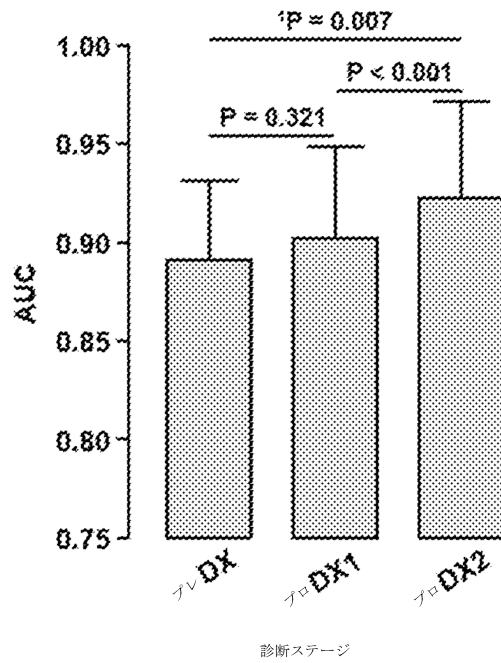


30

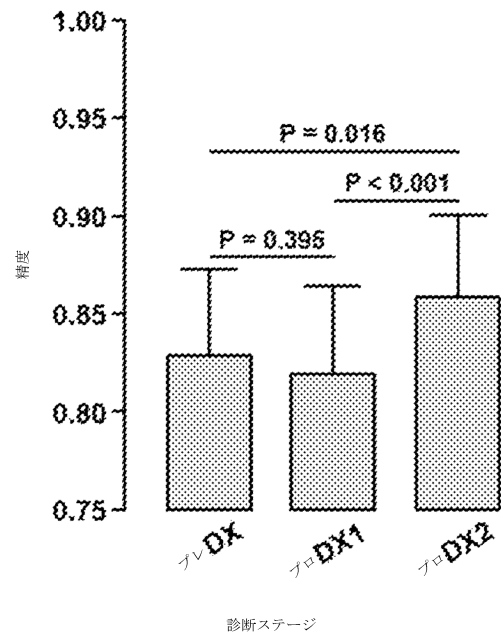
40

50

【図 2 2 A】



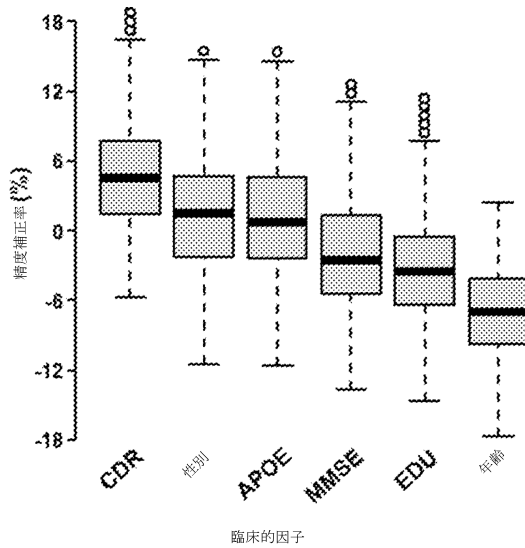
【図 2 2 B】



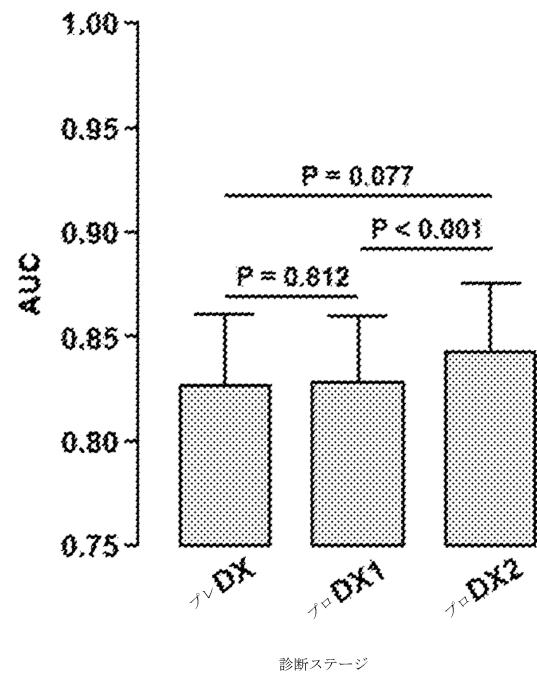
10

20

【図 2 2 C】



【図 2 2 D】

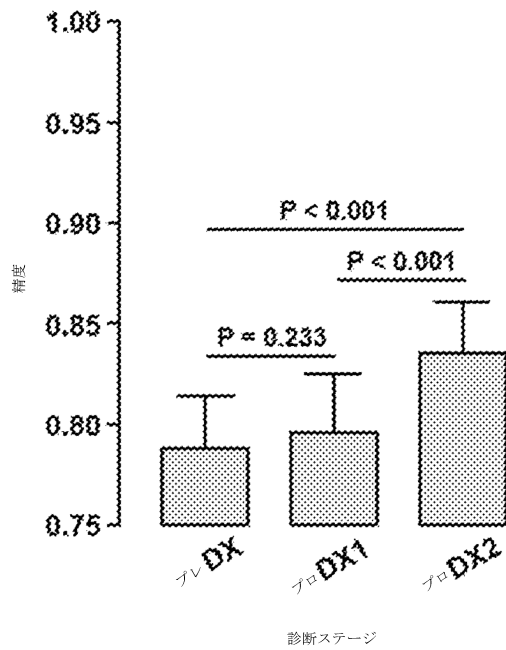


30

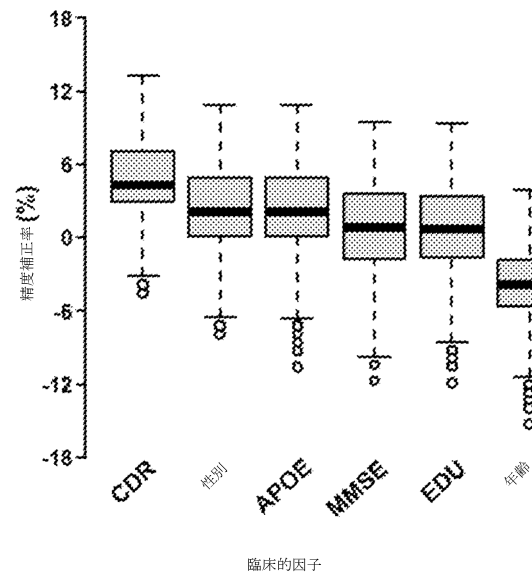
40

50

【図 2 2 E】



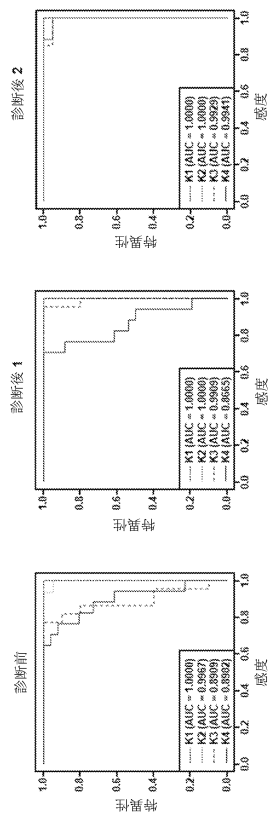
【図 2 2 F】



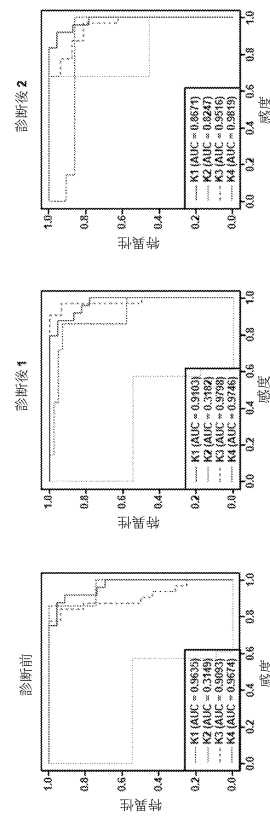
10

20

【図 2 3 A】



【図 2 3 B】

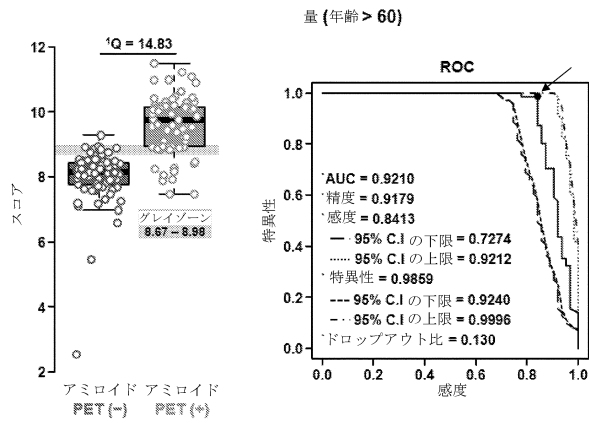


30

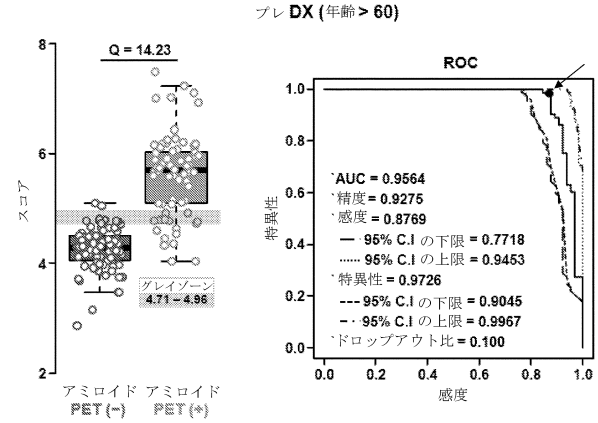
40

50

【図 2 4 A】

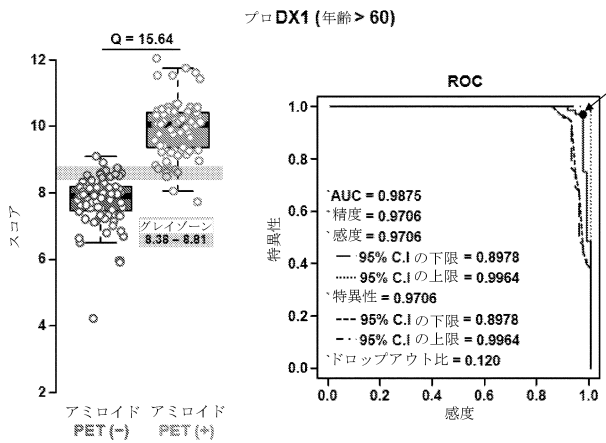


【図 2 4 B】

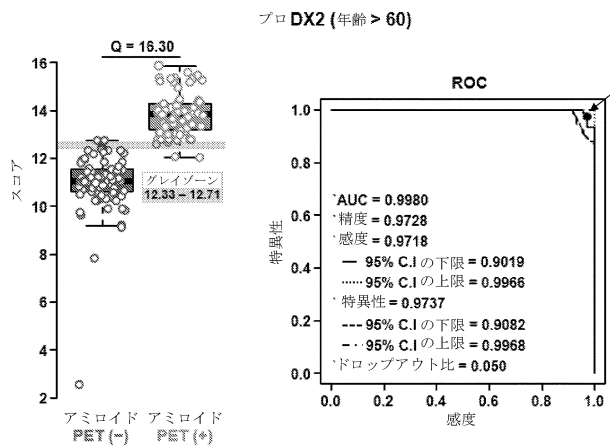


10

【図 2 4 C】



【図 2 4 D】



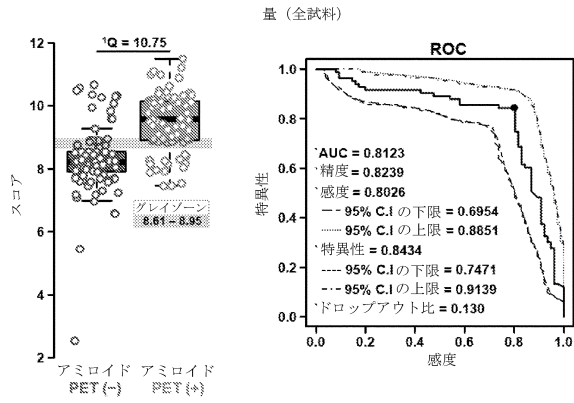
20

30

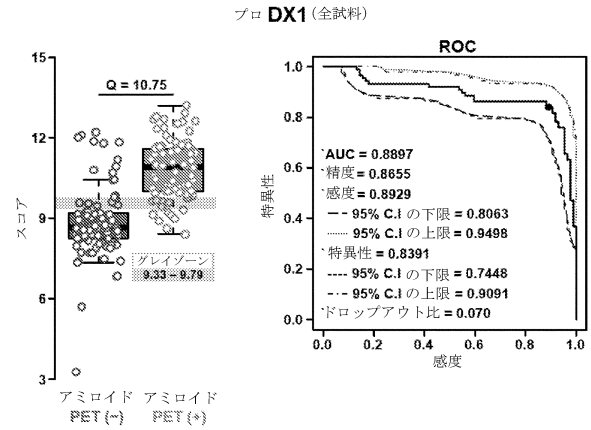
40

50

【図 25 A】

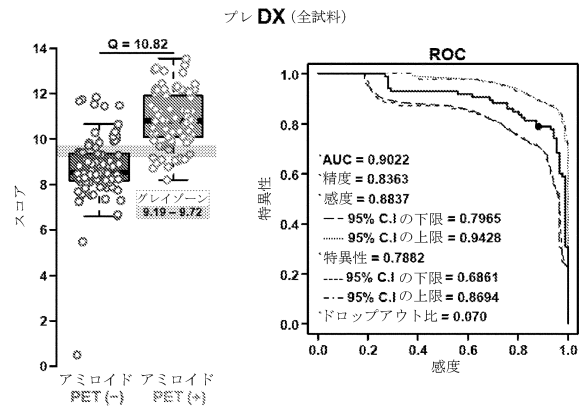


【図 25 B】

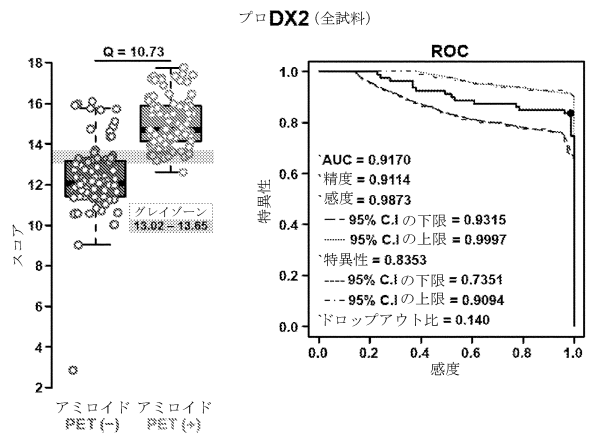


10

【図 25 C】



【図 25 D】



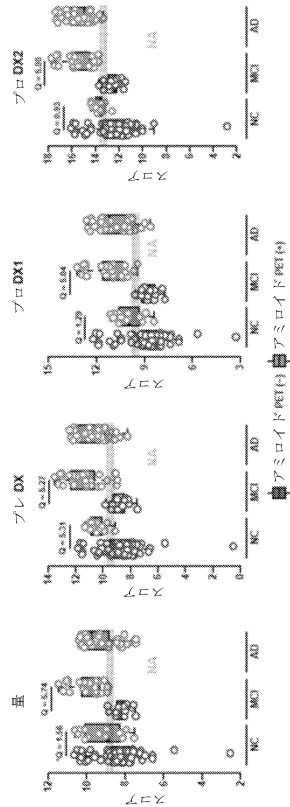
20

30

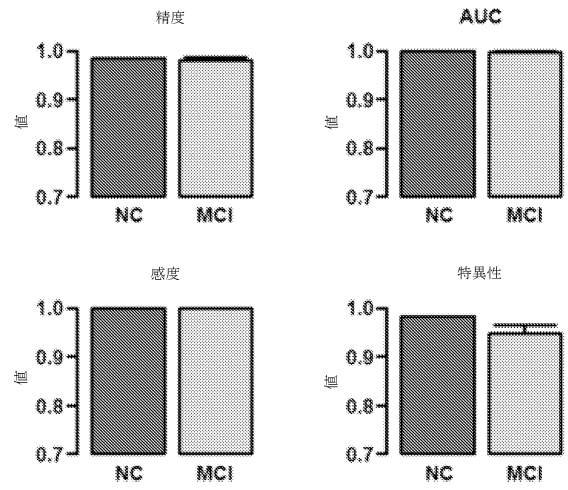
40

50

【図 2 6 A】



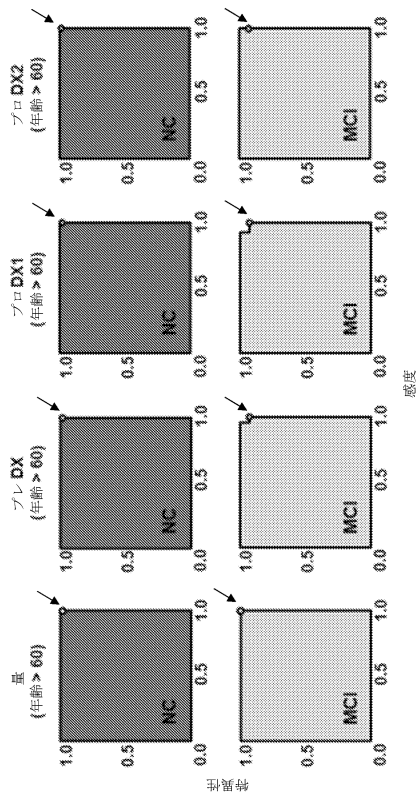
【図 2 6 B】



10

20

【図 2 6 C】



30

40

50

【配列表】

2023522402000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2021/053353
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6883(2018.01); A61K 31/7105(2006.01); A61K 47/69(2017.01); A61P 25/28(2006.01); 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) C12Q 1/6883(2018.01); C12N 15/113(2010.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/68(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & keywords: cognitive disorder, Alzheimer, miR-485-3p, expression level		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018-139759 A1 (BIORCHESTRA LTD.) 02 August 2018 (2018-08-02) paragraphs [50], [54]-[55], [79]-[85]; claims 1-13	1-8,32-34,104-108
X	WANG, W.-X. et al., 'Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex: white matter versus gray matter', Acta Neuropathologica, 2011, vol. 121, pp. 193-205 abstract; tables 2, 5; pages 194, 204	1-8
A	US 2016-0273043 A1 (DIAMIR, LLC) 22 September 2016 (2016-09-22) claims 1-9, 14, 37, 67	1-8,32-34,104-108
A	US 2014-0120545 A1 (UMANSKY, S. R. et al.) 01 May 2014 (2014-05-01) abstract; claims 2, 4, 20, 26, 54	1-8,32-34,104-108
A	US 2017-0002348 A1 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK) 05 January 2017 (2017-01-05) the whole document	1-8,32-34,104-108
☐ 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 27 July 2021		Date of mailing of the international search report 27 July 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Jung, Da Won Telephone No. +82-42-481-5373

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2021/053353

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2021/053353

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.: **12-31,47-103**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 12-31, 47-103 pertain to a method for treatment of the human body by therapy or surgery, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search. 10
2. ☒ Claims Nos.: **10,20,23-24,36-38,42-45,48,53,56,58,60,62-63,65,67-70,74-75,78-79,84-86,88,90,93-95,98,102**
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:
Each of claims 10, 20, 23-24, 36-38, 42-45, 48, 53, 56, 58, 60, 62-63, 65, 67-70, 74-75, 78-79, 84-86, 88, 90, 93-95, 98, 102 refers to a claim which is not drafted in accordance with Rule 6.4(a). 30
3. ☒ Claims Nos.: **9,11,19,21,22,25-31,35,39-41,46,47,49-52,54,55,57,59,61,64,66,71-73,76,77,80-83,87,89,91,92,96,97,99-101, 103**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/IB2021/053353

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2018-139759	A1	02 August 2018	KR	10-2019-0051510	A	15 May 2019
				KR	10-2020-0043322	A	27 April 2020
				KR	10-2074407	B1	06 February 2020
				KR	10-2105016	B1	28 April 2020
				WO	2018-139819	A1	02 August 2018
US	2016-0273043	A1	22 September 2016	AU	2014-348273	A1	09 June 2016
				CA	2931082	A1	21 May 2015
				CN	105917005	A	31 August 2016
				CN	105917005	B	11 September 2020
				EP	3071712	A1	28 September 2016
				EP	3071712	B1	24 June 2020
				ES	2813699	T3	24 March 2021
				JP	2016-538851	A	15 December 2016
WO	2015-073972	A1	21 May 2015				
US	2014-0120545	A1	01 May 2014	AU	2012-245580	A1	31 October 2013
				AU	2012-245580	B2	20 July 2017
				AU	2012-245628	A1	31 October 2013
				CA	2833375	A1	26 October 2012
				CA	2833389	A1	26 October 2012
				CN	103620019	A	05 March 2014
				CN	103620019	B	06 June 2017
				CN	103620057	A	05 March 2014
				CN	105861712	A	17 August 2016
				EP	2699666	A1	26 February 2014
				EP	2699666	B1	05 October 2016
				EP	2699697	A1	26 February 2014
				EP	2699697	B1	17 January 2018
				EP	3133147	A1	22 February 2017
				EP	3133147	B1	27 March 2019
				EP	3327145	A1	30 May 2018
				ES	2630602	T3	22 August 2017
				JP	2014-511709	A	19 May 2014
				JP	2014-513528	A	05 June 2014
				JP	2018-027089	A	22 February 2018
				JP	6021893	B2	09 November 2016
				JP	6211511	B2	11 October 2017
				RU	2013146856	A	27 May 2015
				US	10246747	B2	02 April 2019
				US	10472681	B2	12 November 2019
				US	2014-0256562	A1	11 September 2014
				US	2017-0107575	A1	20 April 2017
				US	2017-0362656	A1	21 December 2017
				US	9556487	B2	31 January 2017
				US	9803242	B2	31 October 2017
				WO	2012-145363	A1	26 October 2012
				WO	2012-145409	A1	26 October 2012
US	2017-0002348	A1	05 January 2017	AU	2014-287063	A1	28 January 2016
				CA	2917569	A1	15 January 2015
				CN	105431153	A	23 March 2016
				EP	3019175	A2	18 May 2016

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2019)

10

20

30

40

50

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)

A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105
A 6 1 K	31/712 (2006.01)	A 6 1 K	31/712
A 6 1 K	31/7125(2006.01)	A 6 1 K	31/7125
A 6 1 K	31/7115(2006.01)	A 6 1 K	31/7115
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761
A 6 1 K	47/60 (2017.01)	A 6 1 K	47/60
A 6 1 K	47/58 (2017.01)	A 6 1 K	47/58
A 6 1 K	47/61 (2017.01)	A 6 1 K	47/61
A 6 1 K	47/59 (2017.01)	A 6 1 K	47/59
A 6 1 K	47/62 (2017.01)	A 6 1 K	47/62
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54
A 6 1 K	47/46 (2006.01)	A 6 1 K	47/46
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	47/42
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11

Z

(32)優先日 令和2年8月11日(2020.8.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 リュ, ジン-ヒョブ

大韓民国 3 4 9 6 4 テジョン, ジュン-グ, ケリョン-口, 9 2 2

(72)発明者 キム, デ フン

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン, ユソング, クアハク-口, 1 2 5, クリップ, ベンチャー-ードン, 2 エフ-2 1 6

(72)発明者 ミン, ジェ ウン

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン, ユソング, クアハク-口, 1 2 5, クリップ, ベンチャー-ードン, 2 エフ-2 1 6

(72)発明者 パク, ビュン ギュ

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン, ユソング, クアハク-口, 1 2 5, クリップ, ベンチャー-ードン, 2 エフ-2 1 6

(72)発明者 ミン, ヒュン ス

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン, ユソング, クアハク-口, 1 2 5, クリップ, ベンチャー-ードン, 2 エフ-2 1 6

(72)発明者 リム, ユ ナ

大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン, ユソング, クアハク-口, 1 2 5, クリップ, ベンチャー-ードン, 2 エフ-2 1 6

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ28 QQ42 QQ52 QR08

QR32 QR35 QR55 QR62 QR72 QR77 QS25 QX01 QX02

4C076 AA16 AA19 AA95 CC01 CC41 EE41 EE57 EE59

F ターム (参考)	4C084	AA13 AA17 MA21 MA24 NA14 ZA151 ZA161 ZC412
	4C086	AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA21 MA24 NA14 ZA15 ZA16
	4C087	AA01 AA02 AA03 BC83 CA12 MA21 MA24 NA14 ZA15 ZA16