



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119343154 A

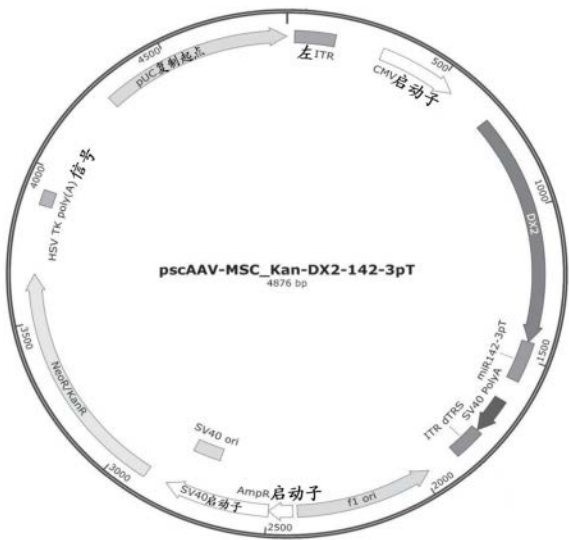
(43) 申请公布日 2025. 01. 21

(21) 申请号	202380039975.2	(74) 专利代理机构	北京市中咨律师事务所
(22) 申请日	2023.05.13		11247
(30) 优先权数据		专利代理师	黄革生 隋晓平
	63/341,798 2022.05.13 US	(51) Int.Cl.	
(85) PCT国际申请进入国家阶段日		A61K 48/00 (2006.01)	
	2024.11.12	A61P 27/02 (2006.01)	
(86) PCT国际申请的申请数据		C12N 15/86 (2006.01)	
	PCT/IB2023/054956 2023.05.13	C12N 15/113 (2006.01)	
(87) PCT国际申请的公布数据			
	W02023/218430 EN 2023.11.16		
(71) 申请人	杰内罗蒂股份有限公司		
地址	韩国		
(72) 发明人	崔镇宇 白京和		

权利要求书2页 说明书38页
序列表（电子公布） 附图41页

(54) 发明名称
使用AIMP2-DX2和任选的miR-142靶序列及其组合物治疗视网膜退行性疾病的方法

(57) 摘要
本文公开了治疗视网膜退行性疾病的方法，包括向有需要的个体施用包含AIMP2-DX2和任选的miR-142靶序列的载体。



1. 一种治疗有需要的个体的视网膜退行性疾病的方法,其包括向所述个体施用药学有效量的包含外显子2缺失的AIMP2变体(AIMP2-DX2)基因的重组载体。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中视网膜退行性疾病是视网膜色素变性、Leber先天性黑蒙、视锥-视杆细胞营养不良、青光眼或糖尿病性视网膜病。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中视网膜退行性疾病在帕金森病、阿尔茨海默病或肌萎缩性侧索硬化症之前或伴随其发生。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中视网膜退行性疾病不是年龄相关性黄斑疾病。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中载体还包含miR-142靶序列。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中载体还包含与AIMP2-DX2可操作连接的启动子。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中启动子是逆转录病毒(LTR)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子、MT启动子、EF-1 α 启动子、UB6启动子、鸡 β -肌动蛋白启动子、CAG启动子、RPE65启动子、突触蛋白启动子、MeCP2启动子、CaMKII启动子、Hb9启动子或视蛋白启动子。

8. 根据权利要求5-7中任一项所述的方法,其中miR-142靶序列位于AIMP2-DX2基因的3'。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中AIMP2-DX2基因包含编码与SEQ ID NO: 2、13、14、15、16、17、18、19或20至少90%相同的氨基酸序列的核苷酸序列。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中AIMP2-DX2基因包含编码SEQ ID NO: 2、13、14、15、16、17、18、19或20的氨基酸序列的核苷酸序列。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中AIMP2-DX2基因不具有这样的外显子,所述外显子包含编码与SEQ ID NO: 10或11至少90%相同的氨基酸序列的核苷酸序列。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中AIMP2-DX2基因不具有这样的外显子,所述外显子包含编码SEQ ID NO: 10或11的氨基酸序列的核苷酸序列。

13. 根据权利要求5-12中任一项所述的方法,其中miR-142靶序列包含ACACTA。

14. 根据权利要求5-12中所述的方法,其中miR-142靶序列包含ACACTA和SEQ ID NO: 5的1-17个另外的连续核苷酸。

15. 根据权利要求5-12中任一项所述的方法,其中miR-142靶序列包含与SEQ ID NO: 5 (TCCATAAAGTAGGAAACTACA)的核苷酸序列至少50%相同的核苷酸序列。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中miR-142靶序列包含SEQ ID NO: 5的核苷酸序列。

17. 根据权利要求5-12中任一项所述的方法,其中miR-142靶序列包含ACTTTA。

18. 根据权利要求5-12所述的方法,其中miR-142靶序列包含ACTTTA和SEQ ID NO: 7的1-15个另外的连续核苷酸。

19. 根据权利要求5-12中任一项所述的方法,其中miR-142靶序列包含与SEQ ID NO: 7 (AGTAGTGCTTTCTACTTTATG)的核苷酸序列至少50%相同的核苷酸序列。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中miR-142靶序列包含SEQ ID NO: 7的核苷酸序列。

21. 根据权利要求5-20中任一项所述的方法,其中miR-142靶序列重复2-10次。

22. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中载体是病毒载体。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中病毒载体是腺病毒、腺相关病毒、慢病毒、逆转录病毒、人免疫缺陷病毒 (HIV)、鼠白血病病毒 (MLV)、禽类肉瘤/白血病 (ASLV)、脾坏死病毒 (SNV)、劳斯肉瘤病毒 (RSV)、小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV)、痘苗病毒或单纯疱疹病毒载体。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的方法, 其中重组载体通过玻璃体内注射、结膜下注射或视网膜下腔局部施用至个体。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的方法, 其还包括向所述个体施用另外的治疗剂。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中另外的治疗剂是雷珠单抗、阿柏西普或贝伐珠单抗。

使用AIMP2-DX2和任选的miR-142靶序列及其组合物治疗视网膜退行性疾病的方法

电子提交的序列表的引用

[0001] 与本申请一起提交的ST26文件中的电子提交序列表(名称:2493-0006W001.xml_Sequence Listing_ST25.txt;大小:36KB;创建日期:2023年5月8日)的内容通过引用整体并入本文中。

技术领域

[0002] 本文公开了治疗视网膜退行性疾病的方法,包括向有需要的个体施用包含AIMP2-DX2和任选的miR-142靶序列的载体。

发明背景

[0003] 视网膜退行性疾病的特征是一种或两种视网膜细胞类型的变性,例如年龄相关性黄斑疾病(AMD)和视网膜色素变性(RP)中的视网膜色素上皮(RPE)和/或感光细胞损失,以及青光眼中的视网膜神经节细胞(RGC)死亡。通常,变性的视网膜细胞引起的视力障碍是不可逆的,因为视网膜细胞缺乏自我修复能力。

[0004] 通过光学相干层析成像(OCT)可以观察到AMD患者的异常RPE细胞。在视网膜色素变性(RP)患者中,RPE和光感受器层的形态和功能异常是由基因异常引起的。Stargardt病或青少年黄斑变性的特征是黄斑区域RPE和光感受器的丧失,会导致早期中央视力丧失。在青光眼患者中可以观察到视网膜神经节细胞(RGC)的丧失。一旦引发视网膜细胞变性,任何治疗都无法逆转它。

[0005] 在视网膜中,光信号被转换成电信号。视网膜中这一关键过程需要各种相互连接的细胞类型来完成,例如感光细胞、双极细胞、水平细胞、无长突细胞和视网膜神经节细胞(RGC)。每种细胞类型在视觉信号传导过程中都发挥着不可或缺的作用。视觉信号传导始于感光细胞,感光细胞主要在外节表达感光蛋白。Jin ZB等人(2019)。

[0006] 在人类视网膜中,两种类型的感光细胞,视杆细胞和视锥细胞,分别负责暗光视觉和日光视觉(包括颜色)。视杆细胞主要位于周边的视网膜,而视锥细胞则集中在视网膜的一小部分,即黄斑,黄斑提供高分辨率的中央视觉。双极细胞从感光细胞接收视觉信号,并将这些信号传输到由水平细胞和无长突细胞协调的RGC。最终,所有信号都聚集在视神经中并传输到大脑。细胞变性和突触破坏都可能导致永久性视力损伤甚至失明。参见,Jin 2019。

[0007] 年龄相关性黄斑疾病(AMD)是欧洲、美国和澳大利亚视力丧失的主要原因。80岁以上的人口中,几乎三分之二会出现湿性或渗出性AMD的迹象,其特征是存在玻璃膜疣和CNV(中央凹下脉络膜血管新生)。AMD是一种慢性进行性疾病,其特征是视网膜中央区受损。脉络膜毛细血管层(choriocapillary)、视网膜色素上皮(RPE)和布鲁赫膜(Bruch's membrane)(衰老的典型特征)的变化是AMD发病机制的基础;然而,在病理过程中引发典型年龄相关变化转移的机制尚不清楚。光感受器死亡和不可逆的视力丧失是RPE和脉络膜病理变化的结果。最近的研究表明,不仅凋亡,而且自噬和坏死信号级联也参与视网膜细胞的

细胞死亡 (Telegina 2017)。

[0008] 该病可分为“干性”和“湿性”两种类型。约90%的病例属于“干性”萎缩性AMD;目前尚无治疗方法。在“干性”AMD中,黄斑区会出现玻璃膜疣,色素重新分布,色素上皮和脉络膜血管层出现缺损,以及在RPE细胞萎缩的背景下,光感受器死亡。~10%的AMD患者会出现“湿性”(渗出性)类型,其特征是新生血管通过视网膜色素上皮或神经上皮下的布鲁赫膜缺损长入。新生血管的通透性增加导致视网膜水肿、渗出以及玻璃体和视网膜出血(最终成为视力丧失的原因)。

[0009] 目前,激光诱导的布鲁赫膜光凝模型是最广泛接受和最常用的实验小鼠CNV模型。本文描述的模型包括激光冲击破裂布鲁赫膜,导致新血管从脉络膜生长到视网膜下空间,模仿人类AMD渗出性形式的主要特征,并提供了通过使用大量转基因小鼠探索CNV分子机制的机会。该模型已被证明适用于通过全身或局部(眼内)给药测试新药的疗效,并已在AMD患者中显示出对药物效果的预测价值,例如,使用血管内皮生长因子受体(VEGFR)陷阱或醋酸阿奈可他(anecortave acetate) (Telegina 2017)。

[0010] 有三种主要药物通过阻断视网膜中的血管内皮生长因子(VEGF)提供间接的抗血管生成作用。雷珠单抗(Ranibizumab) (Lucentis, Genentech Inc., 加利福尼亚州南旧金山;由诺华公司在全球范围内商业化)于2006年获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于治疗新生血管性AMD (Hernández-Zimbrón 2018)。它是一种重组人源化免疫球蛋白(Ig)G1 κ 同种型单克隆抗原结合片段(Fab),以高亲和力靶向和结合VEGF-A。阿柏西普(Aflibercept) (Regeneron, 塔里敦, 纽约;由拜耳公司在全球范围内商业化)于2011年获得FDA批准。它是一种融合蛋白,结合了人类VEGF受体1和2的两个关键结合结构域以及人IgG1的片段可结晶(Fc)区。最后,贝伐珠单抗(bevacizumab) (Genentech Inc., 加利福尼亚州南旧金山;由罗氏公司在全球范围内商业化)是一种全长人源化抗体,可结合和阻断所有VEGF亚型。

[0011] 氧化应激可引发细胞凋亡,其活化和募集巨噬细胞并诱发炎症。细胞凋亡可能是脉络膜炎症的诱因之一,从而导致CNV模型中的血管生成 (Du 2013)。

[0012] 最常见的隐性RP形式是X连锁RP,由视网膜色素变性GTPase调节器(RPGR)基因突变引起。Talib M等人(2018)。X连锁RP的特征是儿童时期视杆细胞和视锥细胞光感受器的变性,导致视野收缩和早期严重视力丧失。尽管在动物模型中取得了有希望的结果 (Bennett J (2017); Boye SE等人(2013); Sahel JA等人(2014); Vandenberghe LH (2015)), 但针对人类RPGR相关RP的光感受器变性的基因治疗至今尚未完全开发。使用腺相关病毒载体的基因治疗被认为是治疗这种病症最有希望的方法 (Megaw RD等人(2015)), 尽管RPGR编码序列固有的不稳定性对将这种疗法转化为人体试验带来了挑战。

[0013] 针对RPE65相关视网膜变性的基因治疗获批是临床基因治疗应用的重大突破,并赋予了治疗多种遗传疾病的潜力。Russell S等人(2017)。然而,RPGR编码序列具有固有的不稳定性,其中包含重复的富含嘌呤的区域并发生可变剪接,给该疗法转化为人体试验带来了挑战。Deng WT等人(2015); Pawlyk BS等人(20016); Sun X等人(2016); Wu Z等人(2015)。

[0014] 神经退行性疾病(NDD)是一组异质性疾病,其特征是中枢和外周神经系统的进行性结构和功能变性。由于眼睛与大脑的特殊联系以及易于测量的特点,眼睛为观察大脑提供了一个独特的窗口,因此可以非侵入性地获取大量可能有助于NDD早期诊断和临床护理

的潜在生物标志物。

[0015] 除了传统的与年龄和遗传有关的视力疾病(如黄斑变性)外,帕金森病和阿尔茨海默病等中枢神经系统病症也会影响患者的视力。这些疾病可导致视神经、视网膜细胞和周围视觉结构的直接或逆向变性。虽然这些病症通常并不明显,但它们会影响协调性、活动能力和视觉感知,从而增加跌倒和相关伤害的风险。

[0016] AIMP2-DX2是AIMP2的替代拮抗性剪接变体,AIMP2是一种多因子凋亡基因。已知AIMP2-DX2通过阻碍AIMP2的功能来抑制细胞凋亡。AIMP2-DX2作为AIMP2的竞争性抑制剂,通过抑制TRAF2的泛素化/降解来抑制TNF- α 介导的细胞凋亡。此外,据报道AIMP2-DX2已被证实为现有的肺癌诱导因子,并且在现有研究中,已证实在癌细胞中广泛表现的AIMP2-DX2通过干扰AIMP2的癌症抑制功能来诱发癌症。此外,还发现AIMP2-DX2在正常细胞中的表现会促进细胞癌变,而抑制AIMP2-DX2的表现会抑制癌症生长,从而显示治疗效果。

[0017] 研究还确定了AIMP2-DX2可用于治疗神经元疾病(KR10-2015-0140723(2017)和US2019/0298858(2019))。

发明内容

[0018] 本发明公开了治疗有需要的个体的视网膜退行性疾病的方法,包括向个体施用药学有效量的包含外显子2缺失的AIMP2变体(AIMP2-DX2或DX2)的核酸分子。在一些实施方案中,核酸分子是病毒载体或非病毒载体,例如重组载体。

[0019] 本文还公开了药理学有效量的包含外显子2缺失的AIMP2变体(AIMP2-DX2或DX2)的核酸分子在治疗有需要的个体的视网膜退行性疾病中的用途。本文还公开了药理学有效量的包含AIMP2-DX2的核酸分子在治疗有需要的个体的视网膜退行性疾病中的用途。本文还公开了药理学有效量的包含AIMP2-DX2的核酸分子在制造用于治疗有需要的个体的视网膜退行性疾病的药物中的用途。

[0020] 本文公开了治疗有需要的个体的视网膜退行性疾病的方法,包括向个体施用药学有效量的包含外显子2缺失的AIMP2变体(AIMP2-DX2或DX2)基因的重组载体。

[0021] 本文还公开了药理学有效量的包含外显子2缺失的AIMP2变体(AIMP2-DX2或DX2)的重组载体在治疗有需要的个体的视网膜退行性疾病中的用途。本文还公开了药理学有效量的包含AIMP2-DX2的重组载体在治疗有需要的个体的视网膜退行性疾病中的用途。本文还公开了药理学有效量的包含AIMP2-DX2的重组载体在制造用于治疗有需要的个体的视网膜退行性疾病的药物中的用途。

[0022] 在一些实施方案中,核酸分子通过与Galnac的化学结合、细胞穿透肽、核酸或糖肽介导的工具、合成化合物载体来施用;脂质介导的递送,例如脂质纳米颗粒包封;无机载体介导的递送,例如无机载体;生物递送,例如外泌体介导的递送;或物理递送,例如通过微/纳米针、压力灌注、微粒、电能/电穿孔/离子电渗疗法、声穿孔、磁穿孔或光穿孔/光动力能。

[0023] 在一些实施方案中,视网膜退行性疾病是视网膜色素变性、Leber先天性黑蒙、视锥-视杆细胞营养不良(cone-rod dystrophy)、青光眼或糖尿病性视网膜病。在一些实施方案中,视网膜退行性疾病在帕金森病、阿尔茨海默病或肌萎缩性侧索硬化症之前或伴随其发生。在一些实施方案中,视网膜退行性疾病不是年龄相关性黄斑疾病。在一些实施方案中,治疗视网膜退行性疾病的方法不包括治疗年龄相关性黄斑疾病(AMD)。在一些实施方案

中,AMD是湿性AMD。在一些实施方案中,AMD是干性AMD。

[0024] 重组载体还可包含miR-142靶序列。

[0025] 载体还可包含与AIMP2-DX2可操作连接的启动子。在一些实施方案中,启动子是逆转录病毒(LTR)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子、MT启动子、EF-1 α 启动子、UB6启动子、鸡 β -肌动蛋白启动子、CAG启动子、RPE65启动子或视蛋白启动子。

[0026] miR-142靶序列可以位于AIMP2-DX2基因的3'端。

[0027] 在一些实施方案中,AIMP2-DX2基因包含编码与SEQ ID NO:2、13、14、15、16、17、18、19或20至少90%相同的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0028] 在一些实施方案中,AIMP2-DX2基因包含编码SEQ ID NO:2、13、14、15、16、17、18、19或20的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0029] 在一些实施方案中,AIMP2-DX2基因不具有这样的外显子,所述外显子包含编码与SEQ ID NO:10或11至少90%相同的氨基酸序列的核苷酸序列的外显子。

[0030] 在一些实施方案中,AIMP2-DX2基因不具有这样的外显子,所述外显子包含编码SEQ ID NO:10或11的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0031] miR-142靶序列可以包含含有ACACTA的核苷酸序列。在一些实施方案中,miR-142靶序列包含ACACTA和SEQ ID NO:5的1-17个另外的连续核苷酸。在一些实施方案中,miR-142靶序列包含与SEQ ID NO:5(TCCATAAAGTAGGAAACACTACA;miR-142-3p靶序列)的核苷酸序列至少50%相同的核苷酸序列。在一些实施方案中,miR-142靶序列可包含SEQ ID NO:5的核苷酸序列。

[0032] 在一些实施方案中,miR-142靶序列包含ACTTTA。在一些实施方案中,miR-142靶序列包含ACTTTA和SEQ ID NO:7的1-15个另外的连续核苷酸。在一些实施方案中,miR-142靶序列包含与SEQ ID NO:7(AGTAGTGCTTTCTACTTTATG;miR-142-5p靶序列)的核苷酸序列至少50%相同的核苷酸序列。在一些实施方案中,miR-142靶序列包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列。

[0033] miR-142靶序列在本文公开的载体中可重复2-10次。

[0034] 载体可以是病毒载体。病毒载体可以是腺病毒、腺相关病毒、慢病毒、逆转录病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、鼠白血病病毒(MLV)、禽类肉瘤/白血病(ASLV)、脾坏死病毒(SNV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、单纯疱疹病毒或痘苗病毒载体。

[0035] 在一些实施方案中,重组载体通过玻璃体内注射、结膜下注射或视网膜下腔局部施用至个体。

[0036] 本文公开的方法还可以包括向个体施用另外的治疗剂。在一些实施方案中,所述另外的治疗剂是雷珠单抗、阿柏西普或贝伐珠单抗。

附图说明

[0037] 图1.重组载体的示例。

[0038] 图2.重组载体在体外环境下的神经细胞特异性表达。

[0039] 图3.具有4个重复的miR142-3pT(下划线)的miR142-3pT(靶)序列(SEQ ID NO:6)。

[0040] 图4A.具有1 $\times$ 、2 $\times$ 和3 $\times$ 重复的miR142-3pT和突变体的示意图。图4B显示了miR142-3p对具有1 $\times$ 、2 $\times$ 和3 $\times$ 重复的miR-142-3pT的DX2表达的抑制。

[0041] 图5.核心结合序列在DX2抑制中是重要的。一种具有Tseq×3重复的载体,其显示了DX2的显著抑制(图4B),并且DX2构建体作为对照。100pmol miR-142-3p处理显著抑制Tseq×3载体,但DX2和突变序列不被抑制。

[0042] 图6A-6C.AIMP2-DX2和变体的氨基酸序列的比较(图6B和6C是图6A的续图)

[0043] 图7A-7I.DX2与AIMP2物理结合以减少PARP-1活化。图7A.通过在SH-SY5Y细胞中转染各质粒诱导AIMP2和DX2表达,然后通过PARP-1下拉试验进行分析。DX2对PARP-1的亲合性高于AIMP2。图7B.SH-SY5Y细胞用媒介物(Con)或DX2表达(DX2)质粒转染,孵育24小时并裂解。将总细胞裂解物与蛋白质琼脂糖珠一起孵育以免疫沉淀PARP-1结合的AIMP2,并通过免疫印迹分析进行分析。图7C.DX2 siRNA(DX2)和对照siRNA(Con)转染到SH-SY5Y中,孵育48小时。将总细胞裂解物与蛋白质琼脂糖珠一起孵育以免疫沉淀PARP-1结合的AIMP2,并通过免疫印迹分析进行分析。图7D和7E.将GFP-或Myc-标记的AIMP2和/或DX2表达质粒转染到HEK 293细胞中,并通过用myc抗体(图7D)和GFP抗体(图7E)免疫沉淀(IP)测量结合亲和力。图7F和7G.用EV(空载体)、AIMP2和DX2表达质粒转染SH-SY5Y细胞,24小时后,将转染的细胞在含或不含10 400μM H₂O₂的条件下孵育4小时。切割的PARP-1水平(图7F)和PARylation(图7G)使用免疫印迹分析进行检测。在氧化应激诱导的细胞损伤条件下,DX2减弱与细胞死亡有关的PARP-1的切割(图7F)和PARylation(图7G)。图7H.用环己酰亚胺处理的脉冲追踪试验评价AIMP2和DX2蛋白质的稳定性。以时间依赖性方式从0小时至4小时收集样品,并使用免疫印迹分析进行检查。图7I.AIMP2诱导的PARP-1活化的示意图。在不存在DX2时,AIMP2二聚体诱导PARP-1活化和神经元死亡。然而,在存在DX2时,DX2与AIMP2相互作用并抑制PARP-1活化。

[0044] 图8A-8C.DX2减少神经毒素诱导的神经元细胞死亡。图8A.用EV、AIMP2和DX2表达质粒转染N2A细胞,将转染的细胞在含或不含H₂O₂的条件下孵育4小时,然后用MTT测定细胞活力。图8B和8C.SH-SY5Y细胞用EV、AIMP2和DX2表达质粒共转染,与H₂O₂一起孵育4小时,并通过MTT试验测定细胞活力。数字表示转染的DNA的量。

[0045] 图9A-9C.DX2通过竞争性抑制AIMP2与TRAF2结合而损害AIMP2的促凋亡活性。图9A.用所示量的Myc-DX2和Myc-AIMP2转染HEK293细胞。Endo-和Exo-AIMP2和-DX2的表达通过用抗AIMP2抗体对全细胞裂解物(WCL)进行Western印迹来证实(下图)。TRAF2用其特异性抗体免疫沉淀,以及用抗Myc抗体检测结合TRAF2的AIMP2或DX2(上图)。Choi JW等人(2012)。图9B.DX2增加NF-κB活性,而AIMP2产生相反的作用。图9C.DX2过表达消除了TNF-α诱导的细胞死亡。

[0046] 图10A-10B.DX2的过表达减少TNFα诱导的神经元细胞死亡。图11A.用EV和DX2转染N2A细胞,并用TNF-α和CHX处理6小时,通过MTT试验评价细胞活力。#P<0.05。图10B.用EV(空载体)和DX2转染WT小鼠中的原代神经元细胞,并进行MTT试验以评估它们的活力。#P<0.0。

[0047] 图11A-11B.AAV2-GFP转导效率测试。图11A.AAV-GFP的转导效力测试。SK-SY5Y细胞用scAAV-GFP或ssAAV-GFP感染,48小时后(图11B)在荧光显微镜下观察GFP表达。

[0048] 图12A-12G.AAV2-DX2具有抗凋亡作用并改变细胞信号传导。图12A.在原代神经元(神经元)、MEF(小鼠胚胎成纤维细胞)、肝细胞和MSC(间充质干细胞)中的细胞毒作用。H₂O₂处理后,当与对照转导的细胞相比时,在DX2转导的细胞(AAV2-DX2)中观察到降低的细胞毒

作用(c)。图12B.DX2不是SH-SY5Y(左)和原代神经元细胞(右)中正常细胞生长所必需的。在氧化应激条件下,当与其对照对应物(AAV-GFP,GFP)相比时,AAV2-DX2感染的细胞显示出降低的细胞死亡水平。图12C.AAV-GFP或AAV2-DX2感染的成神经细胞瘤细胞SK-N-SH和N2A的RNaseq的富集图。图12D和12E.代表细胞死亡和炎症相关途径的基因计数被下调的图表。图12F和12G.DX2过表达改变的信号传导途径的p-值图。ns;非显著性;* $P < 0.05$;**, $P < 0.01$;****, $P < 0.0001$,t-检验。

[0049] 图13.DX2增加了视网膜光感受器神经元细胞的活力。将661W细胞以 5×10^4 个细胞/孔接种于96孔板中,接着以5000MOI用AAV-DX2病毒感染。48小时后,用不同浓度的H2O2处理细胞。24小时后用MTT试验评价细胞活力。

[0050] 图14.DX2降低了由H2O2诱导的BAX水平。661W细胞用AAV-GFP或AAV-DX2以各自5,000的MOI感染。72小时后,用2mM H₂O₂处理细胞6小时,然后评估BAX的RNA水平。

[0051] 图15A-15B.DX2的过表达导致661W细胞中67LR水平增加。图15A.使用Lipofectamine 3000试剂将空载体(EV)和Strep-DX2(DX2)转染到661W细胞中。DX2转染导致67LR水平增加。图15B.在与图15A中相同的条件下对661W细胞进行免疫荧光染色。

[0052] 图16.DX2与KRS结合,类似于AIMP2。将2 μ g Flag-Tag-AIMP2和Flag-Tag-DX2转染的细胞用NP-40裂解缓冲液进行细胞裂解。随后,将15 μ l琼脂糖A/G plus珠和KRS抗体的混合物用于下拉试验。

[0053] 图17A-17B.DX2在ROS条件下调节KRS膜形式的水平,导致67LR水平增加。图17A.用AAV-GFP和AAV-DX2以5,000的感染复数(MOI)感染661W细胞,然后在感染后72小时用2mM H₂O₂处理6小时。随后,进行细胞裂解,并使用Western印迹分析观察KRS和67LR水平的变化。图17B.遵循与图17A中相同的实验条件,将细胞分级分离成胞质和膜组分,并进行Western印迹分析。经H₂O₂处理后,观察到KRS的膜形式减少,而用AAV-DX2处理导致67LR和KRS的膜形式都增加。

[0054] 图18A.视网膜的横截面组织学(H&E染色)。图18B.视网膜厚度。图18C.RPE(视网膜色素上皮)厚度。图18D.ONL(光感受器的外核层)厚度。图18E.外段层厚度。图18F.OPL(外网层)厚度。所有样品都是从10 μ m厚的含有视神经的切片中获得的。图18G.RPE(视网膜色素上皮)的完整性和增殖。图18H.PR(光感受器)恢复。图18I.RPE和PR的细胞增殖。图18J-18O.视网膜功能恢复。正常ERG图形格式的视网膜电图(图18J-18K)。a波振幅(图18L)和a波延迟(图18M)、b波振幅(图18N)和b波延迟(图18O)。

[0055] 图19A.用scAAV2-GFP或scAAV2-DX2处理后,激光光凝部位的荧光素血管成像和吲哚菁绿血管成像图像。图19B-19D.脉络膜血管新生面积的比较。当用GFP对照和DX2处理时,渗漏面积与CNV面积的比率。通过使用FA测量总的高荧光面积来估计渗漏面积,并且使用ICGA计算CNV面积。用DX2处理后CNV面积的变化。基于总测量的同工凝集素(Isolectin)B4体积计算CNV体积。对于每个组, $n=12$,* $P < (0.05)$ 。图19E.激光诱导的脉络膜血管新生(CNV)小鼠模型中VEGF的表达。CNV小鼠模型中VEGF表达和VEGF差异倍数的Western印迹结果。通过ImageJ测量VEGF差异倍数。对于每组, $n=6$,* $P < (0.05)$ 。

[0056] 图20A-20B.视网膜色素上皮(RPE)变性区域眼底照相。图20C-20F.供试品(AAV2-DX2)处理组的DX2表达水平。图20G-20J.免疫组织化学。图20K-20L.视网膜电图。

[0057] 图21A-21B.a波(图21A)和b波(图21B)的视网膜电图测量。

[0058] 图22A-22B. AAV2-DX2AAV2-DX2在激光诱导的脉络膜血管新生 (CNV) 兔模型中预防血管新生。图22A荧光素强度。图22B同工凝集素B4染色。

[0059] 图23A-23M. 生物分布研究以评估DX2在全身器官中的表达。图23A. qPCR分析以证实DX2在注射组织区域中的表达。图23B-23M. 使用qPCR分析胸腺、肝脏、睾丸、大脑、脾脏、肾脏、心脏、胃、肠系膜淋巴结、脊髓、胰腺和肺中的DX2表达。

具体实施方式

[0060] 神经退行性疾病 (NDD) 是一组异质性疾病, 其特征在中枢和外周神经系统的进行性结构和功能变性。由于眼睛与大脑的特殊联系以及易于测量, 它为观察大脑提供了一个独特的窗口, 从而可以非侵入性地获取大量可能有助于NDD早期诊断和临床护理的潜在生物标志物。

[0061] 遗传性视网膜疾病, 尤其是RP或Leber先天性黑蒙 (Leber congenital Amurosis), 是一种集合的概念, 其是指由多种基因中的数十种突变引起的异质性眼部疾病, 并且其存在和频率因种族和地区而异。最近, 用正常WT基因取代突变基因的基因治疗已经成为一种有前途的治疗方法。然而, 目前正在临床阶段研究的大多数基因治疗药物是通过引入单个正常WT基因来代替突变基因的治疗, 这是一个限制, 仅能预期在非常有限数量的患者中有效。此外, 迄今为止单突变基因替代基因治疗 (例如Luxturna) 的临床研究结果距离恢复正常视力还很遥远。仅有增强光检测能力以使患者能够独立日常生活的功效被报道过。这表明除了单个突变基因替代之外, 在正常视力恢复中存在更复杂的细胞水平机制。

[0062] 除了传统的与年龄和遗传相关的视力病症, 例如黄斑变性以外, 中枢神经系统病症, 包括帕金森病和阿尔茨海默病, 也可影响患者的视力。这些疾病可导致视神经、视网膜细胞和周围视觉结构的直接或逆向变性。虽然这些病症通常并不明显, 但它们会影响协调性、活动能力和视觉感知, 从而增加跌倒和相关伤害的风险。

[0063] 帕金森病是一种进行性神经退行性疾病。黑质中多巴胺能神经元的破坏, 随之而来的是纹状体 (基底神经节系统中参与运动控制的部分) 中多巴胺作用的减弱, 这被认为是帕金森病的病理生理机制。虽然帕金森病的主要特征是震颤、僵硬和姿势不稳, 但模糊的视觉症状 (如视力模糊和复视、不受控制的眼球运动、光敏感、眼睛疲劳和阅读困难) 也很常见。多达75%的特发性帕金森病患者会出现轻微的眼球运动异常, 但通常得不到治疗。然而, 由于这些症状会进一步降低患者本已受损的生活质量和功能, 因此需要专门治疗。

[0064] 肌萎缩性侧索硬化症 (ALS) 是一种致命的神经退行性疾病, 导致运动神经元功能逐渐丧失。尽管目前眼部不适不被认为是ALS的典型症状, 但在许多患者中都发现了变薄、轴突变性和包涵体等视网膜变化。在死后人体组织和动物模型中观察到的视网膜异常与ALS中的脊髓变化相似。这些发现并不出人意料, 因为视网膜与大脑具有个体发生关系, 许多基因都与神经退行性疾病和视网膜疾病有关。参见Soldatov 2021。

[0065] 阿尔茨海默病是最常见的痴呆症, 其特征是神经细胞之间的连接被破坏和损坏。这些损伤是由于 β -淀粉样蛋白 (Abeta) 以淀粉样斑块的形式和/或由聚集的tau蛋白组成的神经元纤维缠结异常积累而发生的。阿尔茨海默病的眼部变性是由于视网膜神经纤维层变薄而发生的。负责视觉处理的神经元往往比初级视觉神经元受到的损伤更大, 导致疾病早

期出现视力模糊的症状。在任何阶段都可能出现识别物体、看颜色和处理视觉运动的缺陷,从而增加跌倒、割伤和烧伤等事故的风险。

[0066] DX2是AIMP2的一种外显子2缺陷拮抗性剪接变体,可有效抑制AIMP2诱导的神经元死亡。AIMP2是形成多tRNA合成酶复合物的三种辅助蛋白之一。除了在翻译过程中支持tRNA连接外,据报道AIMP2还是一种多功能且有效的细胞死亡诱导基因。

[0067] AIMP2过度活化细胞凋亡信号传导途径如PARP-1或p53或抑制细胞存活信号传导途径如TRAF信号传导或LR表达。

[0068] 作为AIMP2的剪接变体,DX2充当针对AIMP2的拮抗竞争者,因此直接和间接抑制AIMP2诱导的细胞死亡。

[0069] DX2在帕金森病模型中抑制PARP-1和p53诱导的神经元死亡。在黑质中使用AAV过度表达DX2可拯救PD诱导的小鼠模型中的运动活性和神经元细胞死亡。

[0070] 在ALS中,DX2抑制ALS疾病中TRAF2依赖性和67LR介导的神经元死亡。在ALS小鼠模型中,DX2的过表达可改善运动活性和存活并减少神经元细胞死亡。

[0071] 不受任何理论的约束,考虑到在眼睛和大脑之间解剖学和发育上的相互联系以及NDD中视网膜损伤的临床证据,CNS中神经元细胞系统的破坏和视神经、视网膜细胞和周围视觉结构的变性中可能存在共同的病理生理途径。

[0072] 基因治疗是一种有前景的治疗方法,用于治疗各种疾病中的不可逆视网膜细胞死亡,例如年龄相关性黄斑变性(AMD)、Stargardt病、视网膜色素变性(RP)和青光眼。腺相关病毒(AAV)已成为将基因表达靶向视网膜的优选载体。经视网膜下或玻璃体内注射的AAV可有效转导视网膜色素上皮和视网膜内层。AAV由于其相对安全性(由于缺乏致病性)也被认为是一种合适的基因递送方法(20)。存活基因DX2的利用可以是治疗视网膜退行性疾病的潜在选择。

[0073] AIMP2-DX2是AIMP2(氨酰基tRNA合成酶复合物相互作用多功能蛋白质2)的替代拮抗性剪接变体,其是一种多因子凋亡基因。已知AIMP2-DX2通过阻碍AIMP2的功能来抑制细胞凋亡。

[0074] AIMP2-DX2,作为AIMP2的竞争性抑制剂,通过抑制TRAF2的泛素化/降解来抑制TNF- α 介导的细胞凋亡。

[0075] 还已经确定AIMP2-DX2可以治疗神经元疾病(US2019/0298858A1)。

[0076] 还已经确定,当AIMP2-DX2插入腺相关病毒并将所得物引入视网膜下腔时,它能有效抑制脉络膜血管新生。

[0077] 本文公开了治疗有需要的个体的视网膜退行性疾病的方法,包括向所述个体施用药学有效量的包含外显子2缺失的AIMP2变体(AIMP2-DX2或DX2)的核酸分子。在一些实施方案中,核酸分子是病毒载体或非病毒载体,例如重组载体。

[0078] 本文公开了治疗有需要的个体的视网膜退行性疾病的方法,包括向所述个体施用药学有效量的包含外显子2缺失的AIMP2变体(AIMP2-DX2或DX2)的重组载体。

[0079] 在一些实施方案中,视网膜退行性疾病是视网膜色素变性、Leber先天性黑蒙、视锥-视杆细胞营养不良、青光眼或糖尿病性视网膜病。在一些实施方案中,视网膜退行性疾病在帕金森病、阿尔茨海默病或肌萎缩性侧索硬化症之前或伴随其发生。在一些实施方案中,视网膜退行性疾病不是年龄相关性黄斑疾病。在一些实施方案中,治疗视网膜退行性疾

病的方法不包括治疗年龄相关性黄斑疾病。在一些实施方案中,AMD是湿性AMD。在一些实施方案中,AMD是干性AMD。

[0080] 本文公开了减少患有视网膜退行性疾病的个体的眼睛或眼睛周围区域中的血管渗漏、减少脉络膜血管新生面积、减少脉络膜血管新生形成、或减少VEGF表达的方法,包括向个体施用药学有效量的包含外显子2缺失的AIMP2变体(AIMP2-DX2)基因的重组载体。

[0081] 本文公开的重组载体还可包含miR-142靶序列。载体还可包含与AIMP2-DX2可操作连接的启动子。在一些实施方案中,启动子是逆转录病毒(LTR)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子、MT启动子、EF-1 α 启动子、UB6启动子、鸡 β -肌动蛋白启动子、CAG启动子、RPE65启动子、突触蛋白启动子、MeCP2启动子、CaMKII启动子、Hb9启动子或视蛋白启动子。

[0082] 在本文公开的方法中,在一些实施方案中,重组载体可包含外显子2缺失的AIMP2变体(AIMP2-DX2)基因和miR-142靶序列。miR-142靶序列可以位于AIMP2-DX2基因的3'端。本文所述载体可在神经元细胞中表达AIMP2-DX2,但不在造血细胞如白细胞和淋巴细胞中表达。

[0083] AIMP2-DX2多肽(SEQ ID NO:2)是AIMP2的剪接变体(例如,SEQ ID NO:12的aa序列;例如,SEQ ID NO:3的nt序列),其中省略了AIMP2的第二外显子(SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:4的nt序列)。在一些实施方案中,AIMP2-DX2基因具有SEQ ID NO:1中所示的核苷酸序列,AIMP2-DX2多肽具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。AIMP2-DX2多肽的变体或同种型也是已知的,并且可由本领域技术人员确定(参见,例如SEQ ID NO:13-19,例如,图6A-6C显示了AIMP2(SEQ ID NO:2)与变体SEQ ID NO:13-19以及AIMP2或AIMP2-DX2(SEQ ID NO:20)的共有序列或核心序列的比较。

[0084] 在一些实施方案中,AIMP2-DX2基因可包含编码与SEQ ID NO:2、13、14、15、16、17、18、19或20至少90%相同、至少93%相同、至少95%相同、至少96%相同、至少97%相同、至少98%相同、至少99%相同或其中任何范围的同一性%的氨基酸序列的核苷酸序列。AIMP2-DX2基因可包含编码SEQ ID NO:2、13、14、15、16、17、18、19或20的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0085] AIMP2-DX2基因可包含与SEQ ID NO:1的核苷酸序列至少90%相同、至少93%相同、至少95%相同、至少96%相同、至少97%相同、至少98%相同、至少99%相同或其中任何范围的同一性%的核苷酸序列。AIMP2-DX2基因可包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列。

[0086] 在一些实施方案中,AIMP2-DX2基因不具有这样的外显子,所述外显子包含编码与SEQ ID NO:10或11具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列的核苷酸序列。在一些实施方案中,AIMP2-DX2基因不具有这样的外显子,所述外显子包含编码SEQ ID NO:10或11的氨基酸序列的核苷酸序列。在一些实施方案中,AIMP2-DX2基因不具有这样的外显子,所述外显子包含与SEQ ID NO:4具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的核苷酸序列。

[0087] 在一些实施方案中,包含AIMP2-DX2的核酸分子可任选包含miR-142靶序列。miR-142靶序列(miR-142T)可包含含有ACACTA的核苷酸序列。miR-142靶序列可包含含有ACACTA和SEQ ID NO:5的1-17个另外的连续核苷酸的核苷酸序列。例如,miR-142靶序列可包含这

样的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含ACACTA和总计1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17个另外的核苷酸,所述另外的核苷酸在ACACTA的5'或3'处连续,如SEQ ID NO:5所示。

[0088] miR-142靶序列可包含与SEQ ID NO:5的核苷酸序列(TCCATAAAGTAGGAAACACTACA; miR-142-3pT)至少50%相同、至少60%相同、至少70%相同、至少80%相同、至少90%相同、至少90%相同、至少93%相同、至少95%相同、至少96%相同、至少97%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同的核苷酸序列。miR-142靶序列可包含SEQ ID NO:5的核苷酸序列。

[0089] miR-142靶序列可以包含含有ACTTTA的核苷酸序列。miR-142靶序列可包含含有ACTTTA和SEQ ID NO:7的1-15个另外的连续核苷酸的核苷酸序列。例如,miR-142靶序列可包含这样的核苷酸序列,所述核苷酸序列包含ACTTTA和总计1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个另外的核苷酸,所述另外的核苷酸在ACTTTA的5'或3'处连续,如SEQ ID NO:7所示

[0090] miR-142靶序列可包含与SEQ ID NO:7的核苷酸序列(AGTAGTGCTTTCTACTTTATG; miR-142-5pT)至少50%相同、至少60%相同、至少70%相同、至少80%相同、至少90%相同、至少90%相同、至少93%相同、至少95%相同、至少96%相同、至少97%相同、至少98%相同、至少99%相同或100%相同的核苷酸序列。miR-142靶序列可包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列。

[0091] miR142-3pT突变序列的示例为:

```
ccgctgcagtgacagtgccagccaatgtgcagaggtggatgaggtcttgtgaaaacctggctcctt
ttaacacggcc
ctcaagctccttaagtgaccagaagcttgctagctccataaagtaggaCCACTGCAatcactccataa
agtagga
CCACTGCAagatatctccataaagtaggaCCACTGCAatcactccataaagtaggaCCACTGCAaaag
cttgtagggatccgcc (SEQ ID NO:25)。
```

[0092] 突变序列是指miR142 3pT核心序列的一个或多个区域,例如四个区域被取代如下:(5'-AACACTAC-3'→5'-CCACTGCA-3')。在载体转染的HEK293细胞中观察到miR142-3p×1重复(100pmol)miR142-3p靶序列对DX2表达的抑制,并且随着miR142-3p靶序列中核心结合序列的数目增加,miR142-3p对DX2表达的抑制也增加。含有Tseq×3核心序列的载体显示显著的抑制,而对于突变的3x序列没有观察到抑制。

[0093] 微小RNA(miRNA)是起到控制基因表达的作用的非编码RNA分子。MiRNA通过与mRNA分子内的互补序列(即miRNA靶序列)碱基配对发挥作用。miRNA可以结合到蛋白质编码基因的靶信使RNA(mRNA)转录本上,并且负调控它们的翻译或引起mRNA降解。目前,已经鉴定了超过2000种人miRNA,并且miRbase数据库是公众可获得的。许多miRNA以组织特异性方式表达,并且在维持组织特异性功能和分化中具有重要作用。

[0094] miRNA在基因的转录后阶段起作用,并且在哺乳动物的情况下,已知大约60%的基因表达受miRNA控制。miRNA在生物体内的多种过程中起重要作用,并且已经公开与癌症、心脏病和神经相关障碍具有相关性。例如,miR-142-3p和miR-142-5p存在于miR-142中,并且可以使用其任何靶序列。因此,“miR-142”或“miRNA-142”是指,例如,miR-142-3p和/或

miR-142-5p,并可结合miR-142靶序列,例如,miR-142-3pT或miR-142-5pT。

[0095] miR-142靶序列可以位于AIMP2-DX2基因的5'或3'。

[0096] 例如,“miR-142-3p”可存在于侵袭性B细胞白血病中发生其基因易位的区域,并且已知在造血组织(骨髓、脾脏和胸腺等)中表达。另外,已知miR-142-3p参与造血系统的分化,已证实在胎鼠的肝脏(小鼠的造血组织)中表达。

[0097] 在一些实施方案中,miR-142-3p和/或miR-142-5p靶序列重复至少2-10次,至少2-8次,至少2-6次,至少4次,或其任何范围或次数。

[0098] 作为一个实例,miR-142-3p,例如,具有SEQ ID NO:23的核苷酸序列,可以具有相应的靶序列,例如,具有SEQ ID NO:5的核苷酸序列的miR-142-3p靶序列(miR-142-3pT),但不限于此。miR-142-5p,例如,具有SEQ ID NO:24的核苷酸序列,可以具有相应的靶序列,例如,具有SEQ ID NO:7的核苷酸序列的miR-142-5p靶序列(miR-142-5pT),但不限于此。

[0099] 在一些实施方案中,miR-142-3p可具有SEQ ID NO:23的核苷酸序列,miR-142-5p可具有SEQ ID NO:24的核苷酸序列。

[0100] 本文公开了重组载体,其可通过将miR-142-3p靶序列和/或miR-142-5p靶序列(分别为miR-142-3pT和/或miR-142-5pT)插入AIMP2-DX2的末端,并控制CD45衍生的细胞,特别是淋巴系统和白细胞中的AIMP2-DX2表达抑制,来控制AIMP2-DX2变体过表达的副作用。因此,AIMP2-DX2变体的表达可仅限于注射的神经元细胞和组织中,而不在注射组织区域中的主要群体非神经元造血细胞中。MiR142-3p仅在造血细胞中表达。

[0101] 本文公开了含有miR-142-3p和/或miR-142-5p的靶序列的重组载体。本文公开了重组载体,其包含本文公开的外显子2缺失的AIMP2变体(AIMP2-DX2)基因和miR-142-3p和/或miR-142-5p靶序列。

[0102] 术语“重组载体”是指可以在合适的宿主细胞中编码靶蛋白或RNA的载体,或含有必需的可操作连接的控制因子以使插入的基因能够适当表达的基因构建体。

[0103] 术语“可操作地连接”是指核酸表达控制序列和编码靶蛋白和RNA以执行一般功能的核酸序列之间的功能性连接。例如,它可影响编码启动子的核酸序列和为了核酸序列的可操作性而连接的蛋白或RNA的表达。与重组载体的可操作连接可以通过使用基因重组技术来制造,这在相应的技术领域是众所周知的,并且使用通常已知的酶在相应的技术领域用于区域特异性DNA切割和连接。

[0104] 重组载体还可包含与本文公开的AIMP2-DX2可操作连接的启动子。在一些实施方案中,启动子是逆转录病毒(LTR)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子、MT启动子、EF-1 α 启动子、UB6启动子、鸡 β -肌动蛋白启动子、CAG启动子、RPE65启动子、突触蛋白启动子、MeCP2启动子、CaMKII启动子、Hb9启动子或视蛋白启动子。

[0105] 重组载体可另外含有异源启动子和在启动子中可操作地连接的异源基因。

[0106] 本文所用的“异源基因”可以包括具有生物学适当活化的蛋白质或多肽,以及靶产物(例如免疫原或抗原蛋白质或多肽,或治疗活化蛋白质或多肽)的加密序列。

[0107] 多肽可补充宿主细胞中内源蛋白质的表达不足或缺失。基因序列可以从不同来源诱导,包括DNA、cDNA、合成的DNA、RNA或其组合。基因序列可以包括含有或不含有天然内含子的基因组DNA。另外,基因组DNA可以与启动子序列或聚腺苷酸化序列一起获得。基因组DNA或cDNA可以用多种方法获得。通过相应领域公开的方法,可以从合适的细胞中提取和纯

化基因组DNA。或者,mRNA可通过逆转录或其他方法从细胞中分离而用于产生cDNA。或者,多核苷酸序列可以含有与RNA序列互补的序列,例如反义RNA序列,并且可以将反义RNA施用于个体以抑制互补多核苷酸在个体细胞中的表达。

[0108] 例如,异源基因是具有外显子2缺失的AIMP-2剪接变体,且miR-142-3p靶序列可与异源基因的3'UTR连接。AIMP2蛋白的序列(312aa版本: AAC50391.1或GI:1215669;320aa版本: AAH13630.1,GI:15489023,BC013630.1)已在文献中描述(312aa版本: Nicolaides, N.C.,Kinzler, K.W.和Vogelstein, B. Analysis of the 5' region of PMS2 reveals heterogeneous transcripts and a novel overlapping gene, Genomics 29(2), 329-334 (1995)/320aa版本: Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA combinations, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99(26), 16899-16903 (2002))。

[0109] 术语“AIMP2剪接变体”是指由于外显子1至4中的外显子2部分或全部缺失而产生的变体。因此,该变体通过形成AIMP2蛋白和异二聚体干扰AIMP2的正常功能。注射的AIMP2-DX2基因在注射组织以外的组织中很少表达。然而,作为另外的安全性测量,可插入miR142靶序列以完全阻断AIMP2-DX2在注射组织区域中非神经元细胞的主要群体——造血细胞中表达的可能性。

[0110] 重组载体可以包括SEQ ID NO:1和5。

[0111] 术语与核苷酸或氨基酸序列“序列同源性百分比”、“同一性百分比”或“相同百分比”可以例如通过将2个最优排列的序列与比较域进行比较来确认,并且比较域中的一些核苷酸序列与2个序列的最优排列上的参考序列相比可以包括添加或缺失(即空位)(不包括添加或缺失)。

[0112] 本文公开的蛋白质不仅包括具有其天然类型氨基酸序列的那些,而且包括具有变体氨基酸序列的那些。

[0113] 蛋白质的变体是指由于天然氨基酸序列和1个以上氨基酸残基的缺失、插入、非保守或保守取代或它们的组合而具有不同序列的蛋白质。相应领域中已说明蛋白质和肽中的氨基酸交换不会改变分子整体的活性(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。

[0114] 该蛋白质或其变体可以通过天然提取、合成(Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-2156, 1963)或基于DNA序列的基因重组(Sambrook等人, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 第2版, 1989)来制造。

[0115] 氨基酸突变可基于氨基酸侧链取代基的相对相似性如亲水性、疏水性、电荷和大小等而发生。根据氨基酸侧链取代基的大小、形状和类型的分析,可以看出精氨酸、赖氨酸和组氨酸是带正电荷的残基;丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸具有相似的大小;苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸具有相似的形状。因此,基于这些考虑,精氨酸、赖氨酸和组氨酸;丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸;苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸可被认为是生物学上的功能等同物。

[0116] 在引入一个或多个突变时,可以考虑氨基酸的疏水性指数。根据疏水性和电荷将疏水性指数分配给每个氨基酸: 异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-

3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)
[0117] 在赋予蛋白质相互作用的生物学功能时,疏水性氨基酸指数是非常重要的。只有当用具有相似疏水性指数的氨基酸进行取代时,才可能具有相似的生物学活性。在通过参考疏水性指数引入突变的情况下,取代发生在疏水性指数差异在 ± 2 内、 ± 1 内或 ± 0.5 内的氨基酸之间。

[0118] 同时,还公知的是,具有相似亲水性值的氨基酸之间的取代可以诱导具有等同生物学活性的蛋白质。如美国专利4,554,101中所示,对每个氨基酸残基赋予以下亲水值:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0 ± 1);谷氨酸(+3.0 ± 1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5 ± 1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。

[0119] 在通过参考亲水值引入一个或多个突变的情况下,可以在亲水值差异在 ± 2 内、在 ± 1 内或在 ± 0.5 内的氨基酸之间进行取代。但并不限于此。

[0120] 蛋白质中氨基酸交换不会改变分子整体的活性,这在相应领域中已公布(H.Neurath,R.L.Hill,The Proteins,Academic Press,New York,1979)。最通常发生的交换是氨基酸残基之间的那些,包括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和Asp/Gly。可以通过相应行业中公布的各种方法构建载体系统。具体方法描述于Sambrook等人(2001),Molecular Cloning,A Laboratory Manual,冷泉港实验室出版社。

[0121] 本文公开的载体可以构建为用于克隆或表达的典型载体。另外,载体可以用原核或真核细胞作为宿主构建。如果载体是表达载体且用原核细胞作为宿主,通常包括用于执行转录的强启动子(例如tac启动子、lac启动子、lacUV5启动子、lpp启动子、pL X启动子、pRX启动子、rac5启动子、amp启动子、recA启动子、SP6启动子、trp启动子和T7启动子等)、用于开始解码的核糖体结合位点和转录/解码终止序列。在使用大肠杆菌(例如HB101、BL21、DH5a等)作为宿主细胞的情况下,大肠杆菌色氨酸生物合成途径的启动子和操纵子位点(Yanofsky,C.(1984),J.Bacteriol.,158:1018-1024)和噬菌体X的左向启动子(pLX promoter,Herskowitz,I.and Hagen,D.(1980),Ann.Rev.Genet.,14:399-445)可用作控制位点。

[0122] 同时,可以使用的载体可以是1种以上的类型,例如病毒载体、线性DNA或质粒DNA。

[0123] “病毒载体”指能够将基因或遗传物质递送至所需细胞、组织和/或器官的病毒载体。

[0124] 尽管病毒载体可包括来自腺病毒、腺相关病毒、慢病毒、逆转录病毒、HIV(人免疫缺陷病毒)、MLV(鼠白血病病毒)、ASLV(禽类肉瘤/白血病)、SNV(脾坏死病毒)、RSV(劳斯肉瘤病毒)、MMTV(小鼠乳腺肿瘤病毒)和单纯疱疹病毒中的1种以上,但并不限于此。在一些实施方案中,病毒载体可以是腺相关病毒(AAV)、腺病毒、慢病毒、逆转录病毒、痘苗病毒或单纯疱疹病毒载体。

[0125] 尽管逆转录病毒对宿主细胞基因组具有整合功能,并且对人体无害,但其可具有包括在整合时抑制正常细胞的功能、感染不同范围的细胞的能力、易于增殖、容纳约1-7kb的外源基因和产生复制缺陷型病毒的特征。然而,逆转录病毒也有缺点,包括在有丝分裂后

感染细胞的困难,在体内条件下基因递送,以及需要在体外条件下增殖体细胞。此外,逆转录病毒具有自发突变的风险,因为它可以整合到原癌基因中,从而可能导致细胞坏死。

[0126] 同时,腺病毒作为克隆载体具有各种优点,包括甚至在中等水平大小的细胞的细胞核中复制,临床上无毒,即使插入外部基因也稳定,没有基因重排或丢失,转化真核生物,并且即使当整合到宿主细胞染色体中时也稳定地高水平表达。腺病毒的良好宿主细胞是导致人类造血、淋巴和骨髓瘤的细胞。然而,由于它是线性DNA,因此增殖是困难的,并且病毒感染率低,不容易回收感染的病毒。此外,递送基因的表达在1-2周期间最广泛,仅在一些细胞中持续表达超过3-4周。另一个问题是它具有高免疫原性。

[0127] 腺相关病毒(AAV)由于能够弥补上述问题,作为基因治疗剂具有很多优点,因此近年来受到人们的青睐。它也被称为腺卫星病毒。腺相关病毒颗粒直径为20nm,已知对人体几乎没有危害。因此,在欧洲它作为基因治疗剂的销售获得批准。

[0128] AAV是一种单链原病毒,其需要辅助病毒进行复制,AAV基因组具有4,680bp,可插入感染细胞的19号染色体的特定区域。转基因通过2个各145bp的反向末端重复(ITR)序列段和信号序列段连接插入到血浆DNA中。转染时要与其他表达AAV rep和cap片段的质粒DNA一起进行,并加入腺病毒作为辅助病毒。AAV具有递送基因的宿主细胞范围广、重复施用时无免疫副作用小和基因表达周期长的优点。而且,即使AAV基因组整合到宿主细胞的染色体上,也不会改变或重排宿主的基因表达,这也是安全的。

[0129] 已知腺相关病毒总共具有4种血清型。在许多可用于递送靶基因的腺相关病毒的血清型中,研究最广泛的载体是腺相关病毒血清型2,并且目前用于递送囊性纤维化、血友病和卡纳万(Canavan's)病的临床基因。此外,最近,重组腺相关病毒(rAAV)在癌症基因治疗领域的潜力日渐增加(Du 2013)。在一些实施方案中,可使用腺相关病毒血清型2。尽管可以选择和应用合适的病毒载体,但并不限于此。

[0130] 另外,如果载体是表达载体并使用真核细胞作为宿主,则可以使用衍生自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如金属硫蛋白启动子)或衍生自哺乳动物病毒的启动子(例如腺病毒后启动子(post-adenovirus promoter)、疫苗病毒7.5K启动子、SV40启动子、巨细胞病毒启动子和HSV TK启动子)。具体地,尽管其可以包括选自逆转录病毒的LTR、巨细胞病毒(CMV)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子、MT启动子、EF-1 α 启动子、UB6启动子、鸡 β -肌动蛋白启动子、CAG启动子、RPE65启动子和视蛋白启动子中的1种以上,但其不限于此。此外,它通常具有聚腺苷酸化序列作为转录终止序列。

[0131] 本文公开的载体可以根据需要与其他序列融合,以使蛋白质的纯化更容易。尽管可以使用融合序列,例如谷胱甘肽S-转移酶(Pharmacia,USA)、麦芽糖结合蛋白(NEB,USA)、FLAG(ABI,USA)和6xHis(六组氨酸;Qiagen,USA)等,但不限于这些。另外,表达载体可以包括对抗生素的耐受性基因,所述抗生素通常在相应的工业中用作选择性标记,例如包括氨苄青霉素、庆大霉素、羧苄青霉素、氯霉素、链霉素、卡那霉素、遗传霉素、新霉素和四环素。

[0132] 此外,本文公开了包括重组载体的基因载体,所述重组载体包含miR-142(例如miR-142-3p和/或miR-142-5p)的靶序列(miR-142-3pT和/或miR-142-5pT)。

[0133] 术语“基因转移”通常包括将遗传物质递送至细胞以进行转录和表达。该方法非常适合蛋白质表达和治疗目的。已公布了多种递送方法,例如DNA转染和病毒转导。它表示病毒介导的基因转移,因为有可能通过高递送效率和递送基因的高水平表达以及必要时的自

然友好型或假型来靶向特定受体和/或细胞类型。

[0134] 基因载体可以是转化实体,其已经被转化到重组载体中,并且转化包括将核酸引入到有机实体、细胞、组织或器官中的所有方法,并且如在相应的领域中所公布的,可以根据宿主细胞选择和执行合适的标准技术。尽管这些方法包括电穿孔、原生质融合、磷酸钙(CaPO_4)沉淀、氯化钙(CaCl_2)沉淀、与碳化硅纤维混合、农杆菌介导的转化、PEG、硫酸葡聚糖和lipofectamin等,但并不限于这些。

[0135] 基因载体是为了在神经元中表达异源基因。因此,它抑制异源基因在CD45衍生细胞中的表达,并可提高异源基因在脑组织中的表达。CD45的大部分是位于造血细胞的跨膜蛋白酪氨酸磷酸酶。细胞可以根据位于细胞表面的分子来定义,CD45是所有白细胞群和淋巴细胞的细胞标志物。该基因载体在CD45衍生细胞中,尤其是在淋巴和白细胞范围的细胞中不表达。

[0136] 基因载体可另外包括允许药理学使用的载体、赋形剂或稀释剂。

[0137] 此外,本文公开了在神经元中递送和表达异源基因的方法,其包括将重组载体引入相应实体的阶段。

[0138] 本文公开的递送方法可以增加脑组织中异源基因的表达,并控制其他组织中的异源基因表达。

[0139] 此外,本文公开了包含以下的载体:1) 启动子;2) 编码靶蛋白的核苷酸序列,其与启动子连接以使其能够操作;和3) 表达盒,其包括插入到核苷酸序列的3' UTR中的靶向miR-142-3p的核苷酸序列。在一些实施方案中,载体可以包含1) 启动子;2) 编码靶蛋白的核苷酸序列,其与启动子连接以使其能够操作;和3) 表达盒,其包括插入到核苷酸序列的3' UTR中的靶向miR-142-5p的核苷酸序列。

[0140] 术语“表达盒”是指可操作地连接于信号肽下游、可进行表达以产生和分泌目标蛋白的单元盒,其包括编码目标蛋白的基因和编码启动子和信号肽的核苷酸序列。分泌表达盒可以与分泌系统混合使用。此类表达盒内或外可包括各种可帮助有效产生目标蛋白的因子。

[0141] 此外,本文公开了用于视网膜退行性疾病的预防性或治疗性制剂,其包含编码具有外显子2缺失的AIMP-2剪接变体的核苷酸序列和与该核苷酸序列的3' UTR连接的靶向miR-142-3p的核苷酸序列。

[0142] 因此,本文还公开了在有需要的个体中治疗视网膜退行性疾病的方法,包括施用本文公开的任何载体。在一些实施方案中,视网膜退行性疾病不包括AMD。AMD可以是湿性AMD。在一些实施方案中,AMD是干性AMD。

[0143] 本文公开的载体可以影响但不限于细胞凋亡抑制、运动障碍改善和/或氧化应激抑制,并因此预防或治疗视网膜退行性疾病。

[0144] 术语“治疗”不仅包括视网膜退行性疾病的完全治疗,而且包括作为本文公开的药物应用结果的AMD整体症状的部分治疗、改善和/或减轻。

[0145] 术语“预防”表示通过向患有退行性脑障碍的实体应用本文公开的药剂来抑制或阻断诸如认知障碍、行为障碍和脑神经破坏的症状或现象,从而预先预防视网膜退行性疾病的总体症状的发生。

[0146] 除了本文公开的药剂之外,还可以含有除活性成分以外的佐剂。尽管可以无限制

地使用任何佐剂,只要其在相应的技术领域是已知的,但是还可以通过包括例如弗氏完全和不完全佐剂来增加免疫。

[0147] 本文公开的药剂可以以将活性成分与药理学允许的载体混合的形式制备。在本文中,药理学上允许的载体包括药理学领域中通常使用的载体、赋形剂和稀释剂。可用于本文公开的药剂的药理学允许的载体包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石粉、硬脂酸镁和矿物油,但不限于这些。

[0148] 本文公开的药剂可以根据它们各自的一般制造方法以各种形式制造使用,包括口服施用类型如粉剂、颗粒剂、丸剂、胶囊剂、混悬溶液、乳剂、糖浆剂和气雾剂等,以及外用剂、栓剂药物或消毒注射液等。

[0149] 当制成制剂时,可以使用通常使用的稀释剂或赋形剂如填充剂、增量剂、粘合剂、保湿剂、崩解剂和表面活性剂等进行制造。口服施用固体制剂包括丸剂、片剂、粉剂、颗粒剂和胶囊剂,并且这种固体制剂可以通过将1种以上的赋形剂如淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖和明胶与活性成分混合来制备。另外,除了简单的赋形剂之外,也可以使用润滑剂如硬脂酸镁和滑石。口服施用液体制剂包括混悬溶液、内服溶液、油和糖浆等,其中包含除了常用的稀释剂水和液体石蜡之外的各种赋形剂,如保湿剂、甜味剂、调味剂和防腐剂等。非口服施用制剂包括无菌水溶液、非水溶剂、悬浮剂、油、冻干剂和栓剂。植物油如丙二醇、聚乙二醇和橄榄油,以及可注射的酯如乙醇酸酯可用作非水溶剂和混悬溶液。栓剂的试剂可以包括Witepsol、吐温61、可可油、月桂油和甘油明胶等。

[0150] 本文公开的药剂可以通过各种通道施用至实体中。可以使用所有的施用形式,例如口服施用和静脉内、肌肉、皮下和腹膜内注射。

[0151] 在一些实施方案中,重组载体通过玻璃体内注射、结膜下注射或视网膜下腔局部施用至个体。

[0152] 本文公开的方法还可以包括向个体施用另外的治疗剂。在一些实施方案中,所述另外的治疗剂是雷珠单抗、阿柏西普和/或贝伐珠单抗。

[0153] 本文公开的治疗剂的期望施用剂量根据各种因素而不同,所述因素包括制剂生产方法、施用形式、患者的年龄、体重和性别、疾病的症状程度、食物、施用期、施用途径、排出速度和反应敏感性等。然而,它可以由相应的制造商适当地选择。

[0154] 此外,对于治疗效果,熟练的医生可针对性地确定和开出有效剂量进行治疗。例如,治疗途径可以包括但不限于视网膜下、玻璃体内、静脉内、皮下和肌肉注射,以及通过使用微针直接注射到眼、脑室或脊髓中。在一些实施方案中,每只眼睛的剂量可以是 1×10^8 vg (病毒基因组) 至 1×10^{11} vg、 1×10^8 vg至 1×10^{10} vg、 1×10^8 vg至 1×10^9 vg以及其中的任何特定剂量或剂量范围,例如, 2×10^8 vg至 5×10^8 vg、 2×10^9 vg至 4×10^{10} vg、 4×10^8 vg至 6×10^{10} vg、 5×10^8 vg至 4×10^{10} vg、 5×10^8 vg至 1×10^{11} vg、 1×10^9 vg至 5×10^{10} vg、 2×10^9 vg至 1×10^{10} vg、 5×10^9 vg至 1×10^{10} vg或 5×10^9 vg至 8×10^{10} vg。每天多次注射和重复施用是可能的,例如,有效剂量可以是,例如,每只眼睛,在载体的情况下为0.05至15mg/kg,在重组病毒的情况下为 5×10^{11} 至 3.3×10^{14} 个病毒颗粒(2.5×10^{12} 至 1.5×10^{16} IU)/kg,以及在细胞中为 5×10^2 至 5×10^7 个细胞/kg。理想地,在载体的情况下剂量为0.1至10mg/kg,在重组病毒的情

况下剂量为 5×10^{12} 至 3.3×10^{13} 个颗粒(2.5×10^{13} 至 1.5×10^{15} IU)/kg,以及在细胞的情况下剂量为 5×10^3 至 5×10^6 个细胞/kg,每周施用2至3次。剂量没有严格限制。相反,可以根据患者的状况和神经障碍的表现程度来对其进行调整。其他皮下脂肪、和肌肉注射直接施用于患处的有效剂量为 9×10^{10} 至 3.3×10^{14} 个重组病毒颗粒,间隔10cm,每周2~3次。剂量没有严格限制。相反,可以根据患者的状况和神经障碍的表现程度来对其进行调整。更具体地说,本文公开的药物可包括 1×10^{10} 至 1×10^{12} vg(病毒基因组)/mL的重组腺相关病毒,并且通常建议在2周内每2天注射 1×10^{12} vg。可以每天施用一次或将剂量分成全天几次施用。在一些实施方案中,载体可以以 0.1×10^8 vg至 500×10^8 vg、 1×10^8 vg至 100×10^8 vg、 1×10^8 vg至 10×10^8 vg,例如, 5×10^8 vg或由此得到的任何特定量或范围的剂量施用。对于IV注射,例如,vg可以基于体重转化为用于人的剂量用于IV注射。对于局部组织注射,例如vg也可以基于靶细胞数目和有效MOI(感染复数)转化为用于人的剂量。

[0155] 在一些实施方案中,本文公开的载体可以通过例如视网膜下注射、玻璃体内注射或脉络膜下注射至个体。注射可以是液体的形式。在其他实施方案中,本文公开的载体可以以滴眼剂或软膏的形式施用于个体。

[0156] 包含AIMP2-DX2的核酸分子,例如载体,可以通过本领域熟知的方法递送。包含AIMP2-DX2的核酸分子也可任选地与其他基因或核酸递送工具或材料组合。递送方法可以包括但不限于:病毒载体和非病毒载体;与N-乙酰半乳糖胺(Galnac)、细胞穿透肽、核酸或糖肽介导的工具或合成的化合物载体的化学缀合;脂质介导的递送,例如脂质纳米颗粒包封;无机载体介导的递送,例如无机载体;生物递送,例如外泌体介导的递送;物理递送,例如通过微/纳米针、压力灌注、微粒、电能/电穿孔/离子电渗疗法、声孔效应、磁孔效应或光孔效应/光动力能量。

[0157] 该药物制剂可以制成各种口服施用和非口服施用形式。在一些实施方案中,本文公开的载体可以施用至大脑或脊髓。在一些实施方案中,本文公开的载体可以通过立体定位注射施用至大脑。

[0158] 口服施用的制剂包括丸剂、片剂、硬胶囊和软胶囊、液体、悬浮溶液、油、糖浆和颗粒等。除了活性成分之外,这些试剂可以包括稀释剂(例如,乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、纤维素和/或甘氨酸)和助流剂(例如,二氧化硅、滑石粉和硬脂酸及其镁盐或钙盐,和/或聚乙二醇)。此外,丸剂可以含有粘合剂如硅酸铝镁、淀粉糊、明胶、黄芪胶(tragacanthin)、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮,并且根据情况,可以含有崩解剂如淀粉、琼脂、海藻酸或其钠盐或类似的混合物和/或吸收剂、着色剂、调味剂和甜味剂。这些试剂可以通过一般的混合、造粒或包衣方法来制造。

[0159] 此外,注射剂是非口服施用制剂的代表性形式。用于这种注射剂的溶剂包括水、林格氏溶液、等渗生理盐水和混悬液。注射剂的灭菌的固定油可以用作溶剂或悬浮介质,并且任何非刺激性的固定油包括甘单油酯和双甘油酯都可以用于该目的。另外,注射剂可以使用脂肪酸,例如油酸。

[0160] 通过使用以下实施例更详细地解释本发明。但是,以下的实施例仅是为了说明本发明的内容,本发明的应用并不限于这些实施例。

实施例

实施例1. 重组载体的制备

[0161] CD45的大部分是造血细胞的跨膜蛋白酪氨酸磷酸酶,其可用于根据细胞表面的分子定义细胞。CD45是所有白细胞群和B淋巴细胞的标志物。已经制备了仅在神经元中特异性表达而不在CD45衍生细胞(特别是淋巴和白细胞)中表达的重组载体。该重组载体含有一种其中氨酰tRNA合成酶复合物相互作用多功能蛋白2(AIMP2)外显子2已缺失的剪接变体和能控制AIMP2剪接变体表达的miRNA。

[0162] 重组载体是作为分配安全措施产生的,以诱导AIMP2剪接变体在注射的神经元组织中特异性表达。这样做也是为了完全阻断AIMP2-DX2在造血细胞中表达的任何可能性,造血细胞是注射组织区域中非神经元细胞的主要群体。

实施例1-1.AIMP2变体的产生

[0163] AIMP2是参与氨酰-tRNA合成酶(ARS)形成的蛋白质之一,并作为多因子凋亡蛋白起作用。为了构建表达其中AIMP2的外显子2已缺失的变体的质粒,将AIMP2剪接变体的cDNA克隆到pcDNA3.1-myc中。在通过使用具有连接到H322 cDNA上的EcoR1和Xho1接头的引物扩增AIMP2剪接变体后,通过使用EcoR1和Xho1进行pcDNA3.1-myc中的亚克隆。

[0164] 使用具有SEQ ID NO:1的核苷酸序列和SEQ ID NO:2的氨基酸序列的AIMP2变体。

实施例1-2.miRNA的分选及其靶序列的选择

[0165] 如上所述,作为分配安全措施,如上所述产生重组载体以限制AIMP2变体在注射的神经元细胞中的表达并完全阻断AIMP2-DX2在造血细胞中表达的可能性,造血细胞是注射组织区域中的非神经元细胞的主要群体。

[0166] 为此,选择仅在成生白细胞和淋巴相关细胞的造血细胞中特异性表达的miR-142-3p作为靶标。为了产生仅靶向miR-142-3p的序列,使用小鼠B细胞的微阵列数据和由miR-142-3p靶向的基因的计算机编程(mirSVR评分)。miR-142-3p是SEQ ID NO所示的核苷酸序列。SEQ ID NO:5的miR-142-3p靶序列结合miR-142-3p。

[0167] miR-142-3p靶序列包括Nhe I和Hind III、Bmt 1位点序列(ccagaagcttgctagc; SEQ ID NO:21)和Hind H位点序列(aagcttgtag;SEQ ID NO:22)。miR-142-3pT可包含重复4次的SEQ ID NO:5的核苷酸序列以及连接它们的接头(tcac和gatatc)(图4;SEQ ID NO:6)。

实施例1-3.重组载体的产生

[0168] 为了产生重组载体,将miR-142-3p靶序列(SEQ ID NO:5)插入AIMP2变体(序列号1)的3'UTR。AIMP 2变体和miR-142-3p靶序列的连接用碱基序列号6表示,并且,具体地,通过使用Nhe I和Hind III位点切割和插入。重组载体如图1所示。

实施例1-4.重组载体体外神经细胞特异性表达的确认

[0169] 由于miR142-3p仅在造血细胞中特异性表达,所以根据重组载体的miR142-3p靶序列的表达情况,通过敲低AIMP2变体来确认AIMP2变体在特定细胞中的表达程度。

[0170] 具体地,有未处理重组载体的组(SHAM)、空白/对照载体处理组(NC载体)、单一AIMP2变体载体处理组(pscAAV_DX2)和用重组载体处理的组(pscAAV-DX2-miR142-3pT)。所有载体的浓度以 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 为单位,每组用 $2.5\mu\text{l}$ ($2.5\mu\text{g}$) 处理。在每个处理组中,对THP-1细胞株(人白血病单核细胞)和SH-SY5Y细胞株(成神经细胞瘤)进行处理,确认了AIMP2变体的敲低。使用下表1中的引物进行qPCR(变性15秒,在 60°C 温度下退火和延伸30秒,进行40个以上的循环)。

表1

AIMP2 变体	引物	SEQ ID NO
正向	CTGGCCACGTGCAGGATTACGGGG (仅人)	8
反向	AAGTGAATCCCAGCTGATAG (仅人)	9

[0171] 结果确认 AIMP2 变体不在 SHAM 和 NC 载体组中表达。此外,确认了在单一 AIMP2 变体载体处理组 (pscAAV-DX2) 的 THP-1 细胞株和 SH-SY5Y 细胞株中均有表达,从而确认了未诱导神经细胞特异性表达。另一方面,确认 AIMP2 变体仅在用重组载体处理的组中的 SH-SY5Y 细胞株中特异性表达 (图2)。

实施例1-5.材料和方法

实施例1-5-1.qRT-PCR

[0172] 按照制造商的方案,使用 TRIzol (Invitrogen, 美国马萨诸塞州沃尔瑟姆) 从脊髓分离总 RNA。用分光光度计 (ASP-2680, ACTgene, 美国) 定量提取的 RNA。为了制备 cDNA, 使用 SuperScript III First-Strand (Invitrogen) 通过制造商的方案进行逆转录。将所得 cDNA 用于使用 SYBR green PCR master mix (ThermoFisher Scientific, 美国) 的实时 PCR。将复制结果的表达数据用于 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 统计分析, 并用 GAPDH 表达进行标准化。

实施例1-5-2.miR142-3p抑制实验

[0173] 从 $\times 1$ miR-142-3p 靶序列可以观察到 miR-142-3p 对 DX2 表达的抑制。使用 lipofectamine 2000 (Invitrogen, 美国), 用 $\times 1$ 、 $\times 2$ 和 $\times 3$ 重复的 miR-142-3p 靶序列载体以及 100 pmol miR-142-3p 瞬时转染 HEK293 细胞, 然后孵育 48 小时。通过 PCR 分析 DX2 mRNA 的量。从 Tseq $\times 1$ 重复 miR142 3p 靶序列 (图4B) 观察到 miR142-3p 对 DX2 表达的抑制。

实施例1-6.生成的抑制核心结合序列作用的三 (3) 类载体

[0174] Tseq $\times 1$ 含有 1 个核心结合序列, Tseq $\times 2$ 含有 2 个核心结合序列, Tseq $\times 3$ 含有 3 个核心结合序列 (图4A)。

[0175] 从 $\times 1$ 重复 miR142-3p 靶序列开始观察到 miR142-3p (100 pmol) 对 DX2 表达的抑制。使用 lipofectamine 2000 (Invitrogen, 美国), 用 $\times 1$ 、 $\times 2$ 和 $\times 3$ 重复的 miR-142-3p T Seq 载体以及 100 pmol miR-142-3p 瞬时转染 HEK293 细胞, 然后孵育 48 小时。通过 PCR 分析 DX2 mRNA 的量。当 miR142-3p 靶序列中的核心结合序列的数目增加时, miR142-3p 对 DX2 表达的抑制也增加。含 Tseq $\times 3$ 核心序列的载体显示出显著的抑制作用 (图4B)。

实施例1-7.核心序列突变

[0176] 使用小鼠 B 细胞微阵列数据和 miR-142-3p 靶基因的 mirSVR 评分, 预测核心序列。对核心序列四个区域进行如下取代: (5'-AACACTAC-3' $\rightarrow$ 5'-CCACTGCA-3') (见图3原始序列和图4A示意图)。

实施例1-8.核心结合序列是重要的 DX2 抑制

[0177] 四个核心序列被取代 (图4A)。通过使用 lipofectamin 2000 (Invitrogen, 美国), 用 DX2-miR-142-3p T Seq $\times 3$ 重复载体 (Tsq3 $\times$) 或核心序列突变载体 (mut) 和 100 pmol miR-142-3p 瞬时转染 HEK293 细胞, 然后孵育 48 小时。通过 PCR 分析 DX2 mRNA 的表达。以对 DX2 有显著抑制作用的 Tseq $\times 3$ 重复载体 (图4B) 及 DX2 构建体为对照。100 pmol miR142-3p 处理对 Tseq $\times 3$ 载体有显著抑制作用, 但对 DX2 及 mut 序列无抑制作用 (图5)。

实施例2.RP (视网膜色素变性) 的治疗

[0178] 为了探索治疗RP (视网膜色素变性) 的安全性和特异性靶点的可能性,AIMP2被认为是抑制细胞死亡的靶点。AIMP2积累导致聚(ADP-核糖)聚合酶-1 (PARP-1) 活化和随后的神经元变性:DX2通过竞争性抑制AIMP2与PARP-1结合而损害AIMP2的促凋亡活性。

[0179] 聚(ADP-核糖)聚合酶-1 (PARP-1) 是PARP家族研究最多的成员(也称为ADPRT, PARS,ART),其包括17个负责聚(ADP-核糖) (PAR) 合成的成员。Kim JH等人(2014)。PARP酶参与DNA修复,其中它们通过单和双DNA链断裂而被活化。它们参与DNA修复似乎需要向PARP酶本身或参与修复过程的其他蛋白质中添加PAR链(本文称为多聚核糖基化(PARylation))。Kim JH等人(2014)。此外,PARP-1的异常活化与病理过程如中风、创伤、糖尿病和帕金森病有关(Ko HS等人(2005);Corti O.等人(2003);Ko HS等人(2010)),并且在这种或类似的情况下,PAR的过度积累可能导致不同类型的细胞死亡——依赖性细胞死亡(parthanatos)。Narne P等人(2017);和Mao K等人(2022)。在这种情况下,过度的多聚核糖基化(PARylation)可以将凋亡诱导因子(AIF)从线粒体重新定位到细胞核,进一步加速DNA碎片整理和细胞死亡。Hone SJ等人(2004);Narne P等人(2017);Mao K等人(2022);Szabo C等人(1996);Virag L等人(1988)。在几种RP大鼠和小鼠模型中,过度的PARP活性也出现在光感受器细胞死亡中,这会增加变性的感光细胞中的多聚核糖基化(PARylation)水平。Sahaboglu A等人(2017)。

[0180] 因此,测试了DX2抑制AIMP2在PARP-1过度活化中的功能中的功效。首先,为了研究DX2是否是AIMP2的竞争性抑制剂并调节神经元细胞死亡,用PARP-1、AIMP2和DX2表达质粒共转染SH-SY5Y细胞,并对PARP-1进行免疫沉淀。如图7A所示,DX2与PARP-1的结合力比AIMP2更强。

[0181] 为了确定细胞内DX2蛋白水平是否影响PARP-1和AIMP2的结合,在免疫沉淀分析之前,将DX2过表达质粒(图7B)或DX2 siRNA(图7C)转染到成神经细胞瘤SH-SY5Y细胞中。在该试验中,SH-SY5Y细胞用媒介物(Con)或DX2表达(DX2)质粒转染,孵育24小时并裂解。将细胞裂解物与蛋白质琼脂糖珠一起孵育以免疫沉淀PARP-1结合的AIMP2,并通过免疫印迹分析进行分析(图7B)。类似地,将DX2 siRNA(DX2)和对照siRNA(Con)转染进SH-SY5Y细胞,孵育48小时,然后进行免疫沉淀和免疫印迹分析(图7C)。

[0182] DX2过表达的细胞中AIMP2与PARP-1的结合量降低(图7B),但是在DX2敲低细胞中,AIMP2与PARP-1的结合量增加(图7C),这表明DX2表达在PARP1和AIMP2的相互作用中起关键作用。

[0183] 为了阐明DX2在氧化应激条件下调节PARP-1切割(例如PARP-1活化)的机制,评估了AIMP2和DX2的结合亲和力。将AIMP2和/或DX2表达载体引入HEK 293细胞。将细胞孵育24小时,裂解,并进行免疫沉淀。

[0184] 当AIMP2单独表达时,观察到AIMP2同二聚体的形成。然而,与AIMP2-AIMP2同二聚体或AIMP2-DX2异二聚体相比,DX2同二聚体的量显著更低(图7D-7E,左上图的第三个泳道)。总之,这些观察结果提示DX2更倾向于与AIMP2结合并抑制AIMP2诱导的细胞死亡。

[0185] PARylation是翻译后过程,调节生物学事件如DNA损伤应答和凋亡。Szabo C等人(1996)和Virag l等人(1998)。PARP-1是一种酶,其识别核中受损的DNA,形成PAR链,并通过多聚核糖基化(PARylation)诱导受损蛋白的降解和细胞死亡。为了评估AIMP2或DX2如何影

响PARP-1活化(例如PARP-1切割)和在氧化应激条件下的多聚核糖基化(PARylation),用表达空载体(EV)、AIMP2或DX2的载体转染SH-SY5Y细胞,然后用过氧化氢(H₂O₂)处理4小时。然后裂解细胞并通过Western印迹分析评估活化的PARP-1蛋白水平(图7F)和多聚核糖基化(PARylation)(图7G)的量。

[0186] 在氧化应激条件下,与其他转染细胞中观察到的表达相比,AIMP2转染的细胞显示PARP-1的切割显著增加。然而,在DX2转染的细胞中未观察到PARP-1切割(图7F)。H₂O₂存在时AIMP2的多聚核糖基化(PARylation)增加,但DX2的多聚核糖基化(PARylation)没有改变(图7G)。

[0187] 为了检查AIMP2和DX2之间的蛋白质半衰期,进行环己酰亚胺处理的脉冲追踪试验。DX2显示出与全长AIMP2相似的稳定性,直到蛋白质从头合成停止后4小时(图7H)。

[0188] 因此,这些结果表明DX2是神经元细胞活性的关键因素,且DX2过表达可减少神经退行性疾病中的神经元细胞死亡。

[0189] 观察发现,当DX2表达不充分时,AIMP2形成同二聚体,与PARP-1相互作用,活化PARP-1,并诱导神经元细胞死亡。然而,由于DX2对PARP-1的结合亲和力显著高于AIMP2,因此在表达DX2的细胞中AIMP2和PARP-1之间的结合亲和力降低,从而导致PARP-1活性的抑制和神经元细胞死亡的减少。因此,DX2是AIMP2诱导的PARP-1活化和细胞死亡中的主要调节蛋白(图7I)。

[0190] 总之,DX2通过竞争性抑制AIMP2结合PARP-1而损害AIMP2的促凋亡活性。

实施例3. DX2减轻H₂O₂诱导的神经元细胞死亡

[0191] 基于上述结果,DX2是氧化应激诱导的PARP-1切割的抑制分子,进一步研究了DX2是否抑制神经元细胞的细胞死亡。为了检查AIMP2和DX2过表达条件下的细胞活力,将AIMP2或DX2表达质粒引入N2A细胞(Neuro-2a,小鼠成神经细胞瘤细胞系)中,并将转染的细胞与400 μ M H₂O₂一起孵育4小时。进行MTT分析以确定细胞死亡的水平。

[0192] 在正常条件下,AIMP2或DX2的过表达不影响细胞活力;然而,在H₂O₂处理的条件下,AIMP2的过表达显著增加细胞死亡,而DX2的过表达减少细胞死亡(图8A)。

[0193] 为了测试DX2或AIMP2是否在损伤诱导的细胞死亡条件下控制细胞活力,将SH-SY5Y细胞与EV、AIMP2和DX2表达质粒共转染,并用400 μ M H₂O₂处理4小时。进行MTT分析以确定细胞死亡。即使当AIMP2的表达增加(1 μ g至2 μ g)时,1 μ g DX2转染将AIMP2/H₂O₂诱导的细胞死亡抑制至与2 μ g DX2相似的水平(图8B)。相反,在DX2表达细胞条件下(1 μ g至2 μ g),AIMP2表达水平无法显著影响神经元细胞死亡(图8B),并且与氧化应激条件下的对照细胞相比,DX2表达细胞的细胞死亡显著减少(图8C)。总之,DX2的抗凋亡作用似乎比在两种蛋白质共存条件下AIMP2诱导的凋亡强得多。

实施例4. TRAF依赖性途径:DX2通过竞争性抑制AIMP2与TRAF2的结合而损害AIMP2的TNF- α 依赖性促凋亡活性

[0194] DX2通过竞争性抑制AIMP2与TRAF2的结合而损害AIMP2的TNF- α 依赖性促凋亡活性。

[0195] 眼部炎症是视力损伤的常见原因。Olivares-Gonzalez L等人(2021)。它被认为是一种慢性炎症,伴随神经胶质细胞(小神经胶质细胞、星形胶质细胞)的持续活化和其他免疫细胞募集进入神经组织(大脑、脊髓或视网膜)。Streit WJ(2004)。小胶质细胞,视网膜和

其他神经组织中固有的先天免疫细胞,是炎症的潜在细胞调节剂。Karlstetter M等人(2015)。活化的小胶质细胞和巨噬细胞在视网膜细胞(例如光感受器细胞)上分泌促炎介质如TNF- α 和t。Murakami Y等人(2019)。在眼睛中,TNF- α 似乎参与炎症、水肿、血管新生和神经退行性疾病的发病机制。Rodrigues EB等人(2009)。

[0196] 在TNF- α 信号传导中,TRAF2在细胞死亡中起关键作用。当TNF- α 信号被活化时,TRADD(TNF受体相关死亡结构域)且TRAF2结合TNF- α 受体TNFR1,然后,活化的复合物介导I κ B激酶(IKK)活化。当caspase-8失活时,TRAF2从TRADD复合物中释放出来,释放的TRAF2被E3泛素连接酶cIAP泛素化,促进细胞死亡。AIMP2促进cIAP对TRAF2的泛素化,刺激细胞死亡。Choi JW等人(2009)。

[0197] 为了理解DX2如何损害TNF- α 信号传导的凋亡活性,我们评价了DX2与AIMP2竞争与TRAF2的相互作用并影响NF- κ B依赖性转录活性的能力。对于共免疫沉淀试验,用0、1或2 μ g Myc标记的DX2或AIMP2表达质粒转染HEK293细胞(图9A)。通过使用抗AIMP2抗体对全细胞裂解物(WCL)进行免疫印迹,确认内源性(Endo)和外源性(Exo)AIMP2和DX2的表达。使用TRAF2特异性抗体对TRAF2进行免疫沉淀,并使用抗Myc抗体检测与TRAF2结合的AIMP2或DX2。

[0198] 为了测试NF- κ B依赖性转录活性,用NF- κ B荧光素酶载体转染HEK293细胞,并用G418(1mg/ml)选择细胞1周,以建立稳定表达的细胞。在选择存活的细胞后,用pcDNA 3.1空载体(作为对照)或编码AIMP2或DX2的pcDNA3.1表达载体转染细胞。十六小时后,用TNF- α (20ng/ml)处理转染的细胞12小时。收获细胞,并制备细胞裂解物,用于根据制造商的方案(Promega)使用荧光素酶检测试剂盒定量荧光素酶。

[0199] 随着DX2表达的增加,AIMP2与TRAF2的相互作用降低。相反,AIMP2的引入以剂量依赖方式抑制DX2与TRAF2的相互作用(图9A)。增加的NF- κ B活性抑制TNF- α 的促凋亡信号。正如所料,DX2增加NF- κ B活性,而AIMP2产生相反的作用(图9B)。DX2过表达消除了TNF- α 诱导的细胞死亡(图9C)。

[0200] 接着,为了评估DX2是否抑制TNF- α 依赖性神经元细胞死亡,用EV(空载体)或DX2表达质粒转染N2A和小鼠原代神经元细胞。转染细胞在存在或不存在TNF- α (20ng/ml)+环己酰亚胺(CHX,10 μ M)的条件下培养6小时,然后用MTT试验评价细胞活力。如图10A和10B所示,DX2过表达在正常条件(con)下不影响N2A或小鼠原代神经元细胞的细胞活力;然而,经TNF- α 处理后,DX2转染的细胞(DX2)的细胞死亡与EV(空载体)转染的细胞相比显著降低。

[0201] 总之,DX2与AIMP2竞争,且与TRAF2的相互作用比AIMP2强,因此抑制TNF- α -活化条件下AIMP2刺激的神经元细胞凋亡。

实施例5.AAV2-DX2的设计:DX2编码自互补AAV2

[0202] 由于通常难以使用常规的药理学方法治疗视网膜退行性疾病(RDD),因此正在寻找更有效的策略。在这些替代方案中,基因治疗可以成为一种利用视网膜下显微注射的微创的治疗RDD和治疗疾病例如RP的策略。Christine CW等人(2009);Eberling JL等人(2008);Castle MJ等人(2020)。

[0203] AAV载体是能够将转基因递送至视网膜细胞的有效穿梭载体,其具有向非分裂视网膜细胞有效转导的特性。AAV由于其相对安全性(由于缺乏致病性)而被认为是一种合适的基因递送方法。Wang D等人(2019)。本文研究了腺相关病毒血清型2(AAV2)递送系统有效地将治疗基因DX2递送至RDD患者的潜力。

[0204] 为了确定在单链AAV(ssAAV)和自身互补AAV(scAAV)之间使用哪种病毒系统,SH-SY5Y细胞用10、100、1000或 10^4 MOI(感染复数)的ssAAV-GFP(绿色荧光蛋白)或scAAV-GFP感染。48小时后,通过显微镜检测GFP表达。图11A表示GFP阳性细胞的百分比,且图11B显示GFP表达细胞的显微图像。在图11A和11B中,当两种病毒以不同浓度用于处理SH-SY5Y时,scAAV在病毒感染率方面更有效。

实施例6.AAV2-DX2转导抑制神经元死亡相关的细胞信号传导

[0205] 为了研究AAV2-DX2是否损害MEF(小鼠胚胎成纤维细胞)、肝细胞、MSC(间充质干细胞)以及原代神经元(神经元)中H2O2诱导的细胞毒性作用,用 10^4 MOI的AAV-DX2(AAV2-DX2)感染细胞48小时。然后,转导的细胞用400 μ M H2O2处理4小时以诱导细胞死亡,并通过MTT分析测量细胞活力(图12A)。

[0206] 当与H2O2处理后的AAV-GFP转导的细胞(GFP)相比时,AAV2-DX2转导的细胞(DX2)通常显示细胞死亡的显著减少(图12A),这意味着AAV2-DX2是有效的抗凋亡剂。有趣的是,在正常条件下,AAV2-DX2存在或不存在不影响细胞活力(图12B)。因此,DX2仅在应激源诱导凋亡条件时起作用。

[0207] 为了研究DX2过表达如何改变神经元细胞中的细胞信号传导,在通过AAV递送系统诱导DX2基因后对神经元细胞进行RNA测序。SK-N-SH或神经细胞瘤细胞用scAAV2-GFP或AAV2-DX2感染。感染后四十八小时,收获细胞,分离RNA并进行RNA测序。预测DX2参与抑制p53相关的细胞死亡途径和TNF- α 或白细胞介素相关的信号传导(图12C)。基于两种细胞类型SK-N-SH(图12D)和N2A(图12E)分析基因集合,以评估被分类到信号传导途径或本体数据库中的不同表达的基因(DEG)。DX2似乎在N2A细胞(图12D)和SK-N-SH细胞(图12E)中都降低了炎症或细胞凋亡信号,显示出相关基因的大量下调。在DX2过表达后所有通路的p值图分布中可视化了统计学显著性(图12F-12G)。

实施例7.DX2增加了661W细胞的活力,这是一种视网膜光感受器和神经节前体样细胞系

[0208] 为了研究DX2是否能拯救视网膜光感受器和神经节神经元免于ROS诱导的细胞死亡,如上述段落中所述的其他神经元细胞一样,我们对用不同浓度的H₂O₂处理的AAV-DX2感染的细胞和未感染的细胞进行了细胞活力测试。结果显示,与未感染的细胞相比,用AAV-DX2感染的细胞对H₂O₂浓度表现出更大的抗性并保持活力。

[0209] 图13显示DX2增加了视网膜光感受器神经元细胞的活力。将661W细胞以 5×10^4 个细胞/孔接种于96孔板中,接着以5000MOI用AAV-DX2病毒感染。48小时后,用不同浓度的H2O2处理细胞。24小时后用MTT试验评估细胞活力。

[0210] 为了进一步检测AAV-DX2的抗细胞凋亡作用,用AAV-DX2感染661W细胞,然后用H₂O₂处理诱导细胞死亡。评估了促凋亡标志物BAX的mRNA水平。结果显示,在用对照病毒AAV-GFP感染的细胞中,与未处理的细胞相比,经H₂O₂处理后BAX水平增加了2.5倍以上。然而,在用AAV-DX2处理的细胞中,与AAV-GFP处理组相比,经H₂O₂处理后的BAX水平显著降低。

[0211] 图14显示DX2降低了由H2O2诱导的BAX水平。661W细胞用AAV-GFP或AAV-DX2以各自5,000的MOI感染。72小时后,用2mM H₂O₂处理细胞6小时,然后评估BAX的RNA水平。

实施例8.DX2增加视网膜神经元中67LR的表达水平

[0212] 为了进一步研究DX2的抗凋亡信号传导途径,我们研究了DX2在67LR中的调节作

用。DX2在661W、视网膜光感受器和神经节前体样细胞系中过表达,并检测了67LR表达的变化。经DX2过表达后,观察到67LR和37LRP表达均有所增加(图15A)。当我们在相同的实验条件下对661W细胞中的67LR进行免疫荧光染色时,这一观察结果得到进一步支持。过表达DX2的细胞显示的荧光强度比非过表达的细胞强大约2.5倍(图15B)。

[0213] 接着,过表达AIMP2和DX2,然后用KRS进行免疫沉淀,以评估DX2和KRS的结合亲和力。结果显示AIMP2和DX2都表现出对KRS相似的结合亲和力。

[0214] 图16显示DX2与AIMP2类似地结合KRS。将2 μ g Flag-Tag-AIMP2和Flag-Tag-DX2转染的细胞用NP-40裂解缓冲液进行细胞裂解。随后,将15 μ l琼脂糖A/G plus珠和KRS抗体的混合物用于下拉试验。

[0215] 如先前所报道的,H2O2诱导的ROS应激导致67LR降低,这削弱了细胞存活信号传导并引发了细胞死亡。Yan X等人(2017)。在视网膜细胞由于ROS而死亡的情况下,我们通过用AAV-DX2感染661W细胞来检查KRS的变化和DX2的影响。当用对照病毒AAV-GFP处理时,由于H2O2处理,观察到67LR水平降低,并且KRS水平也降低。然而,当用AAV-DX2处理时,没有由于H2O2导致的67LR水平的降低,并且没有观察到KRS水平的变化(图17A)。

[0216] 为了确定KRS和67LR中的变化在胞质溶胶或膜中何处产生最显著的影响,我们在分级分离后分析细胞。结果表明,H₂O₂引起的KRS水平降低不是胞质形式,而是膜形式,并且在膜中也发生67LR水平的增加(图17B)。总之,这些结果暗示DX2结合KRS,导致KRS的膜形式增加,并因此导致67LR表达增加,从而防止神经元细胞失巢凋亡。

实施例9. 体内研究评价AAV2-DX2对RDD的作用

[0217] 为了理解对视网膜退行性疾病患者的潜在效力,在小鼠和兔的三个RDD动物模型(即激光诱导的脉络膜血管新生、Mdm1^{-/-} (CRISPR/Cas9 KO) 和碘酸钠诱导的视网膜变性模型) 中评价AAV2-DX2的预防作用和疗效。总的来说,AAV2-DX2被确定在预防和治疗方面都是有效的。这些研究总结如下。实施例9-1. AAV2-DX2在小鼠Mdm1^{-/-} (CRISPR/Cas9 KO) 模型中显示DX2的预防作用

[0218] 小鼠双微体同源基因1(Mouse double minute 1) (Mdm1) 可能涉及中心粒的功能和结构以及变性。Son等人证明Mdm1蛋白位于视网膜光感受器细胞的连接纤毛(CC) 处。Mdm1转录本的缺失可能是导致发生进行性视网膜变性机制的基础。

[0219] 使用CRISPR/Cas9产生Mdm1^{-/-}小鼠,并且小鼠表现出视网膜变性和异常的眼电生理学(eye electrophysiology)³⁹。在视网膜中转导AAV-DX2导致总神经视网膜厚度的恢复(图18B)。DX2的转导显示了较厚的RPE层(图18C) 和光感受器外段层(图18D),这意味着DX2表达防止了RPE变性和光感受器纤毛降解。DX2的转导也显示光感受器的较厚的外核层(图18E) 和外网层(图18F),这表明DX2表达降低了光感受器变性。

[0220] 图18G显示了RPE(视网膜色素上皮) 的完整性和增殖。DX2基因的转导通过活化RPE的增殖导致RPE完整性的恢复。图18H显示了PR(光感受器) 的恢复。DX2基因的转导通过活化PR增殖导致PR群体的恢复。

[0221] 图18I显示了RPE和PR的细胞增殖。测量Ki67表达以分析RPE和光感受器层中的增殖。RPE(左图) 和光感受器外段层(右图) 中的增殖在AAV2-DX2转染的样品中显著更高。

[0222] 图18J-18O显示了视网膜的功能恢复。与RDD模型(mdm1^{-/-}) 或阴性对照(mdm1^{-/+} AAV-GFP) 相比,AAV2-DX2转导显示a波振幅增加(图18L) 和延迟减少(图18M),表明DX2表达

降低了光感受器的电生理功能和视觉灵敏度的损害。与RDD模型 (mdm1^{-/-}) 相比, AAV2-DX2 转染的样品没有显示b波振幅的变化 (图18N), 但减少了延迟 (图18O), 这表明DX2只影响RPE和光感受器, 而不影响双极细胞 (光感受器后神经元)。

[0223] AAV2-DX2转导样品的视网膜电流图显示正常ERG图形格式的恢复有所增加 (图18J和18K)。AAV2-DX2转导的样品显示相比于干性AMD (mdm1^{-/-}) 略微增加的a波振幅 (图18L) 和减少的延迟 (图18M), 这表明DX2的表达降低了光感受器电生理功能的损伤。与RDD模型 (mdm1^{-/-}) 相比, AAV2-DX2转导的样品的b波振幅没有变化 (图18N), 但延迟减少 (图18O)。

[0224] DX2对视网膜变性的存活效应和由腺相关病毒 (AAV) 通过SR和IV注射递送至兔视网膜中的DX2的抗凋亡功效。

实施例9-2. 材料和方法

[0225] 1. 动物实验 (基因敲除小鼠)

[0226] 对于视网膜变性小鼠模型实验, 生成Mdm1^{-/-} (CRISPR/Cas9 KO) 小鼠以呈现进行性光感受器和RPE变性。在动物设施中, 在无特定病原体条件和恒定环境条件 (21°C-23°C温度, 50-60%湿度和12小时光/暗循环) 下将动物饲养在单独的笼中。3周龄时在视网膜下空间注射AAV2-DX2和阴性对照 (AAV2-GFP)。在3月龄时进行视网膜的组织学测量和功能恢复。使用38G无菌微针头 (INCYTO, KR) 将4μl体积的AAV2-DX2/AAV2-GFP通过经巩膜注射注入三周龄Mdm1^{-/-}小鼠的视网膜下腔, 以尽量减少视网膜创伤。将AAV2-GFP/DX2注射到同一动物中。AAV2-GFP注射到OS (左)。AAV2-DX2注射到OD (右)。

[0227] 2. 电生理学功能评估

[0228] 使用38G无菌微针头将4μl体积的AAV2-DX2/AAV2-GFP注射到三周龄的Mdm1^{-/-}小鼠的视网膜下腔, 以尽量减少视网膜创伤。使用三月龄的小鼠。对于最终的测量, 评价WT (n=11)、mdm1^{-/-} (n=6)、mdm1^{-/-} (AAV2+GFP) (n=6) 和mdm1^{-/-} (AAV2+DX2) (n=7)。对于光感受器功能评价的视网膜电图, 使用OcuScience®HMsERG。用Avertin (1%) 诱导小鼠麻醉, 用3%异氟烷吸入维持麻醉, 并将小鼠放在加热垫上以维持其生理条件。将一滴2%羟丙甲纤维素溶液滴在啮齿动物用银嵌螺纹电极角膜接触镜 (Rodent Contact Lens with Silver-embedded Thread Electrode) 上, 以保持与角膜接触并保持角膜湿润。将小鼠置于76mm直径的Ganzfeld圆顶下, 以保持黑暗并均匀照亮眼睛。测量是根据ISCEV扩展的全域ERG标准协议 (ISCEV-Extended full-field ERG standards protocols) 进行的。使用ERGVIEW分析数据, 并选择组合标准Rod&Cone响应值进行分析, 闪光强度为3000mcd.s/m², 0.10Hz。波分析是针对光感受器细胞功能进行的。b波分析是针对双极细胞和水平细胞功能进行的。分析a波和b波的振幅和延迟。

[0229] 3. 组织学分析

[0230] ERG后将所有小鼠安乐死, 并收集它们的眼球。在4°C下, 将眼球在4%PFA中固定过夜。眼球在30%蔗糖下脱水, 并用OCT化合物包埋用于组织冷冻切片。所有视网膜冷冻切片样品从10μm厚的含有视神经的切片中获得。分析视网膜冷冻切片。H&E用于层厚度分析。用Leica LAS程序进行层厚度分析。使用免疫荧光进行RPE65和视蛋白表达以及增殖评估 (Ki67)。使用Image J测量免疫荧光ROI集和重叠系数测量值。

[0231] 4. 统计分析

[0232] 使用Student's t检验进行初步分析。将P值与mdm1^{-/-} (AAV2+DX2) 进行比较。为了

进行恢复评估,将P值与WT进行比较。对于完整数据,使用IBM SPSS statistics 23执行Levene方差齐性检验、ANOVA检验和事后分析(Dunnett(T3)、Tukey HSD)评估。

实施例10.AAV2-DX2在激光诱导的脉络膜血管新生(CNV)小鼠模型中显示DX2的预防效力

实施例10-1.AAV2-DX2处理的小鼠减弱了激光诱导的脉络膜血管新生

[0233] 激光诱导的脉络膜血管新生(CNV)模型是广泛用于视网膜退行性疾病(RDD)的动物模型。在该模型中,使用激光破坏布鲁赫膜,这使得下层的脉络膜血管穿透并生长到色素上皮下方的空间中。对5周龄雄性C57BL/6小鼠($n=12$)进行scAAV2-GFP(对照)或AAV2-DX2的视网膜下注射(第0天)。注射后二十一天,通过激光凝固法产生CNV(第21天)。激光处理后十四天,进行荧光素血管成像和ICG血管成像(第35天)。第二天,处死小鼠,制作脉络膜扁平载片(flat mount),并用(FITC)偶联的同工凝集素B4染色(图19A)(第36天)。通过荧光素血管成像在激光诱导的光凝固部位清楚地观察到由新血管形成引起的血管渗漏。使用ICG血管成像获取脉络膜的血管成像。使用扁平载片评估清晰界定的同工凝集素阳性CNV的存在和面积。在荧光素血管成像中,DX2注射与GFP注射对照相比显示血管渗漏减少(图19A)。类似地,在ICG血管成像中,DX2注射的小鼠与GFP注射的小鼠相比显示CNV面积减少(图19A)。此外,用同工凝集素B4染色的脉络膜扁平载片表明DX2注射的小鼠中CNV形成面积的显著减少(图19A)。

[0234] 通过使用荧光素血管成像(FA)测量总的高荧光区域和使用ICGA测量CNV面积,估计泄漏面积与CNV面积的比率(图19B)。与GFP对照($n=12$)相比,在注射DX2的小鼠中使用同工凝集素B4染色在布鲁赫膜处的平均CNV面积也显著较小(图19C)。基于该结果,DX2在CNV小鼠模型中具有预防作用。组织学上证实,炎症细胞,特别是(巨噬细胞),位于退行性病变附近/内,包括布鲁赫膜破裂、RPE萎缩和CNV区域。(巨噬细胞)在CNV病变中已显示分泌促血管生成因子如VEGF和促炎细胞因子如TNF。在图19D中,DX2注射的小鼠的炎症细胞的数量与GFP对照CNV细胞相比显著较小。过量的血管内皮生长因子(VEGF)引发黄斑下异常血管的生长和渗漏,导致不可逆的中央视觉丧失。在这种情况下,已经进行了许多努力来开发靶向VEGF的抗血管生成疗法,用于治疗视网膜退行性疾病。这些药物已显示能减缓RDD的发展,并且在某些情况下,通过抑制血管生成来改善视敏度。在本文中,我们在激光诱导脉络膜血管新生小鼠之前用DX2进行处理,并比较了GFP处理小鼠的VEGF表达($n=6$)(图19E)。DX2处理的小鼠与GFP处理的小鼠相比显示较少的VEGF表达。该数据还表明了DX2对CNV模型小鼠的预防作用。

实施例10-2.材料和方法

[0235] 1.动物实验(小鼠)

[0236] 在动物设施中,在无特定病原体条件和恒定环境条件(21℃-23℃温度,50-60%湿度和12小时光/暗循环)下将动物饲养在单独的笼中。每组中的小鼠左眼(ocular sinister)(OS,左眼)用AAV-GFP处理,而右眼(Ocular Dexter)(OD,右眼)用AAV-DX2处理。(注射: 5×10^8 vg)。视网膜下注射1周和10周后,用激光光凝仪,眼底的RPE层分别进行激光诱导以分别建立3周、3个月视网膜退行性疾病模型。激光治疗2周、2个月后,分离小鼠眼球。

[0237] 2.视网膜下注射方案

[0238] 麻醉啮齿动物。使用腹膜内注射100mg/ml氯胺酮和10mg/ml赛拉嗪(20 μ l/10g体

重)代替异氟烷吸入。捏住动物的一只爪子,确保动物深度麻醉。如果它退缩,则等待几分钟,再试一次,然后开始视网膜下注射。将啮齿动物侧卧,使要注射的眼睛朝向天花板。在解剖显微镜下轻轻拉伸皮肤,使眼球稍微从眼窝中弹出(暂时性眼球突出),然后用两根手指握住头部,略高于耳朵,靠近下颌,轻轻拉伸与眼睑平行的皮肤,使眼球稍微从眼窝中弹出。38G无菌微针头(INCYTO, KR),在角膜缘正下方以一定角度打一个孔,以避免针接触晶状体。从眼睛中收回一次性使用的尖锐针,同时保持对头部的夹持。在将预装载的带钝针的注射器安装在显微操作器上或用手握住它之后,将带钝针的注射器的尖端插入穿过孔,再次注意不要碰到晶状体,然后轻轻地将其推入眼中,直到感觉到阻力。尽量减少所有动作,小心地将病毒缓慢注入视网膜下空间。AAV2-GFP注射到OS(左)。AAV2-DX2注射到OD(右)。缓慢地收回注射器。滴上眼部保湿液以保持眼部湿润。继续监测动物,直到它恢复胸骨卧位。

[0239] 3. 小鼠激光诱导的CNV模型方案

[0240] 在对老鼠进行激光诱导之前,将激光器和裂隙灯定位在容易接近的位置。打开激光器并设定到预定参数。麻醉啮齿动物。使用腹腔内注射100mg/ml氯胺酮和10mg/ml赛拉嗪(20 μ l/10g体重)代替吸入异氟烷。将小鼠侧卧并将一滴(约30 μ l)盐酸丁卡因滴入每只眼睛进行局部麻醉。等待2分钟以使溶液生效。用一滴局部托吡卡胺重复前一步骤用于瞳孔扩张。或者,使用盐酸去氧肾上腺素(2.5%)用于扩张。经过适当时间后,迅速将小鼠放在小鼠平台上,并将平台放在裂隙灯的下颌托上。打开裂隙灯至最低光亮度并检查瞳孔扩张程度。如果瞳孔没有充分扩张(大约2.5-3mm),则将小鼠放回动物保温处并等待。或者,施用另一滴托吡卡胺。一旦眼睛充分扩张,进行激光手术。调整小鼠在小鼠台上的放置,使其处于理想的位置以观察视神经。将小鼠放在支架上,使其水平放置,垂直于裂隙灯光束,头部在一侧,尾巴在另一侧。稍微转动小鼠,使其与靠近激光操作者的头部成大约170的角度。在小鼠被理想地定位后,将一滴人工泪液置于25mm $\times$ 25mm的玻璃盖玻片上。将一滴人工泪液滴在小鼠的另一只眼睛上——这将确保眼睛湿润并有助于延缓白内障的形成。用拇指和食指握住盖玻片的一角;将玻璃挤压在两根手指的指尖之间。轻轻地用剩下的三根手指环绕动物的身体以支撑和稳定手部。将手放在能够轻松将玻璃盖玻片放在小鼠眼睛上的位置。一旦获得稳定的位置,小心地将玻璃盖玻片(仍粘附有一滴人工泪液)按到小鼠的眼睛上。确保盖玻片尽可能垂直于激光束,以防止激光束散射或反射。盖玻片充当角膜接触镜,使角膜变平。通过裂隙灯观察,用自由的手切换对焦,直到可以看到视网膜。视网膜将呈现浅黄色/红色,具体取决于所观察的位置,可以看到明显的红色血管。缓慢而小心地操纵小鼠头部和/或盖玻片,直到看到视神经。视神经将呈黄色,有多条血管从中辐射出来。一旦操作者确认可以看到视神经,则打开激光聚焦光束。一旦打开激光束,操纵激光聚焦光束到期望的位置(距离视神经大约1个圆盘直径(1disc diameter))。将激光束聚焦在眼底的RPE上。通过具有最锐利和最清晰的激光束来实现适当的聚焦。如果瞄准光束看起来是椭圆形或失焦,则切换裂隙灯焦点或重新定位玻璃盖玻片。一旦瞄准光束聚焦在RPE上,就使用激光器的脚踏触发器启动激光施用。激光施用后立即观察气泡的出现。激光照射的轮廓应清晰,没有任何模糊感。对于所有期望的CNV位置(通常在视神经周围的3、6、9和12点钟位置)重复前面的3个步骤。在笔记本中记录每次激光照射施用的位置和结果以及每次施用的照射对于眼睛的结果(成功、模糊、出血等)。确保在不使用时将激光器置于待机模式。如果需要,对小鼠的另一只眼睛重复先前所有步骤,使用另一只手稳定并使用新的盖玻片。在执行所有所需的激

光发射之后,关闭激光器和裂隙灯。丢弃盖玻片,并将小鼠置于温热器上,以便从麻醉中恢复。用肉眼检查(acrosopically inspect)眼睛的任何损伤,并滴上一滴人工泪液以保持眼睛湿润并可能防止未来的白内障发展。一旦小鼠从麻醉中恢复过来,将其放回笼子中。

[0241] 4. 荧光素血管成像

[0242] 在除去角膜和晶状体后,将眼球在4%多聚甲醛(Electron Microscopic Sciences,宾夕法尼亚州哈特菲尔德)中固定2小时。解剖RPE/脉络膜/巩膜的后眼杯(posterior eyecups),并除去玻璃体。将眼杯在4℃下与(AlexaFluor 647或FITC)-偶联的同工凝集素B4(1:200,Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德)一起孵育过夜,以标记侵入的脉络膜血管。

[0243] 5. 通过Western印迹检测血管生成因子的表达

[0244] 收集细胞,用含有1% Triton X-100的PBS裂解。将等量的蛋白质加载到SDS-PAGE凝胶的孔中,并在100V下转移到硝酸纤维素滤膜上2小时。用含有1% BSA的PBST(含有Tween 20的磷酸盐缓冲盐水)在室温下封闭该膜1小时,并用抗VEGF和抗β肌动蛋白抗体在室温下探测1小时。用PBST洗膜三次,然后与二抗在室温下孵育1小时。用PBST洗涤三次后,检测到免疫反应条带。使用Image J软件定量数据。

[0245] 6. 统计分析

[0246] 使用Student's t检验进行初步分析。将P值与mdm1-/- (AAV2+DX2)进行比较。为了进行恢复评估,将P值与WT进行比较。对于完整数据,使用IBM SPSS statistics 23执行Levene方差齐性检验、ANOVA检验和事后分析(Dunnett(T3)、Tukey HSD)评估。

实施例11. AAV2-DX2改善碘酸钠(SI)诱导的兔RDD模型中的视网膜变性

[0247] 碘酸钠(SI)是一种广泛使用的氧化剂,通过诱导感光细胞^{40 41}和视网膜色素上皮细胞(RPE)的死亡而生成视网膜变性模型。一次静脉注射碘酸钠溶液,剂量为30mg/kg,以生成RDD模型⁴²。第1次视网膜神经变性诱导后21天,眼底图像显示碘酸钠诱导组(G2)的RPE变性区域与正常对照组(G1)相比明显变性。与G2相比,供试品处理组(G5和G6)的RPE变性面积(%)水平显著恢复(图20A-20B)。

[0248] 在组织学检查中,与正常对照组(G1)相比,碘酸钠诱导组(G2)的视网膜色素上皮(RPE)变性面积(%)水平显著变性($p < 0.001$)。与G2相比,供试品处理组(G5和G6)的RPE变性面积(%)水平显著恢复($p < 0.01$, $p < 0.05$) (图20D)。与正常对照组(G1)相比,钠诱导组(G2)光感受器层的外段水平显著降低($p < 0.001$),并且与G2相比,供试品处理组(G5和G6)的水平恢复($p < 0.01$) (图20E)。与G1相比,碘酸钠诱导的组(G2)的视网膜厚度水平显著降低($p < 0.001$)。与G2相比,供试品处理组(G5和G6)的水平有所恢复($p < 0.05$) (图20F)。

[0249] 在免疫组织化学分析中,与G1相比,G2的视紫红质阳性面积(%)水平显著降低($p < 0.001$, $p < 0.01$)。与G2相比,G5和G6的视紫红质阳性面积(%)水平显著恢复($p < 0.01$) (图20G-20J)。与G1相比,G2的神经节阳性细胞(%)水平显著降低($p < 0.001$)。与G2相比,G3、G4和G6的神经节阳性细胞(%)水平显著恢复($p < 0.05$)。

[0250] 第1次视网膜神经变性诱导后21天,与正常对照组(G1)相比,碘酸钠诱导组(G2)的a波和b波振幅水平显著降低($p < 0.001$)。与G2相比,供试品处理组(G5和G6)的a波和b波振幅水平显著恢复($p < 0.05$) (图20K-20L)。

[0251] 最后,我们生成了一个非常严重的RDD模型,以确认证实DX2发挥其存活作用,即使

在视网膜严重受损的情况下也能挽救视网膜功能。一次静脉注射碘酸钠溶液,剂量为60mg/kg,以产生非常严重RDD模型。Koster C等人(2022)。

[0252] 与HG2 (严重RDD组) 相比,在两个DX2处理的HG组中均观察到a波和b波振幅水平的统计学显著改善(即通过视网膜下途径或玻璃体内途径注射 5×10^{10} VG剂量的AAV2-DX2) ($p < 0.05$)。参见下表2。

表2

		注射途径	视网膜变性诱导	治疗剂量
HG1	-	-	-	-
HG2	媒介物	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

[0253] 图21A-21B显示了a波(图21A)和b波(图21B)的视网膜电图测量结果。

[0254] 材料和方法

[0255] 1. 动物实验(兔)

[0256] 雄性南美栗鼠兔52只(约13周龄,2.5~3.0kg,Dream Bio Co.,Ltd.)用于体内实验。设定环境对照以维持以下条件:温度范围 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$,相对湿度范围 $55 \pm 15\%$,通风10-20次/小时,发光强度为150-300勒克斯,12小时光照/12小时黑暗循环。实验动物饲料购自Dream Bio(Cargill Agri Purina Inc.制造),动物可自由采食。水通过聚碳酸酯水瓶自由采食。实验结束时,所有存活动物麻醉后安乐死,摘除右眼球,每组前半部分的眼球在角膜中央穿刺,用10%中性缓冲福尔马林溶液固定。取各组后半部分右眼球视网膜(含脉络膜)样品,并放入标有动物识别号的微管中,储存于温度低于 -70°C 的深冷冰箱中。

[0257] 2. 碘酸钠诱导的视网膜神经变性疾病兔模型

[0258] 在第1次诱导日(第0天),对拟诱导眼部退行性疾病的动物静脉注射一次碘酸钠(Sigma-Aldrich Co.)溶液5mg/kg,在第2次诱导日(第14天),根据试验组的设置,静脉注射一次碘酸钠溶液30mg/kg或60mg/kg。通常,视网膜变性研究用25-30mg/kg碘酸钠溶液进行。然而,用非常高剂量的碘酸钠溶液(60mg/kg)诱导视网膜变性,以测试DX2是否在视神经被破坏并发生完全视力丧失的情况下,仍能有效维持神经元存活。在施用日(第5天)注射一次供试品。在玻璃体内注射的情况下,将动物麻醉,并且用装备有31号针头的注射器将供试品通过玻璃体内注射到右眼球内。在视网膜下注射的情况下,将动物麻醉,并且用装备有31号针头的注射器将供试品通过巩膜途径注射到右眼球内。

[0259] 试验组的设置如下表3所示。

表3

		注射途径	视网膜变性诱导	治疗剂量
G1	-	-	-	-
G2	媒介物	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:正常对照。G2:媒介物对照。I.Vt:玻璃体内注射。S.R:视网膜下注射。vg:病毒基因组。

[0260] 3.眼底照相

[0261] 在退化性眼病诱导和实验结束之前,在将滴眼剂(Mydriacyl oph solin,1%)施用于两个眼球后,将动物麻醉,用眼底照相机(TRC-50IX,TOPCON,日本)拍摄眼底图像。使用Image J(NIH,Bethesda,MD)分析眼底图像中的视网膜色素上皮(RPE)变性面积。变性面积(%)=变性面积/总面积。

[0262] 4.电生理学功能评估

[0263] 在实验结束之前,对所有存活动物的右眼进行视网膜电图(ERG)检查。麻醉动物后,使其在暗室中适应60分钟,用ERG设备(HMs-ERG,Oculus,美国)进行ERG测量。在暗室中用闪光灯测量ERG,通过与正常对照比较振幅评价a波和b波。

[0264] 5.组织病理学检查

[0265] 固定的眼部组织经过切割、脱水、石蜡包埋、解剖等一般组织处理后,制作组织病理学检查标本,进行苏木精&伊红染色,用光学显微镜(Olympus BX53,日本)测量视网膜色素上皮(RPE)、光感受器外段、外核层、外网层以及整个视网膜的厚度。

[0266] 6.通过RT-PCR检测DX2的表达

[0267] 使用RNA分离GeneAll hybrid-R试剂盒(GeneAll Biotechnology Co.,Ltd.,韩国)从兔视网膜(包括脉络膜)分离总RNA,并用cDNA合成试剂盒(Toyobo,日本)进行逆转录。然后使用qPCRBIO SyGreen Blue Mix(PCR Biosystems Ltd.,英国)对互补DNA进行实时PCR。用CFX96 touch(BioRad,美国)进行扩增、检测和数据分析。

[0268] 7.统计分析

[0269] 本研究结果假设服从正态分布,采用参数多重比较程序或非参数多重比较程序进行分析。当单因素方差分析(ANOVA)结果显著时,采用Dunnett多重比较程序进行事后分析。

[0270] 使用Prism 7.04(GraphPad Software Inc.,美国加利福尼亚州圣地亚哥)进行统计分析,统计学显著性设定为P值小于0.05。

实施例12.AAV2-DX2在激光诱导的脉络膜血管新生(CNV)兔模型中显示DX2的预防效力

[0271] 使用15只雄性南美栗鼠兔,通过激光诱导脉络膜血管新生(CNV)来生成视网膜退行性疾病(RDD)兔模型。如图22A所示,脉络膜血管新生(CNV)面积分析的结果是,在诱导CNV后14、21、28天,与G2相比,G3(SR)、G4(IVT)和阳性对照(G5)的荧光素强度水平显著降低($p < 0.001$ 、 $p < 0.01$ 或 $p < 0.05$)。

[0272] 图22B显示了使用同工凝集素B4染色分析CNV面积,所有测试制品处理组(G3,G4)和阳性对照(G5)的CNV面积水平趋于降低,但未达到统计学显著性。

实施例13.AAV2-DX2不会在全身器官中诱导任何组织病理学异常或肿瘤模式

[0273] 进行全身组织病理学分析以测试AAV2-DX2的任何致癌性的潜在毒性。如表4中所总结的,施用AAV2-DX2的动物在肾脏、肝脏、脾脏、脑、淋巴结、肺等中没有显示任何组织病理学异常或肿瘤模式。与对照(G1)组相比,存活率不受影响。

表4.器官组织病理学分析

组织病理学检查结果				
器官	G2	G3	G4	G5
大脑	未检测到异常			
睾丸	未检测到异常			
肾脏-L	未检测到异常			
肾脏-R	未检测到异常			
肝脏	未检测到异常			
肺	未检测到异常			
脊髓	未检测到异常			
脾脏	未检测到异常			
胃	未检测到异常			
心脏	未检测到异常			
胸腺	未检测到异常			
胰腺	未检测到异常			
肠系膜淋巴结	未检测到异常			
左眼(无激光诱导)	未检测到异常			

实施例14.通过AAV2-DX2-miR-3PT进行初步分布研究以确认注射的组织神经元细胞特异性DX2表达

[0274] 为了观察使用miR-3P T VECTOR系统的DX2的生物分布模式,处死动物,并使用qPCR分析胸腺、肝脏、睾丸、大脑、脾脏、肾脏、心脏、胃、肠系膜淋巴结、脊髓、胰腺、肺中DX2的表达(图23B-23M)。qPCR分析确认仅在注射组织区域观察到DX2的表达(图23A)。

[0275] 材料和方法

[0276] 1. 动物实验(兔)

[0277] 雄性南美栗鼠兔15只(约13周龄,2.5~3.0kg,Dream Bio Co.,Ltd.)用于体内实验。设定环境对照以维持以下条件:温度范围 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$,相对湿度范围 $55\pm 15\%$,通风10-20次/小时,发光强度为150-300勒克斯,12小时光照/12小时黑暗循环。实验动物饲料购自Dream Bio(Cargill Agri Purina Inc.制造),动物可自由采食。水通过聚碳酸酯水瓶自由采食。实验结束时,所有存活动物麻醉后安乐死,摘除右眼球,每组前半部分的眼球在角膜中央穿刺,用10%中性缓冲福尔马林溶液固定。取各组后半部分右眼球视网膜(含脉络膜)样品,并放入标有动物识别号的微管中,储存于温度低于 -70°C 的深冷冰箱中。在玻璃体内注射的情况下,将动物麻醉,并且用装备有31号针头的注射器将供试品通过玻璃体内注射到右眼球内。

[0278] 在视网膜下注射的情况下,将动物麻醉,并且用装备有31号针头的注射器将供试品通过巩膜途径注射到右眼球内。麻醉兔后,用无菌盐水对G1兔和每组中前述编号标记的兔进行全身灌注,摘取下列器官并储存在低于 -70°C 以下的深冷冰箱中待分析。

[0279] 摘取的器官:大脑、睾丸、肾脏、肝脏、肺、脊髓、脾脏、胃、心、胸腺、胰腺、淋巴结和右眼(G1双眼)的视网膜/脉络膜。

[0280] 在实验结束时,在麻醉后将标记有后续编号的兔安乐死后,取出右眼,用针穿刺角膜中心并用10%中性缓冲福尔马林固定。摘取并固定下列器官。

[0281] 摘取的器官:大脑、睾丸、肾脏、肝脏、肺、脊髓、脾脏、胃、心、胸腺、胰腺和淋巴结。

[0282] 试验组的设置如下表5所示。

表5

		疾病诱导	注射途径	治疗剂量
G1	媒介物	N	-	-
G2	媒介物	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

G1:正常对照。G2:媒介物对照。I.Vt:玻璃体内注射。S.R:视网膜下注射。vg:病毒基因组。

[0283] 兔激光诱导CNV模型方案

[0284] 在右眼球滴上眼药水(Mydriacyl oph soln,1%)后,对动物进行麻醉。用激光(Elite,Lumenis,USA)在532nm、功率150mW、持续时间0.1秒的条件下照射眼睛,然后在大约6点钟方向的视神经周围产生六个斑点。

[0285] 荧光素血管成像

[0286] 在右眼滴上眼药水(Mydriacyl oph soln,1%)后,在第0、7、14、21和28天对动物进行麻醉。并通过静脉注射1mL荧光素钠盐溶液(2%),在2分钟内使用眼底照相机(TRC-50IX,TOPCON,日本)拍摄图像。

[0287] 使用视网膜荧光眼底照相进行视网膜CNV面积和功效评价。使用ImageJ软件(NIH,马里兰州贝塞斯达)进行图像分析以验证照射部位的荧光强度。

[0288] 荧光素强度(%)计算如下;

[0289] $\text{荧光素强度}(\%) = (\text{荧光素强度值} - \text{背景值的平均值}(G1)^{1}) / G2 \text{荧光素强度值平均值}$

[0290] 测量没有CNV斑点的视网膜的荧光素强度并将其用作背景值。

[0291] 组织病理学分析

[0292] 固定的组织进行一般组织处理如切割、脱水、石蜡包埋和解剖以产生组织病理学检查的样品后,进行苏木精&伊红染色,使用光学显微镜(Olympus BX53,日本)观察组织病理学变化。用脉络膜扁平载片法用固定的眼组织进行同工凝集素B4染色以分析CNV面积。

[0293] 通过RT-PCR检测DX2的表达

[0294] 使用RNA分离Geneall hybrid-R试剂盒(GeneAll Biotechnology Co.,Ltd.,韩国)从兔眼组织和各器官中分离总RNA,并用cDNA合成试剂盒(Toyobo,日本)进行逆转录。

[0295] 然后使用qPCR BIO SyGreen Blue Mix(PCR Biosystems Ltd.,英国)对互补DNA进行实时PCR。用CFX96 touch(BioRad,美国)进行扩增、检测和数据分析。使用摘取的器官和眼部组织对靶基因进行RT-PCR分析,以确认与GAPDH表达相比的靶基因表达量。

[0296] 对于本研究的结果,假定数据是正常的,并且使用参数单因素ANOVA验证试验组之间的显著性。在显著的情况下,使用Dunnett多重比较检验进行事后检验。使用Prism 7.04(GraphPad Software Inc.,美国加利福尼亚州圣地亚哥)进行统计分析,当p值小于0.05时确定为具有统计学显著性。

[0297] 结论

[0298] 在本研究中,已经证明了以下内容:(1)DX2对视网膜变性的存活效应;(2)利用DX2治疗视网膜退行性疾病;通过腺相关病毒(AAV)经SR和IV注射递送至小鼠和兔的视网膜中的DX2抗凋亡功效。因此,还确认了利用存活基因DX2的基因治疗作为治疗视网膜退行性疾病的潜在选择的有效性。

[0299] 参考文献

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/iovs.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.Vandenberghe 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 3trial.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.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,Hiriyanna 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.

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.

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.

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 TNF α -dependent apoptosis via ubiquitin-mediated degradation of TRAF2. *J Cell Sci*. Aug 12 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.

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.

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 11998;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.

28.Olivares-Gonzalez L,Velasco S,Campillo I,Rodrigo R.Retinal Inflammation,Cell Death and Inherited Retinal Dystrophies.Int J Mol Sci.Feb 2020;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.Mar2015;45:30-57.doi:10.1016/j.preteyeres.2014.11.004.

31.Murakami Y,Ishikawa K,Nakao S,Sonoda KH.Innate immune response in retinal homeostasis and inflammatory disorders.Prog Retin Eye Res.Jan2020;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.

34.Christine CW,Starr PA,Larson PS,et al.Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease.Neurology.Nov 172009;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 202008;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.

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 H(2)O

(2)-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.

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.

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).

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).

48. KR 10-1067816 (2011).

49. US2019/0298858A1.

[0300] 上述具体实施方案的描述将充分揭示本发明的一般特性,其他人可以通过应用本领域技术范围内的知识,在不背离本发明的一般概念的情况下,可以容易地修改和/或适应各种应用。因此,基于本文提供的教导和指导,此类适应和修改旨在属于所公开实施例的等效物的含义和范围。应当理解,本文的措辞或术语是为了描述而不是限制的目的,因此,本领域技术人员应根据教导和指导来解释本说明书的术语或措辞。

[0301] 本发明的宽度和范围不应受上述任何示例性实施方案的限制,而应仅根据以下权利要求及其等同物来定义。

[0302] 本文描述的所有各个方面、实施方案和选项可以以任何和所有变化形式进行组合。

[0303] 在本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都通过引用并入本文,其引用范围与每个单独的出版物、专利或专利申请被具体且单独地指出以引用的方式并入本文中相同。

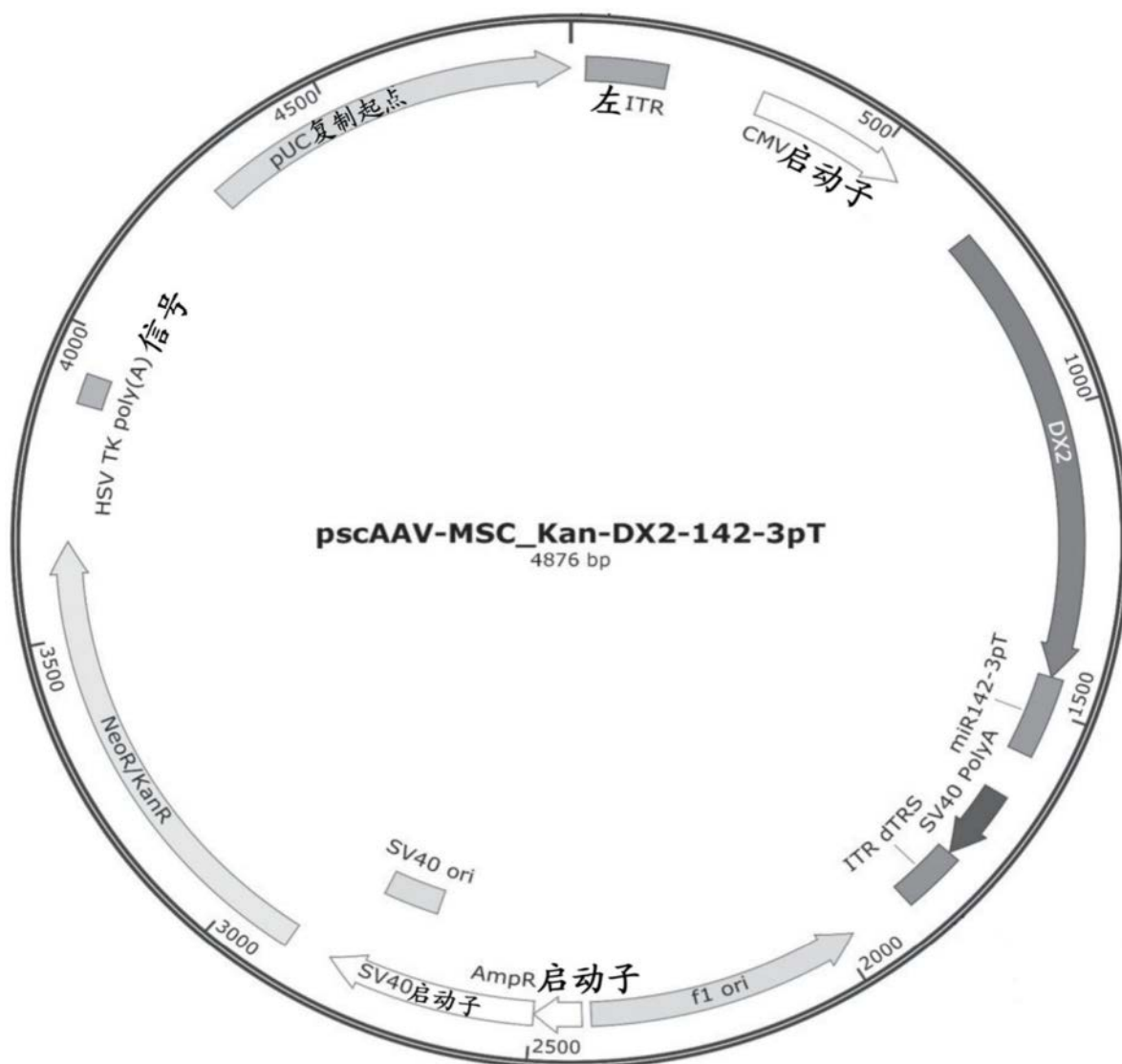


图1

通过miR142-3pT的DX2表达敲低

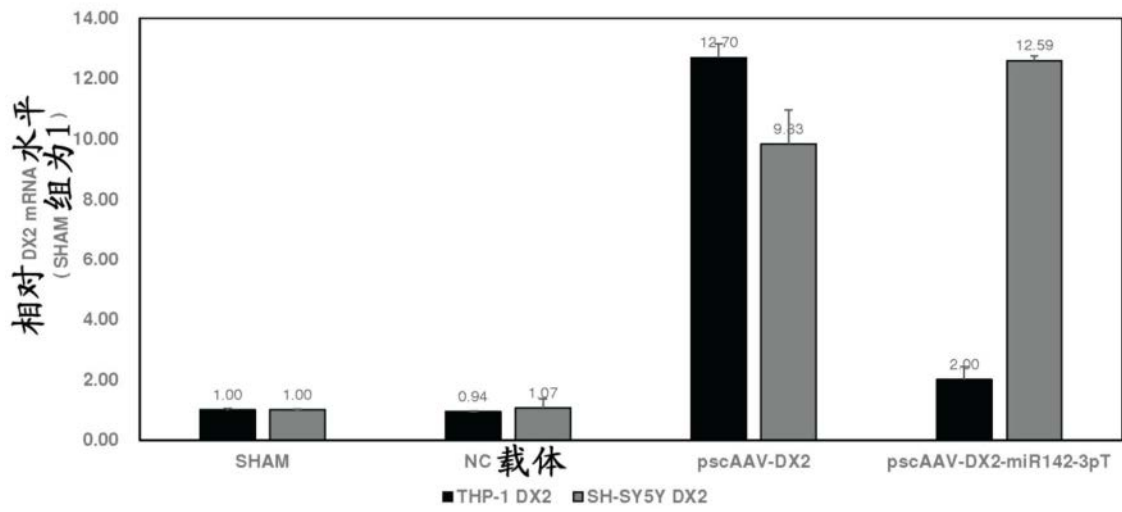


图2

ccagaagcttgctagctccataaagtaggaaacactacatcactccataaagtaggaaacactaca
gatattccataaagtaggaaacactacatcactccataaagtaggaaacactacaaagcttgtag

图3

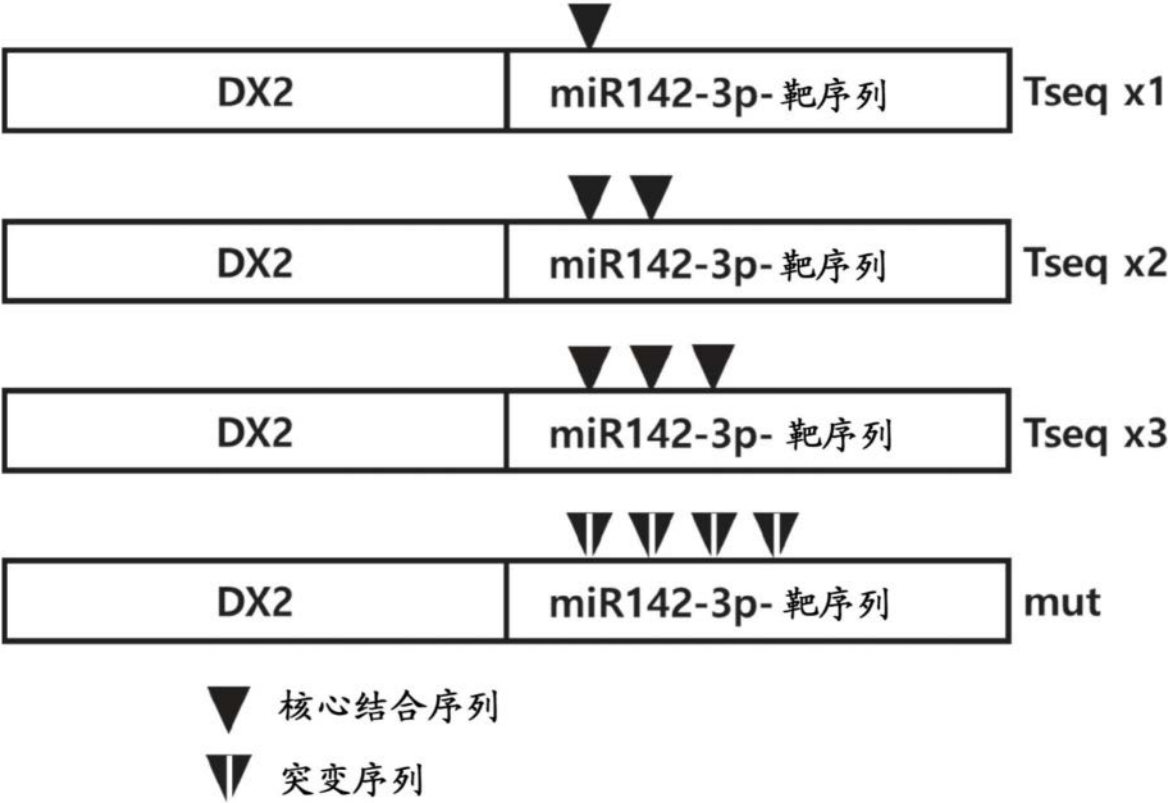


图4A

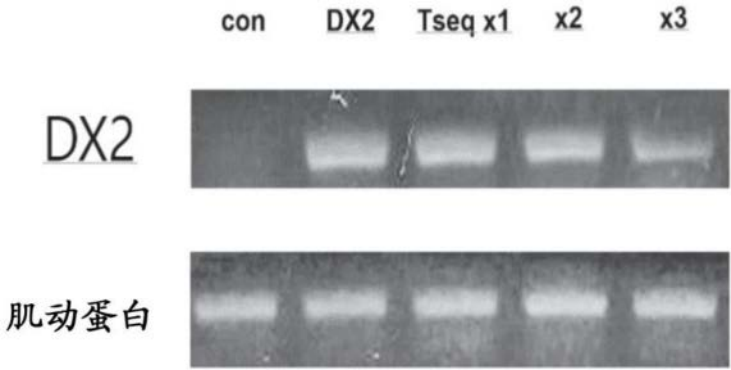


图4B

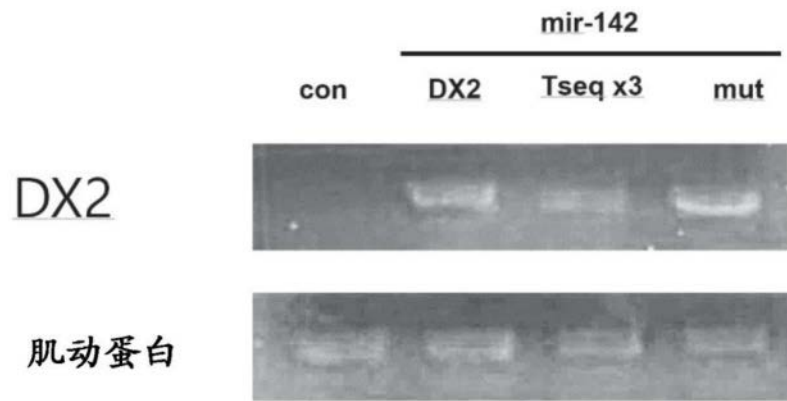


图5

1 SEQ ID NO:12 AAH13630.1 蛋白序列(320a.a)	1	MPMYOVKPYHG6GAPLRVELPTCMYRLPNVHGGRSY6PAPGAGHY0EESNLSLOALESRODDILKRLYELKAAYDGLSKMI	80
2 SEQ ID NO:10 外显子2	1	-----EESNLSLOALESRODDILKRLYELKAAYDGLSKMI	35
3 SEQ ID NO:2 NP_001313536.1(DX2)	1	MPMYOVKPYHG6GAPLRVELPTCMYRLPNVHGGRSY6PAPGAGHY	44
4 SEQ ID NO:13 AAC50391.1_ 蛋白质_(312a.a)	1	MPMYOVKPYHG6GAPLRVELPTCMYRLPNVHGGRSY6PAPGAGHY	44
5 SEQ ID NO:14 XM_005249847.3_(同种型 X1)	1	MOME	4
6 SEQ ID NO:15 NIM_001362787.2_(同种型 f)	1	M-----	4
7 SEQ ID NO:16 NIM_001362785.2	1	MNSP	4
8 SEQ ID NO:17 NIM_001326606.2_(同种型 e)	1	MPMY	4
9 SEQ ID NO:18 NIM_006303.4	1	MPMYOVKPYHG6GAPLRVELPTCMYRLPNVHGGRSY6PAPGAGHY	44
10 SEQ ID NO:19 NIM_001326609.2			
11 SEQ ID NO:19 NIM_001326610.2			
12 SEQ ID NO:19 NIM_001326611.3			
13 SEQ ID NO:20 共有序列			
1 SEQ ID NO:12 AAH13630.1 蛋白序列(320a.a)	81	QTPDADLDVTNIIOADEPTLTNALDLSYLK	127
2 SEQ ID NO:10 外显子2	36	QTPDADLDVTNIIOADEPTLTNALDLSYLK	69
3 SEQ ID NO:2 NP_001313536.1(DX2)	45	-----0-----	58
4 SEQ ID NO:13 AAC50391.1_ 蛋白质_(312a.a)	45	-----0-----	58
5 SEQ ID NO:14 XM_005249847.3_(同种型 X1)	5	-----GTAHYKICG0S0GGGLGTPRTVWLEHRORTKLGEDYKALDIIYINAN	51
6 SEQ ID NO:15 NIM_001362787.2_(同种型 f)	2	-----	14
7 SEQ ID NO:16 NIM_001362785.2	5	-----AVNTLI0RSRHG-----	29
8 SEQ ID NO:17 NIM_001326606.2_(同种型 e)	5	-----0-----	18
9 SEQ ID NO:18 NIM_006303.4	45	-----0-----	58
10 SEQ ID NO:19 NIM_001326609.2	1	-----	13
11 SEQ ID NO:19 NIM_001326610.2	1	-----	13
12 SEQ ID NO:19 NIM_001326611.3	1	-----	13
13 SEQ ID NO:20 共有序列	1	-----	13

图6A

1	SEQ ID NO:12 AAH13630.1 蛋白序列(320a.a)	128	PGSPPLSLLVLHRLLCHEFRVLTSTVHTHSSVKSYPENLLKCF6EONKKOPRODYOLGFTLIHKNVPKTMKFSIOTMCP	207
2	SEQ ID NO:10 外显子2		-----	
3	SEQ ID NO:2 NP_001313536.1(DX2)	59	PASPLSLLVLHRLLCHEFRVLTSTVHTHSSVKSYPENLLKCF6EONKKOPRODYOLGFTLIHKNVPKTMKFSIOTMCP	138
4	SEQ ID NO:13 AAC50391.1_蛋白质_(312a.a)	59	PASPLSLLVLHRLLCHEFRVLTSTVHTHSSVKSYPENLLKCF6EONKKOPRODYOLGFTLIHKNVPKTMKFSIOTMCP	138
5	SEQ ID NO:14 XM_005249847.3-(同种型 X1)	52	PASPLSLLVLHRLLCHEFRVLTSTVHTHSSVKSYPENLLKCF6EONKKOPRODYOLGFTLIHKNVPKTMKFSIOTMCP	131
6	SEQ ID NO:15 NM_001362787.2_(同种型 f)	15	PASPLSLLVLHRLLCHEFRVLTSTVHTHSSVKSYPENLLKCF6EONKKOPRODYOLGFTLIHKNVPKTMKFSIOTMCP	94
7	SEQ ID NO:16 NM_001362785.2	30	PASPLSLLVLHRLLCHEFRVLTSTVHTHSSVKSYPENLLKCF6EONKKOPRODYOLGFTLIHKNVPKTMKFSIOTMCP	109
8	SEQ ID NO:17 NM_001326606.2_(同种型 e)	19	PASPLSLLVLHRLLCHEFRVLTSTVHTHSSVKSYPENLLKCF6EONKKOPRODYOLGFTLIHKNVPKTMKFSIOTMCP	98
9	SEQ ID NO:18 NM_006303.4	59	PASPLSLLVLHRLLCHEFRVLTSTVHTHSSVKSYPENLLKCF6EONKKOPRODYOLGFTLIHKNVPKTMKFSIOTMCP	138
10	SEQ ID NO:19 NM_001326609.2	14	PASPLSLLVLHRLLCHEFRVLTSTVHTHSSVKSYPENLLKCF6EONKKOPRODYOLGFTLIHKNVPKTMKFSIOTMCP	93
11	SEQ ID NO:19 NM_001326610.2	14	PASPLSLLVLHRLLCHEFRVLTSTVHTHSSVKSYPENLLKCF6EONKKOPRODYOLGFTLIHKNVPKTMKFSIOTMCP	93
12	SEQ ID NO:19 NM_001326611.3	14	PASPLSLLVLHRLLCHEFRVLTSTVHTHSSVKSYPENLLKCF6EONKKOPRODYOLGFTLIHKNVPKTMKFSIOTMCP	93
13	SEQ ID NO:20 共有序列	14	PASPLSLLVLHRLLCHEFRVLTSTVHTHSSVKSYPENLLKCF6EONKKOPRODYOLGFTLIHKNVPKTMKFSIOTMCP	93
1	SEQ ID NO:12 AAH13630.1 蛋白序列(320a.a)	208	EGEGNIARFLFSLFGOKHNAYNATLIDSWVDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTVADVYLWSVL00	287
2	SEQ ID NO:10 外显子2		-----	
3	SEQ ID NO:2 NP_001313536.1(DX2)	139	EGEGNIARFLFSLFGOKHNAYNATLIDSWVDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTVADVYLWSVL00	218
4	SEQ ID NO:13 AAC50391.1_蛋白质_(312a.a)	139	EGEGNIARFLFSLFGOKHNAYNATLIDSWVDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTVADVYLWSVL00	218
5	SEQ ID NO:14 XM_005249847.3-(同种型 X1)	132	EGEGNIARFLFSLFGOKHNAYNATLIDSWVDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTVADVYLWSVL00	211
6	SEQ ID NO:15 NM_001362787.2_(同种型 f)	95	EGEGNIARFLFSLFGOKHNAYNATLIDSWVDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTVADVYLWSVL00	174
7	SEQ ID NO:16 NM_001362785.2	110	EGEGNIARFLFSLFGOKHNAYNATLIDSWVDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTVADVYLWSVL00	189
8	SEQ ID NO:17 NM_001326606.2_(同种型 e)	99	EGEGNIARFLFSLFGOKHNAYNATLIDSWVDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTVADVYLWSVL00	178
9	SEQ ID NO:18 NM_006303.4	139	EGEGNIARFLFSLFGOKHNAYNATLIDSWVDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTVADVYLWSVL00	218
10	SEQ ID NO:19 NM_001326609.2	94	EGEGNIARFLFSLFGOKHNAYNATLIDSWVDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTVADVYLWSVL00	173
11	SEQ ID NO:19 NM_001326610.2	94	EGEGNIARFLFSLFGOKHNAYNATLIDSWVDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTVADVYLWSVL00	173
12	SEQ ID NO:19 NM_001326611.3	94	EGEGNIARFLFSLFGOKHNAYNATLIDSWVDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTVADVYLWSVL00	173
13	SEQ ID NO:20 共有序列	94	EGEGNIARFLFSLFGOKHNAYNATLIDSWVDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPWLAGNELTVADVYLWSVL00	173

图6B

1SEQ ID NO:12 AAH13630.1 蛋白序列 (320a.a)	288	IGGCSVTVPANVQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	320
2SEQ ID NO:10 外显子2		-----	
3SEQ ID NO:2 NP_001313536.1(DX2)	219	IGGCSVTVPANVQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	251
4SEQ ID NO:13 AAC50391.1_ 蛋白质_(312a.a)	219	IGGCSVTVPANVQRWMRSCENLAPF-----	243
5SEQ ID NO:14 XM_005249847.3-(同种类型X1)	212	IGGCSVTVPANVQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	244
6SEQ ID NO:15 NM_001362787.2_(同种类型f)	175	IGGCSVTVPANVQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	207
7SEQ ID NO:16 NM_001362785.2	190	IGGCSVTVPANVQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	222
8SEQ ID NO:17 NM_001326606.2_(同种类型e)	179	IGGCSVTVPANVQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	211
9SEQ ID NO:18 NM_006303.4	219	IGGCSVTVPANVQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	251
10SEQ ID NO:19 NM_001326609.2	174	IGGCSVTVPANVQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	206
11SEQ ID NO:19 NM_001326610.2	174	IGGCSVTVPANVQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	206
12SEQ ID NO:19 NM_001326611.3	174	IGGCSVTVPANVQRWMRSCENLAPFNTALKLLK	206
13SEQ ID NO:20 共有序列	174	IGGCSVTVPANVQRWMRSCENLAPF-----	198

图6C

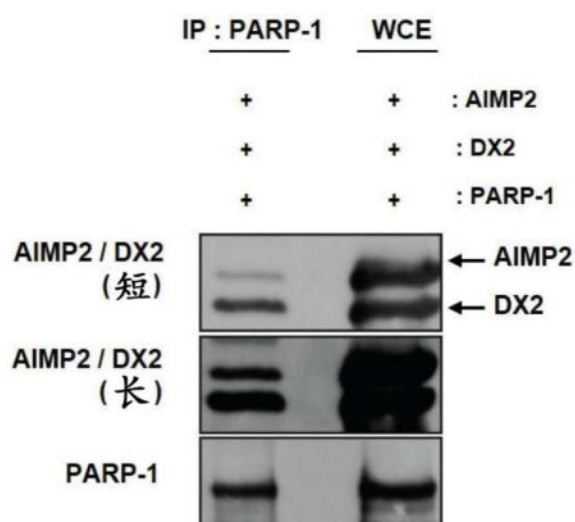


图7A

DX2 过表达

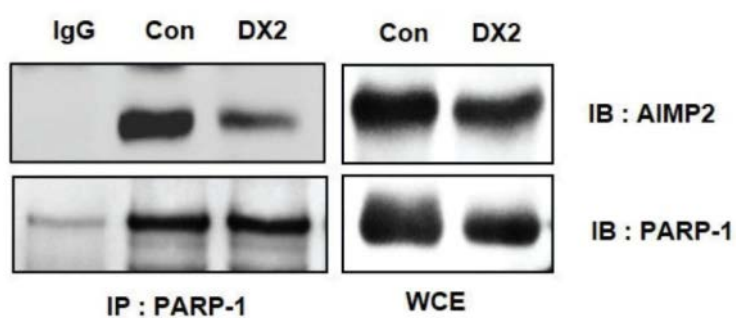


图7B

siRNA

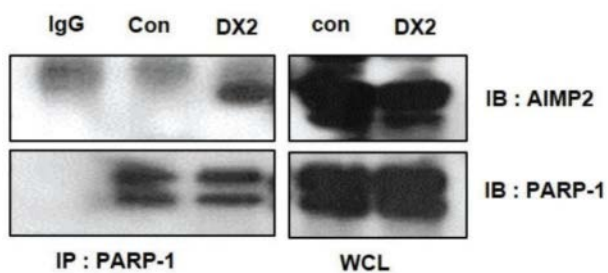


图7C

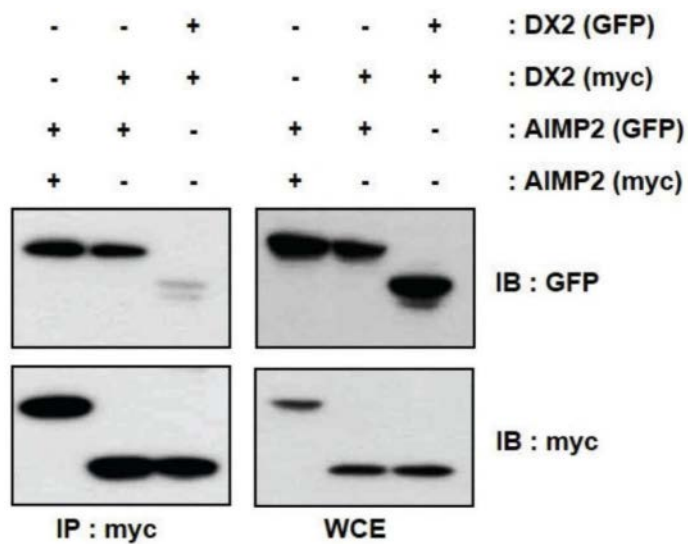


图7D

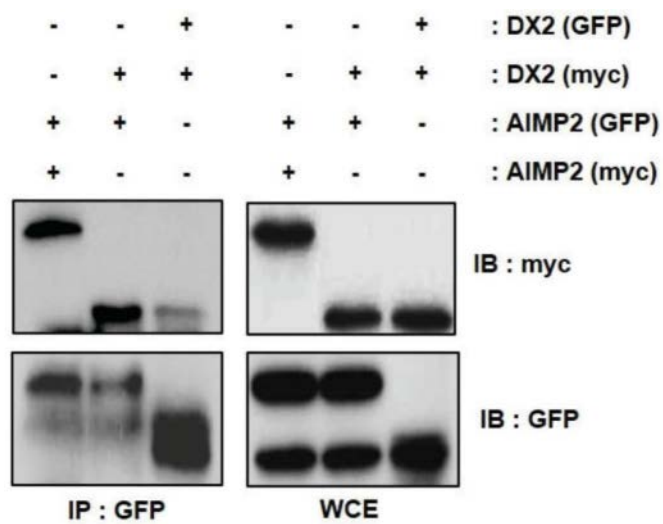


图7E

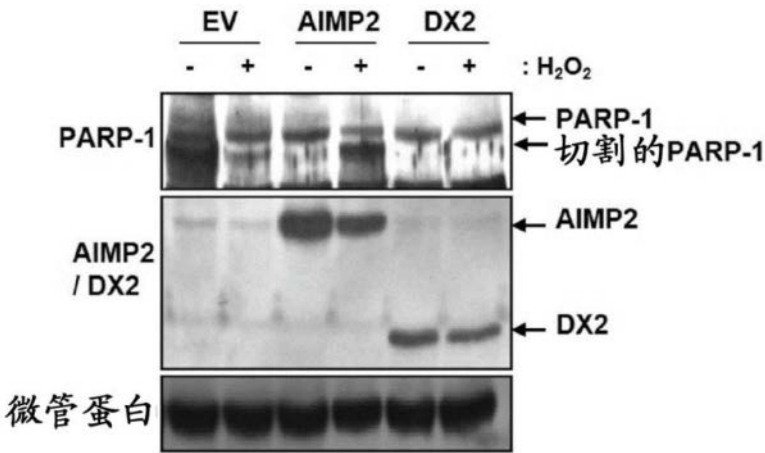


图7F

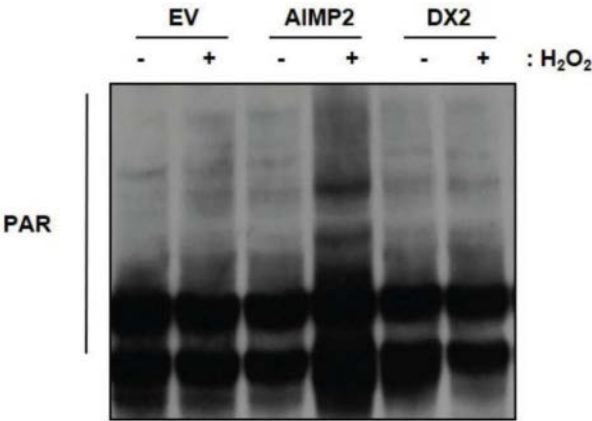


图7G

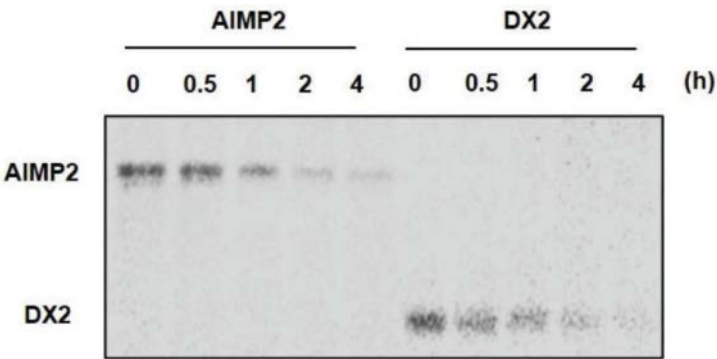


图7H

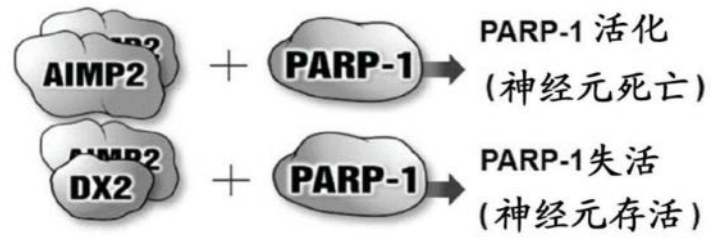


图7I

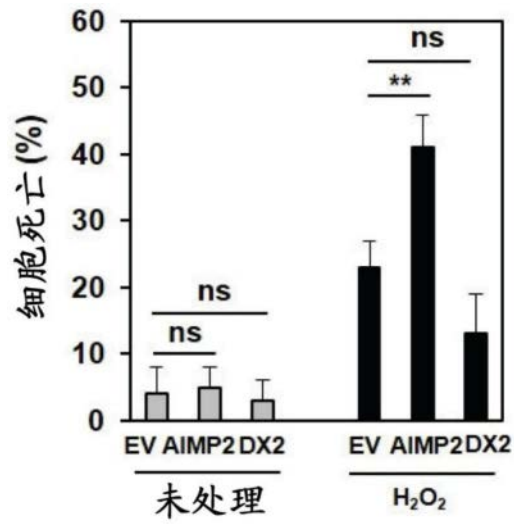


图8A

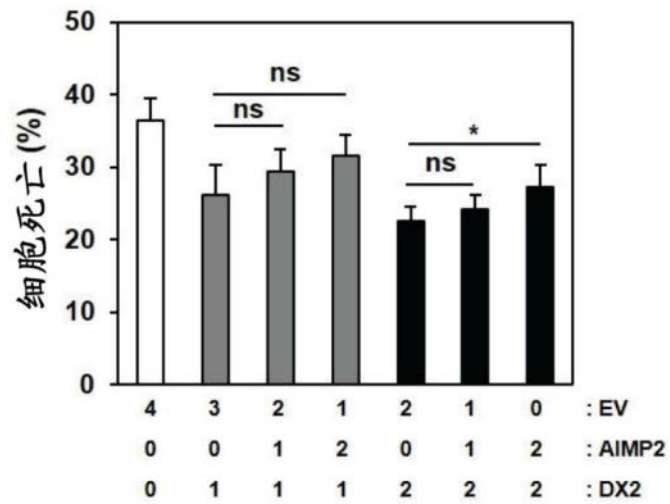


图8B

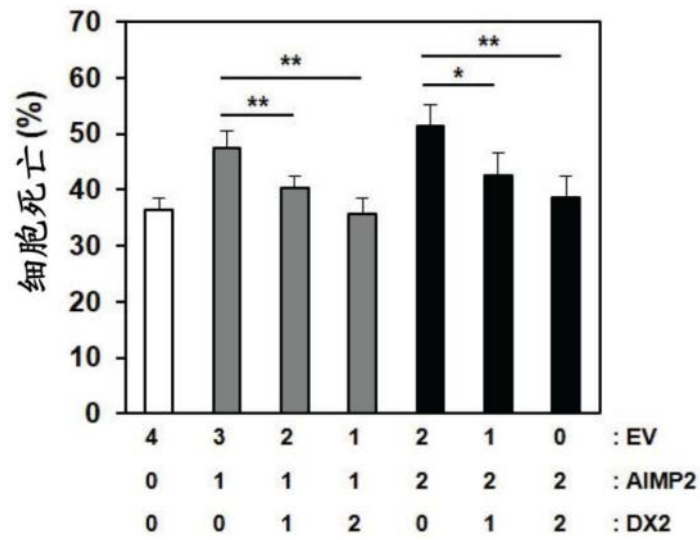


图8C

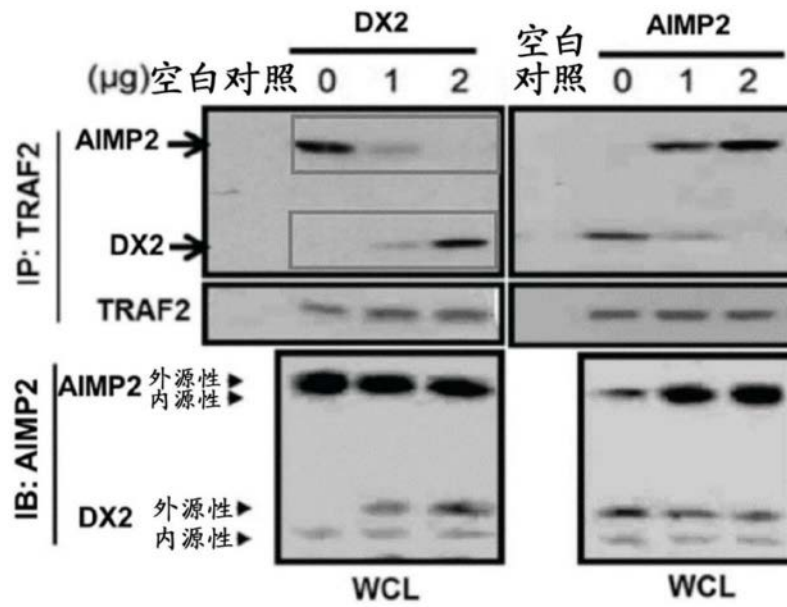


图9A

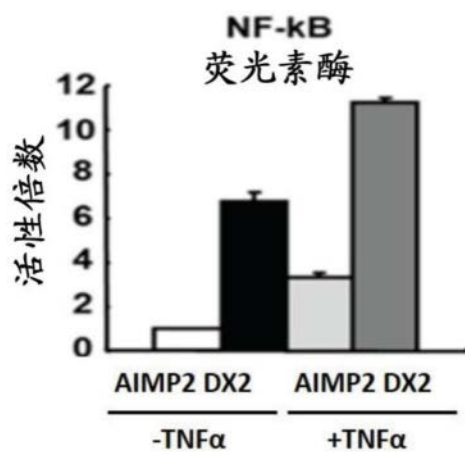


图9B

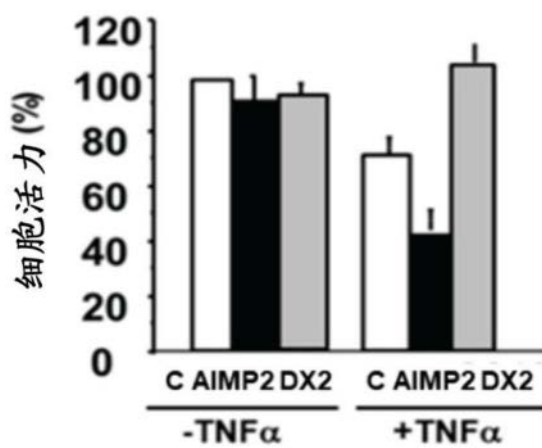


图9C

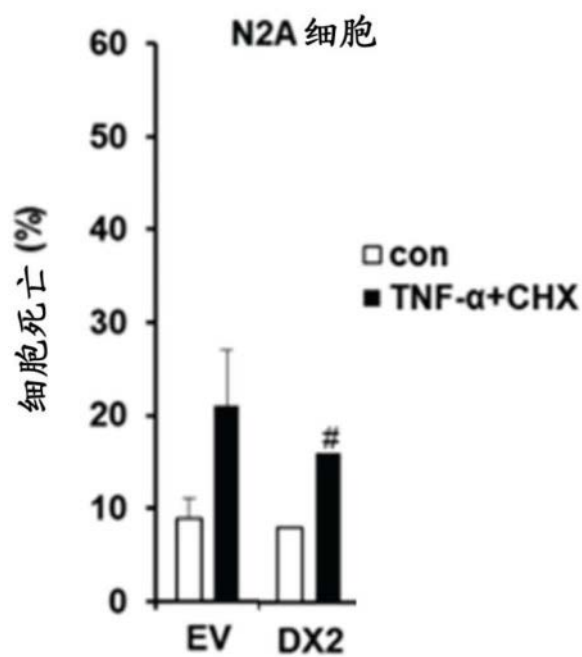


图10A

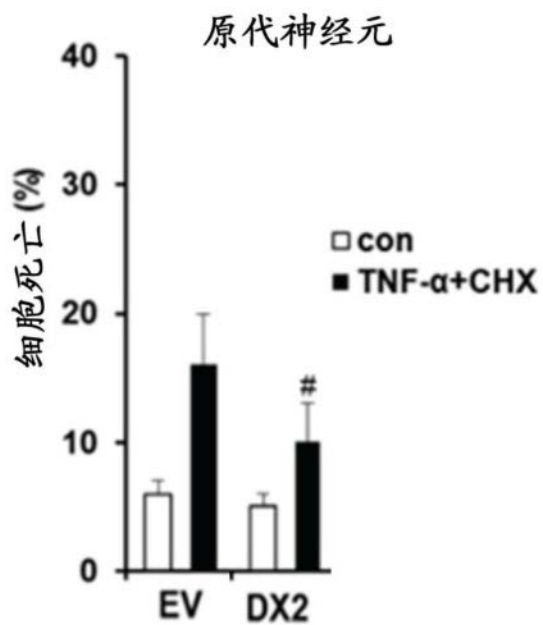


图10B

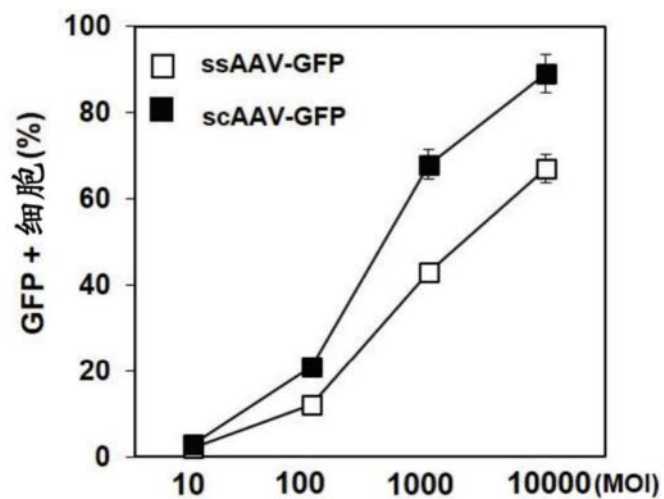
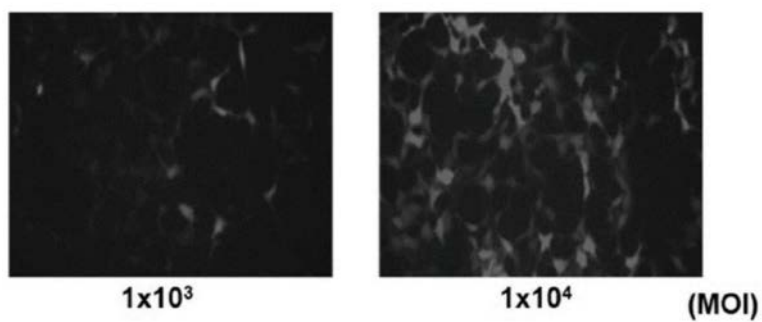


图11A

单链 AAV-GFP



自身互补链 AAV-GFP

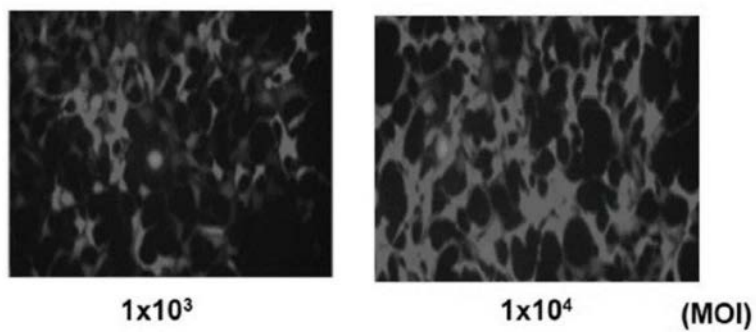


图11B

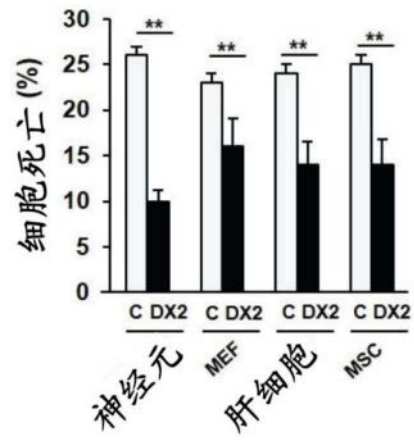


图12A

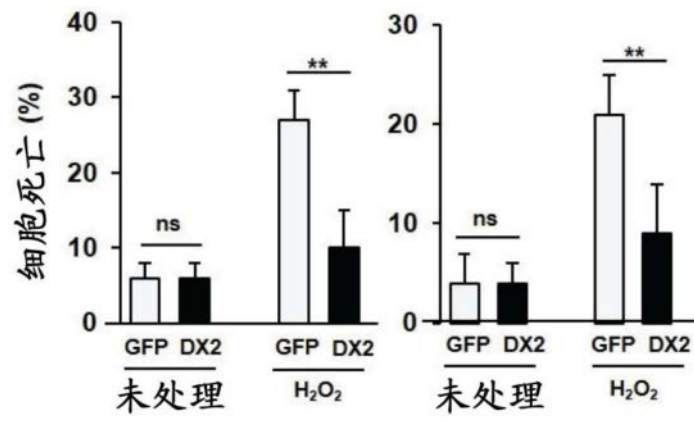


图12B

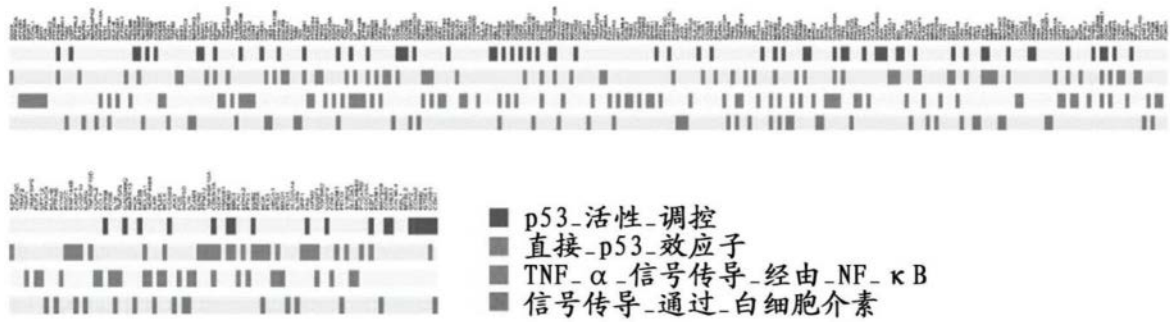


图12C

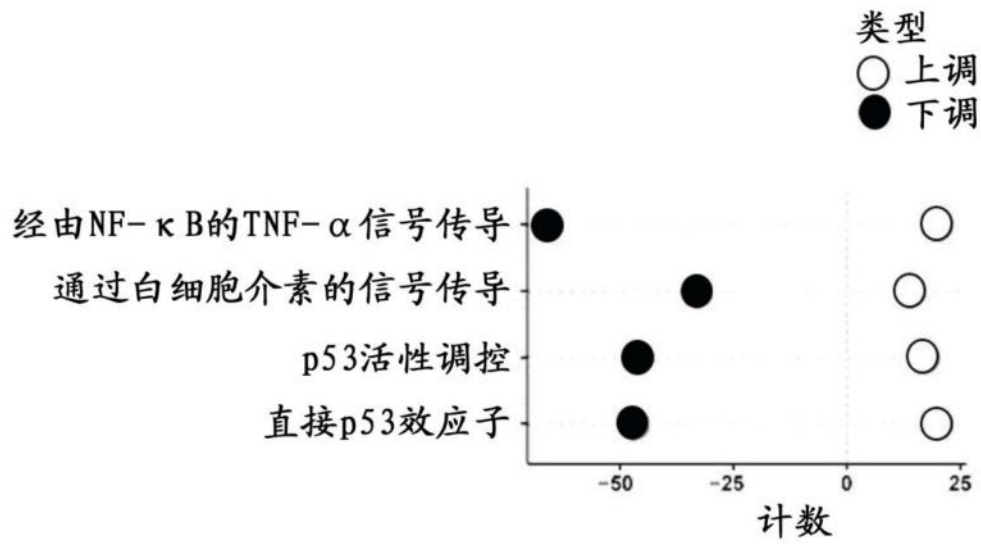


图12D

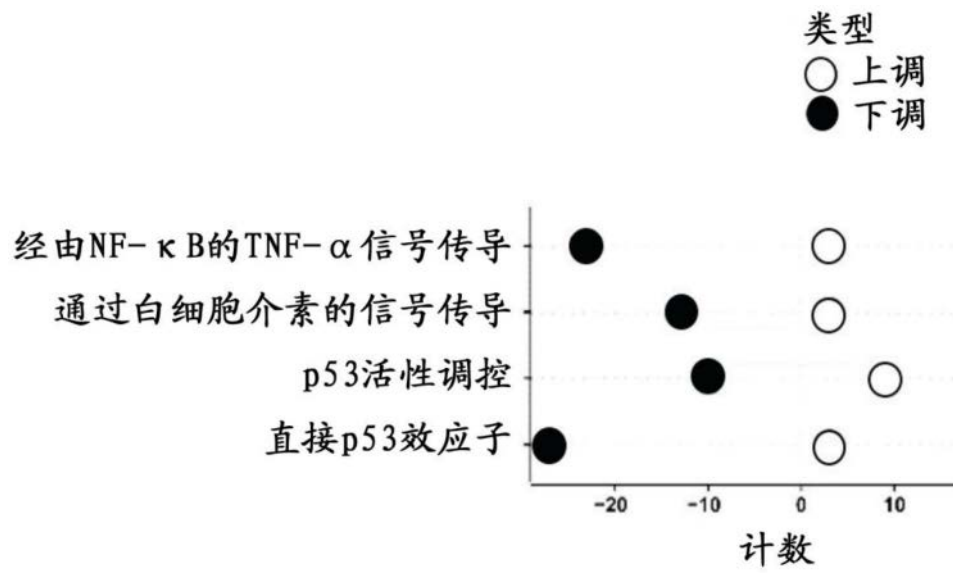


图12E

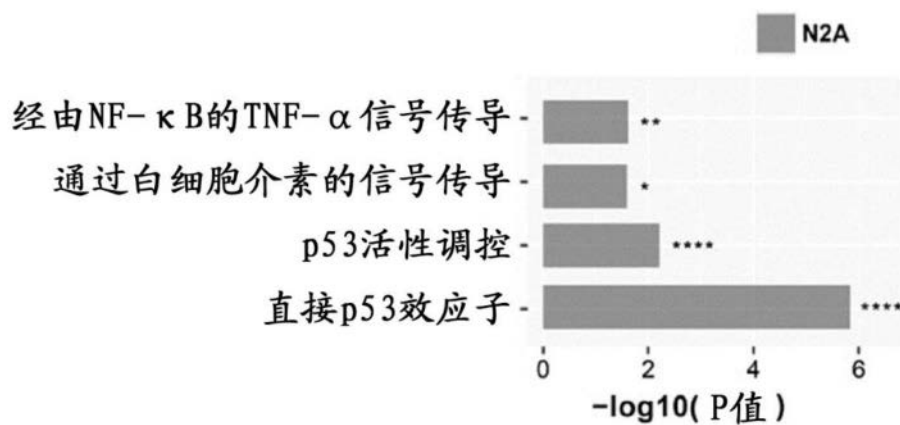


图12F

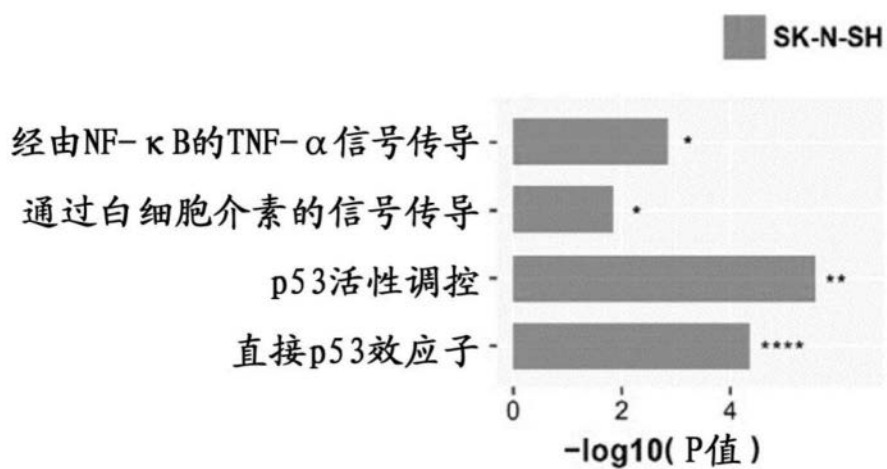


图12G

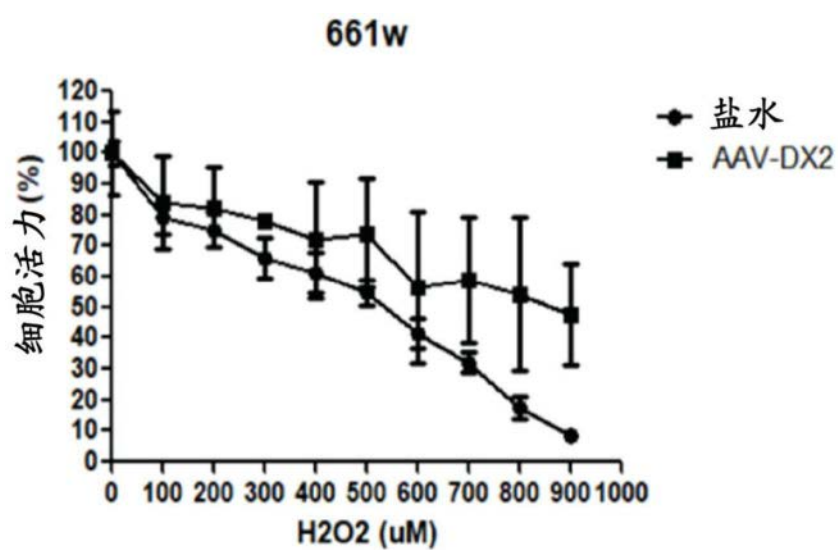


图13

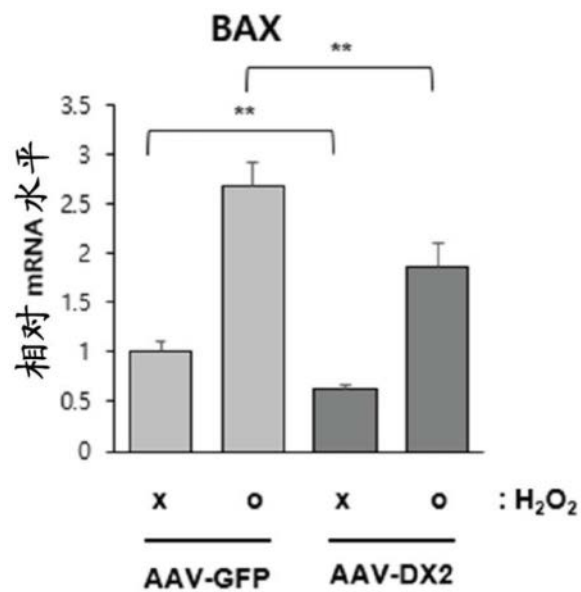


图14

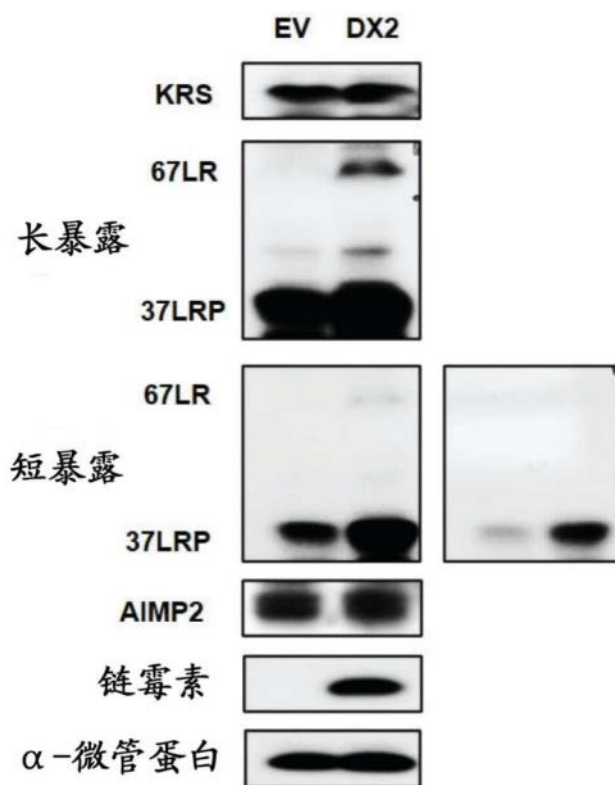


图15A

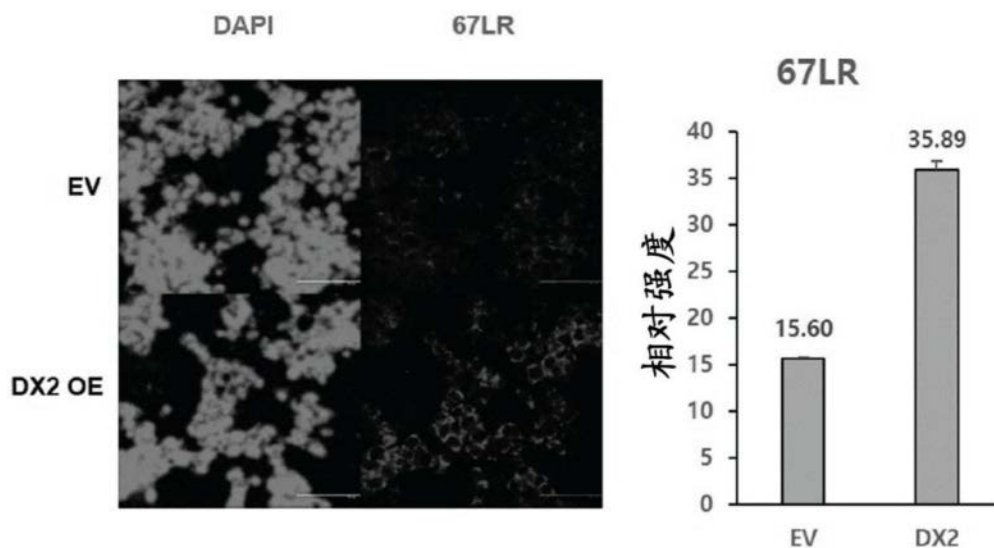


图15B

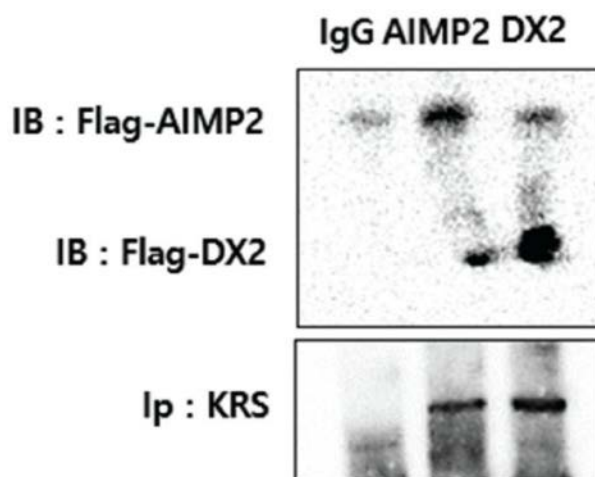


图16

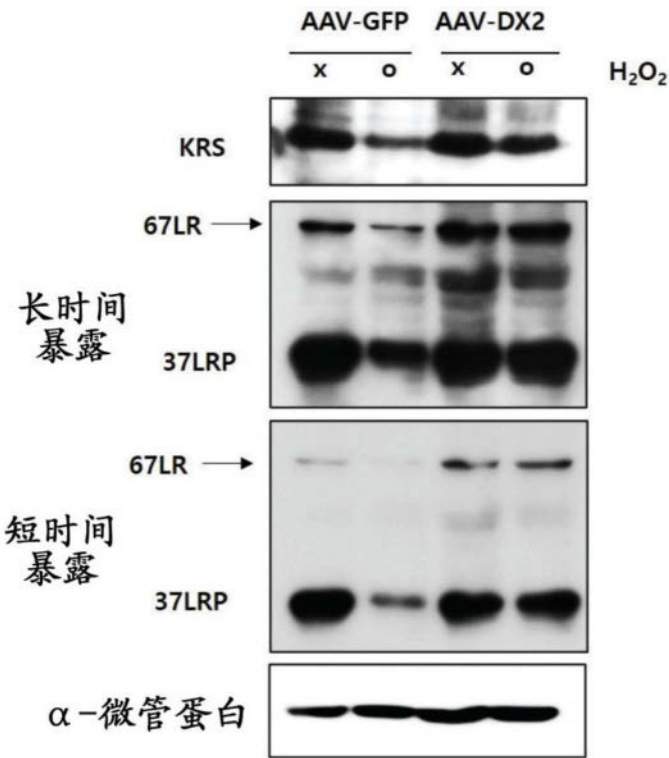


图17A

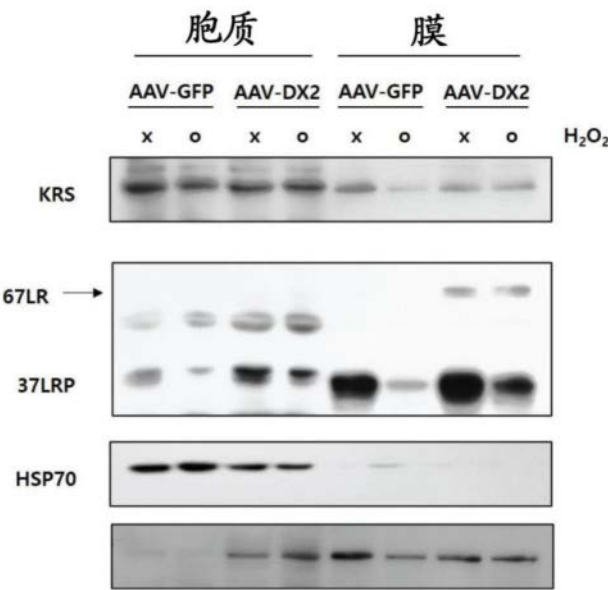


图17B

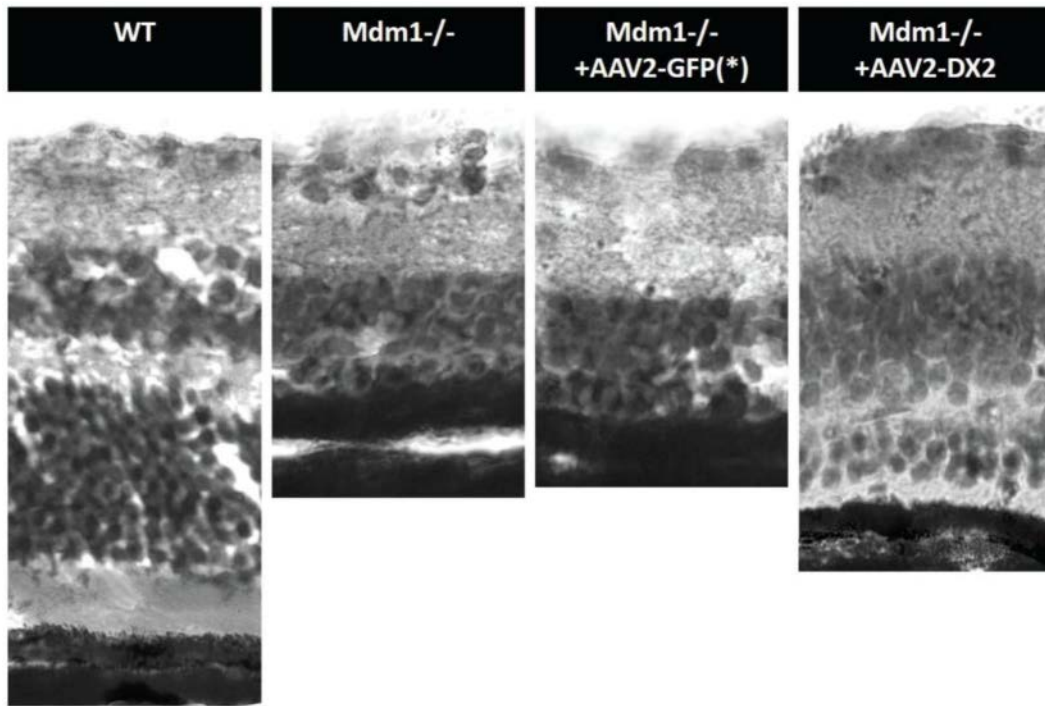


图18A

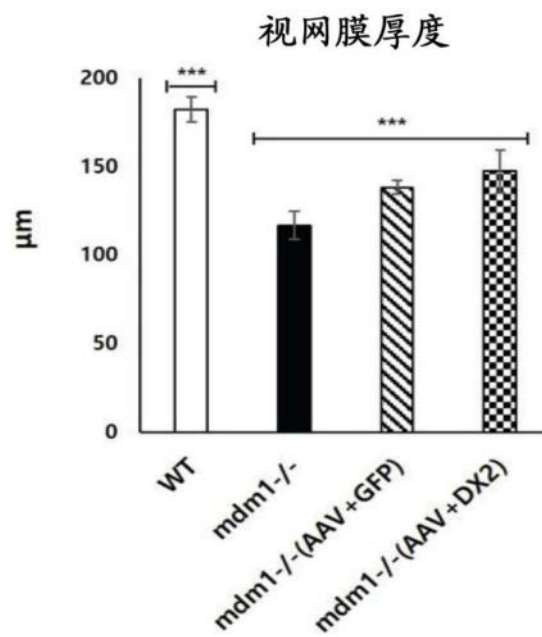


图18B

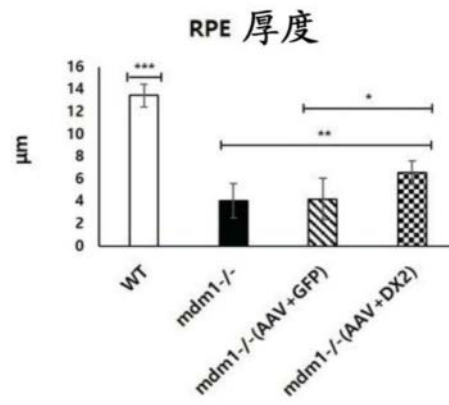


图18C

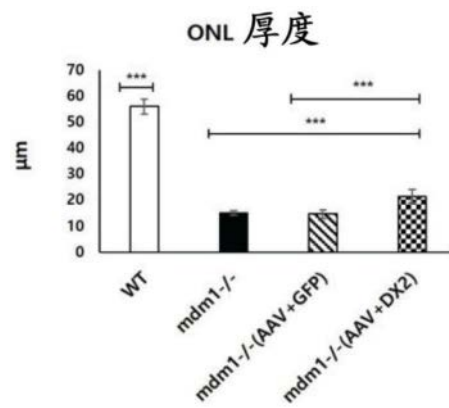


图18D

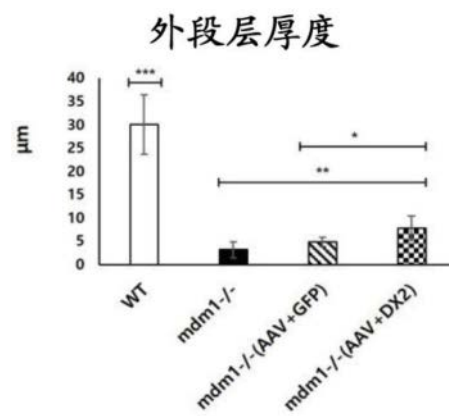


图18E

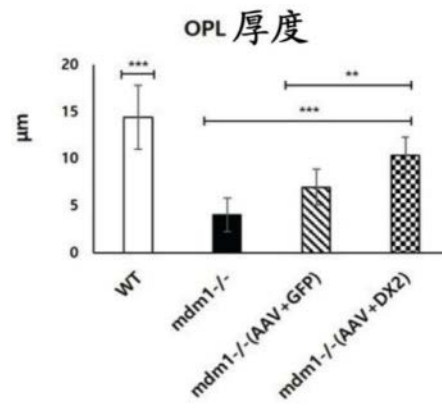


图18F

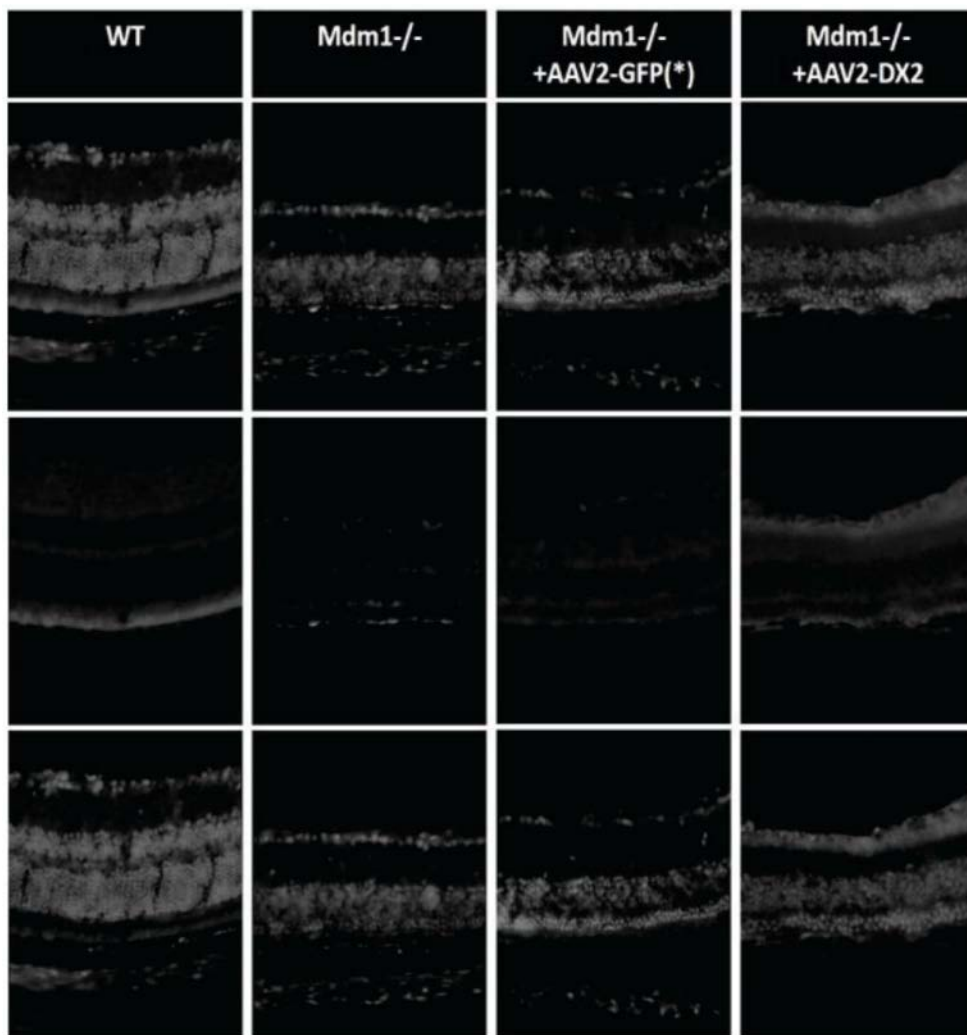


图18G

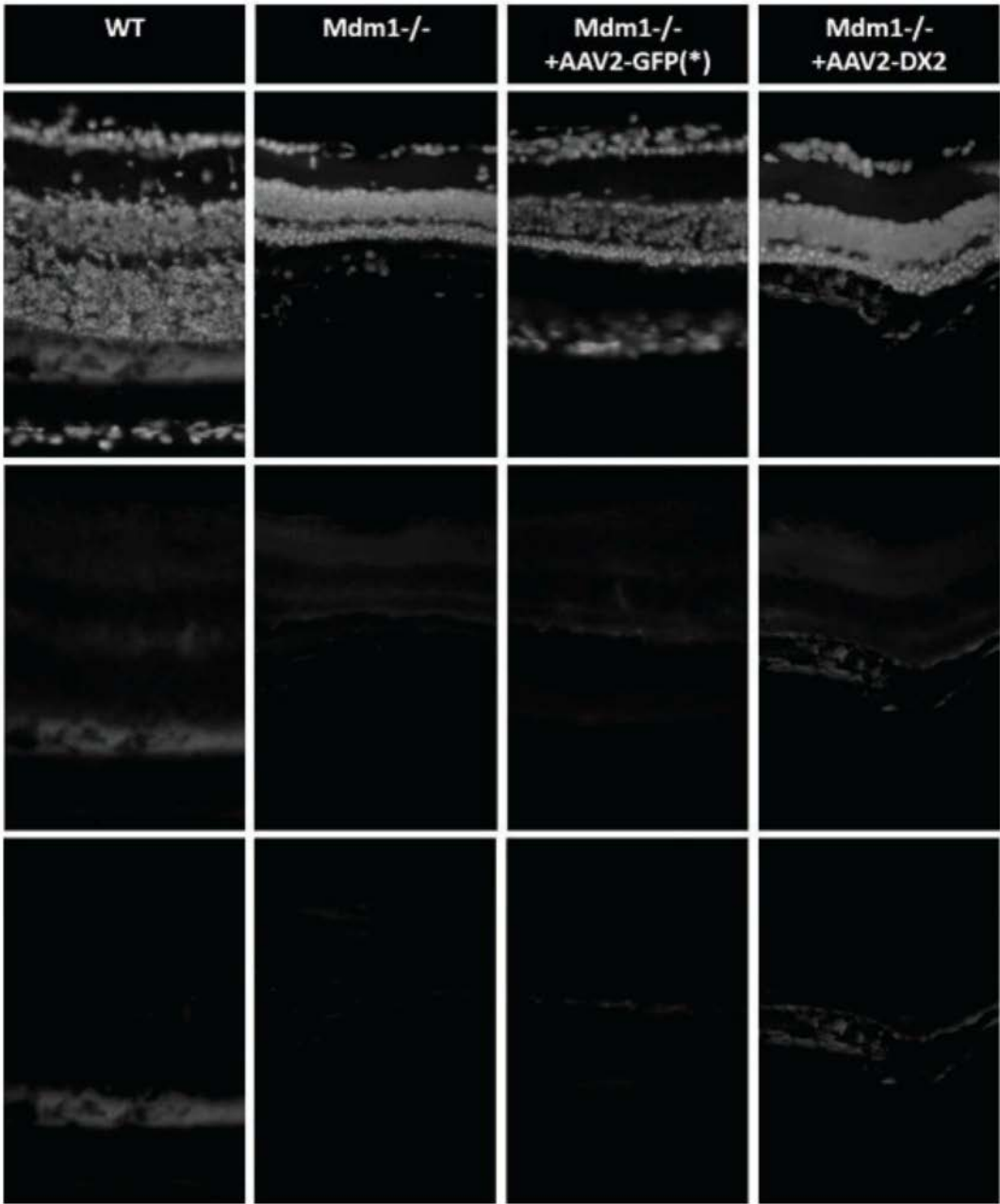


图18H

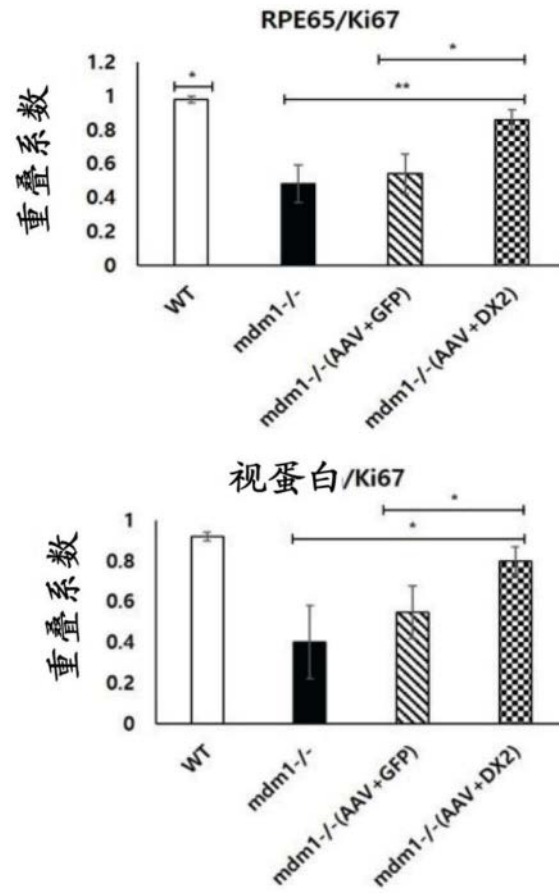


图18I

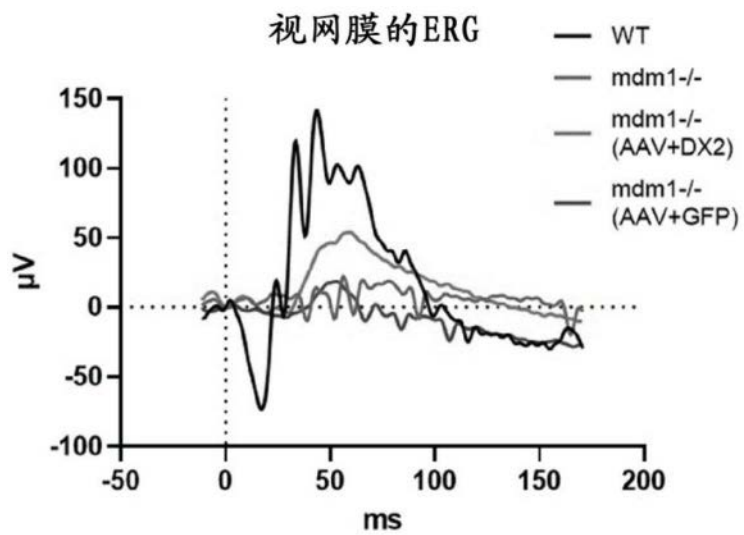


图18J

视网膜的ERG

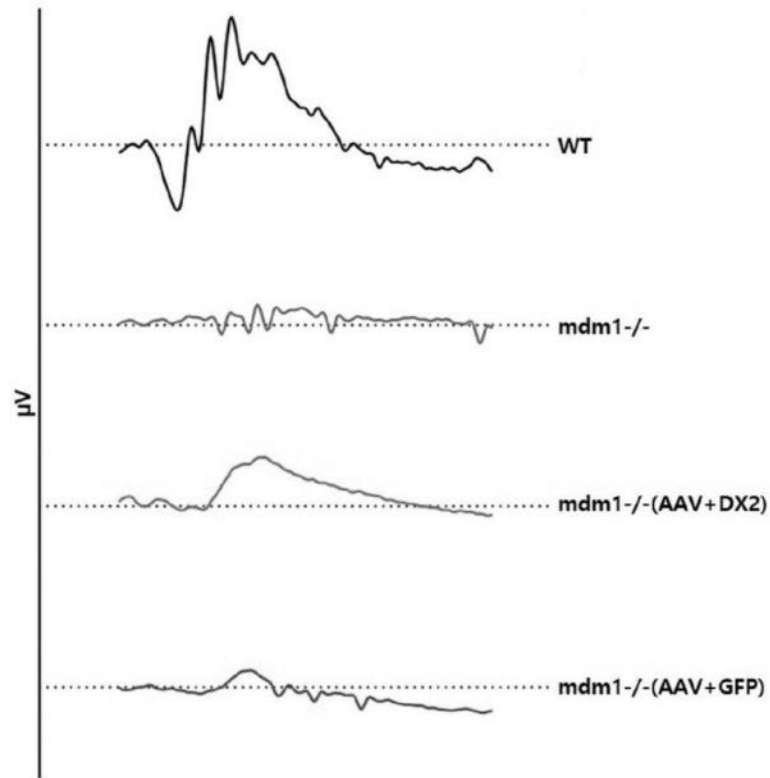


图18K

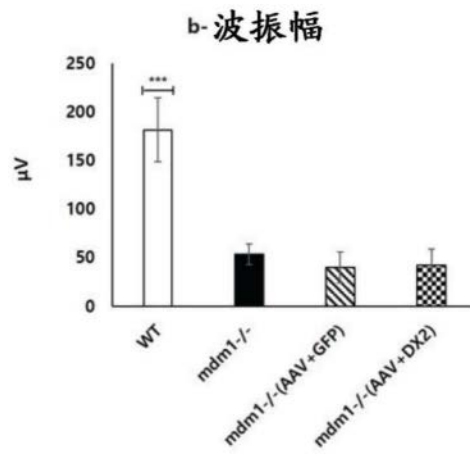


图18L

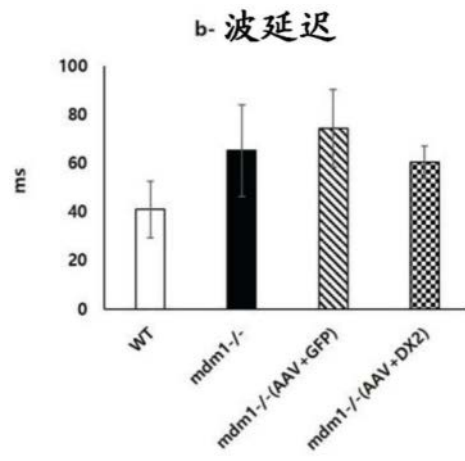


图18M

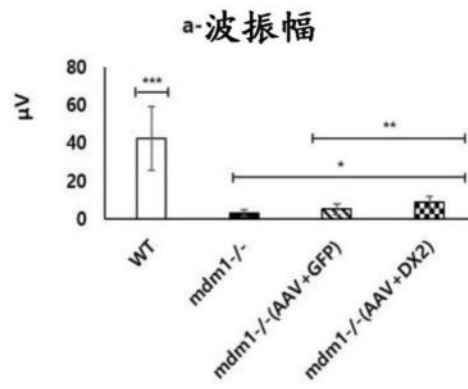


图18N

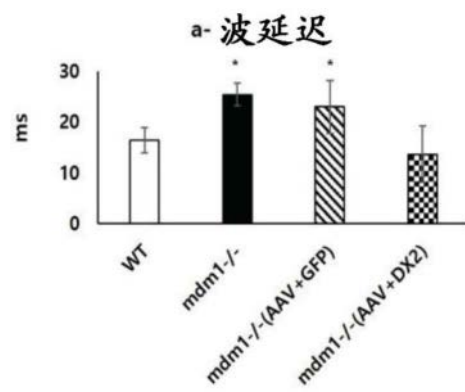


图18O

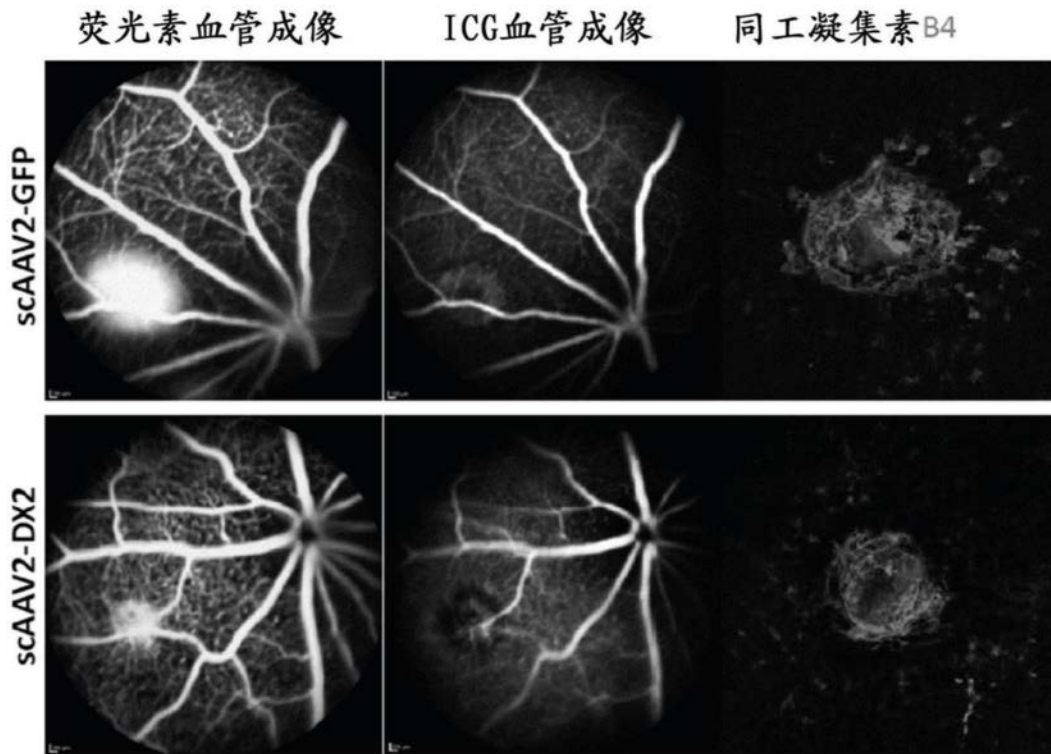


图19A

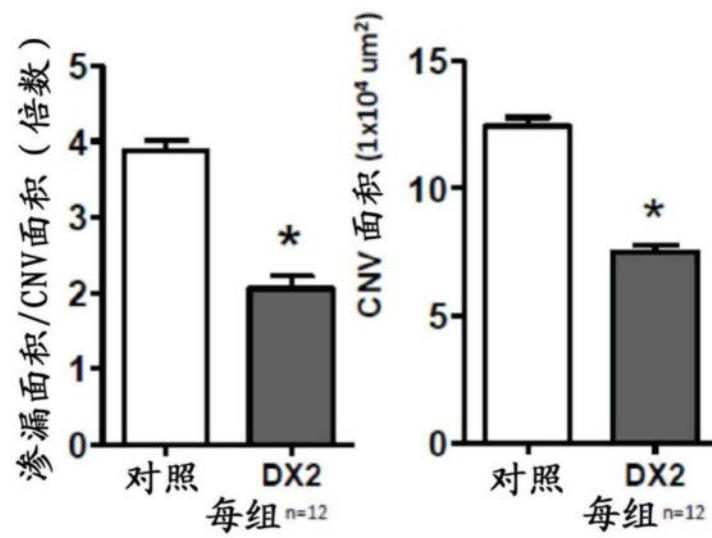


图19B

图19C

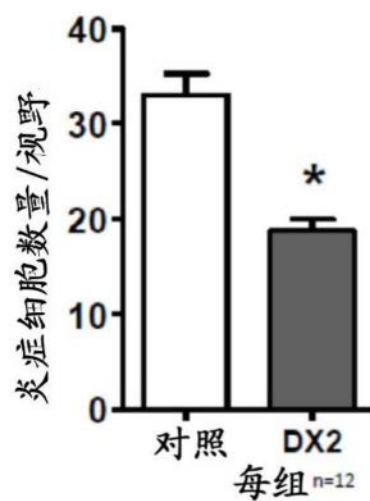


图19D

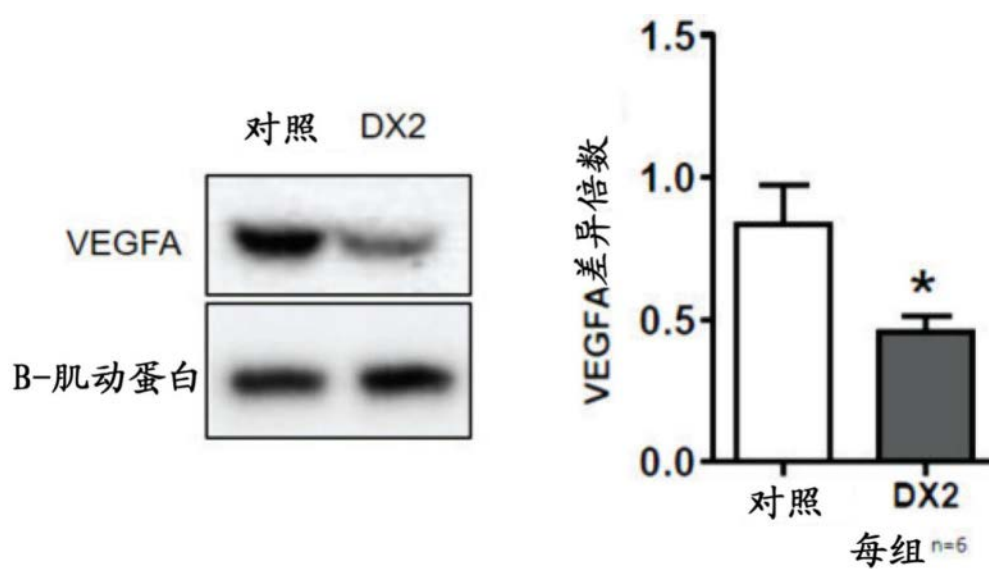
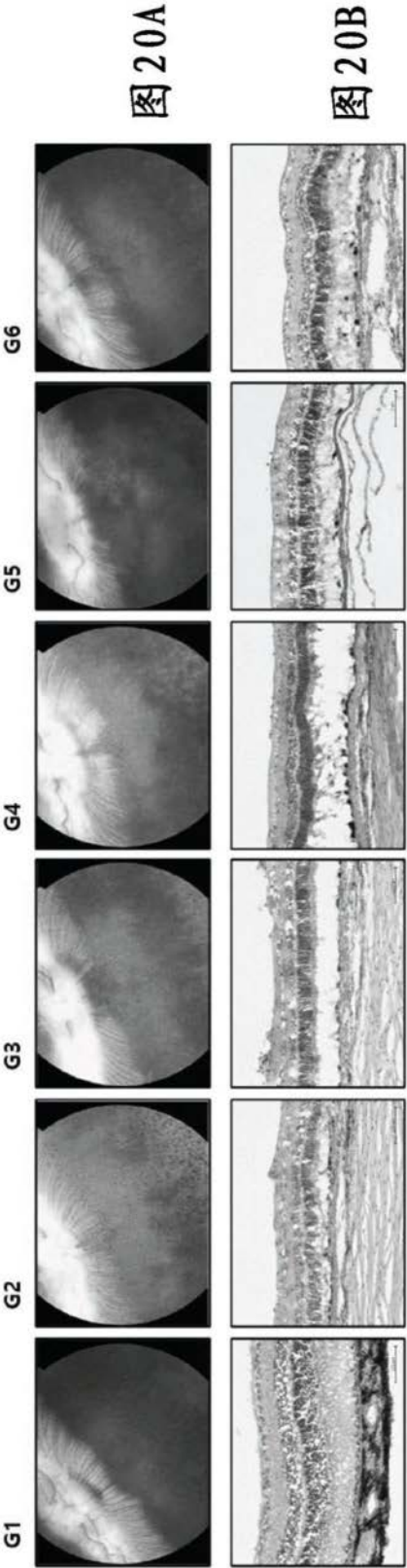


图19E



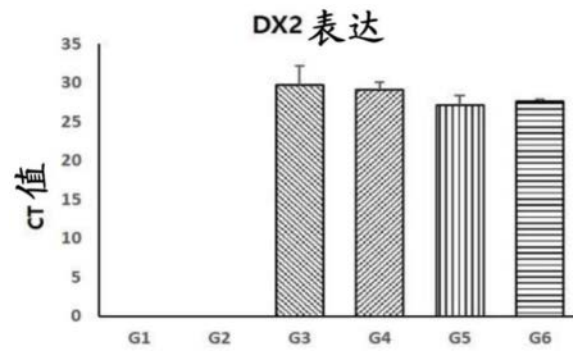


图20C

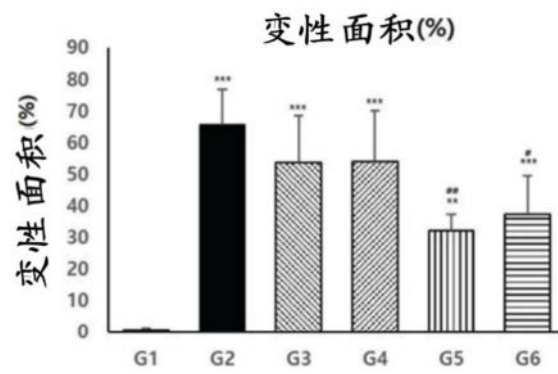


图20D

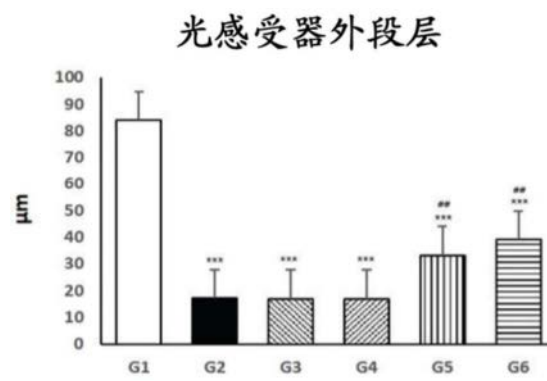


图20E

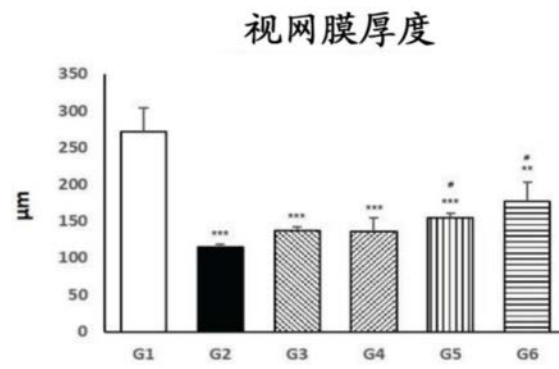
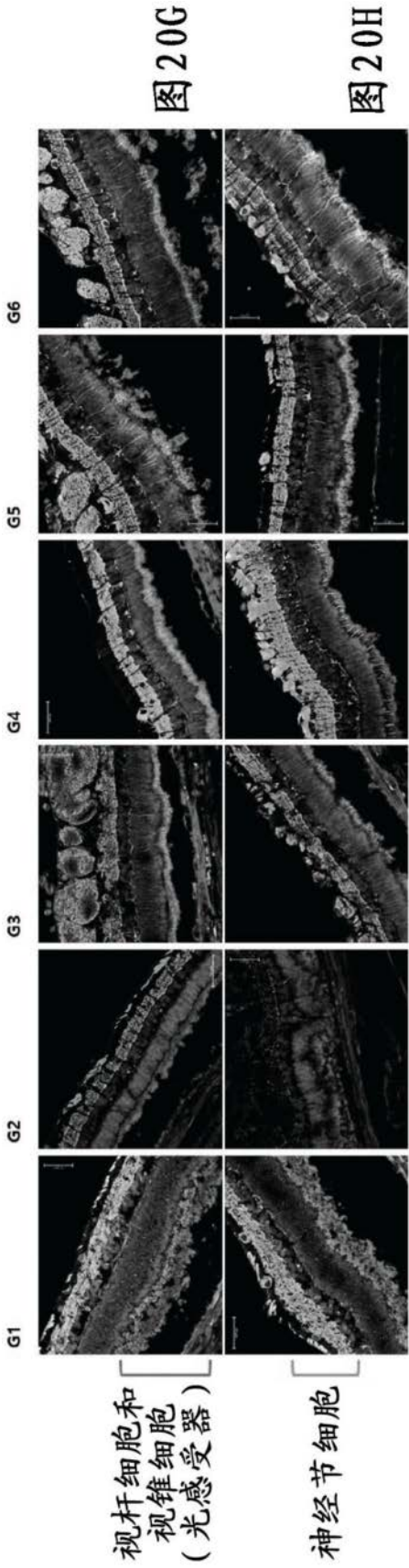


图20F



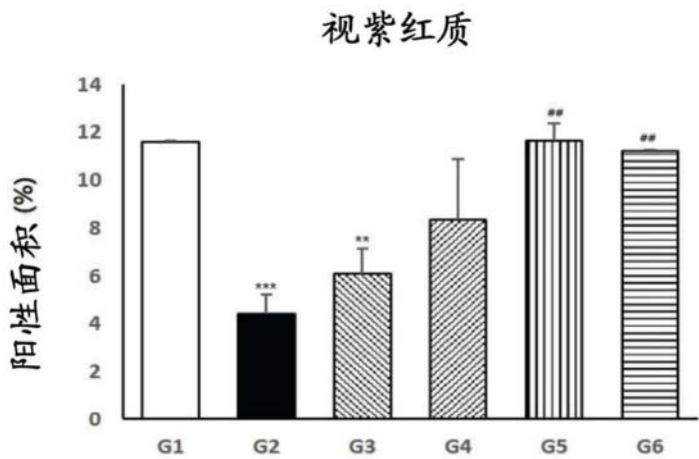


图20I

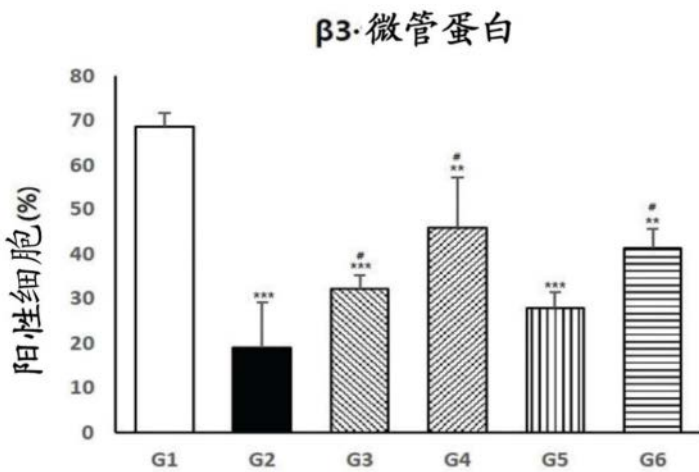


图20J

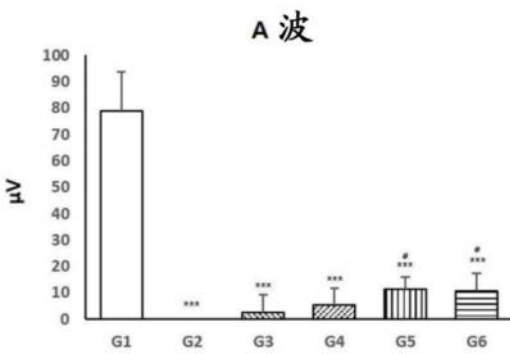


图20K

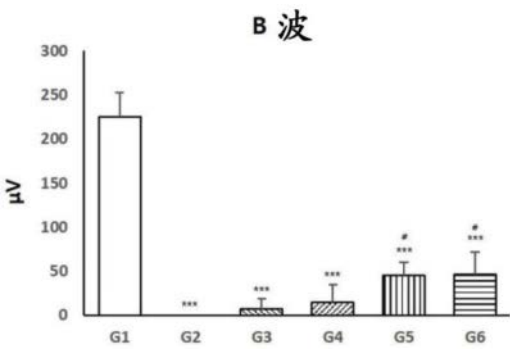


图20L

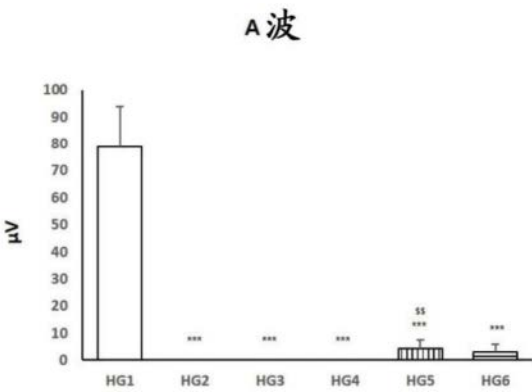


图21A

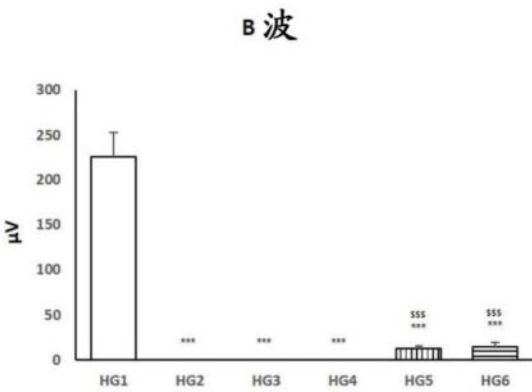


图21B

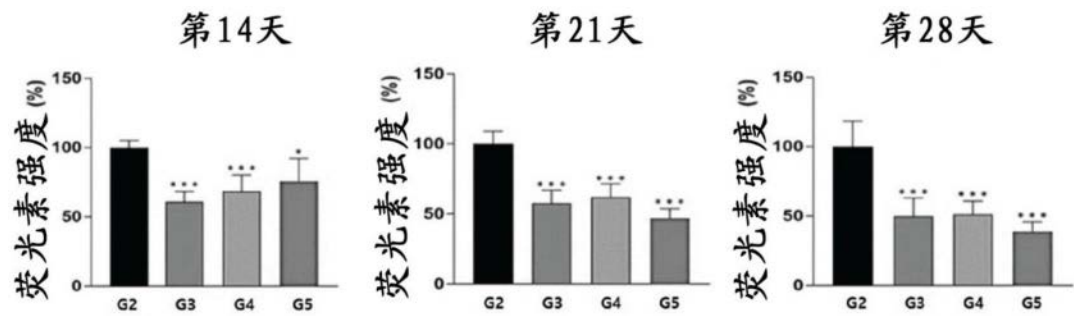


图22A

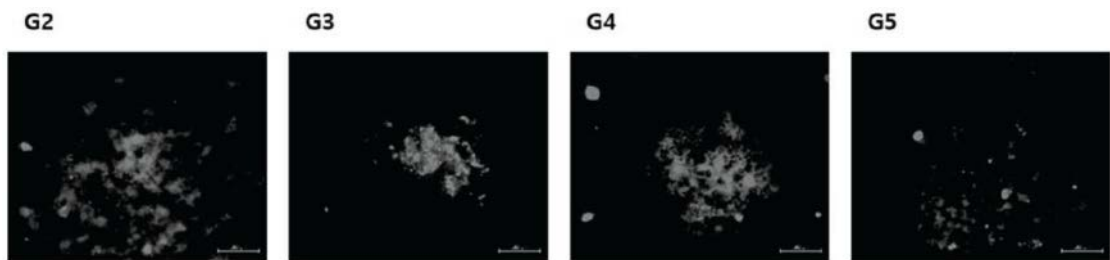


图22B

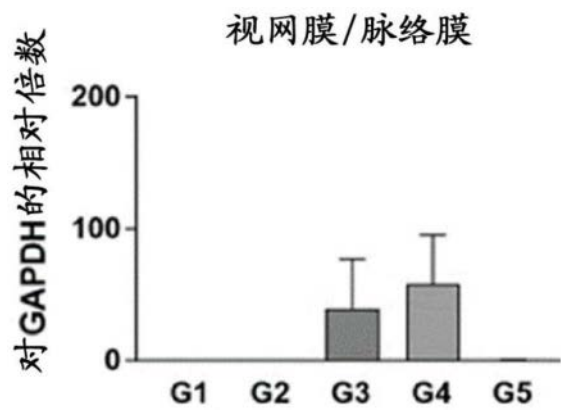


图23A

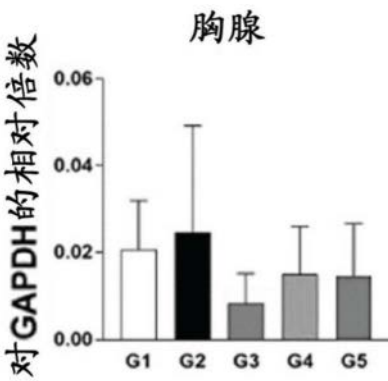


图23B

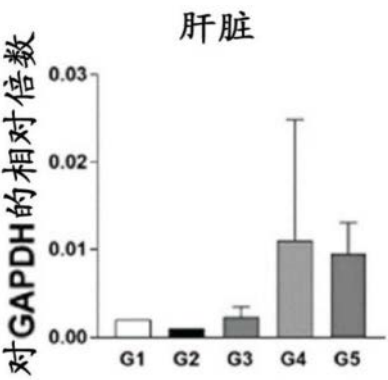


图23C

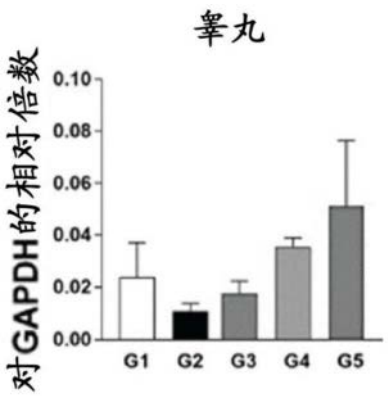


图23D

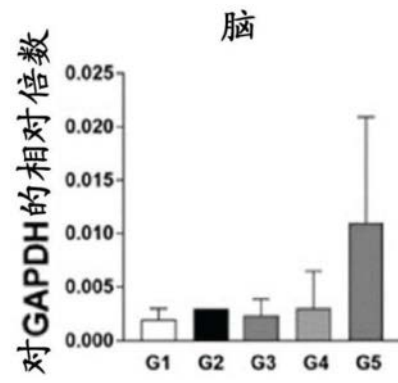


图23E

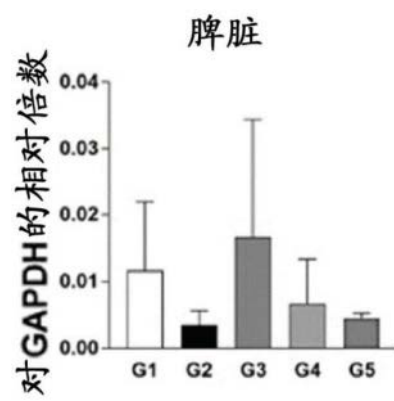


图23F

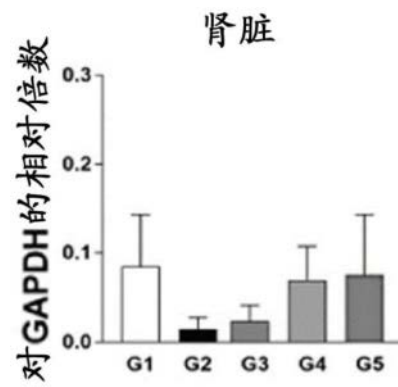


图23G

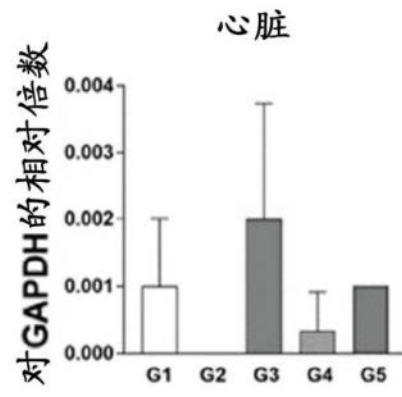


图23H

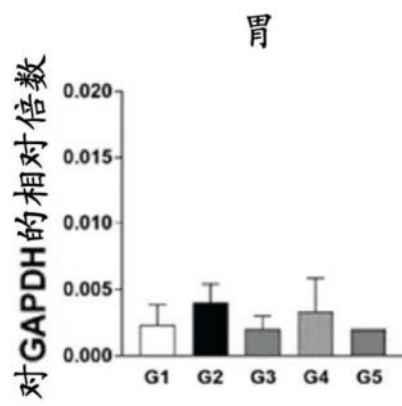


图23I

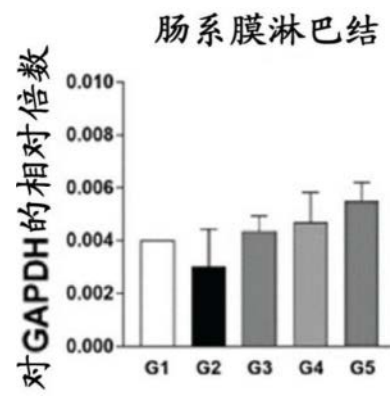


图23J

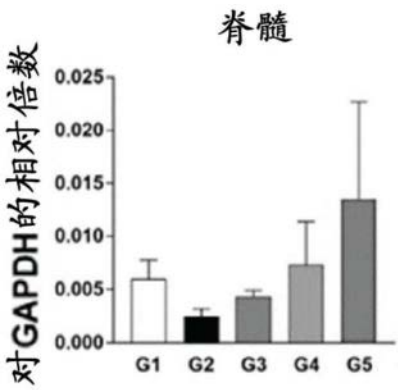


图23K

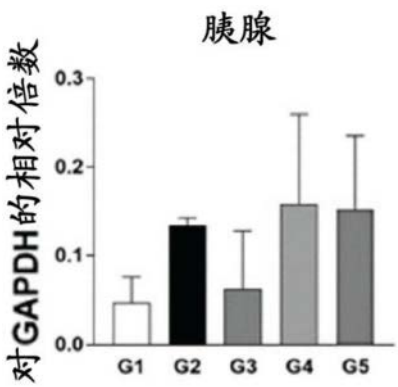


图23L

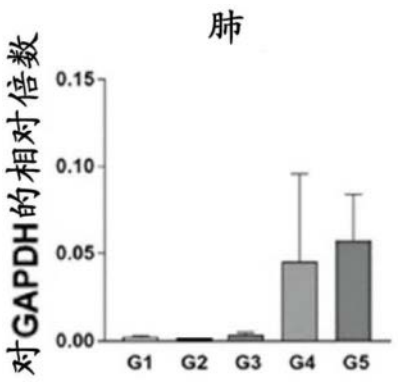


图23M