



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0110503
(43) 공개일자 2023년07월24일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 38/1709 (2020.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-7014891</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2021년09월30일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2023년05월01일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IB2021/059018</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2022/070142
국제공개일자 2022년04월07일</p> <p>(30) 우선권주장
63/085,922 2020년09월30일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
주식회사 제너로스
대전광역시 유성구 테크노4로 17, 제비502호(관평동, 비즈센터)</p> <p>(72) 발명자
최진우
서울특별시 동작구 사당로2가길 102, 101동 302호 백경화
강원도 강릉시 교1동 가작로 78 교동(1)주공아파트 113동 701호</p> <p>(74) 대리인
한윤호</p> |
|---|---|

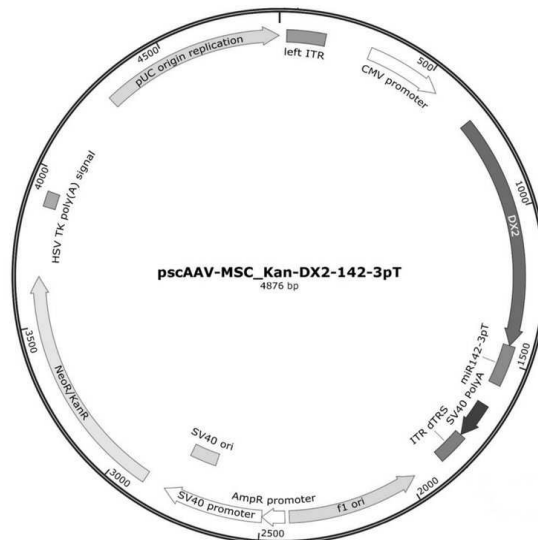
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 AIMP2-DX2 및 선택적으로 miR-142에 대한 표적 서열 및 이의 조성물을 이용한 노인성 황반 질환의 치료방법

(57) 요약

본 발명은 AIMP2-DX2 및 임의로 miR-142에 대한 표적 서열을 포함하는 벡터를 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 노인성 황반 질환의 치료방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 27/02 (2018.01)

C07K 14/47 (2013.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

약학적으로 유효한 양의 엑손 2-결실 AIMP2 변이체(AIMP2-DX2) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 개체에 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 개체의 노인성 황반 질환(AMD)의 치료방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 AMD는 습성 AMD인, 치료방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 AMD는 건성 AMD인, 치료방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 벡터는 miR-142 표적 서열을 추가로 포함하는, 치료방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 벡터는 AIMP2-DX2에 작동가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함하는, 치료방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 프로모터는 레트로바이러스(LTR) 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 라우스육종바이러스(RSV) 프로모터, MT 프로모터, EF-1 알파 프로모터, UB6 프로모터, 치킨 베타-액틴 프로모터, CAG 프로모터, RPE65 프로모터, 시냅신(Synapsin) 프로모터, MeCP2 프로모터, CaMKII 프로모터, Hb9 프로모터, 또는 옵신(opsin) 프로모터인, 치료방법.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 miR-142 표적 서열은 AIMP2-DX2 유전자에 대해 3'인, 치료방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 AIMP2-DX2 유전자는 서열번호 2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20과 적어도 90% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 치료방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 AIMP2-DX2 유전자는 서열번호 2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 치료방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 AIMP2-DX2 유전자는 서열번호 10 또는 11과 적어도 90% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 엑손을 갖지 않는, 치료방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 AIMP2-DX2 유전자는 서열번호 10 또는 11의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 엑손을 갖지 않는, 치료방법.

청구항 12

제4항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 miR-142 표적 서열은 AACTTA를 포함하는, 치료방법.

청구항 13

상기 제4항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 miR-142 표적 서열은 AACTTA 및 서열번호 5의 1 내지 17개의 추가적인 연속 뉴클레오티드를 포함하는, 치료방법.

청구항 14

제4항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 miR-142 표적 서열은 서열번호 5(TCCATAAAGTAGGAAACTACA)의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 50% 상동성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 치료방법.

청구항 15

제4항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 miR-142 표적 서열은 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 치료방법.

청구항 16

제4항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 miR-142 표적 서열은 ACTTTA를 포함하는, 치료방법.

청구항 17

제4항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 miR-142 표적 서열은 ACTTTA 및 서열번호 7의 1 내지 15개의 추가적인 연속 뉴클레오티드를 포함하는, 치료방법.

청구항 18

제4항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 miR-142 표적 서열은 서열번호 7(AGTAGTGCTTTCTACTTTATG)의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 50% 상동성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 치료방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 miR-142 표적 서열은 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 치료방법.

청구항 20

제4항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 miR-142 표적 서열은 2 내지 10회 반복되는 것인, 치료방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 벡터는 바이러스 벡터인, 치료방법.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 바이러스 벡터는 아데노바이러스(adenovirus), 아데노연관바이러스(aden-associated virus), 렌티바이러스(lentivirus), 레트로바이러스(retrovirus), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 쥐 백혈병 바이러스(MLV), 조류 육종/백혈병(ASLV), 비장 괴사 바이러스(SNV), 라우스육종바이러스(RSV), 마우스유방종양바이러스(MMTV), 단순 헤르페스바이러스(Herpes simplex virus) 또는 백신시아 바이러스(vaccinia virus) 벡터인, 치료방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 개체의 망막하 공간에, 유리체강내 주사에 의해, 결막하 주사에 의해, 국소적으로 투여되는, 치료방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

부가적 치료제를 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는, 치료방법.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 부가적 치료제는 라니비주맵(ranibizumab), 에플리버셉트(afibercept) 또는 베바시주맵(bevacizumab)인, 치료방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참조

[0002] 본 출원은 2020년 9월 30일자로 출원된 미국 공개특허 제63/085,922호에 기술되어 있으며, 상기 개시 내용은 그 전체가 본 문서에 참조로 포함된다.

[0003] 전자적으로 제출된 서열 목록 참조

[0004] 본 명세서와 함께 제출된 ASCII 텍스트 파일(이름:2493-0004W001_Sequence Listing_ST25.txt, 크기: 28KB, 생성 날짜: 2021년 9월 30일)로 전자적으로 제출된 서열 목록의 내용은 전체가 참조로 본 문서에 통합된다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 AIMP2-DX2 및 선택적으로 miR-142에 대한 표적 서열을 포함하는 벡터를 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 노인성 황반 질환의 치료방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 노인성 황반 질환(AMD)은 유럽, 미국 및 호주에서 시력 상실의 주요 원인이다. 80세 이상 인구의 거의 2/3가 습성 또는 삼출성 형태로 인한 AMD의 징후를 가질 것이며, 이는 드루젠(drusen) 및 CNV(황반하 맥락막 혈관신생)의 존재를 특징으로 한다. AMD는 중앙 망막 영역의 손상을 특징으로 하는 만성 진행성 질환이다. 맥락막모세혈관(choriocapillaries), 망막색소상피(RPE) 및 부르크막(Bruch's membrane, 전형적인 노화)의 변화가 AMD 병인의 기초가 된다. 그러나 병리학적 과정에서 전형적인 연령 관련 변화의 전달을 시작하는 메커니즘은 알려져 있지 않다. 광수용체의 죽음과 돌이킬 수 없는 시력 상실은 RPE와 맥락막의 병리학적 변화의 결과가 된다. 최근 연구는 세포사멸(apoptotic)뿐만 아니라 자가포식(autophagic) 및 괴사 신호 캐스케이드(necrotic signaling cascades)가 망막 세포의 세포사멸에 관여한다는 것을 입증했다(Telegina 2017).

[0008] 질병의 "건성" 및 "습성" 형태가 분류된다. 약 90%의 사례는 AMD의 "건성" 위축성 형태로 현재는 치료 방법이 없다. AMD의 "건성" 형태에서는 황반부에서 드루젠이 진단되고, 색소 재분포(pigment redistribution)가 발생하며, 색소 상피 및 맥락막모세혈관층의 결합이 나타나고, RPE 세포 위축의 배경에 대해 광수용체의 사멸이 발생한다. "습성"(삼출성) 형태는 AMD 환자의 ~10%에서 발생하며 망막 색소 상피 또는 신경 표피 아래의 부르크막 결손을 통해 새로 생성된 혈관의 내부 성장을 특징으로 한다. 새로 생성된 혈관의 투과성 증가는 유리체와 망막에 망막 부종(retinal edema), 삼출물(exudation) 및 출혈을 유발한다(결국 시력 상실의 원인이 됨). 현재, 레이저-유도 부르크막 광응고 모델은 가장 널리 수용되고 가장 자주 사용되는 실험용 마우스 CNV 모델이다. 여기에 설명된 모델은 맥락막에서 망막하 공간으로 새로운 혈관의 성장을 유도하는 부르크막의 레이저 충격 과열로 구성되고 인간 AMD의 삼출성 형태의 주요 특징을 모방하고 대규모 트랜스제닉 마우스 패널을 사용하여 CNV의 분자 메커니즘을 탐색할 수 있는 기회를 제공한다. 상기 모델은 전신 또는 국소(안구 내) 투여를 통해 신약의 효능을 테스트하는 데 적합하다는 것이 입증되었으며, 예컨대 혈관 내피성장인자수용체(VEGFR) 트랩 또는 안코테브 아세테이트(Telegina 2017)를 사용하는 AMD 환자에서 약물 효과에 대한 예측 값을 보여주었다. 망막에서 혈관내피성장인자(VEGF)를 차단함으로써 간접적인 항-혈관형성을 제공하는 3가지 주요 약물이 있다. 라니비주맵(Lucentis, Genentech Inc., South San Francisco CA, Novartis가 전 세계적으로 상용화)은 2006년 미국 식품의약국(FDA)의 승인을 받아 신생혈관 AMD 치료용으로 승인되었다(Hernandez-Zimbron 2018). 재조합 인간화 면역글로불린(Ig) G1 카파 이소형 단일클론 항원-결합 단편(Fab)으로, VEGF-A를 높은 친화력으로 표적화하고 결합한다. 에플리버셉트(Regeneron, Tarrytown, NY; Bayer AG에 의해 전 세계적으로 상업화됨)는 2011년에 FDA의 승인을 받았다. 인간 VEGF 수용체 1 및 2의 두 가지 주요 결합 도메인과 인간 IgG1의 단편 결정화(Fc) 영역을 결합한 융합 단백질이다. 마지막으로, 베바시주맵(Genentech Inc., South San Francisco, CA; Roche에 의해 전 세계적으로 상업화됨)은 모든 VEGF 이소형에 결합하고 차단하는 완전한 길이의 인간화 항체이다. 산화 스트레스는 아포토시스를 유발할 수 있으며, 이는 대식세포를 활성화 및 모집하고 염증을 유발할 수 있다. 아포토시스(Apoptosis)는 맥락막 염증 및 결과적으로 CNV 모델에서 혈관신생의 유발인자 중 하나일 수 있다(Du 2013). AIMP2-DX2는 AIMP2의 대안적인 길항 스플라이싱 변이체로 다인자 세포사멸 유전자이다. AIMP2-DX2는 AIMP2의 기능을 방해하여 세포사멸을 억제하는 것으로 알려져 있다. AIMP2의 경쟁적 억제체로서 작용하는 AIMP2-DX2는 TRAF2의 유비퀴틴화/분해의 억제를 통해 TNF-알파 매개 세포사멸을 억제한다. 게다가, AIMP2-DX2가 기존의 폐암 유발인자로 보고된 바 있으며 기존 연구에서는 암세포에 광범위하게 발현하는 AIMP2-DX2가 AIMP2의 암 억제 기능을 방해해 암을 유도하는 것으로 확인됐다. 또한, 정상 세포에서 AIMP2-DX2의 발현이 세포의 종양화를 진행시키는 반면, AIMP2-DX2의 발현 억제는 암의 성장을 억제하여 치료 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 게다가, AIMP2-DX2가 신경질환 치료에 유용할 수 있음이 확인되었다(KR10-2015-0140723(2017) 및 US2019/0298858(2019.10.23 공개)).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 AIMP2-DX2 및 선택적으로 miR-142에 대한 표적 서열을 포함하는 벡터를 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 노인성 황반 질환의 치료방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 관점에 따르면, 약학적으로 유효한 양의 엑손 2-결실 AIMP2 변이체(AIMP2-DX2) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 개체의 노인성 황반 질환(AMD)를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 AMD는 습성 AMD이다. 일부 실시양태에서, 상기 AMD는 건성 AMD이다.

- [0011] 상기 재조합 벡터는 miR-142 표적 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0012] 상기 벡터는 AIMP2-DX2에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 프로모터는 레트로바이러스(LTR) 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 라우스육종바이러스(RSV) 프로모터, MT 프로모터, EF-1 알파 프로모터, UB6 프로모터, 치킨 베타-액틴 프로모터, CAG 프로모터, RPE65 프로모터 또는 오피신 프로모터일 수 있다. 상기 miR-142 표적 서열은 AIMP2-DX2 유전자에 대해 3'일 수 있다.
- [0013] 일부 실시양태에서, 상기 AIMP2-DX2 유전자는 서열번호 2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20과 적어도 90% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0014] 일부 실시양태에서, 상기 AIMP2-DX2 유전자는 서열번호 2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 상기 AIMP2-DX2 유전자는 서열번호 10 또는 11과 적어도 90% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 엑손을 갖지 않을 수 있다.
- [0016] 일부 실시양태에서, 상기 AIMP2-DX2 유전자는 서열번호 10 또는 11의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 엑손을 갖지 않을 수 있다.
- [0017] 상기 miR-142 표적 서열은 AACTA를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 miR-142 표적 서열은 AACTA 및 서열번호 5의 1 내지 17개의 추가적인 연속 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 miR-142 표적 서열은 서열번호 5(TCCATAAAGTAGGAAACTACA)의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 50% 상동성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 miR-142 표적 서열은 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0018] 일부 실시양태에서, 상기 miR-142 표적 서열은 ACTTTA를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 miR-142 표적 서열은 ACTTTA 및 서열번호 7의 1 내지 15개의 추가적인 연속 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 miR-142 표적 서열은 서열번호 7(AGTAGTGCTTCTACTTTATG)의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 50% 상동성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 miR-142 표적 서열은 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 상기 miR-142 표적 서열은 본 문서에 기재된 벡터에서 2 내지 10 회 반복될 수 있다.
- [0019] 상기 벡터는 바이러스 벡터일 수 있다. 상기 바이러스 벡터는 아데노바이러스(adenovirus), 아데노연관바이러스(Adeno-associated virus), 렌티바이러스(lentivirus), 레트로바이러스(retrovirus), 인간면역결핍바이러스(HIV), 쥐백혈병바이러스(MLV), 조류육종/백혈병(ASLV), 비장괴사바이러스(SNV), 라우스육종바이러스(RSV), 마우스유방종양바이러스(MMTV), 단순헤르페스바이러스(Herpes simplex virus) 또는 백신시아바이러스(vaccinia virus) 벡터일 수 있다.
- [0020] 일부 실시양태에서, 상기 재조합 벡터는 국소적으로 유리체강내 주사에 의해, 결막하 주사에 의해, 또는 개체의 망막하 공간에 투여된다.
- [0021] 본 문서에 개시된 방법은 부가적 치료제를 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 상기 부가적 치료제는 라니비주맙(ranibizumab), 에플리버셉트(aflibercept) 또는 베바시주맙(bevacizumab)이다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 예시적인 재조합 벡터를 나타낸다.
- 도 2는 *in vitro* 환경에서 재조합 벡터의 신경세포-특이적 발현을 나타낸다.
- 도 3은 miR142-3pT(밑줄)의 4개 반복을 갖는 miR142-3pT(표적) 서열을 나타낸다(서열번호 6).
- 도 4a는 1x, 2x 및 3x 반복 및 돌연변이를 갖는 miR142-3pT의 개요도를 나타낸다.
- 도 4b는 miR-142-3pT의 1x, 2x 및 3x 반복을 갖는 DX2 발현에 대한 miR142-3p 억제를 나타낸다.
- 도 5는 코어 결합 서열이 DX2 억제에서 중요함을 나타낸다. DX2의 현저한 억제를 나타내는 Tseq x3 반복을 갖는 벡터(도 4b) 및 DX2 컨스트럭트를 대조군으로 사용하였다. 100 pmol의 miR-142-3p 처리는 Tseq x3 벡터를 현저

히 억제했지만 DX2 및 돌연변이 서열은 억제하지 않았다.

6a 내지 6c는 AIMP2-DX2 및 변이체의 아미노산 서열의 비교를 나타낸다(도 6b 및 6c는 도 6a의 연속임).

도 7은 CNV 마우스 모델에서 DX2의 예방 효능을 나타낸다. scAAV2-GFP 또는 scAAV2-DX2로 처리한 후 레이저 광응고 부위의 형광 혈관조영술 및 인도시아닌 녹색 혈관조영술 이미지이다. 바이러스 주사 레이저-유도 CNV 후 21일.

도 8은 맥락막 혈관신생 부위의 비교를 나타낸다. GFP 대조군과 DX2로 처리 시 누출 영역 대 CNV 영역의 비율을 나타낸다. 누출 영역은 FA를 이용하여 전체 과형광 면적을 측정하여 추정하였고, CNV 영역은 ICGA를 이용하여 산출하였다. DX2 처리에 의한 CNV 부위의 변화. CNV 부피는 총 측정된 이소렉틴(Isolectin) B4 부피를 기준으로 계산되었다. 각 그룹에 대해 n = 12, *P < (0.05).

도 9는 레이저-유도 맥락막 혈관신생(CNV) 마우스 모델에서 VEGF의 발현을 나타낸다. CNV 마우스 모델에서 VEGF 발현 및 VEGF 배수 변화의 웨스턴 블롯 결과이다. VEGF 배수 변화는 이미지 J로 측정했다. 각 그룹에 대해 n = 6, *P < (0.05).

도 10은 망막의 단면 조직학(H&E 염색) 결과를 나타낸다.

도 11a 내지 11e는 조직학적 망막 두께의 조직학적 측정 결과를 나타낸다. 도 11a는 망막 두께, 도 11b는 RPE(망막 색소 상피) 두께, 도 11c는 ONL(광수용체의 외부 핵층) 두께, 도 11d는 외부 세그먼트 두께, 11e는 OPL 외부 플렉시폼 층 두께를 나타낸다. 모든 샘플은 10 μm 두께의 시신경 포함 섹션에서 획득했다. 망막에서 DX2 유전자의 형질감염은 총 신경 망막 두께의 회복을 유도하였다(도 11a). DX2의 형질감염은 더 두꺼운 RPE 층(도 11b) 및 광수용체 외부 세그먼트 층(도 11c)을 나타냈고, 이는 DX2 발현이 RPE 변성과 광수용체 섬모 분해를 방지함을 시사한다. DX2의 형질감염은 또한 더 두꺼운 광수용체의 외부 핵층(도 11d) 및 외부 망상층(도 11e)을 나타내었고, 이는 DX2 발현이 광수용체 변성을 감소시킨다는 것을 시사한다.

도 12는 RPE(망막 색소 상피)의 무결성 및 증식을 나타낸다. DX2 유전자의 형질감염은 RPE의 증식을 활성화시켜 RPE 무결성을 회복시켰다. 도 13은 PR(광수용체) 회복. DX2 유전자의 형질감염은 PR의 증식을 활성화시켜 PR 집단을 회복시키는 결과를 낳았다.

도 14a 내지 14b는 RPE 및 PR의 세포 증식을 나타낸다. RPE 및 광수용체 층에서의 증식을 분석하기 위해 Ki67 발현을 측정하였다. RPE(도 14a) 및 광수용체 외부 세그먼트 층(도 14b)에서의 증식은 AAV2-DX2 형질감염된 샘플에서 현저히 높게 나타났다.

도 15a 내지 15f는 망막의 기능 회복을 나타낸다. AAV2-DX2 형질감염된 샘플의 망막전위도는 정상적인 ERG 그래프 형식의 회복 증가를 보여주었다(도 15a 및 15b). AAV2-DX2 형질감염은 건성-AMD 모델(mdm1-/-) 또는 음성 대조군(mdm1/+ AAV-GFP)에 비해 증가된 a-파 진폭(도 15c) 및 감소된 잠복기(도 15d)를 나타냈으며, 이에 따라 DX2 발현은 광수용체의 전기생리학적 기능과 시력의 손상을 감소시켰다. AAV2-DX2 형질감염된 샘플은 b-파 진폭(도 15e) 및 잠복기(도 15f)를 변화시키지 않았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] AIMP2-DX2는 AIMP2(aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2)의 대안적 길항 스플라이싱 변종으로 다인자 세포사멸 유전자이다. AIMP2-DX2는 AIMP2의 기능을 방해하여 세포사멸을 억제하는 것으로 알려져 있다. AIMP2의 경쟁적 억제체로서 작용하는 AIMP2-DX2는 TRAF2의 유비퀴틴화/분해의 억제를 통해 TNF-알파 매개 아포토시스를 억제한다. 또한 AIMP2-DX2가 신경질환을 치료할 수 있는 것으로 확인되었다(US2019/0298858 A1).

[0025] 또한, AIMP2-DX2를 아데노연관바이러스에 삽입하여 이를 망막하 공간에 도입 시 맥락막 신생혈관 형성을 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다.

[0026] 본 발명의 일 관점에 따르면, 약학적으로 유효한 양의 엑손 2-결실 AIMP2 변이체(AIMP2-DX2) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 개체에 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 개체의 노인성 황반 질환(AMD)를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 AMD는 습성 AMD이다. 일부 실시양태에서, 상기 AMD는 건성 AMD이다.

[0027] 본 발명의 일 관점에 따르면, 엑손 2-결실 AIMP2 변이체(AIMP2-DX2) 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 약학적 유효량을 개체에 투여하는 것을 포함하는, AMD에 걸린 개체에서 눈 또는 눈 주변 영역에서 혈관 누출 감소,

맥락막 혈관신생 영역 감소, 맥락막 혈관신생 형성 감소, 또는 VEGF 발현 감소 방법이 제공된다.

- [0028] 상기 재조합 벡터는 miR-142 표적 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 벡터는 AIMP2-DX2에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 프로모터는 레트로바이러스(LTR) 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 라우스육종바이러스(RSV) 프로모터, MT 프로모터, EF-1 알파 프로모터, UB6 프로모터, 치킨 베타-액틴 프로모터, CAG 프로모터, RPE65 프로모터 또는 옵션 프로모터일 수 있다.
- [0029] 본 문서에 개시된 방법에 따르면, 일부 실시 양태에서 상기 재조합 벡터는 엑손 2-결실 AIMP2 변이체(AIMP2-DX2) 유전자 및 miR-142 표적 서열을 포함할 수 있다. 상기 miR-142 표적 서열은 AIMP2-DX2 유전자에 대해 3' 일 수 있다. 본 문서에 기재된 상기 벡터는 신경세포에서 AIMP2-DX2를 발현할 수 있지만 백혈구 및 림프구 세포와 같은 조혈 세포에서는 발현하지 않는다.
- [0030] 상기 AIMP2-DX2 폴리펩티드(서열번호 2)는 AIMP2(예컨대, 서열번호 12의 aa 서열; 예컨대, 서열번호 3의 nt 서열)의 스플라이스 변이체이며, 여기서 두 번째 엑손은 (서열번호10; 서열번호 4의 nt 시퀀스)는 생략된다. 일부 실시 양태에서, 상기 AIMP2-DX2 유전자는 서열번호1에 제시된 뉴클레오티드 서열을 갖고, AIMP2-DX2 폴리펩티드는 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. AIMP2-DX2 폴리펩티드의 변이체 또는 이소형도 알려져 있고 당업자에 의해 결정될 수 있다(예컨대, 서열번호 13 내지 19 참조). 예컨대 도 6a-6c는 AIMP2(서열번호 2)와 변이체, 서열번호 13 내지 19, 뿐만 아니라 AIMP2 또는 AIMP2-DX2(서열번호 20)의 컨센서스 또는 핵심 서열의 비교를 보여준다.
- [0031] 일부 실시양태에서, 상기 AIMP2-DX2 유전자는 서열번호 2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 또는 그 안에 포함된 % 상동성 범위와 적어도 90% 상동성, 적어도 93% 상동성, 적어도 95% 상동성, 적어도 96% 상동성, 적어도 97% 상동성, 적어도 98% 상동성, 적어도 99% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 상기 AIMP2-DX2 유전자는 서열번호 2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 상기 AIMP2-DX2 유전자는 서열번호 1 또는 그 안에 포함된 % 상동성 범위와 적어도 90% 상동성, 적어도 93% 상동성, 적어도 95% 상동성, 적어도 96% 상동성, 적어도 98% 상동성, 적어도 99% 상동성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 AIMP2-DX2 유전자는 서열번호 10 또는 11에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 엑손을 갖지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 서열번호 10 또는 11의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 엑손을 갖지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 AIMP2-DX2 유전자는 서열번호 4에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 상동성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 엑손을 갖지 않을 수 있다.
- [0032] 상기 miR-142 표적 서열(miR-142T)은 AACTA를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 상기 miR-142 표적 서열은 AACTA 및 서열번호 5의 1 내지 17개의 추가적인 연속 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 miR-142 표적 서열은 AACTA 및 서열번호 5에 기재된 AACTA의 연속 5' 또는 3'인 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개의 추가 뉴클레오티드의 합을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0033] 상기 miR-142 표적 서열은 서열번호 5(TCCATAAAGTAGGAAACTACA; miR-142-3pT)의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 상동성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 상기 miR-142 표적 서열은 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0034] 상기 miR-142 표적 서열은 ACTTTA를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 상기 miR-142 표적 서열은 ACTTTA 및 서열번호 7의 1 내지 15개의 추가적인 연속 뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 miR-142 표적 서열은 ACTTTA 및 서열번호 7에 기재된 ACTTTA의 5' 또는 3'에 연속한 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15의 추가적인 뉴클레오티드의 합을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0035] 상기 miR-142 표적 서열은 서열번호 7 (AGTAGTGCTTCTACTTTATG; miR-142-5pT)의 뉴클레오티드 서열에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 상동성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 상기 miR-142 표적 서열은 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0036] miR142-3pT 돌연변이 서열의 예는 하기와 같다:
Ccgctgcagtgacagtgccagccaatgtgcagaggtggatgaggtcttgtgaaaacctggctccttttaacacggcctcaagctccttaagtgaccaga

agcttgctagctccataaagttaggaCCACTGCAatcactccataaagttaggaCCACTGCAagat atccat aagttaggaCCACTGCAatcactccat aaggttaggaCCACTGCAaaagctttagggatccgcc(서열번호 25).

- [0037] 돌연변이 서열은 하기과 같이 치환된 miR142 3pT의 코어 서열 중 하나 이상의 영역, 예컨대 4개의 영역을 의미한다: (5'-AACACTAC-3' -> 5'-CCACTGCA-3'). miR142-3p x1 반복(100 pmol) miR142-3p 표적 서열로 백터 형질전환된 HEK293 세포에서 DX2 발현의 억제가 관찰되었고 miR142-3p 표적 서열에서 코어 결합 서열의 수가 증가함에 따라 DX2에 발현 대한 miR142-3p 억제도 증가하였다. 백터를 포함하는 Tseq x3 코어 서열은 현저한 억제를 보인 반면, 돌연변이 3x 서열에 대해서는 억제가 관찰되지 않았다.
- [0038] 마이크로RNA(miRNA)는 유전자 발현을 제어하는 기능을 하는 비-암호화 RNA 분자이다. miRNA는 mRNA 분자 내의 상보적인 서열, 즉 miRNA 표적 서열과의 염기쌍 결합을 통해 기능한다. miRNA는 단백질 코딩-유전자의 표적 메신저 RNA(mRNA) 전사체에 결합하여 번역을 부정적으로 제어하거나 mRNA 분해를 일으킬 수 있다. 현재 2000개 이상의 인간 miRNA가 확인되었으며 miRbase 데이터베이스가 공개되어 있다. 많은 miRNA는 조직-특이적 방식으로 발현되며 조직-특이적 기능과 분화를 유지하는 데 중요한 역할을 한다.
- [0039] miRNA는 유전자의 전사 후 단계에 작용하며, 포유류의 경우 유전자 발현의 약 60%가 miRNA에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. miRNA는 생체 내 다양한 과정에서 중요한 역할을 하며 암, 심장 질환 및 신경 관련 질환과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다. 예컨대, miR-142-3p 및 miR-142-5p는 miR-142에 존재하며 상기 표적 서열 중 어느 것이든 사용될 수 있다. 따라서 "miR-142" 또는 "miRNA-142"는 예컨대 miR-142-3p 및/또는 miR-142-5p를 의미하고 miR-142 표적 서열, 예컨대 miR-142-3pT 또는 miR-142-5pT에 결합할 수 있다.
- [0040] 상기 miR-142 표적 서열은 AIMP2-DX2 유전자에 대해 5' 또는 3'일 수 있다. 예컨대, "miR-142-3p"는 공격적인 B 세포 백혈병에서 유전자의 전좌가 야기되는 부위에 존재할 수 있으며 조혈 조직(골수, 비장 및 흉선 등)에서 발현되는 것으로 알려져 있다. 또한, miR-142-3p는 태아 마우스의 간(마우스의 조혈조직)에서 발현 확인과 함께 조혈계 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다. 일부 실시 양태에서, miR-142-3p 및/또는 miR-142-5p 표적 서열은 적어도 2 내지 10회, 적어도 2 내지 8회, 적어도 2 내지 6회, 적어도 4회 또는 해당하는 임의의 범위나 횟수로 반복된다.
- [0041] 예컨대, 서열번호 23의 뉴클레오티드 서열을 갖는 miR-142-3p는 예컨대, 서열번호 5의 염기서열을 갖는 miR-142-3p 표적 서열에 해당하는 표적 서열을 가질 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 예컨대, 서열번호 24의 뉴클레오티드 서열을 갖는 상기 miR-142-5p는 서열번호 7의 뉴클레오티드를 갖는 예컨대 miR-142-5p 표적 서열에 해당하는 표적 서열을 가질 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 일부 실시 양태에서, miR-142-3p는 서열번호 23의 뉴클레오티드 서열을 가질 수 있고 miR-142-5p는 서열번호 24의 뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다.
- [0043] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, CD45-유래 세포, 특히 림프계와 백혈구에서 AIMP2-DX2 발현의 억제를 제어하고, AIMP2-DX2의 말단으로 miR-142-3p 및/또는 miR-142-5p 표적 서열(각각 miR-142-3pT 및/또는 miR-142-5pT)을 삽입함으로써 AIMP2-DX2 변이체의 과발현의 부작용을 제어할 수 있는 재조합 백터를 제공한다. 따라서, 상기 AIMP2-DX2 변이체의 발현은 주입된 신경 세포 및 조직에서만 제한될 수 있으며 주입된 조직 영역의 주요 집단인 비-신경 조혈 세포에서는 발현되지 않는다. MiR142-3p는 조혈 세포에서만 발현된다.
- [0044] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, miR-142-3p 및/또는 miR-142-5p에 대한 표적 서열을 포함하는 재조합 백터가 제공된다.
- [0045] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 엑손 2-결실 AIMP2 변이체(AIMP2-DX2) 유전자 및 miR-142-3p 및/또는 miR-142-5p 표적 서열을 포함하는 재조합 백터가 제공된다.
- [0046] 본 문서에 기재된 용어 "재조합 백터"는 적절한 숙주 세포에서 표적 단백질 또는 RNA로 발현될 수 있는 백터 및 삽입된 유전자가 적절하게 발현될 수 있도록 필수적인 작동가능하게 연결된 조절 인자를 포함하는 유전자 구조물을 의미한다.
- [0047] 상기 "작동 가능하게 연결된"이라는 용어는 일반적인 기능을 수행하기 위해 핵산 발현 제어 서열과 표적 단백질 및 RNA를 코딩하는 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 의미한다. 예컨대, 핵산 서열의 작동성을 위해 연결된 프로모터 및 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 백터와의 작동 가능한 연결은 해당 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제작할 수 있으며, 영역 특이적 DNA 절단 및 연결은 해당 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소를 사용한다.

- [0048] 상기 재조합 벡터는 본 문서에 개시된 바와 같이 AIMP2-DX2에 작동가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 프로모터는 레트로바이러스(LTR) 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 라우스육종 바이러스(RSV) 프로모터, MT 프로모터, EF-1 알파 프로모터, UB6 프로모터, 치킨 베타-액틴 프로모터, CAG 프로모터, RPE65 프로모터, 시냅신(Synapsin) 프로모터, MeCP2 프로모터, CaMKII 프로모터, Hb9 프로모터, 또는 옵신(opsin) 프로모터일 수 있다.
- [0049] 상기 재조합 벡터는 이중 프로모터 및 프로모터에 작동가능하게 연결된 이중 유전자를 추가로 포함할 수 있다.
- [0050] 본 문서에서 사용되는 "이중 유전자(heterogeneous gene)"는 생물학적으로 적절한 활성화를 갖는 단백질 또는 폴리펩타이드, 및 번역원 또는 항원성 단백질 또는 폴리펩타이드와 같은 표적 산물의 암호화된 서열, 또는 치료 활성화 단백질 또는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.
- [0051] 폴리펩타이드는 숙주 세포에서 내인성 단백질의 결핍 또는 부재 발현을 보충할 수 있다. 유전자 서열은 DNA, cDNA, 합성 DNA, RNA 또는 이들의 조합을 포함하는 다양한 공급자로부터 유도될 수 있다. 상기 유전자 서열은 천연 인트론을 포함하거나 포함하지 않는 게놈 DNA를 포함할 수 있다. 또한, 상기 게놈 DNA는 프로모터 서열 또는 폴리아데닐화 서열과 함께 획득될 수 있다. 게놈 DNA 또는 cDNA는 다양한 방법으로 획득할 수 있다. 게놈 DNA는 해당 지역에서 고시하는 방법을 통해 적절한 세포로부터 추출 및 정제할 수 있다. 대안적으로, mRNA는 세포로부터 분리되어 역전사 또는 다른 방법에 의해 cDNA를 생산하는데 사용될 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오티드 서열은 RNA 서열에 상보적인 서열, 예컨대 안티센스 RNA 서열을 포함할 수 있으며, 안티센스 RNA는 개인에게 투여되어 개인의 세포에서 상보적인 폴리뉴클레오티드의 발현을 억제할 수 있다.
- [0052] 예컨대, 상기 이중 유전자는 엑손 2가 결실된 AIMP-2 스플라이싱 변이체이며 miR-142-3p 표적 서열은 이중 유전자의 3' UTR에 연결될 수 있다. AIMP2 단백질의 서열(312aa 버전: AAC50391.1 또는 GI: 1215669; 320aa 버전: AAH13630.1, GI: 15489023, BC0 13630.1)은 하기 문헌(312aa version: 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)/ 320 aa version: 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))에 기재되어 있다. 본 문서에서 사용되는 용어 "AIMP2 스플라이싱 변이체"는 엑손 1 내지 4 중 엑손 2의 일부 또는 전체 결실로 인해 생성된 변이체를 의미한다. 이와 같이 상기 변이체는 AIMP2 단백질 및 이중이중체(heterodimer)를 형성하여 AIMP2의 정상적인 기능을 방해하는 것을 의미한다. 상기 주입된 AIMP2-DX2 유전자는 주입된 조직 이외의 조직에서는 거의 발현되지 않는다. 그러나 추가 안전 조치로 miR142 표적 서열을 삽입하여 AIMP2-DX2가 주입된 조직 영역에서 비-신경 세포의 주요 집단인 조혈 세포에서 발현될 가능성을 완전히 차단할 수 있다.
- [0053] 상기 재조합 벡터는 서열번호 1 및 5를 포함할 수 있다. 본 문서에서 사용되는 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열에 대한 용어 "서열 상동성 %", "% 동일성" 또는 "% 동일성"은 예컨대 최적으로 배열된 2개의 서열을 비교 도메인 및 일부 비교 도메인의 뉴클레오타이드 서열 중 2개 서열의 최적 배열 상의 참조 서열과 비교하여 추가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다(추가 또는 결실은 포함하지 않음). 본 문서에 개시된 바와 같은 단백질은 자연형 아미노산 서열을 갖는 것뿐만 아니라 변이체 아미노산 서열을 갖는 것도 포함한다.
- [0054] 단백질의 변이체는 자연 아미노산 서열과 1개 이상의 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 비보존적 또는 보존적 치환 또는 이들의 조합으로 인해 서열이 다른 단백질을 의미한다. 단백질에서의 아미노산 교환과 전체적으로 분자의 활성화를 변형시키지 않는 펩타이드는 해당 분야에 고시되어 있다(H. Neurath, R.L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979).
- [0055] 단백질 또는 그 변이체는 자연적 추출, 합성(Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-2156, 1963) 또는 DNA 서열을 기반으로 유전자 재조합(Sambrook et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2nd Ed., 1989)을 통해 제조할 수 있다.
- [0056] 아미노산 변이는 친수성, 소수성, 전하 및 크기 등과 같은 아미노산 측쇄 치환체의 상대적인 유사성에 기초하여 발생할 수 있다. 아미노산 측쇄 치환체의 크기, 형태 및 유형의 분석에 따라, 아르기닌, 리신 및 히스티딘은 양 전하를 갖는 잔기임을 식별할 수 있다; 알라닌, 글리신 및 세린은 크기가 비슷하다. 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신은 모양이 비슷하다. 따라서, 이러한 고려사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신 및 히스티딘; 알라닌, 글리신 및 세린; 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신은 생물학적으로 기능적 동등물로 간주될 수 있다.
- [0057] 하나 이상의 돌연변이를 도입함에 있어서, 아미노산의 소수성 지수(hydrophobic index)가 고려될 수 있다. 소수

성 지수는 소수성 및 전하에 따라 각 아미노산에 지정된다: 이소류신(+4.5); 발린(+4.2); 류신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글리신(-0.4); 트레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 티로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).

- [0058] 단백질의 상호작용적 생물학적 기능을 부여함에 있어서, 소수성 아미노산 지수는 매우 중요하다. 소수성 지수가 유사한 아미노산으로 치환해야만 비슷한 생물학적 활성화가 가능하다. 소수성 지수를 참고하여 돌연변이를 도입한 경우, 소수성 지수 차이가 ± 2 이내, ± 1 이내 또는 ± 0.5 이내인 아미노산 간의 치환을 수행한다.
- [0059] 한편, 유사한 친수성 값을 갖는 아미노산 간의 치환이 동등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 유도할 수 있다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 기재된 바와 같이, 하기의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 할당된다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스파르테이트(+3.0 ± 1); 글루타메이트(+3.0 ± 1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글리신(0); 트레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5 ± 1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 류신(-1.8); 이소류신(-1.8); 티로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4).
- [0060] 친수성 값을 참조하여 하나 이상의 돌연변이를 도입하는 경우, 친수성 값 차이가 ± 2 이내, ± 1 이내 또는 ± 0.5 이내인 아미노산 간에 치환이 이루어질 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.
- [0061] 전체적으로 분자의 활성화를 변형시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 해당 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). 가장 일반적으로 발생하는 교환은 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 및 Asp/Gly를 포함하는 아미노산 잔기 사이의 교환이다. 벡터 시스템은 해당 업계에서 발표된 다양한 방법을 통해 구축할 수 있다. 구체적인 방법은 Sambrook et al. (2001), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.에 기재되어 있다.
- [0062] 본 문서에 개시된 벡터는 클로닝 또는 발현을 위한 일반적인 벡터로 구성될 수 있다. 또한, 원핵 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 벡터를 구축할 수 있다. 벡터가 발현 벡터이고 원핵 세포를 숙주로 사용하는 경우에는 전사 실행을 위한 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL X 프로모터, pRX 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독 개시를 위한 리보솜 결합 부위 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 대장균(예컨대, HB101, BL21, DH5a 등)을 숙주세포로 사용하는 경우, 대장균의 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 작동자 부위(Yanofsky, C.(1984), *J. Bacteriol.*, 158: 1018-1024) 및 파지 X의 좌측 방향성 프로모터(pLX 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D.(1980), *Ann. Rev. Genet.*, 14: 399-445)를 제어 부위로 사용할 수 있다.
- [0063] 한편, 사용될 수 있는 벡터는 바이러스 벡터, 선형 DNA 또는 플라스미드 DNA와 같이 1가지 이상의 유형일 수 있다.
- [0064] "바이러스 벡터"는 원하는 세포, 조직 및/또는 기관에 유전자 또는 유전 물질을 전달할 수 있는 바이러스 벡터를 의미한다.
- [0065] 바이러스 벡터는 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노연관바이러스(Adeno-associated virus), 렌티바이러스(Lentivirus), 레트로바이러스(Retrovirus), HIV(Human immunodeficiency virus), MLV(Murine leukemia virus), ASLV(Avian sarcoma/leukosis), SNV(Spleen necrosis virus), RSV(Rous sarcoma virus), MMTV(Mouse mammary tumor virus) 및 단순포진바이러스(Herpes simplex virus)로 구성된 군으로부터 1종 이상을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0066] 일부 실시양태에서, 상기 바이러스 벡터는 아데노연관바이러스(AAV), 아데노바이러스, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 백시니아 바이러스 또는 단순포진바이러스 벡터일 수 있다.
- [0067] 레트로바이러스는 숙주 세포의 게놈에 대한 통합 기능을 갖고 인체에 무해하지만, 통합시 정상 세포의 기능 억제, 다양한 범위의 세포 감염 능력, 증식 용이성, 약 1-7kb의 외부 유전자 수용 및 복제 결핍 바이러스 생성 등의 특성을 가질 수 있다. 그러나 레트로바이러스(Retrovirus)는 유사분열 후 세포 감염이 어렵고 생체 내 조건에서 유전자 전달이 어렵고 체외 조건에서 체세포 증식이 필요한 단점도 있다. 또한 레트로바이러스는 원발암 유전자(proto-oncogene)에 통합될 수 있어 자발적인 돌연변이의 위험이 있으므로 세포 괴사의 가능성이 있다.
- [0068] 한편, 아데노바이러스는 중간 크기의 세포의 핵에서도 복제가 가능하고, 임상적으로 무독성이며, 외부 유전자가

삽입되어도 안정적이고, 유전자의 재배열이나 결실이 없으며, 진핵생물의 형질전환이 가능하고 숙주 세포 염색체에 통합되더라도 안정적으로 높은 수준으로 발현되는 등 클로닝 벡터로서 다양한 장점을 가지고 있다. 아데노바이러스의 좋은 숙주 세포는 인간의 조혈, 림프 및 골수종의 원인이 되는 세포이다. 그러나 선형 DNA이기 때문에 증식이 어렵고 바이러스 감염률이 낮아 감염된 바이러스를 복구하기가 쉽지 않다. 또한, 전달된 유전자의 발현은 1-2주 동안 가장 광범위하며 일부 세포에서만 발현이 3-4주 동안 지속된다. 또 다른 문제는 면역 항원성이 높다는 것이다.

[0069] 아데노연관바이러스(AAV)는 상기 문제점을 보완할 수 있고 유전자 치료제로서 많은 장점을 가지기 때문에 최근에 선호되고 있다. 이는 아데노위성바이러스라고도 하는데 아데노연관바이러스 입자의 직경은 20nm로 인체에 거의 해가 없는 것으로 알려져 있다. 이에 따라 유럽에서 유전자치료제로 판매가 승인됐다.

[0070] AAV는 복제를 위한 보조 바이러스가 필요한 단일 가닥을 가진 프로바이러스이며 AAV 게놈은 감염된 세포의 19번 염색체의 특정 영역에 삽입될 수 있는 4,680 bp를 갖는다. 트랜스진(Trans-gene)은 각각 145bp의 2개의 ITR(inverted terminal repeat) 시퀀스 섹션과 신호 시퀀스 섹션으로 연결된 혈장 DNA에 삽입된다. AAV rep 및 cap 섹션을 발현하는 다른 플라스미드 DNA와 함께 형질감염이 수행되고, 아데노바이러스가 보조 바이러스로 추가된다. AAV는 유전자를 전달하는 숙주세포의 범위가 넓고 반복 투여 시 면역학적 부작용이 적고 유전자 발현 기간이 긴 장점이 있다. 또한 AAV 게놈이 숙주 세포의 염색체와 통합되어 숙주의 유전자 발현을 변형하거나 재배열하지 않아도 안전하다.

[0071] 아데노연관바이러스는 총 4가지 혈청형(serotype)을 갖는 것으로 알려져 있다. 표적 유전자의 전달에 사용될 수 있는 많은 아데노연관바이러스 혈청형 중 가장 널리 연구된 벡터는 아데노연관바이러스 혈청형 2로 현재 낭포성 섬유증, 혈우병 및 카나반병의 임상 유전자 전달에 사용된다. 또한 최근 암 유전자 치료 분야에서 rAAV(recombinant adeno-associated virus)의 가능성이 높아지고 있다. 또한 본 발명에서 아데노연관바이러스 혈청형 2를 사용하였다. 적절한 바이러스 벡터를 선택하여 적용하는 것이 가능하나 이에 제한되지 않는다.

[0072] 또한, 벡터가 발현 벡터이고 진핵 세포를 숙주로 하는 경우, 포유류 세포의 게놈에서 유래한 프로모터(예: 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유류 바이러스에서 유래한 프로모터(예: 포스트-아데노바이러스 프로모터, 백신 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV TK 프로모터)가 사용될 수 있다. 구체적으로, 레트로바이러스의 LTR, CMV(cytomegalovirus) 프로모터, RSV(Rous sarcoma virus) 프로모터, MT 프로모터, EF-1 알파 프로모터, UB6 프로모터, 치킨 베타-액틴 프로모터, CAG 프로모터, RPE65 프로모터 및 옹신 프로모터로 구성되는 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 일반적으로 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화(polyadenylated) 서열을 갖는다.

[0073] 본 발명에 개시된 벡터는 단백질의 정제를 용이하게 하기 위해 필요에 따라 다른 서열과 융합될 수 있다. 예컨대 glutathione S-transferase(Pharmacia, USA), maltose binding protein(NEB, USA), FLAG(ABI, USA), 6xHis(hexahistidine; Quiagen, USA) 등의 융합서열을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 발현 벡터는 암피실린(Ampicillin), 젠타마이신(Gentamycin), 카베니실린(Carbenicillin), 클로람페니콜(Chloramphenicol), 스트렙토마이신(Streptomycin), 카나마이신(Kanamycin), 제네티신(Geneticin), 네오마이신(Neomycin), 테트라사이클린(Tetracycline) 등을 예시적으로 선택 마커로 해당 산업에서 일반적으로 사용되는 항생제에 대한 내성 유전자를 포함할 수 있다.

[0074] 또한, 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, miR-142-3p 및/또는 miR-142-5p와 같은 miR-142에 대한 표적 서열(miR-142-3pT 및/또는 miR-142-5pT)을 각각 포함하는 재조합 벡터를 포함하는 유전자 운반체가 제공된다.

[0075] 본 문서에 사용되는 "유전자 전달"이라는 용어는 일반적으로 전사 및 발현을 위해 유전 물질을 세포로 전달하는 것을 포함한다. 상기 방법은 단백질 발현 및 치료 목적에 이상적이다. DNA 침투법과 바이러스 전달법 등 다양한 전달 방법이 발표되었다. 이는 특정 수용체 및/또는 세포 유형을 대상으로 높은 전달 효율과 전달된 유전자의 높은 발현 수준을 통해 바이러스 매개 유전자 전달의 가능성을 나타내며, 필요한 경우 친환경성이나 의사형성(pseudo-typing)을 갖춘 특성을 가질 수 있다.

[0076] 유전자 운반체는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체일 수 있으며, 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 모든 방법을 포함하며, 해당 분야에서 공지된 바와 같이, 숙주세포에 따라 적절한 표준기울을 선택하여 시행한다. 이러한 방법으로는 전기천공(electroporation), 원형질 융합(fusion of protoplasm), 인산칼슘(CaPO4) 침강, 염화칼슘(CaCl2) 침강, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 혼합, 농균-매개 형질전환, PEG, 황산 덱스트란(dextran sulphate) 및 리포펙타민(lipofectamin) 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [0077] 유전자 운반체는 뉴런에서 이중 유전자의 발현을 목적으로 한다. 이와 같이 CD45-유래 세포에서 이중 유전자의 발현을 억제하고 뇌 조직에서 이중 유전자의 발현을 증가시킬 수 있다. CD45의 대부분은 조혈 세포에 위치한 막 관통 단백질 티로신 포스파타제(tyrosine phosphatase)이다. 세포는 세포 표면에 위치한 분자에 따라 정의될 수 있으며 CD45는 모든 백혈구 그룹과 B 림프구에 대한 세포 마커이다. 유전자 캐리어는 CD45-유래 세포, 특히 림프구 및 백혈구 범위의 세포에서 발현되지 않는다.
- [0078] 상기 유전자 운반체는 추가적으로 약리학적으로 사용될 수 있는 운반체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 재조합 벡터를 상용하는 개체에 도입하는 단계를 포함하는 뉴런에서 이중 유전자를 전달 및 발현하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 대뇌 조직에서 이중 유전자의 발현을 증가시키고 다른 조직에서 이중 유전자 발현을 제어할 수 있다.
- [0079] 또한, 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 1) 프로모터; 2) 작동가능하게 프로모터와 연결된 목적 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 및 3) 뉴클레오티드 서열의 3'UTR에 삽입된 miR-142-3p를 표적으로 하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 벡터가 제공된다. 일부 실시 양태에서, 상기 벡터는 1) 프로모터; 2) 작동가능하게 프로모터와 연결된 목적 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 및 3) 뉴클레오티드 서열의 3'UTR에 삽입된 miR-142-5p를 표적으로 하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함할 수 있다.
- [0080] 본 문서에서 사용되는 용어 "발현 카세트"는 표적 단백질을 암호화하는 유전자와 프로모터 및 신호 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 신호 펩타이드의 하류와 작동 가능하게 연결된 목적 단백질의 생산 및 분비를 위한 발현을 수행할 수 있는 단위 카세트를 의미한다. 본 발명의 분비 발현 카세트는 분비 시스템과 혼합되어 사용될 수 있다. 이러한 발현 카세트에는 목적 단백질의 효율적인 생산을 도울 수 있는 다양한 인자들이 포함될 수 있다.
- [0081] 또한, 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 엑손 2가 결실된 AIMP-2 스플라이싱 변이체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 및 뉴클레오티드 서열의 3'UTR에 연결된 miR-142-3p를 표적으로 하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 AMD에 대한 예방 또는 치료제가 제공된다.
- [0082] 또한, 본 발명의 일 관점에 따르면, 본 문서에 개시된 임의의 벡터를 투여하는 것을 포함하는, AMD를 필요로 하는 개체의 AMD를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 AMD는 습성 AMD이다. 일부 실시양태에서, 상기 AMD는 건성 AMD이다.
- [0083] 본 문서에 개시된 상기 벡터는 아포토시스 억제, 운동 이상증 개선 및/또는 산화 스트레스 억제를 수행할 수 있지만 이에 제한되지 않으며 따라서 AMD를 예방하거나 치료할 수 있다. 본 문서에 사용되는 용어 "치료"는 AMD의 완전한 치료뿐만 아니라 본 문서에 개시된 약리학적 제제의 적용 결과로서 AMD의 전반적인 증상의 부분적 치료, 개선 및/또는 감소를 포함한다.
- [0084] 본 문서에 사용되는 용어 "예방"은 퇴행성 뇌 질환이 있는 개체에 본 문서에 개시된 약리학적 제제를 적용함으로써 인지장애, 행동장애, 뇌신경 파괴 등 황반변성의 전반적인 증상이나 현상을 억제하거나 차단하여 사전에 예방하는 것을 의미한다. 활성 성분 이외의 보조제가 본 문서에 개시된 약리학적 제제에 추가로 포함될 수 있다. 보조제는 해당 기술분야에 공지된 것이라면 제한 없이 사용할 수 있으나, 예컨대 프로인트(Freund)의 완전 및 불완전 보조제를 추가로 포함함으로써 면역력을 높일 수 있다.
- [0085] 본 문서에 개시된 약리학적 제제는 활성 성분을 약리학적으로 허용된 담체와 혼합한 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약리학적으로 허용되는 담체는 약리학 분야에서 일반적으로 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본원에 개시된 약리학적 제제에 사용될 수 있는 약리학적으로 허용되는 담체는 락토스(lactose), 덱스트로스(dextrose), 수크로스(sucrose), 소르비톨(sorbitol), 만니톨(mannitol), 자일리톨(xylitol), 에리스리톨(erythritol), 말리톨(malitol), 전분(starch), 아카시아 고무(acacia rubber), 알기네이트(alginate), 젤라틴(gelatin), 인산칼슘(calcium phosphate), 규산칼슘(calcium silicate), 셀룰로오스(cellulose), 메틸 셀룰로오스(methyl cellulose), 폴리비닐피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 물, 메틸하이드록시벤조에이트(methylhydroxy benzoate), 프로필하이드록시벤조에이트(propylhydroxy benzoate), 탈크(talc), 스테아르산마그네슘(magnesium stearate) 및 미네랄 오일 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0086] 본 문서에 개시된 약리학적 제제는 산제, 과립제, 환제, 캡슐제, 현탁액제, 유제제, 시럽제, 에어로졸제제 등의 경구용 제제와 외용제제, 좌제제 또는 소독주사제제 등을 각각의 일반적인 제조방법에 따라 구분하고 다양한 형태로 제조되어 사용될 수 있다.

- [0087] 제제로 제조할 때 일반적으로 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 제조에 사용할 수 있다. 경구 투여용 고형 제제는 환제, 정제, 산제, 과립제 및 캡슐제를 포함하며, 상기 고형 제제는 유효성분에 전분, 탄산칼슘, 자당, 유당, 젤라틴 등의 부형제를 1종 이상 혼합하여 제조할 수 있다. 또한 단순한 부형제 외에 스테아린산 마그네슘(magnesium stearate), 탈크(talc) 등의 윤활제도 사용할 수 있다. 경구투여용 액제는 현탁액, 내복액, 유상액 등으로 습윤제, 감미료, 향료, 방부제 등의 각종 부형제를 포함한다. 일반적으로 사용되는 희석제인 물과 유동 파라핀 이외의 것. 비경구용 제제에는 멸균 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유지제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 올리브 오일과 같은 식물성 기름과 에틸레이트(ethylate)와 같은 주사 가능한 에스테르는 비수성 용매 및 현탁 용액으로 사용할 수 있다. 좌제의 제제는 위템솔, 트윈 61, 카카오 오일, 라우린 오일 및 글리세로젤라틴 등을 포함할 수 있다.
- [0088] 약리학적 제제는 다양한 채널을 통해 피험자 또는 독립체에 투여될 수 있다. 경구투여, 정맥주사, 근육주사, 피하주사, 복강주사 등 모든 형태의 투여가 가능하다.
- [0089] 일부 실시양태에서, 상기 재조합 백터는 국소적으로 유리체강내 주사에 의해, 결막하 주사에 의해, 또는 개체의 망막하 공간에 투여된다.
- [0090] 본 문서에 개시된 방법은 부가적 치료제를 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 부가적 치료제는 라니비주맵(ranibizumab), 에플리버셉트(aflibercept) 또는 베바시주맵(bevacizumab)이다.
- [0091] 본 문서에 개시된 치료제의 바람직한 투여량은 제제 제조방법, 투여형태, 환자의 연령, 체중 및 성별, 질환의 증상 정도, 식이, 투여기간, 투여경로, 배출속도 및 반응감도 등을 포함하는 다양한 인자에 따라 상이하다. 다만, 해당 제조사에서 적절하게 선택할 수 있다. 그러나, 치료 효과를 위해 숙련된 의사가 목표 치료를 위한 유효 용량을 결정하고 처방할 수 있다. 예컨대, 상기 치료제는 정맥주사, 피하주사, 근육주사, 마이크로니들을 이용하여 뇌실이나 척수에 직접 주사하는 방식이 있다. 다중 주사 및 반복 투여가 가능하며, 예컨대, 백터의 경우 유효 용량은 0.05~15 mg/kg, 재조합 바이러스 및 $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^7$ cells/kg 세포에서 바이러스 입자의 경우 $5 \times 10^{11} \sim 3.3 \times 10^{14}$ ($2.5 \times 10^{12} \sim 1.5 \times 10^{16}$ IU)/kg이다. 바람직하게는, 상기 용량은 백터의 경우 0.1~10 mg/kg, 재조합 바이러스의 경우 $5 \times 10^{12} \sim 3.3 \times 10^{13}$ 입자($2.5 \times 10^{13} \sim 1.5 \times 10^{15}$ IU)/kg이며 세포의 경우 주당 2~3회 투여 비율로 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$ cells/kg이다. 복용량은 엄격하게 제한되지 않는다. 오히려 환자의 상태와 신경질환의 발현 정도에 따라 수정될 수 있다. 기타 피하 지방 및 근육 주사 및 환부에 직접 투여하는 유효용량은 재조합 바이러스 입자 $9 \times 10^{10} \sim 3.3 \times 10^{14}$ 를 10cm 간격으로 주 2~3회 비율로 투여한다. 복용량은 엄격하게 제한되지 않는다. 오히려 환자의 상태와 신경질환의 발현 정도에 따라 수정될 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 약리학적 제제는 1×10^{10} 내지 1×10^{12} vg(바이러스 계놈)/mL의 재조합 아데노연관바이러스를 포함하며, 일반적으로 2주에 걸쳐 2일에 한번씩 1×10^{12} vg를 주사하는 것이 바람직하다. 1일 1회 투여하거나 하루에 여러 번 나누어 투여할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 백터는 0.1×10^8 vg에서 500×10^8 vg까지, 1×10^8 vg에서 100×10^8 vg까지, 1×10^8 vg에서 10×10^8 vg까지, 예컨대 5×10^8 vg 또는 이에 해당하는 임의의 범위로 투여될 수 있다. IV 주사의 경우, 예컨대, vg는 IV 주사에 대한 체중을 기준으로 한 사람의 용량으로 변환될 수 있다. 국소 조직 주사의 경우, 예컨대, vg는 표적 세포 수 및 효과적인 MOI(다중 감염)에 기초하여 사람에게 대한 투여량으로 변환될 수도 있다.
- [0092] 일부 실시양태에서, 본 문서에 개시된 백터는 예컨대, 망막하 주사, 유리체내 주사 또는 유리체강 내 주입에 의해 개체에게 주사될 수 있다. 주사는 액체 형태일 수 있다. 다른 일부 실시 양태에서, 본 문서에 개시된 백터는 점안액 또는 연고 형태로 개체에게 투여될 수 있다.
- [0093] 상기 약리학적 제제는 다양한 범위의 경구 및 비경구 투여 가능한 형식으로 제조될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 본 문서에 개시된 백터는 뇌 또는 척수에 투여될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 본 문서에 개시된 백터는 정위 주사(stereotaxic injection)에 의해 뇌에 투여될 수 있다.
- [0094] 경구 투여 제제에는 알약, 정제, 경질 및 연질 캡슐, 액체, 현탁 용액, 오일, 시럽 및 과립 등이 포함된다.
- [0095] 상기 제제에는 희석제(예: 유당, 포도당, 자당, 만니톨, 소르비톨, 셀룰로오스 및/또는 글리신) 및

글리텐트(예: 실리카, 활석 및 스테아르산 및 이의 마그네슘 또는 칼슘 염, 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)가 포함될 수 있다. 또한 환제는 규산알루미늄마그네슘, 전분페이스트, 젤라틴, 트라가칸틴, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 및/또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 결합제를 포함할 수 있으며, 상황에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그 나트륨염 또는 이와 유사한 혼합물과 같은 봉해제 및/또는 흡수제, 착색제, 향료 및 감미료를 포함할 수 있다. 상기 제제는 일반적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0096] 또한, 주사용 제제는 비경구 투여 제제의 대표적인 형태이다. 상기 주사제의 용매는 물, 링거액, 등장성 생리 식염수 및 현탁액을 포함한다. 멸균된 주사용 고정유는 용매 또는 현탁매체로 사용할 수 있으며, 모노글리세라이드, 디글리세라이드 등 무자극성 고정유라면 모두 사용할 수 있다. 또한 주사제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다. 이하의 실시예를 사용하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 내용을 특정하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 적용이 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0097] **실시예**

[0098] **실시예 1: 재조합 벡터의 제조**

[0099] CD45의 대부분은 세포 표면의 분자에 따라 세포를 정의하는 데 사용할 수 있는 조혈 세포의 막관통 단백질 티로신 포스파타제이다. CD45는 모든 백혈구 그룹과 B 림프구에 대한 마커이다. CD45 유래 세포, 특히 림프계 및 백혈구 세포에서는 발현되지 않고 뉴런에서만 특이적으로 발현되는 재조합 벡터를 제조하였다.

[0100] 상기 재조합 벡터는 AIMP2(Aminoacyl tRNA Synthetase Complex Interacting Multifunctional Protein 2)의 엑손 2가 결실된 스플라이싱 변이체와 상기 AIMP2 스플라이싱 변이체의 발현을 조절할 수 있는 miRNA를 포함하고 있다.

[0101] 상기 재조합 벡터는 주입된 신경 조직에서 AIMP2 스플라이싱 변이체의 특이적 발현을 유도하기 위해 분포 안전성 조치로 생산되었다. 또한 이는 주입된 조직 영역에서 비-신경 세포의 주요 집단인 조혈 세포에서 AIMP2-DX2가 발현될 가능성을 완전히 차단하기 위해 수행되었다.

[0102] **1-1: AIMP2 변이체의 생산**

[0103] AIMP2는 ARS(aminoacyl-tRNA synthetase)의 형성에 관여하는 단백질 중 하나로 다인성 세포사멸 단백질로 작용한다. AIMP2의 엑손 2가 결실된 변이체를 발현하는 플라스미드를 구축하기 위해 AIMP2 스플라이싱 변이체의 cDNA를 pcDNA3.1-myc에 클로닝하였다. pcDNA3.1-myc에서의 서브클로닝은 AIMP2 스플라이싱 변이체를 H322 cDNA에 부착된 *EcoR1* 및 *Xho1* 링커를 갖는 프라이머를 사용하여 증폭시킨 후 *EcoR1* 및 *Xho1*을 사용하여 수행하였다.

[0104] 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 AIMP2 변이체가 사용되었다.

[0105] **1-2: miRNA의 분류 및 표적 서열의 선택**

[0106] 상기한 바와 같이, 분포 안전성 조치로써 주입된 신경 세포에서 AIMP2 변이체의 발현을 제한하고 AIMP2-DX2가 주입된 조직 영역에서 비-신경 세포의 주요 집단인 조혈 세포에서 발현될 가능성을 완전히 차단하기 위해 상기 재조합 벡터를 제조하였다.

[0107] 이를 위해 백혈구 및 림프계 관련 세포를 생성하는 조혈 세포에서만 특이적으로 발현되는 miR-142-3p를 표적으로 선택하였다. miR-142-3p만을 표적으로 하는 서열을 생성하기 위해 마우스 B 세포의 마이크로레이 데이터 및 miR-142-3p가 표적으로 하는 유전자의 컴퓨터 프로그래밍(mirSVR 점수)을 사용했다. 서열번호 5의 miR-142-3p 표적 서열은 miR-142-3p에 결합한다.

[0108] 상기 miR-142-3p 표적 서열은 *Nhe1* 및 *HindIII*, *Bmt1* 부위 서열(ccagaagcttgctagc; 서열번호 21) 및 *Hind H* 부위 서열(aagcttgtag; 서열번호 22)을 포함한다. 상기 miR-142-3pT는 이들을 연결하는 링커(tcac 및 gatatc)로 4회 반복된 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다(도 4, 서열번호 6).

[0109] **1-3: 재조합 벡터의 생산**

[0110] 재조합 벡터를 생산하기 위해, AIMP2 변이체(서열번호 1)의 3'UTR에 miR-142-3p 표적서열(서열번호 5)을 삽입하였다. AIMP-2 변이체 및 miR-142-3p 표적 서열의 연결은 서열번호 6으로 표시하였으며, 구체적으로 *Nhe I* 및 *Hind III* 부위를 이용하여 절단 삽입하였다. 상기 재조합 벡터는 도 1에 도시되어 있다.

[0111] **실시예 2. in vitro에서 재조합 벡터의 신경세포 특이적 발현 확인**

[0112] miR142-3p는 조혈세포에서만 특이적으로 발현되기 때문에 재조합 벡터의 miR142-3p 표적서열의 발현에 따른

AIMP2 변이체의 녹다운에 따라 특정 세포에서 AIMP2 변이체의 발현 정도를 확인하였다.

[0113] 구체적으로, 상기 재조합 벡터를 처리하지 않은 그룹(SHAM), 보이드/대조군 벡터 처리된 그룹(NC 벡터), 단일 AIMP2 변이체 벡터 처리된 그룹(pscAAV-DX2) 및 재조합 벡터 처리된 그룹(pscAAV-DX2-miR142-3pT)으로 분류하였다. 모든 벡터의 농도는 ug/ul 단위이며 각 그룹은 2.5 ul(2.5 ug)씩 처리하였다. 각 처리군에서 THP-1 세포주(인간 백혈병 단핵구 세포) 및 SH-SY5Y 세포주(신경모세포종)에 AIMP2 변이체의 녹다운을 확인하여 처리하였다. qPCR은 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 수행하였다(변성 15초, 어닐링 및 연장은 60℃ 온도 30초로 40 사이클).

표 1

AIMP2 변이체	프라이머	서열번호
정방향	CTGGCCACGTGCAGGATTACGGGG (인간)	8
역방향	AAGTGAATCCCAGCTGATAG (인간)	9

[0115] 그 결과, AIMP2 변이체가 SHAM 및 NC 벡터 그룹에서 발현되지 않음을 확인하였다. 또한 단일 AIMP2 변이체 벡터 처리 그룹(pscAAV-DX2)의 THP-1 세포주 및 SH-SY5Y 세포주 모두에서 발현이 있음을 확인하여 신경세포 특이적인 발현이 유도되지 않음을 확인하였다. 한편, 상기 재조합 벡터를 처리 그룹에서는 AIMP2 변이체가 SH-SY5Y 세포주에서만 특이적으로 발현됨을 확인하였다(도 2).

[0116] **실시예 3. 재료 및 방법**

[0117] **3-1: qRT-PCR**

[0118] 제조업체의 프로토콜에 따라 TRIzol(Invitrogen, Waltham, MA, USA)을 사용하여 척수로부터 총 RNA를 분리하였다. 상기 추출된 RNA는 분광광도계(ASP-2680, ACTgene, USA)로 정량하였다. cDNA 제조를 위해 SuperScript III First-Strand(Invitrogen)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 역전사를 수행하였다. 상기 생성된 cDNA는 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스(ThermoFisher Scientific, USA)를 사용하여 실시간 PCR에 사용하였다. 증폭된 결과의 발현 데이터는 2-Δ ΔCt 통계 분석에 사용되었고 GAPDH 발현은 정규화에 사용되었다.

[0119] **3-2: miR142-3p 억제 실험**

[0120] DX2 발현에 대한 miR-142-3p 억제는 x1 miR-142-3p 표적 서열로부터 관찰될 수 있었다. 상기 HEK293 세포를 리포펙타민 2000(Invitrogen, US)을 사용하여 x1, x2 및 x3 반복 miR-142-3p 표적 서열 벡터 및 100 pmol miR-142-3p로 일시적으로 형질감염시킨 후, 48시간 동안 배양하였다. DX2 mRNA의 양은 PCR로 분석하였다. DX2 발현에 대한 miR142-3p 억제는 Tseq x1 반복 miR142 3p 표적 서열로부터 관찰되었다(도 4b).

[0121] **실시예 4**

[0122] **4-1: 코어 결합 서열의 억제 효과를 위해 제조된 3종의 벡터**

[0123] Tseq x1은 1개의 코어 결합 서열을 포함하고, Tseq x2는 2개의 코어 결합 서열을 포함하며, Tseq x3은 3개의 코어 결합 서열을 포함한다(도 4a).

[0124] DX2 발현에 대한 miR142-3p(100 pmol) 억제는 x1 반복 miR142-3p 표적 서열로부터 관찰되기 시작하였다. 상기 HEK293 세포를 x1, x2 및 x3 반복 miR-142-3p T seq 벡터 및 리포펙타민 2000(invitrogen, US)을 사용하여 100 pmol miR-142-3p로 일시적으로 형질감염시킨 다음, 48시간 동안 배양하였다. DX2 mRNA의 양을 PCR로 분석하였다. miR142-3p 표적 서열의 코어 결합 서열(core binding sequence)의 수가 증가하면 DX2 발현에 대한 miR142-3p 억제도 증가하였다. Tseq x3 코어 서열 포함 벡터는 상당한 억제를 보였다(도 4b).

[0125] **4-2: 코어 서열 돌연변이**

[0126] 마우스 B 세포 마이크로어레이 데이터 및 miR-142-3p 표적 유전자의 mirSVR 점수를 사용하여 코어 서열을 예측하였다. 코어 서열의 4개 영역을 하기와 같이 대체하였다: (5'-AACACTAC-3' -> 5'-CCACTGCA-3')(원래 서열에 대해서는 도 3를 참조하고 개요도에 대해서는 도 4a를 참조).

[0127] **4-3: DX2 억제에 중요한 코어 결합 서열**

[0128] 4개의 코어 서열이 치환되었다(도 4a). 상기 HEK293 세포를 DX2-miR-142-3p T seq x3 반복 벡터(Tseq3x) 또는 코어 서열 돌연변이 벡터(mut) 및 리포펙타민 2000(Invitrogen, US)을 사용한 100 pmol miR-142-3p로 일시적으

로 형질감염시킨 후 48시간 동안 배양하였다. DX2 mRNA의 발현을 PCR로 분석하였다. DX2(도 4b) 및 DX2 컨스트럭트의 현저한 억제를 나타내는 Tseq x3 반복 벡터를 대조군으로 사용하였다. 100 pmol의 miR142-3p 처리는 Tseq x3 벡터를 상당히 억제했지만 DX2 및 mut 서열은 억제하지 않았다(도 5).

[0129] **실시예 5: 습성 AMD 마우스 모델**

[0130] **재료 및 방법**

[0131] **5-1: 동물 실험**

[0132] 본 발명에서 사용한 동물은 특정 병원균이 없는 조건과 일정한 환경 조건(온도 21 - 23℃, 습도 50-60% 및 12시간 명/암 주기)의 개별 우리에 수용되었다. 각 그룹의 마우스 Ocular sinister(OS, 왼쪽 눈)는 AAV-GFP를 처리하고 Ocular Dexter(OD, 오른쪽 눈)는 AAV-DX2를 처리했다(주입: 5×10^8 vg). 1주 및 10주에 망막하 주사 후 레이저 광응고기(laser photo-coagulator)를 이용하여 눈 안저(fundus)의 RPE층에 레이저를 유도하여 각각 3주, 3개월 습성 AMD 모델을 제조하였다. 2주 및 2개월의 레이저 치료 후 마우스 안구를 분리하였다.

[0133] **5-1-1: 망막하 주사는 하기 프로토콜을 사용하여 수행하였다.**

[0134] 실험 동물은 이소플루레인(isofluorane)으로 마취시킨 후 100 mg/ml 케타민 및 10 mg/ml 자일라진(20 μ l/10 g 체중)을 복강내 주사하였다. 마우스 발 중 하나를 꼬집어 마취가 깊이 되었는지 확인하였고 깜박이면 몇 분 더 기다렸다가 망막하 주입을 시작하기 전에 다시 시도하였다. 주입될 눈이 천장을 향하도록 실험 마우스를 옆으로 눕혔다. 해부 현미경으로 눈이 소켓 밖으로 약간 튀어나오도록 피부를 부드럽게 늘리고(일시적인 안구돌출증) 귀 바로 위의 두 손가락과 턱으로 머리를 잡고 눈꺼풀과 평행하게 피부를 부드럽게 퍼서 눈이 소켓에서 약간 튀어나오도록 하면 더 쉽게 접근할 수 있다. 38G 멸균 마이크로 팁 바늘(INCYTO, KR)로 각막윤부 바로 아래에 바늘이 렌즈에 닿지 않도록 비스듬히 구멍을 뚫는다. 머리에 그림을 유지하면서 눈에서 일회용 날카로운 바늘을 후퇴시켰다. 뚫은 바늘로 미리 로드된 주사기를 마이크로 매니플레이터에 장착하거나 손으로 잡은 후 뚫은 바늘이 달린 주사기 끝을 구멍을 통해 삽입하고, 다시 한 번 렌즈를 만지지 않도록 주의하고 저항이 느껴질 때까지 눈을 통해 아주 부드럽게 밀어 넣는다. 주사기를 천천히 후퇴시키고 눈을 촉촉하게 유지하기 위해 눈 보습 방울을 도포하였고 흉와위(sternal recumbency)를 회복할 때까지 동물을 계속 모니터링하였다.

[0135] 마우스 레이저 유도 CNV 모델은 하기 프로토콜을 사용하여 제조하였다. 마우스에 레이저를 유도하기 전에 쉽게 접근할 수 있는 곳에 레이저와 슬릿 램프를 배치한다. 레이저를 켜고 미리 결정된 매개변수로 설정하고 실험 마우스를 마취하였다. 아이소플루레인 흡입을 통해 100 mg/ml 케타민 및 10 mg/ml 자일라진(20 μ l/10 g 체중)를 복강내 주사하였다. 국소 마취를 위해 마우스를 옆으로 굴리고 테트라카인 염산염 한 방울(약 30 μ l)을 각 눈에 떨어뜨리고 솔루션이 적용될 때까지 2분 동안 대기하였다. 동공 확장을 위해 국소 트로피카미드 한 방울로 이전 단계를 반복하거나 팽창을 위해 페닐에프린 염산염(2.5%)을 사용한다. 적당한 시간이 경과한 후 재빨리 마우스를 마우스 스테이지 위에 올려놓고 슬릿 램프 slit lamp)의 턱받침의 스테이지를 올려 놓고 슬릿 램프를 가장 낮은 밝기로 켜고 동공 확장 정도를 확인하였다. 동공(pupil)이 적절하게 확장되지 않은 경우(약 2.5-3mm) 마우스를 동물 온열기로 돌려놓고 기다리거나 트로피카미드 한 방울을 더 투여하고 눈이 충분히 확장되면 레이저 시술을 진행하였다.

[0136] 시신경의 시각화를 위해 이상적으로 배치되도록 마우스 스테이지에서 마우스의 배치를 조정하였다. 홀더에 마우스를 배치하여 수평으로 슬릿 램프 빔에 수직으로 놓이도록 하고 머리는 한쪽에, 꼬리는 다른 쪽에 놓았다.

[0137] 마우스를 약간 돌려 머리가 레이저 작동자에 더 가깝게 약 170° 각도가 되도록 하였다.

[0138] 마우스를 이상적으로 배치한 후 인공 눈물 용액 한 방울을 25mm x 25mm 유리 커버슬립에 놓고 마우스의 반대쪽 눈에 인공눈물 한 방울을 떨어뜨렸다. 이것은 눈에 수분을 공급하고 백내장 형성을 지연시키는 데 도움이 된다. 엄지손가락과 집게 손가락 사이에 커버슬립 모서리를 잡고 두 손가락 끝 사이에 글래스가 놓리도록 위치를 잡았다. 나머지 세 손가락으로 마우스의 몸을 부드럽게 감싸 지지하고 손을 안정시켰다. 유리 커버슬립이 마우스의 눈에 쉽게 놓일 수 있도록 손을 놓았다. 안정적인 위치를 잡으면 유리 커버슬립(인공 눈물 한 방울이 여전히 부착된 상태)을 마우스의 눈에 조심스럽게 누르고 레이저 빔 산란 또는 반사를 방지하기 위해 커버슬립이 레이저 빔에 가능한 한 수직으로 위치하는지 확인하였다. 상기 커버슬립은 콘택트렌즈 역할을 하여 각막을 평평하게 하였다. 슬릿 램프를 통해 바라보고 망막이 시각화될 수 있을 때까지 자유로운 손으로 초점을 전환하였다. 망막은 시각화된 위치에 따라 밝은 노란색/빨간색을 띠게 되며 뚜렷한 빨간색 혈관이 보이고 시신경을 시각화할 때까지 마우스 헤드 및/또는 커버슬립을 천천히 조심스럽게 조작하였다. 상기 시신경은 여러 혈관이 방출되는 노란색을

나타낸다. 작업자가 시신경의 시각화를 확인하면 레이저 포커싱 빔을 켜고 레이저 빔이 켜지면 레이저 초점 빔을 원하는 위치(시신경에서 약 1디스크 직경)로 이동하였다. 눈 안저의 RPE에 레이저 빔을 집중시키고 가장 선명하고 선명한 레이저 빔을 사용하여 적절한 초점을 맞추었다. 조준 빔이 타원형이거나 초점이 맞지 않는 경우 슬릿 램프 초점을 전환하거나 유리 커버슬립을 다시 배치하였다. 조준 빔이 RPE에 초점을 맞추면 레이저의 포토트리거를 사용하여 레이저 관리를 시작하였다. 레이저 투여 직후 기포가 나타나는지 확인하였다. 레이저 샷의 윤곽선은 명확해야 하며 어떤 식으로든 흐릿하지 않아야 한다. 원하는 모든 CNV 위치(일반적으로 시신경 주위의 3, 6, 9 및 12시 위치)에 대해 이전 3단계를 반복하였다.

[0139] 노트북에 각 레이저 주사 투여 위치 및 결과와 눈에 투여된 각 주사의 결과(성공, 흐릿함, 출혈 등)를 기록하였고 레이저를 사용하지 않을 때는 대기 모드로 두었다. 안정화를 위해 반대쪽 손과 새로운 커버슬립을 사용하여 필요한 경우 마우스의 다른 눈에 대해 이전의 모든 단계를 반복한다. 원하는 레이저 주사를 모두 마친 후 레이저와 슬릿 램프를 켜다.

[0140] 마취에서 회복하기 위해 커버슬립을 버리고 마우스를 온열기에 두었다. 육안으로 눈에 부상이 있는지 검사하고 인공 눈물 한 방울을 떨어뜨려 눈에 수분을 유지하였으며 잠재적으로 향후 백내장 발생을 예방하였다. 마우스가 마취에서 회복되면 케이지로 돌아갔다.

[0141] **5-1-3: 플루오레세인 혈관조영술**

[0142] 각막 및 수정체를 제거한 후 2시간 동안 눈을 4% 파라포름알데히드(Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA)에 고정시켰다. RPE/맥락막/공막의 후방 안구를 해부하고 유리체를 제거했다. 아이컵(Eyecups)을 (AlexaFluor 647 또는 FITC)-컨쥬게이션된 Isolectin B4(1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA)와 함께 4°C에서 밤새 배양하여 침범하는 맥락막 혈관에 라벨을 붙였다.

[0143] **5-1-4: 혈관 신생 인자의 발현**

[0144] 세포를 수집하고 1% Triton X-100을 함유하는 PBS로 용해시켰다. 동량의 단백질을 SDS-PAGE 겔의 웰에 로딩하고 100V에서 2시간 동안 니트로셀룰로오스 막 필터로 옮겼다. 실온에서 1시간 동안 1% BSA를 포함하는 PBST(phosphate buffered saline with Tween 20)로 멤브레인을 차단하고 실온에서 1시간 동안 항-VEGF 및 항-베타 액틴 항체로 탐침하였다. 멤브레인을 PBST로 3회 세척한 후, 실온에서 1시간 동안 2차 항체와 함께 인큐베이션하였다. PBST로 세 번 세척한 후 면역 반응 밴드가 감지되었다. 데이터는 Image J 소프트웨어를 사용하여 정량화되었다.

[0145] **5-2: 결과**

[0146] scAAV2-DX2 처리 마우스는 레이저 유도 맥락막 혈관신생을 약화시킨다. 레이저-유도 맥락막 혈관신생(CNV)은 습성 AMD에 대해 널리 사용되는 동물 모델이다. 상기 모델에서 레이저는 브크르막을 파괴하는 데 사용되어 밑에 있는 맥락막 혈관이 색소 상피 아래의 공간으로 침투하여 성장할 수 있게 한다. 5주령 수컷 C57BL/6 마우스(n=12)에 scAAV2-GFP(대조군) 또는 scAAV2-DX2의 망막하 주사를 수행했다(0일). 주사 21일 후, 레이저 광응고술에 의해 CNV가 생성되었다(21일). 레이저 치료 14일 후 Fluorescein angiography와 ICG angiography를 수행하였다(35일). 다음 날, 마우스를 희생시켜 맥락막 플랫폼 마운트를 생성하고 (FITC)-접합된 이소렉틴 B4로 염색하였다(도 7)(36일). 플루오레세인 혈관조영술에서 레이저 유도 광응고 부위의 신생혈관 형성으로 인한 혈관누출이 뚜렷하게 관찰되었다. ICG 혈관 조영술은 맥락막의 혈관 조영술을 획득하는 데 사용되었다. 플랫폼 마운트를 사용하여 명확하게 구분된 이소렉틴(isolectin) 양성 CNV의 존재 및 영역을 평가했다. DX2 주사는 플루오레세인 혈관 조영술에서 GFP 주사 대조군에 비해 감소된 혈관 누출을 보였다(도 7). 유사하게, DX2 주입된 마우스는 ICG 혈관조영술에서 GFP 주입된 마우스와 비교하여 감소된 CNV 영역을 나타내었다(도 7). 또한, 이소렉틴-B4로 염색된 맥락막 플랫폼 마운트는 DX2 주사된 마우스에서 CNV 형성 영역의 현저한 감소를 입증한다(도 7).

[0147] CNV 면적에 대한 누출면적의 비율은 FA(Fluorescein angiography)를 사용하여 총 과형광 면적을 측정하고 ICGA를 사용하여 CNV 면적을 측정하여 추정하였다(도 8). 아이소렉틴 B4 염색을 사용한 부크르막의 평균 CNV 영역도 GFP 대조군(n = 12)과 비교하여 DX2 주입 마우스에서 상당히 작았다(도 8). 상기 결과는 DX2가 CNV 마우스 모델에서 예방 효과가 있었음을 나타낸다.

[0148] 염증 세포는, 특히(대식세포) 부크르막 파괴, RPE 위축 및 CNV 영역을 포함하는 AMD 병변 근처/내에서 조직학적으로 입증되었다. CNV 병변의 대식세포(Macrophages)는 VEGF와 같은 전혈관형성인자(proangiogenic factor)와 TNF와 같은 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)을 분비하는 것으로 나타났다. 도 8에서 DX2 주입된

마우스의 염증 세포의 수는 GFP 대조군 CNV 세포에 비해 현저히 적었다.

[0149] 과도한 양의 혈관내피성장인자(VEGF)는 황반 아래 비정상적인 혈관의 성장 및 누출을 촉발하여 돌이킬 수 없는 중심 시력 상실을 초래한다. 이러한 맥락에서, 습성 AMD의 치료를 위해 VEGF를 표적으로 하는 항-혈관신생 치료법의 개발을 위해 많은 노력이 이루어졌다. 이러한 약물은 AMD의 진행을 늦추고 경우에 따라 혈관신생을 억제하여 시력을 향상시키는 것으로 나타났다. 본 발명자들은 레이저-유도 맥락막 혈관신생 마우스에 미리 DX2를 처리하고 VEGF 발현(n = 6)에서 GFP 처리 마우스와 비교했다(도 9). 흥미롭게도, DX2 처리된 마우스는 GFP 처리된 마우스에 비해 더 적은 발현을 보였다. 상기 데이터는 또한 CNV 모델 마우스에 대한 DX2의 예방 효과를 보여주었다.

[0150] **실시예 6. 건성 AMD 마우스 모델**

[0151] **재료 및 방법**

[0152] **6-1: 동물 실험**

[0153] 건성-AMD 마우스 모델 실험을 위해, Mdm1-/- (CRISPR/Cas9 KO) 마우스는 건성-AMD 및 유전성 망막 변성 모두에 대해 진행성 광수용체 및 RPE 변성을 나타낸다. 실험 동물은 특정 병원균이 없는 조건과 일정한 환경 조건(온도 21°C - 23°C, 습도 50-60% 및 12시간 명/암 주기)에서 개별 우리에 수용되었다. 3주령에 망막하 공간에 AAV2-DX2 및 음성 대조군(AAV2-GFP) 주사하였고 망막의 조직학적 측정 및 기능적 회복은 3월령에 시행하였다.

[0154] **6-2: 건성 AMD 및 망막 변성에 대한 DX2의 치료 효과**

[0155] 3주령 Mdm1 -/- 마우스는 38G 멸균 마이크로-팁 바늘(INCYTO, KR)을 사용하여 4µl 부피의 AAV2-DX2/AAV2-GFP로 망막 상체를 최소화하기 위해 경공막 주사에 의해 망막하 공간에 주사되었다. AAV2-GFP/DX2는 동일한 동물에 주사되었다. AAV2-GFP는 OS(왼쪽)에 주입되었다. AAV2-DX2는 OD(오른쪽)에 주입되었다.

[0156] **6-2-3: 전기생리학적 기능 평가**

[0157] 3주령 마우스를 사용하였다. 최종 측정을 위해, WT(n=11), mdm1-/- (n=6), mdm1-/- (AAV2+GFP)(n=6) 및 mdm1-/- (AAV2+DX2)(n=7) 를 평가하였다.

[0158] 광수용체 기능 평가를 위한 망막전위도는 OcuScience® HMsERG를 사용하였다. 마우스는 아베르틴(1%)으로 마취를 유도하고 3% 아이소플루레인 흡입으로 마취를 유지하고 생리학적 상태를 유지하기 위해 가열 패드를 씌웠다. 각막과의 접촉을 유지하고 축축하게 유지하기 위해 2% 하이프로멜로오스 용액 한 방울을 Silver-embedded Thread Electrode이 있는 설치류 콘택트 렌즈에 떨어뜨렸다. 어둠과 눈의 균일한 조명을 위해 마우스를 직경 76mm의 Ganzfeld dome 아래에 두었다. 측정은 ISCEV-Extended full-field ERG 표준 프로토콜에 따라 수행되었다. 상기 데이터는 ERGVIEW를 사용하여 분석하였으며, 플래시 강도 3000mcd.s/m², 0.10Hz로 분석하기 위해 결합된 표준 Rod&Cone 응답 값을 선택하였다. 광수용체 세포 기능에 대해 A-과 분석을 수행하였다. 양극성 및 수평 세포 기능에 대해 B-과 분석을 수행했다. a-과 및 b-과에 대한 진폭 및 대기 시간 값을 분석했다.

[0159] **6-2-4: 조직학적 측정**

[0160] ERG 후 모든 마우스를 안락사시키고 안구를 채취하였다. 상기 안구는 4°C에서 밤새 4% PFA로 고정되었다. 그 후 안구는 30% 수크로스에서 탈수되었고 조직 동결 절편을 위해 OCT 화합물로 포매되었다. 모든 망막 저온 절편 샘플은 10 µm 두께의 시신경 포함 절편에서 획득했다. 망막 동결절편을 분석하였다. H&E는 층 두께 분석에 사용되었다. 층 두께 분석은 Leica LAS 프로그램으로 수행되었다. 면역형광법(Immunofluorescence)은 RPE65 및 Opsin 발현, 증식 평가(Ki67)에 사용되었다. ROI 세트 및 중첩 계수 측정은 Image J로 측정되었다.

[0161] **6-2-5: 통계 분석**

[0162] Student's t-test가 1차 분석에 사용되었다. P-값은 mdm1-/- (AAV2+DX2)와 비교되었다. 회복 평가를 위해 P 값을 WT와 비교했다. 전체 데이터를 위해 IBM SPSS 통계 23을 사용하여 Levene's Homogeneity of Variance 테스트, ANOVA 테스트 및 post-hoc (Dunnett (T3), Tukey HSD) 평가를 수행했다.

[0163] **6-2-6: 결과**

[0164] 도 10은 망막의 단면 조직학(H&E 염색)을 나타낸다. 도 11a-11e는 조직학적 망막 두께의 조직학적 측정치를 보여준다. 도 11a는 망막 두께를 나타낸다. 도 11b는 RPE(망막 색소 상피) 두께를 나타낸다. 도 11c는 ONL(광수용체의 외부 핵층) 두께를 나타낸다. 도 11d는 외부 세그먼트 두께를 나타낸다. 도 11e는 OPL 외부 망상층(Outer

Plexiform Layer) 두께를 나타낸다. 모든 샘플은 10 μm 두께의 시신경 포함 섹션에서 획득했다. 망막에서 DX2 유전자의 형질감염은 전체 신경 망막 두께의 회복을 가져왔다(도 11a).DX2의 형질감염은 더 두꺼운 RPE 층(도 11b) 및 광수용체 외부 세그먼트 층(도 11c)을 나타내었고, 이는 DX2 발현이 RPE 변성과 광수용체 섬모 분해를 억제함을 암시한다. DX2의 형질감염은 또한 더 두꺼운 광수용체의 외부 핵층(도 11d) 및 외부 망상층(도 11e)을 나타내었고, 이는 DX2 발현이 광수용체 변성을 감소시킨다는 것을 나타낸다.

- [0165] 도 12는 RPE(망막 색소 상피)의 무결성 및 증식을 보여준다. DX2 유전자의 형질감염은 RPE의 증식을 활성화시켜 RPE 무결성을 회복시켰다
- [0166] 도 13은 PR(광수용체) 회복을 나타낸다. DX2 유전자의 형질감염은 PR의 증식을 활성화시켜 PR 집단을 회복시키는 결과를 낳았다.
- [0167] 도 14a 내지 14b는 RPE 및 PR의 세포 증식을 보여준다. RPE 및 광수용체 층에서의 증식을 분석하기 위해 Ki67 발현을 측정하였다.
- [0168] RPE(도 14a) 및 광수용체 외부 세그먼트 층(도 14b)에서의 증식은 AAV2-DX2 형질감염된 샘플에서 현저히 더 높게 나타났다.
- [0169] 도 15A 내지 15D는 망막의 기능적 회복을 보여준다. AAV2-DX2 형질감염은 건성-AMD 모델(mdm1-/-) 또는 음성 대조군(mdm1-/- + AAV-GFP)에 비해 증가된 a-파 진폭(도 15a) 및 감소된 잠복기(도 15b)를 나타내었다. 이는 DX2 발현이 광수용체의 전기생리학적 기능 및 시력의 손상을 감소시킨다는 것을 나타낸다. AAV2-DX2 형질감염된 샘플은 b-파 진폭의 변화를 나타내지 않았지만(도 15c) 건성 AMD 모델(mdm1-/-)과 비교하여 잠복기를 감소시켰다(도 15d), 이는 DX2가 RPE와 광수용체에만 영향을 미치고 양극성 세포(후광수용체 뉴런)에는 영향을 미치지 않음을 시사한다.
- [0170] AAV2-DX2 형질감염된 샘플의 망막전위도는 정상 ERG 그래프 형식의 회복 증가를 보여주었다(도 15a 및 15b). AAV2-DX2 형질감염된 샘플은 건성 AMD 모델(mdm1-/-)보다 약간 증가된 a-파 진폭(도 15c) 및 감소된 잠복기(도 15d)를 나타냈으며, 이는 DX2 발현이 광수용체의 전기생리학적 기능의 손상을 감소시켰다는 것을 나타낸다. AAV2-DX2 형질감염된 샘플은 b-파 진폭을 변화시키지 않았지만(도 15e) 건성 AMD 모델(mdm1-/-)보다 잠복기를 감소시켰다(도 15f).

[0171] **참조 문헌**

- [0172] KR 10-1067816 (2011).
- [0173] 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.
- [0174] Hernandez-Zimbron, Luis Fernando, et al. "Age-related macular degeneration: new paradigms for treatment and management of AMD." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2018 (2018).
- [0175] 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.
- [0176] Brown et al., Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer, *Nature Med.* 12:585-591 (2006).
- [0177] 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).
- [0178] 특정 실시예에 대한 전술한 설명은 다른 사람들이 본 발명의 일반적인 개념을 벗어나지 않고 당업자가 당업자의 지식을 적용함으로써 다양한 응용에 대해 쉽게 수정 및/또는 적용할 수 있도록 본 발명의 일반적인 특성을 충분히 드러낼 것이다. 따라서, 그러한 적용 및 수정은 여기에 제시된 교시 및 지침에 기초하여 개시된 해당 실시예의 등가물의 의미 및 범위 내에 있는 것으로 의도된다.
- [0179] 본 명세서의 구문 또는 용어는 설명을 위한 것이고 제한이 아닌 것으로 이해되어야 하며, 따라서 본 명세서의 구문 또는 용어는 교시 및 지침에 비추어 숙련된 기술자에 의해 해석되어야 한다.
- [0180] 본 발명의 폭과 범위는 전술한 예시적인 실시예에 의해 제한되어서는 안 되며, 다음 청구범위 및 그 등가물에

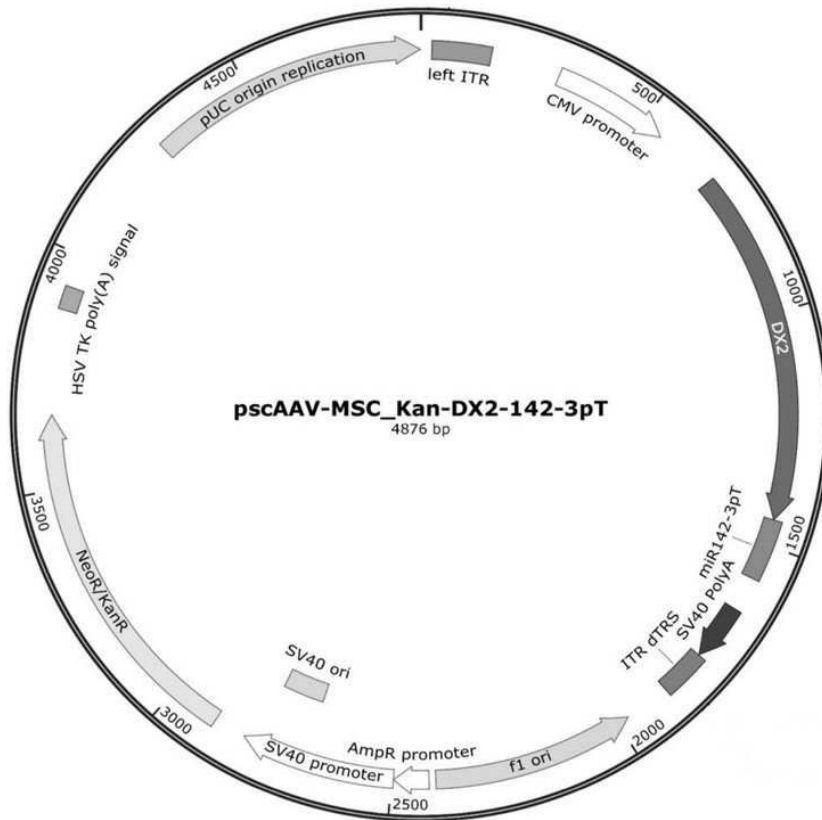
따라서만 정의되어야 한다.

[0181] 본 명세서에 기술된 모든 다양한 양태, 실시예 및 옵션은 임의의 모든 변형으로 조합될 수 있다.

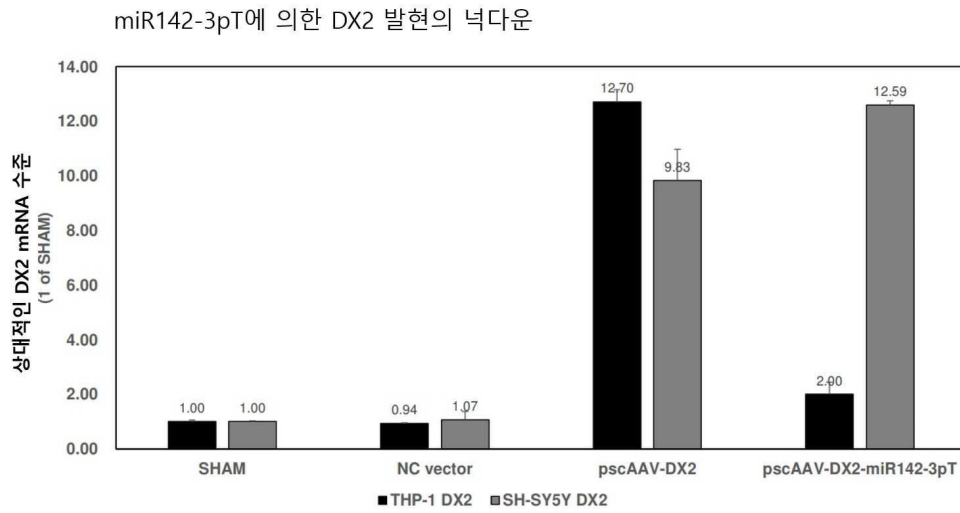
[0182] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 참고로 포함되는 것으로 표시된 것과 동등하게 본 명세서에 참조로 포함된다.

도면

도면1



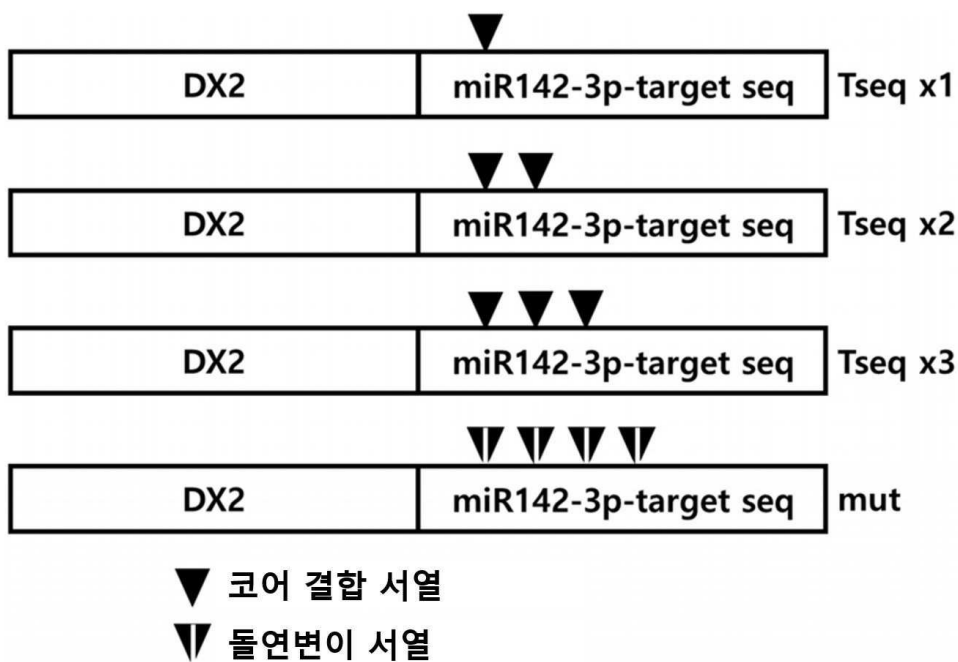
도면2



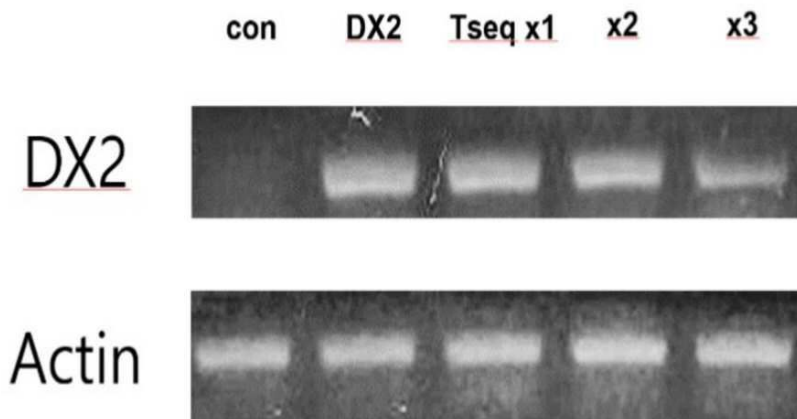
도면3

ccagaagcttgctagctccataaagtaggaaacactacatcactccataaagtaggaaacacta
 cagatatctccataaagtaggaaacactacatcactccataaagtaggaaacactacaaagctt
 gtag

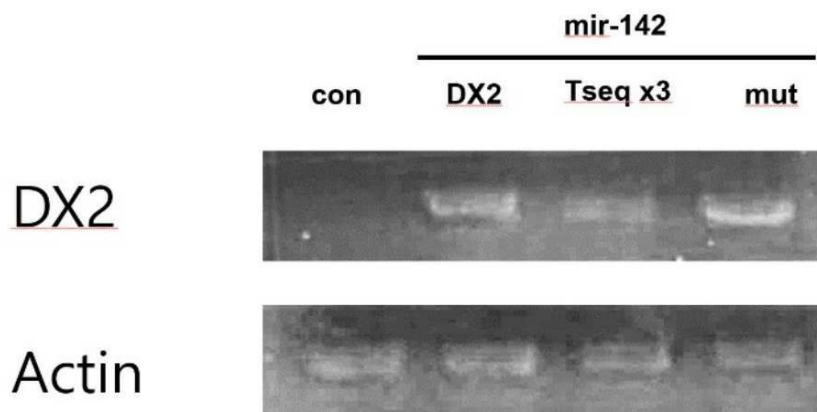
도면4a



도면4b



도면5



도면6a

1	SEQ ID NO:12 AAH13630.1 protein seq (320a.a)	1	MPWYVYKPYHGGGAPLRVELPTCMYRLPNVHGRSYGFPAGAGHYOEEENLSLDALESRODDILKRLVELKAAVDGLSKMI	80
2	SEQ ID NO:10 exon2	1	-----EESNLSLDALESRODDILKRLVELKAAVDGLSKMI	35
3	SEQ ID NO:2 NP_001313536.1(DX2)	1	MPWYVYKPYHGGGAPLRVELPTCMYRLPNVHGRSYGFPAGAGHY-----	44
4	SEQ ID NO:13 AAC50391.1_Protein_(312a.a)	1	MPWYVYKPYHGGGAPLRVELPTCMYRLPNVHGRSYGFPAGAGHY-----	44
5	SEQ ID NO:14 XM_005249847.3-(isoform X1)	1	MOME-----	4
6	SEQ ID NO:15 NM_001362787.2_(isoform f)	1	M-----	4
7	SEQ ID NO:16 NM_001362785.2	1	MNSP-----	4
8	SEQ ID NO:17 NM_001326606.2_(isoform e)	1	MPWY-----	4
9	SEQ ID NO:18 NM_006303.4	1	MPWYVYKPYHGGGAPLRVELPTCMYRLPNVHGRSYGFPAGAGHY-----	44
10	SEQ ID NO:19 NM_001326609.2	1	-----	-----
11	SEQ ID NO:19 NM_001326610.2	1	-----	-----
12	SEQ ID NO:19 NM_001326611.3	1	-----	-----
13	SEQ ID NO:20 Consensus Sequence	1	-----	-----
1	SEQ ID NO:12 AAH13630.1 protein seq (320a.a)	81	QTPDAQLDYVNI I0ADEPTTLTINALDLSYLK	127
2	SEQ ID NO:10 exon2	36	QTPDAQLDYVNI I0ADEPTTLTINALDLSYLK	69
3	SEQ ID NO:2 NP_001313536.1(DX2)	45	-----0-----	58
4	SEQ ID NO:13 AAC50391.1_Protein_(312a.a)	45	-----0-----	58
5	SEQ ID NO:14 XM_005249847.3-(isoform X1)	5	-----GTAHYKIGS0SG66GLGTPRTVLEHRR0TKLGEDYKALDVIYINAN	51
6	SEQ ID NO:15 NM_001362787.2_(isoform f)	2	-----	14
7	SEQ ID NO:16 NM_001362785.2	5	-----AVNTL I0RSRHG-----	29
8	SEQ ID NO:17 NM_001326606.2_(isoform e)	5	-----0-----	18
9	SEQ ID NO:18 NM_006303.4	45	-----0-----	58
10	SEQ ID NO:19 NM_001326609.2	1	-----	13
11	SEQ ID NO:19 NM_001326610.2	1	-----	13
12	SEQ ID NO:19 NM_001326611.3	1	-----	13
13	SEQ ID NO:20 Consensus Sequence	1	-----	13

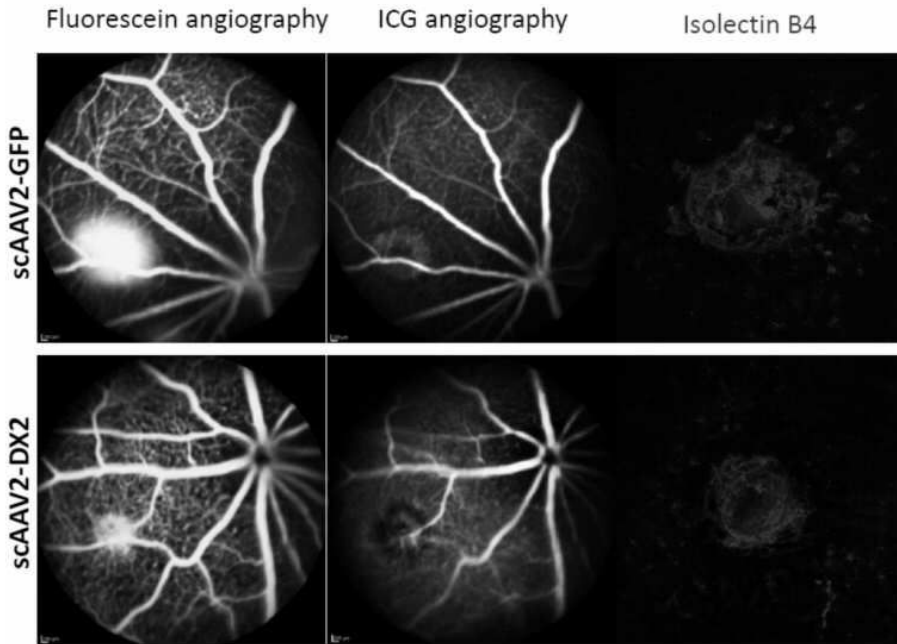
도면6b

1	SEQ ID NO.12 AAH13630.1 protein seq (320a.a)	128	PSPPPLSLVLRLLLCEHFRVLSYTHSSWSKYPENLLKCFBEONKOPRODYOLGFTLIRKNWPKTOMKFSIOTMCP	207
2	SEQ ID NO.10 exon2		-----	
3	SEQ ID NO.2 NP_001313536.1(DX2)	59	PASPPLSLLVLRLLLCEHFRVLSYTHSSWSKYPENLLKCFBEONKOPRODYOLGFTLIRKNWPKTOMKFSIOTMCP	138
4	SEQ ID NO.13 AAC50391.1_Protein_(312a.a)	59	PASPPLSLLVLRLLLCEHFRVLSYTHSSWSKYPENLLKCFBEONKOPRODYOLGFTLIRKNWPKTOMKFSIOTMCP	138
5	SEQ ID NO.14 XM_005249847.3-(isoform X1)	52	PASPPLSLLVLRLLLCEHFRVLSYTHSSWSKYPENLLKCFBEONKOPRODYOLGFTLIRKNWPKTOMKFSIOTMCP	131
6	SEQ ID NO.15 NM_001362787.2_(isoform f)	15	PASPPLSLLVLRLLLCEHFRVLSYTHSSWSKYPENLLKCFBEONKOPRODYOLGFTLIRKNWPKTOMKFSIOTMCP	94
7	SEQ ID NO.16 NM_001362785.2	30	PASPPLSLLVLRLLLCEHFRVLSYTHSSWSKYPENLLKCFBEONKOPRODYOLGFTLIRKNWPKTOMKFSIOTMCP	109
8	SEQ ID NO.17 NM_001326606.2_(isoform e)	19	PASPPLSLLVLRLLLCEHFRVLSYTHSSWSKYPENLLKCFBEONKOPRODYOLGFTLIRKNWPKTOMKFSIOTMCP	98
9	SEQ ID NO.18 NM_006303.4	59	PASPPLSLLVLRLLLCEHFRVLSYTHSSWSKYPENLLKCFBEONKOPRODYOLGFTLIRKNWPKTOMKFSIOTMCP	138
10	SEQ ID NO.19 NM_001326609.2	14	PASPPLSLLVLRLLLCEHFRVLSYTHSSWSKYPENLLKCFBEONKOPRODYOLGFTLIRKNWPKTOMKFSIOTMCP	93
11	SEQ ID NO.19 NM_001326610.2	14	PASPPLSLLVLRLLLCEHFRVLSYTHSSWSKYPENLLKCFBEONKOPRODYOLGFTLIRKNWPKTOMKFSIOTMCP	93
12	SEQ ID NO.19 NM_001326611.3	14	PASPPLSLLVLRLLLCEHFRVLSYTHSSWSKYPENLLKCFBEONKOPRODYOLGFTLIRKNWPKTOMKFSIOTMCP	93
13	SEQ ID NO.20 Consensus Sequence	14	PASPPLSLLVLRLLLCEHFRVLSYTHSSWSKYPENLLKCFBEONKOPRODYOLGFTLIRKNWPKTOMKFSIOTMCP	93
1	SEQ ID NO.12 AAH13630.1 protein seq (320a.a)	208	EEGNIARFLSFLF60KHAYNATLDSWYDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPILAGNELTYADVYLRSYLOO	287
2	SEQ ID NO.10 exon2		-----	
3	SEQ ID NO.2 NP_001313536.1(DX2)	139	EEGNIARFLSFLF60KHAYNATLDSWYDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPILAGNELTYADVYLRSYLOO	218
4	SEQ ID NO.13 AAC50391.1_Protein_(312a.a)	139	EEGNIARFLSFLF60KHAYNATLDSWYDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPILAGNELTYADVYLRSYLOO	218
5	SEQ ID NO.14 XM_005249847.3-(isoform X1)	132	EEGNIARFLSFLF60KHAYNATLDSWYDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPILAGNELTYADVYLRSYLOO	211
6	SEQ ID NO.15 NM_001362787.2_(isoform f)	95	EEGNIARFLSFLF60KHAYNATLDSWYDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPILAGNELTYADVYLRSYLOO	174
7	SEQ ID NO.16 NM_001362785.2	110	EEGNIARFLSFLF60KHAYNATLDSWYDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPILAGNELTYADVYLRSYLOO	189
8	SEQ ID NO.17 NM_001326606.2_(isoform e)	89	EEGNIARFLSFLF60KHAYNATLDSWYDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPILAGNELTYADVYLRSYLOO	178
9	SEQ ID NO.18 NM_006303.4	139	EEGNIARFLSFLF60KHAYNATLDSWYDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPILAGNELTYADVYLRSYLOO	218
10	SEQ ID NO.19 NM_001326609.2	94	EEGNIARFLSFLF60KHAYNATLDSWYDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPILAGNELTYADVYLRSYLOO	173
11	SEQ ID NO.19 NM_001326610.2	94	EEGNIARFLSFLF60KHAYNATLDSWYDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPILAGNELTYADVYLRSYLOO	173
12	SEQ ID NO.19 NM_001326611.3	94	EEGNIARFLSFLF60KHAYNATLDSWYDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPILAGNELTYADVYLRSYLOO	173
13	SEQ ID NO.20 Consensus Sequence	94	EEGNIARFLSFLF60KHAYNATLDSWYDIAIFOLKEGSSKEKAAYFRSMNSALGKSPILAGNELTYADVYLRSYLOO	173

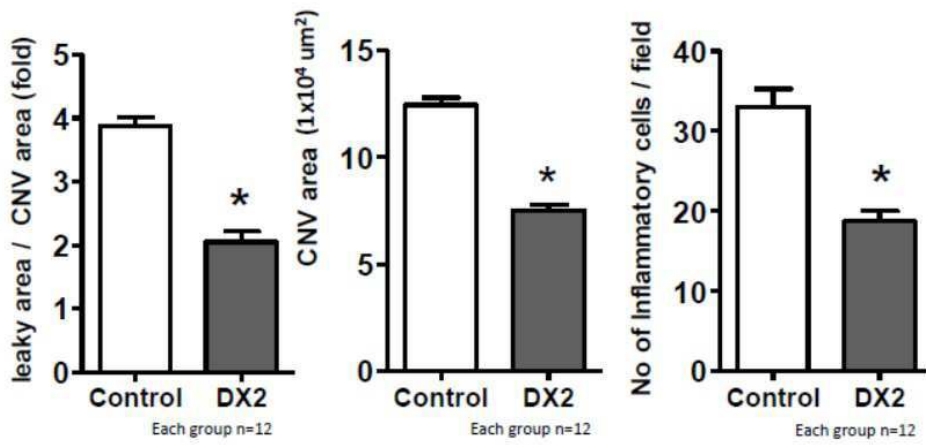
도면6c

1	SEQ ID NO:12 AAH13630.1 protein seq (320a.a)	288	IGGCSYTPANVORWRRSCENLAPFNTALKLLK	320
2	SEQ ID NO:10 exon2		-----	
3	SEQ ID NO:2 NP_001313536.1(DX2)	219	IGGCSYTPANVORWRRSCENLAPFNTALKLLK	251
4	SEQ ID NO:13 AAC50391.1_Protein_(312a.a)	219	IGGCSYTPANVORWRRSCENLAPF-----	243
5	SEQ ID NO:14 XM_005249847.3-(isoform X1)	212	IGGCSYTPANVORWRRSCENLAPFNTALKLLK	244
6	SEQ ID NO:15 NM_001362787.2_(isoform f)	175	IGGCSYTPANVORWRRSCENLAPFNTALKLLK	207
7	SEQ ID NO:16 NM_001362785.2	190	IGGCSYTPANVORWRRSCENLAPFNTALKLLK	222
8	SEQ ID NO:17 NM_001326606.2_(isoform e)	179	IGGCSYTPANVORWRRSCENLAPFNTALKLLK	211
9	SEQ ID NO:18 NM_006303.4	219	IGGCSYTPANVORWRRSCENLAPFNTALKLLK	251
10	SEQ ID NO:19 NM_001326609.2	174	IGGCSYTPANVORWRRSCENLAPFNTALKLLK	206
11	SEQ ID NO:19 NM_001326610.2	174	IGGCSYTPANVORWRRSCENLAPFNTALKLLK	206
12	SEQ ID NO:19 NM_001326611.3	174	IGGCSYTPANVORWRRSCENLAPFNTALKLLK	206
13	SEQ ID NO:20 Consensus Sequence	174	IGGCSYTPANVORWRRSCENLAPF-----	198

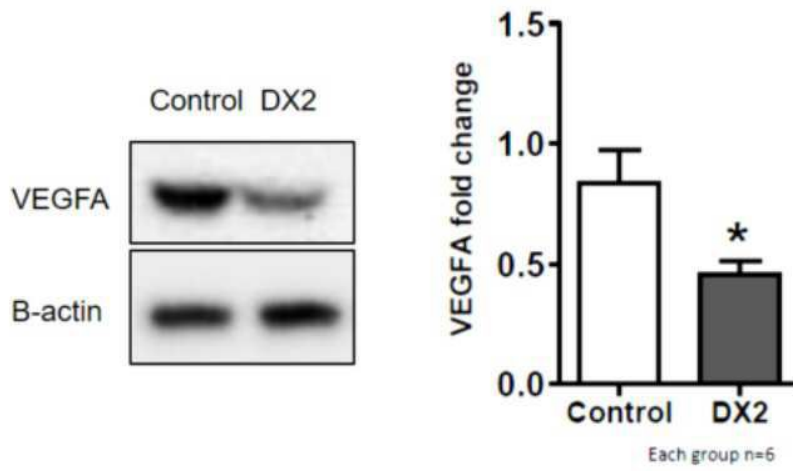
도면7



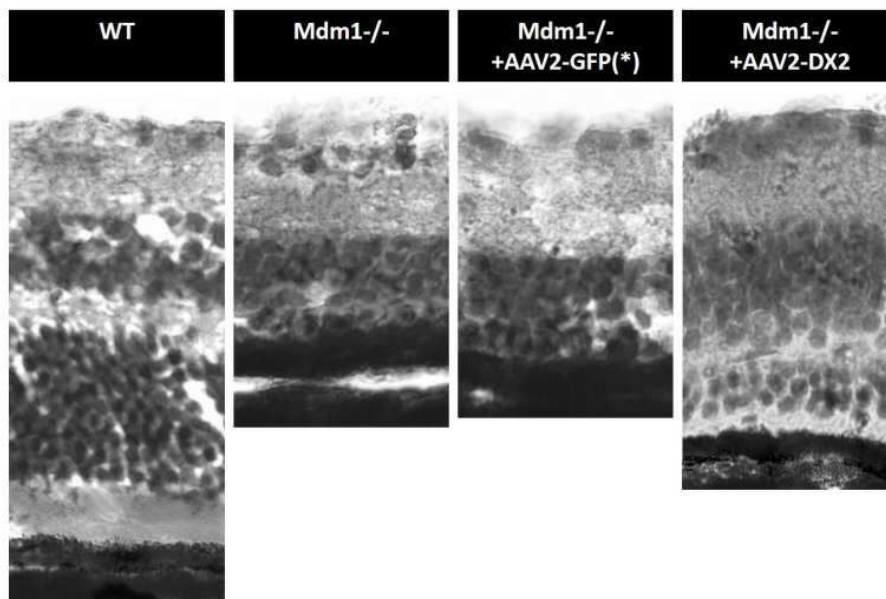
도면8



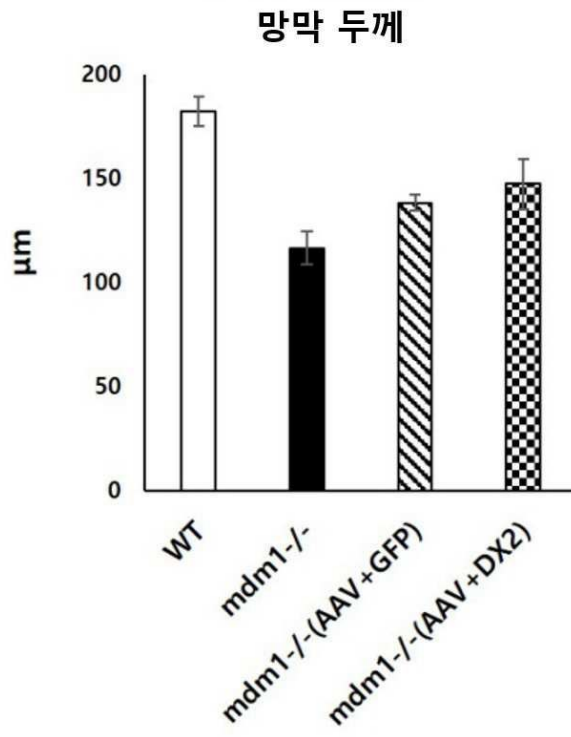
도면9



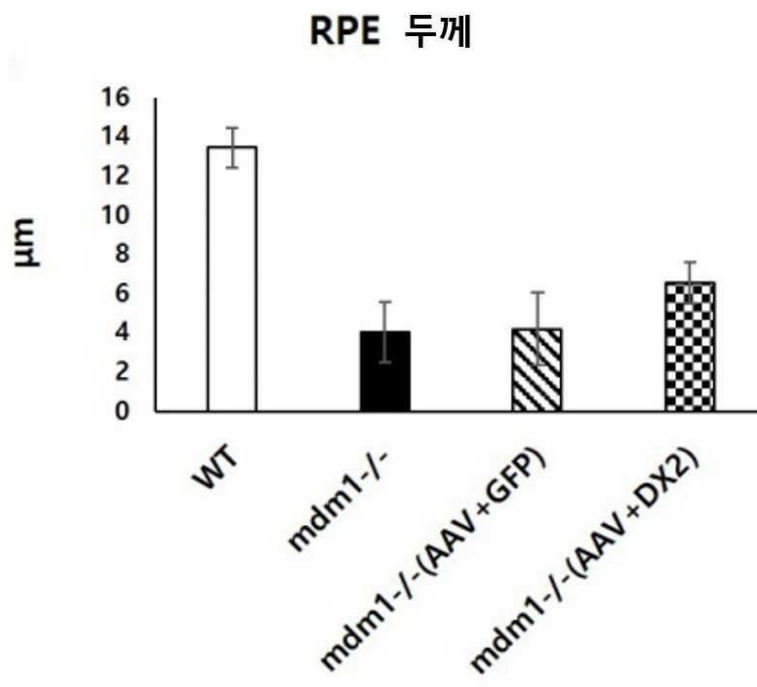
도면10



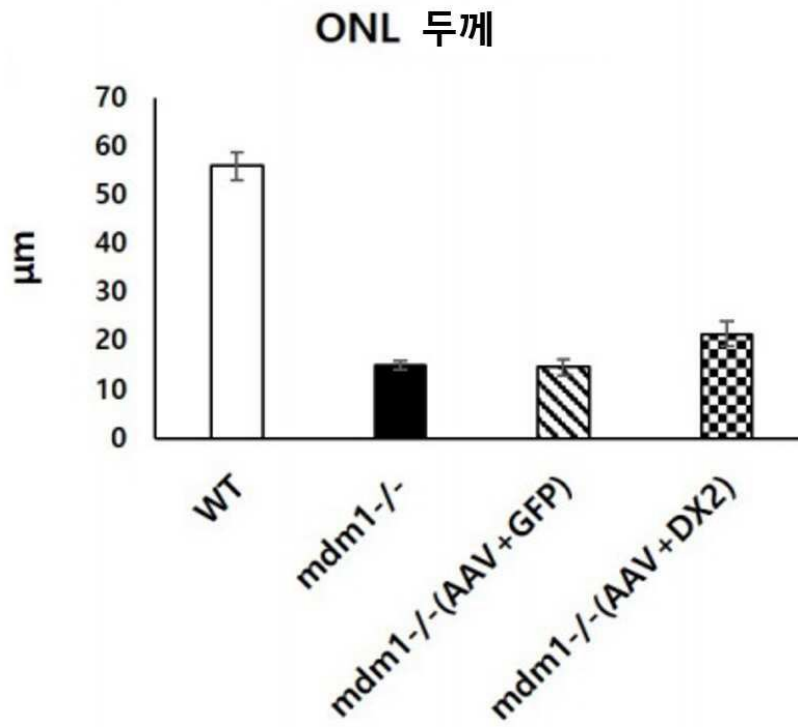
도면11a



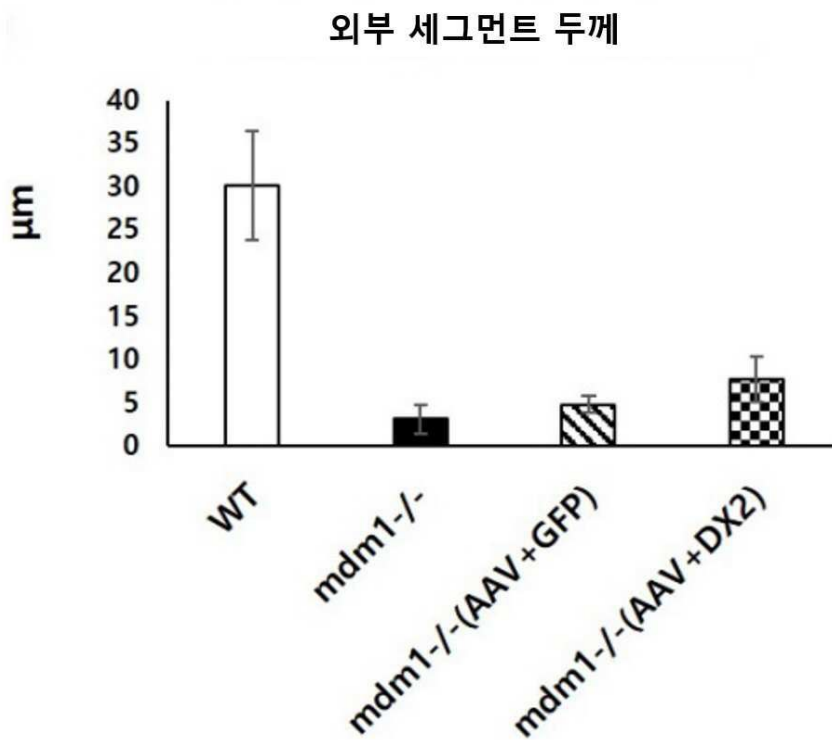
도면11b



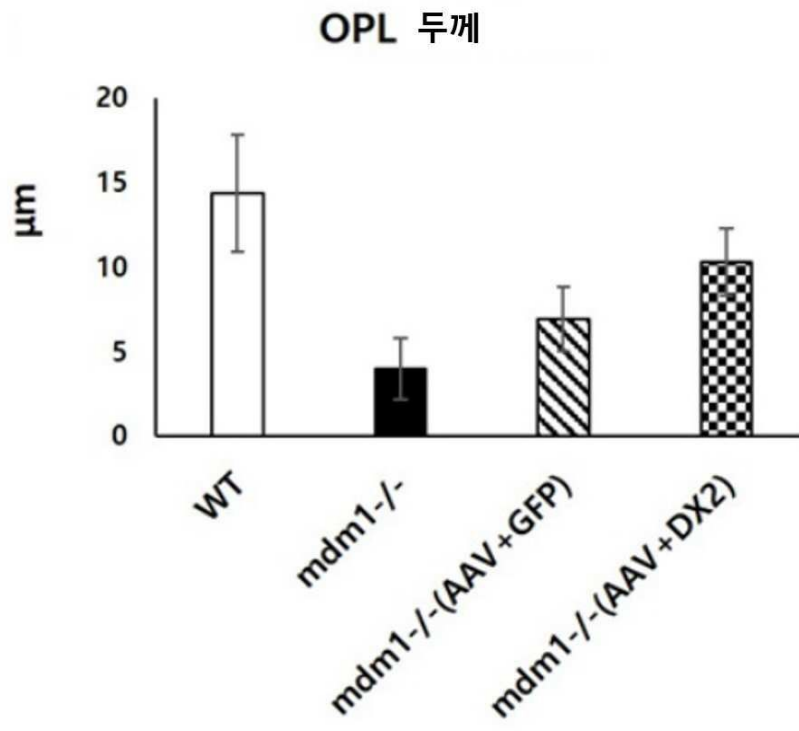
도면11c



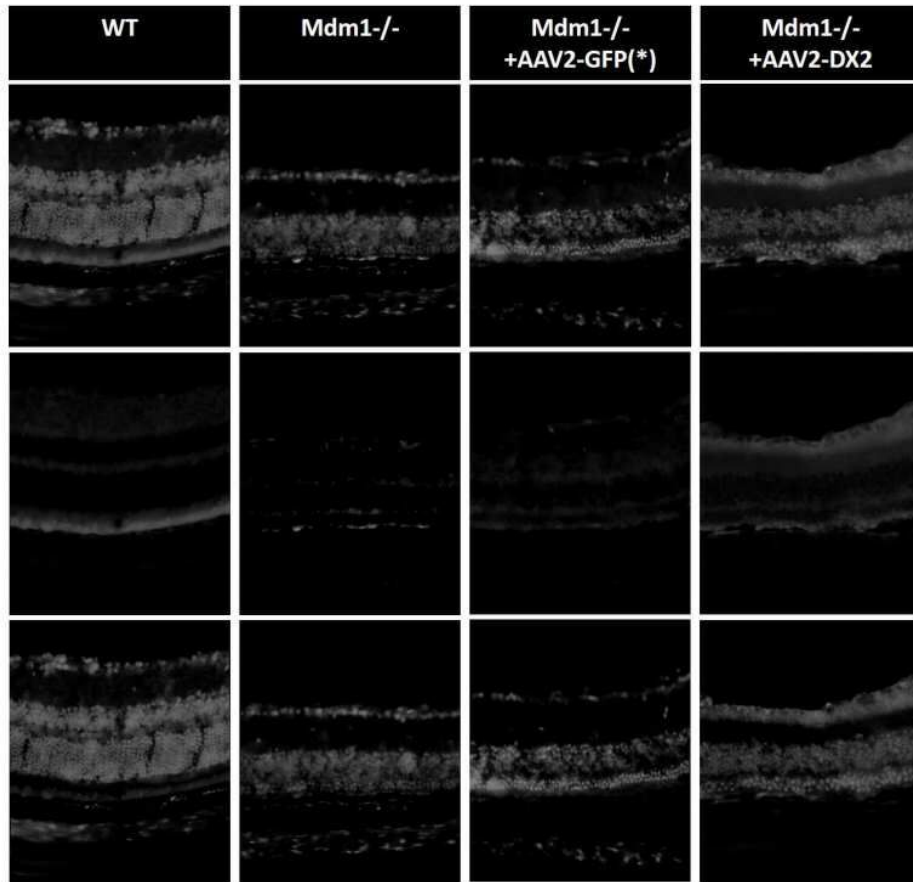
도면11d



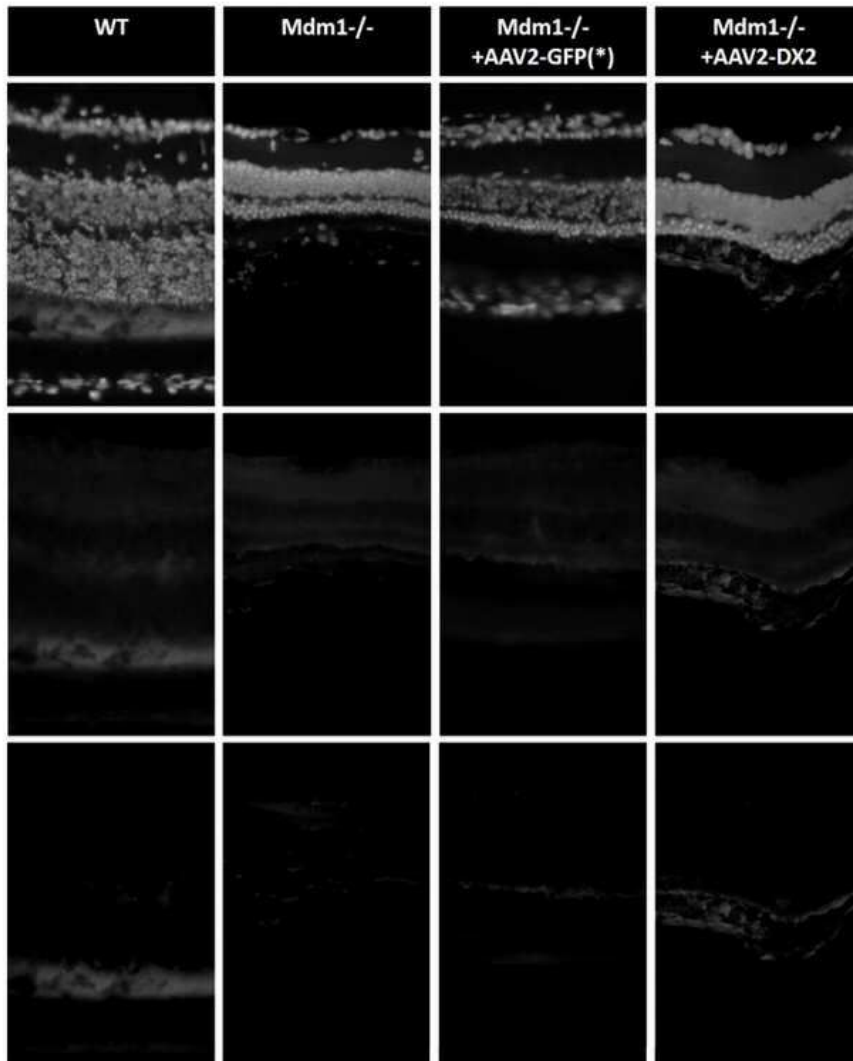
도면11e



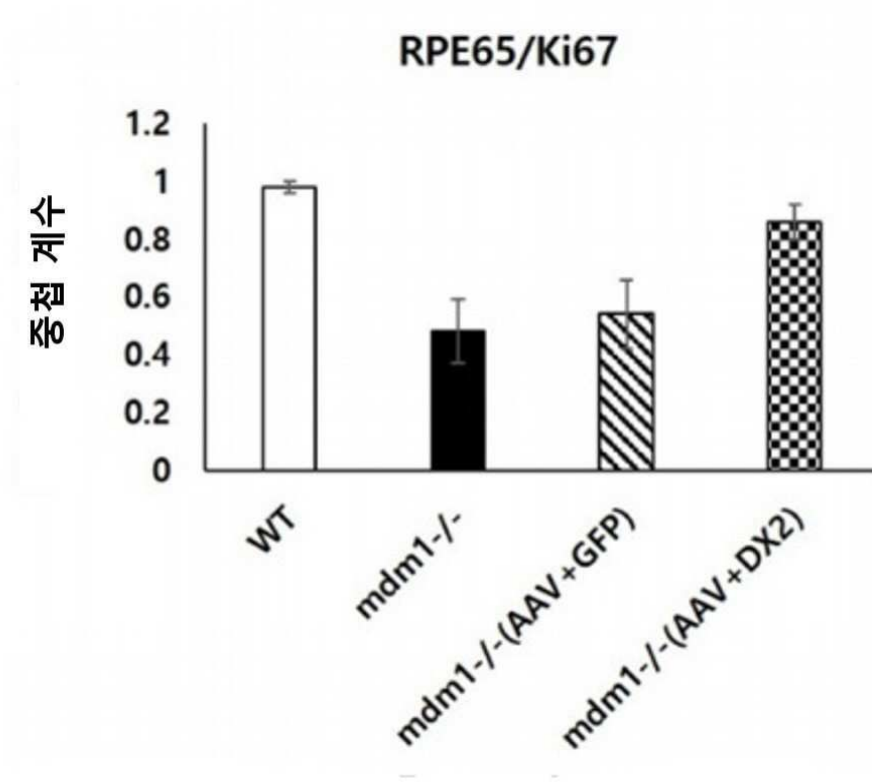
도면12



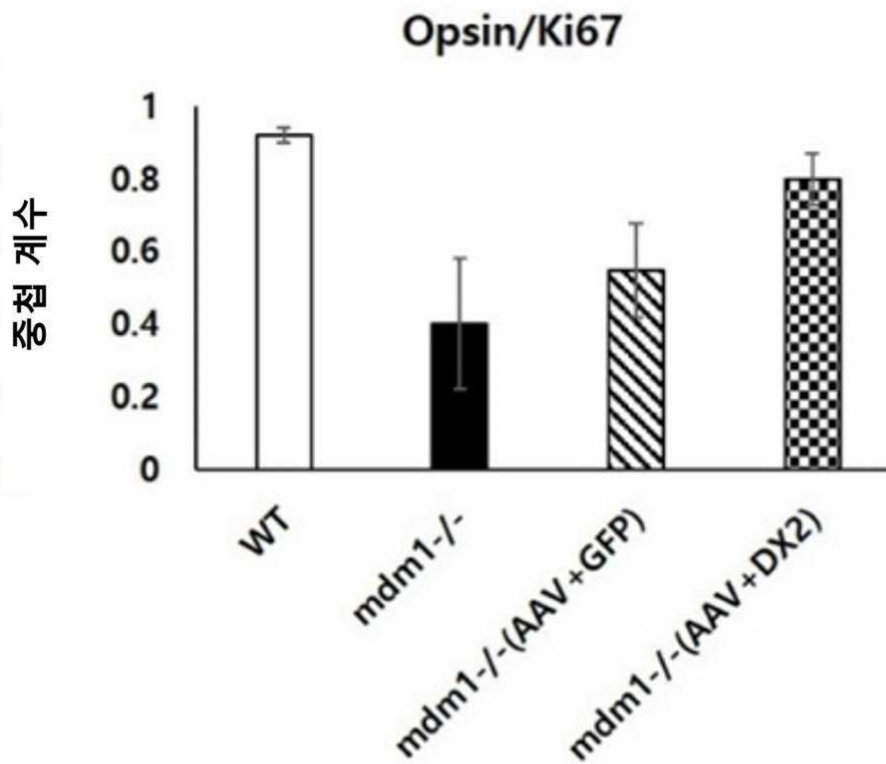
도면13



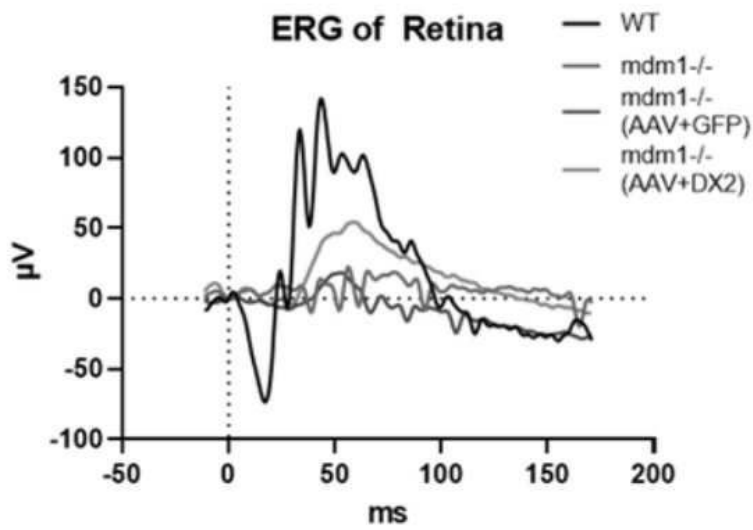
도면14a



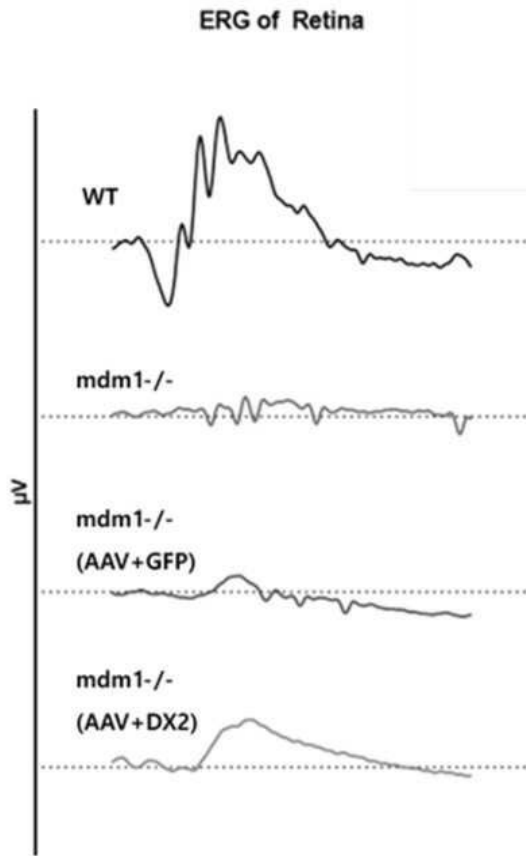
도면14b



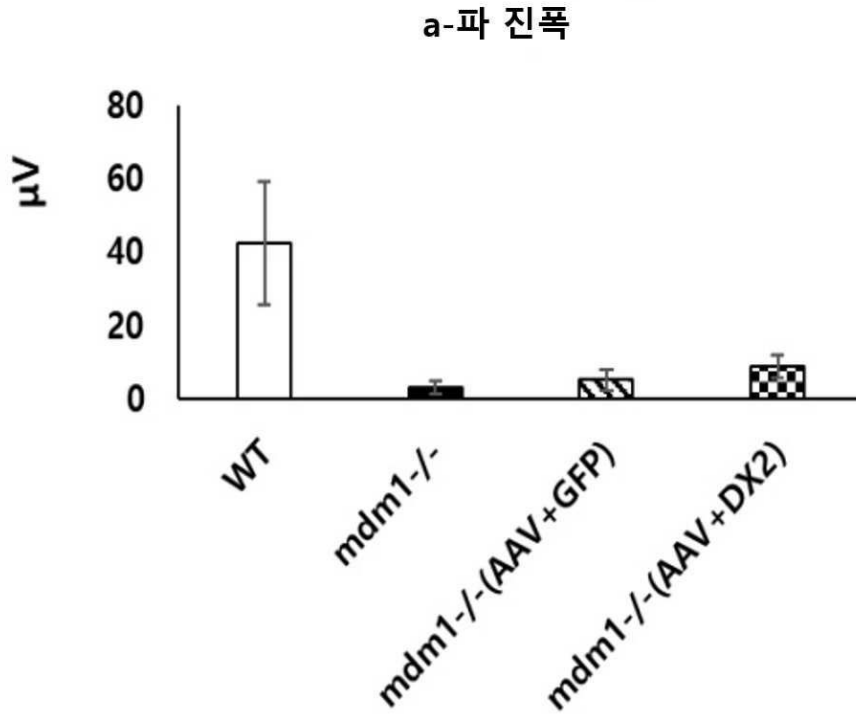
도면15a



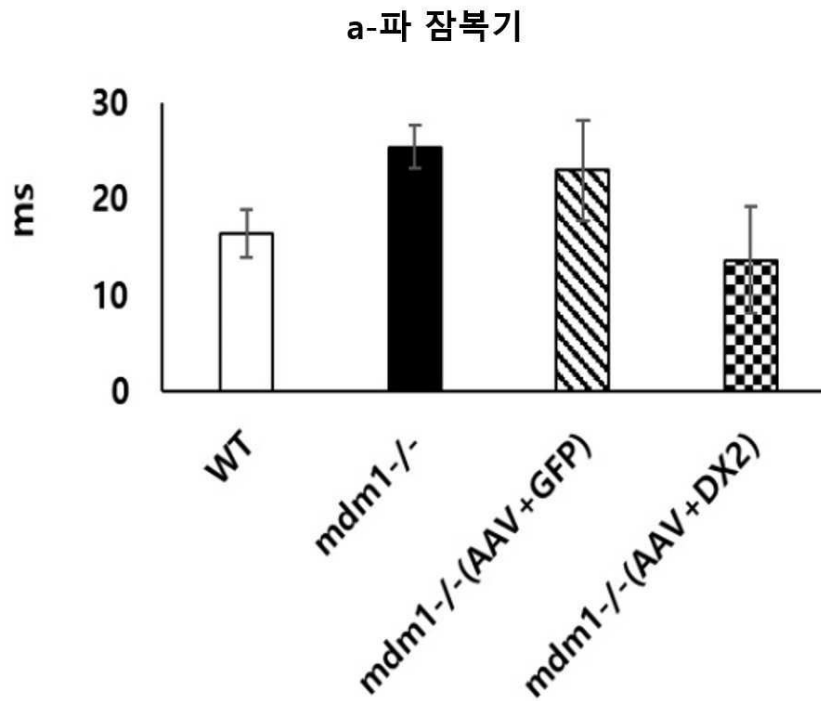
도면15b



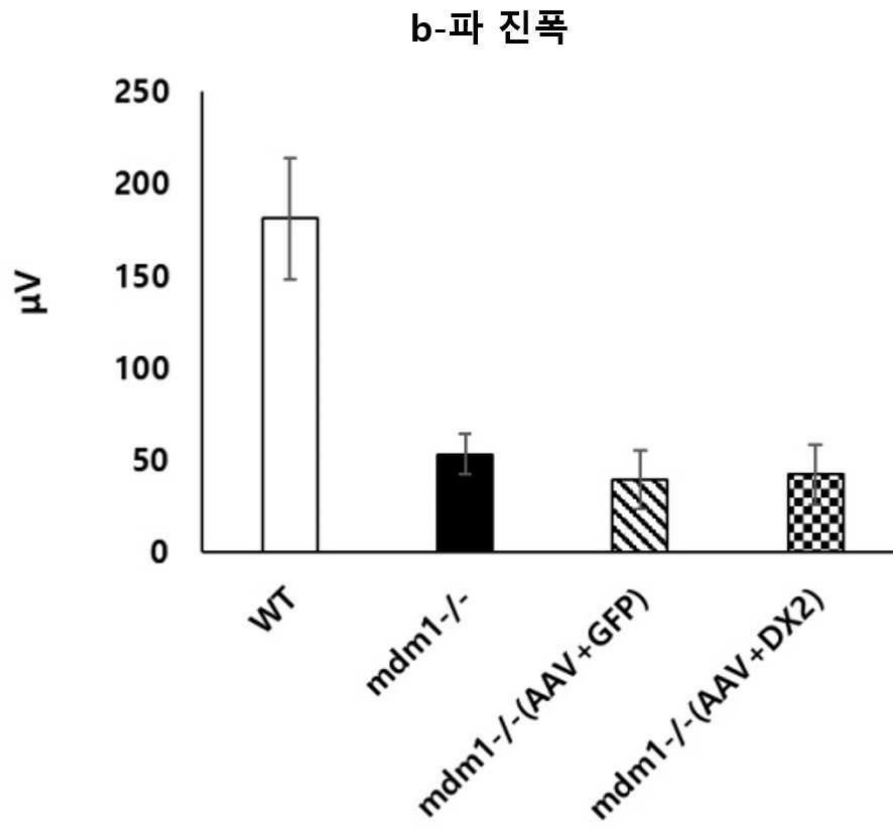
도면15c



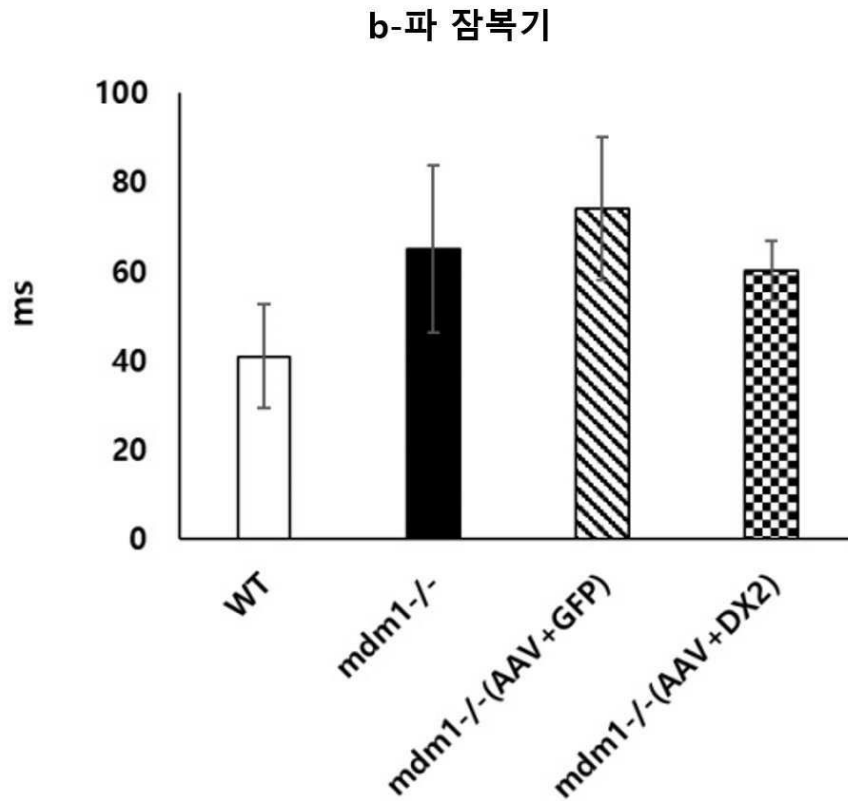
도면15d



도면15e



도면15f



서열목록

<110> Generoath Co., Ltd.
 <120> METHODS OF TREATING AGE-RELATED MACULAR DISEASES USING AIMP2-DX2 AND OPTIONALLY A TARGET SEQUENCE FOR miR 142 AND COMPOSITIONS THEREOF
 <130> PI23-5138
 <150> US 63/085,922
 <151> 2020-09-30
 <160> 25
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AIMP2-DX2
 <400> 1
 atgccgatgt accaggtaaa gccctatcac gggggcggcg cgcctctccg tgtggagctt

cccacctgca tgiaccggct ccccaacgtg cacggcagga gctacggccc agcgccgggc 120
 gctggccacg tgcaggatta cggggcgctg aaagacatcg tgatcaacgc aaacceggcc 180
 tccccctccc tctccctgct tgtgctgcac aggctgctct gtgagcactt cagggctcctg 240
 tccacggctg acacgcactc ctcggccaag agcgtgctg aaaaccttct caagtgtttt 300
 ggagaacaga ataaaaaaca gccccgcaa gactatcagc tgggattcac ttttaatttg 360
 aagaatgtgc cgaagacgca gatgaaattc agcatccaga cgatgtgccc catcgaaggc 420
 gaaggaaca ttgcacgttt cttgttctct ctgtttggcc agaagcataa tgctgtcaac 480
 gcaaccctta tagatagctg ggtagatatt gcgatttttc agttaaaga gggaagcagt 540
 aaagaaaaag ccgctgtttt ccgctccatg aactctgctc ttgggaagag cccttgctc 600
 gctgggaatg aactcaccgt agcagacgtg gtgctgtggt ctgtactcca gcagatcgga 660
 ggctgcagtg tgacagtgcc agccaatgtg cagaggtgga tgaggtcttg tgaaaacctg 720
 gtcctttta acacggcctt caagctcctt aagtga 756

<210> 2
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AIMP2-DX2
 <400> 2

Met Pro Met Tyr Gln Val Lys Pro Tyr His Gly Gly Gly Ala Pro Leu
 1 5 10 15
 Arg Val Glu Leu Pro Thr Cys Met Tyr Arg Leu Pro Asn Val His Gly
 20 25 30
 Arg Ser Tyr Gly Pro Ala Pro Gly Ala Gly His Val Gln Asp Tyr Gly
 35 40 45
 Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro Ala Ser Pro Pro Leu
 50 55 60
 Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu His Phe Arg Val Leu
 65 70 75 80
 Ser Thr Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser Val Pro Glu Asn Leu
 85 90 95
 Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln Pro Arg Gln Asp Tyr

100 105 110
 Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val Pro Lys Thr Gln Met
 115 120 125
 Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met Cys Pro Ile Glu Gly Glu Gly Asn Ile
 130 135 140
 Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys His Asn Ala Val Asn
 145 150 155 160

Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala Ile Phe Gln Leu Lys
 165 170 175
 Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe Arg Ser Met Asn Ser
 180 185 190
 Ala Leu Gly Lys Ser Pro Trp Leu Ala Gly Asn Glu Leu Thr Val Ala
 195 200 205
 Asp Val Val Leu Trp Ser Val Leu Gln Gln Ile Gly Gly Cys Ser Val
 210 215 220
 Thr Val Pro Ala Asn Val Gln Arg Trp Met Arg Ser Cys Glu Asn Leu

225 230 235 240
 Ala Pro Phe Asn Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys
 245 250

<210> 3
 <211> 936
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AIMP2
 <400> 3

atgccgatgt accaggtaaa gccctatcac gggggcggcg cgcctctccg tgtggagctt 60
 cccacctgca tgtaccggct cccaactg cacggcagga gctacggccc agcgccgggc 120
 gctggccacg tgcaggaaga gtctaactg tctctgcaag ctcttgagtc cgcceaagat 180
 gatattttaa aacgtctgta tgagttgaaa gctgcagttg atggcctctc caagatgatt 240

 caaacaccag atgcagactt ggatgtaacc aacataatcc aagcggatga gcccacgact 300
 ttaaccacca atgcgctgga cttgaattca gtgcttggga aggattacgg ggcgctgaaa 360
 gacatcgtga tcaacgcaaa cccggcctcc cctcccctct ccctgcttgt gctgcacagg 420

ctgctctgtg agcacttcag ggtcctgtcc acggtgcaca cgactcctc ggtcaagagc 480
 gtgcctgaaa accttctcaa gtgctttgga gaacagaata aaaaacagcc cgcceaagac 540
 tatcagctgg gattcacttt aatttggaag aatgtgccga agacgcagat gaaattcagc 600
 atccagacga tigtcccat cgaaggcga ggaacattg cacgtttctt gttctctctg 660

tttggccaga agcataatgc tgtcaacgca acccttatag atagctgggt agatattgcg 720
 atttttcagt taaaagaggg aagcagtaaa gaaaaagccg ctgttttccg ctccatgaac 780
 tctgctcttg ggaagagccc ttggctcgct gggaatgaac tcaccgtagc agacgtggtg 840
 ctgtggtctg tactccagca gatcggaggc tgcagtgtga cagtccagc caatgtgcag 900
 aggtggatga ggtcttgtga aaacctggct cctttt 936

<210> 4
 <211> 207
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Exon 2 of AIMP2
 <400> 4

gaagagtcta acctgtctct gcaagctctt ggtcccgc aagatgatat tttaaacgt 60
 ctgtatgagt taaagctgc agttgatgac ctctccaaga tgattcaaac accagatgca 120
 gacttggatg taaccaacat aatccaagcg gatgagccca cgactttaac caccaatgca 180
 ctggacttga attcagtgtc tgggaag 207

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-142-3p target sequence
 <400> 5

tccataaagt aggaaacact aca 23

<210> 6
 <211> 132
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 4 repeats of miR-142-3p target sequence
 <400> 6

ccagaagctt gctagctcca taaagtagga aacactacat cactccataa agtaggaaac 60
 actacagata tctccataaa gtaggaaaca ctacatcact ccataaagta ggaaacacta 120
 caaagcttgt ag 132

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-142-5p target sequence

<400> 7

agtagtgctt tctactttat g 21

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIMP2 variant forward primer

<400> 8

ctggccacgt gcaggattac gggg 24

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AIMP2 variant reverse primer

<400> 9

aagtgaatcc cagctgatag 20

<210> 10

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exon 2 of AIMP2

<400> 10

Glu Glu Ser Asn Leu Ser Leu Gln Ala Leu Glu Ser Arg Gln Asp Asp

1 5 10 15

Ile Leu Lys Arg Leu Tyr Glu Leu Lys Ala Ala Val Asp Gly Leu Ser

20 25 30
 Lys Met Ile Gln Thr Pro Asp Ala Asp Leu Asp Val Thr Asn Ile Ile
 35 40 45
 Gln Ala Asp Glu Pro Thr Thr Leu Thr Thr Asn Ala Leu Asp Leu Asn
 50 55 60
 Ser Val Leu Gly Lys

65
 <210> 11
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Exon 2 of AIMP2 variant
 <400> 11

Met Ile Gln Thr Pro Asp Ala Asp Leu Asp Val Thr Asn Ile Ile Gln
 1 5 10 15
 Ala Asp Glu Pro Thr Thr Leu Thr Thr Asn Ala Leu Asp Leu Asn Ser
 20 25 30
 Val Leu Gly Lys

35
 <210> 12
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> AIMP2
 <400> 12
 Met Pro Met Tyr Gln Val Lys Pro Tyr His Gly Gly Gly Ala Pro Leu
 1 5 10 15
 Arg Val Glu Leu Pro Thr Cys Met Tyr Arg Leu Pro Asn Val His Gly
 20 25 30
 Arg Ser Tyr Gly Pro Ala Pro Gly Ala Gly His Val Gln Glu Glu Ser
 35 40 45
 Asn Leu Ser Leu Gln Ala Leu Glu Ser Arg Gln Asp Asp Ile Leu Lys

Ser Cys Glu Asn Leu Ala Pro Phe Asn Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys
 305 310 315 320
 <210> 13
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AIMP-DX2 variant 1
 <400> 13
 Met Pro Met Tyr Gln Val Lys Pro Tyr His Gly Gly Gly Ala Pro Leu
 1 5 10 15

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

 85 90 95
 Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln Pro Arg Gln Asp Tyr
 100 105 110
 Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val Pro Lys Thr Gln Met
 115 120 125
 Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met Cys Pro Ile Glu Gly Glu Gly Asn Ile
 130 135 140
 Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys His Asn Ala Val Asn
 145 150 155 160

 Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala Ile Phe Gln Leu Lys
 165 170 175
 Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe Arg Ser Met Asn Ser
 180 185 190

Ala Leu Gly Lys Ser Pro Trp Leu Ala Gly Asn Glu Leu Thr Val Ala
 195 200 205

Asp Val Val Leu Trp Ser Val Leu Gln Gln Ile Gly Gly Cys Ser Val
 210 215 220

Thr Val Pro Ala Asn Val Gln Arg Trp Met Arg Ser Cys Glu Asn Leu
 225 230 235 240

Ala Pro Phe

<210> 14
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AIMP2-DX2 variant 2
 <400> 14

Met Gln Met Glu Gly Thr Ala His Val Lys Ile Cys Gly Gln Ser Gln
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Leu Gly Thr Pro Arg Thr Val Trp Leu Glu His Arg Gln
 20 25 30

Arg Thr Lys Leu Gly Glu Asp Tyr Gly Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile
 35 40 45

Asn Ala Asn Pro Ala Ser Pro Pro Leu Ser Leu Leu Val Leu His Arg
 50 55 60

Leu Leu Cys Glu His Phe Arg Val Leu Ser Thr Val His Thr His Ser
 65 70 75 80

Ser Val Lys Ser Val Pro Glu Asn Leu Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln
 85 90 95

Asn Lys Lys Gln Pro Arg Gln Asp Tyr Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile
 100 105 110

Trp Lys Asn Val Pro Lys Thr Gln Met Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met
 115 120 125

Cys Pro Ile Glu Gly Glu Gly Asn Ile Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu
 130 135 140

Phe Gly Gln Lys His Asn Ala Val Asn Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp
 145 150 155 160
 Val Asp Ile Ala Ile Phe Gln Leu Lys Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys
 165 170 175
 Ala Ala Val Phe Arg Ser Met Asn Ser Ala Leu Gly Lys Ser Pro Trp
 180 185 190
 Leu Ala Gly Asn Glu Leu Thr Val Ala Asp Val Val Leu Trp Ser Val
 195 200 205
 Leu Gln Gln Ile Gly Gly Cys Ser Val Thr Val Pro Ala Asn Val Gln
 210 215 220
 Arg Trp Met Arg Ser Cys Glu Asn Leu Ala Pro Phe Asn Thr Ala Leu
 225 230 235 240
 Lys Leu Leu Lys

<210> 15
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> AIMP2-DX2 variant 3

<400> 15
 Met Asp Tyr Gly Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Pro Pro Leu Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu His
 20 25 30
 Phe Arg Val Leu Ser Thr Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser Val
 35 40 45
 Pro Glu Asn Leu Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln Pro
 50 55 60

 Arg Gln Asp Tyr Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val Pro
 65 70 75 80
 Lys Thr Gln Met Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met Cys Pro Ile Glu Gly
 85 90 95

Glu Gly Asn Ile Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys His
 100 105 110
 Asn Ala Val Asn Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala Ile
 115 120 125
 Phe Gln Leu Lys Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe Arg
 130 135 140
 Ser Met Asn Ser Ala Leu Gly Lys Ser Pro Trp Leu Ala Gly Asn Glu
 145 150 155 160
 Leu Thr Val Ala Asp Val Val Leu Trp Ser Val Leu Gln Gln Ile Gly
 165 170 175
 Gly Cys Ser Val Thr Val Pro Ala Asn Val Gln Arg Trp Met Arg Ser
 180 185 190
 Cys Glu Asn Leu Ala Pro Phe Asn Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys
 195 200 205

<210> 16
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AIMP2-DX2 variant 4
 <400> 16

Met Asn Ser Pro Ala Val Asn Thr Leu Ile Gln Arg Ser Arg His Gly
 1 5 10 15
 Asp Tyr Gly Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro Ala Ser
 20 25 30
 Pro Pro Leu Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu His Phe
 35 40 45
 Arg Val Leu Ser Thr Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser Val Pro
 50 55 60
 Glu Asn Leu Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln Pro Arg
 65 70 75 80
 Gln Asp Tyr Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val Pro Lys
 85 90 95

Thr Gln Met Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met Cys Pro Ile Glu Gly Glu
 100 105 110
 Gly Asn Ile Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys His Asn
 115 120 125

 Ala Val Asn Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala Ile Phe
 130 135 140
 Gln Leu Lys Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe Arg Ser
 145 150 155 160
 Met Asn Ser Ala Leu Gly Lys Ser Pro Trp Leu Ala Gly Asn Glu Leu
 165 170 175
 Thr Val Ala Asp Val Val Leu Trp Ser Val Leu Gln Gln Ile Gly Gly
 180 185 190
 Cys Ser Val Thr Val Pro Ala Asn Val Gln Arg Trp Met Arg Ser Cys

 195 200 205
 Glu Asn Leu Ala Pro Phe Asn Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys
 210 215 220
 <210> 17
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AIMP2-DX2 variant 5
 <400> 17
 Met Pro Met Tyr Gln Asp Tyr Gly Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn
 1 5 10 15
 Ala Asn Pro Ala Ser Pro Pro Leu Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu
 20 25 30

 Leu Cys Glu His Phe Arg Val Leu Ser Thr Val His Thr His Ser Ser
 35 40 45
 Val Lys Ser Val Pro Glu Asn Leu Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln Asn
 50 55 60
 Lys Lys Gln Pro Arg Gln Asp Tyr Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile Trp
 65 70 75 80

Lys Asn Val Pro Lys Thr Gln Met Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met Cys
 85 90 95

Pro Ile Glu Gly Glu Gly Asn Ile Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu Phe
 100 105 110

Gly Gln Lys His Asn Ala Val Asn Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp Val
 115 120 125

Asp Ile Ala Ile Phe Gln Leu Lys Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ala
 130 135 140

Ala Val Phe Arg Ser Met Asn Ser Ala Leu Gly Lys Ser Pro Trp Leu
 145 150 155 160

Ala Gly Asn Glu Leu Thr Val Ala Asp Val Val Leu Trp Ser Val Leu
 165 170 175

Gln Gln Ile Gly Gly Cys Ser Val Thr Val Pro Ala Asn Val Gln Arg
 180 185 190

Trp Met Arg Ser Cys Glu Asn Leu Ala Pro Phe Asn Thr Ala Leu Lys
 195 200 205

Leu Leu Lys
 210

<210> 18
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AIMP2-DX2 variant 6
 <400> 18

Met Pro Met Tyr Gln Val Lys Pro Tyr His Gly Gly Gly Ala Pro Leu
 1 5 10 15

Arg Val Glu Leu Pro Thr Cys Met Tyr Arg Leu Pro Asn Val His Gly
 20 25 30

Arg Ser Tyr Gly Pro Ala Pro Gly Ala Gly His Val Gln Asp Tyr Gly
 35 40 45

Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro Ala Ser Pro Pro Leu
 50 55 60

Pro Pro Leu Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu His Phe
 20 25 30

Arg Val Leu Ser Thr Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser Val Pro
 35 40 45

Glu Asn Leu Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln Pro Arg
 50 55 60

Gln Asp Tyr Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val Pro Lys
 65 70 75 80

Thr Gln Met Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met Cys Pro Ile Glu Gly Glu
 85 90 95

Gly Asn Ile Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys His Asn
 100 105 110

Ala Val Asn Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala Ile Phe
 115 120 125

Gln Leu Lys Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe Arg Ser
 130 135 140

Met Asn Ser Ala Leu Gly Lys Ser Pro Trp Leu Ala Gly Asn Glu Leu
 145 150 155 160

Thr Val Ala Asp Val Val Leu Trp Ser Val Leu Gln Gln Ile Gly Gly
 165 170 175

Cys Ser Val Thr Val Pro Ala Asn Val Gln Arg Trp Met Arg Ser Cys
 180 185 190

Glu Asn Leu Ala Pro Phe Asn Thr Ala Leu Lys Leu Leu Lys
 195 200 205

<210> 20
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AIMP2-DX2 consensus sequence
 <400> 20

Asp Tyr Gly Ala Leu Lys Asp Ile Val Ile Asn Ala Asn Pro Ala Ser
 1 5 10 15

Pro Pro Leu Ser Leu Leu Val Leu His Arg Leu Leu Cys Glu His Phe

20 25 30

Arg Val Leu Ser Thr Val His Thr His Ser Ser Val Lys Ser Val Pro

35 40 45

Glu Asn Leu Leu Lys Cys Phe Gly Glu Gln Asn Lys Lys Gln Pro Arg

50 55 60

Gln Asp Tyr Gln Leu Gly Phe Thr Leu Ile Trp Lys Asn Val Pro Lys

65 70 75 80

Thr Gln Met Lys Phe Ser Ile Gln Thr Met Cys Pro Ile Glu Gly Glu

85 90 95

Gly Asn Ile Ala Arg Phe Leu Phe Ser Leu Phe Gly Gln Lys His Asn

100 105 110

Ala Val Asn Ala Thr Leu Ile Asp Ser Trp Val Asp Ile Ala Ile Phe

115 120 125

Gln Leu Lys Glu Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ala Ala Val Phe Arg Ser

130 135 140

Met Asn Ser Ala Leu Gly Lys Ser Pro Trp Leu Ala Gly Asn Glu Leu

145 150 155 160

Thr Val Ala Asp Val Val Leu Trp Ser Val Leu Gln Gln Ile Gly Gly

165 170 175

Cys Ser Val Thr Val Pro Ala Asn Val Gln Arg Trp Met Arg Ser Cys

180 185 190

Glu Asn Leu Ala Pro Phe

195

<210> 21

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NheI, Hind III, and BmtI sites in miR-142-3pT with 4 repeats

<400> 21

ccagaagctt gctagc

16

<210> 22

<211> 10
 <212
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Hind H site in miR-142-3pT with 4 repeats
 <400> 22
 aagcttgtag 10
 <210> 23
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-142-3p
 <400> 23
 uguaguguuu ccuacuuuau gga 23
 <210> 24
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-142-5p
 <400> 24
 cauaaaguag aaagcacuac u 21

 <210> 25
 <211> 238
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-142-3pT target sequence mutant
 <400> 25
 ccgctgcagt gtgacagtc cagccaatgt gcagaggtgg atgaggtctt gtgaaaacct 60
 ggctcctttt aacacggccc tcaagctcct taagtgacca gaagcttgct agctccataa 120
 agtaggacca ctgcaatcac tccataaagt aggaccactg caagatatct ccataaagta 180
 ggaccactgc aatcactcca taaagtagga ccaactgcaaa agcttgtagg gatccgcc 238