

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-516639
(P2025-516639A)

(43)公表日 令和7年5月30日(2025.5.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	4 C 0 8 4	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	4 C 0 8 5	
A 6 1 P	27/06 (2006.01)	A 6 1 P	27/06	4 C 0 8 7	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	4 H 0 4 5	
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全67頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-566533(P2024-566533)	(71)出願人	521254203
(86)(22)出願日	令和5年5月13日(2023.5.13)		ジェネロス カンパニー, リミテッド
(85)翻訳文提出日	令和7年1月9日(2025.1.9)		大韓民国 0 4 1 6 8 ソウル, マポー
(86)国際出願番号	PCT/IB2023/054956		グ, セチャンーロ 1 1, 1 4 エフ
(87)国際公開番号	WO2023/218430	(74)代理人	100078282
(87)国際公開日	令和5年11月16日(2023.11.16)		弁理士 山本 秀策
(31)優先権主張番号	63/341,798	(74)代理人	100113413
(32)優先日	令和4年5月13日(2022.5.13)		弁理士 森下 夏樹
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,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	(74)代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74)代理人	230113332
			弁護士 山本 健策
		(72)発明者	チェ, ジン ウ

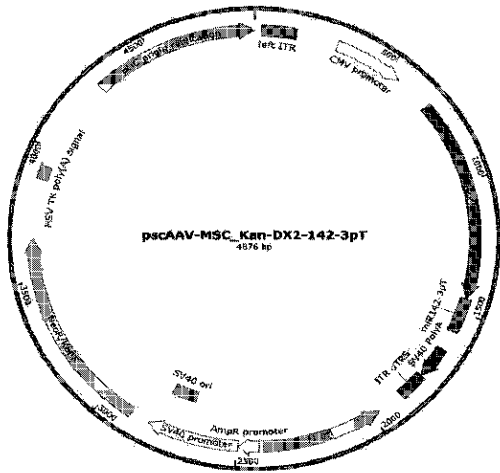
最終頁に続く

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 A I M P 2 − D X 2 および必要に応じてm i R − 1 4 2 に対する標的配列を使用して網膜変性疾患を処置する方法ならびにその組成物

(57)【要約】
本明細書に開示されるのは、網膜変性疾患を処置する方法であって、A I M P 2 − D X 2 および必要に応じてm i R − 1 4 2 に対する標的配列を含むベクターを、網膜変性疾患を処置することを必要とする対象に投与することを含む、方法である。本発明は、例えば、網膜変性疾患を処置することを必要とする対象における網膜変性疾患を処置する方法であって、エクソン2欠失A I M P 2 バリエント (A I M P 2 − D X 2) 遺伝子を含む薬学的に有効な量の組換えベクターを前記対象に投与することを含む、方法を提供する。

FIG. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

網膜変性疾患を処置することを必要とする対象における網膜変性疾患を処置する方法であって、エクソン 2 欠失 A I M P 2 バリエーション (A I M P 2 - D X 2) 遺伝子を含む薬学的に有効な量の組換えベクターを前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 2】

前記網膜変性疾患が、網膜色素変性症、レーバー先天性黒内障、錐体-桿体ジストロフィー、緑内障、または糖尿病性網膜症である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記網膜変性疾患が、パーキンソン病、アルツハイマー病、または筋萎縮性側索硬化症に先行するか、またはそれらを伴う、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記網膜変性疾患が、加齢黄斑疾患ではない、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記ベクターが、m i R - 1 4 2 標的配列をさらに含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記ベクターが、前記 A I M P 2 - D X 2 に作動可能に連結したプロモーターをさらに含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記プロモーターが、レトロウイルス (L T R) プロモーター、サイトメガロウイルス (C M V) プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (R S V) プロモーター、M T プロモーター、E F - 1 アルファプロモーター、U B 6 プロモーター、ニフトリベーター-アクチンプロモーター、C A G プロモーター、R P E 6 5 プロモーター、シナプシンプロモーター、M e C P 2 プロモーター、C a M K I I プロモーター、H b 9 プロモーター、またはオプシンプロモーターである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 m i R - 1 4 2 標的配列が、前記 A I M P 2 - D X 2 遺伝子の 3' にある、請求項 5 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記 A I M P 2 - D X 2 遺伝子が、配列番号 2、13、14、15、16、17、18、19、または 20 と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記 A I M P 2 - D X 2 遺伝子が、配列番号 2、13、14、15、16、17、18、19、または 20 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 A I M P 2 - D X 2 遺伝子が、配列番号 10 または 11 と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むエクソンを有しない、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記 A I M P 2 - D X 2 遺伝子が、配列番号 10 または 11 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むエクソンを有しない、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 m i R - 1 4 2 標的配列が、A C A C T A を含む、請求項 5 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

50

前記m i R－1 4 2 標的配列が、A C A C T A および配列番号5 の1 ～1 7 個の追加の連続するヌクレオチドを含む、請求項5 から1 2 に記載の方法。

【請求項1 5】

前記m i R－1 4 2 標的配列が、配列番号5 のヌクレオチド配列（T C C A T A A A G T A G G A A A C A C T A C A）と少なくとも5 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含む、請求項5 から1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項1 6】

前記m i R－1 4 2 標的配列が、配列番号5 のヌクレオチド配列を含む、請求項1 5 に記載の方法。

【請求項1 7】

前記m i R－1 4 2 標的配列が、A C T T T A を含む、請求項5 から1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項1 8】

前記m i R－1 4 2 標的配列が、A C T T T A および配列番号7 の1 ～1 5 個の追加の連続するヌクレオチドを含む、請求項5 から1 2 に記載の方法。

【請求項1 9】

前記m i R－1 4 2 標的配列が、配列番号7 のヌクレオチド配列（A G T A G T G C T T T C T A C T T T A T G）と少なくとも5 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含む、請求項5 から1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項2 0】

前記m i R－1 4 2 標的配列が、配列番号7 のヌクレオチド配列を含む、請求項1 9 に記載の方法。

【請求項2 1】

前記m i R－1 4 2 標的配列が、2 ～1 0 回反復している、請求項5 から2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項2 2】

前記ベクターが、ウイルスベクターである、請求項1 から2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項2 3】

前記ウイルスベクターが、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）、マウス白血病ウイルス（M L V）、トリ肉腫／白血病（A S L V）、脾臓壊死ウイルス（S N V）、ラウス肉腫ウイルス（R S V）、マウス乳腺腫瘍ウイルス（M M T V）、ワクシニアウイルス、または単純ヘルペスウイルスベクターである、請求項2 2 に記載の方法。

【請求項2 4】

前記組換えベクターが、前記対象に局所的に、硝子体内注射によって、結膜下注射によって、または前記対象の網膜下腔内に投与される、請求項1 から2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項2 5】

前記対象に追加の治療剤を投与することをさらに含む、請求項1 から2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項2 6】

前記追加の治療剤が、ラニビズマブ、アフリベルセプト、またはベバシズマブである、請求項2 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

電子的に提出した配列表の参照

本出願とともに提出した、S T 2 6 ファイル（名称：2 4 9 3－0 0 0 6 W O 0 1 . x m l _ S e q u e n c e L i s t i n g _ S T 2 5 . t x t；サイズ：3 6 K B；およ

10

20

30

40

50

び作成日：2023年5月8日）の電子的に提出した配列表の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

発明の分野

本明細書に開示されるのは、網膜変性疾患を処置する方法であって、AIMP2-DX2および必要に応じてmiR-142に対する標的配列を含むベクターを、網膜変性疾患を処置することを必要とする対象に投与することを含む、方法である。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

網膜変性疾患は、加齢黄斑疾患（AMD）および網膜色素変性症（RP）における網膜色素上皮（RPE）および／または光受容体細胞喪失、ならびに緑内障における網膜神経節細胞（RGC）死などの、1つまたは2つの網膜細胞型の変性を特徴とする。典型的には、網膜細胞の変性によって引き起こされる視覚障害は、網膜細胞が自己修復能力を欠いているため、不可逆的である。

【0004】

異常なRPE細胞は、AMD患者において光干渉断層撮影（OCT）により観察され得る。網膜色素変性症（RP）患者では、RPEおよび光受容体層の形態学的および機能的異常が遺伝的異常によって引き起こされる。黄斑領域におけるRPEおよび光受容体の喪失を特徴とする、スターガルト病または若年性黄斑変性症は、若年齢で中心視力の低下を引き起こす。網膜神経節細胞（RGC）の喪失は、緑内障を有する患者において観察され得る。網膜細胞変性が引き起こされると、それを反転させることができる処置はない。

【0005】

網膜では、光シグナルが電気シグナルに変換される。光受容体細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、および網膜神経節細胞（RGC）などの様々な相互接続した細胞型が、網膜におけるこの重要なプロセスを達成するために必要とされる。各細胞型は、視覚シグナル伝達プロセスにおいて不可欠な役割を果たす。視覚シグナル伝達は、主に外節において光感受性タンパク質を発現する光受容体細胞から始まる。Jin ZB et al. (2019)。

【0006】

ヒトの網膜では、2種類の光受容体細胞である、桿体および錐体が、それぞれ暗所視および明所視（色を含む）を担っている。桿体は主に周辺網膜に存在し、錐体は網膜のごく一部である黄斑に集中しており、これは高解像度の中心視をもたらす。双極細胞は光受容体細胞から視覚シグナルを受け取り、水平細胞およびアマクリン細胞によって調整されたRGCにこれらのシグナルを伝達する。最終的に、全てのシグナルは視神経に集められ、脳に伝達される。細胞変性およびシナプス崩壊の両方が、永続的な視力障害またはさらに失明を引き起こし得る。Jin 2019を参照のこと。

【0007】

加齢黄斑疾患（AMD）は、欧州、米国、および豪州における視力喪失の最も主要な原因である。80歳を超える人口のほぼ3分の2が、ドルーゼンおよびCNV（中心窩下脈絡膜血管新生）の存在を特徴とする湿性型または滲出型に起因するAMDの徴候を有する。AMDは中心網膜ゾーンの損傷を特徴とする慢性進行性疾患である。脈絡膜毛細血管、網膜色素上皮（RPE）、およびブルッフ膜の変化（加齢に典型的である）が、AMD病理発生の根底にあるが、病理過程において典型的な加齢に伴う変化の移行が始まるメカニズムは不明である。光受容体の死および不可逆的な視力喪失は、RPEおよび脈絡膜の病理学的変化の結果である。最近の研究により、網膜細胞の細胞死にはアポトーシスだけでなく、オートファジーおよび壊死のシグナル伝達カスケードも関与していることが実証された（Telegina 2017）。

【0008】

疾患の「乾性」および「湿性」型が分類されている。症例の約90%がAMDの「乾性

10

20

30

40

50

」萎縮型であり；今日、その処置方法は存在しない。AMDの「乾性」型では、ドルーゼンが黄斑部で診断され、色素の再分布が起こり、色素上皮および脈絡毛細管板の欠損が現れ、RPE細胞の萎縮を背景にして光受容体の死が起こる。「湿性」（滲出）型はAMD患者の約10%で発症し、網膜色素上皮下または神経上皮下のブルッフ膜欠損による新たに生成した血管の内方成長を特徴とする。新たに生成した血管の透過性が増加すると、硝子体および網膜において網膜浮腫、滲出、および出血が生じる（これは最終的に視力喪失の原因となる）。

【0009】

現在、レーザー誘発ブルッフ膜光凝固モデルは、最も広く受け入れられ、最も頻繁に使用されている実験マウスCNVモデルである。ここで説明するモデルは、ブルッフ膜のレーザー衝撃破裂からなり、これは、脈絡膜から網膜下腔への新生血管の成長をもたらし、ヒトAMDの滲出型の主な特徴を模倣し、多数のトランスジェニックマウスの使用によりCNVの分子メカニズムを探索する機会を提供する。このモデルは、全身または局所（眼内）投与による新規薬物の有効性を試験するのに適していることが証明されており、例えば、血管内皮成長因子受容体（VEGFR）トラップまたは酢酸アネコルタブでは、AMDを有する患者における薬物効果の予測値を示している（Telegina 2017）。

【0010】

網膜における血管内皮成長因子（VEGF）を遮断することによって間接的な抗血管新生をもたらす3つの主な薬物が存在する。ラニビズマブ（Lucentis、Genentech Inc.、South San Francisco CA；Novartisにより全世界で商品化されている）は、新生血管AMDの処置のために2006年に米国食品医薬品局（FDA）により承認された（Hernandez-Zimbron 2018）。これは、VEGF-Aを標的とし、高い親和性でそれに結合する、組換えヒト化免疫グロブリン（Ig）G1カップアイソタイプモノクローナル抗原結合性断片（Fab）である。アフリベルセプト（Regeneron、Tarrytown、NY；Bayer AGにより全世界で商品化されている）は2011年にFDAにより承認された。これは、ヒトVEGF受容体1および2の2つの主要な結合ドメインと、ヒトIgG1の結晶化可能な断片（Fc）領域とを組み合わせた融合タンパク質である。最後に、ベバシズマブ（Genentech Inc.、South San Francisco, CA；Rocheにより全世界で商品化されている）は、全てのVEGFアイソフォームに結合し、それを遮断する完全長ヒト化抗体である。

【0011】

酸化ストレスはアポトーシスを誘発し得、マクロファージを活性化および動員し、炎症を誘導し得る。アポトーシスは、CNVモデルにおける脈絡膜炎症およびその結果としての血管新生の誘因の1つであり得る（Du 2013）。

【0012】

劣性RPの最も一般的な形態はX連鎖RPであり、これは、網膜色素変性症GTPase調節因子（RPGR）遺伝子の変異によって引き起こされる。Talib M et al. (2018)。X連鎖RPは、小児期の桿体および錐体光受容体の変性を特徴とし、若年齢で視野狭窄および重度の失明を引き起こす。動物モデルにおける有望な結果にもかかわらず（Bennett J (2017)；Boye SE et al. (2013)；Sahel JA et al. (2014)；Vandenbergh LH (2015)）、RPGR関連RPに対するヒトにおける光受容体変性を標的とした遺伝子治療は、現在まで十分に開発されていない。アデノ随伴ウイルスベクターを使用する遺伝子治療は、この状態を処置するための最も有望なアプローチと考えられているが（Megaw RD et al. (2015)）、RPGRコード配列の固有の不安定性が、この治療法をヒト試験に移行する上での課題となっている。

【0013】

RPE65関連網膜変性を標的とした遺伝子治療の承認は、臨床遺伝子治療応用における大きなブレークスルーであり、多数の遺伝性疾患を処置する可能性を与えた。Russell S et al. (2017)。しかしながら、RPGRコード配列は、反復的なプリンリッチの

10

20

30

40

50

領域を含有し、選択的スプライシングを受ける、固有の不安定性を有し、この治療法をヒト試験に移行する上での課題となっている。Deng WT et al. (2015); Pawlyk BS et al. (20016); Sun X et al. (2016); Wu Z et al. (2015)。

【0014】

神経変性障害（NDD）は、中枢および末梢神経系の進行性の構造的および機能的変性を特徴とする異種の疾患群を表す。脳へのその特別なつながりおよび測定へのその到達性のために、眼は脳への固有の窓を提供し、それによってNDDの早期診断および臨床ケアに役立ち得る多くの可能性のあるバイオマーカーのセットへの非侵襲的なアクセスを提供する。

【0015】

黄斑変性症などの従来の加齢および遺伝的特徴に関連した視力状態以外に、パーキンソン病およびアルツハイマー病を含む中枢神経系状態が、患者の視力に影響を及ぼし得る。これらの疾患は、視神経、網膜細胞、および周囲の視覚構造の直接的または退行性の変性を引き起こし得る。多くの場合、明らかではないが、これらの状態は、協調性、運動性、および視覚認知に影響を及ぼし、転倒および関連する損傷のリスクを増加させる。

【0016】

AIMP2-DX2は、多因子アポトーシス遺伝子であるAIMP2の選択的で、拮抗的なスプライシングバリエーションである。AIMP2-DX2は、AIMP2の機能を妨げることにより、細胞アポトーシスを抑制することが知られている。AIMP2の競合的阻害剤として作用するAIMP2-DX2は、TRAF2のユビキチン化／分解の阻害により、TNF-αアルファ媒介性アポトーシスを抑制する。加えて、AIMP2-DX2が既存の肺がん誘発因子として確認されていることが報告されており、既存の研究では、がん細胞において広範囲に現れるAIMP2-DX2が、AIMP2のがん抑制機能を妨げることによってがんを誘発することが確認された。さらに、正常細胞におけるAIMP2-DX2の発現は細胞のがん化を進行させるが、AIMP2-DX2の発現の抑制はがんの成長を抑制し、それによって処置効果が示されることが発見された。

AIMP2-DX2がニューロン疾患の処置に有用であり得ることも決定されている（KR10-2015-0140723（2017）およびUS2019/0298858（2019））。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0017】

【特許文献1】 韓国特許第10-2015-0140723号公報

【特許文献2】 米国特許出願公開第2019/0298858号明細書

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0018】

発明の要旨

本明細書に開示されるのは、網膜変性疾患を処置することを必要とする対象における網膜変性疾患を処置する方法であって、エクソン2欠失AIMP2バリエーション（AIMP2-DX2またはDX2）を含む薬学的に有効な量の核酸分子を対象に投与することを含む、方法である。一部の実施形態では、核酸分子は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクター、例えば、組換えベクターである。

【0019】

また、本明細書に開示されるのは、網膜変性疾患を処置することを必要とする対象における網膜変性疾患の処置のための、エクソン2欠失AIMP2バリエーション（AIMP2-DX2またはDX2）を含む薬学的に有効な量の核酸分子の使用である。また、本明細書に開示されるのは、網膜変性疾患を処置することを必要とする対象における網膜変性疾患の処置における使用のための、AIMP2-DX2を含む薬学的に有効な量の核酸分子である。また、本明細書に開示されるのは、網膜変性疾患を処置することを必要とする対象

10

20

30

40

50

における網膜変性疾患の処置のための医薬の製造のための、A I M P 2 - D X 2を含む薬学的に有効な量の核酸分子の使用である。

【0020】

本明細書に開示されるのは、網膜変性疾患を処置することを必要とする対象における網膜変性疾患を処置する方法であって、エクソン2欠失A I M P 2バリエーション（A I M P 2 - D X 2またはD X 2）遺伝子を含む薬学的に有効な量の組換えベクターを対象に投与することを含む、方法である。

【0021】

また、本明細書に開示されるのは、網膜変性疾患を処置することを必要とする対象における網膜変性疾患の処置のための、エクソン2欠失A I M P 2バリエーション（A I M P 2 - D X 2またはD X 2）を含む薬学的に有効な量の組換えベクターの使用である。また、本明細書に開示されるのは、網膜変性疾患を処置することを必要とする対象における網膜変性疾患の処置における使用のための、A I M P 2 - D X 2を含む薬学的に有効な量の組換えベクターである。また、本明細書に開示されるのは、網膜変性疾患を処置することを必要とする対象における網膜変性疾患の処置のための医薬の製造のための、A I M P 2 - D X 2を含む薬学的に有効な量の組換えベクターの使用である。

【0022】

一部の実施形態では、核酸分子は、G a l n a cとの化学的コンジュゲーション、細胞透過性ペプチド、核酸もしくは糖ペプチド媒介ツール、合成化合物ベクター；脂質ナノ粒子カプセル化などの脂質媒介送達；無機ベクターなどの無機ベクター媒介送達；エクソソーム媒介送達などの生物学的送達；またはマイクロ／ナノニードル、圧力灌流、マイクロプロジェクタイル、電気エネルギー／電気穿孔／イオントフォレーション、ソノポレーション、マグネトポレーション（magnetoporation）、もしくはオプトポレーション／光学的エネルギーなどによる物理的送達によって投与される。

【0023】

一部の実施形態では、網膜変性疾患は、網膜色素変性症、レーバー先天性黒内障、錐体桿体ジストロフィー、緑内障、または糖尿病性網膜症である。一部の実施形態では、網膜変性疾患は、パーキンソン病、アルツハイマー病、または筋萎縮性側索硬化症に先行するか、またはそれらを伴う。一部の実施形態では、網膜変性疾患は、加齢黄斑疾患ではない。一部の実施形態では、網膜変性疾患を処置する方法は、加齢黄斑疾患（A M D）を処置することを含まない。一部の実施形態では、A M Dは湿性A M Dである。一部の実施形態では、A M Dは乾性A M Dである。

【0024】

組換えベクターは、m i R - 1 4 2 標的配列をさらに含み得る。

【0025】

ベクターは、A I M P 2 - D X 2に作動可能に連結したプロモーターをさらに含み得る。一部の実施形態では、プロモーターは、レトロウイルス（L T R）プロモーター、サイトメガロウイルス（C M V）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（R S V）プロモーター、M Tプロモーター、E F - 1アルファプロモーター、U B 6プロモーター、ニフトリベーターアクチンプロモーター、C A Gプロモーター、R P E 6 5プロモーターまたはオプシンプロモーターである。

【0026】

m i R - 1 4 2 標的配列は、A I M P 2 - D X 2 遺伝子の3'にあり得る。

【0027】

一部の実施形態では、A I M P 2 - D X 2 遺伝子は、配列番号2、13、14、15、16、17、18、19、または20と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0028】

一部の実施形態では、A I M P 2 - D X 2 遺伝子は、配列番号2、13、14、15、16、17、18、19、または20のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含

10

20

30

40

50

む。

【0029】

一部の実施形態では、AIMP2-DX2遺伝子は、配列番号10または11と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むエクソンを有しない。

【0030】

一部の実施形態では、AIMP2-DX2遺伝子は、配列番号10または11のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むエクソンを有しない。

【0031】

miR-142標的配列は、ACACTAを含むヌクレオチド配列を含み得る。一部の実施形態では、miR-142標的配列は、ACACTAおよび配列番号5の1~17個の追加の連続するヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、miR-142標的配列は、配列番号5のヌクレオチド配列(TCCATAAAGTAGGAACACTACA; miR-142-3p標的配列)と少なくとも50%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、miR-142標的配列は、配列番号5のヌクレオチド配列を含み得る。

【0032】

一部の実施形態では、miR-142標的配列は、ACTTTAを含む。一部の実施形態では、miR-142標的配列は、ACTTTAおよび配列番号7の1~15個の追加の連続するヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、miR-142標的配列は、配列番号7のヌクレオチド配列(AGTAGTGCTTTCTACTTTATG; miR-142-5p標的配列)と少なくとも50%同一であるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、miR-142標的配列は、配列番号7のヌクレオチド配列を含む。

【0033】

miR-142標的配列は、本明細書に開示されるベクターにおいて2~10回反復され得る。

【0034】

ベクターはウイルスベクターであり得る。ウイルスベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、マウス白血病ウイルス(MLV)、トリ肉腫/白血病(ASLV)、脾臓壊死ウイルス(SNV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)、単純ヘルペスウイルス、またはワクシニアウイルスベクターであり得る。

【0035】

一部の実施形態では、組換えベクターは、対象に局所的に、硝子体内注射によって、結膜下注射によって、または対象の網膜下腔内に投与される。

【0036】

本明細書に開示される方法は、対象に追加の治療剤を投与することをさらに含み得る。一部の実施形態では、追加の治療剤は、ラニビズマブ、アフリベルセプト、またはベバシズマブである。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】組換えベクターの例。

【0038】

【図2】in vitro環境下での組換えベクターの神経細胞特異的発現。

【0039】

【図3】miR142-3pTの4つの反復(下線)を有するmiR142-3pT(標的)配列(配列番号6)。

【0040】

【図4】図4A。1×、2×、および3×の反復、ならびに変異体を有するmiR142-3pTの概略図。図4Bは、miR-142-3pTの1×、2×、および3×の反復

10

20

30

40

50

を有する D X 2 発現に対する m i R 1 4 2 - 3 p 阻害を示す。

【 0 0 4 1 】

【図 5】コア結合配列は D X 2 阻害において重要である。D X 2 の有意な阻害を示した T s e q × 3 の反復を有するベクター（図 4 B）、および D X 2 構築物を対照として使用した。1 0 0 p m o l の m i R - 1 4 2 - 3 p 処理は、T s e q × 3 ベクターを有意に阻害したが、D X 2 および変異体配列は阻害されなかった。

【 0 0 4 2 】

【図 6 A】A I M P 2 - D X 2 およびバリエーションのアミノ酸配列の比較（図 6 B および 6 C は図 6 A の続きである）。

【図 6 B】同上。

【図 6 C】同上。

【 0 0 4 3 】

【図 7 - 1】D X 2 は A I M P 2 と物理的に結合して P A R P - 1 の活性化を減少させる。図 7 A。S H - S Y 5 Y 細胞への各プラスミドのトランスフェクションによって A I M P 2、および D X 2 の発現を誘導し、その後、P A R P - 1 プルダウンアッセイの解析を行った。D X 2 は A I M P 2 よりも P A R P - 1 に対して高い親和性を示す。図 7 B。S H - S Y 5 Y 細胞にビヒクル（C o n）または D X 2 発現（D X 2）プラスミドをトランスフェクトし、24 時間インキュベートし、溶解した。全細胞溶解物をタンパク質アガロースビーズとインキュベートして、P A R P - 1 結合 A I M P 2 を免疫沈降させ、免疫ブロット解析によって解析した。図 7 C。D X 2 s i R N A（D X 2）および対照 s i R N A（C o n）を S H - S Y 5 Y にトランスフェクトし、48 時間インキュベートした。全細胞溶解物をタンパク質アガロースビーズとインキュベートして、P A R P - 1 結合 A I M P 2 を免疫沈降させ、免疫ブロット解析によって解析した。図 7 D および 7 E。G F P - または M y c - タグ付き A I M P 2 および / または D X 2 発現プラスミドを H E K 2 9 3 細胞にトランスフェクトし、m y c 抗体（図 7 D）および G F P 抗体（図 7 E）を用いた免疫沈降（I P）によって結合親和性を測定した。図 7 F および 7 G。S H - S Y 5 Y 細胞に、E V（空ベクター）、A I M P 2 および D X 2 発現プラスミドをトランスフェクトし、24 時間後、トランスフェクトした細胞を、1 0 4 0 0 μ M H 2 O 2 とともに、またはそれを含まずに 4 時間インキュベートした。免疫ブロットアッセイを使用して、切断した P A R P - 1 レベル（図 7 F）および P A R 化（P A R y l a t i o n）（図 7 G）を調べた。酸化ストレス誘発細胞損傷条件において、D X 2 は、細胞死に関連する P A R P - 1 の切断（図 7 F）および P A R y l a t i o n（図 7 G）を減弱させる。図 7 H。A I M P 2 および D X 2 タンパク質の安定性を、シクロヘキシミド処理パルスチェイスアッセイにより評価した。試料を時間依存的に 0 時間から 4 時間で採取し、免疫ブロットアッセイを使用して調べた。図 7 I。A I M P 2 により誘発される P A R P - 1 の活性化の概略図。D X 2 の非存在下では、A I M P 2 二量体は P A R P - 1 の活性化およびニューロン死を誘発する。しかしながら、D X 2 の存在下では、D X 2 は A I M P 2 と相互作用し、P A R P - 1 の活性化を阻害する。

【図 7 - 2】同上。

【図 7 - 3】同上。

【図 7 - 4】同上。

【 0 0 4 4 】

【図 8 - 1】D X 2 は神経毒誘発ニューロン細胞死を低減させる。図 8 A。N 2 A 細胞に、E V、A I M P 2 および D X 2 発現プラスミドをトランスフェクトし、トランスフェクトした細胞を、H 2 O 2 とともに、またはそれを含まずに 4 時間インキュベートし、次いで M T T を使用して細胞生存率を測定した。図 8 B および 8 C。S H - S Y 5 Y 細胞に、E V、A I M P 2 および D X 2 発現プラスミドを共トランスフェクトし、H 2 O 2 とともに 4 時間インキュベートし、M T T 解析により細胞生存率を測定した。数字はトランスフェクトした D N A の量を示す。

【図 8 - 2】同上。

【0045】

【図9-1】DX2は、TRAF2へのAIMP2結合の競合阻害によりAIMP2のアポトーシス促進活性を損なう。図9A。HEK293細胞に、示した量のMyc-DX2およびAIMP2をトランスフェクトした。エンドーおよびエキソAIMP2およびDX2の発現を、抗AIMP2抗体を用いた全細胞溶解物(WCL)のウェスタンブロッティングにより確認した(下側のパネル)。TRAF2をその特異的抗体を用いて免疫沈降させ、TRAF2に結合したAIMP2またはDX2を抗Myc抗体を用いて検出した(上側のパネル)。Choi JW et al. (2012)。図9B。DX2はNF- κ B活性を増加させたが、AIMP2は逆の効果を与えた。図9C。DX2の過剰発現はTNF- α 誘導細胞死を無効にした。

10

【図9-2】同上。

【0046】

【図10】DX2の過剰発現は、TNF α 誘発ニューロン細胞死を低減させる。図11A。N2A細胞にEVおよびDX2をトランスフェクトし、TNF- α およびCHXで6時間処理した。細胞生存率をMTTアッセイによって評価した。 $\#P<0.05$ 。図10B。WTマウスの一次ニューロン細胞にEV(空ベクター)およびDX2をトランスフェクトし、MTTアッセイを実施してそれらの生存率を評価した。 $\#P<0.0$ 。

【0047】

【図11】AAV2-GFP形質導入効力試験。図11A。AAV-GFPの形質導入効力試験。SK-SY5Y細胞にscAAV-GFPまたはssAAV-GFPを感染させ、48時間後、(図11B)GFP発現を蛍光顕微鏡法で観察した。

20

【0048】

【図12-1】AAV2-DX2は抗アポトーシス効果を有し、細胞シグナル伝達を変化させる。図12A。一次ニューロン(ニューロン)、MEF(マウス胎児線維芽細胞)、肝細胞、およびMSC(間葉幹細胞)における細胞傷害性効果。H₂O₂処理後、対照形質導入細胞と比較して減少した細胞傷害性効果をDX2形質導入細胞(AAV2-DX2)において観察した(c)。図12B。DX2はSH-SY5Y(左)および一次ニューロン細胞(右)における正常な細胞成長には必要とされない。酸化ストレス条件下では、AAV2-DX2感染細胞は、それらの対照の対応物(AAV-GFP、GFP)と比較して、細胞死の減少したレベルを示す。図12C。AAV-GFPまたはAAV2-DX2感染神経芽腫細胞SK-N-SHおよびN2AのRNAseqの富化プロット。図12Dおよび12E。細胞死および炎症関連経路が下方調節されたことを表す遺伝子カウントのグラフ。図12Fおよび12G。DX2の過剰発現によって変化したシグナル伝達経路のp値プロット。ns;有意ではない; * $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.0001$ 、t検定。

30

【図12-2】同上。

【図12-3】同上。

【0049】

【図13】DX2は網膜光受容体ニューロン細胞生存率を増加させた。661W細胞を96ウェルプレートに1ウェルあたり 5×10^4 細胞で播種し、続いて5000MOIでAAV-DX2ウイルスを感染させた。48時間後、細胞を様々な濃度のH₂O₂で処理した。細胞生存率を24時間後にMTTアッセイを使用して評価した。

40

【0050】

【図14】DX2はH₂O₂によって誘導されるBAXのレベルを低減させる。661W細胞にAAV-GFPまたはAAV-DX2を各々5,000のMOIで感染させた。72時間後、細胞を2mMのH₂O₂で6時間処理し、次いでBAXのRNAレベルを評価した。

【0051】

【図15】DX2の過剰発現は661W細胞における67LRレベルの増加をもたらす。図15A。空ベクター(EV)およびStrep-DX2(DX2)を、Lipofec

50

tamine 3000試薬を使用して661W細胞にトランスフェクトした。DX2トランスフェクションにより、67LRレベルの増加が生じた。図15B。図15Aと同じ条件下で、661W細胞に対して免疫蛍光染色を実施した。

【0052】

【図16】DX2はAIMP2と同様にKRSに結合する。2 μ gのフラグータグ-AIMP2およびフラグータグ-DX2をトランスフェクトした細胞を、NP-40溶解バッファーを使用して細胞溶解に供した。その後、15 μ lのアガロースA/GプラスビーズとKRS抗体の混合物をプルダウンアッセイに使用した。

【0053】

【図17】DX2はROS条件下でKRS膜形態のレベルをモジュレートし、67LRレベルの増加をもたらす。図17A。661W細胞にAAV-GFPおよびAAV-DX2を5,000の感染多重度(MOI)で感染させ、続いて感染後72時間後に2mMのH₂O₂で6時間処理した。その後、細胞溶解を実施し、ウエスタンブロット解析を使用してKRSおよび67LRレベルの変化を観察した。図17B。図17Aと同じ実験条件に従って、細胞を細胞質ゾル成分および膜成分に分画し、ウエスタンブロット解析を行った。H₂O₂処理により、KRSの膜形態の低減が観察されたが、AAV-DX2による処理により、67LRおよびKRSの両方の膜形態の増加が生じた。

【0054】

【図18-1】網膜の断面組織像(H&E染色)。図18B。網膜厚。図18C。RPE(網膜色素上皮)厚。図18D。ONL(光受容体の外核層)厚。図18E。外節厚。図18F。OPL外網状層)厚。全ての試料は、10 μ mの厚さを有する視神経含有切片から取得した。図18G。RPE(網膜色素上皮)の完全性および増殖。図18H。PR(光受容体)の回復。図18I。RPEおよびPRの細胞増殖。図18J~18O。網膜の機能回復。正常ERGグラフ形式の網膜電図(図18J~18K)。A波振幅(図18L)およびA波潜時(図18M)、b波振幅(図18N)およびb波潜時(図18O)。

【図18-2】同上。

【図18-3】同上。

【図18-4】同上。

【図18-5】同上。

【図18-6】同上。

【図18-7】同上。

【0055】

【図19-1】scAAV2-GFPまたはscAAV2-DX2による処置後のレーザー光凝固部位のフルオレセイン血管造影およびインドシアニンググリーン血管造影画像。図19B~19D。脈絡膜血管新生面積の比較。GFP対照およびDX2で処置した場合のCNV面積に対する漏出面積の比。漏出面積はFAを使用して総過蛍光面積を測定することにより推定し、CNV面積はICGAを使用して算出した。DX2での処置によるCNV面積の変化。CNV体積は、測定されたイソレクチンB4体積の合計に基づいて算出した。各群について、n=12、*P<(0.05)。図19E。レーザー誘発脈絡膜血管新生(CNV)モデルマウスにおけるVEGFの発現。CNVマウスモデルにおけるVEGF発現およびVEGF倍率変化のウエスタンブロット結果。VEGF倍率変化はImage Jにより測定した。各群について、n=6、*P<(0.05)。

【図19-2】同上。

【0056】

【図20-1】網膜色素上皮(RPE)変性面積眼底撮影。図20C~20F。試験品(AAV2-DX2)処置群のDX2発現レベル。図20G~20J。免疫組織化学。図20K~20L。網膜電図。

【図20-2】同上。

【図20-3】同上。

【図20-4】同上。

【図 20-5】 同上。

【0057】

【図 21】 A 波（図 21 A）および B 波（図 21 B）の網膜電図測定値。

【0058】

【図 22】 A A V 2 - D X 2 A A V 2 - D X 2 は、レーザー誘発脈絡膜血管新生（C N V）ウサギモデルにおける血管新生を阻止する。図 22 A。フルオレセイン強度。図 22 B。イソレクチン B 4 染色。

【0059】

【図 23-1】 全身臓器における D X 2 発現を評価するための生体分布研究。図 23 A。注射された組織領域における D X 2 の発現を確認するための q P C R 解析。図 23 B ~ 23 M。q P C R を使用した、胸腺、肝臓、精巣、脳、脾臓、腎臓、心臓、胃、腸間膜リンパ節、脊髄、膵臓、および肺における D X 2 発現の解析。

10

【図 23-2】 同上。

【発明を実施するための形態】

【0060】

発明の詳細な説明

神経変性障害（N D D）は、中枢および末梢神経系の進行性の構造的および機能的変性の特徴とする異種の疾患の群を表す。脳へのその特別なつながりおよび測定へのその到達性のために、眼は脳への固有の窓を提供し、それによって N D D の早期診断および臨床ケアに役立ち得る多くの可能性のあるバイオマーカーのセットへの非侵襲的なアクセスを提供する。

20

【0061】

遺伝性網膜疾患、特に R P またはレーバー先天性黒内障（Leber congenital Amurosis）は、様々な遺伝子の数十の変異によって引き起こされ、人種および地域に応じて存在および頻度が異なる異種の眼疾患を指す集合概念である。近年、変異した遺伝子を正常な W T 遺伝子に置き換える遺伝子治療が、有望な処置方法として出現している。しかしながら、現在、臨床相試験を受けている遺伝子治療薬のほとんどは、変異体遺伝子を置き換えるための単一の正常な W T 遺伝子の導入による治療法であり、これには、非常に限られた数の患者においてのみ有効であることが期待できるという限界がある。加えて、単一変異体遺伝子置換遺伝子治療（例えば、Luxturna）の臨床試験成果は、これまでのところ正常な視力回復にはまだほど遠い。患者の日常生活を自力で可能にする光検出能力を増強する有効性しか報告されていない。このことは、単一変異体遺伝子置換に加えて、正常な視力回復には、より複雑な細胞レベルのメカニズムが存在することを示唆している。

30

【0062】

黄斑変性症などの従来の加齢および遺伝的特徴に関連した視力状態以外に、パーキンソン病およびアルツハイマー病を含む中枢神経系状態が、患者の視力に影響を及ぼし得る。これらの疾患は、視神経、網膜細胞、および周囲の視覚構造の直接的または退行性の変性を引き起こし得る。多くの場合、明らかではないが、これらの状態は、協調性、運動性、および視覚認知に影響を及ぼし、転倒および関連する傷害のリスクを増加させる。

40

【0063】

パーキンソン病は進行性のニューロン変性障害である。運動制御に関与する大脳基底核系の一部である線条体におけるドーパミン作用の結果として生じる低減を伴う黒質（substantia nigra）におけるドーパミン作動性ニューロンの破壊が、パーキンソン病の病態生理学的メカニズムであると考えられている。パーキンソン病は、主に振戦、固縮、および姿勢不安定を特徴とするが、かすみ目および複視、制御不能な眼球運動、光感受性、眼精疲労、および読字困難などの漠然とした視覚症状がよく見られる。軽度の眼球運動異常は特発性パーキンソン病を有する患者の 75 パーセントにも起こるが、多くの場合、処置されないままである。しかし、これらの症状は、患者の既に危険にさらされている生活の質および機能性をさらに低減させる可能性があるため、専門的な処置を必要とする。

50

【0064】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンの機能が徐々に失われる致死的な神経変性疾患である。眼の不調の訴えは、現在、ALSの古典的な症状とは考えられていないが、菲薄化、軸索変性および封入体などの網膜の変化が多く患者において見出されている。死後のヒトの組織および動物モデルにおいて観察される網膜の異常は、ALSにおける脊髄の変化と類似している。網膜は脳と個体発生的な関係を共有し、多くの遺伝子が神経変性疾患および網膜疾患の両方に関連しているため、これらの所見は劇的に予想外ではない。Soldatov 2021を参照のこと。

【0065】

アルツハイマー病は最も一般的な認知症の形態であり、神経細胞間の、破壊され、損傷された結合を特徴とする。これらの傷害は、アミロイド斑および／または凝集したタウタンパク質から構成される神経原線維変化の形態のβ-アミロイドタンパク質（Aβ）の異常な蓄積に起因して起こる。アルツハイマー病における眼の変性は、網膜神経線維層が薄くなると起こる。視覚処理を担うニューロンは一次視覚ニューロンよりも損傷する傾向があり、疾患の初期段階において不明瞭な視覚症状が生じる。物体の認識、色の見え方、および視覚運動の処理の欠陥は、どの段階でも起こる可能性があり、転倒、裂傷、および火傷などのアクシデントのリスクが増加する。

10

【0066】

AIMP2のエクソン2欠損の拮抗的スプライシングバリエントであるDX2は、AIMP2誘発ニューロン死を効果的に損なう。AIMP2は、マルチ-tRNA合成酵素複合体を形成する3つの補助タンパク質のうちの1つである。翻訳の間にtRNAライゲーションを支持するそれらの役割の他に、AIMP2は、多機能で強力な細胞死誘導遺伝子としての役割を果たすことが報告されている。

20

【0067】

AIMP2は、PARP-1もしくはp53などの細胞アポトーシスシグナル伝達経路を過剰に活性化するか、またはTRAFシグナル伝達もしくはLR発現などの細胞生存シグナル伝達経路を抑制する。

【0068】

AIMP2のスプライシングバリエントとして、DX2はAIMP2に対して拮抗的な競合相手として作用し、その結果、AIMP2誘発細胞死を直接的および間接的に阻害する。

30

【0069】

DX2はパーキンソン病モデルにおいてPARP-1およびp53誘発ニューロン死を阻害する。黒質においてAAVを使用してDX2を過剰発現させると、PD誘発マウスモデルにおいて運動活性およびニューロン細胞死が救済される。

【0070】

ALSでは、DX2は、ALS疾患におけるTRAF2依存性および67LR媒介性のニューロン死を阻害する。DX2を過剰発現させると、ALSモデルマウスにおいて運動活性および生存率が改善し、ニューロン細胞死が低減した。

【0071】

いかなる理論にも拘束されないが、眼と脳との間の解剖学および発生学的相互関連、ならびにNDDにおける網膜損傷の臨床的証拠を考慮すると、CNSにおけるニューロン細胞系の破壊、ならびに視神経、網膜細胞および周囲の視覚構造の変性には、共通の病態生理学的経路が存在する可能性がある。

40

【0072】

遺伝子治療は、加齢黄斑変性症（AMD）、スターガルト病、網膜色素変性症（RP）および緑内障などの多様な疾患における不可逆的な網膜細胞死に対する有望な処置である。アデノ随伴ウイルス（AAV）は、網膜への遺伝子発現を目標とするための好ましいベクターとして出現した。AAVを網膜下または硝子体内に注射することにより、網膜色素上皮および網膜の内層に効率よく形質導入することができる。AAVはまた、病原性の欠

50

如に起因するその相対的な安全性のために、適切な遺伝子送達アプローチとして評価されている（20）。生存遺伝子D X 2の利用は、網膜変性疾患の処置のための潜在的な選択肢であり得る。

【0073】

A I M P 2 - D X 2は、多因子アポトーシス遺伝子であるA I M P 2（アミノアシル t R N A 合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質2）の選択的で、拮抗的なスプライシングバリエーションである。A I M P 2 - D X 2は、A I M P 2の機能を妨げることにより、細胞アポトーシスを抑制することが知られている。

【0074】

A I M P 2の競合的阻害剤として作用するA I M P 2 - D X 2は、T R A F 2のユビキチン化／分解の阻害により、T N F - α 媒介性アポトーシスを抑制する。

【0075】

A I M P 2 - D X 2がニューロン疾患を処置できることも実証されている（U S 2 0 1 9 / 0 2 9 8 8 5 8 A 1）。

【0076】

また、A I M P 2 - D X 2をアデノ随伴ウイルスに挿入し、その結果として得られたものを網膜下腔に導入すると、脈絡膜血管新生を効果的に阻害することも実証されている。

【0077】

本明細書に開示されるのは、網膜変性疾患を処置することを必要とする対象における網膜変性疾患を処置する方法であって、エクソン2欠失A I M P 2バリエーション（A I M P 2 - D X 2またはD X 2）を含む薬学的に有効な量の核酸分子を対象に投与することを含む、方法である。一部の実施形態では、核酸分子は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクター、例えば、組換えベクターである。

【0078】

本明細書に開示されるのは、網膜変性疾患を処置することを必要とする対象における網膜変性疾患を処置する方法であって、エクソン2欠失A I M P 2バリエーション（A I M P 2 - D X 2またはD X 2）遺伝子を含む薬学的に有効な量の組換えベクターを対象に投与することを含む、方法である。

【0079】

一部の実施形態では、網膜変性疾患は、網膜色素変性症、レーバー先天性黒内障、錐体-桿体ジストロフィー、緑内障、または糖尿病性網膜症である。一部の実施形態では、網膜変性疾患は、パーキンソン病、アルツハイマー病、または筋萎縮性側索硬化症に先行するか、またはそれらを伴う。一部の実施形態では、網膜変性疾患は、加齢黄斑疾患ではない。一部の実施形態では、網膜変性疾患を処置する方法は、加齢黄斑疾患を処置することを含まない。一部の実施形態では、A M Dは湿性A M Dである。一部の実施形態では、A M Dは乾性A M Dである。

【0080】

本明細書に開示されるのは、エクソン2欠失A I M P 2バリエーション（A I M P 2 - D X 2）遺伝子を含む薬学的に有効な量の組換えベクターを対象に投与することを含む、網膜変性疾患に罹患している対象において、眼または眼周辺領域における血管漏出を減少させ、脈絡膜血管新生領域を低減させ、脈絡膜血管新生の形成を低減させ、またはV E G F発現を低減させる方法である。

【0081】

本明細書に開示される組換えベクターは、m i R - 1 4 2 標的配列をさらに含み得る。ベクターは、A I M P 2 - D X 2に作動可能に連結したプロモーターをさらに含み得る。一部の実施形態では、プロモーターは、レトロウイルス（L T R）プロモーター、サイトメガロウイルス（C M V）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（R S V）プロモーター、M Tプロモーター、E F - 1アルファプロモーター、U B 6プロモーター、ニフトリベーターアクチンプロモーター、C A Gプロモーター、R P E 6 5プロモーター、シナプシンプロモーター、M e C P 2プロモーター、C a M K I Iプロモーター、H b 9プロモーター

10

20

30

40

50

一、またはオブシンプロモーターである。

【0082】

本明細書に開示される方法において、一部の実施形態では、組換えベクターは、エクソン2欠失AIMP2バリエーション(AIMP2-DX2)遺伝子およびmiR-142標的配列を含み得る。miR-142標的配列は、AIMP2-DX2遺伝子の3'にあり得る。本明細書に記載されるベクターは、ニューロン細胞においてAIMP2-DX2を発現させることができるが、白血球およびリンパ系細胞などの造血細胞では発現させることができない。

【0083】

AIMP2-DX2ポリペプチド(配列番号2)は、AIMP2(例えば、配列番号12のaa配列;例えば、配列番号3のnt配列)のスプライスバリエーションであり、AIMP2の第2のエクソン(配列番号10;配列番号4のnt配列)は省略されている。一部の実施形態では、AIMP2-DX2遺伝子は、配列番号1に記載されるヌクレオチド配列を有し、AIMP2-DX2ポリペプチドは、配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有する。AIMP2-DX2ポリペプチドのバリエーションまたはアイソフォームも公知であり、当業者によって決定することができる(例えば、配列番号13~19を参照のこと。例えば、図6A~6Cは、AIMP2(配列番号2)およびバリエーション、配列番号13~19、ならびにAIMP2またはAIMP2-DX2(配列番号20)のコンセンサス配列もしくはコア配列の比較を示す。

【0084】

一部の実施形態では、AIMP2-DX2遺伝子は、配列番号2、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20と少なくとも90%同一、少なくとも93%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一であるか、またはそれらの同一性の任意の範囲であるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含み得る。AIMP2-DX2遺伝子は、配列番号2、13、14、15、16、17、18、19、または20のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含み得る。

【0085】

AIMP2-DX2遺伝子は、配列番号1のヌクレオチド配列と少なくとも90%同一、少なくとも93%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一であるか、またはそれらの同一性の任意の範囲であるヌクレオチド配列を含み得る。AIMP2-DX2遺伝子は、配列番号1のヌクレオチド配列を含み得る。

【0086】

一部の実施形態では、AIMP2-DX2遺伝子は、配列番号10または11と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むエクソンを有しない。一部の実施形態では、AIMP2-DX2遺伝子は、配列番号10または11のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むエクソンを有しない。一部の実施形態では、AIMP2-DX2遺伝子は、配列番号4と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むエクソンを有しない。

【0087】

一部の実施形態では、AIMP2-DX2を含む核酸分子は、必要に応じてmiR-142標的配列を含み得る。miR-142標的配列(miR-142T)は、ACACTAを含むヌクレオチド配列を含み得る。miR-142標的配列は、ACACTAおよび配列番号5の1~17個の追加の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み得る。例えば、miR-142標的配列は、ACACTAおよび配列番号5に示されるAC

10

20

30

40

50

ACTAの5'または3'に連続する合計で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の追加のヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み得る。

【0088】

miR-142 標的配列は、配列番号5のヌクレオチド配列(TCCATAAAGTAGGAACACTACA; miR-142-3pT)と少なくとも50%同一、少なくとも60%同一、少なくとも70%同一、少なくとも80%同一、少なくとも90%同一、少なくとも90%同一、少なくとも93%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一のヌクレオチド配列を含み得る。miR-142 標的配列は、配列番号5

10

【0089】

miR-142 標的配列は、ACTTTTAを含むヌクレオチド配列を含み得る。miR-142 標的配列は、ACTTTTAおよび配列番号7の1~15個の追加の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み得る。例えば、miR-142 標的配列は、ACTTTTAおよび配列番号7に示されるACTTTTAの5'または3'に連続する合計で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個の追加のヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含み得る。

【0090】

miR-142 標的配列は、配列番号7のヌクレオチド配列(AGTAGTGCTTTCTACTTTTATG; miR-142-5pT)と少なくとも50%同一、少なくとも60%同一、少なくとも70%同一、少なくとも80%同一、少なくとも90%同一、少なくとも90%同一、少なくとも93%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、または100%同一のヌクレオチド配列を含み得る。miR-142 標的配列は、配列番号7のヌクレオチド配列を含み得る。

20

【0091】

miR142-3pT 変異体配列の例は以下である：

【化1】

ccgctgcagtgtagcagtgccagccaatgtgcagaggtggatgaggtcttgtaaaacctggctcctttaacacggccctcaagct
ccttaagtgaccagaagcttgtagctccataaagtaggaCCACTGCAatcactccataaagtaggaCCACTGCAagatatct
ccataaagtaggaCCACTGCAatcactccataaagtaggaCCACTGCAaaagcttgtagggatccgcc (配列番号 25)

30

【0092】

変異体配列とは、1つまたは複数の領域、例えば、以下のように置換されているmiR142-3pTのコア配列の4つの領域を指す：(5'-AACACTAC-3'→5'-CACTGCA-3')。ベクターをトランスフェクトしたHEK293細胞におけるDX2発現の阻害が、miR142-3p×1の反復(100pmol)のmiR142-3p 標的配列で観察され、miR142-3p 標的seqにおけるコア結合配列の数が増加するにつれて、DX2発現に対するmiR142-3p阻害も増加した。Tseq×3コア配列含有ベクターは有意な阻害を示したが、変異した3×配列では阻害は観察されなかった。

40

【0093】

マイクロRNA(miRNA)は、遺伝子発現を制御するように機能する非コードRNA分子である。miRNAは、mRNA分子内の相補配列、すなわち、miRNA 標的配列と塩基対を形成することにより機能する。miRNAは、タンパク質をコードする遺伝子の標的メッセンジャーRNA(mRNA)転写物に結合し、それらの翻訳を負に制御し得るか、またはmRNAの分解を引き起こし得る。現在、2000個よりも多いヒトmiRNAが同定されており、miRbaseデータベースが公開されている。多くのmiR

50

NAは組織特異的に発現し、組織特異的な機能および分化を維持するのに重要な役割を有する。

【0094】

miRNAは遺伝子の転写後の段階で作用し、哺乳動物の場合、遺伝子発現の約60%がmiRNAによって制御されていることが知られている。miRNAは生体内の多様なプロセスにおいて重要な役割を果たし、がん、心臓障害および神経関連障害と相関関係を有することが開示されている。例えば、miR-142には、miR-142-3pおよびmiR-142-5pが存在し、それらの標的配列のいずれも使用することができる。したがって、「miR-142」または「miRNA-142」とは、例えば、miR-142-3pおよび／またはmiR-142-5pを指し、miR-142標的配列、例えば、miR-142-3pTまたはmiR-142-5pTに結合することができる。

10

【0095】

miR-142標的配列はAIMP2-DX2遺伝子の5'または3'にあり得る。

【0096】

例えば、「miR-142-3p」は、進行性B細胞白血病において、その遺伝子の転座が起こる領域に存在し得、造血組織（骨髄、脾臓および胸腺など）において発現することが知られている。加えて、miR-142-3pはマウス胎児の肝臓（マウスの造血組織）での発現が確認されており、造血系の分化に関与していることが知られている。

【0097】

一部の実施形態では、miR-142-3pおよび／またはmiR-142-5p標的配列は、少なくとも2〜10回、少なくとも2〜8回、少なくとも2〜6回、少なくとも4回、またはそれらの任意の範囲もしくは数の回数、反復される。

20

【0098】

一例として、例えば、配列番号23のヌクレオチド配列を有するmiR-142-3pは、対応する標的配列、例えば、配列番号5のヌクレオチド配列を有するmiR-142-3p標的配列（miR-142-3pT）を有し得るが、これに限定されない。例えば、配列番号24のヌクレオチド配列を有するmiR-142-5pは、対応する標的配列、例えば、配列番号7のヌクレオチド配列を有するmiR-142-5p標的配列（miR-142-5pT）を有し得るが、これに限定されない。

【0099】

一部の実施形態では、miR-142-3pは、配列番号23のヌクレオチド配列を有し得、miR-142-5pは、配列番号24のヌクレオチド配列を有し得る。

30

【0100】

本明細書に開示されるのは、miR-142-3p標的配列および／またはmiR-142-5p標的配列（それぞれ、miR-142-3pTおよび／またはmiR-142-5pT）をAIMP2-DX2の末端に挿入し、CD45由来細胞、特に、リンパ系および白血球におけるAIMP2-DX2発現の抑制を制御することにより、AIMP2-DX2バリエーションの過剰発現の副作用を制御し得る組換えベクターである。したがって、AIMP2-DX2バリエーションの発現は、注射された組織領域における主要な集団である非ニューロン造血細胞ではなく、注射されたニューロン細胞および組織のみに制限され得る。miR142-3pは造血細胞においてのみ発現する。

40

【0101】

本明細書に開示されるのは、miR-142-3pおよび／またはmiR-142-5pに対する標的配列を含有する組換えベクターである。本明細書に開示されるのは、エクソン2欠失AIMP2バリエーション（AIMP2-DX2）遺伝子、ならびに本明細書に開示されるmiR-142-3pおよび／またはmiR-142-5p標的配列を含む組換えベクターである。

【0102】

「組換えベクター」という用語は、適切な宿主細胞において標的タンパク質もしくはRNAをコードすることができるベクター、または挿入された遺伝子が適切に発現すること

50

を可能にするために必須の作動可能に連結した制御因子（複数可）を含有する遺伝子構築物を指す。

【0103】

「作動可能に連結した」という用語は、一般的な機能を実行するように、核酸発現制御配列と、標的とされたタンパク質およびRNAをコードする核酸配列との間の機能的連結を指す。例えば、それは、プロモーターをコードする核酸配列、および核酸配列の作動性のために連結しているタンパク質またはRNAの発現に影響を与え得る。組換えベクターによる作動可能な連結は、対応する技術分野で周知の遺伝子組換え技術を使用することにより製造することができ、領域特異的DNA切断および連結のための対応する技術分野で一般的に公知の酵素を使用する。

10

【0104】

組換えベクターは、本明細書に開示されるように、AIMP2-DX2に作動可能に連結したプロモーターをさらに含み得る。一部の実施形態では、プロモーターは、レトロウイルス（LTR）プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、MTプロモーター、EF-1アルファプロモーター、UB6プロモーター、ニワトリベーターアクチンプロモーター、CAGプロモーター、RPE65プロモーター、シナプシンプロモーター、MeCP2プロモーター、CaMKIIプロモーター、Hb9プロモーター、またはオプシンプロモーターである。

【0105】

組換えベクターは、異種プロモーターおよびプロモーターにおいて作動可能に連結した異種遺伝子をさらに含有し得る。

20

【0106】

本明細書で使用される場合、「異種遺伝子」は、生物学的に適切な活性化を伴うタンパク質またはポリペプチド、および免疫原または抗原性タンパク質もしくはポリペプチド、あるいは処置活性化タンパク質またはポリペプチドなどの標的とされた産生物の暗号化配列を含み得る。

【0107】

ポリペプチドは、宿主細胞における内因性タンパク質の発現の不足または欠如を補うことができる。遺伝子配列は、DNA、cDNA、合成DNA、RNAまたはその組合せを含む多様な供給源から誘導され得る。遺伝子配列は、天然のイントロンを含有するか、または含有しないゲノムDNAを含み得る。加えて、ゲノムDNAは、プロモーター配列またはポリアデニル化配列とともに取得され得る。ゲノムDNAまたはcDNAは様々な方法で取得され得る。ゲノムDNAは、対応する分野において公的に知られている方法によって適切な細胞から抽出および精製され得る。あるいは、mRNAを使用して、細胞から分離することにより逆転写または他の方法によりcDNAを産生することができる。あるいは、ポリヌクレオチド配列は、RNA配列と相補的な配列、例えば、アンチセンスRNA配列を含有することができ、アンチセンスRNAを個体に投与して、個体の細胞における相補的ポリヌクレオチドの発現を抑制することができる。

30

【0108】

例えば、異種遺伝子はエクソン2が欠損したAIMP-2スプライシングバリエーションであり、miR-142-3p標的配列は異種遺伝子の3'UTRに連結され得る。AIMP2タンパク質の配列（312aaバージョン：AAC50391.1またはGI:1215669；320aaバージョン：AAH13630.1、GI:15489023、BC013630.1）は文献に記載されている（312aaバージョン：Nicolaidis, N.C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. Analysis of the 5' region of PMS2 reveals heterogeneous transcripts and a novel overlapping gene, Genomics 29 (2), 329-334 (1995)／320aaバージョン：Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26), 16899-16903 (2002))。

40

50

【0109】

「AIMP2 スプライシングバリエント」という用語は、エクソン1～4のうちのエクソン2の一部または全部の欠損により生じたバリエントを指す。したがって、バリエントは、AIMP2 タンパク質およびヘテロ二量体を形成することによる、AIMP2 の正常な機能の阻害を意味する。注射されたAIMP2-DX2 遺伝子は、注射された組織以外の組織ではほとんど発現しない。しかしながら、追加の安全対策として、miR142 標的配列を挿入して、AIMP2-DX2 が、注射された組織領域における非ニューロン細胞の主要な集団である造血細胞において発現する可能性を完全に遮断することができる。

【0110】

組換えベクターは、配列番号1および5を含み得る。

10

【0111】

ヌクレオチドまたはアミノ酸配列に対する「配列相同性%」、「同一性%」または「同一%」という用語は、例えば、最適に配置された2つの配列を比較ドメインと比較することによって確認することができ、比較ドメインにおけるヌクレオチド配列の一部は、2つの配列の最適な配置における参照配列（付加または欠失を含まない）と比較して、付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。

【0112】

本明細書で開示されるタンパク質は、その天然型アミノ酸配列を有するものだけでなく、バリエントアミノ酸配列を有するものも含まれる。

【0113】

タンパク質のバリエントは、天然アミノ酸配列の欠失、挿入、非保存的もしくは保存的置換、またはそれらの組合せによる異なる配列、および1つより多いアミノ酸残基を有するタンパク質を意味する。全体として分子の活性化を変更しないタンパク質およびペプチドのアミノ酸交換は、対応する分野において知られている（H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979）。

20

【0114】

タンパク質またはそのバリエントは、天然の抽出、合成（Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-2156, 1963）、またはDNA配列に基づく遺伝子組換え（Sambrook et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2nd Ed., 1989）によって製造され得る。

30

【0115】

アミノ酸変異は、親水性、疎水性、電荷およびサイズなどのアミノ酸側鎖置換基の相対的な類似性に基づいて発生し得る。アミノ酸側鎖置換基のサイズ、形状および種類の解析によれば、アルギニン、リジンおよびヒスチジンは正電荷を有する残基であり；アラニン、グリシンおよびセリンは類似のサイズを有し；フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは類似の形状を有することを認識することができる。したがって、このような考慮に基づいて、アルギニン、リジンおよびヒスチジン；アラニン、グリシンおよびセリン；ならびにフェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは、生物学的に機能的等価物であるとみなすことができる。

【0116】

1つまたは複数の変異を導入する際、アミノ酸の疎水性指数を考慮することができる。疎水性指数は疎水性および電荷に応じて各アミノ酸に割り当てられる：イソロイシン（+4.5）；バリン（+4.2）；ロイシン（+3.8）；フェニルアラニン（+2.8）；システイン（+2.5）；メチオニン（+1.9）；アラニン（+1.8）；グリシン（-0.4）；スレオニン（-0.7）；セリン（-0.8）；トリプトファン（-0.9）；チロシン（-1.3）；プロリン（-1.6）；ヒスチジン（-3.2）；グルタミン酸（-3.5）；グルタミン（-3.5）；アスパラギン酸（-3.5）；アスパラギン（-3.5）；リジン（-3.9）；およびアルギニン（-4.5）。

40

【0117】

タンパク質の相互に作用する生物学的機能を割り当てる際に、疎水性アミノ酸指数は非

50

常に重要である。置換が類似の疎水性指数を有するアミノ酸で行われる場合、類似の生物学的活性のみを有することが可能である。疎水性指数を参照することにより変異を導入する場合では、疎水性指数の差が±2以内、±1以内、または±0.5以内のアミノ酸間の置換。

【0118】

一方、類似の親水性値を有するアミノ酸間の置換が、同等の生物学的活性を有するタンパク質を誘導し得ることも周知である。米国特許第4,554,101号に示されているように、以下の親水性値がアミノ酸残基の各々に割り当てられる：アルギニン(+3.0)；リジン(+3.0)；アスパラギン酸(+3.0±1)；グルタミン酸(+3.0±1)；セリン(+0.3)；アスパラギン(+0.2)；グルタミン(+0.2)；グリシン(0)；スレオニン(-0.4)；プロリン(-0.5±1)；アラニン(-0.5)；ヒスチジン(-0.5)；システイン(-1.0)；メチオニン(-1.3)；バリン(-1.5)；ロイシン(-1.8)；イソロイシン(-1.8)；チロシン(-2.3)；フェニルアラニン(-2.5)；トリプトファン(-3.4)。

10

【0119】

親水性値を参照することにより1つまたは複数の変異を導入する場合では、親水性値の差が±2以内、±1以内、または±0.5以内のアミノ酸間の置換が行われ得るが、これらに限定されない。

【0120】

全体として分子の活性化を変更しないタンパク質のアミノ酸交換は、対応する分野において報告されている(H. Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。最も一般的に起こる交換は、Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thy/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/GluおよびAsp/Glyを含むアミノ酸残基間の交換である。ベクター系は、対応する業界で公表されている多様な方法によって構築することができる。具体的な方法は、Sambrook et al. (2001), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Pressに記載されている。

20

【0121】

本明細書に開示されるベクターは、クローニングのためまたは発現のための典型的なベクターとして構築することができる。加えて、ベクターは宿主として原核細胞または真核細胞を用いて構築することができる。ベクターが発現ベクターであり、宿主として原核細胞を使用する場合、転写を実行するための強力なプロモーター（例えば、tacプロモーター、lacプロモーター、lacUV5プロモーター、lppプロモーター、pLXプロモーター、pRXプロモーター、rac5プロモーター、ampプロモーター、recAプロモーター、SP6プロモーター、trpプロモーターおよびT7プロモーターなど）、解読開始のためのリボソーム結合部位および転写／解読終結配列を含むことが一般的である。宿主細胞としてE. coli（例えば、HB101、BL21、DH5aなど）を使用する場合、E. coliのトリプトファン生合成経路のプロモーターおよびオペレーター部位(Yanofsky, C. (1984), J. Bacteriol., 158: 1018-1024)およびファージXの左方向のプロモーター(pLXプロモーター、Herskowitz, I. and Hagen, D. (1980), Ann. Rev. Genet., 14: 399-445)を対照部位として使用することができる。

30

40

【0122】

一方、使用され得るベクターは、ウイルスベクター、線状DNA、またはプラスミドDNAなど、1種類より多くてもよい。

【0123】

「ウイルスベクター」とは、遺伝子または遺伝物質を所望の細胞、組織および／または臓器に送達することができるウイルスベクターを指す。

50

【0124】

ウイルスベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、HIV（ヒト免疫不全ウイルス）、MLV（マウス白血病ウイルス）、ASLV（トリ肉腫／白血症）、SNV（脾臓壊死ウイルス）、RSV（ラウス肉腫ウイルス）、MMTV（マウス乳腺腫瘍ウイルス）および単純ヘルペスウイルスから構成される群から1つの種より多くを含み得るが、これらに限定されない。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、または単純ヘルペスウイルスベクターであり得る。

【0125】

レトロウイルスは宿主細胞のゲノムに対する組み込み機能を有し、人体には無害であるが、組み込み時点の正常細胞の機能の抑制、多様な範囲の細胞を感染させる能力、増殖の容易性、約1～7 kbの外部遺伝子の収容、および重複欠損ウイルスの生成を含む特徴を有し得る。しかしながら、レトロウイルスはまた、有糸分裂後の細胞への感染の困難性、*in vivo*条件下での遺伝子導入の困難性、および*in vitro*条件下で体細胞を増殖させる必要性を含む不都合な点も有し得る。加えて、レトロウイルスは、がん原遺伝子に組み込まれ得るため、自然変異のリスクを有し、それによって細胞が壊死する可能性を示す。

【0126】

一方、アデノウイルスは、クローニングベクターとして、中レベルのサイズの細胞核内でも複製すること、臨床的に無毒であること、外部遺伝子が挿入されても安定であること、遺伝子の再配列または喪失がないこと、真核生物の形質転換、および宿主細胞の染色体に組み込まれても高レベルで安定して発現することを含む様々な利点を有する。アデノウイルスの良好な宿主細胞は、ヒトにおける造血、リンパおよび骨髄腫の原因となる細胞である。しかしながら、それは線状DNAであるため増殖が難しく、ウイルスの感染率が低いことに加えて、感染したウイルスを回収することが容易ではない。加えて、送達された遺伝子の発現は1～2週間の間で最も広範囲であり、3～4週間にわたって一部の細胞でのみ発現が持続する。別の問題は、それが高い免疫抗原性を有することである。

【0127】

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、前記の問題を補うことができ、遺伝子治療剤として多くの利点を有するため、近年好まれている。これはアデノサテライトウイルスとも呼ばれる。アデノ随伴ウイルス粒子の直径は20 nmであり、人体への害をほとんど有しないことが知られている。そのため、欧州では遺伝子治療剤としてその販売が承認された。

【0128】

AAVは複製に補助ウイルスを必要とする一本鎖を有するプロウイルスであり、AAVゲノムは、感染細胞の第19染色体の特定の領域に挿入され得る4,680 bpを有する。導入遺伝子は、各々145 bpを有する2つの逆位末端反復（ITR）配列部分およびシグナル配列部分によって連結された血漿DNAに挿入される。トランスフェクションは、AAV repおよびcap部分を発現する他のプラスミドDNAとともに行われ、補助ウイルスとしてアデノウイルスが加えられる。AAVは、遺伝子を送達する宿主細胞の範囲が広く、反復投与時の免疫学的副作用が少なく、遺伝子発現期間が長いという利点を有する。さらに、AAVゲノムは宿主細胞の染色体に組み込まれても安全であり、宿主の遺伝子発現を変更または再配列しない。

【0129】

アデノ随伴ウイルスは合計で4つの血清型を有することが知られている。標的遺伝子の送達に使用され得る多くのアデノ随伴ウイルスの血清型の中で、最も広範に研究されているベクターはアデノ随伴ウイルス血清型2であり、嚢胞性線維症、血友病およびカナバン病の臨床遺伝子の送達に現在使用されている。加えて、近年、組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）の潜在力が、がん遺伝子治療の分野において高まっている（Du 2013）。一部の実施形態では、アデノ随伴ウイルス血清型2を使用することができる。適切なウイルスベクターを選択して適用することが可能であるが、これに限定されない。

【0130】

加えて、ベクターが発現ベクターであり、宿主として真核細胞を使用する場合、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（例えば、ポストアデノウイルスプロモーター、ワクチンウイルス（vaccine virus）7.5 Kプロモーター、SV40プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーターおよびHSV TKプロモーター）を使用することができる。具体的には、それは、レトロウイルスのLTR、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、MTプロモーター、EF-1アルファプロモーター、UB6プロモーター、ニワトリベーターアクチンプロモーター、CAGプロモーター、RPE65プロモーターおよびオプシンプロモーターから構成される群から選択されるプロモーターから構成される群から選択される1つの種より多くを含むことができるが、これらに限定されない。さらに、それは、一般に転写終結配列としてポリアデニル化配列を有する。

10

【0131】

本明細書に開示されるベクターは、タンパク質の精製を容易にするために、必要に応じて他の配列と融合させることができる。例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（Pharmacia、USA）、マルトース結合タンパク質（NEB、USA）、FLAG（IBI、USA）および6×His（ヘキサヒスチジン；Qiagen、USA）などの融合配列を使用することができるが、これらに限定されない。加えて、発現ベクターは、例として、アンピシリン、ゲンタマイシン、カルベニシリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、カナマイシン、ジェネティシン、ネオマイシンおよびテトラサイクリンを含む選択マーカーとして、対応する産業において一般的に使用される抗生物質に対する耐性遺伝子を含むことができる。

20

【0132】

加えて、本明細書に開示されるのは、miR-142-3pおよび／またはmiR-142-5pなどのmiR-142に対する標的配列（miR-142-3pTおよび／またはmiR-142-5pT）をそれぞれ含有する組換えベクターを含む遺伝子担体である。

【0133】

「遺伝子移入」という用語は、一般に転写および発現のための遺伝物質の細胞への送達を含む。その方法はタンパク質の発現および処置目的に理想的である。DNAトランスフェクションおよびウイルス形質導入などの多様な送達方法が公表されている。これは、高い送達効率および送達された遺伝子の高い発現レベルにより、特定の受容体および／または細胞型を標的とする可能性、ならびに必要なに応じて自然適合性またはシュードタイプ化に起因するウイルス媒介性の遺伝子移入を意味する。

30

【0134】

遺伝子担体は、組換えベクターに形質転換された形質転換実体であり得、形質転換は、有機実体、細胞、組織または臓器に核酸を導入する全ての方法を含み、対応する分野で公表されているように、宿主細胞に応じて適切な標準技術を選択して実行することが可能である。このような方法としては、電気穿孔、原形質の融合、リン酸カルシウム（CaPO₄）沈降、塩化カルシウム（CaCl₂）沈降、炭化ケイ素（silicone carbide）繊維の使用との混合、アグリバクテリア（agribacteria）媒介性の形質転換、PEG、硫酸デキストランおよびリポフェクタミンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0135】

遺伝子担体は、ニューロンにおける異種遺伝子の発現の目的のためである。そのため、これは、CD45由来の細胞における異種遺伝子の発現を抑制し、脳組織における異種遺伝子の発現を増加させることができる。CD45の大部分は造血細胞に存在する膜貫通タンパク質チロシンホスファターゼである。細胞は細胞表面に存在する分子に応じて定義することができ、CD45は全ての白血球群およびBリンパ球に対する細胞マーカーである。遺伝子担体はCD45由来の細胞、特にリンパ系および白血球の範囲の細胞では発現し

50

ない。

【0136】

遺伝子担体は、薬理学的に使用することが許可された担体、添加剤または希釈剤をさらに含み得る。

【0137】

加えて、本明細書に開示されるのは、組換えベクターを対応する実体に導入する段階を含む、ニューロンに異種遺伝子を送達し、発現させる方法である。

【0138】

本明細書に開示される送達方法は、大脳組織における異種遺伝子の発現を増加させ、他の組織における異種遺伝子の発現を制御することができる。

【0139】

加えて、本明細書に開示されるのは、1) プロモーター；2) 作動可能にプロモーターと連結した標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列；および3) ヌクレオチド配列の3' UTRに挿入されたmiR-142-3pを標的とするヌクレオチド配列を含む発現カセットを含むベクターである。一部の実施形態では、ベクターは、1) プロモーター；2) 作動可能にプロモーターと連結した標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列；および3) ヌクレオチド配列の3' UTRに挿入されたmiR-142-5pを標的とするヌクレオチド配列を含む発現カセットを含み得る。

【0140】

「発現カセット」という用語は、標的タンパク質をコードする遺伝子、ならびにプロモーターおよびシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むため、シグナルペプチドの下流と作動可能に連結した標的タンパク質の産生および分泌のための発現を実行することができる単位カセットを指す。分泌発現カセットを分泌系と混合して使用することができる。標的タンパク質の効率的な産生を支援することができる多様な因子をこのような発現カセット内および外に含めることができる。

【0141】

加えて、本明細書に開示されるのは、エクソン2が欠損したAIMP-2スプライシングバリエーションをコードするヌクレオチド配列、およびヌクレオチド配列の3' UTRに連結したmiR-142-3pを標的とするヌクレオチド配列を含む、網膜変性疾患のための予防用または治療用製剤である。

【0142】

したがって、また、本明細書に開示されるのは、網膜変性疾患を処置することを必要とする対象における網膜変性疾患を処置する方法であって、本明細書に開示されるベクターのいずれかを投与することを含む、方法である。一部の実施形態では、網膜変性疾患はAMDを含まない。AMDは、湿性AMDであり得る (can be is)。一部の実施形態では、AMDは乾性AMDである。

【0143】

本明細書に開示されるベクターは、限定されないが、アポトーシス阻害、ジスキネジア改善、および／または酸化ストレス阻害に影響を及ぼし得るので、網膜変性疾患を予防または処置することができる。

【0144】

「処置」という用語は、網膜変性疾患の完全な処置だけでなく、本明細書に開示される薬理学的薬剤の適用の結果として、AMDの全体的な症状の部分的な処置、好転および／または軽減も含む。

【0145】

「予防」という用語は、本明細書に開示される薬理学的薬剤を、大脳変性障害を有する実体に適用することにより、認知障害、行動障害および脳神経の破壊などの症状または現象を抑制または遮断することによって、事前の網膜変性疾患の全体の症状の発生の予防を意味する。

【0146】

10

20

30

40

50

有効成分以外のアジュバントが、本明細書に開示される薬理学的薬剤に加えて含まれてもよい。任意のアジュバントを、対応する技術分野で公知である限り、制限なく使用することができるが、例えば、フロイントの完全アジュバントおよび不完全アジュバントをさらに含めることにより免疫性を増加させることが可能である。

【0147】

本明細書に開示される薬理学的薬剤は、有効成分を薬理学的に許容される担体と混合した形式で製造することができる。ここで、薬理学的に許容される担体は、薬理学の分野で一般的に使用される担体、添加剤および希釈剤を含む。本明細書に開示される薬理学的薬剤に使用され得る薬理学的に許容される担体としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マリトール (malitol)、デンプン、アカシアゴム、アルギネート、ゼラチン、リン酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、セルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、水、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウムおよび鉱物油が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0148】

本明細書に開示される薬理学的薬剤は、それぞれの一般的な製造方法に従って、粉剤・散剤 (powder)、顆粒剤、丸剤、カプセル剤、懸濁化液剤、乳剤、シロップ剤およびエアゾール剤などのような経口投与型、ならびに外用、坐薬または消毒注射液剤などを含む様々な形式で製造することによって使用することができる。

【0149】

20

製剤に製造する場合、一般的に使用される充填剤、増量剤、結合剤、保湿剤、崩壊剤および界面活性剤などの希釈剤または添加剤が、製造する際に使用され得る。経口投与用の固形製剤としては、丸剤、錠剤、粉剤・散剤、顆粒剤およびカプセル製剤が挙げられ、このような固形製剤は、デンプン、炭酸カルシウム、スクロース、ラクトースおよびゼラチンなどの1つより多い添加剤を有効成分と混合することによって製造され得る。加えて、ステアリン酸マグネシウムおよびタルクなどの滑沢剤も、単純な添加剤に加えて使用され得る。経口投与用の液体製剤としては、一般的に使用される希釈剤である水および流動パラフィン以外に、保湿剤、甘味剤、矯味矯臭剤および防腐剤などのような様々な添加剤を含有させた、懸濁化液剤、内服用溶液、油剤およびシロップ剤などが挙げられる。非経口投与用製剤としては、滅菌水性液剤、非水性溶媒、懸濁剤、油剤、凍結乾燥剤および坐剤が挙げられる。プロピレングリコール、ポリエチレングリコールおよびオリーブ油などの植物油、ならびにエチレートなどの注射用エステルが、非水性溶媒および懸濁溶液として使用され得る。坐剤用の剤としては、ウイテプゾール、tween 61、カカオ脂、ラウリン油およびグリセロゼラチンなどを挙げるができる。

30

【0150】

本明細書に開示される薬理学的薬剤は、多様なチャネルを介して実体に投与することができる。経口投与、ならびに静脈注射、筋肉注射、皮下注射および腹腔内注射などの全ての投与形式を使用することができる。

【0151】

一部の実施形態では、組換えベクターは、対象に局所的に、硝子体内注射によって、結膜下注射によって、対象の網膜下腔にまたは網膜下腔内に投与される。

40

【0152】

本明細書に開示される方法は、対象に追加の治療剤を投与することをさらに含み得る。一部の実施形態では、追加の治療剤は、ラニビズマブ、アフリベルセプト、および／またはベバシズマブである。

【0153】

本明細書に開示される治療剤の望ましい投与用量は、製剤の製造方法、投与形式、患者の年齢、体重および性別、疾患の症状の程度、食物、投与期間、投与経路、排出速度ならびに反応感度などを含む様々な要因に応じて異なる。それにもかかわらず、これは対応する製造業者によって適切に選択され得る。

50

【0154】

さらに、処置効果のために、熟練した医師は、目標とする処置のための有効用量を決定し、処方することができる。例えば、処置経路としては、網膜下注射、硝子体内注射、静脈内注射、皮下注射および筋肉注射、ならびにマイクロニードルを使用することによる眼、脳室または脊髄への方向注射 (direction injection) を挙げることができるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、眼当たりの用量は、 $1 \times 10^8 \text{ v g}$ (ウイルスゲノム) $\sim 1 \times 10^{11} \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^8 \text{ v g} \sim 1 \times 10^{10} \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^8 \text{ v g} \sim 1 \times 10^9 \text{ v g}$ 、およびそれらの中の任意の特定の用量または用量の範囲、例えば、 $2 \times 10^8 \text{ v g} \sim 5 \times 10^8 \text{ v g}$ 、 $2 \times 10^9 \text{ v g} \sim 4 \times 10^{10} \text{ v g}$ 、 $4 \times 10^8 \text{ v g} \sim 6 \times 10^{10} \text{ v g}$ 、 $5 \times 10^8 \text{ v g} \sim 4 \times 10^{10} \text{ v g}$ 、 $5 \times 10^8 \text{ v g} \sim 1 \times 10^{11} \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^9 \text{ v g} \sim 5 \times 10^{10} \text{ v g}$ 、 $2 \times 10^9 \text{ v g} \sim 1 \times 10^{10} \text{ v g}$ 、 $5 \times 10^9 \text{ v g} \sim 1 \times 10^{10} \text{ v g}$ 、または $5 \times 10^9 \text{ v g} \sim 8 \times 10^{10} \text{ v g}$ であり得る。1日当たり複数回の注射および反復投与が可能であり、例えば、有効用量は、例えば、眼当たり、ベクターの場合、 $0.05 \sim 15 \text{ mg/k g}$ 、組換えウイルスの場合、 $5 \times 10^{11} \sim 3.3 \times 10^{14}$ ウイルス粒子 ($2.5 \times 10^{12} \sim 1.5 \times 10^{16} \text{ IU}$) $/\text{ k g}$ 、および細胞では $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^7$ 細胞 $/\text{ k g}$ であり得る。望ましくは、用量は、1週間当たり2～3回の投与の割合で、ベクターの場合、 $0.1 \sim 10 \text{ mg/k g}$ 、組換えウイルスの場合、 $5 \times 10^{12} \sim 3.3 \times 10^{13}$ 粒子 ($2.5 \times 10^{13} \sim 1.5 \times 10^{15} \text{ IU}$) $/\text{ k g}$ 、および細胞の場合、 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$ 細胞 $/\text{ k g}$ である。用量は厳密に制限されない。むしろ、用量は患者の状態および神経障害の発現の程度に応じて変更することができる。他の皮下脂肪および筋肉注射、ならびに患部への直接投与 (direct administration) に対する有効用量は、10 cmの間隔で1週間当たり2～3回の割合で、 $9 \times 10^{10} \sim 3.3 \times 10^{14}$ 組換えウイルス粒子である。用量は厳密に制限されない。むしろ、用量は患者の状態および神経障害の発現の程度に応じて変更することができる。より具体的には、本明細書に開示される薬理学的薬剤は、 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12} \text{ v g}$ (ウイルスゲノム) $/\text{ mL}$ の組換えアデノ随伴ウイルスを含むことができ、一般に、これは $1 \times 10^{12} \text{ v g}$ を2週間にわたって2日に1回注射することが望ましい。これは、1日1回または1日を通して数回の投与のために用量を分割して投与されてもよい。一部の実施形態では、ベクターは、 $0.1 \times 10^8 \text{ v g} \sim 500 \times 10^8 \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^8 \text{ v g} \sim 100 \times 10^8 \text{ v g}$ 、 $1 \times 10^8 \text{ v g} \sim 10 \times 10^8 \text{ v g}$ 、例えば、 $5 \times 10^8 \text{ v g}$ 、またはそれらに由来する任意の特定の量もしくは範囲の用量で投与されてもよい。IV注射の場合、例えば、v gは、IV注射のために体重に基づいてヒトに対する用量に換算され得る。局所組織注射の場合、例えば、v gはまた、標的細胞数および有効MOI (感染多重度) に基づいてヒトに対する用量に換算され得る。

【0155】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるベクターは、例えば、網膜下注射、硝子体内注射、または脈絡膜下注射によって対象に注射され得る。注射は液体の形態であってもよい。他の実施形態では、本明細書に開示されるベクターは、点眼剤または軟膏剤の形態で対象に投与され得る。

【0156】

ベクターなどのAIMP2-DX2を含む核酸分子は、当該技術分野で周知の方法によって送達され得る。AIMP2-DX2を含む核酸分子はまた、必要に応じて他の遺伝子または核酸送達のツールまたは材料と組み合わせられてもよい。送達方法としては、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクター；Galnacとの化学的コンジュゲーション、細胞透過性ペプチド、核酸もしくは糖ペプチド媒介ツール、または合成化合物ベクター；脂質ナノ粒子カプセル化などの脂質媒介送達；無機ベクターなどの無機ベクター媒介送達；エクソソーム媒介送達などの生物学的送達；マイクロ／ナノニードル、圧力灌流、マイクロプロジェクトイル、電気エネルギー／電気穿孔／イオントフォレーシス、ソノポレーション、マグネトポレーション、またはオプトポレーション／光学的エネルギーなどの物理的送達を挙げることができるが、これらに限定されない。

【0157】

薬理学的製剤は、多様な経口および非経口投与可能な形式で製造することができる。一部の実施形態では、本明細書に開示されるベクターは、脳または脊髄に投与することができる。一部の実施形態では、本明細書に開示されるベクターは、定位注射によって脳に投与することができる。

【0158】

経口投与薬剤としては、丸剤、錠剤、硬および軟カプセル剤、液剤 (liquid)、懸濁化液剤 (suspended solution)、油剤、シロップ剤および顆粒剤などが挙げられる。これらの薬剤は、有効成分に加えて、希釈剤 (例えば、ラクトース、デキストロース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、セルロースおよび／またはグリシン) および滑沢剤 (glident) (例えば、シリカ、タルク、ならびにステアリン酸およびそのマグネシウム塩もしくはカルシウム塩、ならびに／またはポリエチレングリコール) を含み得る。加えて、丸剤は、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、デンプンペースト、ゼラチン、トラガカンチン (tragacanthin)、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよび／またはポリビニルピロリジンなどの結合剤を含有し得、状況に応じて、デンプン、寒天、アルギン酸もしくはそのナトリウム塩または類似の混合物などの崩壊剤、ならびに／あるいは吸収剤、着色剤、矯味矯臭剤および甘味剤を含有し得る。薬剤は、一般的な混合法、造粒法またはコーティング法によって製造することができる。

【0159】

加えて、注射剤が非経口投与製剤の代表的な形態である。このような注射剤のための溶媒としては、水、リンゲル液、等張生理食塩水および懸濁液が挙げられる。注射剤の滅菌固定油は、溶媒または懸濁媒体として使用することができ、モノグリセリドおよびジグリセリドを含む任意の非刺激性固定油を、このような目的に使用することができる。加えて、注射剤は、オレイン酸などの脂肪酸を使用することもできる。

【0160】

以下の実施例を使用することにより本発明をより詳細に説明する。しかしながら、以下の実施例は、本発明の内容を特定する目的のためだけであり、本発明の適用をこのような実施例に限定するものではない。

【実施例】

【0161】

(実施例1)

組換えベクターの作製

CD45の大部分は造血細胞の膜貫通タンパク質チロシンホスファターゼであり、これは細胞表面上の分子に従って細胞を定義するために使用され得る。CD45は全ての白血球群およびBリンパ球に対するマーカーである。CD45由来の細胞、特にリンパ系細胞および白血球細胞において発現することなく、ニューロンにおいて特異的かつ唯一に発現する組換えベクターを作製した。この組換えベクターは、アミノアシル-tRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質2 (AIMP2) のエクソン2が欠失したスプライシングバリエーション、およびAIMP2スプライシングバリエーションの発現を制御することができるmiRNAを含む。

【0162】

注射したニューロン組織においてAIMP2スプライシングバリエーションの特異的発現を誘導するために、分布安全対策として組換えベクターを作製した。また、これは、AIMP2-DX2が、注射した組織領域における非ニューロン細胞の主要な集団である造血細胞において発現するあらゆる可能性を完全に遮断するために行った。

(実施例1-1)

AIMP2バリエーションの作製

【0163】

AIMP2は、アミノアシル-tRNA合成酵素 (ARS) の形成に関与するタンパク質の1つであり、多因子アポトーシスタンパク質として機能する。AIMP2のエクソン

2 が欠失したバリエーションを発見するプラスミドを構築するために、A I M P 2 スプライシングバリエーションの c D N A を p c D N A 3 . 1 - m y c にクローニングした。p c D N A 3 . 1 - m y c へのサブクローニングは、H 3 2 2 c D N A に E c o R 1 および X h o 1 リンカーを取り付けたプライマーを使用することにより A I M P 2 スプライシングバリエーションを増幅した後、E c o R 1 および X h o 1 を使用することにより実行した。

【0164】

配列番号1のヌクレオチド配列および配列番号2のアミノ酸配列を有するA I M P 2 バリエーションを使用した。

(実施例1-2)

m i R N A の選別およびその標的配列の選択

10

【0165】

上述したように、分布安全対策として、A I M P 2 バリエーションの発現を注射したニューロン細胞内に限定し、A I M P 2 - D X 2 が注射した組織領域における非ニューロン細胞の主要集団である造血細胞において発現する可能性を完全に遮断するために、上記のように組換えベクターを作製した。

【0166】

この目的のために、白血球およびリンパ系関連細胞を生成する造血細胞においてのみ特異的に発現する m i R - 1 4 2 - 3 p を標的として選択した。m i R - 1 4 2 - 3 p のみを標的とする配列を作製するために、マウス B 細胞のマイクロアレイデータおよび m i R - 1 4 2 - 3 p が標的とする遺伝子のコンピュータプログラミング (m i r S V R スコア) を使用した。m i R - 1 4 2 - 3 p は、配列番号で示したヌクレオチド配列である。配列番号5の m i R - 1 4 2 - 3 p 標的配列は m i R - 1 4 2 - 3 p に結合する。

20

【0167】

m i R - 1 4 2 - 3 p 標的配列は、N h e 1 および H i n d I I I 、B m t 1 部位配列 (c c a g a a g c t t g c t a g c ; 配列番号21) および H i n d H 部位配列 (a a g c t t g t a g ; 配列番号22) を含む。m i R - 1 4 2 - 3 p T は、4 回反復した配列番号5のヌクレオチド配列を含むことができ、それらのヌクレオチド配列はリンカー (t c a c および g a t a t c) で連結されている (図4 ; 配列番号6) 。

(実施例1-3)

組換えベクターの作製

30

【0168】

組換えベクターを作製するために、m i R - 1 4 2 - 3 p 標的配列 (配列番号5) を A I M P 2 バリエーション (配列番号1) の 3 ' U T R に挿入した。A I M P - 2 バリエーションおよび m i R - 1 4 2 - 3 p 標的配列の連結は塩基配列番号6で示され、具体的には、N h e I および H i n d I I I 部位を使用することによって切断し、挿入した。組換えベクターを図1に示す。

(実施例1-4)

i n v i t r o における組換えベクターの神経細胞特異的発現の確認

【0169】

m i R 1 4 2 - 3 p は造血細胞においてのみ特異的に発現しているため、組換えベクターの m i R 1 4 2 - 3 p 標的配列の発現に応じた A I M P 2 バリエーションのノックダウンに従って、特定の細胞において A I M P 2 バリエーションの発現の程度を確認した。

40

【0170】

具体的には、組換えベクターの未処置群 (S H A M) 、空 / 対照ベクター処理群 (N C ベクター) 、単一 A I M P 2 バリエーションベクター処理群 (p s c A A V _ D X 2) 、および組換えベクターで処置した群 (p s c A A V - D X 2 - m i R 1 4 2 - 3 p T) が存在した。全てのベクターの濃度は u g / u l の単位であり、各群は 2 . 5 u l (2 . 5 u g) で処置した。処置群の各々において、A I M P 2 バリエーションのノックダウンを確認しながら、T H P - 1 細胞株 (ヒト白血病単球細胞) および S H - S Y 5 Y 細胞株 (神経芽細胞腫) に対して処置を行った。q P C R は、以下の表1のプライマーを使用することによ

50

り実行した（１５秒間の変性、ならびに３０秒間６０℃の温度下での４０サイクルにわたるアニーリングおよび伸長）。

【表１】

表１

AIMP2 バリエント	プライマー	配列番号
フォワード	CTGGCCACGTGCAGGATTACGGGG (ヒトのみ)	8
リバーズ	AAGTGAATCCCAGCTGATAG (ヒトのみ)	9

10

【０１７１】

結果として、SHAMおよびNCベクター群ではAIMP2バリエントが発現していないことが確認された。加えて、単一のAIMP2バリエントベクター処理群（pscAAV-DX2）のTHP-1細胞株およびSH-SY5Y細胞株の両方において発現が存在したことが確認され、これにより神経細胞特異的発現が誘導されないことが確認された。他方で、組換えベクターで処置した群では、SH-SY5Y細胞株においてのみAIMP2バリエントが特異的に発現することが確認された（図２）。

（実施例１－５）

材料および方法

（実施例１－５－１）

qRT-PCR

【０１７２】

製造業者のプロトコールに従ってTRIzol（Invitrogen、Waltham、MA、USA）を使用して脊髄から全RNAを単離した。抽出したRNAは、定量のために分光光度計（ASP-2680、ACTgene、USA）によって定量した。cDNAを作製するために、製造業者のプロトコールに従って、SuperScript II First-Strand（Invitrogen）を使用して逆転写を実施した。得られたcDNAを、SYBR green PCR master mix（ThermoFisher Scientific、USA）を使用したリアルタイムPCRのために使用した。重複した結果の発現データを2-ΔΔCt統計解析のために使用し、GADPH発現を正規化のために使用した。

30

（実施例１－５－２）

miR142-3p阻害実験

【０１７３】

DX2発現に対するmiR-142-3pの阻害は、×1 miR-142-3p標的配列から観察することができた。HEK293細胞に、×1、×2、および×3の反復miR-142-3p標的配列ベクターを一過性にトランスフェクトし、また、リポフェクタミン2000（Invitrogen、US）を使用して100pmolのmiR-142-3pを一過性にトランスフェクトし、次いで48時間インキュベートした。DX2 mRNAの量をPCRにより解析した。DX2発現に対するmiR142-3pの阻害が、Tseq ×1の反復miR142-3p標的seqから観察された（図4B）。

40

（実施例１－６）

コア結合配列の阻害効果のために生成された３種類のベクター

【０１７４】

Tseq ×1は１つのコア結合配列を含み、Tseq ×2は２つのコア結合配列を含み、Tseq ×3は３つのコア結合配列を含む（図4A）。

【０１７５】

DX2発現に対するmiR142-3p（100pmol）の阻害は、×1の反復miR142-3p標的配列から観察され始めた。HEK293細胞に、×1、×2、および

50

×3の反復miR-142-3p T seqベクターを一過性にトランスフェクトし、また、リポフェクタミン2000 (invitrogen、US)を使用して100 pmolのmiR-142-3pを一過性にトランスフェクトし、次いで48時間インキュベートした。DX2 mRNAの量をPCRにより解析した。miR142-3p 標的 seqにおけるコア結合配列の数が増加すると、DX2発現に対するmiR142-3pの阻害も増加した。ベクターを含むT seq ×3 コア配列は有意な阻害を示した(図4B)。

(実施例1-7)

コア配列変異。

【0176】

マウスB細胞マイクロアレイデータおよびmiR-142-3p 標的遺伝子のmirSVRスコアを使用して、コア配列を予測した。コア配列の4つの領域を以下のように置換した：(5'-AACACTAC-3'→5'-CCACTGCA-3') (元の配列については図3を、概略図については図4Aを参照のこと)。

(実施例1-8)

コア結合配列はDX2阻害に重要である

【0177】

4つのコア配列を置換した(図4A)。HEK293細胞に、DX2-miR-142-3p T seq ×3の反復ベクター(T seq 3×)またはコア配列変異ベクター(mut)を一過性にトランスフェクトし、リポフェクタミン2000 (Invitrogen、US)を使用することにより100 pmolのmiR-142-3pを一過性にトランスフェクトし、次いで48時間インキュベートした。DX2 mRNAの発現をPCRにより解析した。DX2の有意な阻害を示したT seq ×3の反復ベクター(図4B)およびDX2構築物を対照として使用した。100 pmolのmiR142-3p処置により、T seq ×3ベクターは有意に阻害されたが、DX2およびmut配列は阻害されなかった(図5)。

(実施例2)

RP(網膜色素変性症)の処置

【0178】

RP(網膜色素変性症)を処置するための安全で特異的な標的の可能性を調べるために、細胞死を阻害するための標的としてAIMP2を検討した。AIMP2の蓄積は、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ-1(PARP-1)の活性化、およびそれに続くニューロンの変性をもたらす：DX2は、PARP-1へのAIMP2結合の競合阻害によりAIMP2のアポトーシス促進活性を損なう。

【0179】

酵素ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ-1(PARP-1)は、ポリ(ADP-リボース)(PAR)合成を担う17のメンバーを含むPARPファミリー(ADPRT、PARS、ARTとも呼ばれる)の中で最も研究されているメンバーである。Kim JH et al. (2014)。PARP酵素はDNA修復に関与しており、それらは一本鎖DNAおよび二本鎖DNAの切断によって活性化される。DNA修復へのそれらの関与は、PARP酵素自体または修復プロセスに関与する他のタンパク質へのPAR鎖の付加(本明細書においてPAR化と呼ばれる)を必要とするようである。Kim JH et al. (2014)。加えて、PARP-1の異常な活性化は、脳卒中、外傷、糖尿病およびパーキンソン病などの病的過程に関与しており(Ko HS et al. (2005); Corti O. et al. (2003); Ko HS et al. (2010))、このようなまたは類似の状況において、PARの過剰な蓄積は、特徴的なタイプの細胞死であるパータナトス(parthanatos)を引き起こし得る。Narne P et al. (2017); およびMao K et al. (2022)。この文脈において、過剰なPAR化によってアポトーシス誘導因子(AIF)がミトコンドリアから核に再配置され得、さらなる迅速なDNA脱断片化および細胞死が起こる。Hone SJ et al. (2004); Narne P et al. (2017); Mao K et al. (2022); Szabo C et al. (1996); Virag L et al. (1988)。過剰なPARP活性はまた、RP

についてのいくつかのラットおよびマウスモデルにおける光受容体細胞死においても見られ、これは変性光受容体細胞におけるPAR化のレベルを増加させる。Sahaboglu A et al. (2017)。

【0180】

したがって、PARP-1の過剰活性化におけるAIMP2の機能を阻害するDX2の有効性を試験した。まず、DX2がAIMP2の競合的阻害剤であり、ニューロン細胞死を調節するかどうかを調べるために、SH-SY5Y細胞に、PARP-1、AIMP2、およびDX2発現プラスミドを共トランスフェクトし、PARP-1を免疫沈降させた。図7Aに示すように、DX2はAIMP2よりも強くPARP-1に結合する。

【0181】

細胞内のDX2タンパク質レベルがPARP-1およびAIMP2の結合に影響を及ぼすかどうかを判定するために、免疫沈降解析の前に、DX2過剰発現プラスミド（図7B）またはDX2 siRNA（図7C）を神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞にトランスフェクトした。このアッセイでは、SH-SY5Y細胞にビヒクル（Con）またはDX2発現（DX2）プラスミドをトランスフェクトし、24時間インキュベートし、溶解した。次いで、細胞溶解物をプロテインアガロースビーズとインキュベートして、PARP-1と結合したAIMP2を免疫沈降させ、免疫プロット解析によって解析した（図7B）。同様に、免疫沈降および免疫プロット解析の前に、DX2 siRNA（DX2）および対照siRNA（Con）をSH-SY5Y細胞にトランスフェクトし、48時間インキュベートした（図7C）。

【0182】

DX2を過剰発現させた細胞では、PARP-1へのAIMP2の結合量が減少したが（図7B）、DX2をノックダウンした細胞では、PARP-1へのAIMP2の結合量が増加し（図7C）、DX2の発現がPARP1とAIMP2との相互作用に重要な役割を果たしていることが示唆された。

【0183】

酸化ストレスの条件下で、DX2がPARP-1の切断（例えば、PARP-1の活性化）を調節するメカニズムを解明するために、AIMP2およびDX2の結合親和性を評価した。AIMP2および／またはDX2発現ベクターをHEK293細胞に導入した。細胞を24時間インキュベートし、溶解し、免疫沈降を実施した。

【0184】

AIMP2を単独で発現させると、AIMP2ホモ二量体の形成が観察された。しかしながら、DX2ホモ二量体の量は、AIMP2-AIMP2ホモ二量体またはAIMP2-DX2ヘテロ二量体と比較して有意に低かった（図7D～7E、左上のパネルの第3のレーン）。まとめると、これらの観察により、DX2はAIMP2に結合することを優先し、AIMP2誘導性細胞死を阻害することが示唆される。

【0185】

PAR化は翻訳後プロセスであり、DNA損傷応答およびアポトーシスなどの生物学的事象を調節する。Szabo C et al. (1996)およびVirag I et al. (1998)。PARP-1は核内で損傷したDNAを認識し、PAR鎖を形成し、PAR化を通じて損傷したタンパク質の分解および細胞死を誘発する酵素である。AIMP2またはDX2が酸化ストレス条件下でPARP-1の活性化（例えば、PARP-1の切断）およびPAR化にどのように影響するかを評価するために、SH-SY5Y細胞に、空ベクター（EV）、AIMP2、またはDX2を発現するベクターをトランスフェクトし、次いで過酸化水素（H₂O₂）で4時間処理した。次いで細胞を溶解し、活性化したPARP-1タンパク質レベルの量（図7F）およびPAR化（図7G）をウェスタンブロット解析により評価した。

【0186】

AIMP2をトランスフェクトした細胞は、酸化ストレス条件下で他をトランスフェクトした細胞において見られた発現と比較して有意に増加したPARP-1の切断を示した

10

20

30

40

50

。しかしながら、PARP-1の切断はDX2をトランスフェクトした細胞では観察されなかった（図7F）。AIMP2のPAR化はH₂O₂の存在下で増加したが、DX2のPAR化は変化しなかった（図7G）。

【0187】

AIMP2とDX2との間のタンパク質半減期を調べるために、シクロヘキシミド処理パルスチェイスアッセイを実施した。DX2は、*de novo*タンパク質合成の停止から4時間まで、全長AIMP2と同様の安定性を示した（図7H）。

【0188】

したがって、これらの結果は、DX2がニューロン細胞生存率にとって重要な因子であり、DX2の過剰発現が神経変性疾患におけるニューロン細胞死を低減できることを示している。

10

【0189】

観察されたように、DX2が不十分に発現すると、AIMP2はホモ二量体を形成し、PARP-1と相互作用し、PARP-1を活性化し、ニューロン細胞死を誘発する。しかしながら、DX2はAIMP2よりもPARP-1に対して有意に高い結合親和性を有するため、AIMP2とPARP-1との間の結合親和性はDX2発現細胞において減少し、それによってPARP-1の活性の阻害、およびニューロン細胞死の低減がもたらされる。したがって、DX2はAIMP2誘発PARP-1の活性化および細胞死における主要な調節タンパク質である（図7I）。

【0190】

まとめると、DX2は、PARP-1へのAIMP2の結合の競合的阻害により、AIMP2のアポトーシス促進活性を損なう。

20

（実施例3）

DX2はH₂O₂誘発ニューロン細胞死を減弱する。

【0191】

DX2が酸化ストレス誘発PARP-1の切断の阻害分子であるという上記の結果に基づいて、DX2がニューロン細胞の細胞死を抑制するかどうかの判定をさらに調査した。AIMP2およびDX2の過剰発現条件での細胞生存率を調べるために、AIMP2またはDX2発現プラスミドをN2A細胞（Neuro-2a、マウス神経芽細胞腫細胞系）に導入し、トランスフェクトした細胞を400 μMのH₂O₂と4時間インキュベートした。細胞死のレベルを判定するためにMTT解析を実施した。

30

【0192】

通常の条件では、AIMP2またはDX2の過剰発現は細胞生存率に影響を与えなかったが、H₂O₂処理条件では、細胞死はAIMP2の過剰発現によって有意に増加し、DX2の過剰発現によって低減した（図8A）。

【0193】

DX2またはAIMP2が、損傷誘発細胞死の条件において細胞生存率を制御するかどうかを試験するために、SH-SY5Y細胞に、EV、AIMP2およびDX2発現プラスミドを共トランスフェクトし、400 μMのH₂O₂で4時間処理した。細胞死を判定するためにMTT解析を実施した。AIMP2の発現を増加させた（1 μgから2 μg）場合でも、DX2の1 μgのトランスフェクションは、AIMP2/H₂O₂誘発細胞死を、DX2の2 μgのトランスフェクションと同様のレベルに抑制した（図8B）。対照的に、AIMP2の発現レベルは、DX2発現細胞の条件下（1 μgから2 μg）ではニューロン細胞死に有意な影響を与えることができず（図8B）、DX2発現細胞は酸化ストレス条件下で対照細胞と比較して細胞死が有意に低減した（図8C）。まとめると、DX2の抗アポトーシス効果は、2つのタンパク質の共存条件においてAIMP2によるアポトーシス誘導よりもはるかに強いようである。

40

（実施例4）

TRAF依存性経路：DX2は、TRAF2へのAIMP2の結合の競合的阻害により、AIMP2のTNF-α依存性のアポトーシス促進活性を損なう。

50

【0194】

DX2は、TRAF2へのAIMP2の結合の競合的阻害により、AIMP2のTNF- α 依存性のアポトーシス促進活性を損なう。

【0195】

眼の炎症は視力障害の一般的な原因である。Olivares-Gonzalez L et al. (2021)。これは、グリア細胞（ミクログリア、アストロサイト）の持続的な活性化および神経組織（脳、脊髄、または網膜）への他の免疫細胞の動員を伴う慢性炎症であると考えられている。Streit WJ (2004)。網膜および他の神経組織における常在自然免疫細胞であるミクログリア細胞は、炎症の潜在的な細胞調節因子である。Karlstetter M et al. (2015)。活性化したミクログリアおよびマクロファージは、網膜細胞（例えば、光受容体細胞）上にTNF- α およびIL-6などの炎症性メディエーターを分泌する。Murakami Y et al. (2019)。眼において、TNF- α は、炎症、浮腫、血管新生、および神経変性疾患の病因に関与しているようである。Rodrigues EB et al. (2009)。

10

【0196】

TNF- α シグナル伝達において、TRAF2は細胞死に重要な役割を果たす。TNF- α シグナル伝達が活性化されると、TRADD（TNF受容体関連死ドメイン）およびTRAF2が、TNF- α 受容体であるTNFR1に結合し、次いで、活性化された複合体がIKK（IKK）の活性化を媒介する。カスパーゼ-8が不活性化されると、TRAF2はTRADD複合体から遊離され、遊離したTRAF2はE3ユビキチンリガーであるcIAPによってユビキチン化され、細胞死を促進する。AIMP2はcIAPによるTRAF2のユビキチン化を促進し、細胞死を刺激する。Choi JW et al. (2009)。

20

【0197】

DX2がTNF- α シグナル伝達のアポトーシス活性をどのように損なうかを理解するために、本発明者らは、DX2がTRAF2との相互作用に対してAIMP2と競合し、NF- κ B依存性転写活性に影響を与える能力を評価した。共免疫沈降アッセイのために、HEK293細胞に、0、1または2 μ gのMycタグ付きDX2またはAIMP2発現プラスミドをトランスフェクトした（図9A）。内因性（エンド）および外因性（エキソ）のAIMP2およびDX2の発現を、抗AIMP2抗体を用いた全細胞溶解物（WCL）の免疫ブロッティングによって確認した。TRAF2はその特異的抗体を用いて免疫沈降させ、TRAF2に結合したAIMP2またはDX2は抗Myc抗体を用いて検出した。

30

【0198】

NF- κ B依存性転写活性を試験するために、HEK293細胞に、NF- κ B-ルシフェラーゼベクターをトランスフェクトし、安定した発現細胞を樹立するためにG418（1mg/ml）により1週間細胞を選択した。生存細胞の選択後、細胞に、pcDNA3.1空ベクター（対照として）またはAIMP2もしくはDX2をコードするpcDNA3.1発現ベクターをトランスフェクトした。16時間後、トランスフェクトした細胞をTNF- α （20ng/ml）で12時間処理した。細胞を回収し、製造業者のプロトコール（Promega）に従ってルシフェラーゼアッセイキットを使用してルシフェラーゼの定量のために細胞溶解物を調製した。

40

【0199】

DX2の発現が増加すると、AIMP2とTRAF2との相互作用は減少した。逆に、AIMP2を導入すると、用量依存的にDX2とTRAF2との相互作用が阻害された（図9A）。NF- κ B活性の増加は、TNF- α のアポトーシス促進シグナルを抑制した。予想通り、DX2はNF- κ B活性を増加させたが、AIMP2は逆の効果を与えた（図9B）。DX2の過剰発現はTNF- α 誘発細胞死を消失させた（図9C）。

【0200】

次に、DX2がTNF- α 依存性のニューロン細胞死を抑制するかどうかを評価するた

50

めに、N2Aおよびマウスの一次ニューロン細胞に、EV（空ベクター）またはDX2発現プラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を、TNF- α （20 ng/ml）+シクロヘキシミド（CHX、10 μ M）の存在下または非存在下で6時間インキュベートした。次いで、MTTアッセイを使用して細胞生存率を評価した。図10Aおよび図10Bに示すように、DX2の過剰発現は、通常の条件下（con）では、N2Aまたはマウス一次ニューロン細胞の細胞生存率に影響を与えなかったが、TNF- α 処理では、DX2をトランスフェクトした細胞（DX2）の細胞死は、EV（空ベクター）をトランスフェクトした細胞と比較して有意に低減した。

【0201】

まとめると、DX2はAIMP2と競合し、AIMP2よりも強くTRAF2と相互作用するため、TNF- α 活性化条件でのAIMP2刺激によるニューロン細胞のアポトーシスを阻害する。

（実施例5）

AAV2-DX2の設計：DX2をコードする自己相補性AAV2

【0202】

通常の薬理学的方法を使用して網膜変性疾患（RDD）を治療することは一般に困難であるため、より効果的な戦略が模索されている。これらの選択肢の中で、遺伝子治療は、網膜下への微量注射の最小限の侵襲性でRDDにアクセスし、RPなどの疾患を処置するための戦略となり得る。Christine CW et al. (2009); Eberling JL et al. (2008); Castle MJ et al. (2020)。

【0203】

AAVベクターは、非分裂網膜細胞への効率的な形質導入可能な特性を有する、網膜細胞に導入遺伝子を送達することができる効率的なシャトルである。AAVはまた、病原性の欠如に起因するその相対的安全性のために、適切な遺伝子導入アプローチとして評価されている。Wang D et al. (2019)。ここでは、治療遺伝子であるDX2をRDD患者に効果的に送達するためのアデノ随伴ウイルス血清型2（AAV2）送達システムの潜在性を調べる。

【0204】

一本鎖AAV（ssAAV）と自己相補的AAV（scAAV）との間でどちらのウイルス系を使用するかを決定するために、SH-SY5Y細胞に、10、100、1000または104 MOI（感染多重度）のssAAV-GFP（緑色蛍光タンパク質）またはscAAV-GFPを感染させた。48時間後、GFP発現を顕微鏡検査により測定した。図11AはGFP陽性細胞のパーセンテージを表し、図11BはGFP発現細胞の顕微鏡検査による画像を示す。図11Aおよび図11Bにおいて、両方のウイルスを異なる濃度でSH-SY5Yを処理するために使用した場合、ウイルス感染率においてscAAVの方がより効果的であった。

（実施例6）

AAV2-DX2形質導入はニューロン死に関連した細胞シグナル伝達を抑制する。

【0205】

MEF（マウス胎児線維芽細胞）、肝細胞、MSC（間葉幹細胞）および一次ニューロン（ニューロン）において、AAV2-DX2がH2O2誘発細胞傷害性効果を損なうかどうかを調べるために、細胞に、104 MOIのAAV-DX2（AAV2-DX2）を48時間感染させた。次いで、形質導入した細胞を400 μ MのH2O2で4時間処理して細胞死を誘発し、MTT解析によって細胞生存率を測定した（図12A）。

【0206】

AAV2-DX2形質導入細胞（DX2）は、通常、H2O2処理後、AAV-GFP形質導入細胞（GFP）と比較して細胞死の有意な減少を示し（図12A）、AAV2-DX2が有効な抗アポトーシス剤であることを示唆した。興味深いことに、通常の条件下では、細胞生存率はAAV2-DX2の存在または非存在によって影響を受けなかった（図12B）。したがって、DX2はストレッサーがアポトーシス状態を誘導する場合にの

10

20

30

40

50

み機能する。

【0207】

D X 2 の過剰発現がニューロン細胞における細胞内シグナル伝達をどのように変化させるかを調べるために、A A V 送達システムによって D X 2 遺伝子を誘導した後のニューロン細胞について R N A 配列決定を行った。S K - N - S H 神経芽細胞腫細胞に s c A A V 2 - G F P または A A V 2 - D X 2 を感染させた。感染から 48 時間後に細胞を採取し、R N A を単離し、R N A 配列決定を実施した。D X 2 は、p 53 関連細胞死経路および T N F - α またはインターロイキン関連シグナル伝達の抑制に関与すると予測された (図 1 2 C)。遺伝子セットは、シグナル伝達経路またはオントロジーデータベースに分類された差次的に発現した遺伝子 (D E G) を評価するために、S K - N - S H (図 1 2 D) および N 2 A (図 1 2 E) の 2 つの細胞型に基づいて解析した。D X 2 は、N 2 A (図 1 2 D) および S K - N - S H 細胞 (図 1 2 E) の両方において、炎症性またはアポトーシスシグナル伝達を低減させるようであり、関連遺伝子の多数の下方調節を示した。統計的有意性は、D X 2 過剰発現後の経路の全てについて、p 値グラフの分布で可視化された (図 1 2 F ~ 1 2 G)。

10

(実施例 7)

D X 2 は、網膜光受容体および神経節前駆体様細胞系である 6 6 1 W 細胞の生存率を増加させる。

【0208】

D X 2 が、上記の段落に記載される他のニューロン細胞と同様に、R O S 誘発細胞死から網膜光受容体および神経節ニューロンを救済することができるかどうかを調べるために、本発明者らは、様々な濃度の H₂O₂ で処理した、A A V - D X 2 を感染させた細胞および非感染細胞に対して細胞生存率試験を実施した。その結果により、A A V - D X 2 を感染させた細胞は、非感染細胞と比較して H₂O₂ 濃度に対してより高い耐性を示し、依然として生存可能なままであることが示された。

20

【0209】

図 1 3 は、D X 2 が網膜光受容体ニューロン細胞の生存率を増加させたことを示している。6 6 1 W 細胞を 96 ウェルプレートにウェル当たり 5×10^4 細胞で播種し、続いて A A V - D X 2 ウイルスを 5000 M O I で感染させた。48 時間後、細胞を様々な濃度の H₂O₂ で処理した。細胞生存率を 24 時間後に M T T アッセイを使用して評価した。

30

【0210】

A A V - D X 2 の抗アポトーシス効果をさらに調べるために、6 6 1 W 細胞に A A V - D X 2 を感染させ、次いで H₂O₂ 処理により細胞死を誘発した。アポトーシス促進マーカである B A X の m R N A レベルを評価した。その結果により、対照ウイルスである A A V - G F P を感染させた細胞では、H₂O₂ 処理によって B A X レベルが未処理の細胞と比較して 2.5 倍よりも多く増加したことが示された。しかしながら、A A V - D X 2 で処理した細胞では、H₂O₂ で処理した場合、A A V - G F P 処理群と比較して、B A X レベルが有意に低減した。

【0211】

図 1 4 は、D X 2 が H₂O₂ によって誘導される B A X のレベルを低減させることを示している。6 6 1 W 細胞に、A A V - G F P または A A V - D X 2 のいずれかを各々 5,000 の M O I で感染させた。72 時間後、細胞を 2 m M の H₂O₂ で 6 時間処理し、次いで B A X の R N A レベルを評価した。

40

(実施例 8)

D X 2 は網膜ニューロンにおける 6 7 L R 発現レベルを増加させる。

【0212】

D X 2 の抗アポトーシスシグナル伝達経路をさらに調べるために、本発明者らは、6 7 L R における D X 2 の調節的役割を調査する。網膜光受容体および神経節前駆体様細胞系である 6 6 1 W において D X 2 を過剰発現させ、6 7 L R 発現の変化を調べた。D X 2 を過剰発現させると、6 7 L R および 3 7 L R P の両方の発現の増加が観察された (図 1 5

50

A)。この観察は、本発明者らが、同じ実験条件下で661W細胞における67LRの免疫蛍光染色を実施したところ、さらに裏付けられた。DX2を過剰発現する細胞は、過剰発現していない細胞の蛍光強度よりも約2.5倍強い蛍光強度を示した(図15B)。

【0213】

次に、AIMP2およびDX2の両方を過剰発現させ、続いてKRSを用いて免疫沈降させて、DX2およびKRSの結合親和性を評価した。その結果により、AIMP2およびDX2の両方がKRSと同様の結合親和性を示すことが示された。

【0214】

図16は、DX2がAIMP2と同様にKRSに結合することを示している。2μgのフラグータグ-AIMP2およびフラグータグ-DX2をトランスフェクトした細胞を、NP-40溶解バッファーを使用して細胞溶解に供した。その後、15μlのアガロースA/GプラスビーズとKRS抗体の混合物をプルダウンアッセイに使用した。

【0215】

以前に報告されたように、H2O2誘発ROSストレスは67LRの減少を引き起こし、細胞生存シグナル伝達を弱め、細胞死を誘発する。Yan X et al. (2017)。ROSにより網膜細胞が死んでいる条件下で、本発明者らは、661W細胞にAAV-DX2を感染させることにより、KRSの変化およびDX2の効果を調べた。対照ウイルスであるAAV-GFPで処理した場合、H2O2処理による67LRレベルの低減が観察され、KRSレベルも減少した。しかしながら、AAV-DX2で処理すると、H2O2による67LRレベルの減少はなく、KRSレベルの変化も観察されなかった(図17A)。

【0216】

KRSおよび67LRの変化が、細胞質ゾルまたは膜のいずれにおいて最も大きな影響を与えたかを判定するために、本発明者らは、分画後の細胞を解析した。その結果により、H2O2によって引き起こされたKRSレベルの減少は細胞質ゾル形態ではなくむしろ膜形態であり、67LRレベルの増加も膜で起こったことが示された(図17B)。まとめると、これらの結果は、DX2がKRSに結合することにより、KRSの膜形態の増加およびその結果67LR発現の発現(the expression of 67 LR expression)が生じ、それによってニューロン細胞のアノキスを防止することが示唆される。

(実施例9)

RDDに対するAAV2-DX2の効果を評価するin vivo研究

【0217】

網膜変性疾患患者に対する潜在的な有効性を理解するために、AAV2-DX2の予防効果および治療効果をマウスおよびウサギの3つのRDD動物モデル、すなわち、レーザ誘発脈絡膜血管新生、Mdm1-/- (CRISPR/Cas9 KO)、およびヨウ素酸ナトリウムにより誘発される網膜変性モデルにおいて評価した。全体として、AAV2-DX2は予防および治療の両方の状況において有効であると判定された。これらの研究を以下に要約する。

(実施例9-1)

AAV2-DX2はマウスMdm1-/- (CRISPR/Cas9 KO) モデルにおいてDX2の予防効果を示す。

【0218】

マウス二重微小1(mouse double minute 1)(Mdm1)は、中心小体の機能および構造、ならびに変性に関与し得る。Sonらは、Mdm1タンパク質が網膜における光受容体の結合繊毛(CC)に局在することを実証した。Mdm1転写物の枯渇は、進行性網膜変性症の発症につながるメカニズムの根底にある可能性がある。

【0219】

Mdm1-/-マウスはCRISPR/Cas9を使用して作製され(was generated?)、マウスは網膜変性および眼の電気生理学的異常を示す³⁹。網膜にAAV-DX2を形質導入すると、神経網膜全体の厚さの回復が生じた(図18B)。DX2を形質導入すると、より厚いRPE層(図18C)および光受容体外節層(図18D)が示され、

10

20

30

40

50

D X 2 の発現が R P E の変性および光受容体の繊毛分解を阻止することが示唆された。D X 2 の形質導入はまた、より厚い光受容体の外核層（図 1 8 E）および外網状層（図 1 8 F）を示し、D X 2 発現が光受容体の変性を低減させることを示した。

【0220】

図 1 8 G は、R P E（網膜色素上皮）の完全性および増殖を示す。D X 2 遺伝子の形質導入は、R P E の増殖を活性化することによって R P E の完全性の回復をもたらした。図 1 8 H は、P R（光受容体）の回復を示す。D X 2 遺伝子の形質導入は、P R の増殖を活性化することによって P R 集団の回復をもたらした。

【0221】

図 1 8 I は R P E および P R の細胞増殖を示す。R P E および光受容体層における増殖を解析するために K i 6 7 発現を測定した。R P E（左側のパネル）および光受容体外節層（右側のパネル）における増殖は、A A V 2 - D X 2 をトランスフェクトした試料において有意に高かった。

10

【0222】

図 1 8 J ~ 1 8 O は網膜の機能回復を示す。A A V 2 - D X 2 形質導入は、R D D モデル（m d m 1 - / -）または陰性対照（m d m 1 - / - + A A V - G F P）と比較して、a 波振幅の増加（図 1 8 L）および潜時の低減（図 1 8 M）を示し、D X 2 発現が光受容体の電気生理学的機能および視力の損傷を低減することを示す。A A V 2 - D X 2 をトランスフェクトした試料は、b 波振幅の変化を示さなかったが（図 1 8 N）、R D D モデル（m d m 1 - / -）と比較して潜時を低減させ（図 1 8 O）、これは、D X 2 が R P E および光受容体のみに影響を及ぼし、双極細胞（光受容体後（post-photoreceptor）ニューロン）には影響を及ぼさないことを示唆している。

20

【0223】

A A V 2 - D X 2 を形質導入した試料の網膜電図は、正常な E R G グラフ形式の回復の増加を示した（図 1 8 J および図 1 8 K）。A A V 2 - D X 2 を形質導入した試料は、乾性 A M D（m d m 1 - / -）よりもわずかに増加した a 波振幅（図 1 8 L）および低減した潜時（図 1 8 M）を示し、D X 2 発現が光受容体の電気生理学的機能の損傷を低減させたことを示す。A A V 2 - D X 2 を形質導入した試料は、b 波振幅の変化を示さなかったが（図 1 8 N）、R D D モデル（m d m 1 - / -）よりも低減した潜時を示した。（図 1 8 O）。

30

【0224】

S R および I V 注射を介してウサギの網膜にアデノ随伴ウイルス（A A V）により送達した D X 2 の網膜変性に対する D X 2 の生存効果および抗アポトーシス有効性。

（実施例 9 - 2）

材料および方法

【0225】

1. 動物実験（ノックアウトマウス）

【0226】

網膜変性マウスモデル実験では、進行性の光受容体および R P E 変性を呈する M d m 1 - / -（C R I S P R / C a s 9 K O）マウスを作製した。動物を、特定の病原体を含まない条件下で、動物施設内の一定の環境条件（21℃～23℃の温度、50～60%の湿度および12時間の明／暗サイクル）の下で、個別のケージに収容した。3週齢の網膜下腔に A A V 2 - D X 2 および陰性対照（A A V 2 - G F P）注射（injection）。網膜の組織学的測定および機能回復は3ヶ月齢で実施した。3週齢の M d m 1 - / - マウスに、38G滅菌マイクロチップニードル（I N C Y T O、K R）を使用して、4μlの体積で A A V 2 - D X 2 / A A V 2 - G F P を経強膜注射により網膜下腔に注射して、網膜の傷を最小限にした。A A V 2 - G F P / D X 2 を同じ動物に注射した。A A V 2 - G F P は O S（左）に注射した。A A V 2 - D X 2 は O D（右）に注射した。

40

【0227】

2. 電気生理学的機能評価

50

【0228】

3週齢のMdm1-/-マウスに、38G滅菌(a 38G sterile)を使用して4 μ lの体積でAAV2-DX2/AAV2-GFPを経強膜注射により網膜下腔に注射して、網膜の傷を最小限にした。3ヶ月齢のマウスを使用した。最終測定では、WT (n=11)、mdm1-/- (n=6)、mdm1-/- (AAV2+GFP) (n=6)およびmdm1-/- (AAV2+DX2) (n=7)を評価した。光受容体機能の評価のための網膜電図では、Ocuscience (登録商標) HMsERGを使用した。アバチン(1%)を用いてマウスに麻酔を誘導し、3%イソフルラン吸入で麻酔を維持し、マウスの生理的状态を維持するために温熱パッドに置いた。角膜との接触を保ち、角膜を湿った状態に保つために、1滴の2%ヒプロメロース液滴を、銀を埋め込んだ糸電極を備える齧歯動物用コンタクトレンズに乗せた。暗さおよび眼の均一な照射のために、マウスを直径76mmのガンツフェルド(Ganzfeld)ドーム下に置いた。測定を、ISCeV-Extended full-field ERG標準プロトコールに従って実施した。データを、ERGVIEWを使用して解析し、組み合わせた標準桿体および錐体反応値を選択して、3000mc.d.s/m²、0.10Hzの閃光強度で解析した。A波解析を光受容体細胞機能に対して実施した。B波解析を双極細胞機能および水平細胞機能に対して実施した。a波およびb波についての振幅および潜時の値を解析した。

10

【0229】

3. 組織学的解析

【0230】

全てのマウスをERG後に安楽死させ、それらの眼球を採取した。眼球を4%PFA中で4℃にて一晚固定した。眼球を30%スクロースで脱水し、組織凍結切片のためにOCT化合物で包埋した。全ての網膜凍結切片試料は、10 μ mの厚さを有する視神経を含む切片から採取した。網膜凍結切片を解析した。層の厚さの解析のためにH&Eを使用した。層の厚さの解析はLeica LASプログラムを用いて実施した。RPE65およびオプシン発現、ならびに増殖評価(Ki67)のために免疫蛍光を使用した。免疫蛍光ROIセットおよび重複係数測定は、Image Jを用いて測定した。

20

【0231】

4. 統計解析

【0232】

一次解析のためにスチューデントのt検定を使用した。P値をmdm1-/- (AAV2+DX2)と比較した。回復評価のために、P値をWTと比較した。完全データのために、Leveneの等分散性検定、ANOVA検定、およびpost-hoc (Dunnett (T3)、Tukey HSD) 評価を、IBM SPSS統計値23を用いて実施した。

30

(実施例10)

AAV2-DX2は、レーザー誘発脈絡膜血管新生(CNV)マウスモデルにおいてDX2の予防効力を示す。

(実施例10-1)

AAV2-DX2で処置したマウスはレーザー誘発脈絡膜血管新生を減弱する。

40

【0233】

レーザー誘発脈絡膜血管新生(CNV)モデルは、網膜変性疾患(RDD)についての広く使用されている動物モデルである。このモデルでは、レーザーを使用してブルッフ膜を破壊し、その下にある脈絡膜血管が色素上皮の下空間に貫入して成長することを可能にする。5週齢の雄のC57BL/6マウス(n=12)にscAAV2-GFP(対照)またはAAV2-DX2の網膜下注射を行った(0日目)。注射から21日後、レーザー光凝固によりCNVを作製した(21日目)。レーザー処置から14日後、フルオレセイン血管造影およびICG血管造影を実施した(35日目)。翌日、マウスを殺し、脈絡膜フラットマウントを作製し、(FITC)コンジュゲートイソレクチンB4で染色した(図19A)(36日目)。新しい血管形成によって引き起こされた血管漏出は、フル

50

オレセイン血管造影によってレーザー誘発光凝固部位で明確に観察された。ICG血管造影が脈絡膜の血管造影図を取得するために使用される。フラットマウントを使用して、明確に区分されたイソレクチン陽性CNVの存在および面積を評価した。DX2注射により、フルオレセイン血管造影において、GFP注射対照と比較して血管漏出の減少が示された（図19A）。同様に、DX2を注射したマウスは、ICG血管造影において、GFPを注射したマウスと比較してCNV面積の低減を示した（図19A）。また、イソレクチン-B4で染色した脈絡膜フラットマウントにより、DX2を注射したマウスにおいてCNV形成面積の有意な低減が実証される（図19A）。

【0234】

CNV面積に対する漏出面積の比は、フルオレセイン血管造影（FA）を使用して総過蛍光面積、およびICGAを使用してCNV面積を測定することにより推定した（図19B）。イソレクチンB4染色を使用したブルッフ膜における平均CNV面積もまた、DX2を注射したマウスでは、GFP対照と比較して有意に小さかった（ $n=12$ ）（図19C）。この結果に基づくと、DX2はCNVマウスモデルにおいて予防効果があった。炎症性細胞、特に（マクロファージ）は、ブルッフ膜の破壊、RPEの萎縮、およびCNVを含む、変性病変の近傍／内部にあることが組織学的に実証されている。CNV病変における（マクロファージ）は、VEGFなどの血管新生促進因子およびTNFなどの炎症性サイトカインを分泌することが示されている。図19Dでは、DX2を注射したマウスの炎症細胞の数は、GFP対照のCNV細胞と比較して有意に少ない。過剰量の血管内皮成長因子（VEGF）は、黄斑下に異常な血管の成長および漏出を引き起こし、その結果、不可逆的な中心視力の低下が生じる。この文脈において、網膜変性疾患の処置のために、VEGFを標的とした抗血管新生治療の開発に向けて多くの試みがなされてきた。これらの薬物はRDDの進行を遅らせ、場合によっては血管新生を抑制することにより視力を改善することが示されている。ここで、本発明者らは、レーザー誘発脈絡膜血管新生より前にマウスをDX2で処置し、VEGF発現についてGFPで処置したマウスと比較した（ $n=6$ ）（図19E）。DX2で処置したマウスは、GFPで処置したマウスと比較して少ないVEGF発現を示した。このデータはまた、CNVモデルマウスに対するDX2の予防効果を示した。

（実施例10-2）

材料および方法

【0235】

1. 動物実験（マウス）

【0236】

動物を、特定の病原体を含まない条件下で、動物施設内の一定の環境条件（ $21^{\circ}\text{C}\sim 23^{\circ}\text{C}$ の温度、 $50\sim 60\%$ の湿度および12時間の明／暗サイクル）の下で、個別のケージに収容した。各群において、マウスの眼の左側（OS、左眼）はAAV-GFPで処置し、眼の右側（OD、右眼）はAAV-DX2で処置した。（注射： $5\times 10^8\text{vg}$ ）。網膜下注射の1週間後および10週間後に、レーザー光凝固装置を使用して、眼底のRPE層にレーザーを誘導して、それぞれ3週間、3ヶ月の網膜変性疾患モデルを作製した。2週間、2ヶ月のレーザー処置後、マウスの眼球を分離する。

【0237】

2. 網膜下注射プロトコール。

【0238】

齧歯動物を麻酔する。イソフルラン（isofluorane）吸入よりも $100\text{mg}/\text{ml}$ のケタミンおよび $10\text{mg}/\text{ml}$ のキシラジン（ $20\mu\text{l}/10\text{g}$ 体重）の腹腔内注射を使用する。動物の片足をつまんで、動物が深く麻酔されていることを確認する。動物が身じろぐ場合は、網膜下注射を開始する前に、さらに数分待って再度試みる。注射する眼が天井を向くように齧歯動物を横向きにする。解剖顕微鏡下で、眼球が眼窩（socket）からわずかに飛び出し（一時的な眼球突出）、頭を耳のすぐ上および顎で2本の指により保持することによってよりアクセスしやすくなるように皮膚を穏やかに引っ張り、眼球が眼窩

からわずかに飛び出すようにまぶたと平行に皮膚を穏やかに引っ張る。38Gの滅菌マイクロチップニードル（INCYTO、KR）により、角膜輪部のすぐ下に、ニードルで水晶体に触れることを回避する角度で穴を開ける。頭部を握ったままにしながら、使い捨ての鋭いニードルを眼から引き抜く。マイクロマニピュレーターに尖っていないニードルを予め取り付け付けた注射器を装着するか、または手で保持した後、尖っていないニードルを付けたシリンジの先端を、穴を通して挿入し、水晶体に触れないように再度注意し、抵抗を感じるまで非常に穏やかに眼を通してニードルを穏やかに押し込む。全ての動きを最小限に抑えながら、注意深くゆっくりと網膜下腔にウイルスを注射する。AAV2-GFPをOS（左）に注射した。AAV2-DX2をOD（右）に注射した。注射器をゆっくり引き抜く。眼の潤いを保つために、保湿点眼剤を適用する。動物が胸骨臥位に復帰するまでモニタリングし続ける。

10

【0239】

3. マウスのレーザー誘発CNVモデルプロトコール。

【0240】

レーザーをマウスに誘導する前に、レーザーおよびスリットランプをアクセスしやすい場所に設置する。レーザーの電源を入れ、予め決定されたパラメータに設定する。齧歯動物を麻酔する。イソフルラン吸入よりも100mg/mlのケタミンおよび10mg/mlのキシラジン（20μl/10g体重）の腹腔内注射を使用する。マウスを横向きにし、局所麻酔のために塩酸テトラカインを各眼に1滴（約30μl）垂らす。溶液が効くまで2分間待つ。瞳孔拡張のために局所用トロピカミドを1滴滴下し、前のステップを繰り返す。あるいは、拡張のために塩酸フェニレフリン（2.5%）を使用する。適切な時間が経過した後、マウスを素早くマウスステージに置き、ステージをスリットランプの顎当てに置く。スリットランプを最低の明るさにし、瞳孔拡張の程度を確認する。瞳孔が十分に拡張していない場合（約2.5~3mm）、マウスを動物用保温器に戻し、待つ。あるいは、トロピカミドをもう1滴投与する。眼が十分に拡張したら、レーザー処置に進む。視神経の可視化に理想的な位置になるように、マウスステージ上のマウスの位置を調整する。水平に位置し、スリットランプビームに垂直になり、頭部が一方に、尾部が他方になるように、ホルダー上でマウスの方向を合わせる。頭部をレーザー操作者に近づけて約170°の角度になるようにマウスをわずかに回転させる。マウスを理想的に配置した後、25mm×25mmのガラスカバースリップに人工涙溶液を1滴垂らす。マウスの反対側の眼にも人工涙液を1滴垂らす。これにより眼が潤うことを確実にし、白内障の形成を遅らせるのに役立つ。カバースリップの角を親指と人差し指との間で持ち、両指の先の間にガラスを挟むように配置する。支え、手を安定させるために残りの3本の指を動物の体に穏やかに巻き付ける。ガラスカバースリップをマウスの眼に当てやすくなり得るように手を置く。安定した位置が得られたら、ガラスカバースリップ（滴下した人工涙液が付着したままである）をマウスの眼に注意深く押し付ける。レーザービームの散乱または反射を防ぐために、カバースリップがレーザービームに対して可能な限り垂直になるように配置することを確実にする。カバースリップは角膜を平らにするためのコンタクトレンズとして機能する。スリットランプを覗き、フリーハンドで網膜を見ることができるよう焦点を切り替える。網膜は可視化された位置に応じて明黄色／赤色を示し、明瞭な赤い血管が見える。視神経を可視化できるまでマウスの頭部および／またはカバースリップをゆっくりと注意深く操作する。視神経は黄色であり、そこから複数の血管が放射状に伸びる。操作者が視神経の可視化を確認したら、レーザー集束ビームの電源を入れる。レーザービームの電源を入れたら、レーザー集束ビームを所望の位置（視神経から約1ディスク直径）まで移動させる。眼底のRPEにレーザービームを集光する。適切な焦点は、最も鋭く、最も明瞭なレーザービームを有することにより達成される。照準ビームが楕円形に見えるか、または焦点が合っていない場合、スリットランプの焦点を切り替えるか、またはガラスカバースリップを再配置する。照準ビームがRPEに焦点が合ったら、レーザーのフットトリガーを使用してレーザー投与を開始する。レーザー投与直後の気泡の出現を監視する。レーザーショットの輪郭は明瞭であるべきであり、決してかすんではない。全ての

20

30

40

50

所望の C N V の位置（通常、視神経周囲の 3 時、6 時、9 時、および 12 時の位置）について、前の 3 ステップを繰り返す。各レーザーショットの投与の位置および結果、ならびに眼に投与した各ショットの結果（成功、かすみ、出血など）をノートに記録する。使用しないときは、必ずレーザーをスタンバイモードにする。必要であれば、安定させるために反対の手を使用し、新しいカバースリップを使用して、マウスの他方の眼について前の全てのステップを繰り返す。全ての所望のレーザーショットを投与した後、レーザーおよびスリットランプの電源を切る。カバースリップを捨て、麻酔からの回復のためにマウスを保温器に入れる。あらゆる傷について眼を肉眼で（acrosopically）検査し、人工涙液を 1 滴垂らして眼の潤いを保ち、起こる可能性のある将来の白内障発症を予防する。マウスが麻酔から回復したら、ケージに戻す。

10

【0241】

4. フルオレセイン血管造影

【0242】

角膜と水晶体を除去した後、眼を 4 % パラホルムアルデヒド（Electron Microscopy Sciences、Hatfield、PA）中に 2 時間固定した。RPE / 脈絡膜 / 強膜の後眼杯を切開し、硝子体を除去した。侵入する脈絡膜血管を標識するために、眼杯を、（AlexaFluor 647 または FITC）コンジュゲートイソレクチン B4（1 : 200、Invitrogen、Carlsbad、CA）と 4 °C で一晩インキュベートした。

20

【0243】

5. ウエスタンブロットによる血管新生因子の発現

【0244】

細胞を回収し、1 % の Triton（登録商標） X-100 を含有する PBS で溶解した。等量のタンパク質を SDS-PAGE ゲルのウェルにロードし、100 V で 2 時間ニトロセルロース膜フィルターに移した。膜を、1 % BSA を含有する PBST（Tween（登録商標）20 を含むリン酸緩衝食塩水）を用いて室温で 1 時間ブロッキングし、抗 VEGF および抗ベータアクチン抗体を用いて室温で 1 時間プローブした。膜を PBST で 3 回洗浄し、その後、二次抗体と室温で 1 時間インキュベートした。PBST で 3 回洗浄した後、免疫反応性バンドを検出した。データは Image J ソフトウェアを使用して定量した。

30

【0245】

6. 統計解析

【0246】

一次解析のためにスチューデントの t 検定を使用した。P 値を $mdm1 - / - (AAV2 + DX2)$ と比較した。回復評価のために、P 値を WT と比較した。完全データのために、Levene の等分散性検定、ANOVA 検定、および post-hoc（Dunnett（T3）、Tukey HSD）評価を、IBM SPSS 統計値 23 を用いて実施した。

（実施例 11）

AAV2-DX2 は、ヨウ素酸ナトリウム（SI）誘発ウサギ RDD モデルにおける網膜変性を改善する。

40

【0247】

ヨウ素酸ナトリウム（SI）は、光受容体細胞^{40 41}および網膜色素上皮細胞（RPE）の死を誘発することにより、網膜変性モデルを作製するために広く使用されている酸化剤である。ヨウ素酸ナトリウム溶液を 30 mg / kg の用量で 1 回静脈内注射し、RDD モデルを作製した⁴²。1 回目の網膜神経変性誘発から 21 日後、眼底画像により、ヨウ素酸ナトリウムにより誘発された群（G2）の RPE 変性面積は正常対照群（G1）と比較して有意に変性していたことが示された。試験物で処置した群（G5 および G6）の RPE 変性面積（%）レベルは、G2 と比較して有意に回復した（図 20A ~ 20B）。

50

【0248】

組織学的検査では、ヨウ素酸ナトリウムにより誘発された群（G2）の網膜色素上皮（RPE）変性面積（%）レベルは、正常対照群（G1）と比較して有意に変性していた（ $p < 0.001$ ）。試験物で処置した群（G5およびG6）のRPE変性面積（%）レベルは、G2と比較して有意に回復した（ $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ ）（図20D）。ナトリウムにより誘発された群（G2）の光受容体層の外節レベルは、正常対照群（G1）と比較して有意に低減し（ $p < 0.001$ ）、試験物で処置した群（G5およびG6）のレベルは、G2と比較して回復した（ $p < 0.01$ ）（図20E）。ヨウ素酸ナトリウムにより誘発された群（G2）の網膜厚さのレベルは、G1と比較して有意に低減した（ $p < 0.001$ ）。試験物で処置した群（G5およびG6）のレベルは、G2と比較して回復した（ $p < 0.05$ ）（図20F）。

10

【0249】

免疫組織化学解析では、G2のロドプシン陽性面積（%）レベルは、G1と比較して有意に低減した（ $p < 0.001$ 、 $p < 0.01$ ）。G5およびG6のロドプシン陽性面積（%）レベルは、G2と比較して有意に回復した（ $p < 0.01$ ）（図20G～20J）。G2の神経節陽性細胞（%）レベルは、G1と比較して有意に低減した（ $p < 0.001$ ）。G3、G4およびG6の神経節陽性細胞（%）レベルは、G2と比較して有意に回復した（ $p < 0.05$ ）。

【0250】

1回目の網膜神経変性誘発から21日後、ヨウ素酸ナトリウムにより誘発された群（G2）のA波およびB波の振幅レベルは、正常対照群（G1）と比較して有意に減少した（ $p < 0.001$ ）。試験物で処置した群（G5およびG6）のA波およびB波の振幅レベルは、G2と比較して有意に回復した（ $p < 0.05$ ）（図20K～20L）。

20

【0251】

最後に、本発明者らは、非常に重度に破壊された網膜においても、DX2が生存の役割を果たし、網膜機能を救済することを確認するために、非常に重度のRDDモデルを作製した。ヨウ素酸ナトリウム溶液を60mg/kgの用量で1回静脈内注射し、非常に重度のRDDモデルを作製した。Koster C et al. (2022)。

【0252】

HG2（重度のRDD群）と比較してA波およびB波の振幅レベルの統計的に有意な改善が、両方のDX2で処置したHG群（すなわち、網膜下経路または硝子体内経路により注射された 5×10^{10} VG用量のAAV2-DX2）において観察された（ $p < 0.05$ ）。以下の表2を参照のこと。

30

【表2】

表2

		注射経路	網膜変性誘発	処置用量
HG1	-	-	-	-
HG2	ビヒクル	IVT	5,60 NaIO3 注射 (mg/kg)	
HG3	AAV-DX2	SR		5×10^9 vg
HG4	AAV-DX2	IVT		5×10^9 vg
HG5	AAV-DX2	SR		4×10^{10} vg
HG6	AAV-DX2	IVT		4×10^{10} vg

40

【0253】

図21A～21Bは、A波（図21A）およびB波（図21B）の網膜電図測定値を示す。

【0254】

材料および方法

【0255】

50

1. 動物実験（ウサギ）

【0256】

雄の52羽のチンチラウサギ（約13週、2.5～3.0kg、Dream Bio Co., Ltd.）をin vivo実験のために使用した。以下の条件を維持するように環境制御を設定した：23±3℃の温度範囲、55±15%の相対湿度範囲、10～20回の空気交換／時間の換気、150～300Luxの光度および12時間の明／12時間の暗サイクル。動物には、Cargill Agri Purina Inc.によって製造され、Dream Bioから購入した実験動物用飼料を自由に摂取させた。また、水はポリカーボネート製の給水ボトルにより自由に摂取させた。実験の終了時に、生存している全ての動物に麻酔をかけた後、安楽死を実施し、右眼球を摘出し、各群の最初の10%の眼球を角膜中央に穿刺し、10%の中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。各群の後の半分の右眼球の網膜（脈絡膜を含む）を採取し、動物識別番号を標識したマイクロチューブに入れ、温度を-70℃より低く維持する冷凍冷蔵庫にそれらを保存した。

【0257】

2. ヨウ素酸ナトリウム誘発網膜神経変性疾患ウサギモデル。

【0258】

初回誘発日（0日目）に、変性眼疾患を誘発することが指定されている動物にヨウ素酸ナトリウム（Sigma-Aldrich Co.）溶液を5mg/kgの用量で1回静脈内注射し、2回目の誘発日（14日目）に、試験群の設定に従って、ヨウ素酸ナトリウム溶液を30mg/kgまたは60mg/kgの用量で1回静脈内注射した。一般に、網膜変性症研究は、25～30mg/kgのヨウ素酸ナトリウム溶液を用いて行う。しかしながら、視神経が破壊され、完全な視覚喪失が生じた状況においても、DX2がニューロンの生存に有効であるかどうかを試験するために、非常に高用量のヨウ素酸ナトリウム溶液（60mg/kg）を用いて網膜変性を誘発した。試験物を投与日（5日目）に1回注射した。硝子体内注射の場合、動物を麻酔し、31ゲージのニードルを装着した注射器を用いて試験物を右眼球に硝子体内注射した。網膜下注射の場合、動物を麻酔し、31ゲージのニードルを装着した注射器を用いて試験物を右眼球に経強膜的に注射した。

【0259】

試験群の設定は以下の表3に従った。

【表3】

表3

		注射経路	網膜変性誘発	処置用量
G1	-	-	-	-
G2	ビヒクル	IVT	5,30 NaIO3 注射 (mg/kg)	-
G3	AAV-DX2	SR		5*10 ⁹ vg
G4	AAV-DX2	IVT		5*10 ⁹ vg
G5	AAV-DX2	SR		4*10 ¹⁰ vg
G6	AAV-DX2	IVT		4*10 ¹⁰ vg

G1: 正常対照。G2: ビヒクル対照。I.Vt: 硝子体内注射。S.R: 網膜下注射。

vg: ウイルスゲノム。

【0260】

3. 眼底写真法

【0261】

変性眼疾患誘発および実験終了前に、両方の眼球に点眼剤（Mydrin ophthalmic solution、1%）を適用した後、動物を麻酔し、眼底カメラ（TRC-50IX、T

OPCON、日本)を用いて眼底画像を撮影した。眼底画像の網膜色素上皮(RPE)変性面積を、Image J(NIH、Bethesda、MD)を使用して解析した。変性面積(%) = 変性面積 / 総面積。

【0262】

4. 電気生理学的機能評価

【0263】

実験終了前に、全ての生存動物の右眼を網膜電図(ERG)に供した。動物を麻酔した後、暗室で60分間順応させ、ERG装置(HMs-ERG、Ocuscience、USA)を用いてERG測定を行った。ERGは暗室でフラッシュライトを用いて測定し、A波およびB波を正常な対照の振幅と比較することにより評価した。

10

【0264】

5. 病理組織学的検査

【0265】

固定した眼組織を、切断、脱水、パラフィン包埋、および切開などの一般的な組織処理に供して、病理組織学的検査のための検体を作製した後、ヘマトキシリンおよびエオシン染色を行い、光学顕微鏡(Olympus BX53、日本)を使用して、網膜色素上皮(RPE)、光受容体の外節、外核層、外網状層および網膜全体の厚さを測定した。

【0266】

6. RT-PCRによるDX2の発現

【0267】

RNA単離GeneAll hybrid-R Kit(GeneAll Biotechnology Co., Ltd., 韓国)を使用してウサギの網膜(脈絡膜を含む)から全RNAを単離し、cDNA合成キット(Toyobo、日本)を用いて逆転写した。次いで相補的DNAを、qPCR BIO SyGreen Blue Mix(PCR Biosystems Ltd., UK)を使用したリアルタイムPCRに使用した。増幅、検出、およびデータ解析は、CFX96 touch(BioRad、USA)を用いて実施した。

20

【0268】

7. 統計解析

【0269】

この研究の結果は正規分布していると仮定し、パラメトリック多重比較法またはノンパラメトリック多重比較法によって解析した。一元配置分散分析(ANOVA)の結果が有意であった場合は、post-hoc解析としてDunnettの多重比較法を使用した。

30

【0270】

統計解析は、Prism 7.04(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)を使用して実施し、統計的有意性は、0.05未満のP値で設定した。

(実施例12)

AAV2-DX2は、レーザー誘発脈絡膜血管新生(CNV)ウサギモデルにおいてDX2の予防効力を示す。

40

【0271】

レーザー誘発脈絡膜血管新生(CNV)を、雄の15羽のチンチラウサギを使用して網膜変性疾患(RDD)ウサギモデルを作製するために行った。図22Aに示すように、脈絡膜血管新生(CNV)面積解析の結果として、フルオレセイン強度レベルG3(SR)、G4(IVT)および陽性対照(G5)は、CNV誘発後14、21、28日に、G2と比較して有意に減少した($p < 0.001$ 、 $p < 0.01$ または $p < 0.05$)。

【0272】

図22Bは、イソレクチンB4染色を使用したCNV面積の解析を示し、全ての試験物で処置した群(G3、G4)および陽性対照群(G5)の値のCNV面積レベルは減少す

50

る傾向にあるが、統計学的有意差には達しなかった。

(実施例 13)

AAV2-DX2 は全身の臓器において病理組織学的異常または腫瘍性パターンを誘発しなかった。

【0273】

AAV2-DX2 の任意の腫瘍形成性 (tumorigenicity) の潜在的毒性を試験するために、全身の病理組織学的解析を実施した。表 4 にまとめたように、AAV2-DX2 を投与した動物は、腎臓、肝臓、脾臓、脳、リンパ節、肺などに病理組織学的異常または腫瘍性パターンを示さなかった。生存は対照 (G1) 群と比較して影響を受けなかった。

【表 4-1】

表 4. 臓器病理組織学的解析

病理組織学的所見				
臓器	G2	G3	G4	G5
脳	異常は検出されない			
精巣	異常は検出されない			
腎臓 -L	異常は検出されない			
腎臓 -R	異常は検出されない			
肝臓	異常は検出されない			
肺	異常は検出されない			
脊髄	異常は検出されない			
脾臓	異常は検出されない			

【表 4-2】

胃	異常は検出されない
心臓	異常は検出されない
胸腺	異常は検出されない
脾臓	異常は検出されない
腸間膜リンパ節	異常は検出されない
左眼 (レーザー誘発なし)	異常は検出されない

(実施例 14)

AAV2-DX2-miR-3PT による注射組織ニューロン細胞特異的 DX2 発現を確認するための予備分布研究。

【0274】

miR-3PT VECTOR システムを使用して DX2 の生体分布パターンを観察するために、動物を殺し、qPCR を使用して、胸腺、肝臓、精巣、脳、脾臓、腎臓、心臓、胃、腸間膜リンパ節、脊髄、脾臓、肺における DX2 の発現を解析した (図 23B ~ 23M)。qPCR 解析により、DX2 の発現が注射組織領域においてのみ観察されたことが確認された (図 23A)。

【0275】

材料および方法

【0276】

1. 動物実験（ウサギ）

【0277】

雄の15羽のチンチラウサギ（約13週、2.5～3.0kg、Dream Bio Co., Ltd.）をin vivo実験のために使用した。以下の条件を維持するように環境制御を設定した：23±3℃の温度範囲、55±15%の相対湿度範囲、10～20回の空気交換／時間の換気、150～300Luxの光度および12時間の明／12時間の暗サイクル。動物には、Cargill Agri Purina Inc.によって製造され、Dream Bioから購入した実験動物用飼料を自由に摂取させた。また、水はポリカーボネート製の給水ボトルにより自由に摂取させた。実験の終了時に、生存している全ての動物に麻酔をかけた後、安楽死を実施し、右眼球を摘出し、各群の最初の半分の眼球を角膜中央に穿刺し、10%の中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。各群の後の半分の右眼球の網膜（脈絡膜を含む）を採取し、動物識別番号を標識したマイクロチューブに入れ、温度を-70℃より低く維持する冷凍冷蔵庫にそれらを保存した。硝子体内注射の場合、動物を麻酔し、31ゲージのニードルを装着した注射器を用いて試験物を右眼球に硝子体内注射した。

10

【0278】

網膜下注射の場合、動物を麻酔し、31ゲージのニードルを装着した注射器を用いて被験物を右眼球内に経強膜的に注射した。ウサギを麻酔した後、G1のウサギおよび各群の前記の番号で標識したウサギに滅菌生理食塩水を使用して全身灌流を行い、下記の臓器を摘出し、解析の前に-70℃より低く設定した冷凍冷蔵庫に保存した。

20

【0279】

摘出した臓器：脳、精巣、腎臓、肝臓、肺、脊髄、脾臓、胃、心臓、胸腺、膵臓、リンパ節および右眼の（G1の両眼の）網膜／脈絡膜。

【0280】

実験終了時に、後続の番号を標識したウサギを麻酔後に安楽死させた後、右眼を摘出し、角膜中央をニードルで穿刺し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。下記の臓器を摘出し、固定した。

【0281】

摘出した臓器：脳、精巣、腎臓、肝臓、肺、脊髄、脾臓、胃、心臓、胸腺、膵臓およびリンパ節。

30

【0282】

試験群の設定は以下の表5に従った。

【表5】

表5

		疾患誘発	注射経路	処置用量
G1	ビヒクル	N	-	-
G2	ビヒクル	Y	I.VT	-
G3	AAV-DX2	Y	SR	8×10^{10} vg
G4	AAV-DX2	Y	I.VT	8×10^{10} vg
G5	Eylea®	Y	I.VT	2000 µg/眼

40

G1: 正常対照。G2: ビヒクル対照。I.Vt: 硝子体内注射。S.R: 網膜下注射。

vg: ウイルスゲノム。

【0283】

50

ウサギのレーザー誘発C N Vモデルプロトコール

【0284】

右眼球に点眼剤 (Mydriacyl oph soln、1%) を適用した後、動物を麻酔した。眼にレーザー (Elite、Lumenis、USA) を532nm、出力150mW、時間0.1秒の条件で照射し、その後、視神経の約6時あたりに6つのスポットを発生させた。

【0285】

フルオレセイン血管造影

【0286】

右眼に点眼剤 (Mydriacyl oph soln、1%) を適用した後、0、7、14、21および28日目に動物を麻酔した。そして、1mLのフルオレセインナトリウム塩溶液 (2%) を静脈により注射して、眼底カメラ (TRC-50IX、TOPCON、日本) を使用して2分以内に撮影した。

【0287】

網膜C N V面積および有効性の評価は、網膜蛍光眼底写真法を使用して実施した。画像解析は、Image Jソフトウェア (NIH、Bethesda、MD) を使用して実施して、照射部位の蛍光強度を検証した。

【0288】

フルオレセイン強度 (%) は以下のように計算した；

【0289】

フルオレセイン強度 (%) = (フルオレセイン強度値 - バックグラウンド値の平均 (G1) ¹⁾) / G2のフルオレセイン強度値の平均

【0290】

C N Vスポットのない網膜のフルオレセイン強度を測定し、バックグラウンド値として使用した。

【0291】

病理組織学的解析

【0292】

固定した組織を、切断、脱水、パラフィン包埋、および切開などの一般的な組織処理に供して、病理組織学的検査のための検体を作製した後、ヘマトキシリンおよびエオシン染色を行い、光学顕微鏡 (Olympus BX53、日本) を使用して、病理組織学的変化を観察した。C N V領域を解析するために、眼組織を固定して、脈絡膜フラットマウント法を使用してイソレクチンB4染色を行った。

【0293】

RT-PCRによるDX2の発現

【0294】

RNA単離Geneall hybrid-R Kit (GeneAll Biotechnology Co., Ltd.、韓国) を使用してウサギの眼組織および各臓器から全RNAを単離し、cDNA合成キット (Toyobo、日本) を用いて逆転写した。

【0295】

次いで相補的DNAを、qPCR BIO SyGreen Blue Mix (PCR Biosystems Ltd.、UK) を使用したリアルタイムPCRに使用した。増幅、検出、およびデータ解析は、CFX96 touch (BioRad、USA) を用いて実施した。摘出した臓器および眼組織を使用して標的遺伝子のRT-PCR解析を行って、GAPDH発現と比較して標的遺伝子の発現量を確認した。

【0296】

この研究の結果については、データの正規性を仮定し、パラメトリック一元ANOVAを使用して試験群間の有意性を検証した。有意な場合には、Dunnettの多重比較検定を使用してpost hoc検定を実施した。統計解析は、Prism 7.04 (GraphPad Software Inc.、San Diego、CA、USA) を

10

20

30

40

50

使用して実施し、p 値が 0.05 未満であった場合、統計的に有意であると決定した。

【0297】

結論

【0298】

本研究では、以下が実証された：) 1) 網膜変性に対する D X 2 の生存効果；(2) 網膜変性疾患の処置としての D X 2 の利用；S R および I V 注射によりマウスおよびウサギの網膜にアデノ随伴ウイルス (A A V) によって送達された D X 2 の抗アポトーシス効果。したがって、網膜変性疾患の処置のための潜在的な選択肢として生存遺伝子 D X 2 を利用した遺伝子治療の有効性も確認された。

【0299】

参考文献

【化2-1】

1. Talib M, van Schooneveld MJ, Van Cauwenbergh C, et al. The Spectrum of Structural and Functional Abnormalities in Female Carriers of Pathogenic Variants in the RPGR Gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Aug 1 2018;59(10):4123-4133. doi:10.1167/iov.17-23453.
2. Bennett J. Taking Stock of Retinal Gene Therapy: Looking Back and Moving Forward. *Mol Ther*. May 3 2017;25(5):1076-1094. doi:10.1016/j.ymthe.2017.03.008.
3. Boye SE, Boye SL, Lewin AS, Hauswirth WW. A comprehensive review of retinal gene therapy. *Mol Ther*. Mar 2013;21(3):509-19. doi:10.1038/mt.2012.280.
4. Sahel JA, Marazova K, Audo I. Clinical characteristics and current therapies for inherited retinal degenerations. *Cold Spring Harb Perspect Med*. Oct 16 2014;5(2):a017111. doi:10.1101/cshperspect.a017111.
5. Vandenbergh LH. What Is Next for Retinal Gene Therapy? *Cold Spring Harb Perspect Med*. Apr 15 2015;5(10):doi:10.1101/cshperspect.a017442.
6. Megaw RD, Soares DC, Wright AF. RPGR: Its role in photoreceptor physiology, human disease, and future therapies. *Exp Eye Res*. Sep 2015;138:32-41. doi:10.1016/j.exer.2015.06.007.
7. Russell S, Bennett J, Wellman JA, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. Aug 26 2017;390(10097):849-860. doi:10.1016/S0140-6736(17)31868-8.
8. Deng WT et al. Correction to: Stability and Safety of an AAV Vector for Treating RPGR-ORF15X-Linked Retinitis Pigmentosa by Deng, W.-T. et al. *Hum Gene Ther* 2015;26(9):593-602. DOI: 10.1089/hum.2015.035. *Hum Gene Ther*. Feb 2021;32(3-4):232-233. doi:10.1089/hum.2015.035.correx.
9. Pawlyk BS, Bulgakov OV, Sun X, et al. Photoreceptor rescue by an abbreviated human RPGR gene in a murine model of X-linked retinitis pigmentosa. *Gene Ther*. Feb 2016;23(2):196-204. doi:10.1038/gt.2015.93.

10

20

30

40

50

【化 2 - 2】

10. Sun X, Park JH, Gumerson J, et al. Loss of RPGR glutamylation underlies the pathogenic mechanism of retinal dystrophy caused by TTLL5 mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 24 2016;113(21):E2925-34. doi:10.1073/pnas.1523201113.
11. Wu Z, Hiriyan S, Qian H, et al. A long-term efficacy study of gene replacement therapy for RPGR-associated retinal degeneration. *Hum Mol Genet*. Jul 15 2015;24(14):3956-70. doi:10.1093/hmg/ddv134.
12. Jin ZB, Gao ML, Deng WL, et al. Stemming retinal regeneration with pluripotent stem cells. *Prog Retin Eye Res*. Mar 2019;69:38-56. doi:10.1016/j.preteyeres.2018.11.003. 10
13. Soldatov VO, Kukharsky MS, Belykh AE, Sobolev AM, Deykin AV. Retinal Damage in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Underlying Mechanisms. *Eye Brain*. 2021;13:131-146. doi:10.2147/EB.S299423.
14. Kim JH, Han JM, Kim S. Protein-protein interactions and multi-component complexes of aminoacyl-tRNA synthetases. *Top Curr Chem*. 2014;344:119-44. doi:10.1007/128_2013_479.
15. Choi JW, Kim DG, Lee AE, et al. Cancer-associated splicing variant of tumor suppressor AIMP2/p38: pathological implication in tumorigenesis. *PLoS Genet*. Mar 2011;7(3):e1001351. doi:10.1371/journal.pgen.1001351. 20
16. Ko HS, von Coelln R, Sriram SR, et al. Accumulation of the authentic parkin substrate aminoacyl-tRNA synthetase cofactor, p38/JTV-1, leads to catecholaminergic cell death. *J Neurosci*. Aug 31 2005;25(35):7968-78. doi:10.1523/JNEUROSCI.2172-05.2005.
17. Lee Y, Karuppagounder SS, Shin JH, et al. Parthanatos mediates AIMP2-activated age-dependent dopaminergic neuronal loss. *Nat Neurosci*. Oct 2013;16(10):1392-400. doi:10.1038/nn.3500.
18. de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, et al. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 8 1997;94(14):7303-7. doi:10.1073/pnas.94.14.7303. 30
19. Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci*. May 2004;25(5):259-64. doi:10.1016/j.tips.2004.03.005.
20. Choi JW, Kim DG, Park MC, et al. AIMP2 promotes TNFalpha-dependent apoptosis via ubiquitin-mediated degradation of TRAF2. *J Cell Sci*. Aug 1 2009;122(Pt 15):2710-5. doi:10.1242/jcs.049767.
21. Corti O, Hampe C, Koutnikova H, et al. The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration. *Hum Mol Genet*. Jun 15 2003;12(12):1427-37. doi:10.1093/hmg/ddg159. 40

【化 2 - 3】

22. Ko HS, Lee Y, Shin JH, et al. Phosphorylation by the c-Abl protein tyrosine kinase inhibits parkin's ubiquitination and protective function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 21 2010;107(38):16691-6. doi:10.1073/pnas.1006083107.
23. Narne P, Pandey V, Simhadri PK, Phanithi PB. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 hyperactivation in neurodegenerative diseases: The death knell tolls for neurons. *Semin Cell Dev Biol*. Mar 2017;63:154-166. doi:10.1016/j.semcdb.2016.11.007.
24. Mao K, Zhang G. The role of PARP1 in neurodegenerative diseases and aging. *FEBS J*. Apr 2022;289(8):2013-2024. doi:10.1111/febs.15716. 10
25. Szabo C, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL. DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 5 1996;93(5):1753-8. doi:10.1073/pnas.93.5.1753.
26. Virag L, Salzman AL, Szabo C. Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *J Immunol*. Oct 1 1998;161(7):3753-9.
27. Sahaboglu A, Sharif A, Feng L, Secer E, Zrenner E, Paquet-Durand F. Temporal progression of PARP activity in the Prph2 mutant rd2 mouse: Neuroprotective effects of the PARP inhibitor PJ34. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181374. doi:10.1371/journal.pone.0181374. 20
28. Olivares-Gonzalez L, Velasco S, Campillo I, Rodrigo R. Retinal Inflammation, Cell Death and Inherited Retinal Dystrophies. *Int J Mol Sci*. Feb 20 2021;22(4)doi:10.3390/ijms22042096
29. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation*. Jul 30 2004;1(1):14. doi:10.1186/1742-2094-1-14.
30. Karlstetter M, Scholz R, Rutar M, Wong WT, Provis JM, Langmann T. Retinal microglia: just bystander or target for therapy? *Prog Retin Eye Res*. Mar 2015;45:30-57. doi:10.1016/j.preteyeres.2014.11.004. 30
31. Murakami Y, Ishikawa K, Nakao S, Sonoda KH. Innate immune response in retinal homeostasis and inflammatory disorders. *Prog Retin Eye Res*. Jan 2020;74:100778. doi:10.1016/j.preteyeres.2019.100778.
32. Rodrigues EB, Farah ME, Maia M, et al. Therapeutic monoclonal antibodies in ophthalmology. *Prog Retin Eye Res*. Mar 2009;28(2):117-44. doi:10.1016/j.preteyeres.2008.11.005.
33. Choi JW, Lee JW, Kim JK, et al. Splicing variant of AIMP2 as an effective target against chemoresistant ovarian cancer. *J Mol Cell Biol*. Jun 2012;4(3):164-73. doi:10.1093/jmcb/mjs018. 40

【化 2 - 4】

34. Christine CW, Starr PA, Larson PS, et al. Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology*. Nov 17 2009;73(20):1662-9. doi:10.1212/WNL.0b013e3181c29356.
35. Eberling JL, Jagust WJ, Christine CW, et al. Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology*. May 20 2008;70(21):1980-3. doi:10.1212/01.wnl.0000312381.29287.ff.
36. Castle MJ, Baltanas FC, Kovacs I, Nagahara AH, Barba D, Tuszynski MH. Postmortem Analysis in a Clinical Trial of AAV2-NGF Gene Therapy for Alzheimer's Disease Identifies a Need for Improved Vector Delivery. *Hum Gene Ther*. Apr 2020;31(7-8):415-422. doi:10.1089/hum.2019.367. 10
37. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*. May 2019;18(5):358-378. doi:10.1038/s41573-019-0012-9.
38. Yan X, Li Y, Yu H, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits H₂O₂-induced apoptosis in Mouse Vascular Smooth Muscle Cells via 67kD Laminin Receptor. *Sci Rep*. Aug 10 2017;7(1):7774. doi:10.1038/s41598-017-08301-6.
39. Chang B, Mandal MN, Chavali VR, et al. Age-related retinal degeneration (arrd2) in a novel mouse model due to a nonsense mutation in the Mdm1 gene. *Hum Mol Genet*. Dec 15 2008;17(24):3929-41. doi:10.1093/hmg/ddn295. 20
40. Zhou; R. Sodium iodate-induced retina and choroid damage model in rabbits to test efficacy of RPE auto-transplants. Vol.57, 2253. .
<https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2560738&resultClick=1>.
41. Ahn SM, Ahn J, Cha S, et al. The effects of intravitreal sodium iodate injection on retinal degeneration following vitrectomy in rabbits. *Sci Rep*. Oct 30 2019;9(1):15696. doi:10.1038/s41598-019-52172-y. 30
42. Koster C, van den Hurk KT, Ten Brink JB, et al. Sodium-Iodate Injection Can Replicate Retinal Degenerative Disease Stages in Pigmented Mice and Rats: Non-Invasive Follow-Up Using OCT and ERG. *Int J Mol Sci*. Mar 8 2022;23(6)doi:10.3390/ijms23062918.
43. Telegina, D. V., O. S. Kozhevnikova, and N. G. Kolosova. "Molecular mechanisms of cell death in retina during development of age-related macular degeneration." *Advances in Gerontology* 7.1 (2017): 17-24.
44. Hernández-Zimbrón, Luis Fernando, et al. "Age-related macular degeneration: new paradigms for treatment and management of AMD." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2018 (2018). 40

【化 2 - 5】

45. Du, Hongjun, et al. "JNK inhibition reduces apoptosis and neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.6 (2013): 2377-2382.

46. Brown et al., Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer, *Nature Med.* 12:585-591 (2006).

47. Brown et al., Endogenous microRNA can broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state, *Nature Biotech.* 25:12457-1467 (2007).

10

48. KR 10-1067816 (2011).

49. US2019/0298858 A1.

【0300】

特定の実施形態に関する前述の記載は、本発明の一般的な性質を十分に明らかにするものであるため、他者は、本発明の一般的な概念から逸脱することなく、当該技術分野の範囲内である知識を適用することにより、様々な用途のために容易に変更および／または適合させることができる。したがって、このような適合および変更は、本明細書に提示された教示および指針に基づいて、開示された実施形態の均等物の意味および範囲内にあることが意図される。本明細書の用語または語句は、教示および指針に照らして当業者によって解釈されるべきであるように、本明細書の語句または用語は、説明の目的のためであり、限定のためではないことを理解されたい。

20

【0301】

本発明の広さおよび範囲は、上述の例示的な実施形態のいずれかによって限定されるべきではなく、以下の特許請求の範囲およびそれらの均等物に従ってのみ定義されるべきである。

【0302】

本明細書に記載された様々な態様、実施形態、および選択肢の全ては、任意および全ての變形形態において組み合わせることができる。

30

【0303】

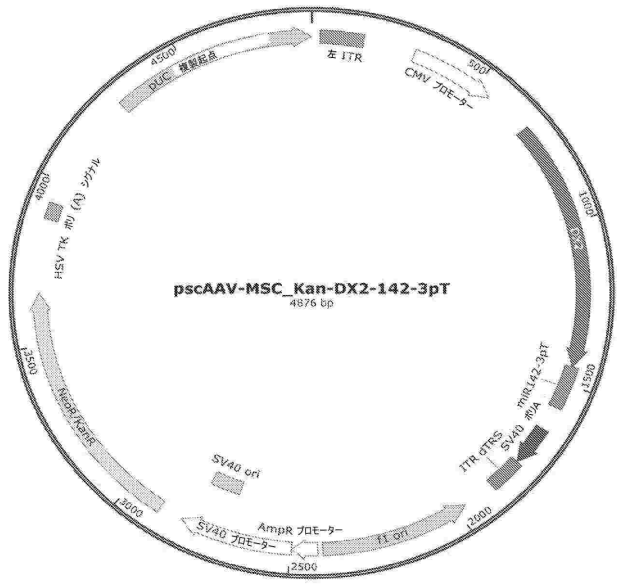
本明細書において言及される全ての刊行物、特許、および特許出願は、個々の刊行物、特許、または特許出願が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されている場合と同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

40

50

【図面】
【図 1】

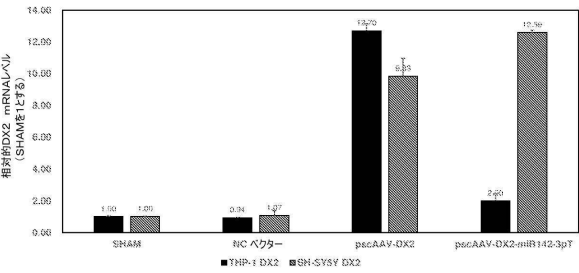
FIG. 1



【図 2】

FIG. 2

miR142-3pT によるDX2発現のノックダウン



【図 3】

FIG. 3

ccagaagcttgctagctccataaagttaggaacactacatcactccataaagttaggaacactaca
gatatcctccataaagttaggaacactacatcactccataaagttaggaacactacaagcttgtag

【図 4】

FIG. 4A

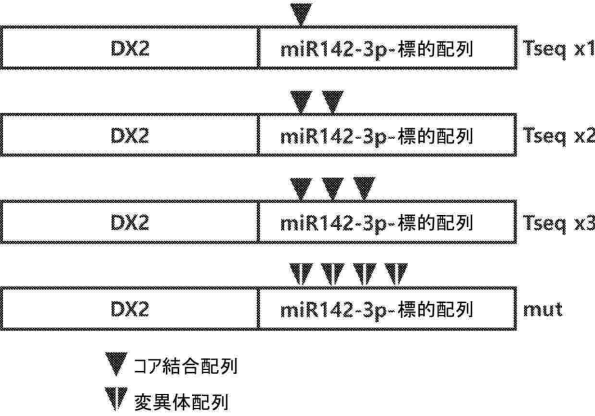
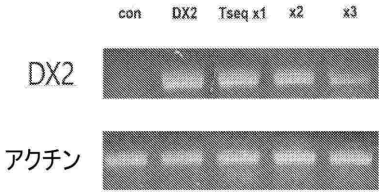


FIG. 4B



10

20

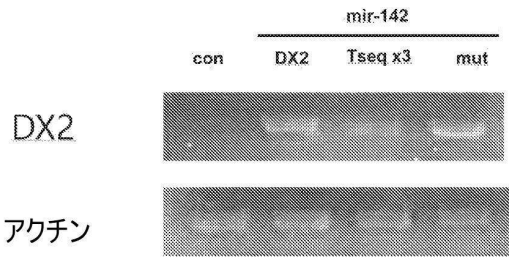
30

40

50

【図 5】

FIG. 5



【図 6 A】

FIG. 6A

1	配列番号 12 AAH13630.1 (200aa)	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	20
2	配列番号 2 NP_001313536.1 (DX2)	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	35
3	配列番号 14 XM_005249847.3 (アノ7α-ΔX1)	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	44
4	配列番号 13 AAC50391.1 (アノ7α-ΔX1)	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	44
5	配列番号 14 XM_005249847.3 (アノ7α-ΔX1)	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	4
6	配列番号 15 NM_001362785.2 (アノ7α-Δ)	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	4
7	配列番号 16 NM_001362785.2	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	4
8	配列番号 17 NM_001362785.2	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	4
9	配列番号 18 NM_006303.4	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	44
10	配列番号 19 NM_001326609.2	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	44
11	配列番号 19 NM_001326610.2	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	44
12	配列番号 19 NM_001326611.3	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	44
13	配列番号 20 コンセンサス配列	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	44
14	配列番号 12 AAH13630.1 (200aa)	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	127
15	配列番号 2 NP_001313536.1 (DX2)	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	58
16	配列番号 14 XM_005249847.3 (アノ7α-ΔX1)	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	58
17	配列番号 13 AAC50391.1 (アノ7α-ΔX1)	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	58
18	配列番号 14 XM_005249847.3 (アノ7α-ΔX1)	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	51
19	配列番号 15 NM_001362785.2 (アノ7α-Δ)	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	14
20	配列番号 16 NM_001362785.2	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	29
21	配列番号 17 NM_001362785.2	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	29
22	配列番号 18 NM_006303.4	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	59
23	配列番号 19 NM_001326609.2	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	59
24	配列番号 19 NM_001326610.2	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	13
25	配列番号 19 NM_001326611.3	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	13
26	配列番号 20 コンセンサス配列	1	MPVQNTPHGGAPLVLEPTCNVLPVTHGSGSPFAGHYGEENLSQALESHDDILRLVELKANGLSMI	13

【図 6 B】

FIG. 6B

1	配列番号 12 AAH13630.1 (200aa)	128	PSPPLSLVWHLLECEHFLSTVHTHSYKSYFENLLKCFEEDKAGPFGDYGLQFTLHNNPKTOMKFSIOTKCP	207
2	配列番号 2 NP_001313536.1 (DX2)	59	PSPPLSLVWHLLECEHFLSTVHTHSYKSYFENLLKCFEEDKAGPFGDYGLQFTLHNNPKTOMKFSIOTKCP	139
3	配列番号 13 AAC50391.1 (アノ7α-ΔX1)	59	PSPPLSLVWHLLECEHFLSTVHTHSYKSYFENLLKCFEEDKAGPFGDYGLQFTLHNNPKTOMKFSIOTKCP	120
4	配列番号 14 XM_005249847.3 (アノ7α-ΔX1)	52	PSPPLSLVWHLLECEHFLSTVHTHSYKSYFENLLKCFEEDKAGPFGDYGLQFTLHNNPKTOMKFSIOTKCP	133
5	配列番号 15 NM_001362785.2 (アノ7α-Δ)	15	PSPPLSLVWHLLECEHFLSTVHTHSYKSYFENLLKCFEEDKAGPFGDYGLQFTLHNNPKTOMKFSIOTKCP	84
6	配列番号 16 NM_001362785.2	30	PSPPLSLVWHLLECEHFLSTVHTHSYKSYFENLLKCFEEDKAGPFGDYGLQFTLHNNPKTOMKFSIOTKCP	100
7	配列番号 17 NM_001362785.2	19	PSPPLSLVWHLLECEHFLSTVHTHSYKSYFENLLKCFEEDKAGPFGDYGLQFTLHNNPKTOMKFSIOTKCP	90
8	配列番号 18 NM_006303.4	59	PSPPLSLVWHLLECEHFLSTVHTHSYKSYFENLLKCFEEDKAGPFGDYGLQFTLHNNPKTOMKFSIOTKCP	198
9	配列番号 19 NM_001326609.2	14	PSPPLSLVWHLLECEHFLSTVHTHSYKSYFENLLKCFEEDKAGPFGDYGLQFTLHNNPKTOMKFSIOTKCP	92
10	配列番号 19 NM_001326610.2	14	PSPPLSLVWHLLECEHFLSTVHTHSYKSYFENLLKCFEEDKAGPFGDYGLQFTLHNNPKTOMKFSIOTKCP	92
11	配列番号 19 NM_001326611.3	14	PSPPLSLVWHLLECEHFLSTVHTHSYKSYFENLLKCFEEDKAGPFGDYGLQFTLHNNPKTOMKFSIOTKCP	92
12	配列番号 20 コンセンサス配列	14	PSPPLSLVWHLLECEHFLSTVHTHSYKSYFENLLKCFEEDKAGPFGDYGLQFTLHNNPKTOMKFSIOTKCP	92
13	配列番号 12 AAH13630.1 (200aa)	208	ESEGNHARFLFSLFQGNHAYATLIDSNWDIAIFQLKEGSSKEAAFFFSNMGALDKSPMLABHETVADYVLSYLQ	287
14	配列番号 2 NP_001313536.1 (DX2)	139	ESEGNHARFLFSLFQGNHAYATLIDSNWDIAIFQLKEGSSKEAAFFFSNMGALDKSPMLABHETVADYVLSYLQ	218
15	配列番号 13 AAC50391.1 (アノ7α-ΔX1)	139	ESEGNHARFLFSLFQGNHAYATLIDSNWDIAIFQLKEGSSKEAAFFFSNMGALDKSPMLABHETVADYVLSYLQ	218
16	配列番号 14 XM_005249847.3 (アノ7α-ΔX1)	102	ESEGNHARFLFSLFQGNHAYATLIDSNWDIAIFQLKEGSSKEAAFFFSNMGALDKSPMLABHETVADYVLSYLQ	211
17	配列番号 15 NM_001362785.2 (アノ7α-Δ)	110	ESEGNHARFLFSLFQGNHAYATLIDSNWDIAIFQLKEGSSKEAAFFFSNMGALDKSPMLABHETVADYVLSYLQ	174
18	配列番号 16 NM_001362785.2	95	ESEGNHARFLFSLFQGNHAYATLIDSNWDIAIFQLKEGSSKEAAFFFSNMGALDKSPMLABHETVADYVLSYLQ	189
19	配列番号 17 NM_001362785.2	95	ESEGNHARFLFSLFQGNHAYATLIDSNWDIAIFQLKEGSSKEAAFFFSNMGALDKSPMLABHETVADYVLSYLQ	179
20	配列番号 18 NM_006303.4	139	ESEGNHARFLFSLFQGNHAYATLIDSNWDIAIFQLKEGSSKEAAFFFSNMGALDKSPMLABHETVADYVLSYLQ	218
21	配列番号 19 NM_001326609.2	94	ESEGNHARFLFSLFQGNHAYATLIDSNWDIAIFQLKEGSSKEAAFFFSNMGALDKSPMLABHETVADYVLSYLQ	179
22	配列番号 19 NM_001326610.2	94	ESEGNHARFLFSLFQGNHAYATLIDSNWDIAIFQLKEGSSKEAAFFFSNMGALDKSPMLABHETVADYVLSYLQ	179
23	配列番号 19 NM_001326611.3	94	ESEGNHARFLFSLFQGNHAYATLIDSNWDIAIFQLKEGSSKEAAFFFSNMGALDKSPMLABHETVADYVLSYLQ	179
24	配列番号 20 コンセンサス配列	94	ESEGNHARFLFSLFQGNHAYATLIDSNWDIAIFQLKEGSSKEAAFFFSNMGALDKSPMLABHETVADYVLSYLQ	179

【図 6 C】

FIG. 6C

1	配列番号 12 AAH13630.1 (200aa)	288	I66CSYTPANYVORHMRSCENAPFNTALKK	320
2	配列番号 2 NP_001313536.1 (DX2)	219	I66CSYTPANYVORHMRSCENAPFNTALKK	261
3	配列番号 13 AAC50391.1 (アノ7α-ΔX1)	219	I66CSYTPANYVORHMRSCENAPFNTALKK	243
4	配列番号 14 XM_005249847.3 (アノ7α-ΔX1)	212	I66CSYTPANYVORHMRSCENAPFNTALKK	244
5	配列番号 15 NM_001362785.2 (アノ7α-Δ)	175	I66CSYTPANYVORHMRSCENAPFNTALKK	207
6	配列番号 16 NM_001362785.2	190	I66CSYTPANYVORHMRSCENAPFNTALKK	222
7	配列番号 17 NM_001362785.2	179	I66CSYTPANYVORHMRSCENAPFNTALKK	211
8	配列番号 18 NM_006303.4	219	I66CSYTPANYVORHMRSCENAPFNTALKK	251
9	配列番号 19 NM_001326609.2	174	I66CSYTPANYVORHMRSCENAPFNTALKK	206
10	配列番号 19 NM_001326610.2	174	I66CSYTPANYVORHMRSCENAPFNTALKK	206
11	配列番号 19 NM_001326611.3	174	I66CSYTPANYVORHMRSCENAPFNTALKK	206
12	配列番号 20 コンセンサス配列	174	I66CSYTPANYVORHMRSCENAPFNTALKK	198

【図 7 - 1】

FIG. 7A

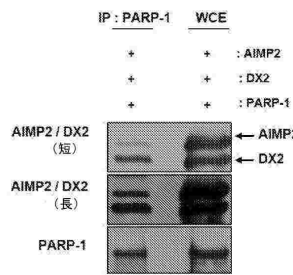


FIG. 7B

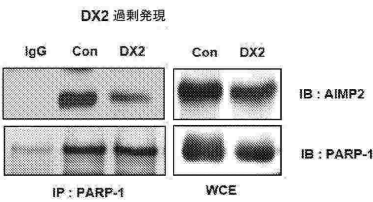
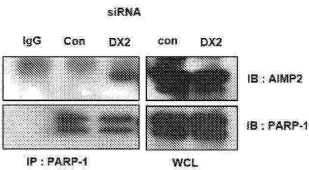


FIG. 7C



【図 7 - 3】

FIG. 7F

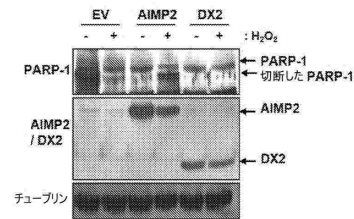


FIG. 7G

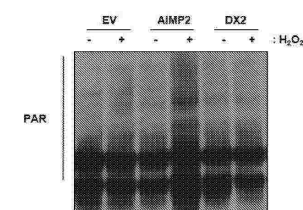
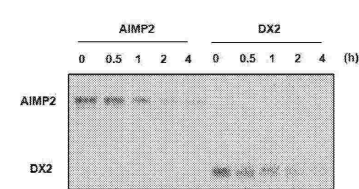


FIG. 7H



【図 7 - 2】

FIG. 7D

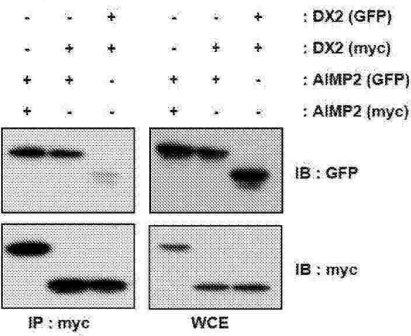
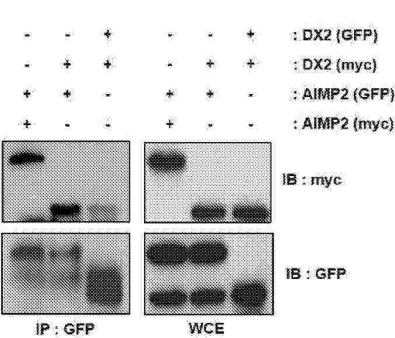
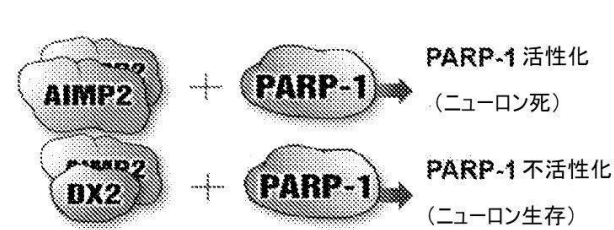


FIG. 7E



【図 7 - 4】

FIG. 7I



10

20

30

40

50

【図 8 - 1】

FIG. 8A

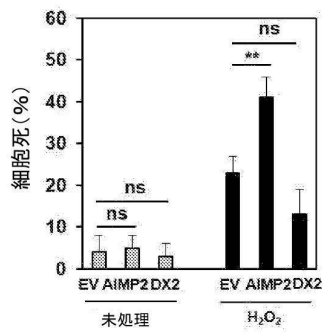
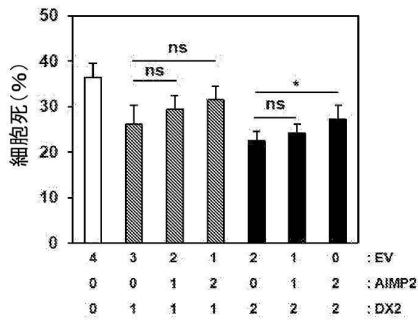
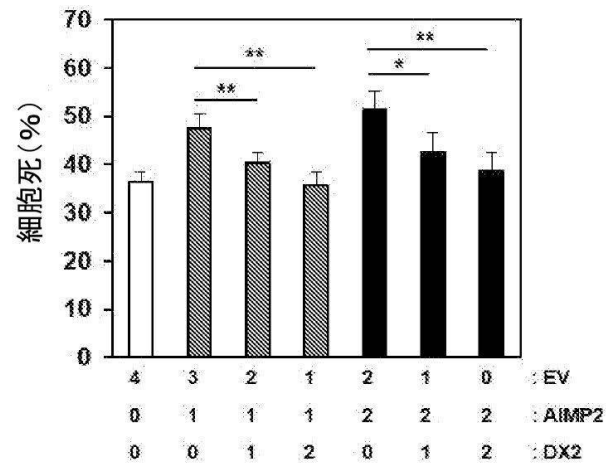


FIG. 8B



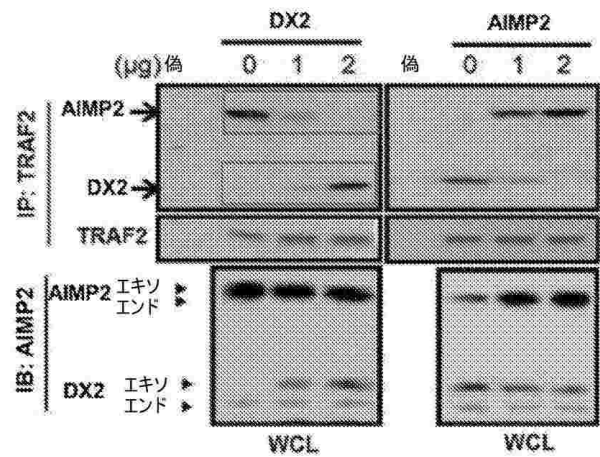
【図 8 - 2】

FIG. 8C



【図 9 - 1】

FIG. 9A



【図 9 - 2】

FIG. 9B

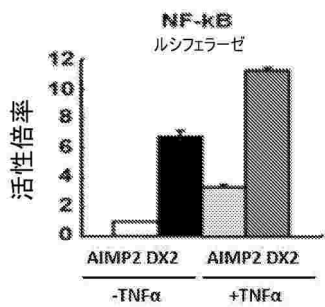
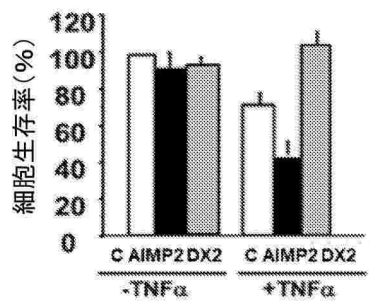


FIG. 9C



10

20

30

40

50

【図 10】

FIG. 10A

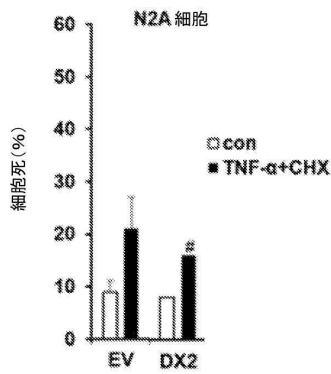
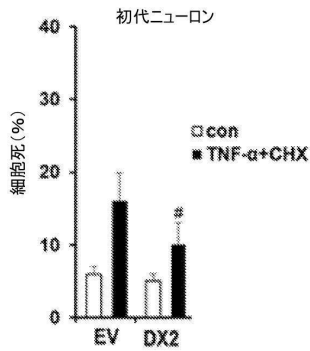


FIG. 10B



【図 12 - 1】

FIG. 12A

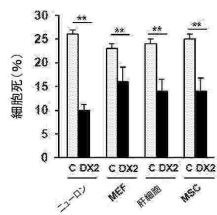


FIG. 12B

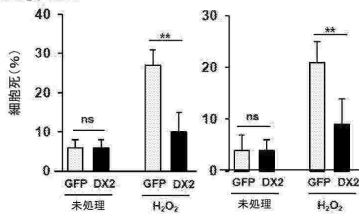
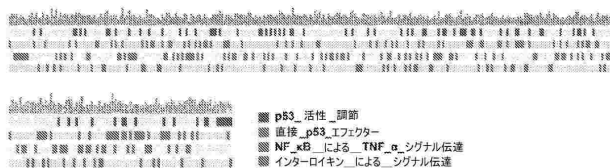


FIG. 12C



【図 11】

FIG. 11A

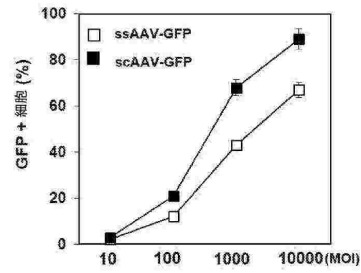
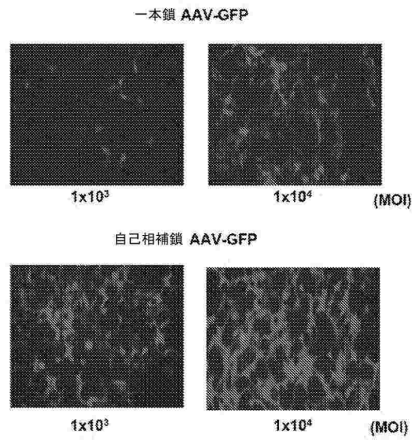


FIG. 11B



【図 12 - 2】

FIG. 12D

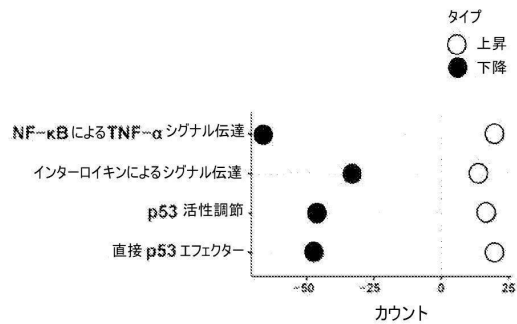
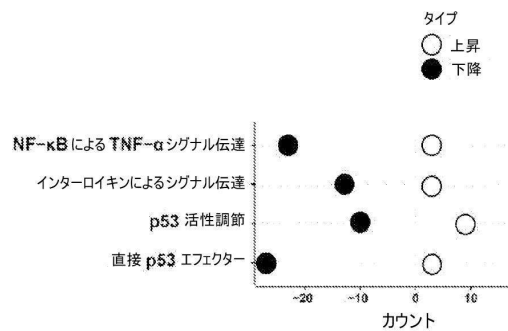


FIG. 12E



10

20

30

40

50

【 図 1 2 - 3 】
FIG. 12F

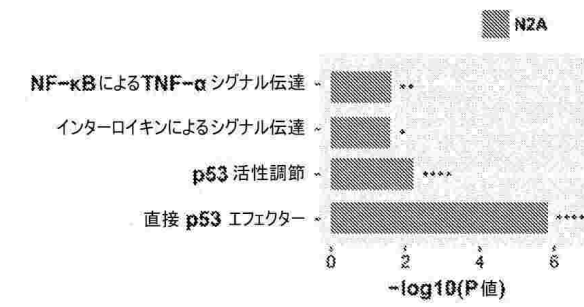
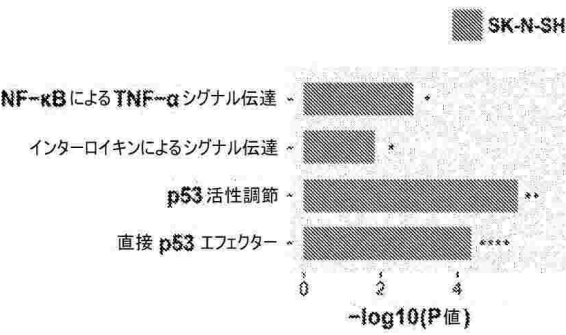
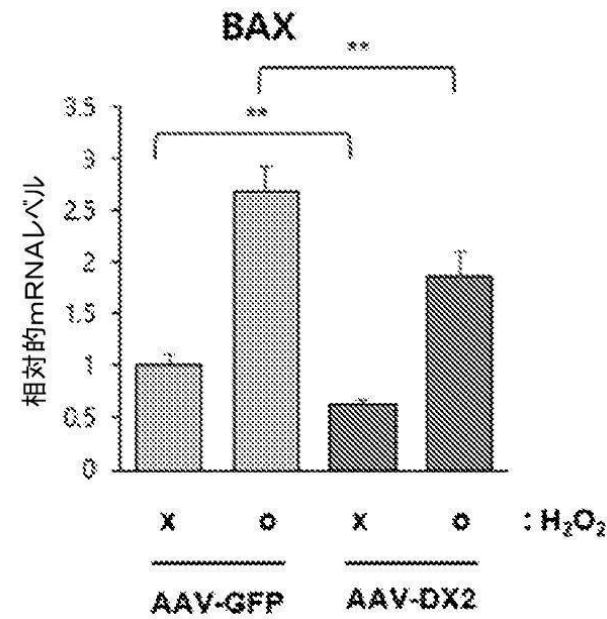


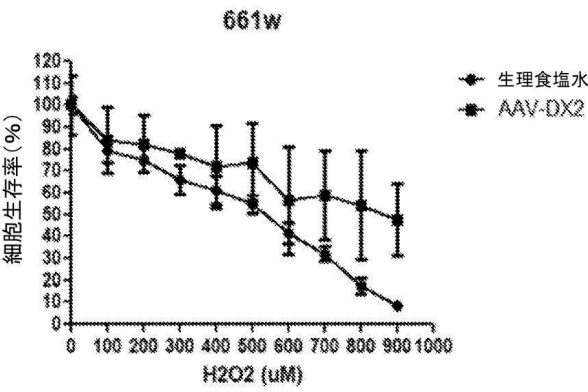
FIG. 12G



【 図 1 4 】
FIG. 14



【 図 1 3 】
FIG. 13



【 図 1 5 】
FIG. 15A

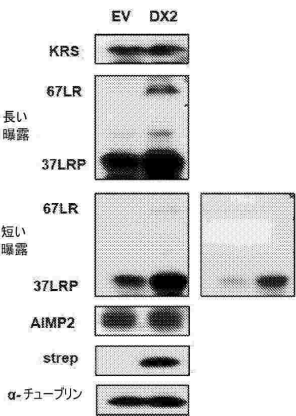
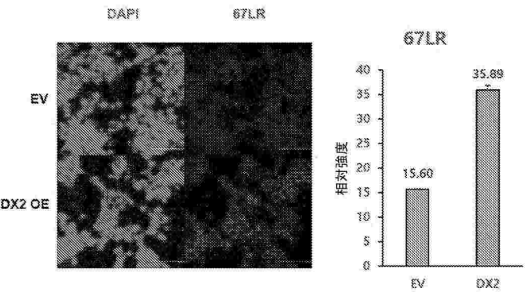


FIG. 15B



10

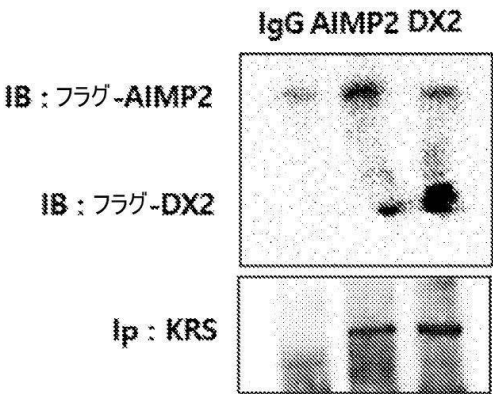
20

30

40

50

【図 1 6】
FIG. 16



【図 1 7】
FIG. 17A

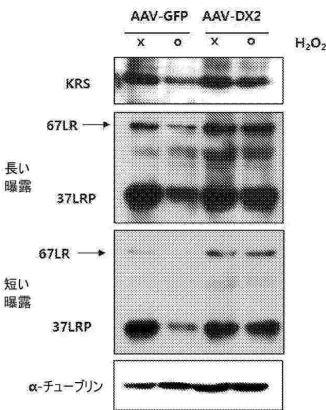
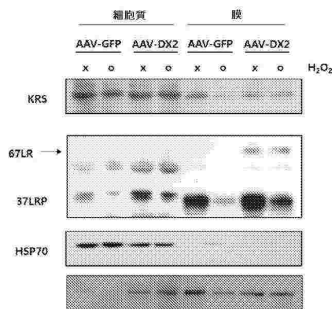


FIG. 17B



【図 1 8 - 1】
FIG. 18A

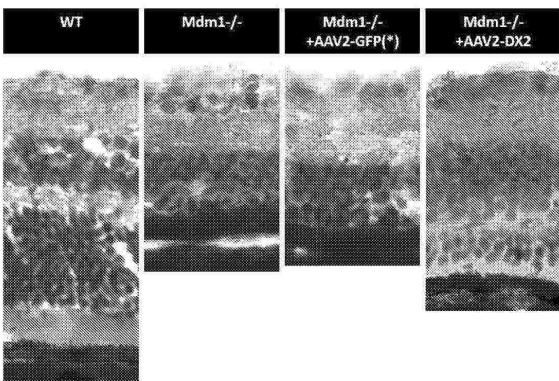
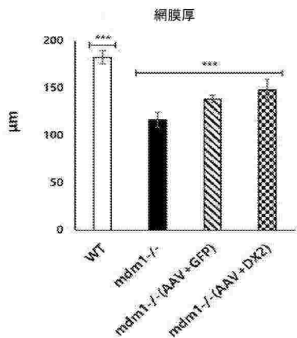


FIG. 18B



【図 1 8 - 2】
FIG. 18C

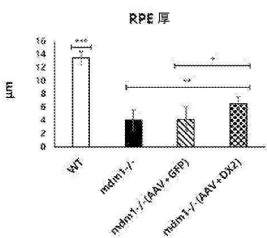


FIG. 18E

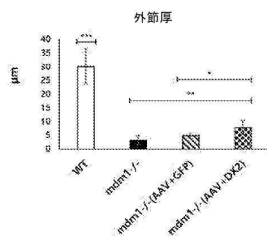


FIG. 18D

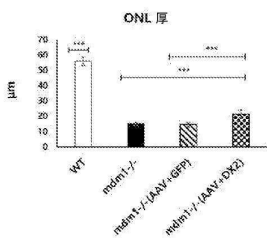
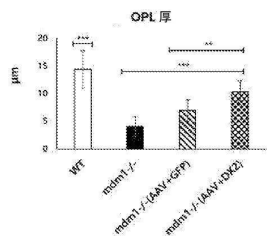


FIG. 18F



10

20

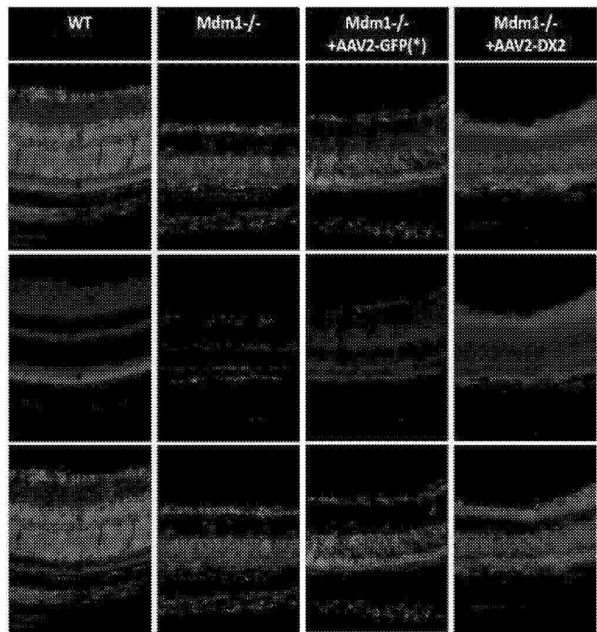
30

40

50

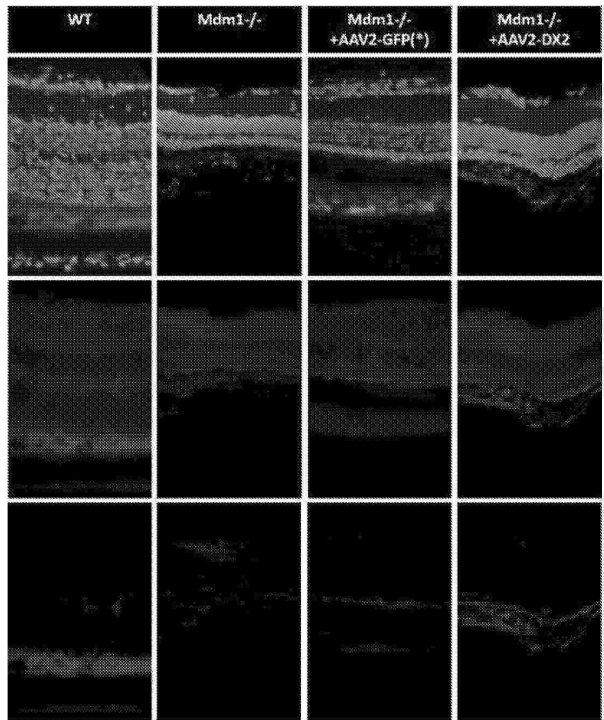
【 図 1 8 - 3 】

FIG. 18G



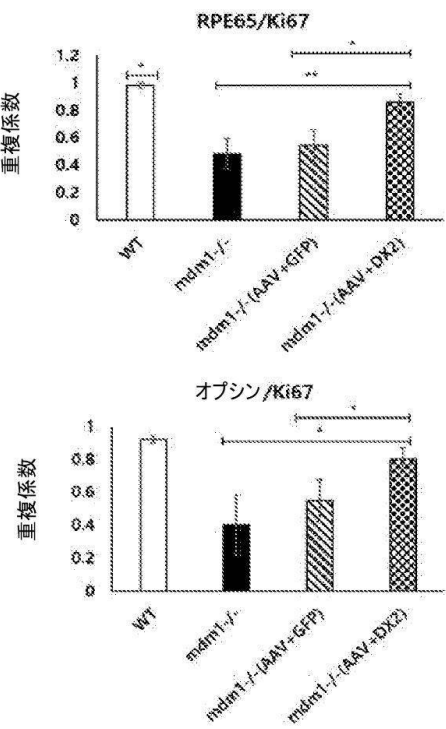
【 図 1 8 - 4 】

FIG. 18H



【 図 1 8 - 5 】

FIG. 18I



【 図 1 8 - 6 】

FIG. 18J

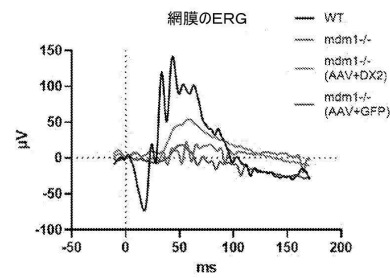
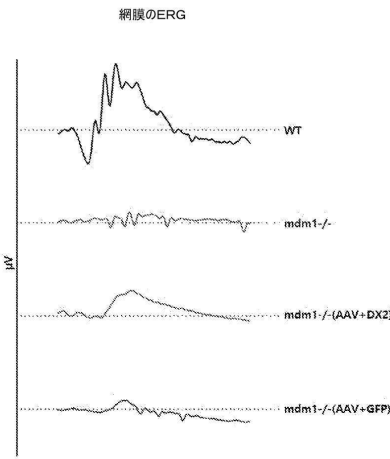


FIG. 18K



10

20

30

40

50

【図 18 - 7】

FIG. 18L

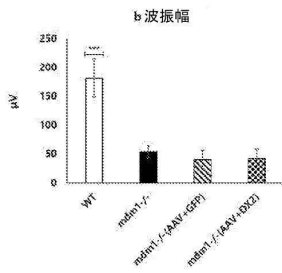


FIG. 18M

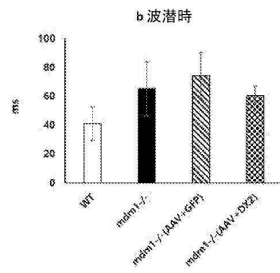


FIG. 18N

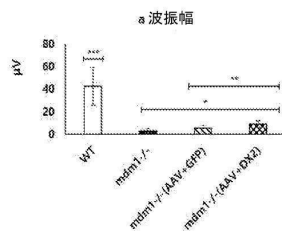
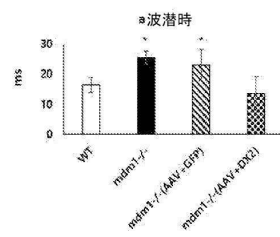


FIG. 18O



【図 19 - 1】

FIG. 19A

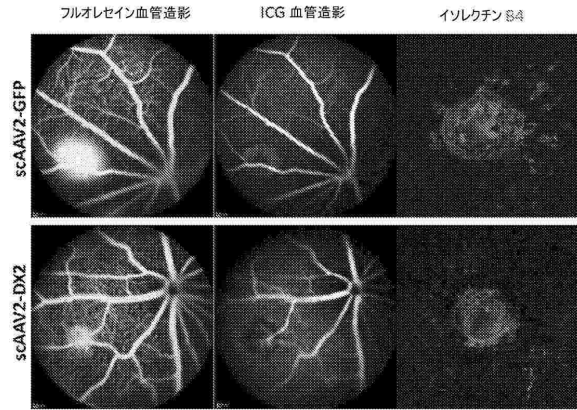


FIG. 19B

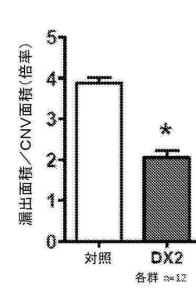


FIG. 19C

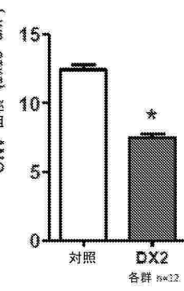
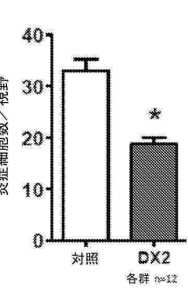
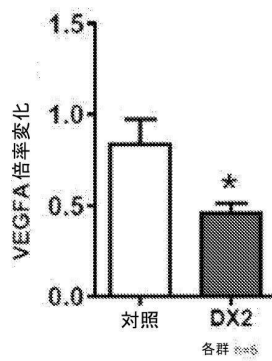
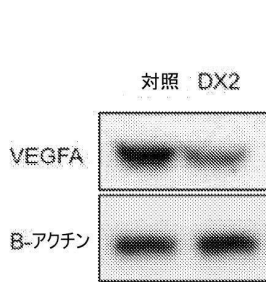


FIG. 19D



【図 19 - 2】

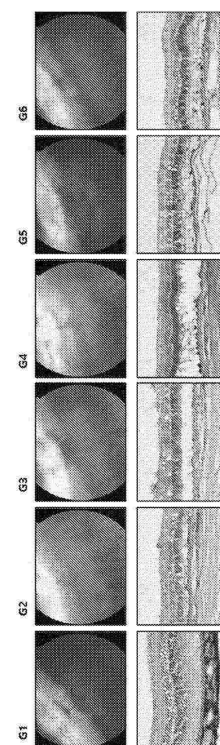
FIG. 19E



【図 20 - 1】

FIG. 20A

FIG. 20B



10

20

30

40

50

【図 20-2】

FIG. 20C

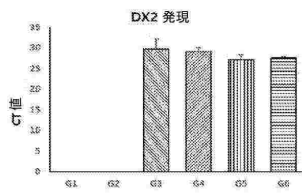


FIG. 20D

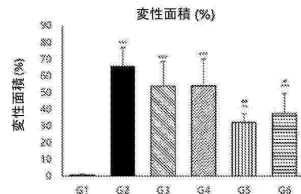


FIG. 20E

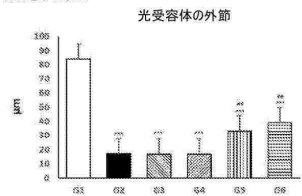
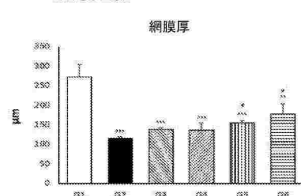


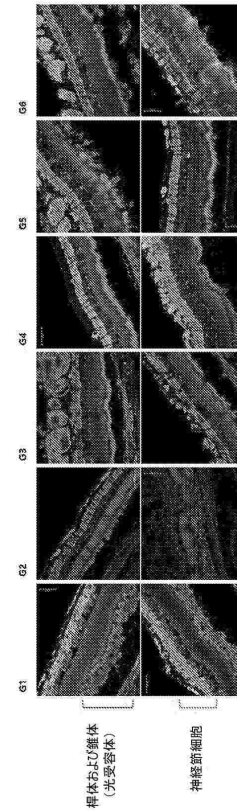
FIG. 20F



【図 20-3】

FIG. 20G

FIG. 20H

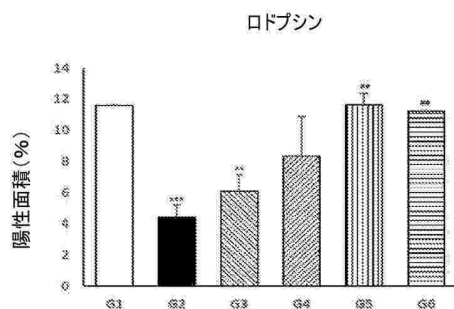


10

20

【図 20-4】

FIG. 20I



【図 20-5】

FIG. 20K

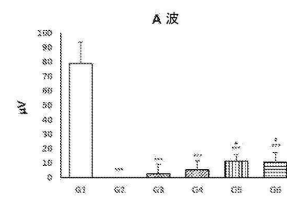
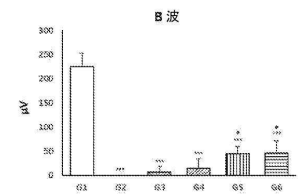


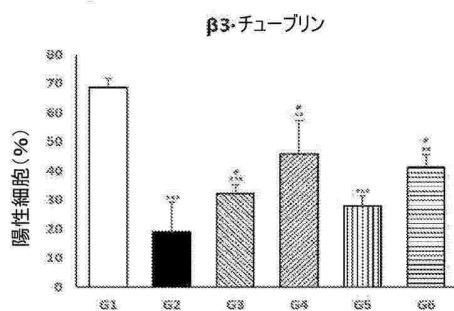
FIG. 20L



30

40

FIG. 20J



50

【図 2 1】

FIG. 21A

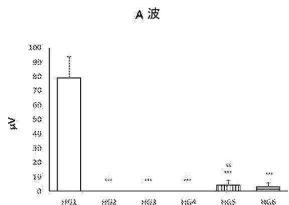
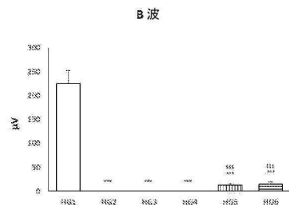


FIG. 21B



【図 2 2】

FIG. 22A

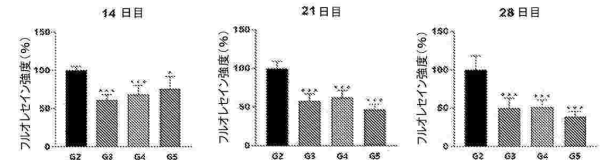
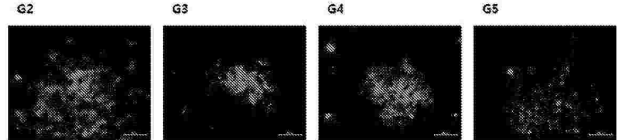


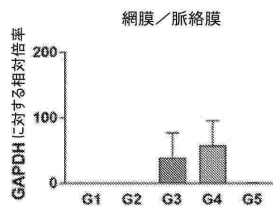
FIG. 22B



10

【図 2 3 - 1】

FIG. 23A



【図 2 3 - 2】

FIG. 23H

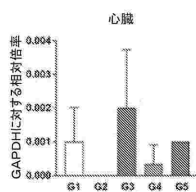


FIG. 23I

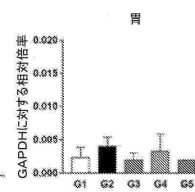
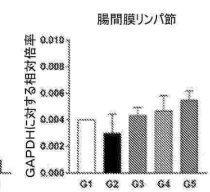


FIG. 23J



20

FIG. 23B

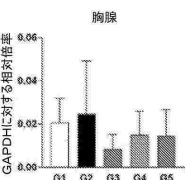


FIG. 23C

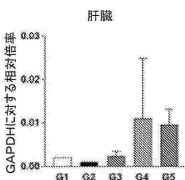


FIG. 23D

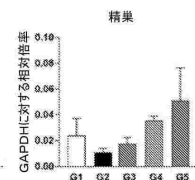


FIG. 23K

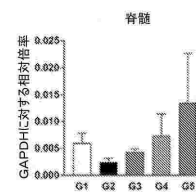


FIG. 23L

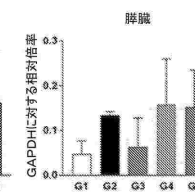
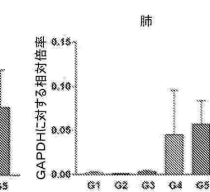


FIG. 23M



30

FIG. 23E

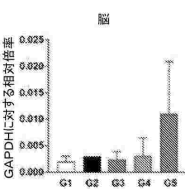


FIG. 23F

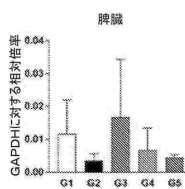
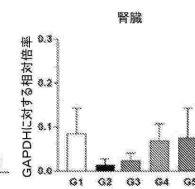


FIG. 23G



40

【配列表】

2025516639000001.xml

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2023/054956
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 48/00(2006.01); A61P 27/02(2006.01); C12N 15/86(2006.01); C12N 15/113(2010.01) 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) A61K 48/00(2006.01); A61K 31/7105(2006.01); A61P 9/00(2006.01); C07H 21/04(2006.01); C07K 14/435(2006.01); C07K 14/47(2006.01); C12N 15/86(2006.01); C12N 7/00(2006.01); C12Q 1/68(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: exon 2-deleted AIMP2 variant gene, retinal degenerative disease, recombinant vector, retinitis pigmentosa, glaucoma, diabetic retinopathy		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020-0325454 A1 (GENEROATH CO., LTD.) 15 October 2020 (2020-10-15) claims 1, 21, 22; paragraph [0022]	1-3
A	WO 2022-055320 A1 (GENEROATH CO., LTD.) 17 March 2022 (2022-03-17) whole documents	1-3
A	US 2006-0110397 A1 (KIM, S.) 25 May 2006 (2006-05-25) whole documents	1-3
A	WO 2007-000668 A2 (FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE DEL MONTE TABOR et al.) 04 January 2007 (2007-01-04) whole documents	1-3
A	CN 107184594 A (QINGDAO UNIVERSITY) 22 September 2017 (2017-09-22) whole documents	1-3
☐ 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 05 September 2023		Date of mailing of the international search report 05 September 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. +82-42-481-5373

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2023/054956

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.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2023/054956

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **7, 10, 16, 20, 23, 26**
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:

Claims 7, 10, 16, 20, 23, 26 are unclear since they are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).
3. ☒ Claims Nos.: **4-6, 8, 9, 11-15, 17-19, 21, 22, 24, 25**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/IB2023/054956

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
US	2020-0325454	A1	15 October 2020	AU	2020-244321	A1	13 May 2021
				BR	112021010235	A2	01 February 2022
				CA	3115637	A1	24 September 2020
				CN	113166777	A	23 July 2021
				EA	202191208	A1	04 August 2021
				EP	3870710	A1	01 September 2021
				JP	2022-513454	A	08 February 2022
				JP	7291423	B2	15 June 2023
				KR	10-2020-0110055	A	23 September 2020
				KR	10-2248420	B1	06 May 2021
				KR	10-2248420	B9	30 September 2022
				WO	2020-188472	A1	24 September 2020
				WO	2020-188472	A9	26 November 2020
WO	2022-055320	A1	17 March 2022	KR	10-2022-0035693	A	22 March 2022
US	2006-0110397	A1	25 May 2006	EP	1814909	A1	08 August 2007
				EP	1814909	B1	24 August 2011
				KR	10-0762995	B1	04 October 2007
				KR	10-2006-0058014	A	29 May 2006
				US	7459529	B2	02 December 2008
				WO	2006-057500	A1	01 June 2006
WO	2007-000668	A2	04 January 2007	CA	2609142	A1	04 January 2007
				CA	2609142	C	09 February 2016
				CN	101287834	A	15 October 2008
				CN	101287834	B	09 November 2016
				DK	2002003	T3	21 March 2016
				EP	2002003	A2	17 December 2008
				EP	2002003	B1	30 December 2015
				EP	3002330	A1	06 April 2016
				JP	2008-545406	A	18 December 2008
				JP	2013-226139	A	07 November 2013
				JP	5956709	B2	27 July 2016
				KR	10-1373548	B1	25 March 2014
				KR	10-2008-0041601	A	13 May 2008
				KR	10-2013-0114758	A	17 October 2013
				SG	162726	A1	29 July 2010
				SI	2002003	T1	31 May 2016
				SI	EP2002003	T1	31 May 2016
				US	10000757	B2	19 June 2018
				US	2010-0041737	A1	18 February 2010
				US	2015-0167003	A1	18 June 2015
				US	2019-0032059	A1	31 January 2019
				US	9556438	B2	31 January 2017
				WO	2007-000668	A3	21 December 2007
				CN	107184594	A	22 September 2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

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 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28		
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00		
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17		
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761		
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76		
A 6 1 K	35/763 (2015.01)	A 6 1 K	35/763		
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395		N
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		Z N A
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113		Z
C 1 2 N	15/861 (2006.01)	C 1 2 N	15/861		Z
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0	Z
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867		Z
C 1 2 N	15/869 (2006.01)	C 1 2 N	15/869		Z
C 0 7 K	16/24 (2006.01)	C 0 7 K	16/24		

,MC,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW
大韓民国 0 7 0 2 8 ソウル, ドンジャクーグ, サダンーロ 2 ガーギル, 1 0 2, 1 0 1 - 3 0 2

(72)発明者 ベク, キュンファ

大韓民国 2 5 4 9 5 ガンウォンード, ガンヌンーシ, ガジャクーロ 7 8, ギョー１ードン, 1 1 3 - 7 0 1, ギョ 1 ジュコン アパートメント

F ターム (参考) 4C084 AA13 AA19 BA41 BA44 DB63 MA02 MA16 MA58 MA66 NA14
ZA02 ZA16 ZA33 ZC35 ZC75
4C085 AA14 BB31 BB41 CC23 EE01 EE03 GG01
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA02 MA16 MA58 MA66 NA14 ZA02
ZA16 ZA33 ZC35 ZC75
4H045 AA30 CA40 DA76 EA20