



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월13일
(11) 등록번호 10-2819739
(24) 등록일자 2025년06월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 27/00 (2006.01)
C07K 14/48 (2024.01) C12N 9/12 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7011772
- (22) 출원일자(국제) 2016년10월25일
심사청구일자 2021년08월30일
- (85) 번역문제출일자 2018년04월25일
- (65) 공개번호 10-2018-0081503
- (43) 공개일자 2018년07월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2016/053319
- (87) 국제공개번호 WO 2017/072498
국제공개일자 2017년05월04일
- (30) 우선권주장
1518911.1 2015년10월26일 영국(GB)
- (56) 선행기술조사문헌
US20040110711 A1
US20110288160 A1

- (73) 특허권자
퀘세라 리미티드
영국 켄트 시티1 3디엔 캔터베리 뉴 도버 로드 27
캠버그 하우스
- (72) 발명자
위도슨 피터
영국 켄트 시티1 3디엔 캔터베리 뉴 도버 로드 27
캠버그 하우스 퀘세라 리미티드 내
- 마틴 키스
영국 켄트 시티1 3디엔 캔터베리 뉴 도버 로드 27
캠버그 하우스 퀘세라 리미티드 내
- (74) 대리인
특허법인태평양

전체 청구항 수 : 총 47 항

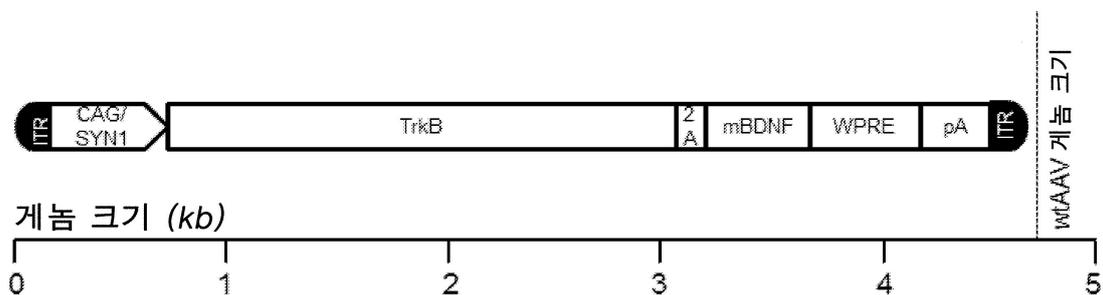
심사관 : 전명숙

(54) 발명의 명칭 유전적 작제물

(57) 요약

본 발명은 유전적 작제물 및 이러한 작제물을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 작제물 및 벡터는, 녹내장 및 난청을 포함하는, 일정 범위의 장애 치료용, 또는 신경 재생 및/또는 생존 촉진용 유전자 치료법에서 사용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 48/0058 (2013.01)
A61K 48/0066 (2013.01)
A61P 27/00 (2018.01)
C07K 14/48 (2013.01)
C12N 9/12 (2013.01)
C12Y 207/10001 (2013.01)
C12N 2710/10041 (2013.01)
C12N 2830/008 (2013.01)
C12N 2840/203 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

제1 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터, 티로신 키나제 수용체 B(TrkB)를 인코딩하는 제1 코딩 서열, 및 상기 TrkB 수용체의 효능제(agonist)를 인코딩하는 제2 코딩 서열을, 5'에서 3' 방향으로, 포함하는 유전적 작제물을 포함하는 재조합 아데노-관련된 벡터(rAAV)로서, 상기 효능제는 성숙 BDNF이고, 상기 제2코딩 서열은 상기 TrkB 수용체의 상기 효능제의 분비를 상승시키는 신호 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 유전적 작제물은 상기 제1 및 제2 코딩 서열 사이에 배치된 스페이서 서열을 포함하고, 스페이서 서열은 소화됨으로써 상기 TrkB 수용체 및 효능제를 별개의 분자로서 생성하도록 구성된 펩타이드 스페이서를 인코딩하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 유전적 작제물은 우드처크 간염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE)를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 WPRE는 서열 식별 번호: 57 또는 58의 핵산 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 4

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 작제물이 폴리A 꼬리를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 폴리A 꼬리가 서열 식별 번호: 59의 핵산 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 프로모터가 인간 시냅신 I(SYN I) 프로모터인, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 프로모터가 CAG 프로모터인, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 스페이서 서열이 바이러스 펩타이드 스페이서 서열을 인코딩하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 스페이서 서열이 바이러스 2A 펩타이드 스페이서 서열을 인코딩하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 펩타이드 스페이서 서열이 서열 식별 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 11

청구항 1에 있어서,

상기 스페이서 서열이 서열 식별 번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 12

청구항 1에 있어서,

상기 펩타이드 스페이서 서열이 서열 식별 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 13

청구항 1에 있어서,

상기 스페이서 서열이 서열 식별 번호 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 14

청구항 1에 있어서,

상기 펩타이드 스페이서 서열이 서열 식별 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 15

청구항 1에 있어서,

상기 제1 코딩 서열이 TrkB의 인간 표준적 동형체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, TrkB의 상기 표준적 동형체가 서열 식별 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 16

청구항 1에 있어서,

상기 제1 코딩 서열이 서열 식별 번호 10의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 17

청구항 1에 있어서,

상기 제1 코딩 서열이 TrkB의 동형체 4를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 18

청구항 17에 있어서,

TrkB의 동형체 4가 서열 식별 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 19

청구항 17에 있어서,

상기 제1 코딩 서열이 서열 식별 번호 12의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 20

청구항 1에 있어서,

상기 제1 코딩 서열이 서열 식별 번호: 9의 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 서열 식별 번호: 9의 위치 516, 701, 705, 706 및/또는 816에서 1개 이상의 티로신 잔기가 상이한 아미노산 잔기로 변형되는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 21

청구항 20에 있어서,

서열 식별 번호: 9의 위치 516, 701, 705, 706 및/또는 816에서 적어도 2, 3 또는 4개의 티로신 잔기가 상이한 아미노산 잔기로 변형되는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 22

청구항 21에 있어서,

서열 식별 번호: 9의 위치 516, 701, 705, 706 및/또는 816에서 5개의 모든 티로신 잔기가 상이한 아미노산 잔기로 변형되는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 23

청구항 20에 있어서,

상기 티로신 잔기가 글루탐산으로 변형되는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 24

청구항 20에 있어서,

상기 TrkB 수용체의 변형된 형태가 서열 식별 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 25

청구항 24에 있어서,

상기 제1 코딩 서열이 서열 식별 번호 14의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 26

청구항 1에 있어서,

상기 제2 코딩 서열이, 서열 식별 번호: 49 또는 55의 아미노산 서열을 포함하는 뉴로트로핀-4(NT-4)를 인코딩 하고/하거나, 상기 제2 코딩 서열이 서열 식별 번호: 50 또는 56의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 27

청구항 1에 있어서,

상기 제2 코딩 서열은 성숙 BDNF를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 28

청구항 27에 있어서,

상기 성숙 BDNF는 서열 식별 번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 29

청구항 28에 있어서,

상기 제2 코딩 서열은 서열 식별 번호: 19의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 30

청구항 1에 있어서,

상기 제2 코딩 서열이 상기 TrkB 수용체의 효능제용의 신호 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 31

청구항 30에 있어서,

상기 제2 코딩 서열이 BDNF용 신호 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 32

청구항 30 또는 청구항 31에 있어서,

상기 뉴클레오타이드 서열이 BDNF용 표준적 신호 펩타이드를 인코딩하고, 상기 제2 코딩 서열이 서열 식별 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 신호 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 33

청구항 30 또는 청구항 31에 있어서,

상기 제2 코딩 서열이 서열 식별 번호 21의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 34

청구항 1에 있어서,

상기 제2 코딩 서열이 서열 식별 번호 23, 25, 27 또는 29 중 어느 하나의 신호 서열 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 상기 신호 펩타이드가 서열 식별 번호 22, 24, 26 또는 28 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 35

청구항 1에 있어서,

상기 제2 코딩 서열이 서열 식별 번호 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101 또는 103 중 어느 하나의 신호 서열 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나; 상기 신호 펩타이드가 서열 식별 번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100 또는 102 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 36

청구항 1에 있어서,

상기 작제물이 서열 식별 번호: 107 또는 108의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 37

청구항 1에 있어서,

상기 rAAV가 AAV-1, AAV-2, AAV-3A, AAV-3B, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10 또는 AAV-11인, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 38

청구항 37에 있어서,

상기 rAAV가 rAAV 혈청형-2인, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 39

청구항 1에 있어서,
약제로서 또는 요법에서 사용하기 위한, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 40

청구항 1에 있어서,
시신경 장애의 치료, 예방 또는 완화에서 사용하기 위한, 또는 신경 재생 및/또는 생존을 촉진시키기 위한, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 41

청구항 40에 있어서,
치료받는 상기 시신경 장애가 RGC(retinal ganglion cell)의 손실을 초래하는 병리생리적 병태인, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 42

청구항 41에 있어서,
상기 시신경 장애가 머리 또는 얼굴 또는 혈관 상해에 대한 트라우마인, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 43

청구항 42에 있어서,
상기 시신경 장애가 상기 시신경으로부터 입력을 받는 뇌의 영역 또는 안구 구조에 혈액 공급의 부분적인 또는 완전한 소실인, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 44

청구항 40에 있어서,
상기 벡터가 환자의 시력과 관련된 영역 또는 눈에 미전환된 또는 전환된 줄기 세포의 도입을 통한 RGC의 대체를 지지하는데 사용되는 것인, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 45

청구항 41에 있어서,
치료받는 상기 시신경 장애가 녹내장인, 재조합 아데노-관련된 벡터.

청구항 46

청구항 1에 따른 재조합 아데노-관련된 벡터, 및 약제학적으로 허용가능한 비히클을 포함하는, 녹내장의 치료, 예방 또는 완화에서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 47

청구항 1에 따른 재조합 아데노-관련된 벡터를 약제학적으로 허용가능한 비히클과 접촉시키는 것을 포함하는, 청구항 46에 따른 약제학적 조성물의 제조 방법.

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유전적 작제물 및 상기 작제물을 포함하는 재조합 벡터, 및 녹내장 및 난청을 포함하는, 일정 범위의 장애의 치료용, 또는 신경 재생 및/또는 생존 촉진용 유전자 치료법에서 작제물 및 벡터의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 녹내장은, 시신경 유두의 굴입된 외관 및 시력의 손실을 초래하는, 진행성 시신경 퇴행, 망막 신경절 세포 (RGC)의 사망 및 축색 손실을 특징으로 하는 안구 장애의 그룹을 정의하는데 사용된 용어이다. 녹내장은 전세계적인 시각상실의 주된 원인이고 [1] 녹내장의 발병률은 노화에 따라 극적으로 증가한다. 40세 이상된 북미에서 2.2 백만 명 초과 및 영국에서 대략 50만명이 녹내장을 갖는다. 또한, 매 시간, 누군가는 미국에서 이러한 시각-위협 질환으로부터 실명한다 [2]. 노인 집단의 크기가 계속해서 빠르게 성장함에 따라, 녹내장은 절박한 사회적 뿐만 아니라 의료 문제가 되고 있다. 상승된 안구내 압력 (IOP)은 연령 이외에, 녹내장에 대하여 가장 중요한 위험 인자 [3]이고 모든 현재 허가받은 치료는 IOP를 낮춤으로써 작용한다 [4-5].

[0003] 녹내장은 시야 시험에 의해 그리고 "커팅(cupping)"을 검출하기 위한 시신경의 검안 시험에 의해 시력의 손실에 앞서 진단될 수 있다. 녹내장의 현행 관리는, 국소적으로 적용된 약물을 이용하여 추가로 시신경 손상을 예방하기 위해, 10 내지 21 mm Hg인, 정상 수준으로 IOP 저하에 기반된다 [6]. 정상 성인에서 평균 IOP는 15 내지 16 mm Hg이다. 현재 IOP를 저하시키는데 사용되는 약물의 5개 주요 부류가 있다: β -아드레날린 길항제, 아드레날린 효능제, 부교감신경작용, 프로스타글란딘-유사 유사체 및 탄산탈수소효소 억제제 [7]. 정확하게 사용된 경우 IOP 감소에 상대적으로 효과적인 한편, 이들 약물은 일부 환자에서 종종 부작용을 야기할 수 있고 이로써 환자의 삶의 질에 부정적으로 영향을 줄 수 있다. 또한, IOP-저하 점안액 치료 집착은, 특히 다중 약물을 섭취하도록 요구되는 노령 환자에서, 종종 불량하다. IOP 저하 치료 처방된 환자의 50% 미만이 실제로, 기저 병태의 제어 명백한 연루와 함께, 지향된 대로 규칙적으로 그것을 이용한다는 것이 추정되고 있다. IOP의 추가의 저하가 지시되면, 또는 약물이 IOP를 충분히 저하시키지 못하면, 레이저 섬유주성형술이 사용될 수 있지만, 상기 치료는 많은 환자에서 적절한 IOP 저하를 달성하지 못한다. IOP가 여전히 적절하게 제어되지 않으면, 절개 녹내장 수술은 지시될 수 있다. 그러나, IOP 저하 치료는 많은 환자에서 악화를 예방하지 못하고 녹내장은 전세계적으로 비가역적 시각상실의 주된 원인으로 남아있다. 시신경을 형성하는, 녹내장 RGCs 및 그것의 축색 투사의 신경보호는 따라서 종래의 IOP 저하 치료에 부속으로서 사용하기 위한 귀중한 치료 패러다임일 수 있고 종래의 요법에도 불구하고 악화하는 환자에서 특히 중요하다 [8].

[0004] 녹내장 시신경병증은 RGCs 및 그것의 축색돌기의 특이적인 병리생리 변화 및 차후의 사망에서 비롯하는 것처럼 보인다. RGC 사망의 과정은 2상, 즉 손상의 개시를 책임지는 1차 손상 그 다음 퇴행 세포를 둘러싸는 적대적 환경에 기인하는 더 느린, 2차 퇴행 [9]으로 생각된다.

[0005] 녹내장 및 인간 녹내장의 실험적 동물 모델에서 RGC 사망 기전은 세포자멸사를 연루하는 것으로 밝혀졌다 [10]. 세포자멸사를 유발하는 분자 기전이 확인되지 않았어도, 신경친화성 인자의 박탈, 허혈, 글루타메이트의 만성 상승 및 비조직원 산화질소 대사는 가능한 기전인 것으로 의심된다 [11].

[0006] 신경 성장 인자 (NGF)와 함께 뇌유래 신경 성장 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3 (NT-3), 및 뉴로트로핀-4/5 (NT-4/5)는 영양성 인자의 뉴로트로핀 계열의 구성원이다 [12-13]. 뉴로트로핀은, RGCs를 포함하는, 양쪽 주변 및 중추신경계에서 광범위한 뉴런의 발생, 생존 및 기능에서 필수적인 역할을 한다. 뉴로트로핀은 2 세포 표면 수용체, 저친화도 $p75^{NTR}$ 수용체 및 고친화도 티로신 수용체 키나제 (Trk) 계열과 상호작용한다 [12-13]. 신경 성장 인자 (NGF)는 TrkA를 우선적으로 결합시키고, 뇌유래 신경 성장 인자 (BDNF) 및 뉴로트로핀-4/5 (NT4/5)는 트롬비오신 수용체 키나제-B (TrkB)에 결합하고, 뉴로트로핀-3 (NT-3)은 TrkC (및 더 적은 정도로 TrkA)를 결합시킨다 [12-13].

[0007] 뉴로트로핀 중에서, BDNF는 손상된 RGCs에 대하여 가장 강력한 생존 인자이다 [14-21]. BDNF는 뇌에서 생산된 그리고 시신경을 통해 역행성 축삭 운반에 의해 망막에 수송된 단백질 분자이고, 여기에서 RGCs를 지지하고 그

것의 생존을 유지한다 [15-21]. 특정 조건에서, 예컨대 글루타메이트 수용체 효능제, 예컨대 N-메틸-D-아스파르트테이트를 가진 흥분독성 외상 동안, BDNF는 상대적으로 낮은 수준이어도 RGCs에서 또한 생산될 수 있다 [22-23]. BDNF는, 세포외 공간에 방출을 위하여 세포에 전체 폴리펩타이드의 이동조절을 용이하게 하는, 짧은 신호 펩타이드 서열을 함유하는 prepro-폴리펩타이드 (즉 preproBDNF)로서 정상적으로 생산된다. 신호 펩타이드의 절단 및 제거는 preproBDNF를 proBDNF로 전환시킨다. N-말단 proBDNF 서열은 그 다음 세포내로 또는 세포외로 절단되어 성숙 BDNF (mBDNF)를 창출한다 [24]. 양쪽 pro-BDNF 및 mBDNF는 p75^{NTR} 수용체를 우선적으로 활성화하는 pro-BDNF 및 TrkB 수용체를 활성화하는 더 짧은 mBDNF와 생물학적 활성을 공유한다 [25-27]. 망막에서 p75^{NTR} 및 TrkB 수용체의 활성화는 RGC 생존에서 반대 효과를 보여주고, 전자는 직접적인 RGC-세포-바디-p75^{NTR}-활성화를 통해 [25-28] 또는 간접적으로 밀러 세포에서 p75^{NTR} 활성화를 통한 세포자멸사를 책임지고, 이로써 추가로 RGC 손실을 촉진시키는 종양 괴사 인자-알파 (TNF-α)의 방출을 자극시킨다 [29].

[0008] 녹내장의 동물 모델은, 신경 손상, 또는 상승된 IOP 이후, pro-BDNF/p75^{NTR} 경로를 향하여 신호전달하는 신경친화성 mBDNF/TrkB로부터 멀리 떨어져 시프트가 있다는 것을 실증하였다 망막에서 TrkB 수용체 및 mBDNF의 감소된 수준은 pro-BDNF [28] 및 p75^{NTR} 수용체 [32]의 상대 수준에서 대항하는 상승과 함께 실증되었다 [27, 30-31]. 실험적으로 상승된 IOP로 랫트에 재조합 단백질의 안구 주사를 통한 mBDNF의 보충은 미치료된 눈과 비교된 RGCs의 생존을 증가시키고, 이로써 상기 뉴로트로핀의 핵심 신경보호성 역할을 확인한다 [19-21].

[0009] 녹내장이 있는 눈에서 mBDNF의 수준을 유지시키기 위해, mBDNF의 규칙적 주사는 mBDNF가 눈 안에서 빠르게 분해됨에 따라 요구될 것이다. mBDNF의 규칙적 안구내 주사용 필요성을 극복하기 위해, 일정한 상승된 BDNF를 제공하는 시도는 녹내장의 동물 모델에서 RGC 사망을 지연 또는 예방하기 위해 망막에 BDNF에 대하여 코딩하는 전이 유전자의 재조합 아테노바이러스 또는 아테노-관련된 바이러스 (rAAV) 벡터 전달 이용으로 재분류하였다 [18, 33-34]. rAAV 벡터는 단일-가닥 DNA 게놈으로 구성된다. 이들은 제한된 독성을 표시하는 동안 다중 임상시험에서 유전자 요법을 위한 바이러스 벡터로서 성공적으로 사용되어 왔다. 재조합 mBDNF 단독의 초자체내 주사, 또는 유전자 요법을 통한 국부 BDNF 생산 증가가 IOP 상승 또는 다른 시신경 손상 이후 짧은 기간 동안 RGCs의 손실 예방에 효과적으로 밝혀지는 한편, BDNF의 유익한 효과는 일시적인 것으로 밝혀졌다 [18]. 그러나, 내인성 BDNF 유전자 서열을 편입시키는 유전자 요법은 또한 pro-BDNF 뿐만 아니라 의도된 mBDNF를 생산 및 방출할 수 있다.

[0010] 효능제 특성을 가진 항체를 이용하는 잔류 세포외 TrkB 수용체의 일정한 자극을 통해 또는 RGCs에서 수용체의 증가된 발현을 통해 신호전달하는 TrkB에서 손실 약화 또는 예방을 목적으로 하는 유전자 요법은 RGC 손실 예방에서 성공을 또한 실증하였다 [35-36]. 그러나, mBDNF/TrkB 경로를 통한 영양성 신호전달의 감소는 mBDNF-활성화된 TrkB 수용체의 내재화 및 세포내 신호전달할 수 없는 TrkB 동형체로 세포 표면에서 이들 수용체의 대체에 의해 추가로 복잡하게 된다 [37-38]. 더욱이, mBDNF의 존재 하에 TrkB 수용체 이량체의 자가인산화 이후 TrkB 수용체의 탈활성화를 책임지는 생화학적 시스템은 상승된 IOP에 적용된 망막에서 상향조절된다 [39].

[0011] 더욱이, 녹내장에 더하여, BDNF/TrkB 축은 또한 내이의 구성요소, 구체적으로 난청을 초래하는 모발 세포의 손실을 초래할 수 있는 달팽이관 구조 [40-42], 및 신경 재생 [43-44]의 신경보호에서 연루되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 따라서 녹내장 및 난청의 치료용, 및 신경 재생 또는 생존 촉진용 개선된 유전자 요법이 필요하다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명자들은, 티로신 키나제 수용체 B (TrkB), 및 단일 프로모터의 제어 하에 TrkB 수용체의 효능제를 인코딩하는, 신규한 유전적 작제물을 작제하였다. 작제물의 프로모터는 효능제 및 수용체가 망막 신경절 세포 (RGCs), 달팽이관 또는 신경 세포에서 단지 발현되고, 이들 세포의 생존을 촉진시키는 것을 확보하는데 사용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 따라서, 본 발명의 제1 측면에 따르면, 티로신 키나제 수용체 B (TrkB)를 인코딩하는, 제1 코딩 서열, 및 TrkB 수용체의 효능제를 인코딩하는, 제2 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 유전적 작제물이 제

공된다.

[0015] 본 발명자들은 실시예에서 단일 유전적 작제물에서 양쪽 TrkB 수용체 및 그것의 효능제에 대하여 코딩하는 유전자를 조합하는 것이 가능하다는 것을 실증하였다. 이것은 그것의 큰 크기를 감안하면 특히 도전적이었고, 생리적으로 유용한 농도로 이들을 공-발현하는 것이 가능하였다는 것이 예상될 수 없었다. 유리하게는, 본 발명의 작제물로, 선행기술에서 기재된 바와 같이, 재조합 단백질을 주사하는 것이 필요 없다. 더욱이, 선행기술에서, 단백질의 규칙적 주사를 수행하는 것이 여전히 필요하고, 반면에 본 발명의 작제물은 단일 유전자 요법 주사만을 요구한다.

[0016] 바람직하게는, 사용시, TrkB 수용체는 효능제에 의해 활성화되어 이로써 망막 신경절 세포 (RGCs), 신경 세포 또는 내이 세포의 생존을 촉진시킨다. 유리하게는, 본 발명의 작제물은 따라서 이들 세포내 TrkB-신호전달을 유지 또는 향상시키기 위해 RGCs, 신경 세포 또는 내이 세포를 표적하는데 사용될 수 있다. 따라서, 작제물은 녹내장 및 난청의 병리생리학적 스트레스요인에 대해 보호를 최대화하는데, 그리고 신경 재생 및/또는 생존을 촉진시키는데 사용될 수 있다. 더욱이, 작제물은 1종 이상의 프로모터의 제어 하에 TrkB 수용체 및 상기 수용체의 효능제의 발현으로 인한 녹내장 또는 난청의 장기간 치료를 제공하는데 사용될 수 있다. 결과적으로, 작제물은, 조합으로, 일시적 치료 효과를 제공하는, 다중 대안 치료를 사용하는 필요성을 극복하였다. 또한, 본 발명의 작제물이 유리한 것은 양쪽 TrkB 수용체 및 상기 수용체의 효능제에서 국제화된 증가로 인한 TrkB 수용체 효능제에 RGC 또는 내이 세포 감수성을 상당히 향상시키는데 사용될 수 있기 때문이다.

[0017] 바람직하게는, 본 발명의 유전적 작제물은 발현 카세트를 포함하고, 이의 일 구현에는 도 1에서 보여진다. 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 작제물은 프로모터, TrkB 수용체를 인코딩하는 제1 뉴클레오타이드 서열, 및 TrkB 수용체의 바람직한 효능제로서 작용하는, 성숙 뇌유래 신경 성장 (mBDNF)를 인코딩하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 그러나, 다른 효능제가 본 명세서에서 논의된 바와 같이 사용될 수 있다는 것이 인정될 것이다. 또한 도 1에서 나타난 바와 같이, 발현 카세트는 또한 2A 스페이서 서열, 간염 바이러스 전사후 조절 요소 (WPRE)를 인코딩하는 서열, 폴리A 꼬리를 인코딩하는 서열, 및 좌측 및 우측 역 말단 반복 서열 (ITRs)를 포함한다.

[0018] 그러므로, 바람직하게는 유전적 작제물은 제1 코딩 서열과 제2 코딩 서열 사이 배치된 스페이서 서열을 포함하고, 여기에서 스페이서 서열은 소화되도록 또는 절단되도록 구성되는 펩타이드 스페이서를 인코딩하여 이로써 TrkB 수용체 및 효능제를 분리된 분자로서 생산한다. 도 1에서 설명된 구현예에서, TrkB 수용체용 코딩 서열은 그사이 스페이서 서열과 수용체 효능제 (BDNF)용 코딩 서열의 5' 배치된다. 그러나, 또 다른 구현예에서, 수용체 효능제용 코딩 서열은 그사이 스페이서 서열과 수용체용 코딩 서열의 5' 배치될 수 있다.

[0019] 바람직하게는, 유전적 작제물은, 2 전이유전자, 즉 TrkB 수용체 및, 바람직하게는 BDNF인, 그것의 효능제의 발현을 향상시키는, 우드처크 간염 바이러스 전사후 조절 요소 (WPRE)를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 바람직하게는, WPRE 코딩 서열은 전이유전자 코딩 서열의 3' 배치된다.

[0020] 우드처크 간염 바이러스 전사후 조절 요소 (WPRE)의 일 구현에는, 감마-알파-베타 요소를 포함하는, 592bp 길이이고, 하기와 같이, 서열 식별 번호: 57로서 본 명세서에서 지칭된다:

```
AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGC
TATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTC
CTTGTATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTG
TGCAGTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGA
CTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCTGCTTGCCCGCTGCTGGACAGG
GGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCTGGTGTGTGCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTC
GCCTGTGTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGG
ACCTTCCTTCCCGCGGCTGCTGCGCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCGTCTTCGCCCTTCGCCCTCAGACGAG
TCGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCGCCTG
```

[0021]
[서열 식별 번호 57]

[0023] 바람직하게는, WPRE는 실질적으로 서열 식별 번호: 57에서 명시된 바와 같이 핵산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0024] 그러나, 바람직한 구현예에서, 베타 요소의 결실로 인해 247bp 길이이고, 하기와 같이, 서열 식별 번호: 58로서 본 명세서에서 지칭되는, 절단된 WPRE가 사용된다:

AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTTACGC
TATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTC
CTTGATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACA
GGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCTGTTGT

[0025]

[0026]

[서열 식별 번호 58]

[0027]

유리하게는, 작제물에서 사용된 절단된 WPRE 서열은 전이유전자 발현에서 부정적으로 영향 없이 약 300bp 합계를 절약하였다. 바람직하게는, WPRE는 실질적으로 서열 식별 번호: 58에서 명시된 바와 같이 핵산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0028]

바람직하게는, 유전적 작제물은 폴리A 꼬리를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 바람직하게는, 폴리A 꼬리 코딩 서열은 전이유전자 코딩 서열의 3', 및 바람직하게는 WPRE 코딩 서열의 3' 배치된다.

[0029]

바람직하게는, 폴리A 꼬리는 유인원 바이러스 40 폴리-A 224 bp 서열을 포함한다. 폴리A 꼬리의 일 구현에는, 하기와 같이, 서열 식별 번호: 59로서 본 명세서에서 지칭된다:

AGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAC TAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTT
ATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACA
ACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAACCT
CTACAAATGTGGTA

[0030]

[0031]

[서열 식별 번호 59]

[0032]

바람직하게는, 폴리A 꼬리는 실질적으로 서열 식별 번호: 59에서 명시된 바와 같이 핵산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0033]

바람직하게는, 유전적 작제물은 좌 및/또는 우 역 말단 반복 서열 (ITRs)를 포함한다. 바람직하게는, 각각의 ITR은 작제물의 5' 및/또는 3' 말단에서 배치된다.

[0034]

제1 측면의 유전적 작제물에서 프로모터는 제1 및 제2 코딩 서열에 결합 및 상기를 전사시키기 위해 RNA 폴리머라제를 유도할 수 있는 임의의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 하나의 바람직한 구현예에서, 프로모터는 인간 시냅신 I (SYN I) 프로모터이다. 인간 시냅신 I (SYN I) 프로모터를 인코딩하는 469 뉴클레오타이드 서열의 일 구현예는, 하기와 같이, 서열 식별 번호 1로서 본 명세서에서 지칭된다:

CTGCAGAGGGCCCTGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCCGGGGTGGGGTGCCTAC
CTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCCAACCCCATTCGCCAAATTCGCGCATCCCTATCAG
AGAGGGGGAGGGGAAAACAGGATGCGGGCGAGGCGCGTGCCTGAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGGC
TTGCCCCCGGCTGGCGGGCGCGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGGCGGCTGACGTCACTCGCGGGT
CCCCCGCAAACCTCCCTTCCCGGCCACCTTGGTGGGGTCCGCGCGCCGCGCCGCGCCAGCCGGACCGCACC
ACGCGAGGCGCGACATAGGGGGGACGGGGCGGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCC
TCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCTGCTGCTGCTGAGAGCGCAG

[0035]

[0036]

[서열 식별 번호 1]

[0037]

바람직하게는, 따라서, 프로모터는 실질적으로 서열 식별 번호: 1에서 명시된 바와 같은 뉴클레오타이드 산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함할 수 있다.

[0038]

또 다른 바람직한 구현예에서, 프로모터는 CAG 프로모터이다. CAG 프로모터는 바람직하게는 사이토메갈로바이러스 초기 인핸서 요소, 제1 엑손 및 닭 베타-액틴 유전자의 제1 인트론 그리고 토끼 베타-글로빈 유전자의 스플라이스 수용체를 포함하여, 이로써 RGCs 및 내이 세포에서만 조직 특이적 발현을 용이하게 한다. CAG 프로모터를 인코딩하는 1733 뉴클레오타이드 서열의 일 구현예는, 하기와 같이, 서열 식별 번호 2로서 본 명세서에서 지칭된다:

CTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT
GGAGTTCGGCSTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGT
ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT
CAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAG
TACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCA
TCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGG
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GGTGGGGGGGACCCAATCAGAGCGGGGGCTCCGAAAGTTTCCCTTTATGGCGAGGCGGGGGGGGGGG
GGCCCTATAAAAAAGCGAAGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
CGCCGGCGCTCCGCGCGCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGAC
GGCCCTTCTCTCCGGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTTGTTCCTTTTCTGTGGCTGGCTG
AAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCCTGTGT
GTGCGTGGGAGCCCGCGTGGGCTCCGCGCTGCCCGCGGCTGTGACCGCTGCGGGGGCGGGCGGGGG
CTTTGTGCGCTCCGCGAGTGTCCCGCAGGGGAGCGCGCGCGGGGGGGTCCCGCGCGTGGGGGGGGGG
GGGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGGCGGTGG
CGGGCTGCAACCCCCCTGCACCCCGCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGGGGGGCTC
CGTACGGGGCGTGGCGGGGGCTCCCGTCCCGGGCGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGGGGGG
CGGGGGCGCTCCGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
AGGCGGGGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGGCAGAGGGCCAGGGACTTCCCTTTGTCC
CAAATCTGTGGCAGCCGAAATCTGGGAGGGCCCGCGCCACCCCTCTAGCGGGCGCGGGGGGAAAGCGGT
GGGGCGCGGCAGGAAGGAAATGGGGGGGGAGGGCCCTTCGTGGGTGCGCCCGCGCGCTCCCTTCTCC
TCTCCAGCTGGGGCTGTCCGGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGGGGGGGTTCGG
TTCTGGCGTGTGACCGGGGGCTCTAGAGCCCTCGCTAACCATGTTTCATGCCCTTCTTCTTTTCTTACAG
TCCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTG

[0039]

[서열 식별 번호 2]

[0040]

[0041] 또 다른 바람직한 구현예에서, 프로모터는 CAG 프로모터의 절단된 형태, 예컨대, 하기와 같이, 서열 식별 번호 3으로서 본 명세서에서 지칭된 프로모터의 664 뉴클레오타이드 형태이다:

CTAGATCTGAATTCCGGTACCCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATAT
ATGGAGTTCGGCSTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCAT
TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGA
CTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGAC
GTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC
AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCC
CATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGG
GCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GAGGTGCGGGCGCAGCCAATCAGAGCGGGCGCTCCGAAAGTTTCCCTTTATGGCGAGGCGGGGGGGGG
GCGGCCCTATAAAAAAGCGAAGCGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG

[0042]

[서열 식별 번호:3]

[0043]

[0044] 더욱 추가의 바람직한 구현예에서, 프로모터는 CAG 프로모터의 절단된 형태, 예컨대, 하기와 같이, 서열 식별 번호 48로서 본 명세서에서 지칭된 프로모터의 584 뉴클레오타이드 형태이다:

CGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAAT
 AATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGG
 TAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG
 GTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTA
 CGTATTAGTCAATCGCTATTACCATGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCC
 CCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGG
 GGGGGGGGCGCGCCAGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 GGCAGCCAATCAGAGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGGCGGCCCTAT
 AAAAAGCGAAGCGCGGGGGGGGG

[0045]

[0046] [서열 식별 번호: 48]

[0047] 따라서, 바람직하게는 프로모터는 실질적으로 서열 식별 번호: 2, 3 또는 48에서 명시된 바와 같은 뉴클레오타이드 산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0048] 과학 문헌에서 제시된 많은 비시스트론 유전자 작제물은 (i) 2 유전자의 발현을 개별적으로 구동하기 위해 이중 프로모터를 편집시켰거나, (ii) 재조합 바이러스 벡터 이내 단일 프로모터로부터 전사된 2 유전자를 연결하기 위해 뇌심근염 바이러스 (EMCV)의 내부 리보솜 유입 부위 (IRES)를 이용한다 [45-46]. 그러나, IRES-의존적 번역의 효율은 상이한 세포 및 조직에서 다양할 수 있고 IRES-의존적 제2 유전자 발현은 비시스트론 벡터에서 캡-의존적 제1 유전자 발현보다 상당히 더 낮을 수 있다 [47]. 또한, rAAV 벡터의 크기 제한 (일반적으로 <5kb)는 큰 유전자 작제물, 예컨대 이중 프로모터 또는 IRES 링커를 이용하여 BDNF와 함께 TrkB 수용체의 편집을 예방할 것이다.

[0049] 따라서, 바람직한 구현예에서, 유전적 작제물은 제1 코딩 서열과 제2 코딩 서열 사이 배치된 스페이서 서열을 포함하고, 여기에서 스페이서 서열은 소화되도록 구성되는 펩타이드 스페이서를 인코딩하여 이로써 TrkB 수용체 및 효능제를 분리된 분자로서 생산한다. 바람직하게는, 스페이서 서열은 바이러스 펩타이드 스페이서 서열, 더욱 바람직하게는 바이러스 2A 펩타이드 스페이서 서열을 포함하고 인코딩한다 [47]. 바람직하게는, 2A 펩타이드 서열은 제1 코딩 서열을 제2 코딩 서열에 연결시킨다. 이것은 작제물이 다양한 벡터에서 발현으로 발생하는 크기 제한을 극복할 수 있게 하고, 단일 단백질로서, 단일 프로모터의 제어 하에 발생시키기 위해 제1 측면의 작제물에 의해 인코딩된 모든 펩타이드의 발현을 가능하게 한다.

[0050] 따라서, TrkB, 2A 펩타이드, 및 효능제 (바람직하게는 BDNF)의 서열을 함유하는 단일 단백질의 번역 이후, 절단은 말단 글리신-프롤린 연결로 바이러스 2A 펩타이드 서열에서 발생하여, 이로써 2 단백질, 즉 TrkB 및 효능제 (즉 mBDNF)를 자유화시킨다. 유전적 작제물은 바이러스 2A 펩타이드의 잔존 짧은 N-말단 아미노산 서열이 TrkB 수용체의 세포내 부분에 부착된 채로 남아, 이로써 면역원성 위험을 제거하고 성숙 수용체의 세포내 신호전달 능력을 방해하지 않도록 설계된다. C-말단 바이러스 2A 서열로부터 잔류 프롤린 아미노산은 N-말단 BDNF 신호 펩타이드에 부착된 채로 남아있고 성숙 단백질로부터 신호 서열의 절단 이후 mBDNF 단백질로부터 궁극적으로 제거된다.

[0051] 본 발명자들은 스페이서 서열의 2 구현예를 생성하였다. 본 명세서에서 기재된 양쪽 구현예에 공통인, 펩타이드 스페이서 서열의 하나의 중요한 부분은 C-말단이다. 따라서, 바람직하게는 펩타이드 스페이서 서열은, 하기와 같이, 서열 식별 번호 4로서 본 명세서에서 지칭된 아미노산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

[0052] QAGDVEENPGP

[0053] [서열 식별 번호: 4]

[0054] 바람직하게는, 펩타이드 스페이서 서열의 소화 또는 절단 부위는 서열 식별 번호:4에서 말단 글리신과 단부 프롤린 사이 배치된다.

[0055] 제1 바람직한 구현예에서, 스페이서 서열은, 하기와 같이, 서열 식별 번호 5로서 본 명세서에서 지칭된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

[0056] GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT

[0057] [서열 식별 번호: 5]

[0058] 상기 제1 구현예에서, 펩타이드 스페이서 서열은, 하기와 같이, 서열 식별 번호 6로서 본 명세서에서 지칭된 아미노산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

[0059] GSGATNFSLLQAGDVEENPGP

[0060] [서열 식별 번호: 6]

[0061] 제2 바람직한 구현예에서, 스페이서 서열은, 하기와 같이, 서열 식별 번호 7로서 본 명세서에서 지칭된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

[0062] AGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT

[0063] [서열 식별 번호: 7]

[0064] 상기 제2 구현예에서, 펩타이드 스페이서 서열은, 하기와 같이, 서열 식별 번호 8로서 본 명세서에서 지칭된 아미노산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

[0065] SGATNFSLLKQAGDVEENPGP

[0066] [서열 식별 번호: 8]

[0067] 본 발명자들은 TrkB 수용체의 서열을 주의하여 고려하였고, 제1 측면의 유전적 작제물에서 제1 코딩 서열에 의해 인코딩되는 수용체의 몇 개의 바람직한 구현예를 생산하였다.

[0068] 하나의 바람직한 구현예에서, 제1 코딩 서열은 TrkB의 인간 표준적 동형체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 바람직하게는, TrkB의 표준적 동형체는, 아래 제시된 바와 같이, 서열 식별 번호 9로서 본 명세서에서 지칭된 아미노산 서열 (822 잔기), 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

[0069] MSSWIRWHGPAMARLWGFCLVVGFWRAAFACPTSCCKCSASRIWCSDPSPGIVAFPRLEPNSVDPENITE
IFIANQKRLEIINEDDVEAYVGLRNLTIVDSGLKRFVAHKAFLRNSNLQHINFTRNKLTSLSRKHFRHLDL
SELILVGNPFTCSCDIMWIKTLQEAKSSPDTQDLYCLNESSKNIPLANLQIPNCGLPSANLAAPNLTVEE
GKSITLSCSVAGDPVPMYWDVGNLVSKHMNETSHTQGLRITNISDDSGKQISCVAENLVGEDQDSVN
LTVHFAPTITFLESPTSDHHWCIPFTVKGMPKALQWFYNGAILNESKYICTKIHVNTNHTTEYHGCLQLDN
PTHMNGDYTLIAKNEYGKDEKQISAHFMCWPGIDDGANPNYPDVIYEDYGTAANDIGDITTNRSEIIPST

DVTDKTGREHLSVYAVVVVIASVVGFCLLVMLFLLKLARHSKFCMKGPASVISNDDDSASPLHHISNCSNT
PSSSEGGPDAVLIIGMTKIPVIENPQYFGITNSQLKPDTFVQHIKRHNIVLKRLECEGAFGKVFLAECYNL
CPEQDKILVAVKTLKDASDNARKDFHREAELLTNLQHEHIVKFGVCVEGDPLIMVFEYMKHGDLNKFLR
AHGPDVAVLMAEGNPPELTQSQMLHIAQQIAAGMVYLASQHFVHRDLATRNCCLVGENLLVKIGDFGMSRD
VYSTDYRVGGHTMLPIRWMPFESIMYRKFTEESDVWSLGVVWLWEIFTYKQPWYQLSNNEVIECITQGR
VLQRPRTCPQEVYELMLGCWQREPHMRKNIKGLHTLLQLNLAKASPVYLDILG

[0070] [서열 식별 번호: 9]

[0072] 바람직하게는, 상기 구현예에서, 제1 코딩 서열은, 아래 제시된 바와 같이, 서열 식별 번호 10으로서 본 명세서에서 지칭된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

ATGTCGTCCTGGATAAGGTGGCATGGACCCGCCATGGCGCGGCTCTGGGGCTTCTGCTGGCTGGTTGTGG
 GCTTCTGGAGGGCCGCTTTTCGCCTGTCCACGTCCTGCAAATGCAGTGCCTCTCGGATCTGGTGCAGCGA
 CCCTTCTCCTGGCATCGTGGCATTTCGAGATTGGAGCCTAACAGTGTAGATCCTGAGAACATCACCGAA
 ATTTTCATCGCAAACCAGAAAAGGTTAGAAATCATCAACGAAGATGATGTTGAAGCTTATGTGGACTGA
 GAAATCTGACAAATTGTGGATTCTGGATTAAAATTTGTGGCTCATAAAGCATTCTGAAAAACGCAACCT
 GCAGCACATCAATTTTACCCGAAACAACTGACGAGTTTGTCTAGGAAACATTTCCGTCACCTTGACTTG
 TCTGAACATGATCCTGGTGGGCAATCCATTTACATGCTCCTGTGACATFATGTGGATCAAGACTCTCCAAG
 AGGCTAAATCCAGTCCAGACACTCAGGATTTGTACTGCCTGAATGAAAGCAGCAAGAATATTCCCTGGC
 AAACCTGCAGATACCCAATTGTGGTTTGCATCTGCAAATCTGGCCGCACCTAACCTCACTGTGGAGGAA
 GGAAAGTCTATCACATTATCCTGTAGTGTGGCAGGTGATCCGGTTCCTAATATGTATTGGGATGTTGGTA
 ACCTGGTTTCCAAAACATATGAATGAAACAAGCCACACACAGGGCTCCTTAAGGATAACTAACATTTTCATC
 CGATGACAGTGGGAAGCAGATCTCTTGTGTGGCGGAAAATCTTGTAGGAGAAGATCAAGATTTCTGTAAC
 CTCACTGTGCATTTTGCACCAACTATCACATTTCTCGAATCTCCAACCTCAGACCACCCTGGTGCATTC
 CATTCACTGTGAAAGGCAACCCCAAACAGCGCTTCAGTGGTCTATAACGGGGCAATATTGAATGAGTC
 CAAATACATCTGTACTAAAATACATGTTACCAATCACACGGAGTACCACGGCTGCCTCCAGCTGGATAAT
 CCCACTCACATGAACAATGGGGACTTACTCTAATAGCCAAGAATGAGTATGGGAAGGATGAGAAAACAGA
 TTTCTGCTCACTTTCATGGGCTGGCCTGGAATTGACGATGGTGCAAAACCAAATTATCCTGATGTAATTTA
 TGAAGATTATGGAAGTGCAGCGAATGACATCGGGGACACCACGAAACAGAAGTAATGAAATCCCTCCACA
 GACGTCACGTGATAAAAACGGTTCGGGAACATCTCTCGGTCTATGCTGTGGTGGTATTGCGTCTGTGGTGG
 GATTTTGCCTTTTGGTAATGCTGTTTCTGCTTAAGTTGGCAAGACACTCCAAGTTTGGCATGAAAGGCC
 AGCCTCCGTTATCAGCAATGATGATGACTCTGCCAGCCACTCCATCACATCTCCAATGGGAGTAACACT
 CCATCTTCTCGGAAGGTGGCCAGATGCTGTGATTATTGGAATGACCAAGATCCCTGTGATTGAAAATC
 CCCAGTACTTTGGCATCACCAACAGTCAAGCCAGACACATTTGTTTCAGCACATCAAGCGACATAA
 CATTGTTCTGAAAAGGGAGCTAGGCGAAGGAGCCTTTGGAAAAGTGTCTTAGCTGAATGCTATAACCTC
 TGTCTTGAGCAGGACAAGATCTTGGTGGCAGTGAAGACCTGAAGGATGCCAGTGACAATGCACGCAAGG
 AGTCCACCGTGAGCCGAGCTGACCAACCTCAGCATGAGCACATCGTCAAGTTCATGCGGCTCG
 CGTGGAGGGCACCCCTCATCATGTTCTTTGAGTACATGAAGCATGGGGACCTCAACAAGTTCTCAGG
 GCACACGGCCCTGATGCCGTGCTGATGGCTGAGGGCAACCCGCCACGGAAGTACGCGAGTCCGAGATGC
 TGCATATAGCCAGCAGATCGCCGCGGCATGGTCTACCTGGCGTCCAGCACTTCGTGCACCAGGATTT
 GGCCACCAGAACTGCCTGGTGGGGAGAACTTGTGTTGAAAATCGGGGACTTTGGGATGTCCGGGGAC
 GTGTACAGCACTGACTACTACAGGGTCGGTGGCCACACAATGCTGCCATTTCGCTGGATGCCGCCAGAGA
 GCATCATGTACAGGAAATTCACGACGGAAAGCGACGTCTGGAGCCTGGGGGTCTGTTGTGGGAGATTTT
 CACCTATGGCAAACAGCCCTGGTACCAGCTGTCAAACAATGAGGTGATAGAGTGTATCACTCAGGGCCGA
 TCTCTGCAGCACCCCGACGTGCCCCAGGAGGTGTATGAGCTGATGCTGGGGTGTGGCAGCGAGAGC
 CCCACATGAGGAAGAACATCAAGGGCATCCATACCCTCCTTCAGAACTTGCCCAAGGCATCTCCGGTCTA
 CCTGGACATTTCTAGGC

[0073]

[0074] [서열 식별 번호: 10]

[0075] 또 다른 바람직한 구현예에서, 제1 코딩 서열은 TrkB의 동형체 4를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 바람직하게는, TrkB의 동형체 4는, 아래 제시된 바와 같이, 서열 식별 번호 11로서 본 명세서에서 지칭된 아미노산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

MSSWIRWHGPAMARLWGF CWLVVGFWRRAAFACPTSCKCSASRIWCSDPSPGIVAFPRLEPNSVDPENITE
 IFIANQKRLEI INEDDVEAYVGLRNLTI VDSGLKFAHKAFLKNSNLQHINFTRNKLTSLSRKHFRHLDL
 SELILVGNPFTCSDDIMWIKTLQEAKSSPDTQDLYCLNESSKNIPLANLQIPNCGLP SANLAAPNLVVEE
 GKSITLSCSVAGDPVPMYWDVGNLVSKHMNETSHTQGLRITNISDDSKQISCV AENLVGEDQDSVN
 LTVHFAPTIITFLESPTSDHWCIPFTVKGPNPKPALQWFYNGAILNESKYICTKIHV TNHTEYHGCLQLEN
 PTHMNGDYTLIAKNEYGKDEKQISAHFMGWPGIDDGANPNYPDVIYEDYGT AANDIGDTTNRSNEIPST
 DVTDKTGREHLSVYAVVVIASVVGFC LLVMLFLLKLARHSKFGMKDFSWFGFGKVKSRQGVGPASVISND
 DDSASPLHHISNGSNTPSSEGGPDAVI IGMTKIPVIENPQYFGITNSQLKPDTFVQHIKRHNIVLKREL
 GEGAFCKVFLAECYNLCPEQDKILVAVKTLKDASDNARKDFHREAELLTNLQHEHIVK FYGVCVEGDPLI
 MVFEYMKHGDNLNKLRAHGPDVAVLMAEGNPTELTSQSMHLIAQQIAACMVY LASQHFVHRDLATRNC LV
 GENLLVKIGDFGMSRDVYSTDYR VGGHTMLPIRWMPPESIMYRKF TTESDVWSLGVVLWEIFTY GKQPW
 YQLSNNEVIECITQGRVLRPRTCPEVYELMLGCWQREPHMRKNIKGIHTLLQLAKASPVYLDILG

[0076]

[0077] [서열 식별 번호: 11]

[0078] 바람직하게는, 제1 코딩 서열의 상기 구현예는, 아래 제시된 바와 같이, 서열 식별 번호 12로서 본 명세서에서 지칭된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

ATGTCGTCCTGGATAAAGGTGGCATGGACCCGCCATGGCGCGGCTCTGGGGCTTCTGCTGGCTGGTTGTGG
 GCTTCTGGAGGGCCGCTTTCGCCTGTCCACGTCTGCAAATGCAGTGCCTCTCGGATCTGGTGCAGCGA
 CCCTTCTCTGGCATCGTGGCATTTCGAGATTGGAGCCTAACAGTGTAGATCCTGAGAACATCACCGAA
 ATTTTCATCGCAAACCAGAAAAGGTTAGAAATCATCAACGAAGATGATGTTGAAGCTTATGTGGGACTGA
 GAAATCTGACAATTGTGGATTCTGGATTAAAATTTGTGGCTCATAAAGCATTCTGAAAAACAGCAACCT
 GCAGCACATCAATTTTACCCGAAACAACTGACGAGTTTGTCTAGGAAACATTTCCGTCACCTTGACTTG
 TCTGAACATGATCCTGGTGGGCAATCCATTTACATGCTCCTGTGACATTATGTGGATCAAGACTCTCCAAG
 AGGCTAAATCCAGTCCAGACACTCAGGATTTGTACTGCCTGAATGAAAGCAGCAAGAATATTTCCCTGGC
 AAACCTGCAGATAACCAATTGTGGTTTGGCCATCTGCAAATCTGGCCGCACCTAACCTCACTGTGGAGGAA
 GGAAAGTCTATCACATTATCCTGTAGTGTGGCAGGTGATCCGGTTCCTAATATGTATTGGGATGTTGGTA
 ACCTGGTTTCCAAACATATGAATGAAACAAGCCACACACAGGGCTCCTTAAGGATAACTAACATTTTCATC
 CGATGACAGTGGGAAGCAGATCTCTTGTGTGGCGGAAAATCTTGTAGGAGAAGATCAAGATTTCTGCAAC
 CTCACTGTGCATTTTGCACCAACTATCACATTTCTCGAATCTCCAACCTCAGACCACCCTGGTGCATTC
 CATTCACTGTGAAAGGCAACCCCAAACCAGCGCTTCAGTGGTTCTATAACGGGGCAATATTGAATGAGTC
 CAAATACATCTGTAATAAATACATGTTACCAATCACACGGAGTACCACGGCTGCCTCCAGCTGGATAAT
 CCCACTCACATGAACAATGGGACTTACTCTAATAGCCAAGAATGAGTATGGGAAGGATGAGAAACAGA
 TTTCTGCTCACTTGGCTGGGCTGGCAATTTGACGATGGTGCAAACCCAAATTTATCCTGATGTAATTTA
 TGAAGATTATGGAACTGCAGCGAATGACATCGGGGACACCACGAAACAGAAGTAATGAAATCCCTTCCACA
 GACGTCACATGATAAAACCGGTGGGAAACATCTCTCGGTCTATGCTGTGGTGGTGGTATTGCGTCTGTGGTGG
 GATTTTGCCTTTTGGTAATGCTGTTTCTGCTTAAGTTGGCAAGACACTCCAAGTTTGGCATGAAAGATTT
 CTCATGGTTTGGATTTGGGAAAGTAAAATCAAGACAAGGTGTTGGCCAGCCTCCGTTATCAGCAATGAT
 GATGACTCTGCCAGCCACTCCATCACATCTCCAATGGGAGTAACACTCCATCTTCTTCGGAAGGTGGCC
 CAGATGCTGTCAATTATTGGAATGACCAAGATCCCTGTCAATTGAAAATCCCCAGTACTTTGGCATCACCAA
 CAGTCAGTCAAGCCAGACACATTTGTTTCAGCACATCAAGCGACATAACATTTGTTCTGAAAAGGGAGCTA
 GGGCAAGGAGCCTTTGGAAAAGTGTTCCTAGCTGAATGCTATAACCTCTGTCTGAGCAGGACAAGATCT
 TGGTGGCAGTGAAGACCCTGAAGGATGCCAGTACAATGCACGCAAGGACTTCCACCGTGAGGCCGAGCT
 CCTGACCAACCTCCAGCATGAGCACATCGTCAAGTTCTATGGCGTGTGCGTGGAGGGCGACCCCTCATC
 ATGGTCTTTGAGTACATGAAGCATGGGGACCTCAACAAGTTCTCAGGGCACACGGCCCTGATGCCGTGC
 TGATGGCTGAGGGCAACCCGCCACGGAAGTACGCGAGTGCAGATGCTGCATATAGCCCAGCAGATCGC
 CGCGGGCATGGTCTACCTGGCGTCCCAGCACTTCGTGCACCCGATTTGGCCACCAGGAAGTGCCTGGTC
 GGGGAGAACTTGTGGTAAAATCGGGGACTTTGGGATGTCCGGGACGTGTACAGCACTGACTACTACA

[0079]

GGGTGGTGGCCACACAATGCTGCCCATTCGCTGGATGCCTCCAGAGAGCATCATGTACAGGAAATTCAC
 GACGAAAGCGACGTCTGGAGCCTGGGGTTCGTGTTGTGGGAGATTTTCACCTATGGCAAACAGCCCTGG
 TACCAGCTGTCAAACAATGAGGTGATAGAGTGTATCACTCAGGGCCGAGTCTTCGAGCGACCCCGCACGT
 GCCCCAGGAGGTGATGAGCTGATGCTGGGGTGTGGCAGCGAGAGCCCCACATGAGGAAGAACATCAA
 GGGCATCCATACCCTCCTTCCAGAACTGGCCAAGGCATCTCCGGTCTACCTGGACATTCTAGGC

[0080]

[서열 식별 번호: 12]

[0081]

[0082]

본 발명자들은 TrkB 수용체의 서열 연구에서 상당한 본 발명의 노력을 소비하였고 TrkB가, BDNF 이량체의 존재 하에 이량체화 및 자가인산화 이후 정상적으로 인산화되는, (서열 식별 번호: 9의 위치 516, 701, 705, 706 및 816에서) 5 티로신 잔기를 포함한다는 것을 실현시켰다. 이들 5 티로신 잔기의 인산화의 문제는 수용체가 포스파타제, 예컨대 Shp-2 포스파타제에 의해 쉽게 탈활성화될 수 있다는 점이다. 따라서, 생체내 수용체의 인산화 및 수득한 탈활성화를 예방하기 위해, 바람직하게는 1종 이상의 이들 핵심 티로신은 포스파타이즈, 예컨대 Shp-2 포스파타제에 의해 탈활성화될 수 없는, 그리고 BDNF의 존재 하에 활성으로 남아있는 수용체를 생산하기 위해 그리고 수득한 포스포티로신을 모방하기 위해 (더욱 바람직하게는, 글루탐산으로) 돌연변이된다. TrkB의 그와 같은 돌연변이체 형태는, 수용체가 내재화되는 때까지 또는, 더 긴 기간 동안 활성으로 남아있는 TrkB 수용체 활성 생산을 목적으로 한다.

[0083]

아래 제공된 DNA 및 아미노산 서열은 5 글루탐산 (E) 잔기로 돌연변이된 이들 5 티로신 (Y) 잔기의 위치를 실증한다. 이들 잔기의 1, 2, 3, 4 또는 5가 본 발명의 구현예에서 글루탐산으로 돌연변이될 수 있음이 인정될 것이다. 이들 돌연변이의 다양한 조합은, 예를 들면 위치 516 및 701 단독, 또는 위치 705, 706 및 816 단독, 및 기타 등등으로 또한 예상된다.

[0084]

따라서, 또 다른 바람직한 구현예에서, 제1 코딩 서열은 TrkB 수용체의 돌연변이체 형태를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서 서열 식별 번호: 9의 위치 516, 701, 705, 706 및/또는 816에서 1종 이상의 티로신 잔기는 변형되되거나 돌연변이된다. 바람직하게는, 서열 식별 번호: 9의 위치 516, 701, 705, 706 및/또는 816에서 적어도 2, 3 또는 4 티로신 잔기는 변형된다. 가장 바람직하게는, 서열 식별 번호: 9의 위치 516, 701, 705, 706 및/또는 816에서 모두 5 티로신 잔기는 변형된다.

[0085]

바람직하게는, 상기 또는 각각의 티로신 잔기는 상이한 아미노산 잔기, 더욱 바람직하게는 글루탐산으로 변형된

다. 따라서, 바람직하게는 TrkB 수용체의 돌연변이체 형태는 Y516E, Y701E, Y705E, Y706E 및/또는 Y816E를 포함한다.

[0086] 바람직하게는, TrkB 수용체의 변형된 형태는, 아래 제시된 바와 같이, 서열 식별 번호 13으로서 본 명세서에서 지칭된 아미노산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

```
MSSWIRWHGCPAMARLWGFCLVVGFWRAAFACPTSCCKCSASRIWCSDPSPGIVAFPRLEPNSVDPENITE
IFIANQKRLEIINEDDVEAYVGLRNLTIIVDSGLKFFVAHKAFKNSNLQHINFTRNKLTSLSRKHFRLDL
SELILVGNPFPTCSCDIMWIKTLQEAQSSPDTQDLYCLNESSKNIPLANLQIPNCGLPSANLAAPNLTVEE
GKSITLSCSVAGDPVFNMYWDVGNLVSKHMNETSHTQGLRITNLSDBSGKQISCVENLVGEBQDSVN
LTVHFAPTTTTFLESPTSDHHWCIPFTVKGNPKPALQWFYNGAILNESKYICTKIHVNTNHTTEYHGCLQLDN
PTHMNGDYTLIAKNEYGKDEKQISAHFMGWPGIDDGANPNYPDVIYEDYGTAAANDIGDTNRSNEIPST
DVTDKTGREHLSVYAVVVIASVVGFCLLVMLFLLKLARHSKFGMKGPASVISNDDDSASPLHHISNGSNT
PSSSEGGPDAVIGMTKIPVIENPQEFGITNSQLKPDFTVQHIKRHNIVLKRRELGEAGFKVFLAECYNL
CPEQDKILVAVKTLKSDARNKDFHREAELLTNLQHEHIVKFGYVGVCEGDPLIMVFYMKHGDNLKFLR
AHGPDVLAEMAEGNPPELTQSQMLHIAQQIAAGMVYLASQHFVHRDLATRNCLVGENLLVKIGDFGMSRD
VESTDEERVGGHTMLPIRWMPPEIMYRKFTTESDVWSLGVVLWEIFTYQKQPWYQLSNNEVICITQGR
VLQRPRTCPQEVYELMLGCWQREPHMRKNIKGIHTLLQNLAKASPVELDILG
```

[0087]

[서열 식별 번호: 13]

[0088]

[0089] 바람직하게는, 상기 구현예에서, 제1 코딩 서열은, 아래 제시된 바와 같이, 서열 식별 번호 14로서 본 명세서에서 지칭된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

```
ATGTCGTCCTGGATAAGGTGGCATGGACCCGCCATGGCGCGGCTCTGGGGCTTCTGCTGGCTGGTTGTGG
GCTTCTGGAGGGCCGCTTTTCGCCTGTCCCAGTCTCTGCAAATGCAGTGCCTCTCGGATCTGGTGCAGCGA
CCCTTCTCCTGGCATCGTGGCATTTCGAGATTGGAGCCTAACAGTGTAGATCCTGAGAACATCACCGAA
ATTTTCATCGCAAACCAGAAAAGGTTAGAAAATCATCAACGAAGATGATGTTGAAGCTTATGTGGGACTGA
GAAATCTGACAAATTGTGGATTCTGGATTTAAAATTTGTGGCTCATAAAGCATTTCTGAAAAACAGCAACCT
GCAGCATCAAAATTTACCCGAAACAACTGACGAGTTTGTCTAGGAAACATTTCCGTCACCTTGACTTG
TCTGAACATGATCCTGGTGGGCAATCCATTACATGCTCCTGTGACATATATGTGGATCAAGACTCCCAAG
AGGCTAAATCCAGTCCAGACACTCAGGATTTGTACTGCCTGAATGAAAGCAGCAAGAATATTCGCCCTGGC
AAACCTGCAGATAACCAATTGTGGTTTGGCATCTGCAAATCTGGCCGCACCTAACCTCACTGTGGAGGAA
GGAAAGTCTATCACATTATCCTGTAGTGTGGCAGGTGATCCGGTTCCTAATATGTATTGGGATGTTGGTA
ACCTGGTTTTCCAAACATATGAATGAAACAAGCCACACACAGGGCTCCTTAAGGATAACTAACATTCATC
CGATGACAGTGGGAAGCAGATCTCTTGTGTGGCGGAAAATCTTGTAGGAGAAGATCAAGATTCGTCAAC
CTCACTGTGCATTTTGACCAACTATCACATTTCTCGAATCTCCAACCTCAGACCACCACTGGTGCATTC
CATTACCTGTGAAAAGGCAACCCCAACCCAGCGCTTCAGTGGTTCTATAACGGGGCAATATTGAATGAGTC
CAAATACATCTGTAATAAATACATGTTACCAATCACACGGAGTACCACGGCTGCCTCCAGCTGGATAAT
CCCCTCACATGAACAATGGGACTACACTCTAATAGCCAAGAATGAGTATGGGAAGGATGAGAAACAGA
TTTCTGCTCACTTCATGGGCTGGCCTGGAATTGACGATGGTGCAAACCCAAAATTATCCTGATGTAATTTA
TGAAGATTATGGAAGTGCAGCGAATGACATCGGGGACACCACGAACAGAAGTAATGAAATCCCTTCCACA
GACGTCAGTATAAAACCGGTCGGGAACATCTCTCGGTCTATGCTGTGGTGGTATTGCGTCTGTGGTGG
GATTTTGCCTTTTGGTAATGCTGTTTCTGCTTAAGTTGGCAAGACACTCCAAGTTTGGCATGAAAGGCC
AGCCTCCGTTATCAGCAATGATGATGACTCTGCCAGCCCACTCCATCACATCTCCAATGGGAGTAACACT
CCATCTTCTTCGGAAGGTGGCCAGATGCTGTGATTATTGGAATGACCAAGATCCCTGTGATTGAAAATC
CCCAGGAATTTGGCATCACCAACAGTCAGCTCAAGCCAGACACATTTGTTTTCAGCACATCAAGCGACATAA
CATTGTTCTGAAAAGGAGCTACGCAAGGAGCCCTTTGGAAAAGTGTTCCTAGCTGAATGCTATAACCTC
TGTCTGAGCAGACAAAGATCTTGGTGGCAGTGAAGACCCTGAAGGATGCCAGTGACAATGCACCAAGG
ACTTCCACCGTGAGGCCGAGCTCCTGACCAACCTCCAGCATGAGCACATCGTCAAGTTCTATGGCGTCTG
CGTGGAGGGCGACCCCTCATCATGTTCTTTGAGTACATGAAGCATGGGGACCTCAACAAGTTCCCTCAGG
GCACACGGCCCTGATGCCGTGCTGATGGCTGAGGGCAACCCGCCACGGAAGTACGACGAGTGCAGATGC
TGCATATAGCCAGCAGATCGCCGCGGGCATGGTCTACCTGGCGTCCAGCACTTCGTGCACCGCGATTT
GGCCACCAGGAAGTGCCTGGTGGGGGAGAACTTGTGGTGAATAACGGGGACTTTGGGATGTCCCGGGAC
GTGGAAGCACTGACGAAGAAAGGTCGGTGGCCACACAATGCTGCCCATTCGCTGGATGCCTCCAGAGA
GCATCATGTACAGGAAATTCACGACGGAAAGCGACGCTCTGGAGCCTGGGGTCTGTTGTGGGAGATTTT
```

[0090]

```
CACCTATGGCAAACAGCCCTGGTACCAGCTGTCAAACAATGAGGTGATAGAGTGTATCACTCAGGGCCGA
GTCTTGCAGCGACCCCGCACGTGCCCCAGGAGGTGTATGAGCTGATGCTGGGGTGTGGCAGCGAGAGC
CCCACATGAGGAAGAACATCAAGGGCATCCATACCCTCCTTCAGAACTTGGCCAAGGCATCTCCGGTCCA
ACTGGACATTTAGGC
```

[0091]

[서열 식별 번호: 14]

[0092]

[0093] 제2 코딩 서열이, 바람직하게는 영양성 인자의 뉴로트로핀 계열의 구성원인, TrkB 수용체의 효능체를 인코딩하는 것이 인정될 것이다. TrkB 수용체의 바람직한 효능체는 따라서 하기로 구성되는 효능체의 군으로부터 선택될

수 있다: 뇌유래 신경 성장 인자 (BDNF); 신경 성장 인자 (NGF); 뉴로트로핀-3 (NT-3); 뉴로트로핀-4 (NT-4); 및 뉴로트로핀-5 (NT-5); 또는 이들의 단편.

[0094] 각각의 이들 효능제의 아미노산 서열 및 뉴클레오타이드는 숙련가에 공지될 것이다. 그러나, 예로써, 뉴로트로핀-4 (NT-4)의 하나의 구현예의 아미노산 서열은, 하기와 같이, 실질적으로 서열 식별 번호 49에서 명시된 바와 같다:

```
MLPLPSCSLPILLLLFLLPSPVPIESQPPPSTLPPFLAPEWDLLSPRVVLSRCAPAGPPLLELLEAGAFRES
AGAPANRSRRGVSETAPASRRGELAVCDVAVSGWVTDRTAVDLRGREVEVLGEVFAAGGSPLRQYFFETR
CKADNAEEGGPGAGGGGCRGVDRRHVSECKAKQSYVRALTADAQGRVGRWRWIRIDTACVCTLLSRTGRA
```

[0095] [서열 식별 번호: 49]

[0097] 뉴로트로핀-4 (NT-4)의 상기 구현예의 핵산 코딩 서열은, 하기와 같이, 실질적으로 서열 식별 번호 50에서 명시된 바와 같다:

```
ATGCTCCCTCTCCCCTCATGCTCCCTCCCCATCCTCCTCCTTTTCTCCTCCCCAGTGTGCCAATTGAGT
CCCAACCCCCACCCTCAACATTGCCCCCTTTTCTGGCCCCCTGAGTGGGACCTTCTCTCCCCCGAGTAGT
CCTGTCTAGGGGTGCCCTGCTGGGCCCTCTGCTCTTCTGCTGGAGGCTGGGGCCTTTTCGGGAGTCA
GCAGGTGCCCGGCCAACCAGCCGCGTGGGGTGAGCGAAACTGCACCAGCGAGTCGTCGGGGTGAGC
TGGCTGTGTGCGATGCAGTCAGTGGCTGGGTGACAGACCCCGGACCGCTGTGGACTTGCGTGGGCGCGA
GGTGGAGGTGTTGGGCGAGGTGCCTGCAGCTGGCGGCAGTCCCCTCCGCCAGTACTTCTTTGAAACCCGC
TGCAAGGCTGATAACGCTGAGGAAGGTGGCCCGGGGCGAGGTGGAGGGGGCTGCCGGGGAGTGGACAGGA
GGCACTGGGTATCTGAGTGAAGGCCAAGCAGTCTATGTGCGGGCATTGACCGCTGATGCCAGGGCCG
TGTGGGCTGGCGATGGATTGAATTGACACTGCCTGCGTCTGCACACTCCTCAGCCGGACTGGCCGGGCC
```

[0098] [서열 식별 번호: 50]

[0100] NT-4 서열에 대한 신호 펩타이드의 아미노산 서열은, 하기와 같이, 실질적으로 서열 식별 번호 51에서 명시된 바와 같다:

```
MLPLPSCSLPILLLLFLLPSPVPIES
```

[0101] [서열 식별 번호: 51]

[0103] 상기 신호 펩타이드의 핵산 서열은, 하기와 같이, 실질적으로 서열 식별 번호 52에서 명시된 바와 같다:

```
ATGCTCCCTCTCCCCTCATGCTCCCTCCCCATCCTCCTCCTTTTCTCCTCCCCAGTGTGCCAATTGAGT
CC
```

[0104] [서열 식별 번호: 52]

[0106] 상기 NT-4 서열에 대한 프로펩타이드의 아미노산 서열은, 하기와 같이, 실질적으로 서열 식별 번호 53에서 명시된 바와 같다:

```
QPPPSTLPPFLAPEWDLLSPRVVLSRCAPAGPPLLELLEAGAFRESAGAPANRSRR
```

[0107] [서열 식별 번호: 53]

[0109] 상기 프로펩타이드의 핵산 서열은, 하기와 같이, 실질적으로 서열 식별 번호 54에서 명시된 바와 같다:

```
CAACCCCCACCCTCAACATTGCCCCCTTTTCTGGCCCCCTGAGTGGGACCTTCTCTCCCCCGAGTAGTCC
TGTCIAGGGGTGCCCTGCTGGGCCCTCTGCTCTTCTGCTGGAGGCTGGGGCCTTTTCGGGAGTCAGC
AGGTGCCCGGCCAACCAGCCGGCGT
```

[0110] [서열 식별 번호: 54]

[0112] 상기 NT-4 서열에 대한 성숙 단백질 서열의 아미노산 서열은, 하기와 같이, 실질적으로 서열 식별 번호 55에서 명시된 바와 같다:

```
GVSETAPASRRGELAVCDVAVSGWVTDRTAVDLRGREVEVLGEVFAAGGSPLRQYFFETRCKADNAEEGG
PGAGGGGCRGVDRRHVSECKAKQSYVRALTADAQGRVGRWRWIRIDTACVCTLLSRTGRA
```

[0113] [서열 식별 번호: 55]

[0115] 상기 성숙 NT-4 단백질의 핵산 코딩 서열은, 하기와 같이, 실질적으로 서열 식별 번호 56에서 명시된 바와 같다:

```
GGGGTGAGCGAAACTGCACCAGCGAGTCGTCGGGGTGAGCTGGCTGTGTGCGATGCAGTCAGTGGCTGGG
TGACAGACCCGCCGACCGCTGTGGACTTGCCTGGGCGCGAGGTGGAGGTGTTGGCCGAGGTGCCTGCAGC
TGGCGGCAGTCCCTCCGCCAGTACTTCTTTGAAACCCGCTGCAAGGCTGATAACGCTGAGGAAGGTGGC
CCGGGGGCAGGTGGAGGGGGCTGCCGGGGAGTGACAGGAGGCACTGGGTATCTGAGTGCAAGGCCAAGC
AGTCCTATGTGCGGGCATTGACCGCTGATGCCAGGGCCGTGTGGGCTGGCGATGGATTCCAATTGACAC
TGCTGCGTCTGCACACTCCTCAGCCGGACTGGCCGGGCC
```

[0116]

[서열 식별 번호: 56]

[0118] 따라서, 하나의 바람직한 구현예에서, 제2 코딩 서열은, 실질적으로 서열 식별 번호: 49 또는 55에서 명시된 바와 같은 아미노산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는, 뉴로트로핀-4 (NT-4)를 인코딩한다. 따라서, 제2 코딩 서열은 실질적으로 서열 식별 번호: 50 또는 56에서 명시된 바와 같은 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함할 수 있다.

[0119] TrkB 수용체의 가장 바람직한 효능제는, 그러나, prepro-뇌유래 신경 성장 인자 (pre-pro-BDNF), pro-BDNF 또는 성숙 BDNF (mBDNF)를 포함한다. BDNF는, 내형질 망에서 발견된 리보솜에 의해, 전구체 단백질, preproBDNF로서 초기에 합성된다. 인간 preproBDNF 유전자 (ENS00000176697)에 의해 인코딩된 적어도 17 공지된 스플라이스 변이체가 있다. 일단 preproBDNF가 조잡한 내형질 망으로 진입하면, preproBDNF는 신호 펩타이드 (즉 "pre" 서열)의 절단에 의해 proBDNF로 전환된다. proBDNF는 proBDNF에서 존재하는 추가의 N-말단 펩타이드 서열의 절단에 의해 mBDNF로 전환된다. 양쪽 proBDNF 및 mBDNF는 그 다음 세포의 공간으로 분비되고, 여기에서 이들은, RGCs 및 내이 세포를 포함하는, 다양한 세포에서 수용체에 결합하고 상기를 활성화시킨다.

[0120] proBDNF는, 활성화된 경우, RGCs 및 내이 세포에서 세포자멸사를 유도하는, 수용체, p75^{NTR}에 우선적으로 결합하고 상기를 활성화시킨다. 따라서, 하나의 바람직한 구현예에서, proBDNF는 p75^{NTR} 수용체의 효능제이다. 일 구현예에서, proBDNF는 표준적 proBDNF이다. 바람직하게는, 표준적 proBDNF는, 아래 제시된 바와 같이, 서열 식별 번호 15로서 본 명세서에서 지칭된 아미노산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

```
APMKEANIRGQGLLAYPGVTRHGTLESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHVIEELLEDEDQKVRPNEENKDDAD
LYTSRVM LSSQVPLEPPLFLLEEYKNYLDAANMSMRVRRHSDPARRGELSVCDSEWVTAADKKTAVD
MSGGTVTVLEKVPVSKGQLKQYFYETKCNPMGYTKEGCRGIDKRHWNSQCRRTTQSYVRALTMDSKKRIGW
RFIRIDTSCVCTLTIKRGR
```

[0121]

[서열 식별 번호: 15]

[0123] 바람직하게는, 상기 구현예에서, 제2 코딩 서열은, 아래 제시된 바와 같이, 서열 식별 번호 16으로서 본 명세서에서 지칭된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

```
GCCCCATGAAAGAAGCAAACATCCGAGGACAAGGTGGCTTGGCCTACCCAGGTGTGCGGACCCATGGGA
CTCTGGAGAGCGTGAATGGGCCCAAGGCAGGTTCAAGAGGCTTGACATCATTGGCTGACACTTTGAAACA
CGTGATAGAAGAGCTGTTGGATGAGGACCAGAAAGTTCGGCCCAATGAAGAAAAACAATAAGGACGCAGAC
TTGTACACGTCCAGGGTGATGCTCAGTAGTCAAGTGCCTTTGGAGCCTCCTCTTCTCTTTCTGCTGGAGG
```

[0124]

```
AATACAAAAATTACCTAGATGCTGCAAACATGTCCATGAGGGTCCGCGGCCACTCTGACCCGTGCCCGCCG
AGGGGAGCTGAGCGTGTGACAGTATTAGTGAGTGGGTAACGGCGGCAGACAAAAAGACTGCAGTGGAC
ATGTCGGGCGGGACGGTCACAGTCTTGAAGGTTCCCTGTATCAAAAGGCCAACTGAAGCAATACTTCT
ACGAGACCAAGTGCAATCCCATGGGTACACAAAAGAAGGCTGCAGGGCCATAGACAAAAGGCATTGGAA
CTCCAGTGCCGAACACTACCCAGTCTGACGTGCGGGCCCTTACCATGGATAGCAAAAAGAGAATTGGCTGG
CGATTTCATAAGGATAGACACTTCTGTGTATGTACATTGACCATTAAGGGGAAGATAG
```

[0125]

[서열 식별 번호: 16]

[0127] 또 다른 구현예에서, proBDNF는, 바람직하게는 발린 내지 메티오닌 돌연변이 (아미노산 밀줄친)을 포함하는, proBDNF의 동형체 2이다. 바람직하게는, proBDNF의 동형체 2는, 아래 제시된 바와 같이, 서열 식별 번호 17로서

본 명세서에서 지칭된 아미노산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

```
APMKEANIRGQGGLAYPGVTRHGTLESVNGPKAGSRGLTSLADTFEHMIEELLDEDQKVRPNEENNKDAD
LYTSRVMLSSQVPLEPPLFLLEEYKNYLDAANMSMRVRRHSDPARRGELSVCDSEWVTAADKKTAVD
MSGGTVTIVLEKVPVSKGQLKQYFYETKCNPMGYTKEGCRGIDKRHWNSQCRTTQSYVRALTMDSKKRIGW
RFIRIDTSCVCTLTIKRGR
```

[0128]

[0129]

[서열 식별 번호: 17]

[0130]

일 구현예에서, 그러나, 효능제는 proBDNF, 또는 이의 단편 또는 변이체가 아니지만, 대신에 제2 코딩 서열은 바람직하게는 성숙 BDNF를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 성숙 BDNF (mBDNF)는, 활성화된 경우, RGCs 및/또는 내이 세포의 생존을 촉진시키는, TrkB에 우선적으로 결합하고 상기를 활성화시킨다. 따라서, 성숙 BDNF는 TrkB의 가장 바람직한 효능제이다. 제1 측면에 따른 작제물이 유리한 것은, 다른 공지된 유전적 작제물과 달리, 작제물이 미스폴딩되지 않는 성숙 BDNF 단백질을 생산할 수 있기 때문이다.

[0131]

따라서, 하나의 바람직한 구현예에서, 제2 코딩 서열은 성숙 BDNF를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. mBDNF는 유전자에 의해 인코딩된 모든 17 동형체에 공통이다. 7 단백질 상이한 서열이 있고, 이중 5개는 표준적 형태로 신호 서열을 연장시키고, 1개는 표준적 신호 서열을 갖지만, (동형체 2, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 및 16에 공통인) 발린 내지 메티오닌 돌연변이는 예외다. 발린 내지 메티오닌 돌연변이가 세포로부터 BDNF의 방출을 감소시킨다고 여겨진다.

[0132]

바람직하게는, 성숙 BDNF는, 아래 제시된 바와 같이, 서열 식별 번호 18로서 본 명세서에서 지칭된 아미노산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

```
HSDPARRGELSVCDSEWVTAADKKTAVDMSGGTVTIVLEKVPVSKGQLKQYFYETKCNPMGYTKEGCRG
IDKRHWNSQCRTTQSYVRALTMDSKKRIGWRFIRIDTSCVCTLTIKRGR
```

[0133]

[0134]

[서열 식별 번호: 18]

[0135]

바람직하게는, 제2 코딩 서열의 상기 구현예는, 아래 제시된 바와 같이, 서열 식별 번호 19로서 본 명세서에서 지칭된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

```
ATGACCATCCTTTTCCTTACTATGGTTATTTTCATACTTTGGTTGCATGAAGGCTGCCCCCATGAAAGAAG
CAAACATCCGAGGACAAGGTGGCTTGGCCTACCCAGGTGTGCGGACCCATGGGACTCTGGAGAGCGTGAA
TGGGCCCAAGGCAGGTTCAAGAGGCTTGACATCATTGGCTGACACTTTCGAACACGTGATAGAAGAGCTG
TTGGATGAGGACCAGAAAGTTCGGCCCAATGAAGAAAAACAATAAGGACGCAGACTTGTACACGTCCAGGG
TGATGCTCAGTAGTCAAGTGCCTTTGGAGCCTCCTCTTCTCTTTCTGCTGGAGGAATACAAAAATTACCT
AGATGCTGCAACATGTCCATGAGGTTCCGGCGCCACTCTGACCTGCCCGCCGAGGGGAGCTGAGCGTG
TGTGACAGTATTAGTGAGTGGGTAACGGCGGCAGACAAAAAGACTGCAGTGGACATGTCGGGCGGGACGG
TCACAGTCCTTGAAAAGGTCCCTGTATCAAAAGGCCAACTGAAGCAATACTTCTACGAGACCAAGTGCAA
TCCCATGGGTTACACAAAAGAAGGCTGCAGGGGCATAGACAAAAGGCATTGGAACCTCCAGTGCCGAAC
ACCCAGTCGTACGTGCGGGCCCTTACCATGGATAGCAAAAAGAGAATTGGCTGGCGATTCCATAAGGATAG
ACACTTCTTGTGTATGTACATTGACCATTAAGGGGAAGATAG
```

[0136]

[0137]

[서열 식별 번호: 19]

[0138]

더욱 또 다른 바람직한 구현예에서, 효능제는 그것의 N-말단에 접합된 신호 펩타이드를 가진 mBDNF이다. 아래에 논의된 바와 같이, 신호 펩타이드는 preproBDNF의 표준적 신호 펩타이드, 또는 IL-2, 또는 본 발명자들에 의해 창출된 드 노보 신규한 신호 서열의 신호 펩타이드일 수 있다.

[0139]

바람직하게는, 제2 코딩 서열은 TrkB 수용체의 효능제용 신호 펩타이드, 가장 바람직하게는 BDNF용 신호 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 하나의 바람직한 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열은 BDNF용 표준적 신호 펩타이드를 인코딩한다. 바람직하게는, 제2 코딩 서열의 상기 구현예는, 아래 제시된 바와 같이, 서열 식별 번호 20으로서 본 명세서에서 지칭된 아미노산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 신호 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0140]

MTILFLTMVISYFGCMKA

[0141]

[서열 식별 번호: 20]

[0142]

바람직하게는, 제2 코딩 서열의 상기 구현예는, 아래 제시된 바와 같이, 서열 식별 번호 21로서 본 명세서에서

지칭된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다:

[0143] ATGACCATCCTTTTCCTTACTATGGTTATTTTCATACTTCGGTTGCATGAAGGCG

[0144] [서열 식별 번호: 21]

[0145] 본 발명자들은 일련의 연장된 신호 펩타이드를 창출하였다. 바람직한 구현예에서, BDNF용 동형체 신호 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 하기로 구성된 군으로부터 선택된다: 동형체 2, 3, 6, 5 및 4. 각각의 이들 연장된 신호 펩타이드용 아미노산 서열 및 핵산은 아래에 명시된다.

[0146] **동형체 2**

[0147] MFHQVRRVMTILFLTMVISYFGCMKA

[0148] [서열 식별 번호: 22]

[0149] ATGTTCCACCAGGTGAGAAGAGTGATGACCATCCTTTTCCTTACTATGGTTATTTTCATACTTCGGTTGCA
TGAAGGCG

[0150] [서열 식별 번호: 23]

[0151] **동형체 3 및 6**

[0152] MQSREEEWFHQVRRVMTILFLTMVISYFGCMKA

[0153] [서열 식별 번호: 24]

[0154] ATGCAGAGCCGGGAAGAGGAATGGTTCCACCAGGTGAGAAGAGTGATGACCATCCTTTTCCTT
ACTATGGTTATTTTCATACTTCGGTTGCATGAAGGCG

[0155] [서열 식별 번호: 25]

[0156] **동형체 5**

[0157] MLCAISLCARVRKLRSAAGRCGKFHQVRRVMTILFLTMVISYFGCMKA

[0158] [서열 식별 번호: 26]

[0159] ATGCTCTGTGCGATTTTCATTGTGTGCTCGCGTTCGCAAGCTCCGTAGTGCAGGAAGGTGCGGGAAGTTCC
ACCAGGTGAGAAGAGTGATGACCATCCTTTTCCTTACTATGGTTATTTTCATACTTCGGTTGCATGAAGGC
G

[0160] [서열 식별 번호: 27]

[0161] **동형체 4**

[0162] MCGATSFLHECTRLILVTTQNAEFLQKGLQVHTCFGVYPHASVWHDCASQKKGCAVYLHVSVEFNKLIPE
NGFIKFHQVRRVMTILFLTMVISYFGCMKA

[0163] [서열 식별 번호: 28]

[0164] ATGTGTGGAGCCACCAGTTTTCTCCATGAGTGCACAAGGTTAATCCTTGTACTACTCAGAATGCTGAGT
TTCTACAGAAAGGGTTGCAGGTCCACACATGTTTTGGCGTCTACCCACACGCTTCTGTATGGCATGACTG
TGCATCCCAGAAGAAGGGCTGTGCTGTGTACCTCCACGTTTCAGTGAATTTAACAACTGATCCCTGAA
AATGGTTTCATAAAGTTCCACCAGGTGAGAAGAGTGATGACCATCCTTTTCCTTACTATGGTTATTTTCAT
ACTTCGGTTGCATGAAGGCG

[0165] [서열 식별 번호: 29]

[0166] 따라서, 바람직한 구현예에서, 제2 코딩 서열은 서열 식별 번호 23, 25, 27 또는 29의 어느 하나로서 본 명세서에서 지칭된 신호 서열 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 바람직하게는, 신호 펩타이드는 서열 식별 번호 22, 24, 26 또는 28의 어느 하나로서 본 명세서에서 지칭된 아미노산 서열을 포함한다.

[0167] 본 발명자들은 또한 효능제, 바람직하게는 BDNF용 신규한 신호 펩타이드의 다양한 구현예를 창출하였다. 이들 신호 펩타이드는 (부가된 라이신 (K) 및 아르기닌 (R) 잔기로) N-말단 부분의 염기도의 수준 및 (류신 (L) 잔기의 부가로) 진행되는 소수성 영역을 증가시키고, 이는 야생형 표준적 신호 서열로 관측된 수준과 비교된 BDNF의 분비를 증가시킨다.

- [0168] **a) QTA003P (IL-2 신호)**
- [0169] MYRMQLLSICIALSLALVTNS
- [0170] [서열 식별 번호: 30]
- [0171] ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACAAACAGT
- [0172] [서열 식별 번호: 31]
- [0173] **b) QTA004P**
- [0174] MKRRVMIILFLTMVISYFGCMK
- [0175] [서열 식별 번호: 32]
- [0176] ATGAAAAGAAGAGTGATGATCATCCTTTTCCTTACTATGGTTATTTTCATACTTCGGTTGCATGAAGAGCG
- [0177] [서열 식별 번호: 33]
- [0178] **c) QTA009P (변형된 IL-2)**
- [0179] MRRMQLLLLIALSLALVTNS
- [0180] [서열 식별 번호: 34]
- [0181] ATGAGGAGGATGCAACTCCTGCTCCTGATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACAAACAGT
- [0182] [서열 식별 번호: 35]
- [0183] **d) QTA010P**
- [0184] MRRMQLLLLTMVISYFGCMKA
- [0185] [서열 식별 번호: 36]
- [0186] ATGAGGAGGATGCAACTCCTGCTCCTGACTATGGTTATTTTCATACTTCGGTTGCATGAAGGCG
- [0187] [서열 식별 번호: 37]
- [0188] **e) QTA0012P**
- [0189] MRILLLTMVISYFGCMKA
- [0190] [서열 식별 번호: 38]
- [0191] ATGAGAATCCTTCTTCTTACTATGGTTATTTTCATACTTCGGTTGCATGAAGGCG
- [0192] [서열 식별 번호: 39]
- [0193] **f) QTA0013P**
- [0194] MRRILFLTMVISYFGCMKA
- [0195] [서열 식별 번호: 40]
- [0196] ATGAGAAGAATCCTTTTCCTTACTATGGTTATTTTCATACTTCGGTTGCATGAAGGCG
- [0197] [서열 식별 번호: 41]
- [0198] **g) QTA0014P**
- [0199] MRRFLFLLVISYFGCMKA
- [0200] [서열 식별 번호: 42]
- [0201] ATGAGGAGGTTCTTTTCCTTCTTGTATTTTCATACTTCGGTTGCATGAAGGCG
- [0202] [서열 식별 번호: 43]
- [0203] **i) QTA0015P**

- [0204] MRRFLFLLYFGCMKA
- [0205] [서열 식별 번호: 44]
- [0206] ATGAGGAGGTTCCCTTTTCCTTCTTTACTTCGGTTGCATGAAGGCG
- [0207] [서열 식별 번호: 45]
- [0208] 도 6은 효능제, 바람직하게는 BDNF의 분비를 증진시키기 위해 본 발명의 작제물에서 사용된 신호 펩타이드의 추가 바람직한 구현예에 대하여 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 보여준다. 신호 펩타이드에서 제2 잔기는 바람직하게는 1종 이상의 염기성 잔기, 예컨대 라이신 (K) 또는 아르기닌 (R)에 의해 대체되는 트레오닌 (T)이다. 이소류신 (I), 류신 (L), 페닐알라닌 (F) 및 류신 (L)을 포함하는 신호 펩타이드에서 잔기의 다음 스트레치는 바람직하게는 1종 이상의 소수성 잔기에 의해 대체된다.
- [0209] 따라서, 바람직한 구현예에서, 제2 코딩 서열은 서열 식별 번호 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101 또는 103의 어느 하나로서 본 명세서에서 지칭된 신호 서열 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 바람직하게는, 신호 펩타이드는 서열 식별 번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100 또는 102의 어느 하나로서 본 명세서에서 지칭된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0210] 따라서, 본 발명자들이, 내인성 서열로 달성된 적 있는 상기 방출 및 BDNF 생산을 상당히 증진시키는, 완전히 신규한 신호 펩타이드의 도입과 조합된, 생성된 적절하게 폴딩된 성숙 BDNF의 결과로, 또한 이전에 달성되지 않았던, pro-서열의 제거에 의해 BDNF 유전자 서열을 변형시켰다는 것이 인정될 것이다.
- [0211] 바람직하게는, 유전적 작제물은 좌 및/또는 우 역 말단 반복 서열 (ITRs)을 포함한다. 바람직하게는, 각각의 ITR은 작제물의 5' 및/또는 3' 말단에서 배치된다. ITR은 바이러스 (예를 들면 AAV 또는 렌티바이러스) 혈청형에 특이적일 수 있고, 그것의 2차 구조에서 헤어핀 루프를 형성하는 한, 임의의 서열일 수 있다.
- [0212] ITR의 (상업적으로 입수가 가능한 AAV 플라스미드로부터 좌 ITR) 일 구현예의 DNA 서열은, 하기와 같이, 서열 식별 번호: 46으로서 본 명세서에서 표시된다:
 CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTTCGCCCGG
 CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTTCCT
- [0213]
- [0214] [서열 식별 번호:46]
- [0215] ITR의 (상업적으로 입수가 가능한 AAV 플라스미드로부터 우 ITR) 또 다른 구현예의 DNA 서열은, 하기와 같이, 서열 식별 번호: 47로서 본 명세서에서 표시된다:
 AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACC
 AAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAG
 G
- [0216]
- [0217] [서열 식별 번호:47]
- [0218] 전술로부터, 숙련가는 제1 측면의 작제물의 구현예의 뉴클레오타이드 서열, 뿐만 아니라 인코딩된 전이유전자의 아미노산 서열을 인식할 것이다. 그러나, 의심할 여지를 없애기 위해, 플라스미드 QTA020P (및 벡터 QTA020V) 내에 함유된 칫과 TrkB 수용체-바이러스성-2A 펩타이드-mBDNF에 대하여 코돈 최적화된 2940 bp 서열의 코딩 서열은, 하기와 같이, 서열 식별 번호: 107로서 여기에서 지칭된다:

ATGAGCCCATGGCTGAAGTGGCACGGACCAGCAATGGCAAGACTGTGGGGCCTGTGCCTGCTGGTGTGG
 GCTTCTGGAGAGCCAGCCTGGCCTGTCCAACCTCCTGCAAGTGTAGCTCCGCCAGGATCTGGTGACAGA
 GCCTTCTCCAGGCATCGTGGCCTTTCCCGCCTGGAGCCTAACAGCGTGGATCCCGAGAATATCACCGAG
 ATCCTGATCGCCAACCAGAAGCGGCTGGAGATCATCAATGAGGACGATGTGGAGGCTACGTGGGCCTGA
 GAAACCTGACAATCGTGGACTCCGGCCTGAAGTTCTGTGGCCTATAAGGCCTTTCTGAAGAACTCTAATCT
 GAGGCACATCAACTTACCCGCAATAAGCTGACATCTCTGAGCCGGAGACTTTCCGCACCTGGATCTG
 TCCGACCTGATCCTGACCGGCAATCCATTACATGCTCTTGTGACATCATGTGGCTGAAGACCCTGCAGG
 AGACAAAGTCTAGCCCGGATACCCAGGACCTGTACTGTCTGAACGAGTCTCTAAGAATATGCCTCTGGC
 CAACCTGCAGATCCCTAATTTGTGGACTGCCAAGCGCCCGGCTGGCCGACCTAACCTGACAGTGGAGGAG
 GGCAAGTCCCGTGAAGTGTCTTCTGTGGGGCGGATCCCTGCCTACCCTGTATTGGGACGTGGGCA
 ACCTGGTGTCTAAGCACATGAATGAGACCTCCACACACAGGGCTCTCTGAGAATCACAAATATCAGCTC
 CGACGATAGCGGCAAGCAGATCTCTTGGCTGGCAGAGAACCTGGTGGGAGAGGATCAGGACAGCGTGAAT
 CTGACCGTGCACCTTCCGCCCCACCATCACATTTCTGGAGTCTCTACCAGCGATCACCCTGGTGCATCC
 CCTTACAGTGCAGGGAAACCCAAAGCCCGCCTGCAGTGGTTTTACAACGGCGCCATCCTGAATGAGTC
 CAAGTATATCTGTACCAAGATCCACGTGACCAACCACACAGAGTACCACGGCTGCCTGCAGCTGGATAAT
 CCCACCCACATGAACAATGGCGACTACACACTGATGGCCAAGAACGAGTATGGCAAGGACGAGAGGCAGA
 TCAGCGCCCACTTCATGGGCCCGCCTGGAGTGGATTATGAGACCAACCCTAATTACCCAGAGGTGCTGTA
 TGAGGACTGGACCACCTACCGATATCGGGGACACCACAAACAAGTCTAATGAGATCCCAAGCACAGAT
 GTGGCCGACAGTCTAACAGGGAGCACCTGAGCGTGTACGCAGTGGTGTTCATCGCCTCCGTGGTGGGCT
 TCTGCCTGCTGGTTCATGCTGCTGCTGCTGAAGCTGGCCCGCCACTCTAAGTTTGGCATGAAGGGCCAGC
 CTCCGTGATCTCTAATGACGATGACAGCGCCAGCCCCCTGCACCACATCAGCAACGGCTCCAATACCCCT
 TCTAGCTCCGAGGGCGGCCAGATGCCGTGATCATCGGCATGACAAAGATCCCGTGATCGAGAACCCTC
 AGTACTTCCGCATCACCAATTTCCAGCTGAAGCCTGACACATTTGTGCAGCACATCAAGCGGCACAAAT
 CGTCTGAAGAGGGAAGTGGGAGAGGGAGCCTTCGGCAAGGTGTTTTCTGGCCGAGTGTATAACCTGTGC
 CCAGAGCAGATAAGATCCTGGTGGCCGTGAAGACCTGAAGGATGCCAGCGACAACGCCCGAAGGACT
 TCCACAGAGAGGCCGAGCTGCTGACAAAATCTGCAGCAGGACACATCGTGAAGTTTTACGGCGTGTGCGT
 GGAGGGCGACCCTCTGATCATGCTGTTTCGAGTATATGAAGCACGGCGATCTGAACAAGTTTCTGAGAGCA
 CACGGACCAGATGCCGTGCTGATGGCAGAGGAAATCCCCCTACCGAGCTGACACAGTCTCAGATGCTGC
 ACATGACAGCAGATGACAGCAGGAATGGTGTACCTGGCCAGCCAGCACTTCGTGCACAGGGATCTGGC
 AACCAAGAACTGCCTGGTGGGAGAGAATCTGCTGGTGAAGATCGGCGACTTTGGCATGTCCCGGGACGTG
 TACTCTACCGACTACTATAGAGTGGGCGGCCACACAATGCTGCCCATCAGGTGGATGCCACCCGAGAGCA
 TCATGTATCGCAAGTTCACCACAGAGTCTGACGTGTGGAGCCTGGGCGTGGTGTGTGGGAGATCTTTAC
 CTACGGCAAGCAGCCTTGGTATCAGCTGTCCAAATGAAGTATCGAGTGTATTACACAGGGACCGGTG
 CTGCAGAGGCCACGCACATGCCCCAGGAGGTGTACGAGCTGATGCTGGGCTGTTGGCAGCGGAGCCAC
 ACACCAGAAAGAATCAAGAGCATCCACACACTGCTGCAGAAATCTGGCCAAGGCCTCCCCGTGTATCT
 GGACATCTGGGCAGCGGAGCTACTAAGTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCT
 GGACCTATGAGAATCCTTCTTCTTACTATGGTTATTTTACACTTCCGGTGCATGAAGGGCGCACTCCGACC
 CTGCCCCCGTGGGAGCTGAGCGTGTGTGACAGTATTAGCGAGTGGTGCACAGCGGCAGATAAAAAGAC
 TGCAGTGGACATGTCTGGCGGACGGTACAGTCTTAGAGAAAGTCCCGGTATCCAAAGGCCAACTGAAG

[0219]

CAGTATTTCTACGAGACCAAGTGAATCCCATGGGTTACACCAAGGAAGGCTGCAGGGGCATAGACAAAA
 GGCCTGGAAGTCCGAATGCCGAAGTACCCAATCGTATGTTCCGGCCCTTACTATGGATAGCAAAAAGAG
 AATTGGCTGGCGATTCATAAGGATAGACACTTCTGTGTATGTACTGACCATTAAAAGGGGAAGATAG

[0220]

[0221] [서열 식별 번호: 107]

[0222]

플라스미드 QTA029P (및 벡터 QTA029V) 내에 함유된 인간 TrkB 수용체-바이러스성-2A 펩타이드-mBDNF에 대하여 코돈 최적화된 2943 bp 서열의 코딩 서열은, 하기와 같이, 서열 식별 번호: 108로서 여기에서 지칭된다:

ATGTCATCTTGGATCCGCTGGCACGGGCCAGCGATGGCCCCGATTGTGGGGCTTCTGCTGGCTTGTGTAG
 GCTTCTGGCGCGCGCGGCTTCGCGTGTCCGACCTCTTGCAAATGCTCAGCAAGCCGAATTTGGTGTCTAGA
 CCCTAGTCCAGGAATTGTTGCATTCCCCGACTGGAACCAAACCCGTCGACCCGGAGAATATAACTGAG
 ATATTTATTGCAAATCAAAAACGCCCTTGAAATCATTAAACGAGGATGACGTGGAGGCCTACGTTGGTTTTGA
 GAAATCTTACTATTGTCGACTCCGGACTTAAATTTGTAGCTCATAAAGCCTTCCTGAAGAACTCTAATCT
 GCAGCACATTAATTTACAGAGAAATAAGCTGACCAGCTTGTCCCGAAGCATTTCGCCATCTCGACCTG
 AGCGAGCTCATACTGGTCGGAAAACCCATTTACGTGCTCCTGTGACATCATGTGGATCAAAAACCTGCAAG
 AGGCGAAAAGTAGTCCGGATACCCAAGACCTTTACTGTCTTAATGAAAGCTCAAAAAATATCCCGCTGGC
 CAACCTGCAGATACCGAATGCGGACTTCCTAGTGCGAATTTGGCTGCCCAAATCTTACCGTCGAAGAA
 GGCAAATCAATCACGCTTTCTGTTCTGTAGCTGGAGATCCAGTGCCTAATATGTATTGGGACGTGGGTA
 ACCTCGTCTCAAAACATATGAACGAAACGAGCCACACCCAGGGCTCTTTGCGGATAACAAACATCTCCTC
 TGATGATTTCTGGAAAGCAAATCAGTTGCGTAGCTGAAAATCTGGTTGGCGAAGATCAAGATTCAGTCAAT
 CTGACAGTCCATTTGCCCCAACGATCACCTTTCTGGAGAGCCCAACTAGCGATCACCACTGGTGTATTC
 CGTTTACGGTAAAAGGAAATCCAAAACCTGCACTCCAATGGTTTTATAATGGAGCCATCTGAATGAAAG
 CAAATATATCTGTACTAAAATCCATGTGACGAATCACACCGAGTATCACGGGTGCTTCAATTGGATAAT
 CCAACCCATATGAATAATGGTGATTATACTTTGATAGCGAAGAACGAATACGGCAAAGACGAAAAGCAA
 TATCCGCACATTTTCATGGGTTGGCCTGGCATCGACGACGGTGGCAACCCGAACCTACCCAGATGTTATTTA
 CGAGGATTATGGGACTGCGGCAAACGACATTGGCGACACCACAAACCGAAGCAACGAGATACCAAGTACT
 GACGTCACGACAAAACGGGTGAGAGCATTTGTCTGTTTACGCCGTTGTTGTTATCGCCTCAGTTGTG
 GATTTTGCTGTTGGTTCATGCTTTTCTCCTGAAGCTCGCGGACATTCGAAGTTTGGCATGAAGGGG C
 CAGCAAGTGTTATATCCAATGATGATGATAGCGCTTCTCCATTGCACCACATAAGTAACGGCTCAAACAC
 GCCGTCATCTAGTGAAGGTGGACCAGACGCGGTCAATTATAGGGATGACTAAAATTTCCCGTAATCGAAAAC
 CCTCAGTACTTCCGCATAACCAACAGTCAGCTTAAACCCGATACTTTCGTGCAGCACATCAAAAGGCACA
 ACATAGTCTCAAGCGGAACTCGGGGAGGGAGCCTTCGAAAGGTCTTTCTTGCTGAGTGTATAATTT
 GTGTCTGAGCAGGATAAAATTTCTTGTGGCTGTAAAACTCTCAAAGATGCTTCCGACAACGCACGGAAG
 GATTTTCATCGGGAGGCCGAACTGTTGACGAATTTGCAGCAGCAGCATATAGTAAAGTTCTACGGGGTAT
 GTGTTGAGGGGGACCCGTTGATTATGGTCTTCGAGTATATGAAGCACGGGGACCTGAACAAAATTTTGGC
 CGCCCATGGGCTGATGCCGTCCTTATGGCAGAAGGGAACCTCCAACAGAACTCACCCAGAGTCAGATG
 TTGCACATAGCGCAACAGATCGCGGCCGGCATGGTTACCTGGCCAGTCAACACTTCGTGCATAGAGATC
 TTGCCACTCGCAACTGTTTGGTCGGGGAGAACCTTCTGGTTAAGATTGGTACTTTGGTATGTCACGAGA

[0223]

TGTGTATTCCACTGACTATTACAGAGTTGGGGGTCATAAATGCTTCCATTCGGTGGATGCCCCCGAA
 TCCATCATGTACAGAAAGTTCACGACAGAGATGATGTT TGG AGT CTCGGCGTGGTGCTCTGGGAAA
 TTTTCACATACGAAAGCAGCCGTGGTATCAACTTAGCAACAATGAGGTGATAGAGTGTATTACACAGGG
 TCGGGTGTTCAGCGCCCTCGAACGTGCCACAAGAAGTATATGAACTTATGCTCGGGTGTGGCAAAGA
 GAACCACATATGAGAAAAATATCAAGGGGATACATACATTGCTTCAAGACTTGGCCAAGGCATCACCCG
 TCTACCTCGATATACTGGGACGGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGA
 GAACCTGGACCTATGAGAATCCTTCTTCTTACTATGGTTATTTCACTTCGGTTGCATGAAGGGCAC
 TCCGACCTGCCCCCGTGGGGAGCTGAGCGTGTGTGACAGTATTAGCGAGTGGGTACAGCGGCAGATA
 AAAAGACTGCAGTGGACATGCTTGGCGGGACGGTCACAGTCTTAGAGAAAAGTCCCGGTATCCAAAGGCCA
 ACTGAAGCAGTATTTCTACGAGACCAAGTGTAAATCCCATGGGTTACACCAAGGAAGGCTGCAGGGGCATA
 GACAAAAGGCACTGGAACCTCGCAATGCCGAACCTACCAATCGTATGTTCCGGGCCCTTACTATGGATAGCA
 AAAAGAGAATTGGCTGGCGATTCATAAGGATAGACACTTCTGTGTATGTACACTGACCATTAAGGGG
 AAGATAG

[0224]

[0225] [서열 식별 번호: 108]

- [0226] 그러므로, 가장 바람직한 구현예에서, 작제물은 실질적으로 서열 식별 번호: 107 또는 108에서 명시된 바와 같은 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0227] 본 발명자들은 본 발명의 작제물을 포함하는 일련의 재조합 발현 벡터를 창출하였다.
- [0228] 따라서, 제2 측면에 따르면, 제1 측면에 따른 유전적 작제물을 포함하는 재조합 벡터가 제공된다.
- [0229] 재조합 벡터는 재조합 AAV (rAAV) 벡터일 수 있다. rAAV는 자연 발생 벡터 또는 하이브리드 AAV 혈청형을 갖는 벡터일 수 있다. rAAV는 AAV-1, AAV-2, AAV-3A, AAV-3B, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, 및 AAV-11일 수 있다. 바람직하게는, rAAV는 rAAV 혈청형-2이다.
- [0230] 유리하게는, 재조합 AAV2는 숙주 유기체에서 최소 면역 반응을 유발시키고 벡터 투여 이후 적어도 1년 동안 망막에서 존재할 수 있는 장기간 전이유전자 발현을 매개한다.
- [0231] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "재조합 AAV (rAAV) 벡터"는 적어도 하나의 말단 반복 서열을 함유하는 재조합 AAV-유래된 핵산을 의미한다.
- [0232] 벡터의 바람직한 구현예는 도 2-5에서 보여진다.
- [0233] 본 명세서에서 기재된 작제물 및 발현 벡터는 시신경 장애 및 달팽이관 장애를 치료하는데, 그리고 더욱 일반적으로 신경 재생 및 생존을 촉진시키는데 사용될 수 있다.
- [0234] 그러므로, 제3 측면에 따르면, 약제로서 또는 요법에서 사용하기 위한, 제1 측면에 따른 유전적 작제물, 또는 제2 측면에 따른 재조합 벡터가 제공된다.
- [0235] 제4 측면에 따르면, 시신경 장애 또는 달팽이관 장애의 치료, 예방 또는 완화에서 사용하기 위해, 또는 신경 재생 및/또는 생존을 촉진시키기 위해, 제1 측면에 따른 유전적 작제물, 또는 제2 측면에 따른 재조합 벡터가 제공된다.
- [0236] 제5 측면에 따르면, 대상체에서 시신경 장애 또는 달팽이관 장애의 치료, 예방 또는 완화, 또는 대상체에서 신경 재생 및/또는 생존의 촉진 방법으로서, 상기 치료를 필요로 하는 대상체에 제1 측면에 따른 유전적 작제물, 또는 제2 측면에 따른 재조합 벡터의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0237] 바람직하게는, 발명에 따른 유전적 작제물 또는 재조합 벡터는 유전자 요법 기술에서 사용된다. 작제물 또는 벡터에 의해 인코딩된 효능제는 작제물/벡터에 의해 또한 인코딩된 TrkB를 활성화시켜 이로써 망막 신경절 세포 (RGCs) 또는 내이 세포의 생존을 촉진시킨다.
- [0238] 일 구현예에서, 치료되는 시신경 장애는 녹내장, 또는 RGCs의 손실, 예컨대 머리 또는 얼굴 또는 혈관 상해에 대한 트라우마, 예를 들어 시신경으로부터 입력을 받는 뇌의 영역 또는 안구 구조에 혈액 공급의 부분적인 또는 완전한 소실을 초래하는 임의의 다른 병리생리적 병태일 수 있다. 또한, 작제물은 환자의 시력과 관련된 영역 또는 눈에 미전환된 또는 전환된 줄기 세포의 도입을 통한 RGCs의 대체를 지지하는데 또한 사용될 수 있다.
- [0239] 일 구현예에서, 치료되는 달팽이관 장애는 청력 상실 또는 난청일 수 있다. 본 발명의 작제물 및 벡터는 양쪽 TrkB 수용체 및 상기 수용체의 효능제에서 국제화된 증가로 인해 TrkB 수용체 효능제에 내이 세포 감수성을 상당히 향상시킨다. 내이 세포는 청각 신호를 그것의 축색돌기를 통해 귀에서 뇌간까지 보내는 뉴런의 나선형 신경절 세포 또는 모발 세포일 수 있다. 모발 세포는 내이 모발 세포 또는 외부 귀 모발 세포일 수 있다 [42, 43, 44].
- [0240] 또 다른 구현예에서, 작제물 및 벡터는 신경 재생 및/또는 생존을 촉진시키는데 사용될 수 있다.
- [0241] 제1 측면에 따른 유전적 작제물, 또는 제2 측면에 따른 재조합 벡터가, 시신경 장애 또는 달팽이관 장애의 치료, 완화, 또는 예방을 위하여, 또는 신경 재생 및/또는 생존의 촉진을 위하여, 단일요법 (즉 본 발명의 제1 측면에 따른 유전적 작제물 또는 본 발명의 제2 측면에 따른 벡터의 용도)로서 사용될 수 있는, 약제에서 사용될 수 있음이 인정될 것이다. 대안적으로, 본 발명에 따른 유전적 작제물 또는 재조합 벡터는 시신경 장애 또는 달팽이관 장애의 치료, 완화, 또는 예방을 위하여, 또는 신경 재생 및/또는 생존의 촉진을 위하여 공지된 요법에 부속으로서, 또는 공지된 요법과 조합으로 사용될 수 있다.
- [0242] 본 발명에 따른 유전적 작제물 또는 재조합 벡터는, 특히, 조성물이 사용되는 방식에 의존하여 수많은 상이한 형태를 갖는 조성물에서 조합될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 조성물은 치료가 필요한 사람 또는 동물에 투여될 수 있는 분말, 정제, 캡슐, 액체, 연고, 크림, 젤, 하이드로겔, 에어로졸, 스프레이, 마이셀 용액, 경피 패치,

리포좀 현탁액의 형태 또는 임의의 다른 적합한 형태일 수 있다. 본 발명에 따른 약제의 비히클이 제공되는 것에 대상체에 의해 양호하게-용인되는 것일 수 있음이 인정될 것이다.

- [0243] 본 발명에 따른 유전적 작제물 또는 재조합 벡터는 또한 느린- 또는 지연-방출 디바이스 내에 편입될 수 있다. 상기 디바이스는, 예를 들어, 피부에서 또는 피부 밑에 삽입될 수 있고, 약제는 수주 또는 심지어 수개월 동안 방출될 수 있다. 디바이스는 치료 부위에 적어도 인접하여 위치할 수 있다. 상기 디바이스는 유전적 작제물 또는 재조합 벡터로 장기간 치료가 요구되고 빈번한 투여 (예를 들면 적어도 매일 주사)를 정상적으로 요구할 경우 특히 유리할 수 있다.
- [0244] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 약제는 혈류, 신경 또는 직접적으로 치료를 요하는 부위에 주사로 대상체에 투여될 수 있다. 예를 들어, 약제는 망막 또는 귀에 적어도 인접하여 주사될 수 있다. 주사는 정맥내 (볼러스 또는 주입) 또는 피하 (볼러스 또는 주입), 또는 진피내 (볼러스 또는 주입)일 수 있다.
- [0245] 요구되는 유전적 작제물 또는 재조합 벡터의 양이, 투여 방식, 유전적 작제물 또는 재조합 벡터의 이화학적 특성 그리고 단일요법으로서 또는 병용 요법에서 사용되고 있는지 여부에 차례로 좌우되는, 그것의 생물학적 활성 및 생체이용률에 의해 결정됨이 인정될 것이다. 투여 빈도는 또한 치료될 대상체 내에 환형 폴리펩타이드의 반감기에 의해 영향받을 것이다. 투여되는 최적의 복용량은 당해 분야의 숙련가에 의해 결정될 수 있고, 사용시 특정한 유전적 작제물 또는 재조합 벡터, 약제학적 조성물의 강도, 투여 방식, 및 시신경 장애 또는 달팽이관 장애의 진전으로 다양할 것이다. 대상체 연령, 체중, 성별, 다이어트, 및 투여 시간을 포함하는, 치료될 특정한 대상체에 좌우되는 추가의 인자는 복용량을 조정할 필요성을 초래할 것이다.
- [0246] 일반적으로, 본 발명에 따른 환형 폴리펩타이드의 0.001 μ g/체중 kg 내지 10mg/체중 kg, 또는 0.01mg/체중 kg 내지 1mg/체중 kg의 1일 용량은, 사용된 유전적 작제물 또는 재조합 벡터에 좌우되는, 시신경 장애 또는 달팽이관 장애의 치료, 완화, 또는 예방을 위하여 사용될 수 있다.
- [0247] 유전적 작제물 또는 재조합 벡터는 시신경 또는 달팽이관 장애의 개시 이전, 동안 또는 이후 투여될 수 있다. 1일 용량은 단일 투여 (예를 들면 단일 매일 주사 또는 비강 스프레이의 흡입)으로서 제공될 수 있다. 대안적으로, 유전적 작제물 또는 재조합 벡터는 1일 동안 2회 이상 투여를 요구할 수 있다. 예로서, 유전적 작제물 또는 재조합 벡터는 0.07 mg 내지 700 mg (즉 70 kg의 체중 추정)의 2 (치료될 시신경 또는 달팽이관 장애의 중증도에 따라 또는 초과) 1일 용량으로서 투여될 수 있다. 치료를 받는 환자는 깨어있는 때 제1 용량 및 그 다음 저녁에 (2 용량 레짐이라면) 또는 3- 또는 4-시간 간격으로 그 후에 두 번째 용량을 섭취할 수 있다. 대안적으로, 서방형 디바이스는 반복된 용량을 투여하는 필요 없이 환자에 본 발명에 따른 유전적 작제물 또는 재조합 벡터의 최적의 용량을 제공하는데 사용될 수 있다.
- [0248] 공지된 절차, 예컨대 약제학적 산업 (예를 들면 생체내 실험과정, 임상시험, 등)에 의해 종래에 이용된 것은 본 발명 및 정확한 치료 레짐 (예컨대 제제 및 투여 빈도의 1일 용량)에 따라 유전적 작제물 또는 재조합 벡터의 특이적인 제형을 형성하는데 사용될 수 있다. 본 발명자들은 TrkB 수용체 및 TrkB 수용체 효능제의 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 인코딩하는 유전적 작제물을 시사하는 최초라고 믿는다.
- [0249] 제6 측면에 따르면, 제1 측면에 따른 유전적 작제물, 또는 제2 측면에 따른 재조합 벡터, 및 약제학적으로 허용 가능한 비히클을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0250] 제7 측면에 따르면, 제6 측면에 따른 약제학적 조성물의 제조 방법으로서, 제1 측면에 따른 유전적 작제물, 또는 제2 측면에 따른 재조합 벡터를, 약제학적으로 허용 가능한 비히클과 접촉시키는 것을 포함하는 방법이 제공된다.
- [0251] "대상체"는 척추동물, 포유동물, 또는 가정용 동물일 수 있다. 그러므로, 본 발명에 따른 조성물 및 약제는 임의의 포유동물, 예를 들어 가축 (예를 들면 말), 애완동물을 치료하는데 사용될 수 있거나, 다른 수의과 적용에서 사용될 수 있다. 가장 바람직하게는, 그러나, 상기 대상체는 인간이다.
- [0252] 유전적 작제물, 재조합 벡터 또는 약제학적 조성물의 "치료적 유효량"은, 대상체에게 투여될 때, 녹내장, 난청을 치료 또는 요망된 효과, 예컨대 신경 재생 및/또는 생존 축진을 생산하는데 필요한 상기 언급된 양인 임의의 양이다.
- [0253] 예를 들어, 사용된 유전적 작제물, 재조합 벡터 또는 약제학적 조성물의 치료적 유효량은 약 0.01 mg 내지 약 800 mg, 및 바람직하게는 약 0.01 mg 내지 약 500 mg일 수 있다. 유전적 작제물, 재조합 벡터 또는 약제학적 조성물의 양이 약 0.1 mg 내지 약 250 mg, 및 가장 바람직하게는 약 0.1 mg 내지 약 20 mg 양인 것이 바람직하다.

- [0254] 본 명세서에서 지칭된 바와 같이 "약제학적으로 허용가능한 비히클"은 약제학적 조성물의 제형화에 유용하도록 당해 분야의 숙련가에 공지되는 임의의 공지된 화합물 또는 공지된 화합물의 조합이다.
- [0255] 일 구현예에서, 약제학적으로 허용가능한 비히클은 고체일 수 있고, 조성물은 분말 또는 정제의 형태일 수 있다. 고체 약제학적으로 허용가능한 비히클은 분말제, 운활제, 가용화제, 현탁화제, 염료, 충전제, 활윤제, 압축 조제, 불활성 결합제, 감미제, 보존제, 염료, 코팅물, 또는 정제-붕해제로서 또한 작용할 수 있는 1종 이상의 서브스텐스를 포함할 수 있다. 비히클은 또한 캡슐화 물질일 수 있다. 분말에서, 비히클은 본 발명에 따른 미세하게 분쇄된 활성제와 혼합물인 미세하게 분쇄된 고체이다. 정제에서, 활성제 (예를 들면 본 발명에 따른 유전적 작제물 또는 재조합 벡터)는 적합한 비율로 필요한 압축 특성을 갖는 그리고 요망된 형상 및 크기로 결속된 비히클과 혼합될 수 있다. 분말 및 정제는 바람직하게는 활성제의 최대 99%를 함유한다. 적합한 고체 비히클은, 예를 들어 인산칼슘, 스테아르산마그네슘, 탈크, 당, 락토오스, 텍스트린, 전분, 젤라틴, 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리딘, 저 용융 왁스 및 이온교환수지를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 약제학적 비히클은 겔일 수 있고 조성물은 크림 또는 동종의 형태일 수 있다.
- [0256] 그러나, 약제학적 비히클은 액체일 수 있고, 약제학적 조성물은 용액의 형태이다. 액체 비히클은 용액, 현탁액, 에멀전, 시럽, 엘릭시르 및 가압된 조성물 제조에 사용된다. 본 발명에 따른 유전적 작제물 또는 재조합 벡터는 약제학적으로 허용가능한 액체 비히클 예컨대 물, 유기 용매, 양쪽의 혼합물 또는 약제학적으로 허용가능한 오일 또는 지방에서 용해 또는 현탁될 수 있다. 액체 비히클은 다른 적합한 약제학적 첨가제 예컨대 가용화제, 유화제, 완충액, 보존제, 감미제, 풍미제, 현탁화제, 증점제, 색상, 점도 조절제, 안정화제 또는 삼투조절제를 함유할 수 있다. 경구 및 비경구 투여를 위하여 액체 비히클의 적합한 예는 (부분적으로 상기에서와 같이 첨가제, 예를 들면 셀룰로오스 유도체, 바람직하게는 나트륨 카복시메틸 셀룰로오스 용액을 함유하는) 물, (1가 알코올 및 다가 알코올, 예를 들면 글리콜을 포함하는) 알코올 및 그것의 유도체, 및 오일 (예를 들면 분획화된 코코넛 오일 및 낙화생 오일)을 포함한다. 비경구 투여를 위하여, 비히클은 또한 오일성 에스테르 예컨대 에틸 올레이트 및 이소프로필 미리스테이트일 수 있다. 멸균된 액체 비히클은 비경구 투여를 위하여 멸균된 액체 형태 조성물에서 유용하다. 가압된 조성물용 액체 비히클은 할로겐화된 탄화수소 또는 다른 약제학적으로 허용가능한 추진제일 수 있다.
- [0257] 멸균된 용액 또는 현탁액인, 액체 약제학적 조성물은, 예를 들어, 근육내, 척추강내, 경막외, 복강내, 정맥내 및 특히 피하 주사에 의해 이용될 수 있다. 유전적 작제물 또는 재조합 벡터는 멸균수, 염수, 또는 다른 적절한 멸균된 주사가능 배지를 이용하여 투여 시간에서 용해 또는 현탁될 수 있는 멸균된 고체 조성물로서 제조될 수 있다.
- [0258] 본 발명의 유전적 작제물, 재조합 벡터 및 약제학적 조성물은 다른 용질 또는 현탁화제 (예를 들어, 용액을 등장으로 만들기 위한 충분한 염수 또는 글루코스), 담즙산염, 아카시아, 젤라틴, 소르비탄 모노올레이트, 폴리소르베이트 80 (소르비톨의 올레이트 에스테르 및 에틸렌 옥사이드로 코폴리머화된 그것의 무수물) 및 동종을 함유하는 멸균된 용액 또는 현탁액의 형태로 경구로 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 유전적 작제물, 재조합 벡터 또는 약제학적 조성물은 액체 또는 고체 조성물 형태로 경구로 또한 투여될 수 있다. 경구 투여에 적합한 조성물은 고체 형태, 예컨대 알약, 캡슐, 과립, 정제, 및 분말, 및 액체 형태, 예컨대 용액, 시럽, 엘릭시르, 및 현탁액을 포함한다. 비경구 투여에 유용한 형태는 멸균된 용액, 에멀전, 및 현탁액을 포함한다.
- [0259] 본 발명이, 이들의 변이체 또는 단편을 포함하는, 본 명세서에서 지칭된 서열의 어느 하나의 아미노산 또는 핵산 서열을 실질적으로 포함하는, 임의의 핵산 또는 펩타이드 또는 이의 변이체, 유도체 또는 유사체로 확장하는 것이 인정될 것이다. 용어들 "실질적으로 아미노산/뉴클레오타이드/펩타이드 서열", "변이체" 및 "단편"은 본 명세서에서 지칭된 서열의 어느 하나의 아미노산/뉴클레오타이드/펩타이드 서열과 적어도 40% 서열 동일성, 예를 들어 서열 식별 번호:1-108로서 확인된 서열과 40% 동일성을 갖는 서열, 기타 등등일 수 있다.
- [0260] 지칭되는 임의의 서열에 65% 초과, 더욱 바람직하게는 70% 초과, 더더욱 바람직하게는 75% 초과, 및 추가로 더욱 바람직하게는 80% 초과 서열 동일성인 서열 동일성을 가진 아미노산/폴리뉴클레오타이드/폴리펩타이드 서열은 또한 예상된다. 바람직하게는, 아미노산/폴리뉴클레오타이드/폴리펩타이드 서열은 본 명세서에서 지칭되는 임의의 서열과 적어도 85% 동일성, 본 명세서에서 지칭되는 임의의 서열과 더욱 바람직하게는 적어도 90% 동일성, 더더욱 바람직하게는 적어도 92% 동일성, 더더욱 바람직하게는 적어도 95% 동일성, 더더욱 바람직하게는 적어도 97% 동일성, 더더욱 바람직하게는 적어도 98% 동일성 및, 가장 바람직하게는 적어도 99% 동일성을 갖는다.
- [0261] 숙련된 기술자는 2 아미노산/폴리뉴클레오타이드/폴리펩타이드 서열 사이 백분율 동일성을 계산하는 방법을 인식할 것이다. 2 아미노산/폴리뉴클레오타이드/폴리펩타이드 서열 사이 백분율 동일성을 계산하기 위해, 2 서열

의 정렬은 먼저 작성되어야 하고, 그 다음 서열 동일성 값을 계산한다. 2 서열에 대한 백분율 동일성은 하기에 좌우되는 상이한 값을 택할 수 있다:- (i) 서열, 예를 들어, (상이한 프로그램에서 시행된) ClustalW, BLAST, FASTA, Smith-Waterman 을 정렬하는데 사용된 방법, 또는 3D 비교로부터 구조적 정렬; 및 (ii) 정렬 방법, 예를 들어, 국부 대 전반적인 정렬, 사용된 쌍-점수 행렬 (예를 들면 BLOSUM62, PAM250, Gonnet 등), 및 갭-패널티, 예를 들면 기능성 형태 및 상수에 의해 사용된 파라미터.

[0262] 정렬을 만들기 위해, 2 서열 사이 백분율 동일성 계산의 많은 상이한 방식이 있다. 예를 들어, 하기로 동일성의 수를 분할할 수 있다: (i) 최단 서열의 길이; (ii) 정렬의 길이; (iii) 서열의 평균 길이; (iv) 비-갭 위치의 수; 또는 (iv) 돌출부를 배제하는 등가 위치의 수. 더욱이, 백분율 동일성이 또한 강하게 길이 의존적이 인정될 것이다. 따라서, 한 쌍의 서열이 더 짧을수록, 우연히 발생하는 것으로 예상할 수 있는 서열 동일성이 더 높다.

[0263] 그러므로, 단백질 또는 DNA 서열의 정확한 정렬이 복잡 공정임이 인정될 것이다. 대중적인 다중 정렬 프로그램 ClustalW (Thompson 등, 1994, *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680; Thompson 등, 1997, *Nucleic Acids Research*, 24, 4876-4882)는 본 발명에 따라 단백질 또는 DNA의 다중 정렬 생성을 위하여 바람직한 방식이다. ClustalW용 적합한 파라미터는 하기와 같을 수 있다: DNA 정렬에 대하여: 갭 오픈 패널티 = 15.0, 갭 연장 패널티 = 6.66, 및 매트릭스 = 동일성. 단백질 정렬에 대하여: 갭 오픈 패널티 = 10.0, 갭 연장 패널티 = 0.2, 및 매트릭스 = Gonnet. DNA 및 단백질 정렬에 대하여: ENDGAP = -1, 및 GAPDIST = 4. 당해 분야의 숙련가는 최적의 서열 정렬을 위하여 이들 및 다른 파라미터를 다양화하는 것이 필요할 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0264] 바람직하게는, 2 아미노산/폴리뉴클레오타이드/폴리펩타이드 서열 사이 백분율 동일성의 계산은 그 다음 $(N/T)*100$ (여기에서 N은 서열이 동일한 잔기를 공유하는 위치의 수이고, T는 갭을 포함하지만 돌출부를 배제하여 비교된 위치의 총 수이다)과 같은 정렬로부터 계산될 수 있다. 그러므로, 2 서열 사이 백분율 동일성의 가장 바람직한 계산 방법은 (i) 예를 들어, 상기 명시된 바와 같이, 파라미터의 적합한 세트를 이용하는 ClustalW 프로그램을 이용하여 서열 정렬 제조; 및 (ii) N 및 T의 값의 하기 식:- 서열 동일성 = $(N/T)*100$ 에 삽입을 포함한다.

[0265] 유사한 서열의 대안적인 확인 방법은 당해 분야의 숙련가에 공지될 것이다. 예를 들어, 실질적으로 유사한 뉴클레오타이드 서열은 엄격한 조건 하에 DNA 서열 또는 그것의 보체에 혼성화하는 서열에 의해 인코딩될 것이다. 엄격한 조건에 의해, 우리는 뉴클레오타이드가 대략 45°C에서 3x 염화나트륨/시트르산나트륨 (SSC)내 필터-결합된 DNA 또는 RNA로 혼성화하고 그 다음 대략 20-65°C에서 0.2x SSC/0.1% SDS내 적어도 1회 세정할 작정이다. 대안적으로, 실질적으로 유사한 폴리펩타이드는, 예를 들어, 서열 식별 번호: 3 및 5에서 보여진 서열로부터 적어도 1, 그러나 5, 10, 20, 50 또는 100 아미노산 미만만큼 상이할 수 있다.

[0266] 유전적 코드의 축퇴로 인해, 명백하게는, 본 명세서에서 기재된 임의의 핵산 서열은 이로써 인코딩된 단백질의 서열에 실질적으로 영향 없이 다양화 또는 변화될 수 있어서, 이의 기능성 변이체를 제공할 수 있다. 적합한 뉴클레오타이드 변이체는 서열 내에 동일한 아미노산을 인코딩하는 상이한 코돈의 치환에 의해 변경된 서열을 갖는, 따라서 침묵의 변화를 생산하는 것이다. 다른 적합한 변이체는 상동성 뉴클레오타이드 서열을 갖지만, 보존적 변화를 생산하기 위해, 치환하는 아미노산에 유사한 생체물리학적 특성의 축퇴로 아미노산을 인코딩하는 상이한 코돈의 치환에 의해 변경되는, 서열의 모두, 또는 부분을 포함하는 것이다. 예를 들어 작은 무극성, 소수성 아미노산은 글리신, 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 및 메티오닌을 포함한다. 큰 무극성, 소수성 아미노산은 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 세린, 트레오닌, 시스테인, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양으로 하전된 (염기성) 아미노산은 라이신, 아르기닌 및 히스티딘을 포함한다. 음으로 하전된 (산성) 아미노산은 아스파르트산 산 및 글루탐산을 포함한다. 따라서 아미노산이 유사한 생체물리학적 특성을 갖는 아미노산으로 대체될 수 있음이 인정될 것이고, 숙련된 기술자는 이들 아미노산을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 알 것이다.

[0267] 또 다른 측면에 따르면, 티로신 키나제 수용체 B (TrkB)를 인코딩하는, 제1 코딩 서열, 및 TrkB의 활성화를 위하여 TrkB 수용체의 효능제를 인코딩하는, 제2 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하여 이로써 망막 신경절 세포 (RGCs), 신경 세포 또는 내이 세포의 생존을 촉진시키는 유전적 작제물이 제공된다.

[0268] (임의의 동반 청구범위, 요약 및 도면을 포함하는) 본 명세서에서 기재된 특징의 모두, 및/또는 상기 개시된 임의의 방법 또는 공정의 모든 단계는, 상기 특징 및/또는 단계의 적어도 일부가 상호 배타적인 조합을 제외하고, 임의의 조합으로 임의의 상기 측면과 조합될 수 있다.

- [0269] 본 발명의 더 나은 이해를 위하여, 그리고 동종의 구현예가 효과적으로 실시될 수 있는 방법을 보여주기 위해, 예로써, 하기인, 첨부 도를 이제 참조할 것이다:
- [0270] 도 1은 본 발명에 따른 유전적 작제물의 일 구현예의 도식이다;
- [0271] 도 2는 표준적 신호 서열 (청색) 플러스 proBDNF (적색) 및 mBDNF (흑색)을 함유하는 "플라스미드 QTA001PA"로서 공지된 본 발명에 따른 재조합 벡터의 제1 구현예의 개략도이다. 또한 -IRES-GFP- 서열 (청록색 및 자주색)을 포함한다;
- [0272] 도 3은 QTA001PA로서 동일한 신호 서열 (청색) 및 무 proBDNF를 가진 (그러나 단지 mBDNF를 생산하는) "플라스미드 QTA002P"로서 공지된 본 발명에 따른 재조합 벡터의 제2 구현예의 개략도이다. 또한 -IRES-GFP- 서열 (청록색 및 자주색)을 포함한다;
- [0273] 도 4는 IL-2 신호 서열 (청색) 및 무 proBDNF를 가진 (그러나 단지 mBDNF를 생산하는) "플라스미드 QTA003P"로서 공지된 본 발명에 따른 재조합 벡터의 제3 구현예의 개략도이다. 또한 -IRES-GFP- 서열 (청록색 및 자주색)을 포함한다;
- [0274] 도 5는 신규한 신호 서열 (청색) 및 무 proBDNF를 가진 (그러나 단지 mBDNF를 생산하는) "플라스미드 QTA004P"로서 공지된 본 발명에 따른 재조합 벡터의 제4 구현예의 개략도이다. 또한 -IRES-GFP- 서열 (청록색 및 자주색)을 포함한다;
- [0275] 도 6은 본 발명의 작제물에서 사용된 신호 펩타이드의 상이한 구현예에 대하여 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 보여준다. 제2 잔기는 1종 이상의 염기성 잔기, 예컨대 라이신 (K) 또는 아르기닌 (R)에 의해 대체될 수 있는 트레오닌 (t)이다. 이소류신 (I), 류신 (L), 페닐알라닌 (F) 및 류신 (L)을 포함하는 잔기의 다음 스트레치는 1종 이상의 소수성 잔기에 의해 대체될 수 있다;
- [0276] 도 7은 상이한 신호 펩타이드 서열을 가진 mBDNF에 대하여 유전자 코딩을 함유하는 그리고 연장된 proBDNF 구성 요소에 대하여 코딩 서열이 없는 플라스미드 (4 μ g DNA/웰)의 형질도입 이후 24 시간에서 특이적 ELISA를 이용하여 HEK293 세포로부터 BDNF의 방출을 보여준다 (n = 4에 대하여 평균 \pm SEM으로서 보여진 데이터);
- [0277] 도 8은 플라스미드 형질도입 이후 24 시간에 HEK293 세포 용해물내 BDNF-면역반응성 물질 (임의의 유닛)의 세포 농도의 웨스턴 블랏팅 결과를 보여준다 (n = 4에 대하여 평균 \pm SEM으로서 보여진 데이터);
- [0278] 도 9는 세포가 QTA002P, QTA003P 및 QTA004P 형질도입을 가진 단지 단일 14kDa 밴드에 대하여 QTA001PA로 형질도입된 경우 2 분자량 밴드 (32kDa 및 14kDa)를 보여주는 세포 용해물의 웨스턴 블랏에서 BDNF-면역반응성을 보여준다;
- [0279] 도 10은 선택적 proBDNF ELISA를 이용하여 플라스미드 형질도입 이후 24 시간에 특이적 ELISA를 이용하여 측정된 경우 HEK293 인큐베이션 배지에서 proBDNF 농도를 보여준다 (n = 4에 대하여 평균 \pm SEM으로서 보여준 데이터);
- [0280] 도 11은 플라스미드 QTA002P (내인성 표준적 신호 펩타이드 서열), 및 QTA009P 내지 QTA013P에 의한 HEK293 세포 용해물내 BDNF 발현을 보여준다. 데이터는 QTA002P에 비교된 경우 평균 + S.E.M. ** P<0.01으로서 보여진다;
- [0281] 도 12는 플라스미드 QTA002P (내인성 표준적 신호 펩타이드 서열), 및 QTA009P 내지 QTA013P에 의한 HEK293 세포 인큐베이션 배지내 BDNF 발현을 보여준다. 데이터는 QTA002P에 비교된 경우 평균 + S.E.M. ** P<0.01로서 보여진다;
- [0282] 도 13은 (IRES 스페이스에 의해 분리된 BDNF 및 eGFP를 발현시키는) 플라스미드 QTA015P, (기능성 바이러스성-2A 펩타이드 서열에 의해 분리된 BDNF 그 다음 eGFP를 발현시키는) QTA021P, (비-기능성 바이러스성-2A 펩타이드 서열에 의해 분리된 BDNF 그 다음 eGFP를 발현시키는) QTA022P 및 (eGFP를 발현 그 다음 기능성 바이러스성-2A 펩타이드 서열에 의해 분리된 BDNF에 대하여 코딩하는) QTA023P로 이들이 형질도입된 후 24 시간에 HEK293 세포로부터 웨스턴 블랏을 보여준다. BDNF-면역반응성 (A), eGFP-면역반응성 (B) 및 HEK293 세포로부터 인큐베이션 배지에 방출된 BDNF의 양 (C)로서 보여진 데이터. 데이터는 밴드에서 밀도의 평균 + S.E.M.으로서 보여진다;
- [0283] 도 14A는 바이러스성-2A 펩타이드 서열에 의해 분리된 TrkB 수용체 및 BDNF를 포함하는 큰 전구체 코딩 영역의 효율적인 가공을 보여주고 QTA020V 벡터로 형질감염 이후 48 시간에 HEK293 세포 균질물의 웨스턴 블랏을 보여준다. 도 14B 및 14C는 바이알-2A 펩타이드 절단 이후 생산된 전이유전자 단백질이 가공 (방출에 앞서 저장 소

포에 BDNF 및 세포 표면에 TrkB 수용체) 이후 HEK293 세포에서 정확한 세포내 구획에 수송된 것을 보여준다;

[0284] **도 15A**는 TrkB 수용체 발현을 보여주고 **도 15B**는 rAAV2 벡터, QTA020V에 대하여 마우스 망막 균질물에서 BDNF 발현을 보여준다. 데이터는 마우스 망막 균질물의 웨스턴 블랏에서 밀도의 평균 + S.E.M.으로서 보여진다. 미접촉 (비-주사된 동물)에 비교된 경우 ** P<0.01;

[0285] **도 16**은 바이러스성-2A 펩타이드 서열에 의해 분리된, TrkB 수용체 및 BDNF에 대하여 코딩을 함유하는 rAAV2 벡터인, QTA020V의 주사 이후 면역세포화학에 의해 보여진 바와 같이 마우스 망막 신경절 세포 층내 TrkB (A) 및 BDNF (B) 전이유전자의 발현을 보여준다; 그리고

[0286] **도 17**은 rAAV2-CAG-eGFP 벡터로 치료된 대조군 동물 대 마우스에서 시신경 손상 (ONC) 이후 망막 신경절 세포 (RGC) 생존을 보여준다. 망막 플랫-마운트에서 Brn3A-양성 세포에 의해 카운트된 경우 동물당 망막 전반에 걸쳐 망막 신경절 세포의 평균 수에 대하여 평균 + S.E.M.으로서 보여진 데이터. 대조군에 비교된 경우 ***P<0.001, *P<0.05.

[0287] **실시예**

[0288] 방법 및 물질

[0289] 분자 클로닝 및 플라스미드 작제물

[0290] DNA 서열의 코돈 최적화는 온라인 툴 (<http://www.idtdna.com/CodonOpt>)을 이용하여 수행되었고 DNA 블록은 Integrated DNA technologies, Inc. (IDT; 9180 N. McCormick Boulevard, Skokie, IL 60076-2920, USA) 또는 GenScript (860 Centennial Ave, Piscataway, NJ 08854, USA)에 의해 합성되었다. 마스터 플라스미드 QTA001PA 및 차후의 플라스미드를 제조하기 위한 클로닝은 표준 분자 생물학 및 클로닝 기술을 이용하여 수행되었다.

[0291] 플라스미드 규모확대 및 정제

[0292] DNA 플라스미드는 밤새 SURE 능숙한 세포 (Agilent Technologies; cat. #200238)에서 규모확대되어 maxi-prep 정제 이후 2.29 µg/µl 플라스미드를 제공하였다. 잔존 플라스미드는 최소 내독소 존재로 500µg 척도 및 형질도입 품질로 규모확대되었다.

[0293] 플라스미드 DNA로 세포 형질도입 및 HEK293 배양

[0294] HEK293 세포 (400,000 세포)는 80% 융합성까지 10% 우태혈청 (FBS), 1% 페니실린 및 1% 스트렙토마이신 (1% Pen/Strep)를 함유하는 1.5mL 들베코 최소 필수 배지 (DMEM)내 폴리-L-라이신 (10ug/mL, Sigma-Aldrich; cat. #P1274) 코팅된 6 웰 플레이트에서 배양되었다. 배지는 그 다음 2mL DMEM (무 첨가제)에 대하여 교환되었다. 2 내지 3 시간 후, 4µg 플라스미드 DNA 플러스 10 µL 리포펙타민 (4 µL/mL; Thermo Fisher Scientific; cat. #12566014)를 함유하는 추가의 0.5ml 형질감염 배지는 상청액 수집을 위하여 그리고 형질감염 기간 내내 2.5ml 의 전반적인 용적을 초래하는 각 웰에 첨가되었다.

[0295] ELISA에 의한 BDNF 측정

[0296] HEK293 세포로부터 분리된 BDNF의 양은 형질감염 이후 24 시간에 세포 배양 배지에서 측정되었다. 배지는 원심 분리되어, 잔해를 제거하였고, 상업적 인간 BDNF ELISA 키트 (Sigma-Aldrich, 생성물# RAB0026)을 이용하여 측정되었다. BDNF 농도는 새롭게 제조된 BDNF 표준에 샘플을 비교함으로써 결정되었다.

[0297] BDNF 및 TrkB 수용체에 대한 웨스턴 블랏팅

[0298] HEK293 세포 이내 BDNF 및 TrkB-면역반응성의 양은 DMEM 인큐베이션 배지 제거, 차가운 포스페이트 완충 식염수 내 세포 세정 및 웰들 (10ml 용해-M 시약 + 1 정제의 완전한 미니 프로테아제 억제제 콕테일, Roche; cat. #04719964001, + 100µl 중지 포스파타제 억제제 콕테일 (100X), Thermo Scientific; cat. #78428)에 350 µL 새롭게 제조된 세포용해 버퍼의 첨가에 의해 측정되었다. 세포 균질화 이후, 단백질 현탁액은 BCA 검정 (Pierce BCA 단백질 검정 키트, Thermo Scientific; cat. #23227)을 이용하여 정량화되었다. 6µg 내지 15µg HEK293 세포 용해물 단백질/레인은 비스-트리스 겔 (12% NuPAGE Novex; cat. #NP0342BOX, Thermo Scientific)로 멈춰졌고 밤새 인큐베이션된 일차 토끼 다클론성 항-BDNF 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc; 생성물# sc-546; 1:500 희석), 토끼 다클론성 항-TrkB 항체 (Abcam; cat. #ab33655, 1:2000 희석으로 사용됨) 또는 eGFP 항체 (1:500으로 사용됨 Abcam 생성물 #ab-290)을 이용하여 웨스턴 블랏팅에 의해 검사되었다. 일차 항체는 HRP 접합된 항-토끼 항체 (Vector Laboratories; cat. #PI-1000, 1:8000) 그리고 ECL Prime (Amersham, GE

Healthcare, UK) 및 Alliance 웨스턴 블랏 이미지형성 시스템 (UVitec Ltd, Cambridge, UK)를 이용하는 신호 검출로 시각화되었다. 마우스 망막의 웨스턴 블랏을 위하여, 백터-치료된 동물로부터 눈은 500 μ L 새롭게 제조된 세포용해 버퍼 (10ml 용해-M 시약 + 1 정제의 완전한 미니 프로테아제 억제제 콕테일, Roche 생성물# 04719964001 + 100 μ L 중지 포스포타제 억제제 콕테일 (100X), Thermo Scientific 생성물# 78428)에서 균질화되었다. 조직은 1 분 동안 파괴되었고 (Qiagen, TissueRuptor 생성물# 9001273) 그 다음 추가의 15 분 동안 얼음에서 유지되었다. 단백질은 그 다음 상기에 기재된 바와 같이 웨스턴 블랏팅에 의해 분석되었다.

[0299] 면역세포화학

[0300] HEK293 세포 (70,000)는 4 웰 플레이트 이내 13mm, 폴리-L-라이신 코팅된 커서슬립에서 씨딩되었고 0.5ml 배지 내 10% FBS 및 1% Pen/Strep을 함유하는 DMEM에서 인큐베이션되었다. 일단 세포가 80% 합류점까지 성장하였다면, 배지는 2-3 시간 0.4ml DMEM (무 첨가제)로 교환되었고 그 다음 추가의 0.1ml 형질감염 배지 (0.8 μ g 플라스미드 DNA + 2 μ L 리포펙타민)은 첨가되어 최종 용적이 0.5ml를 달성하였다. 커서슬립은 PBS에서 2 회 세정되었고 실온에서 1M 포스페이트 완충 식염수 (PBS)내 4% 파라포름알데하이드에서 30분 동안 고정되었다. PBS에서 3 초과 세정 이후, 세포는 차단되었고 실온에서 60 분 동안 5% 정상 염소 혈청 (NGS), 3% 소 혈청 알부민 (BSA) 및 PBS내 0.3% 트리톤 X-100에서 인큐베이션에 의해 침투되었다. 세포는 그 다음 차단 용액에서 희석된 BDNF (Santa Cruz Biotechnology Inc; 생성물# sc-546; 1:300 희석) 또는 TrkB (Abcam 생성물# ab33655, 1:500 희석된)에 대하여 상업적 토끼 다클론성 항체로 4°C에서 밤새 인큐베이션되었다. 염색은 실온에서 2 시간 동안 alexa fluor 647 (Invitrogen, 생성물# A21248 1:1000)에 접합된 이차 항-토끼 항체를 이용하여 드러났다. 세포 핵은 1 μ g/ml DAPI (Thermo Scientific, 생성물# D1306 1:8000)로 또한 대조염색되었다. 세포는 이미지형성에 앞서 fluorSave™ 시약 (Calbiochem/EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, USA)로 실장되기 이전 추가로 3회 세정되었다. 이미지형성은 3X 디지털 줌 및 0.5-0.8 순차 스캐닝 z-단계 간격을 이용하는 63X 오일 대물렌즈가 구비된 Leica DM6000 낙사형광 현미경 (Leica Microsystems, Wetzlar, 독일) 또는 Leica SP5 공초점 현미경 (Leica Microsystems, Wetzlar, 독일) 및 20X 대물렌즈를 이용하여 수행되었다.

[0301] 대조군 또는 백터 치료된 동물로부터 망막 구조의 면역세포화학을 위하여, 주의하여 해부된 눈은 밤새 4% 파라포름알데하이드/0.1% PBS (pH 7.4)에서 고정되었고 4°C에서 (24 시간) 30% 수크로오스/0.1% PBS에서 탈수되었다. 눈은 그 다음 최적의 절단 온도 화합물 (OCT) (Sakura Finetek, Zoeterwoude, 네델란드)을 함유하는 실리콘 주형에 포매되었고 드라이아이스에서 냉동되었다. 망막의 배부-복부/우월한-열등한 축을 통해 13 μ m 절편은, Bright OTF 5000 저온유지장치 (Bright Instruments, Huntingdon, 영국)을 이용하여, 슈퍼프로스트 플러스 슬라이드 (VWR 생성물#631-0108)상에 수집되었다. 슬라이드는 PBS에서 3회 세정되었고, 실온에서 60 분 동안 5% 정상 염소 혈청 (NGS), 3% 소 혈청 알부민 (BSA) 및 PBS내 0.3% 트리톤 X-100에서 침투되었다. 슬라이드는 그 다음 차단 용액에서 희석된, BDNF (Santa Cruz Biotechnology Inc 생성물# sc-546 1:300) 또는 TrkB (Abcam 생성물# ab33655 1:500)에 대하여 상업적 토끼 다클론성 항체로 4°C에서 밤새 인큐베이션되었다. 염색은 실온에서 2 시간 동안 alexa fluor 647 (Invitrogen, 생성물# A21248 1:1000)에 접합된 2차 항-토끼 항체를 이용하여 드러났다. 망막 세포 핵은 1 μ g/mL DAPI (Thermo Scientific, 생성물# D1306 1:8000)으로 또한 대조염색되었다. 슬라이드는 이미지형성에 앞서 fluorSave™ 시약 (Calbiochem/EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, USA)로 실장되기 이전 추가로 3회 세정되었다. 이미지형성은 3X 디지털 줌 및 0.5-0.8 순차 스캐닝 z-단계 간격을 이용하는 63X 오일 대물렌즈가 구비된 Leica DM6000 낙사형광 현미경 (Leica Microsystems, Wetzlar, 독일) 또는 Leica SP5 공초점 현미경 (Leica Microsystems, Wetzlar, 독일) 및 20X 대물렌즈를 이용하여 수행되었다.

[0302] 초자체내 주사

[0303] 7-10 일 기후순응 기간 이후, 마우스는 다양한 연구 그룹으로 무작위화되었다. 이들은 그 다음 케타민 (50mg/kg) 및 크실라진 (5g/kg)의 복강내 주사로 마취되었다. 국소 1% 테트라카인 안약은 연구의 일 1에서 투여되었다. 동공 팽창은 1% 트로피카마이드 안약을 이용하여 달성되었다. 수술 현미경을 이용하여, 부분적인-두께 공막 파일릿 홀은 30-게이지 바늘로 만들어져서 팁 직경 30 μ m 및 팁 길이 2.5mm의 미세 금속 마이크로피펫에 의해 근원적인 공막, 맥락막, 및 망막의 침투를 용이하게 하였다. 마이크로피펫은 그 다음 그룹에 따라 피펫에 2 μ L의 백터 현탁액을 인출하기에 앞서 10 μ L 유리 주사기 (Hamilton Co., Reno, NV)에 연결되었다. 초자체내 주사 동안 렌즈의 침투 또는 와정맥에 손상을 피하기 위해 주의하였다. 주사 부위는 상외측 주변에 대해 대략 3mm 후 측을 목표로 하였다. 주사는 백터 현탁액의 확산을 허용하기 위해 1 분에 걸쳐 느리게 제공되었다. 우측 눈은 미접촉인채로 남겨졌고 내부 반대측 대조군으로서 작용되었다.

[0304] 시신경 손상 (ONC)

[0305] 벡터 투여 이후 3 주 (21 일)에, 마우스는 ONC 절차에 적용되었고, 미치료된채 남겨졌거나 모의-분쇄되었다. 양 안 수술 범위 하에, 작은 절개는 일시적으로 눈 주변 및 안구에 열등하게 시작하는 결막에서 스프링 가위로 실시되었다. 이것은 안구의 후측 측면을 노출시켜, 시신경의 가시화를 허용하였다. 노출된 시신경은, 신경에서 가압하는 자기-클램핑 작용으로부터 단지 압력으로, 10 s 동안 교차-작용 겸자 (Dumont #N7 cat. #RS-5027; Roboz)로 안구로부터 대략 1-3 mm 잡혀졌다. 10 s 후 시신경은 방출되었고, 겸자는 제거되고 눈은 제 자리로 다시 교대한다. ONC 7 일 후, 동물은 도태되었다. 각각의 그룹으로부터 양쪽 눈은 밤새 4% 파라포름알데하이드 /0.1% PBS (pH 7.4)에서 장기를 배치시킴으로써 고정되었다. 망막 플랫-마운트는 그 다음 각막으로부터 후측 눈 구조의 절개 및 렌즈의 제거 이후 제조되었다. 망막 플랫-마운트는 4% 파라포름알데하이드/0.1% PBS에서 30 분 동안 사후 고정되었고 PBS내 0.5% 트리톤 X-100에서 세정되었다. 망막은 -80°C에서 10분 동안 냉동되어 핵 막을 침투시켰고 60 분 동안 실온에서 10% 정상 당나귀 혈청 (NDS), 2% 소 혈청 알부민 (BSA) 및 PBS내 2% 트리톤 X-100에서 차단 이전 항체 침투를 개선시켰다. RGCs는 Brn3A (1:200 Santa Cruz, #sc-31984)에 대해 항체로 대조 염색되었고 20X 대물렌즈 및 Leica DM6000 낙사형광 현미경 (Leica Microsystems, Wetzlar, 독일)을 이용하여 형광 현미경검사 하에 시각화되었다. 더 높은 해상도 이미지는 1.5X 디지털 줌 및 0.5-0.8 순차 스캐닝 z-단계 간격을 이용하는 40X 오일 대물렌즈가 구비된 Leica SP5 공초점 현미경 (Leica Microsystems)을 이용하여 취득되었다. RGC 세포 카운트는 계수 핵 플러그인용 이미지-기반 툴 (ITCN)을 이용하는 ImageJ에 의해 측정되었고 RGCs/mm²의 밀도로서 표현되었다.

[0306] 작제물 및 벡터

[0307] 본 발명자들은, 도 1에서 나타낸 바와 같이, 시신경 병리학, 예컨대 녹내장, 또는 달팽이관 병리학으로 괴로운 대상체를 치료하는데, 또는 신경 재생 및/또는 생존의 촉진을 위하여 사용될 수 있는, 유전적 작제물을 생성하였다. 작제물은 RGCs의 세포 표면에서 TrkB 수용체의 밀도를 유지 또는 증가시키도록 그리고 mBDNF의 수반되는 생산 및 국부 방출에 의한 TrkB 수용체 경로를 통해 신호전달을 유지 또는 증가시키도록 설계되었다.

[0308] 작제물은 TrkB 수용체 및 그것의 효능제, 성숙 뇌유래 신경 성장 인자를 인코딩하는 전이유전자를 포함한다. 이들 전이유전자는, 인간 시냅신 I (SYN I) 프로모터 또는 CAG 프로모터인, 단일 프로모터에 작동가능하게-연결된다. 유리하게는, 도 1의 작제물은 인코딩하는 전이유전자의 크기에 의한 방해 없이 rAAV2 벡터에서 배치될 수 있다. 이것은 제1 전이유전자, TrkB가 바이러스 2A 펩타이드 서열 그 다음 BDNF 신호 펩타이드 및 그 다음 성숙 단백질에 연결되도록 작제물이 배향되기 때문이다. 상기 배향이 또한 면역원성 위험을 최소화하는 것은 바이러스 2A 펩타이드의 짧은 N-말단 아미노산 서열이 TrkB 수용체의 세포내 부분에 부착된 채로 남아있고 C-말단 바이러스 2A 서열로부터 잔류 프롤린 아미노산이 N-말단 BDNF 신호 펩타이드에 부착된 채로 남아있고 절단 이후 mBDNF 단백질로부터 궁극적으로 제거되기 때문이다. 벡터는, 대상체에 투여될 수 있는, 약리적으로 허용가능한 완충 용액에서 배치될 수 있다.

[0309] 도 2-5는 발현 벡터의 다양한 구현예를 보여준다. 도 2는 표준적 신호 서열 (청색) (즉 MTILFLTMVISYFGCMKA [서열 식별 번호:20]) 플러스 proBDNF (적색) 및 mBDNF (흑색)을 함유하는 "플라스미드 QTA001PA"로서 공지된 벡터를 보여준다. 도 3은 "플라스미드 QTA002P"로서 공지된 벡터를 보여준다. proBDNF를 인코딩하지 않지만 mBDNF만을 생산하고, 동일한 신호 서열 (청색)을 QTA001PA로서 인코딩한다. 도 4는 또한 proBDNF를 인코딩하지 않지만 mBDNF만을 생산하는 "플라스미드 QTA003P"로서 공지된 벡터를 보여준다. mBDNF용 표준적 신호 서열 대신에, IL-2 신호 서열 (청색)을 포함한다. 마지막으로, 도 5는 "플라스미드 QTA004P"로서 공지된 벡터를 보여준다. proBDNF를 인코딩하지 않지만 대신 mBDNF만을 생산한다. 또한 신규한 신호 서열 (청색), [서열 식별 번호: 32]를 인코딩한다.

[0310] 본 발명자들은 성숙 BDNF (mBDNF) 요소로 출발하는 녹내장 유전자 요법 개념에 관한 작제물 및 벡터를 생산 및 조사하였다. 이들은 proBDNF 코딩 영역 (QTA002P, 참고 도 3) 없이 BDNF 서열을 함유하는 플라스미드로 리포펙타민 형질도입 이후 HEK293 세포로부터 mBDNF의 생산 및 방출을 명확히 실증하였다 (참고 도 7). 세포로부터 방출된 mBDNF는 (웨스턴 블랏팅 및 상업적으로 입수가 가능한 BDNF용 항체를 이용하여 측정된) 예상된 14kDa 모노머이고, 효모 및 다른 세포-기반 제조 접근법¹을 이용하여 mBDNF의 상업적 양을 생성하도록 노력하는 몇 개의 그룹에 의해 보고됨에 따라, 단백질 응집물에 대한 증거는 없다. mBDNF는 TrkB 수용체를 활성화시키기 위해 비-공유 이량체를 형성하도록 단백질 분자를 허용할 수 있는 형태로 따라서 방출된다.

[0311] (mBDNF와 더 큰 연장된 proBDNF 단백질 사이 분화하지 않는) BDNF에 대하여 ELISA를 이용하여, 본 발명자들은 내인성 표준적 18-아미노산 신호 펩타이드 서열 (MTILFLTMVISYFGCMKA)에 대하여 코딩하는 DNA 서열을 신규한 펩

타이드 서열 (QTA004P - 참고 도 5)로 치환하는 것 그리고 BDNF 유전자를 함유하는 플라스미드로 세포의 리포펙타민 형질도입 이후 HEK293 인큐베이션 배지에 BDNF의 증가 수준을 방출시키는 것 (참고 도 7)이 가능하다는 것을 또한 실증하였다.

- [0312] 인터류킨-2 신호 펩타이드 (QTA003P - 참고 도 4)에 대하여 코딩하는 서열로 내인성 신호 펩타이드의 치환은 배지로부터 BDNF 방출에 덜 효과적이었다. 배지에 방출된 BDNF의 수준은 현재 대략 1 - 2nM이고 상기 효능제의 농도는 특이적 TrkB 수용체 (대략 0.9nM의 IC50)을 최대로 활성화시키는데 충분하다. BDNF 방출의 수준은 조합된 proBDNF 및 mBDNF 서열을 함유하는 그리고 또한 플라스미드 QTA002P (참고 도 3) 및 QTA004P (참고 도 5)에 비교된 경우 18-아미노산 표준적 신호 펩타이드를 포함하는 플라스미드 QTA001PA (참고 도 2)로 대략 35배 더 높다 (876 ± 87 ng/mL BDNF).
- [0313] 리포펙타민 플라스미드 형질도입 이후 24 시간에 정량적 웨스턴 블랏팅에 의해 세포에 잔류하는 BDNF의 측정은 QTA002P 및 QTA004P를 가진 것보다 QTA001PA를 가진 더 낮은 BDNF 잔류 농도를 드러냈다 (참고 도 8).
- [0314] 또한, QTA001PA에 의해 형질도입된 세포 용해물에서 BDNF 면역반응성의 대략 절반은 proBDNF (32kDa에서 분자량 밴드)의 형태이었고 반면에 proBDNF 밴드가 QTA002P, QTA003P 및 QTA004P로 형질도입된 세포의 용해물에서 부재이었던 것은 (참고 도 9), 아마 이들 플라스미드가 proBDNF 연장된 코딩 서열을 함유하지 않기 때문이다.
- [0315] proBDNF에 특이적인 ELISA를 이용하여, 본 발명자들은 QTA001PA에 의해 형질도입된 세포로부터 방출된 BDNF-면역반응성의 대략 70ng/mL (2.2nM 또는 3.5%)가 proBDNF의 형태이고 반면에 다수 (96.5% 또는 876ng/mL / 63nM)이 mBDNF로서 방출되는 것을 입증할 수 있었다 (참고 도 10). 연장된 proBDNF에 대하여 코딩 서열을 함유하지 않는 QTA002P, QTA003P 또는 QTA004P에 의해 형질도입된 세포로부터 검출된 proBDNF-면역반응성은 없었다.
- [0316] 따라서, 명백하게는, 모든 플라스미드는 14kDa mBDNF 단백질을 생산할 수 있지만, HEK293 세포로부터 방출된 mBDNF의 그 양은 분비성 세포에 단백질 저장 및 패키징의 효율에 크게 의존적이다. 플라스미드 QTA001PA (도 2)로 생산된 경우, 조합된 proBDNF 및 mBDNF 서열을 함유하는, 단백질의 연장된 형태는 따라서 분비성 세포에 패키징되고 세포 내에 축적하는 것처럼 보이는 더 작은 mBDNF 서열보다 훨씬 더 효율적으로 인큐베이션 배지에 방출된다.
- [0317] 도 11을 참조로, 플라스미드 QTA009P 내지 QTA013P에서 포함된 신규한 서열을 가진, 플라스미드 QTA002P에서 표시되는 경우, 내인성 표준적 신호 펩타이드 서열용 코딩의 치환이 플라스미드로 형질도입 이후 24 시간에 HEK293 세포에서 BDNF의 농도를 증가시키는 것을 보여준다. 도 12는 신규한 서열 (플라스미드 QTA009P 내지 QTA013P)를 가진 플라스미드 QTA002P에서 포함된 내인성 표준적 신호 펩타이드 코딩 서열의 치환이, 플라스미드로 형질도입 이후 24 시간에 측정된 경우, HEK293 세포로부터 (ELISA에 의해 측정된 경우) BDNF의 방출을 증가시킨다는 것을 입증한다.
- [0318] 도 13에서 나타낸 바와 같이, 바이러스성-2A 펩타이드 서열의 부가는 2 전이유전자, eGFP 및 BDNF에 큰 전구체 단백질용 코딩 서열의 효율적인 가공을 초래한다. 웨스턴 블랏은 플라스미드로 형질도입된 후 24 시간에 HEK293 세포를 보여준다: (i) (IRES 스페이서에 의해 분리된 BDNF 및 eGFP를 발현시키는) QTA015P, (ii) (기능성 바이러스성-2A 펩타이드 서열에 의해 분리된 BDNF 그 다음 eGFP를 발현시키는) QTA021P, (iii) (비-기능성 바이러스성-2A 펩타이드 서열에 의해 분리된 BDNF 그 다음 eGFP를 발현시키는) QTA022P 및 (iv) (eGFP를 발현 그 다음 기능성 바이러스성-2A 펩타이드 서열에 의해 분리된 BDNF에 대하여 코딩하는) QTA023P.
- [0319] QTA021P (mBDNF-바이러스성-2A 펩타이드-eGFP에 대하여 코돈 최적화된 서열을 함유하는 플라스미드)의 코딩 서열은, 하기와 같이, 서열 식별 번호: 104로서 여기에서 지칭된다:

ATGACTATCCTGTTTCTGACAATGGTTATTAGCTATTTTCGGTTGCATGAAGGCTCACAGTGATCCCGCAC
 GCCGCGGAGAACTTAGCGTGTGCGACAGCATCAGCGAGTGGGTCACCGCCCGGATAAGAAGACCGCTGT
 GGATATGTCCGGCGGGACCGTCACTGTACTCGAAAAAGTTCCAGTGAGCAAAGGCCAACTGAAACAATAT
 TTCTATGAAACTAAGTGCAACCCCATGGGGTACACCAAGGAGGGCTGCCGGGAATCGACAAGAGACT
 GGAATTCCCAGTCCCGGACCACTCAGAGCTACGTCCGCGCCTTGACGATGGATTCAAAGAAGCGCATCGG
 ATGGCGGTTTCATAAGAATCGACACCAGTTGTGTGTGCACGCTGACGATAAAAACGGGGGCGGGCCCCGTG
 AAGCAGACCCCTGAACTTTGATTTGCTCAAGTTGGCGGGGATGTGGAAAGCAATCCCGGGCAATGGTGA
 GCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGCGTTGTGCCAATACTGGTTGAGTTGGATGGCGATGTCAACGGACA
 CAAATTTAGCGTAAGCGGGGAGGGAGAGGGCGACGCCACATATGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATTTGC
 ACGACCGGCAAAATGCCCCGTCCCTTGGCCACACTTGTGACGACCCCTGACTTATGGCGTACAGTGCTTCA
 GCAGGTACCCGTATCATATGAAGCAACACGACTTCTTTAAGAGTGCCATGCCAGAGGGATACGTCCAGGA
 AAGAACCATATCTTCAAAGATGATGGAAATTACAAAACCCGGGCAGAGGTCAAGTTTGAAGGCGACACC
 CTGGTGAACAGGATCGAACTCAAAGGCATCGATTTCAAAGAGGACGGAAACATCCTCGGACACAACTGG
 AATACAATTACAACAGCCACAACGTCTACATCATGGCAGATAAAACAAAAGAACGGTATTTAAAGTGAAGT
 CAAGATCCGGCACAACATCGAAGACGGCTCCGTCCAGCTTGCCGACCACTACCAGCAAAAATACCCCGATC
 GCGCAGCGCCCCGTCTCCTCCCGGATAATCACTACCTGAGTACACAGTCAGCCTTGAGCAAAGACCCTA
 ATGAAAAGCGGGACCACATGGTTTTGCTGGAGTTCGTTACCGCAGCGGGTATTACGCTGGGTATGGACGA
 GCTTTACAAGTAA

[0320]

[0321] [서열 식별 번호: 104]

[0322] QTA022P (mBDNF-비-기능성 바이러스성-2A 펩타이드-eGFP에 대하여 코돈 최적화된 서열을 함유하는 플라스미드)의 코딩 서열은, 하기와 같이, 서열 식별 번호: 105로서 여기에서 지칭된다:

ATGACTATCCTGTTTCTGACAATGGTTATTAGCTATTTTCGGTTGCATGAAGGCTCACAGTGATCCCGCAC
 GCCGCGGAGAACTTAGCGTGTGCGACAGCATCAGCGAGTGGGTCACCGCCCGGATAAGAAGACCGCTGT
 GGATATGTCCGGCGGGACCGTCACTGTACTCGAAAAAGTTCCAGTGAGCAAAGGCCAACTGAAACAATAT
 TTCTATGAAACTAAGTGCAACCCCATGGGGTACACCAAGGAGGGCTGCCGGGAATCGACAAGAGACT
 GGAATTCCCAGTCCCGGACCACTCAGAGCTACGTCCGCGCCTTGACGATGGATTCAAAGAAGCGCATCGG
 ATGGCGGTTTCATAAGAATCGACACCAGTTGTGTGTGCACGCTGACGATAAAAACGGGGGCGGGCCCCGTG
 AAACAAACCCCTCAATTTTGACTTGTGTAAGCTTGTGTTGGGATGTGCGAGTCCGCTGCCGCGGCTATGGTGA
 GCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGCGTTGTGCCAATACTGGTTGAGTTGGATGGCGATGTCAACGGACA
 CAAATTTAGCGTAAGCGGGGAGGGAGAGGGCGACGCCACATATGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATTTGC
 ACGACCGGCAAAATGCCCCGTCCCTTGGCCACACTTGTGACGACCCCTGACTTATGGCGTACAGTGCTTCA
 GCAGGTACCCGTATCATATGAAGCAACACGACTTCTTTAAGAGTGCCATGCCAGAGGGATACGTCCAGGA
 AAGAACCATATCTTCAAAGATGATGGAAATTACAAAACCCGGGCAGAGGTCAAGTTTGAAGGCGACACC

[0323]

CTGGTGAACAGGATCGAACTCAAAGGCATCGATTTCAAAGAGGACGGAAACATCCTCGGACACAACTGG
 AATACAATTACAACAGCCACAACGTCTACATCATGGCAGATAAAACAAAAGAACGGTATTTAAAGTGAAGT
 CAAGATCCGGCACAACATCGAAGACGGCTCCGTCCAGCTTGCCGACCACTACCAGCAAAAATACCCCGATC
 GCGCAGCGCCCCGTCTCCTCCCGGATAATCACTACCTGAGTACACAGTCAGCCTTGAGCAAAGACCCTA
 ATGAAAAGCGGGACCACATGGTTTTGCTGGAGTTCGTTACCGCAGCGGGTATTACGCTGGGTATGGACGA
 GCTTTACAAGTAA

[0324]

[0325] [서열 식별 번호: 105]

[0326] QTA023P (eGFP-바이러스성-2A 펩타이드-mBDNF에 대하여 코돈 최적화된 서열을 함유하는 플라스미드)의 코딩 서열은, 하기와 같이, 서열 식별 번호: 106으로서 여기에서 지칭된다:

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAA
 ACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTT
 CATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGAG
 TGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACG
 TCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTTCGAGGG
 CGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC
 AAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGG
 TGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACAC
 CCCCATCGGGCAGCGCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCCTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAG
 GACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGGATCACTCTCGGCA
 TGGACGAGCTGTACAAGGCTCCCGTTAAACAAACTCTGAACTTCGACCTGCTGAAGCTGGCTGGAGACGT
 GGAGTCCAACCTTGACCTATGACCATCCTTTTCTTACTATGGTTATTTTATACTTCGGTTGCATGAAG
 GCGCACTCCGACCCTGCCCGCGTGGGGAGCTGAGCGTGTGTGACAGTATTAGCGAGTGGGTACAGCGG
 CAGATAAAAAGACTGCAGTGGACATGTCTGGCGGGACGGTCACAGTCTTAGAGAAAGTCCCGGTATCCAA
 AGGCCAACTGAAGCAGTATTTCTACGAGACCAAGTGTAAATCCCATGGGTACACCAAGGAAGGCTGCAGG
 GGCATAGACAAAAGGCACTGGAACCTCGCAATGCCGAACCTACCCAATCGTATGTTTCGGGCCCTTACTATGG
 ATAGCAAAAAGAGAATTGGCTGGCGATTCATAAGGATAGACACTTCTGTGTATGTACACTGACCATTAA
 AAGGGGAAGATAG

[0327]

[0328] [서열 식별 번호: 106]

[0329] 도 14A를 참조로, QTA020V 벡터로 형질감염 이후 48 시간에 HEK293 세포 균질물의 웨스턴 블랏이 보여진다. 바이러스성-2A 펩타이드 서열에 의해 분리된 TrkB 수용체 및 BDNF를 포함하는 큰 전구체 코딩 영역의 효율적인 가공을 보여준다. 2 TrkB 및 mBDNF-면역반응성 전이유전자는 예상된 정확한 분자량 크기 이내이다. 5 반복부에서 전구체 단백질의 거의 완전한 또는 완전한 가공을 나타내는, TrkB 수용체 밴드 초과 큰 전구체 단백질의 염색의 부족은 주목되어야 한다. 도 14B 및 14C는 바이알-2A 펩타이드 절단 이후 생산된 전이유전자 단백질이 가공 (세포 표면에 TrkB 수용체 및 방출에 앞서 저장 소포에 BDNF) 이후 HEK293 세포에서 정확한 세포내 구획에 수송되었다는 것을 보여준다.

[0330] 도 15는 TrkB 수용체 및 BDNF에 대하여 2 코딩 영역을 분리시키는 바이러스성-2A 펩타이드 서열의 부가가 rAAV2 벡터, QTA020V의 초자체내 주사 이후 마우스 망막에서 2 전이유전자에 효율적인 가공을 초래한다는 것을 보여준다.

[0331] 도 16은, 바이러스성-2A 펩타이드 서열에 의해 분리된, TrkB 수용체 및 BDNF용 코딩을 함유하는 rAAV2 벡터인, QTA020V의 주사 이후 면역세포화학에 의해 보여진 바와 같이 마우스 망막 신경절 세포 층에서 전이유전자의 발현을 보여준다. 표적 망막 신경절 세포 바디는 항-Brn3A 항체로 적색 염색되고 세포 핵은 DAPI로 청색 반대-염색되어 망막 층을 식별한다.

[0332] 도 17을 참조로, 초자체내 주사 ($2\mu\text{l}$ 의 9×10^{12} 벡터 입자/ml)를 통해 (바이러스성-2A 펩타이드 서열에 의해 분리된, TrkB 수용체 및 BDNF용 코딩을 함유하는) QTA020V의 사전-치료가 rAAV2-CAG-eGFP 벡터로 치료된 대조군 동물 대 마우스에서 시신경 손상 이후 망막 신경절 세포 생존에서 상당한 신경보호성 효능을 부여한다는 것이 보여진다. QTA020V 벡터에 의한 신경보호의 수준은 또한 BDNF만을 발현시키는 벡터에 의해 제공된 것 초과이었다. 동물의 모든 3 그룹은 시신경 손상 절차에 적용되었고 망막 신경절 세포의 수는 외상 후 7 일에 측정되었다. 망막 신경절 세포는 모조 손상에 적용된 동물 (테이터 도시되지 않음) 대 대조군 (흑색 막대)에서 71%만큼 감소되었다.

[0333] 참조

[0334] 1. Quigley HA, Number of people with glaucoma worldwide. Brit. J. Ophthalmol. 1996, vol. 80, PP: 389-393.

[0335] 2. www.preventblindness.org

- [0336] 3. Goldberg I, Relationship between intraocular pressure and preservation of visual field in glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* 2003 vol. 48 Suppl. 1, PP: S₃-S₇.
- [0337] 4. Glaucoma, Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 1999, Merck Research Laboratories; Whitehouse Station, NJ, PP: 733-738.
- [0338] 5. Alward WL, Medical Management of Glaucoma. *New Eng. J. Med.*, 1998; vol. 339, PP: 1298-1307
- [0339] 6. Coleman AL, Glaucoma. *Lancet*, 1999; vol. 354, PP: 1803-1810.
- [0340] 7. Medeiros FA, and Weinreb RN, Medical Backgrounders: glaucoma. *Drugs of Today* 2002, vol. 38, PP: 563-570.
- [0341] 8. Bakalash S, Kipnis J, Yoles E, and Schwartz M, Resistance of retinal ganglion cells to an increase in intraocular pressure is immune-dependent. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2002, vol. 43, PP: 2648-2653.
- [0342] 9. Kipnis J, Yoles E, Porat Z, Cohen A, Mor F, Sela M, Cohen IR, and Schwartz M, T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: Possible therapy for optic neuropathies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000, vol. 97, PP: 7446-7451.
- [0343] 10. Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA, Pease ME, Thibault DJ, and Zack DJ, Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995 vol. 36, PP: 774-786.
- [0344] 11. Weinreb RN, and Levin LA, Is neuroprotection a viable therapy for glaucoma? *Arch. Ophthalmol.* 1999, vol. 117, PP: 1540-1544.
- [0345] 12. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nature Rev. Neurosci.* 2003, vol. 4, PP: 299-309.
- [0346] 13. Dawbarn D, and Allen SJ, Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2003, vol.29, PP: 211-230.
- [0347] 14. Barde Y-A, Leibrock J, Lottspeich F, Edgar D, Yancopoulos G, and Thoenen H, Brain-derived neurotrophic factor 1993, US patent 05229500.
- [0348] 15. Mey J, and Thanos S, Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Res.* 1993, 602: 304-317.
- [0349] 16. Mansour-Rabaey S, Clarke DB, Wang Y-C, Bray GM, and Aguayo AJ, Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994, vol. 91, PP: 1632-1636.
- [0350] 17. Peinado-Ramon P, Salvador M, Vivegas-Perez MP, and Vidal-Sanz M, Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3 and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996, vol. 37, PP: 489-500.
- [0351] 18. Di Polo A, Aigner LJ, Dunn RJ, Bray GM, and Aguayo AJ, Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998, vol. 95, PP: 3978-3983.
- [0352] 19. Klocker N, Kermer P, Weishaupt JH, Labes M, Ankerhold R, and Böhr M, Brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection of adult rat retinal ganglion cells in vivo does not exclusively depend on phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B signaling. *J. Neurosci.* 2000, vol. 20, PP: 6962-6967.
- [0353] 20. Ko ML, Hu DN, Ritch R, Sharma SC, and Chen CF, Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive eyes of rats. *Neurosci. Lett.* 2001,

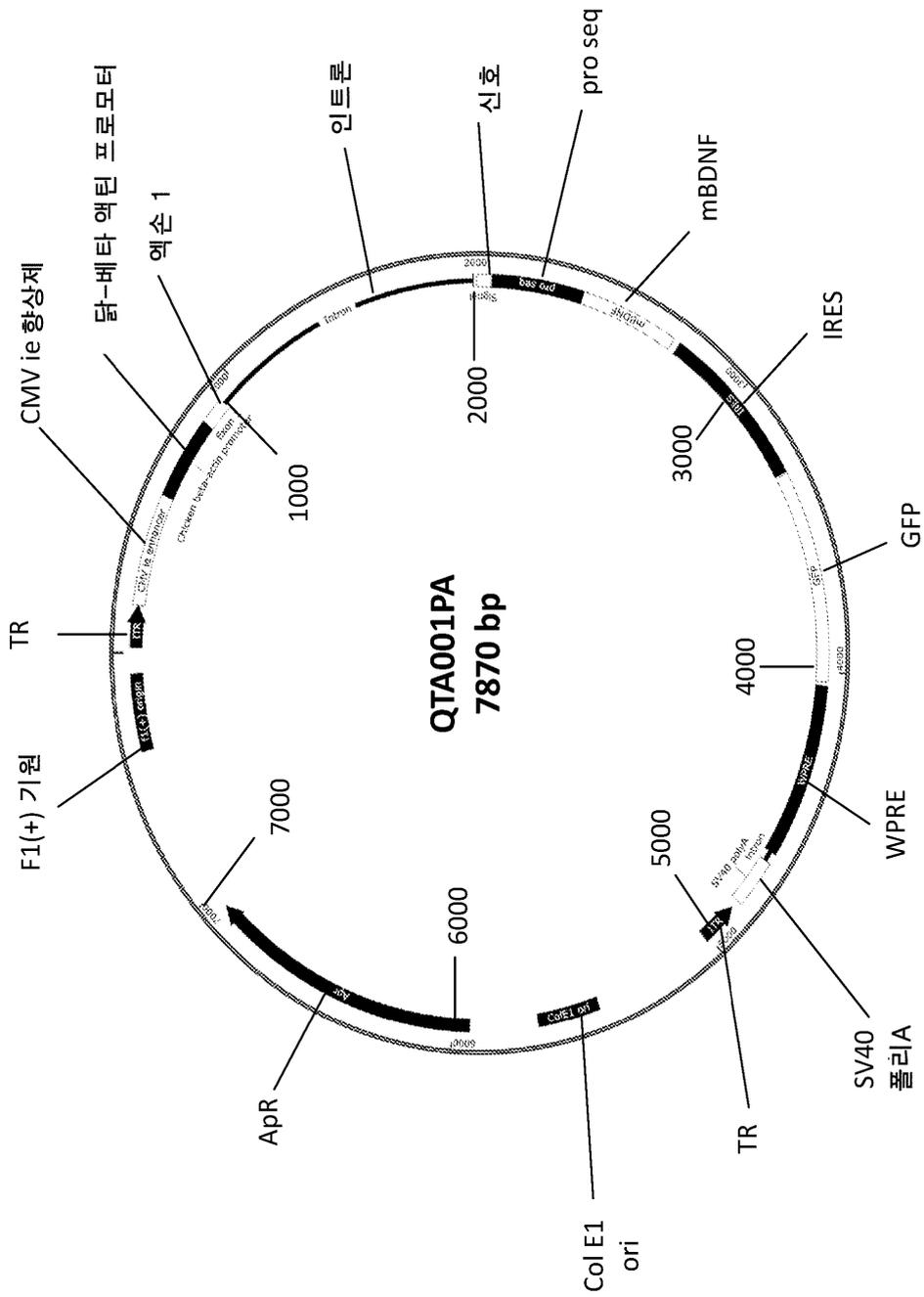
vol. 305, PP: 139-142.

- [0354] 21. Chen H, and Weber AJ, BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001, vol. 42, PP: 966-974.
- [0355] 22. Porez MTR, and Caminos E, Expression of brain-derived neurotrophic factor and its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci. Lett.* 1995, vol. 183, PP: 96-99.
- [0356] 23. Vecino E, Ugarte M, Nash MS, and Osborne NN. NMDA induces BDNF expression in the albino rat retina in vivo. *Neuroreport.* 1999 vol.10, PP: 1103-1106.
- [0357] 24. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, and Murphy RA. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.* 2001 vol 276, PP: 12660-12666.
- [0358] 25. Gupta VK, You Y, Gupta VB, Klistorner A, and Graham SL. TrkB receptor signalling: Implications in neurodegenerative, psychiatric and proliferative disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, vol.14, PP: 10122-10142
- [0359] 26. Teng,H.K., Teng,K.K., Lee,R., Wright,S., Tevar,S., Almeida,R.D., Kermani,P., Torkin,R., Chen,Z.Y., Lee,F.S., Kraemer,R.T., Nykjaer,A. and Hempstead,B.L. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75^{NTR} and sortilin. *J. Neurosci.* 2005, vol. 25, PP: 5455-5463.
- [0360] 27. Wei Y, Zhang F, Zao J, Jiang X, Lu Q, Gao E and Wand N. Enhanced protein expression of proBDNF and proNGF in elevated intraocular pressure-induced rat retinal ischemia. *Chin. Med. J.* 2012, vol. 125, PP: 3875-3879.
- [0361] 28. Woo NH, Teng HK, Siao C-J, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL and Lu B. Activation of p75^{NTR} by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nature Neurosci.* 2005, vol 8, PP: 1069-1077.
- [0362] 29. Lebrun-Julien F, Bertrand MJ, De Backer O, Stellwagen D, Morales CR, Di Polo A, and Barker PA. ProNGF induces TNFalpha-dependent death of retinal ganglion cells through a p75^{NTR} non-cell-autonomous signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2010 vol. 107, PP: 3817-3822.
- [0363] 30. Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, Pease ME, Kerrigan-Baumrind LA, Kerrigan DF, and Mitchell RS, Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2000 vol. 41, PP: 3460-3466.
- [0364] 31. Pease ME McKinnon SJ, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, and Zack DJ, Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TRKB in experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000, vol. 41, PP: 764-774.
- [0365] 32. Wei Y, Wang N, Lu Q, Zhang N, Zheng D, and Li J. Enhanced protein expressions of sortilin and p75^{NTR} in retina of rat following elevated intraocular pressure-induced retinal ischemia. *Neurosci. Lett.* 2007, vol. 429, PP: 169-174.
- [0366] 33. Martin KRG, Quigley HA, Zack DJ, Levkovitch-Verbin H, Kielczewski J, Valenta D, Baumrind L, Pease ME, Klein RL, and Hauswirth WW, Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: Retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2003, vol. 44, PP: 4357-4365.
- [0367] 34. Ren R, Li Y, Liu Z, Liu K, and He S, Long-term rescue of rat retinal ganglion cells and visual function by AAV-mediated BDNF expression after acute elevation of intraocular pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2012, vol. 53, PP: 1003-1011.
- [0368] 35. Cheng L, Sapieha P, Kittlerova P, Hauswirth WW, Di Polo A, TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death *in vivo*. *J. Neurosci.*, 2002, vol. 22, PP: 3977-3986.
- [0369] 36. Bai Y, Xu J, Brahimi F, Zhuo Y, Sarunic MV, and Saragovi HU, An agonistic TrkB mAb causes

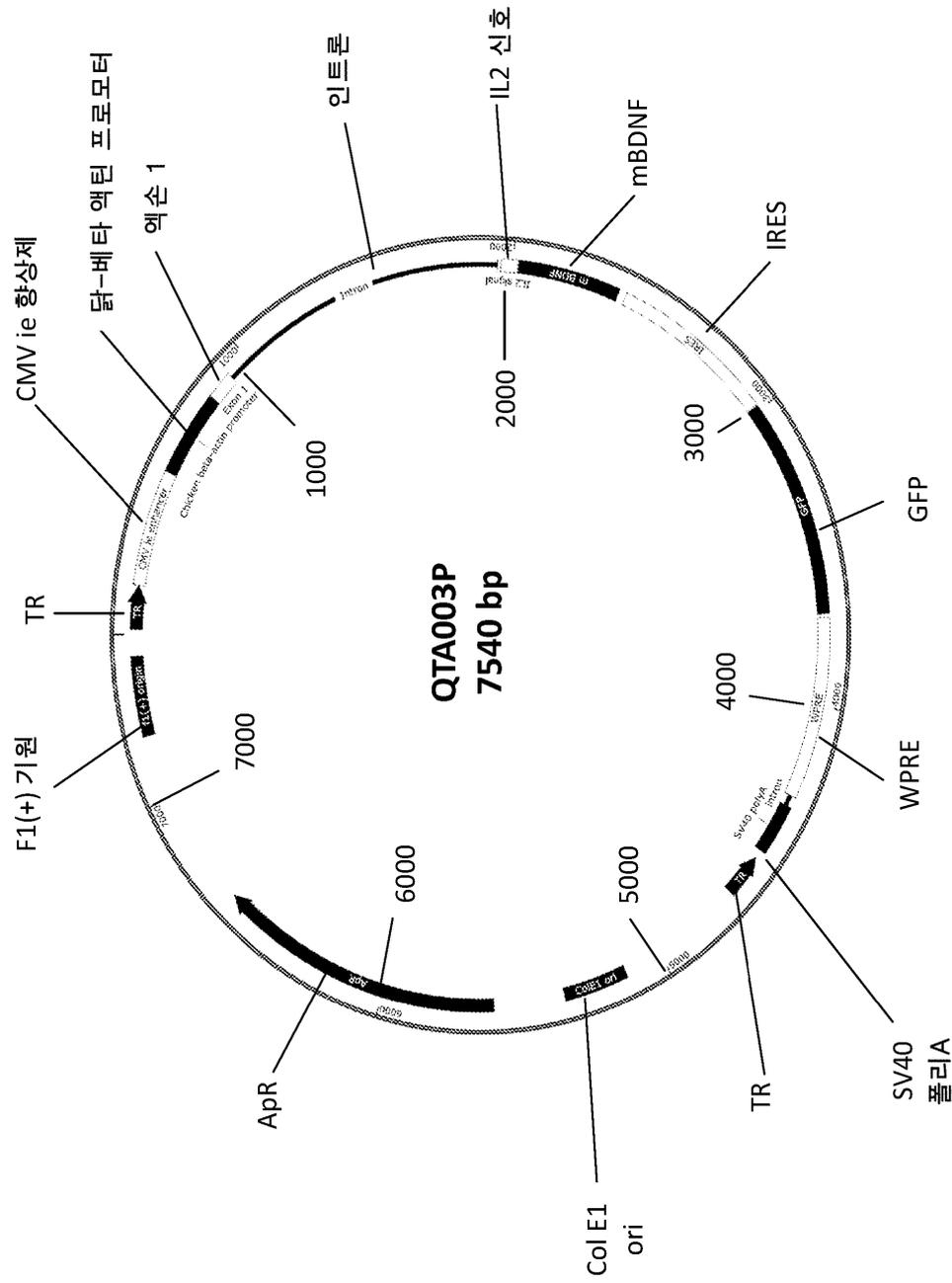
sustained TrkB activation, delays RGC death, and protects the retinal structure in optic nerve axotomy and in glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012, vol. 51, PP: 4722-4731.

- [0370] 37. Jelsma TN, Hyman Friedman H, Berkelaar M, Bra. GM, and Aguayo AJ, Different forms of the neurotrophin receptor *trkB* mRNA predominate in rat retina and optic nerve. *J. Neurobiol.* 1993, vol. 24, PP: 1207-1214.
- [0371] 38. Gomes JR, Costa JT, Melo CV, Felizzi F, Monteiro P, Pinto MJ, Inacio AR, Wieloch T, Almeida RD, Gryos M, and Duarte CB, Excitotoxicity down regulates TrkB.F1 signaling and up regulates the neuroprotective truncated TrkB receptors in cultured hippocampal and striatal neurons *J. Neurosci.* 2012, vol. 32, PP: 4610-4622.
- [0372] 39. Gupta VK, You Y, Klistorner A, and Graham SL. Shp-2 regulates the TrkB receptor activity in the retinal ganglion cells under glaucomatous stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012, vol. 1822, PP: 1643-1649.
- [0373] 40. Khalin I, Alyautdin R, Kocherga G, Bakar MA, Targeted delivery of brain-derived neurotrophic factor for the treatment of blindness and deafness. *Int. J. Nanomedicine.* 2015, vol. 10, PP: 3245-3267.
- [0374] 41. Budenz CL, Wong HT, Swiderski DL, Shibata SB, Pflingst BE, Raphael Y, Differential effects of AAV.BDNF and AAV.Ntf3 in the deafened adult guinea pig ear. *Sci. Rep.* 2015, vol. 5 PP: 8619.
- [0375] 42. Havenith S, Versnel H, Klis SF, Grolman W, Local delivery of brain-derived neurotrophic factor on the perforated round window membrane in Guinea pigs: a possible clinical application. *Otol Neurotol.* 2015, vol.36, PP:705-711.
- [0376] 43. Jian-Yi Zhang J-Y, Luo X-G, Xian CJ, Liu Z-H, Zhou X-F (2008) Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur. J. Neurosci.* Vol. 12, PP: 4171-4180.
- [0377] 44. Lindsey RM (1988) Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons. *J. Neurosci.* vol. 8, PP: 2394-2405.
- [0378] 45. Martinez-Salas E. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999, vol. 10, PP: 458-464.
- [0379] 46. Harries M *et al.* Comparison of bicistronic retroviral vectors containing internal ribosome entry sites (IRES) using expression of human interleukin-12 (IL-12) as a readout. *J. Gene Med.* 200 vol. 2, PP: 243-249.
- [0380] 47. Furler S, Paterna J-C, Weibel M and Bueler H Recombinant AAV vectors containing the foot and mouth disease virus 2A sequence confer efficient bicistronic gene expression in cultured cells and rat substantia nigra neurons *Gene Ther.* 2001, vol. 8, PP: 864-873.

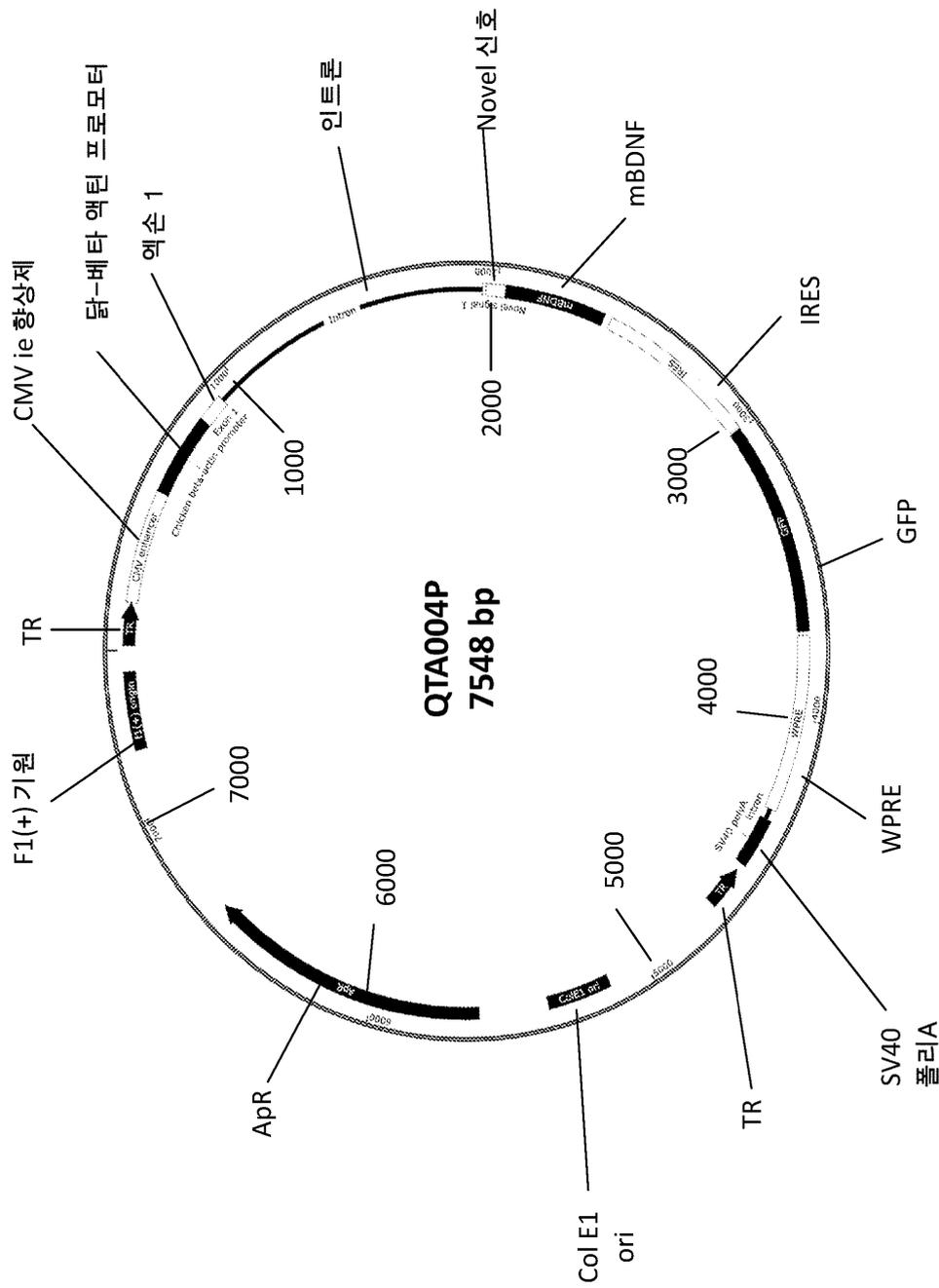
도면2



도면4

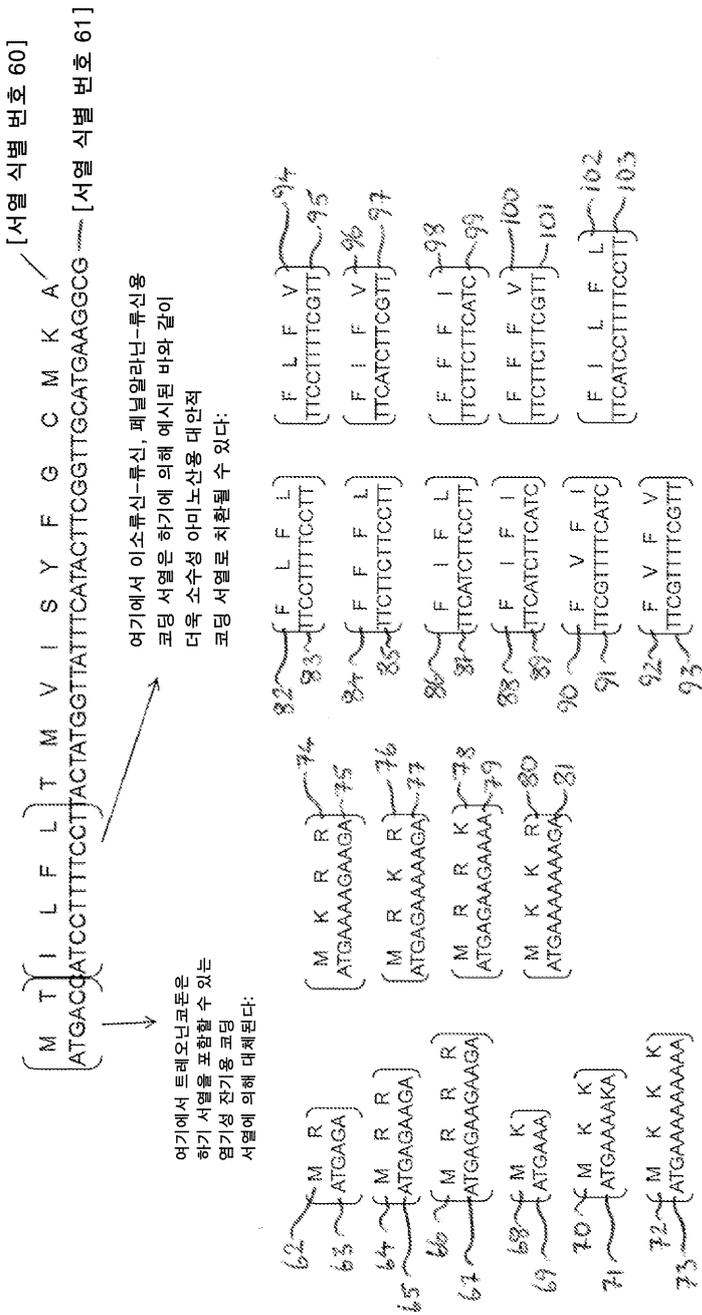


도면5

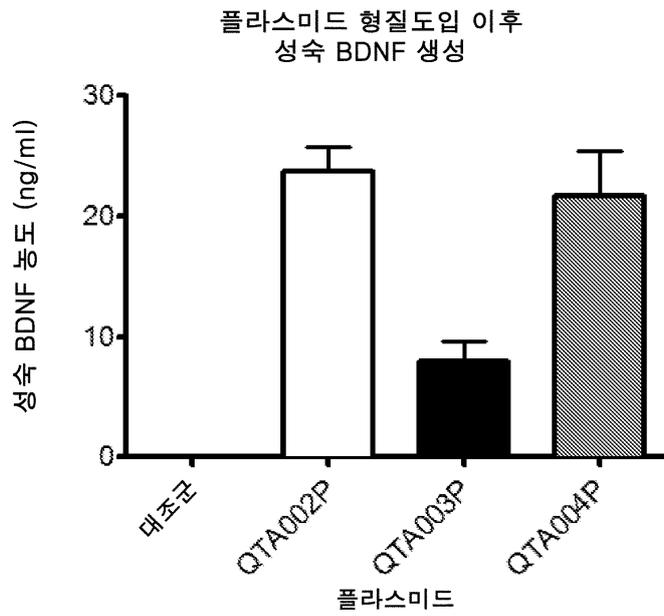


도면6

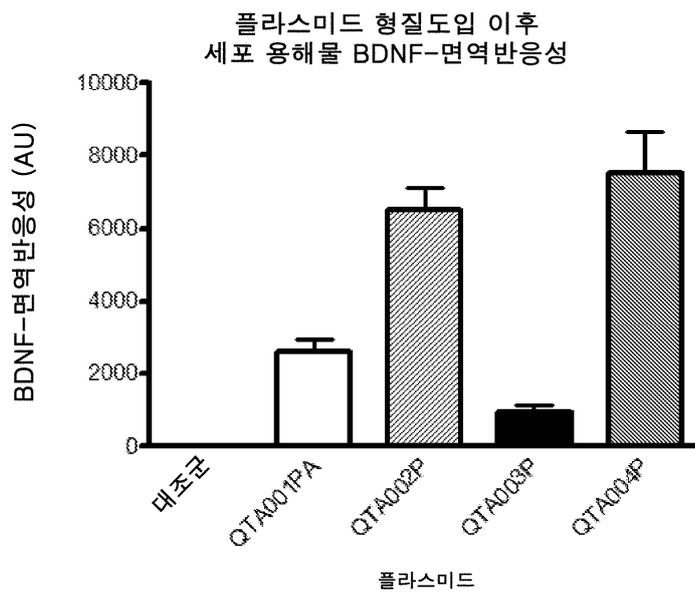
BDNF 표준적 펩타이드 및 코딩 서열



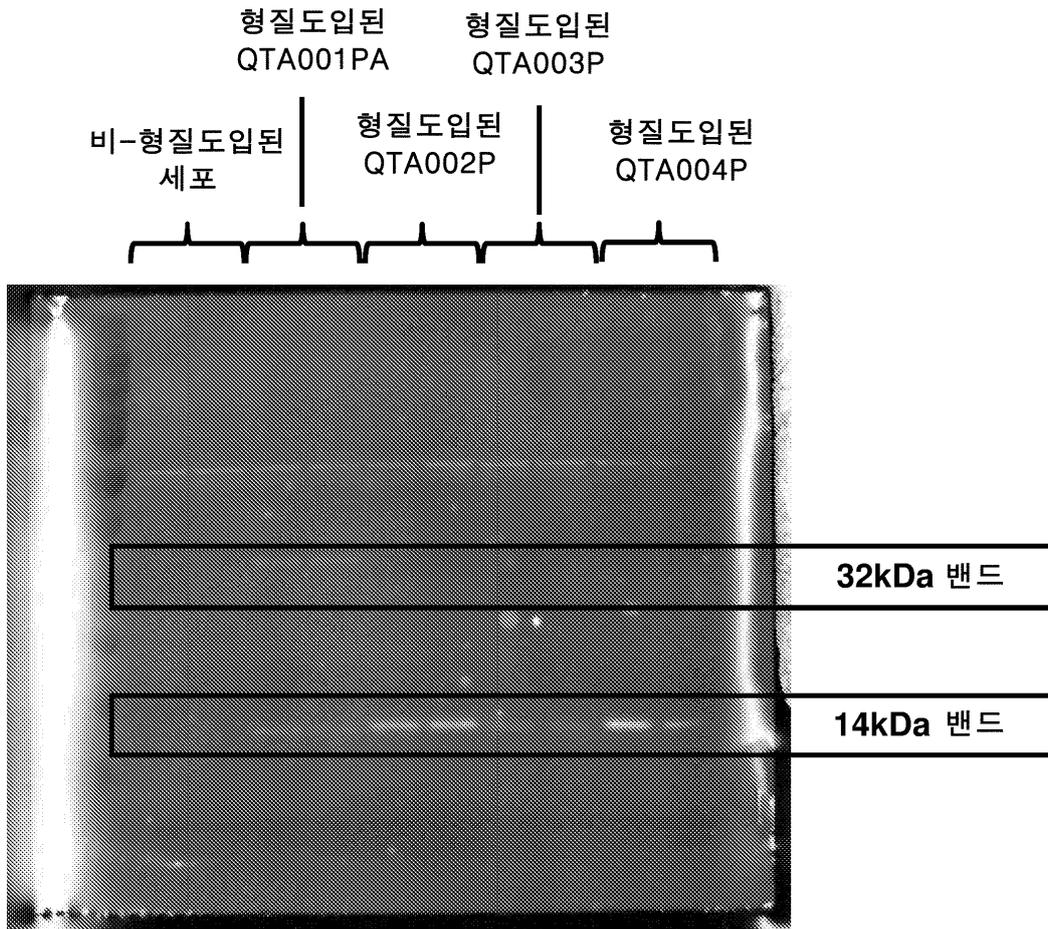
도면7



도면8

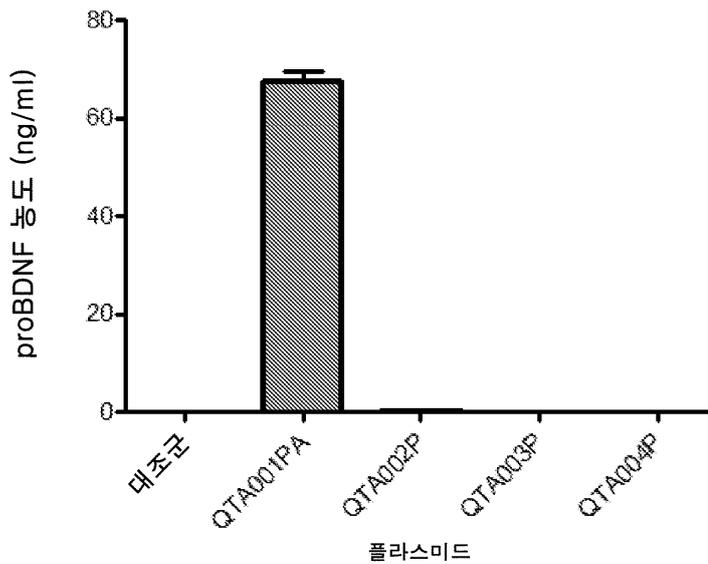


도면9

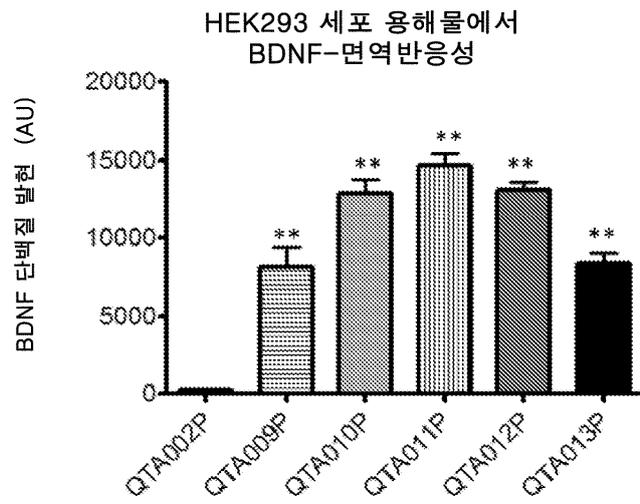


도면10

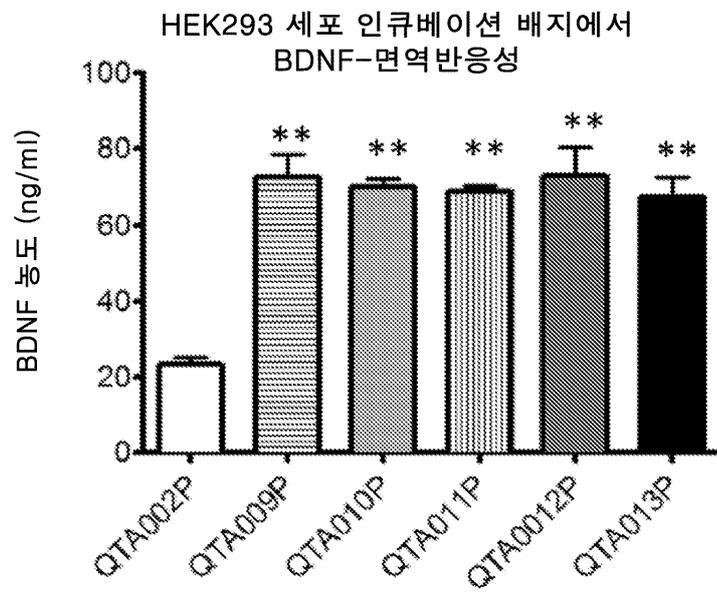
플라스미드 형질도입 이후 24 시간에 HEK293 세포로부터 ProBDNF 단백질 방출



도면11



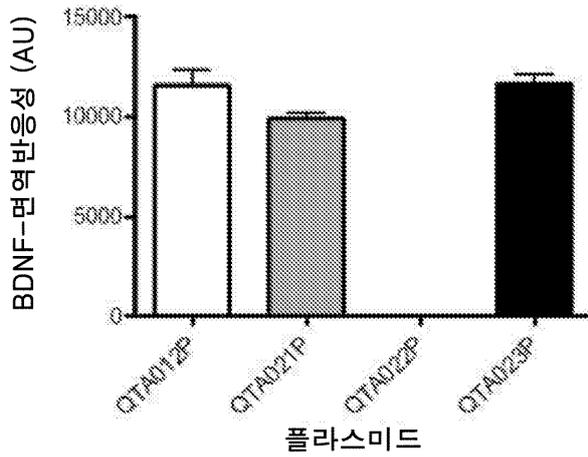
도면12



도면13a

A: HEK293 세포 용해물에서 BDNF

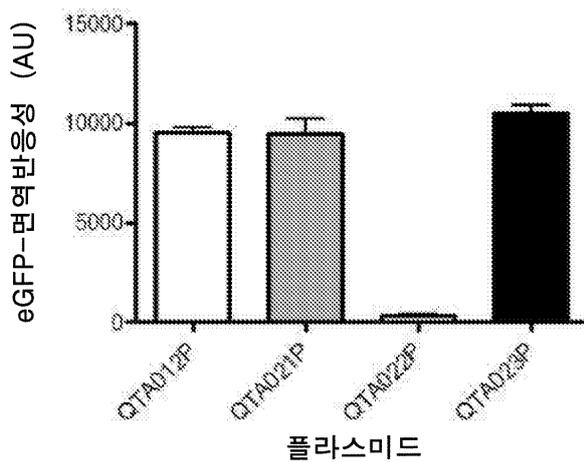
플라스미드 형질도입 이후 HEK293 세포 용해물에서 BDNF-면역반응성



도면13b

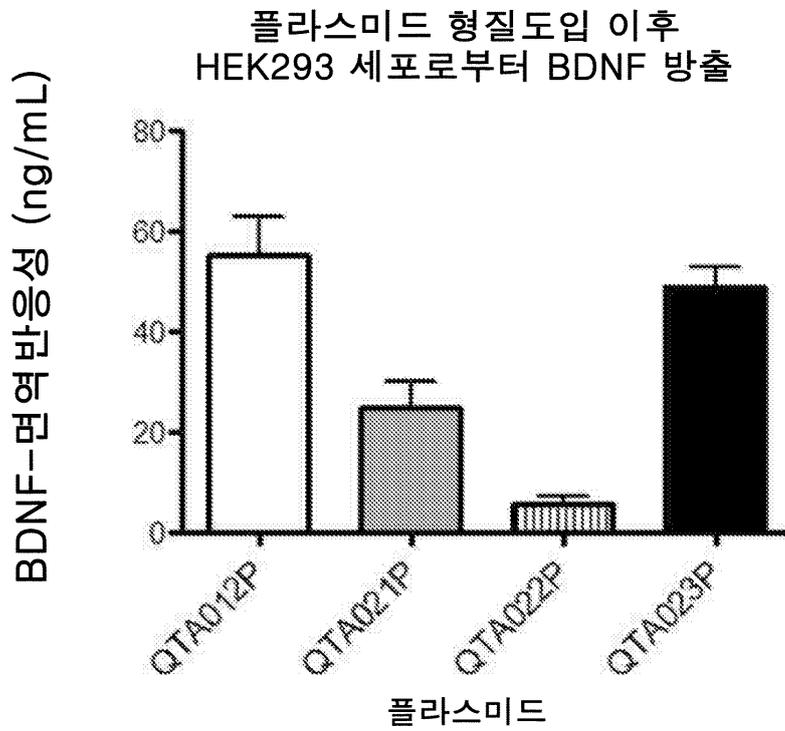
B: HEK293 세포 용해물에서 eGFP

플라스미드 형질도입 이후 HEK293 세포 용해물에서 eGFP-면역반응성



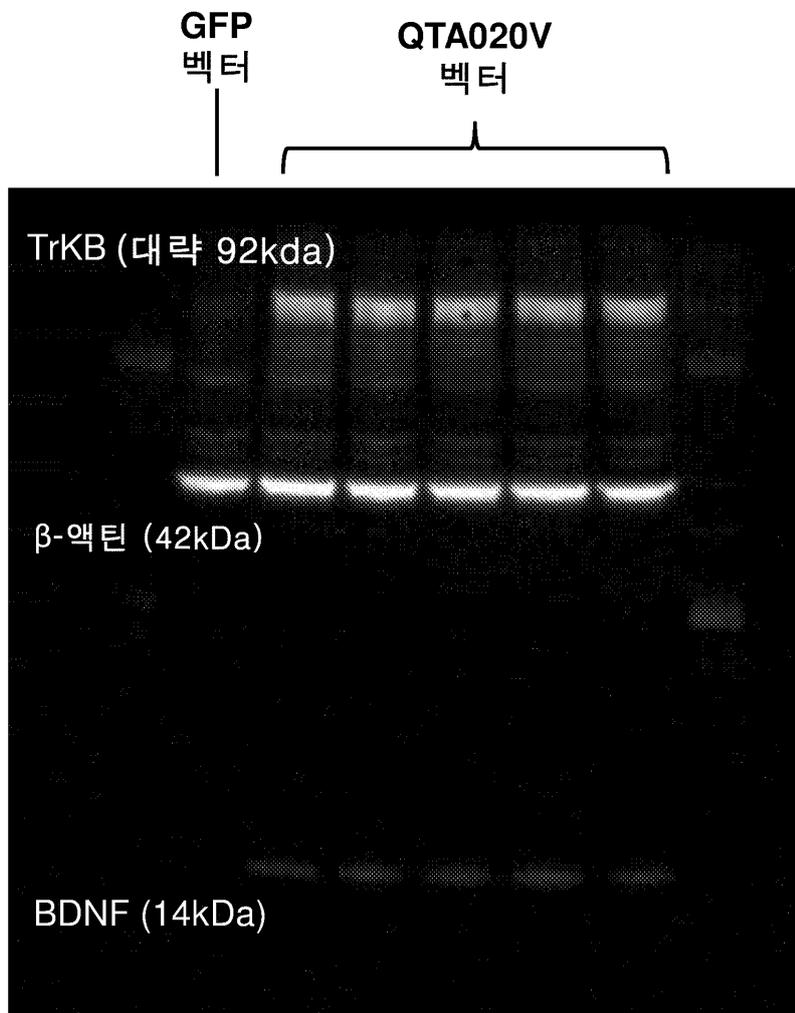
도면13c

C: HEK293 세포로부터 BDNF 방출



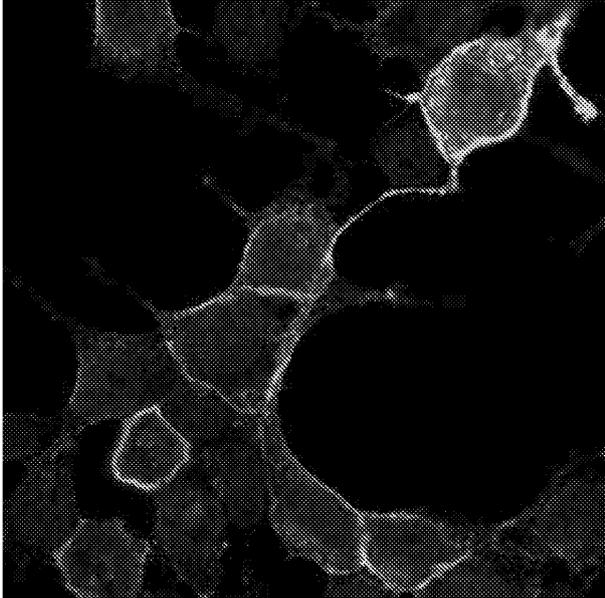
도면14a

A: HEK293 세포의 웨스턴 블랏



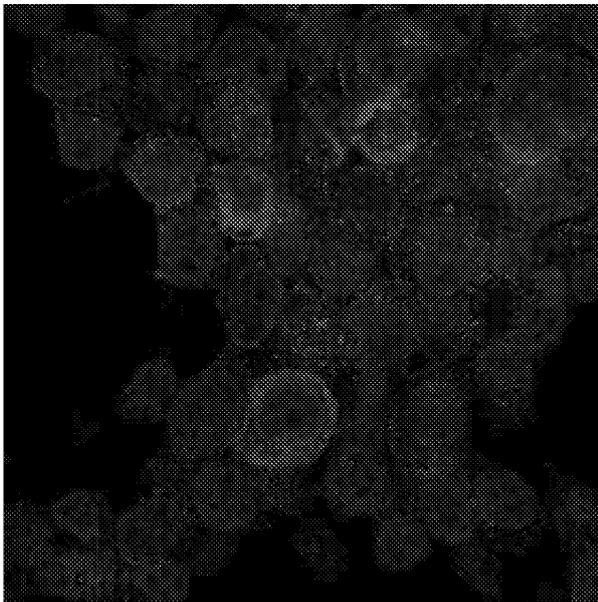
도면14b

B: HEK293 세포에서 TrkB 발현



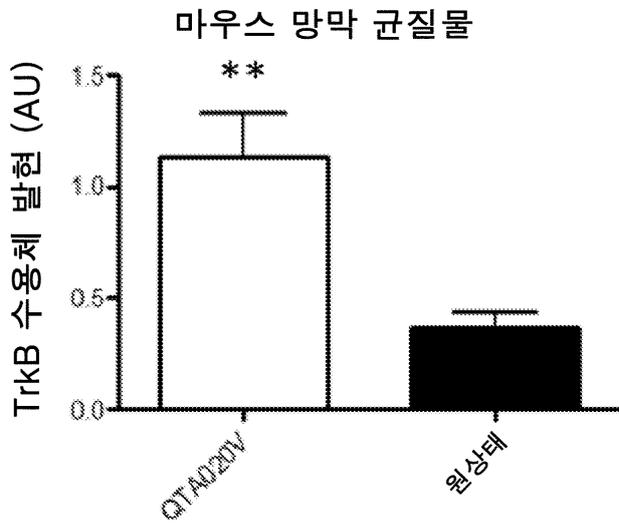
도면14c

C: HEK293 세포에서 BDNF 발현

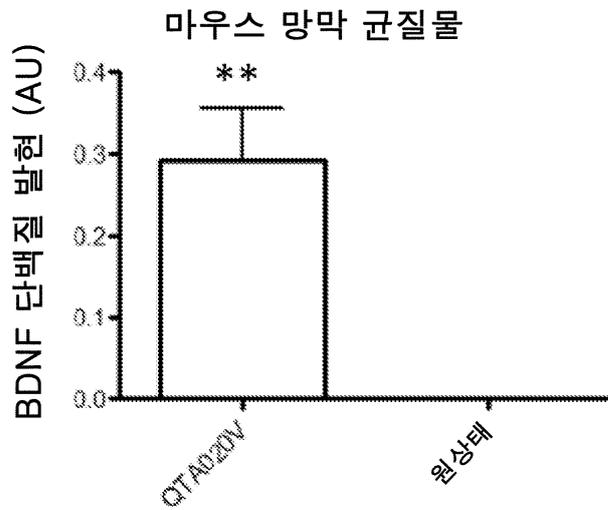


도면15

A: TrkB 수용체 발현

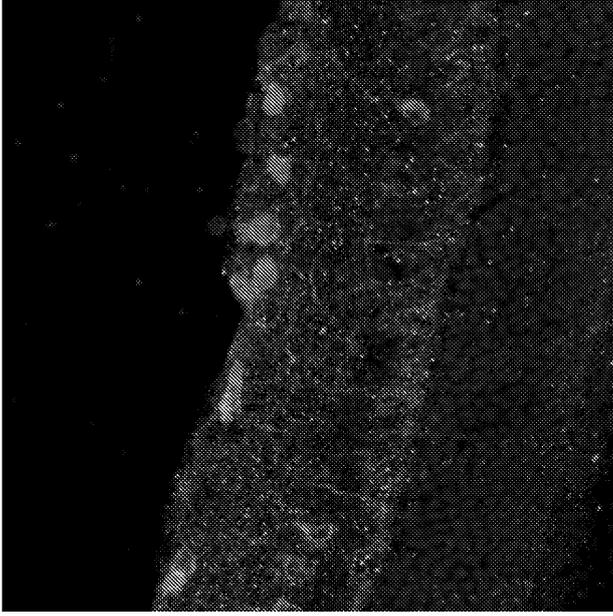


B: BDNF 단백질 발현

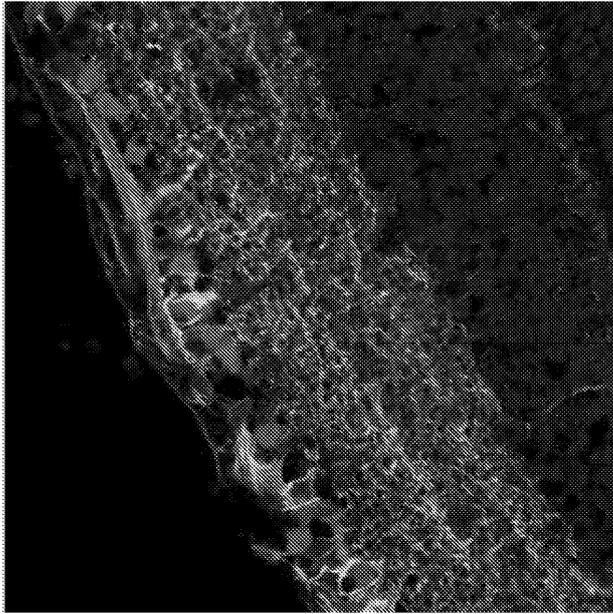


도면16

B: BDNF 염색 (녹색)

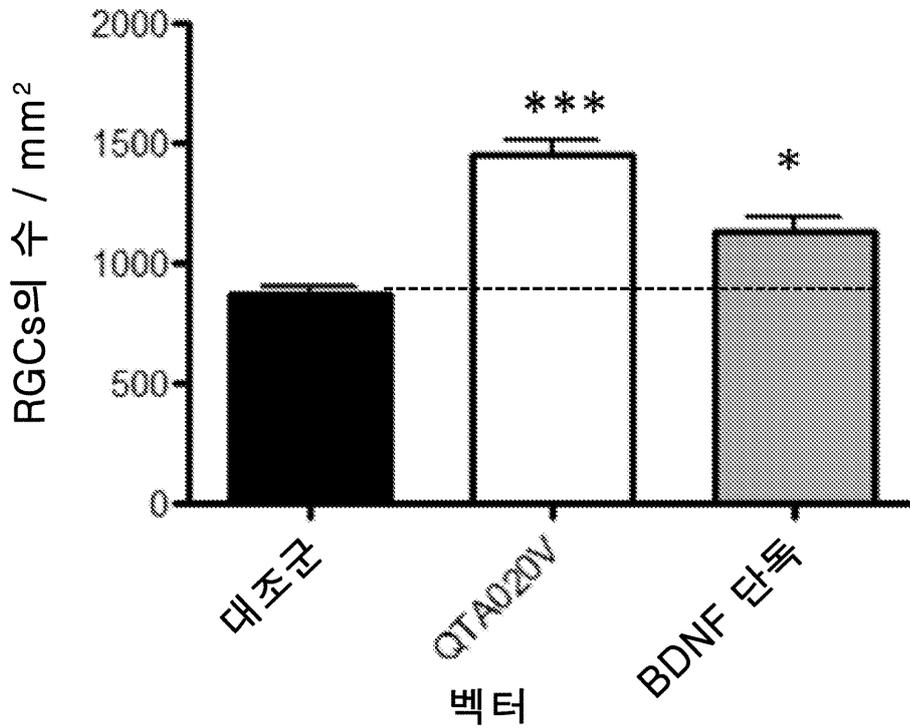


A: TrkB 염색 (적색)



도면17

마우스 ONC RGC 카운트



서열목록

<110> Quethera Limited
 <120> GENETIC CONSTRUCT
 <130> 2018-FPA-8647
 <160> 108
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 469
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(469)
 <223> Promoter: Human synapsin I (SYN I) promoter
 <400> 1

```

ctgcagaggg cctgcgtat gactgcaagt gggttttagg accaggatga ggcggggtgg      60
gggtgcctac ctgacgaccg acccegacce actggacaag cacccaacce ccattcecca      120
aattgcgat ccctatcag agagggggag gggaaacagg atgcggcgag gcgcgtgcgc      180
    
```

actgccagct tcagcaccgc ggacagtgcc ttcgccccg cctggcggcg cgcgccaccg 240
 ccgcctcagc actgaaggcg cgctgacgtc actcgccggt cccccgaaa ctccccttcc 300
 cggccacctt ggtcgcgtcc gcgcccgcgc cggcccagcc ggaccgcacc acgcgaggcg 360
 cgagataggg gggcacgggc gcgaccatct gcgctgcggc gccggcgact cagcgctgcc 420
 tcagtctgcg gtgggcagcg gaggagtcgt gtcgtgcctg agagcgcag 469

<210> 2

<211> 1733

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Promoter: It is the CAG promoter which comprises the following:

(C) the cytomegalovirus (CMV) early enhancer element, (A) the promoter, the first exon and the first intron of chicken beta-actin gene,

<400> 2

ctcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 60
 gcccatatat ggagtccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 120
 ccaacgacce ccgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccac ttggcagtac 240
 atcaagtgta tcatatgcca agtaccccc ctattgacgt caatgacggt aatggcccc 300

cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360
 tattagtcat cgctattacc atggtcgagg tgagcccccac gttctgcttc actctccca 420
 tctcccccc ctecccacc ccaattttgt atttatatat ttttaatta ttttgtgcag 480
 cgatgggggc gggggggggg ggggggcgcg ccgacggcgg ggcggggcgg ggcgaggggc 540
 ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca gagcggcgcg ctccgaaagt 600
 ttcttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggcctataa aaagcgaagc gcgcgccggg 660
 cgggagtcgc tgcgcgctgc cttgccccg tgccccgctc cgccgcccgc tcgcccgcgc 720

cgccccggct ctgactgacc gcgttactcc cacaggtgag cgggcgggac ggccttctc 780
 ctccgggctg taattagcgc ttggtttaat gacggcttgt ttctttctg tggctgcgtg 840
 aaagccttga ggggctccgg gagggccctt tgtgcggggg gagcggctcg gggggtgcgt 900
 gcgtgtgtgt gtgcgtgggg agcgcgcgct gcggctccgc gctgcccggc ggctgtgagc 960
 gctgcgggcg cggcgcgggg ctttgtgcgc tccgagtggt gcgaggggg agcgcggccg 1020
 ggggcgggtgc cccgcggtgc ggggggggct gcgaggggaa caaaggctgc gtgcggggtg 1080

tgtgcgtggg ggggtgagca gggggtgtgg gcgcgtcggg cgggctgcaa cccccctgc 1140

acccccctcc ccgagttgct gagcacggcc cggttcggg tgcggggctc cgtacggggc 1200

gtggcgcggg gctcggcgtg ccgggcgggg ggtggcggca ggtgggggtg ccgggcgggg 1260

cggggccgcc tcgggccggg gagggctcgg gggaggggcg cggcggcccc cggagcggc 1320

gcggctgtcg aggcgcggcg agccgcagcc attgcctttt atggtaatcg tgcgagaggg 1380

cgcagggact tcctttgtcc caaatctgtg cggagccgaa atctgggagg cggcccgca 1440

ccccctctag cgggcgcggg gcgaagcggg gcggcgcggg caggaaggaa atgggcgggg 1500

agggccttcg tgcgtcgccg gcgcccgctc ccctttctcc tctccagcct cggggtgtc 1560

cgcgggggga cggctgcctt cgggggggac ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg 1620

tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc atgttcatgc cttcttcttt ttctacagc 1680

tcctgggcaa cgtgctggtt attgtgctgt ctcatcattt tggcaaagaa ttg 1733

<210> 3

<211> 664

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Promoter: Truncated CAG nucleotide promoter sequence.

<400> 3

ctagatctga attcggtagc ctagtattta atagtaatca attacggggg cattagtcca 60

tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggccccg ctggctgacc 120

gccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat 180

agggactttc cattgacgtc aatgggtgga ctatttacgg taaactgccc acttggcagt 240

acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gteaatgacg gtaaatggcc 300

gccttgccat tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta 360

cgtattagtc atcgtatata ccatggtcga ggtgagcccc acgttctgct tcaactctcc 420

catctcccc cctccccac cccaatttt gtatttttt attttttaat tattttgtgc 480

agcgaatggg gcgggggggg ggggggggcg cgcgccaggc ggggcggggc ggggcgaggg 540

gcggggcggg gcgagggcga gaggtgcggc ggcagccaat cagagcggcg cgctccgaaa 600

gtttcctttt atggcgaggc ggcggcggcg gcggccctat aaaaagcgaa gcgcgcggcg 660

ggcg 664

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide sequence of spacer C-terminue

<400> 4

Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro

1 5 10

<210> 5

<211> 63

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> First embodiment of a spacer nucleotide sequence

<400> 5

ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aaggctggag acgtggagga gaaccctgga 60

cct 63

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First embodiment of a spacer peptide sequence

<400> 6

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Gln Ala Gly Asp Val Glu

1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 7

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Second embodiment of the spacer nucleotide sequence

<400> 7

agcggagcta ctaacttcag cctgetgaag caggctggag acgtggagga gaaccctgga 60

cct 63

<210> 8

<211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Second embodiment of the spacer peptide sequence
 <400> 8
 Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu

1 5 10 15
 Glu Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 9
 <211> 822
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

Met Ser Ser Trp Ile Arg Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu Trp
 1 5 10 15
 Gly Phe Cys Trp Leu Val Val Gly Phe Trp Arg Ala Ala Phe Ala Cys
 20 25 30
 Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ala Ser Arg Ile Trp Cys Ser Asp Pro
 35 40 45

Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val Asp
 50 55 60
 Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Phe Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn Leu
 85 90 95
 Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala His Lys Ala Phe Leu
 100 105 110

Lys Asn Ser Asn Leu Gln His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu Thr
 115 120 125
 Ser Leu Ser Arg Lys His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Glu Leu Ile
 130 135 140

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

 Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Asn Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr Val
 195 200 205
 Glu Glu Gly Lys Ser Ile Thr Leu Ser Cys Ser Val Ala Gly Asp Pro
 210 215 220
 Val Pro Asn Met Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His Met
 225 230 235 240
 Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile Ser
 245 250 255
 Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu Val

 260 265 270
 Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro Thr
 275 280 285
 Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile Pro
 290 295 300
 Phe Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr Asn
 305 310 315 320
 Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His Val
 325 330 335

 Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr
 340 345 350
 His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr Gly
 355 360 365
 Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly Ile
 370 375 380
 Asp Asp Gly Ala Asn Pro Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp Tyr
 385 390 395 400

Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn Glu
 405 410 415
 Ile Pro Ser Thr Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Leu Ser
 420 425 430
 Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu
 435 440 445
 Val Met Leu Phe Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met
 450 455 460
 Lys Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro
 465 470 475 480
 Leu His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly
 485 490 495
 Gly Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu
 500 505 510
 Asn Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr
 515 520 525
 Phe Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu
 530 535 540
 Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu
 545 550 555 560
 Cys Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp
 565 570 575
 Ala Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu
 580 585 590
 Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val
 595 600 605
 Glu Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp
 610 615 620
 Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala
 625 630 635 640
 Glu Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile

	645	650	655	
Ala Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe				
	660	665	670	
Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu				
	675	680	685	
Leu Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr				
	690	695	700	
Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met				
705	710	715	720	
Pro Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val				
	725	730	735	
Trp Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln				
	740	745	750	
Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln				
	755	760	765	
Gly Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu				
	770	775	780	
Leu Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Met Arg Lys Asn Ile				
785	790	795	800	
Lys Gly Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val				
	805	810	815	
Tyr Leu Asp Ile Leu Gly				
	820			
<210>	10			
<211>	2466			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<400>	10			
atgtcgtcct ggataaggtg gcatggacc gccatggcgc ggctctgggg cttctgctgg				60
ctggttgtag gcttctggag ggccgctttc gctgtgccca cgtcctgcaa atgcagtgcc				120
tctcggatct ggtgcagcga cccttctcct ggcacgtgg catttccgag attggagcct				180
aacagtgtag atcctgagaa catcaccgaa attttcatcg caaaccagaa aaggttagaa				240

atcatcaacg aagatgatgt tgaagcttat gtgggactga gaaatctgac aattgtggat 300
 tctggattaa aatttgtggc tcataaagca tttctgaaaa acagcaacct gcagcacatc 360
 aattttaccg gaaacaaact gacgagtttg tctaggaaac atttccgtca ccttgacttg 420
 tctgaactga tcctgggtggg caatccattt acatgctcct gtgacattat gtggatcaag 480

 actctccaag aggctaaatc cagtccagac actcaggatt tgtactgcct gaatgaaagc 540
 agcaagaata ttccccctggc aaacctgcag ataccaatgt gtggtttggc atctgcaaat 600
 ctggccgcac ctaacctcac tgtggaggaa ggaaagtcta tcacattatc ctgtagtgtg 660
 gcaggtgacg cggttcctaa tatgtattgg gatgttgta acctggttcc caaacatag 720
 aatgaaaca gccacacaca gggctcctta aggataacta acatttcac cgatgacagt 780
 gggaagcaga tctcttgtgt ggcggaaaat cttgtaggag aagatcaaga ttctgtcaac 840
 ctactgtgc attttgacc aactatcaca tttctcgaat ctccaacctc agaccaccac 900

 tgggtcattc cattcactgt gaaaggcaac cccaaccag cgcttcagtg gttctataac 960
 ggggcaatat tgaatgagtc caaatacatc tgtactaaaa tacatgttac caatcacacg 1020
 gagtaccacg gctgcctcca gctggataat cccactcaca tgaacaatgg ggactacact 1080
 ctaatagcca agaatgagta tgggaaggat gagaacaga tttctgctca cttcatgggc 1140
 tggcctggaa ttgacgatgg tgcaaaccca aattatcctg atgtaattta tgaagattat 1200
 ggaactgcag cgaatgacat cggggacacc acgaacagaa gtaatgaaat cccttcaca 1260
 gacgtcactg ataaaaccgg tcgggaacat ctctcggtct atgctgtggt ggtgatgcg 1320

 tctgtggtgg gatthtgcct tttggtaatg ctgtttctgc ttaagttggc aagacactcc 1380
 aagtttgga tgaaggccc agcctccgtt atcagcaatg atgatgactc tgccagccca 1440
 ctccatcaca tctccaatgg gagtaacct ccactctctt cggaaggtgg cccagatgct 1500
 gtcatatttg gaatgaccaa gatccctgtc attgaaaatc cccagtaactt tggcatcacc 1560
 aacagtcagc tcaagccaga cacatttgtt cagcacatca agcgacataa cattgttctg 1620
 aaaagggagc taggcgaagg agcctttgga aaagtgttcc tagctgaatg ctataacctc 1680
 tgtcctgagc aggacaagat cttggtggca gtgaagacce tgaaggatgc cagtgacaat 1740

 gcacgcaagg acttccaccg tgaggccgag ctctgacca acctccagca tgagcacatc 1800
 gtcaagttct atggcgtctg cgtggagggc gacccctca tcatggtctt tgagtacatg 1860
 aagcatgggg acctcaaca gttcctcagg gcacacggcc ctgatgccgt gctgatggct 1920
 gagggcaacc cgcccacgga actgacgcag tcgcagatgc tgcatatagc ccagcagatc 1980
 gcccgggca tggcttacct ggcgtcccag cacttctgac accgcgattt ggccaccagg 2040
 aactgcctgg tcggggagaa cttgtctgtg aaaatcgggg actttgggat gtcccgggac 2100

gtgtacagca ctgactacta cagggtcggg ggccacacaa tgctgcccat tcgctggatg 2160
 cctccagaga gcatcatgta caggaaattc acgacggaaa gcgacgtctg gacccctgggg 2220
 gtcgtgttgt gggagatttt cacctatggc aaacagccct ggtaccagct gtcaaacaat 2280
 gaggtgatag agtgtatcac tcagggccga gtctgcagc gaccccgcac gtgccccag 2340
 gaggtgtatg agctgatgct ggggtgctgg cagcgagagc cccacatgag gaagaacatc 2400
 aagggcatec ataccctcct tcagaacttg gccaaaggcat ctccggteta cctggacatt 2460
 ctaggc 2466

<210> 11
 <211> 838
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Ser Ser Trp Ile Arg Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu Trp

1 5 10 15

Gly Phe Cys Trp Leu Val Val Gly Phe Trp Arg Ala Ala Phe Ala Cys

20 25 30

Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ala Ser Arg Ile Trp Cys Ser Asp Pro

35 40 45

Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val Asp

50 55 60

Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Phe Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu Glu

65 70 75 80

Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn Leu

85 90 95

Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala His Lys Ala Phe Leu

100 105 110

Lys Asn Ser Asn Leu Gln His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu Thr

115 120 125

Ser Leu Ser Arg Lys His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Glu Leu Ile

130 135 140

Leu Val Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Ile Lys

145 150 155 160
 Thr Leu Gln Glu Ala Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr Cys
 165 170 175
 Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Ile Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile Pro
 180 185 190
 Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Asn Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr Val
 195 200 205

 Glu Glu Gly Lys Ser Ile Thr Leu Ser Cys Ser Val Ala Gly Asp Pro
 210 215 220
 Val Pro Asn Met Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His Met
 225 230 235 240
 Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile Ser
 245 250 255
 Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu Val
 260 265 270
 Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro Thr

 275 280 285
 Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile Pro
 290 295 300
 Phe Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr Asn
 305 310 315 320
 Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His Val
 325 330 335
 Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr
 340 345 350

 His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr Gly
 355 360 365
 Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly Ile
 370 375 380
 Asp Asp Gly Ala Asn Pro Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp Tyr
 385 390 395 400
 Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn Glu

405 410 415
 Ile Pro Ser Thr Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Leu Ser

420 425 430
 Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu

435 440 445
 Val Met Leu Phe Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met

450 455 460
 Lys Asp Phe Ser Trp Phe Gly Phe Gly Lys Val Lys Ser Arg Gln Gly

465 470 475 480
 Val Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro

485 490 495
 Leu His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly

500 505 510
 Gly Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu

515 520 525
 Asn Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr

530 535 540
 Phe Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu

545 550 555 560
 Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu

565 570 575
 Cys Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp

580 585 590
 Ala Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu

595 600 605
 Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val

610 615 620
 Glu Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp

625 630 635 640
 Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala

645 650 655
 Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala

Glu Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile

660 665 670

Ala Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe

675 680 685

Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu

690 695 700

Leu Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr

705 710 715 720

Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met

725 730 735

Pro Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val

740 745 750

Trp Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln

755 760 765

Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln

770 775 780

Gly Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu

785 790 795 800

Leu Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Met Arg Lys Asn Ile

805 810 815

Lys Gly Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val

820 825 830

Tyr Leu Asp Ile Leu Gly

835

<210> 12

<211> 2514

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

atgtcgtcct ggataagggtg gcatggacc cccatggcgc ggctctgggg cttctgctgg 60

ctggttgtgg gcttctggag ggccgctttc gctgtccca cgtcctgcaa atgcagtgcc 120

tctcggatct ggtgcagcga cccttctcct ggcatcgtgg catttccgag attggagcct 180

aacagtgtag atcctgagaa catcaccgaa attttcatcg caaaccagaa aaggttagaa 240
atcatcaacg aagatgatgt tgaagcttat gtgggactga gaaatctgac aattgtggat 300
tctggattaa aatttgtggc tcataaagca tttctgaaaa acagcaacct gcagcacatc 360
aattttaccg gaaacaaact gacgagtttg tctaggaaac atttccgtca ccttgacttg 420

tctgaactga tcttgggtggg caatccattt acatgctcct gtgacattat gtggatcaag 480
actctccaag aggctaaatc cagtccagac actcaggatt tgtactgcct gaatgaaagc 540
agcaagaata ttcccctggc aaacctgcag ataccaatt gtggtttgcc atctgcaaat 600
ctggccgcac ctaacctcac tgtggaggaa ggaaagtcta tcacattatc ctgtagtgtg 660
gcaggtgatc cggttcctaa tatgtattgg gatgttggta acctggttcc caaacatatg 720
aatgaaaca gccacacaca gggctcctta aggataacta acatttcac c gatgacagt 780
gggaagcaga tctcttgtgt ggcggaaaat ctgttaggag aagatcaaga tctgtcaac 840

ctcactgtgc attttgacc aactatcaca tttctcgaat ctccaacctc agaccaccac 900
tggtgcatte cattcactgt gaaaggcaac cccaaaccag cgcttcagtg gtctataac 960
ggggcaatat tgaatgagtc caaatacac tgtactaaaa tacatgttac caatcacacg 1020
gagtaccacg gctgcctcca gctggataat cccactcaca tgaacaatgg ggactacact 1080
ctaatagcca agaatgagta tgggaaggat gaaaaacaga tttctgctca ctcatgggc 1140
tggcctggaa ttgacgatgg tgcaaaccca aattatctg atgtaattta tgaagattat 1200
ggaactgcag cgaatgacat cggggacacc acgaacagaa gtaatgaaat ccctccaca 1260

gacgtcactg ataaaaccgg tcggaacat ctctcggtct atgctgtggt ggtgattgcg 1320
tctgtggtgg gatthtgcct tttggtaatg ctgtttctgc ttaagttggc aagacactcc 1380
aagtttgca tgaagattt ctcatggttt ggatttggga aagtaaaatc aagacaaggt 1440
gttggcccag cctccgttat cagcaatgat gatgactctg ccagcccact ccatcacatc 1500
tccaatggga gtaaacctcc atcttcttcg gaaggtggcc cagatgctgt cattattgga 1560
atgaccaaga tcctgtcat tgaataccc cagtactttg gcatcacca cagtcagctc 1620
aagccagaca catttgttca gcacatcaag cgacataaca ttgttctgaa aaggagcta 1680

ggcgaaggag cctttgaaa agtgttcta gctgaatgct ataacctctg tctgagcag 1740
gacaagatct tgggtggcagt gaagacctg aaggatgcca gtgacaatgc acgcaaggac 1800
ttccaccgtg aggccgagct cctgaccaac ctccagcatg agcacatcgt caagtictat 1860
ggcgtctgcg tggagggcga cccctcatc atggtctttg agtacctgaa gcatggggac 1920
ctcaacaagt tctcagggc acacggcct gatgccgtgc tgatggctga gggcaaccg 1980
cccacggaac tgacgcagtc gcagatgctg catatagccc agcagatcgc cgcgggcatg 2040

gctacctgg cgicccagca cttcgtgcac cgcgatttgg ccaccaggaa ctgcctggtc 2100

ggggagaact tgctggtgaa aatcggggac tttgggatgt cccgggacgt gtacagcact 2160

gactactaca gggtcgggtgg ccacacaatg ctgccattc gctggatgcc tccagagagc 2220

atcatgtaca gaaattcac gacgaaaagc gacgtctgga gcctgggggt cgtgttgtgg 2280

gagattttca cctatggcaa acagccctgg taccagctgt caaacaatga ggtgatagag 2340

tgtatcactc agggccgagt cctgcagega ccccgcacgt gccccagga ggtgtatgag 2400

ctgatgctgg ggtgctggca gcgagagccc cacatgagga agaacatcaa gggcatccat 2460

accctccttc agaacttggc caaggcatct ccggtctacc tggacattct aggc 2514

<210> 13
 <211> 822
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

Met Ser Ser Trp Ile Arg Trp His Gly Pro Ala Met Ala Arg Leu Trp
 1 5 10 15

Gly Phe Cys Trp Leu Val Val Gly Phe Trp Arg Ala Ala Phe Ala Cys
 20 25 30

Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ala Ser Arg Ile Trp Cys Ser Asp Pro
 35 40 45

Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val Asp
 50 55 60

Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Phe Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn Leu
 85 90 95

Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala His Lys Ala Phe Leu
 100 105 110

Lys Asn Ser Asn Leu Gln His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu Thr
 115 120 125

Ser Leu Ser Arg Lys His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Glu Leu Ile
 130 135 140

Leu Val Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Ile Lys
 145 150 155 160
 Thr Leu Gln Glu Ala Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr Cys
 165 170 175
 Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Ile Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile Pro
 180 185 190
 Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Asn Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr Val
 195 200 205
 Glu Glu Gly Lys Ser Ile Thr Leu Ser Cys Ser Val Ala Gly Asp Pro
 210 215 220
 Val Pro Asn Met Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His Met
 225 230 235 240
 Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile Ser
 245 250 255
 Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu Val
 260 265 270

 Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro Thr
 275 280 285
 Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile Pro
 290 295 300
 Phe Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr Asn
 305 310 315 320
 Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His Val
 325 330 335
 Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro Thr
 340 345 350
 His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr Gly
 355 360 365
 Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly Ile
 370 375 380
 Asp Asp Gly Ala Asn Pro Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp Tyr
 385 390 395 400

Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn Glu
 405 410 415

 Ile Pro Ser Thr Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Leu Ser
 420 425 430
 Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu
 435 440 445
 Val Met Leu Phe Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met
 450 455 460
 Lys Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro
 465 470 475 480
 Leu His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly
 485 490 495
 Gly Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu
 500 505 510
 Asn Pro Gln Glu Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr
 515 520 525
 Phe Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu
 530 535 540
 Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu
 545 550 555 560

 Cys Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp
 565 570 575
 Ala Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu
 580 585 590
 Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val
 595 600 605
 Glu Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp
 610 615 620
 Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala
 625 630 635 640
 Glu Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile

atcatcaacg aagatgatgt tgaagcttat gtgggactga gaaatctgac aattgtggat 300
 tctggattaa aatttgtggc tcataaagca tttctgaaaa acagcaacct gcagcacatc 360
 aattttaccg gaaacaaact gacgagtttg tctaggaaac atttccgtca ccttgacttg 420
 tctgaactga tcctgggtggg caatccattt acatgctcct gtgacattat gtggatcaag 480

 actctccaag aggctaaatc cagtccagac actcaggatt tgtactgcct gaatgaaagc 540
 agcaagaata ttccccctggc aaacctgcag ataccaatgt gtggtttgcc atctgcaaat 600
 ctggccgcac ctaacctcac tgtggaggaa ggaaagtcta tcacattatc ctgtagtgtg 660
 gcaggtgacg cggttcctaa tatgtattgg gatgttgta acctggttcc caaacatag 720
 aatgaaaca gccacacaca gggctcctta aggataacta acatttcac cgatgacagt 780
 gggaagcaga tctcttgtgt ggcggaaaat cttgtaggag aagatcaaga ttctgtcaac 840
 ctactgtgc attttgacc aactatcaca tttctcgaat ctccaacctc agaccaccac 900

 tggtgattc cattcactgt gaaaggcaac cccaaccag cgcttcagtg gttctataac 960
 ggggcaatat tgaatgagtc caaatacatc tgtactaaaa tacatgttac caatcacacg 1020
 gagtaccacg gctgcctcca gctggataat cccactcaca tgaacaatgg ggactacact 1080
 ctaatagcca agaatgagta tgggaaggat gagaacaga tttctgctca cttcatgggc 1140
 tggcctggaa ttgacgatgg tgcaaaccca aattatcctg atgtaattta tgaagattat 1200
 ggaactgcag cgaatgacat cggggacacc acgaacagaa gtaatgaaat cccttcaca 1260
 gacgtcactg ataaaaccgg tcgggaacat ctctcggtct atgctgtggt ggtgatgacg 1320

 tctgtggagg gattttgctt tttggtaatg ctgtttctgc ttaagttggc aagacactcc 1380
 aagtttgcca tgaaggccc agcctccgtt atcagcaatg atgatgactc tgccagccca 1440
 ctccatcaca tctccaatgg gagtaacact ccactctctt cggaagggtgg cccagatgct 1500
 gtcatatttg gaatgaccaa gatccctgtc attgaaaatc cccaggaatt tggcatcacc 1560
 aacagtcagc tcaagccaga cacatttgtt cagcacatca agcgacataa cattgttctg 1620
 aaaagggagc taggcgaagg agcctttgga aaagtgttcc tagctgaatg ctataacctc 1680
 tgtcctgagc aggacaagat cttggtggca gtgaagacce tgaaggatgc cagtgacaat 1740

 gcacgcaagg acttccaccg tgaggccgag ctctgacca acctccagca tgagcacatc 1800
 gtcaagttct atggcgtctg cgtggagggc gacccctca tcatggtctt tgagtacatg 1860
 aagcatgggg acctcaaca gttcctcagg gcacacggcc ctgatgccgt gctgatggct 1920
 gagggcaacc cgcccacgga actgacgcag tcgcagatgc tgcatatagc ccagcagatc 1980
 gcccgggca tggctctact ggcgtcccag cacttcgtgc accgcgattt ggccaccagg 2040
 aactgcctgg tcggggagaa cttgtctgtg aaaatcgggg actttgggat gtcccgggac 2100

gtggaaagca ctgacgaaga aagggtcggg ggccacacaa tgctgcccat tcgctggatg 2160
 cctccagaga gcatcatgta caggaaattc acgacggaaa gcgacgtctg gacccctgggg 2220
 gtcgtgttgt gggagatttt cacctatggc aaacagccct ggtaccagct gtcaaacaat 2280
 gaggtgatag agtgtatcac tcagggccga gtctgcagc gaccccgcac gtgccccag 2340
 gaggtgtatg agctgatgct ggggtgctgg cagcgagagc cccacatgag gaagaacatc 2400
 aagggcatec ataccctcct tcagaacttg gccaaggcat ctccggtcga actggacatt 2460
 ctaggc 2466

<210> 15
 <211> 229
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu Ala Tyr

1 5 10 15

Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly Pro Lys

20 25 30

Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu His Val

35 40 45

Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn Glu Glu

50 55 60

Asn Asn Lys Asp Ala Asp Leu Tyr Thr Ser Arg Val Met Leu Ser Ser

65 70 75 80

Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu Tyr Lys

85 90 95

Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg His Ser

100 105 110

Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu

115 120 125

Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser Gly Gly

130 135 140

Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys

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

Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr
 210 215 220
 Ile Lys Arg Gly Arg

225

<210> 16

<211> 690

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

gccccatga aagaagcaaa catccgagga caaggtggct tggcctaccc aggtgtgcgg 60
 acccatggga ctctggagag cgtgaatggg cccaaggcag gttcaagagg cttgacatca 120
 ttggctgaca ctttcaaca cgtgatagaa gagctgttgg atgaggacca gaaagttcgg 180
 cccaatgaag aaaacaataa ggacgcagac ttgtacacgt ccagggtgat gctcagtagt 240

caagtgcctt tggagcctcc tcttctcttt ctgctggagg aatacaaaaa ttacctagat 300
 gctgcaaaca tgtccatgag ggtccggcgc cactctgacc ctgcccgccg aggggagctg 360
 agcgtgtgtg acagtattag tgagtgggta acggcggcag acaaaaagac tgcagtggac 420
 atgtcggcgc ggacggtcac agtccttgaa aaggtccctg tatcaaaagg ccaactgaag 480
 caatacttct acgagaccaa gtgcaatccc atgggttaca caaaaagaagg ctgcaggggc 540
 atagacaaaa ggcattggaa ctcccagtgc cgaactaccc agtcgtacgt gcgggcccctt 600
 accatggata gcaaaaagag aattggctgg cgattcataa ggatagacac ttcttgtgta 660

tgtacattga ccattaaag gggaagatag 690

<210> 17

<211> 229

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu Ala Tyr
 1 5 10 15

Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly Pro Lys
 20 25 30

Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu His Met
 35 40 45

Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn Glu Glu
 50 55 60

Asn Asn Lys Asp Ala Asp Leu Tyr Thr Ser Arg Val Met Leu Ser Ser
 65 70 75 80

Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu Tyr Lys
 85 90 95

Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg His Ser
 100 105 110

Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile Ser Glu
 115 120 125

Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln Leu Lys
 145 150 155 160

Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr Lys Glu
 165 170 175

Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys Arg Thr
 180 185 190

Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys Arg Ile
 195 200 205

Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr Leu Thr
 210 215 220

Ile Lys Arg Gly Arg
 225

<210> 18

<211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 1 5 10 15
 Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 20 25 30
 Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 35 40 45
 Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 50 55 60
 Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 65 70 75 80
 Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 85 90 95
 Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 100 105 110
 Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg

115
 <210> 19
 <211> 744
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

atgacatcc tttccttac tatggttatt tcatactttg gttgcatgaa ggctgcccc 60
 atgaaagaag caaacatccg aggacaaggt ggcttggcct acccaggtgt gcggacccat 120
 gggactctgg agagcgtgaa tgggccaag gcaggttcaa gagccttgac atcattggct 180
 gacactttcg aacacgtgat agaagagctg ttggatgagg accagaaagt tcggccaat 240
 gaagaaaaca ataaggacgc agacttgtag acgtccaggg tgatgctcag tagtcaagtg 300
 cctttggagc ctctcttct ctttctgctg gaggaataca aaaattacct agatgctgca 360
 aacatgtcca tgagggtccg gcgccactct gacctgccc gccgagggga gctgagcgtg 420

tgtgacagta ttagtgagtg ggtaacggcg gcagacaaaa agactgcagt ggacatgtcg 480
 ggcgggacgg tcacagtctt tgaaaaggtc cctgtatcaa aaggccaact gaagcaatac 540
 ttctacgaga ccaagtgcaa tcccatgggt tacacaaaag aaggctgcag gggcatagac 600
 aaaaggcatt ggaactccca gtgccgaact acccagtcgt acgtgcgggc cttaccatg 660

gatagcaaaa agagaattgg ctggcgattc ataaggatag acacttcttg tgtatgtaca 720
 ttgaccatta aaaggggaag atag 744

<210> 20
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala

<210> 21
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

Ala Thr Gly Ala Cys Cys Ala Thr Cys Cys Thr Thr Thr Thr Cys Cys
 1 5 10 15

Thr Thr Ala Cys Thr Ala Thr Gly Gly Thr Thr Ala Thr Thr Thr Cys
 20 25 30
 Ala Thr Ala Cys Thr Thr Cys Gly Gly Thr Thr Gly Cys Ala Thr Gly
 35 40 45

Ala Ala Gly Gly Cys Gly
 50

<210> 22
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: An amino acid sequence for isoform 2 of an extended

signal peptide

<400> 22

Met Phe His Gln Val Arg Arg Val Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met

1 5 10 15

Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met Lys Ala

20 25

<210> 23

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: A nucleic acid sequence for isoform 2 of an extended

signal peptide

<400> 23

atgttcacc aggtgagaag agtgatgacc atccttttcc ttactatgg tatttcatac 60

ttcggttgca tgaaggcg 78

<210> 24

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: An amino acid sequence for isoforms 3 and 6 of an

extended signal peptide

<400> 24

Met Gln Ser Arg Glu Glu Glu Trp Phe His Gln Val Arg Arg Val Met

1 5 10 15

Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met Lys

20 25 30

Ala

<210> 25

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: A nucleic acid sequence for isoforms 3 and 6 of an extended signal peptide

<400> 25

atgcagagcc gggaagagga atggttccac caggtgagaa gagtgatgac catccttttc 60

cttactatgg ttatttcata cttcggttgc atgaaggcg 99

<210> 26

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: An amino acid sequence for isoform 5 of an extended signal peptide

<400> 26

Met Leu Cys Ala Ile Ser Leu Cys Ala Arg Val Arg Lys Leu Arg Ser

1 5 10 15

Ala Gly Arg Cys Gly Lys Phe His Gln Val Arg Arg Val Met Thr Ile

20 25 30

Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met Lys Ala

35 40 45

<210> 27

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: A nucleic acid sequence for isoform 5 of an extended signal peptide

<400> 27

atgctctgtg cgatttcatt gtgtgctcgc gttcgaagc tccgtagtgc aggaaggtgc 60

gggaagttcc accaggtgag aagagtgatg accatccttt tccttactat ggttatttca 120

tacttcggtt gcatgaaggc g 141

<210> 28

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: An amino acid sequence for isoform 4 of an extended
signal peptide

<400> 28

Met Cys Gly Ala Thr Ser Phe Leu His Glu Cys Thr Arg Leu Ile Leu

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

Cys Met Lys Ala
100

<210> 29

<211> 300

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: A nucleic acid sequence for isoform 4 of an extended
signal peptide

<400> 29

atgtgtggag ccaccagttt ttcctatgag tgcacaaggt taatccttgt tactactcag	60
aatgctgagt ttctacagaa agggttgcag gtccacacat gttttggcgt ctaccacac	120
gcttctgtat ggcatgactg tgcattcccag aagaagggt gtgctgtgta cctccacgtt	180
tcagtggaat ttaacaaact gatcctgaa aatggtttca taaagttcca ccaggtagaga	240
agagtgatga ccatcctttt ccttactatg gttatttcat acttcggttg catgaaggcg	300
	300

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: Amino acid sequence of the signal peptide for the
agonist: QTA003P (IL-2 signal)

<400>

> 30

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Val Thr Asn Ser

20

<210> 31

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: Nucleic acid sequence of the signal peptide for the
agonist: QTA003P (IL-2 signal)

<400> 31

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatc gcactaagtc ttgcacttgt cacaaacagt 60

60

<210> 32

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: Amino acid sequence of the signal peptide for the
agonist: QTA004P

<400> 32

Met Lys Arg Arg Val Met Ile Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser

1 5 10 15

Tyr Phe Gly Cys Met Lys

20

<210> 33

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: Nucleic acid sequence of the signal peptide for the

agonist: QTA004P

<400> 33

atgaaaagaa gagt gatgat catccttttc cttactatgg ttatttcata cttcggttgc 60

atgaagagcg 70

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: Amino acid sequence of the signal peptide for the

agonist: QTA009P (modified IL-2)

<400> 34

Met Arg Arg Met Gln Leu Leu Leu Leu Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Val Thr Asn Ser

20

<210> 35

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: Nucleic acid sequence of the signal peptide for the

agonist: QTA009P (modified IL-2)

<400> 35

atgaggagga tgcaactcct gctcctgatt gcactaagtc ttgcacttgt cacaaacagt 60

60

<210> 36

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: Amino acid sequence of the signal peptide for the

agonist: QTA010P

<400> 36

Met Arg Arg Met Gln Leu Leu Leu Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe

1 5 10 15

Gly Cys Met Lys Ala

20

<210> 37

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: Nucleic acid sequence of the signal peptide for the
agonist: QTA010P

<400> 37

atgaggagga tgcaactcct gctcctgact atggttattt catacttcgg ttgcatgaag 60

gcg 63

<210> 38

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: Amino acid sequence of the signal peptide for the
agonist: QTA0012P

<400> 38

Met Arg Ile Leu Leu Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met

1 5 10 15

Lys Ala

<210> 39

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: Nucleic acid sequence of the signal peptide for the
agonist: QTA0012P

<400> 39

atgagaatcc ttcttcttac tatggttatt tcatacttcg gttgcatgaa ggcg 54

<210> 40

<211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Sig_Peptide: Amino acid sequence of the signal peptide for the
 agonist: QTA0013P

<400> 40
 Met Arg Arg Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys
 1 5 10 15
 Met Lys Ala

<210> 41
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: Nucleic acid sequence of the signal peptide for the
 agonist: QTA0013P

<400> 41
 atgagaagaa tccttttct tactatgggtt atttcatact tcggttgcat gaaggcg 57

<210> 42
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: Amino acid sequence of the signal peptide for the
 agonist: QTA0014P

<400> 42
 Met Arg Arg Phe Leu Phe Leu Leu Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15
 Lys Ala

<210> 43
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: Nucleic acid sequence of the signal peptide for the
agonist: QTA0014P

<400> 43

atgaggaggt tccttttctt tcttggtatt tcatacttcg gttgcatgaa ggcg 54

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: Amino acid sequence of the signal peptide for the
agonist: QTA0015P

<400> 44

Met Arg Arg Phe Leu Phe Leu Leu Tyr Phe Gly Cys Met Lys Ala

1 5 10 15

<210> 45

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sig_Peptide: Nucleic acid sequence of the signal peptide for the
agonist: QTA0015P

<400> 45

atgaggaggt tccttttctt tctttacttc ggtgcatga aggcg 45

<210> 46

<211> 130

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> DNA sequence of a left ITR

<400> 46

cttcgaggca gctgctgct cgctcgtca ctgaggccgc ccggcgctcg ggcgaccttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggccaa ctccatcact 120

aggggttctt 130

<210> 47

<211> 141

<212> DNA

<213> Unknown
 <220><223> DNA sequence of a right ITR
 <400> 47
 aggaaccct agigatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60
 ccggcgacc aaaggtgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120
 gagcgcgag ctgcctgcag g 141

<210> 48
 <211> 584
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Promoter: Truncated CAG nucleotide promoter sequence.
 <400> 48
 gcgttacata acttacgta aatggcccgc ctggctgacc gccaacgac ccccgccat 60
 tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc 120
 aatgggtgga ctatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc 180
 caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggcc cgctggcat tatgccagc 240
 acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta 300

 ccatggtcga ggtgagcccc acgttctgct tcaactctcc catctcccc cctccccac 360
 cccaatttt gtattttatt attttttaat tattttgtgc agcgatgggg gcgggggggg 420
 ggggggggcg cgcgccaggc ggggcggggc gggcgaggg gcggggcggg gcgaggcgga 480
 gaggtcggc ggcagccaat cagagcggcg cgctccgaaa gtttcctttt atggcgaggc 540
 ggcgcgggcg gcggccctat aaaaagcga gcgcgcgggc ggcg 584

<210> 49
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 49

Met Leu Pro Leu Pro Ser Cys Ser Leu Pro Ile Leu Leu Leu Phe Leu

1 5 10 15
 Leu Pro Ser Val Pro Ile Glu Ser Gln Pro Pro Pro Ser Thr Leu Pro
 20 25 30
 Pro Phe Leu Ala Pro Glu Trp Asp Leu Leu Ser Pro Arg Val Val Leu

ggggtgagcg aaactgcacc agcgagtcgt cggggtgagc tggctgtgtg cgatgcagtc 300
 agtggctggg tgacagaccg ccggaccgct gtggacttgc gtgggcgca ggtggaggtg 360
 ttgggcgagg tgccctgcagc tggcggcagt ccctccgcc agtacttctt tgaaccgcg 420

tgcaaggctg ataacgctga ggaaggtggc cgggggcag gtggagggg ctgccgggga 480
 gtggacagga ggcactgggt atctgagtgc aaggccaagc agtcctatgt gcgggcattg 540
 accgctgatg ccagggccg tgtgggctgg cgatggattc gaattgacac tgccctgcgtc 600
 tgcacactcc tcagccggac tggccgggccc 630

<210> 51
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 51

Met Leu Pro Leu Pro Ser Cys Ser Leu Pro Ile Leu Leu Leu Phe Leu

1 5 10 15

Leu Pro Ser Val Pro Ile Glu Ser

20

<210> 52
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 52

atgctccctc tcccctcatg ctcctccccc atcctcctcc ttttctcct ccccagtgtg 60
 ccaattgagt cc 72

<210> 53
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53

Gln Pro Pro Pro Ser Thr Leu Pro Pro Phe Leu Ala Pro Glu Trp Asp

1 5 10 15

Leu Leu Ser Pro Arg Val Val Leu Ser Arg Gly Ala Pro Ala Gly Pro

20 25 30

Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Ala Gly Ala Phe Arg Glu Ser Ala Gly
 35 40 45

Ala Pro Ala Asn Arg Ser Arg Arg
 50 55

<210> 54
 <211> 168
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 54

caacccccac cctcaacatt gccccctttt ctggcccctg agtgggacct tctctcccc 60
 cgagtagtcc tgtctagggg tgcccctgct gggcccctc tgctcttct gctggaggct 120

ggggcctttc gggagtcagc aggtgccccg gccaacccga gccggcgt 168

<210> 55
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 55

Gly Val Ser Glu Thr Ala Pro Ala Ser Arg Arg Gly Glu Leu Ala Val
 1 5 10 15

Cys Asp Ala Val Ser Gly Trp Val Thr Asp Arg Arg Thr Ala Val Asp
 20 25 30

Leu Arg Gly Arg Glu Val Glu Val Leu Gly Glu Val Pro Ala Ala Gly
 35 40 45

Gly Ser Pro Leu Arg Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Arg Cys Lys Ala Asp
 50 55 60

Asn Ala Glu Glu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Gly Gly Cys Arg Gly
 65 70 75 80

Val Asp Arg Arg His Trp Val Ser Glu Cys Lys Ala Lys Gln Ser Tyr
 85 90 95

Val Arg Ala Leu Thr Ala Asp Ala Gln Gly Arg Val Gly Trp Arg Trp
 100 105 110

Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Thr Leu Leu Ser Arg Thr Gly

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Enhancer: Truncated WHPE nucleotide sequence. Beta element has been deleted.

<400> 58

```
aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa ctatgttgct      60
ccttttacgc taigtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgt      120
atggctttca tttctcctc cttgtataaa tcttggttag ttcttgccac ggcggaactc      180
atcgccgcct gccttgcccg ctgctggaca ggggctcggc tgttgggcac tgacaattcc      240
gtgggtgt                                     247
```

<210> 59

<211> 224

<212> DNA

<213> Simian virus 40

<400> 59

```
agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa      60
aaaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg      120
caataaaca gtaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggaggt      180
gtgggaggtt ttttaaagca agtaaacct ctacaaatgt ggta                               224
```

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met

1 5 10 15
Lys Ala

<210> 61

<211> 54

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 61
 atgaccatcc ttttccttac tatggttatt tcatacttcg gttgcatgaa ggcg 54
 <210> 62
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the first
 "T" of SEQ ID No. 60 has been replaced by a "R".

<400> 62
 Met Arg Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met

1 5 10 15
 Lys Ala

<210> 63
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleic acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but "acc"
 of SEQ ID No. 61 has been replaced by a "aga".

<400> 63
 atgagaatcc ttttccttac tatggttatt tcatacttcg gttgcatgaa ggcg 54
 <210> 64
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the first

"T" of SEQ ID No. 60 has been replaced by "RR".
 <400> 64
 Met Arg Arg Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys

1 5 10 15
 Met Lys Ala

<210> 65

<211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleic acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but "acc" of SEQ ID No. 61 has been replaced by a "agaaga".
 <400> 65
 atgagaagaa tccttttct tactatggtt attcatact tcggttgcac gaaggcg 57

<210> 66
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the first "T" of SEQ ID No. 60 has been replaced by "RRR".
 <400> 66

Met Arg Arg Arg Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly
 1 5 10 15
 Cys Met Lys Ala
 20

<210> 67
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleic acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but "acc" of SEQ ID No. 61 has been replaced by a "agaagaaga".
 <400> 67
 atgagaagaa gaatcctttt cttactatg gttatttcat acttcggttg catgaaggcg 60
 60

<210> 68
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the first "T" of SEQ ID No. 60 has been replaced by a "K".

<400> 68

Met Lys Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met

1 5 10 15

Lys Ala

<210> 69

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but "acc" of SEQ ID No. 61 has been replaced by a "aaa".

<400> 69

atgaaaatcc ttttccttac tatggttatt tcatacttcg gttgcatgaa ggcg 54

<210> 70

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the first "T" of SEQ ID No. 60 has been replaced by a "KK".

<400> 70

Met Lys Lys Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys

1 5 10 15

Met Lys Ala

<210> 71

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but "acc" of SEQ ID No. 61 has been replaced by a "aaaaka".

<400> 71

atgaaaakaa tccttttct tactatgggt atttcatact tcggttgcac gaaggcg 57

<210> 72

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the first "T" of SEQ ID No. 60 has been replaced by a "KKK".

<400> 72

Met Lys Lys Lys Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly

1 5 10 15

Cys Met Lys Ala

20

<210> 73

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but "acc" of SEQ ID No. 61 has been replaced by a "aaaaaaaa".

<400> 73

atgaaaaaaaa aaatcctttt ccttactatg gttatttcat acttcggttg catgaaggcg 60

60

<210> 74

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the first "T" of SEQ ID No. 60 has been replaced by a "KRR".

<400> 74

Met Lys Arg Arg Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly

1 5 10 15

Cys Met Lys Ala

20

<210> 75

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but "acc" of SEQ ID No. 61 has been replaced by a "aaaagaaga".

<400> 75

atgaaaagaa gaatcctttt ccttactatg gttatttcat acttcggttg catgaaggcg 60
60

<210> 76

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the first "T" of SEQ ID No. 60 has been replaced by a "RKR".

<400> 76

Met Arg Lys Arg Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly

1 5 10 15

Cys Met Lys Ala

20

<210> 77

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but "acc" of SEQ ID No. 61 has been replaced by a "agaaaaaga".

<400> 77

atgagaaaaa gaatcctttt ccttactatg gttatttcat acttcggttg catgaaggcg 60
60

<210> 78

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the first "T" of SEQ ID No. 60 has been replaced by a "RRK".

<400> 78

Met Arg Arg Lys Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly

1 5 10 15

Cys Met Lys Ala

20

<210> 79

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but "acc" of SEQ ID No. 61 has been replaced by a "agaagaaaa".

<400> 79

atgagaagaa aaatcctttt cttactatg gttatttcat acttcggttg catgaaggcg 60

60

<210> 80

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the first "T" of SEQ ID No. 60 has been replaced by a "KKR".

<400> 80

Met Lys Lys Arg Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly

1 5 10 15

Cys Met Lys Ala

20

<210> 81

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but "acc" of SEQ ID No. 61 has been replaced by a "aaaaaaga".

<400> 81

atgaaaaaaaa gaatcctttt ccttactatg gttatttcat acttcggttg catgaaggcg 60
60

<210> 82

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the "ILFL" sequence of SEQ ID No. 60 has been replaced by "FLFL".

<400> 82

Met Thr Phe Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met

1 5 10 15

Lys Ala

<210> 83

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but the "atccttttcctt" sequence of SEQ ID No. 61 has been replaced by "ttccttttcctt".

<400> 83

atgaccttc ttttccttac tatggttatt tcatacttcg gttgcatgaa ggcg 54

<210> 84

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the "ILFL" sequence of SEQ ID No. 60 has been replaced by "FFFL".

<400> 84

Met Thr Phe Phe Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met

1 5 10 15

Lys Ala

<210> 85

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but the "atccttttcctt" sequence of SEQ ID No. 61 has been replaced by "ttcttcttcctt".

<400> 85

atgaccttct tcttccttac tatggttatt tcatacttcg gttgcatgaa ggcg 54

<210> 86

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the "ILFL" sequence of SEQ ID No. 60 has been replaced by "FIFL".

<400> 86

Met Thr Phe Ile Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met

1 5 10 15

Lys Ala

<210> 87

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but the "atccttttcctt" sequence of SEQ ID No. 61 has been replaced by "ttcatcttcctt".

<400> 87

atgaccttca tcttccttac tatggttatt tcatacttcg gttgcatgaa ggcg 54

<210> 88

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the "ILFL" sequence of SEQ ID No. 60 has been replaced by "FIFI".

<400> 88

Met Thr Phe Ile Phe Ile Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala

<210> 89

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but the "atccttttcctt" sequence of SEQ ID No. 61 has been replaced by "ttcatcttcate".

<400> 89

atgacctca tcttcatcac tatggttatt tcatacttcg gttgcatgaa ggcg 54

<210> 90

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the "ILFL" sequence of SEQ ID No. 60 has been replaced by "FVFI".

<400> 90

Met Thr Phe Val Phe Ile Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala

<210> 91

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but the "atccttttcctt" sequence of SEQ ID No. 61 has been replaced by

"ttcgttttcac".

<400> 91

atgaccttcg ttttcatcac tatggttatt tcatacttcg gttgcatgaa ggcg 54

<210> 92

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequece: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the "ILFL" sequence of SEQ ID No. 60 has been replaced by "FVfV".

<400> 92

Met Thr Phe Val Phe Val Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met

1 5 10 15

Lys Ala

<210> 93

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequece: Same sequence as SEQ ID No. 61 but the

"atccttttcctt" sequence of SEQ ID No. 61 has been replaced by

"ttcgttttcggtt".

<400> 93

atgaccttcg ttttcggttac tatggttatt tcatacttcg gttgcatgaa ggcg 54

<210> 94

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequece: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the "ILFL" sequence of SEQ ID No. 60 has been replaced by "FLfV".

<400> 94

Met Thr Phe Leu Phe Val Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met

1 5 10 15

Lys Ala

<210> 95

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but the "atccttttcctt" sequence of SEQ ID No. 61 has been replaced by "ttccttttcggtt".

<400> 95

atgaccttc ttttcgttac tatggttatt tcatacttcg gttgcatgaa ggcg 54

<210> 96

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the "ILFL" sequence of SEQ ID No. 60 has been replaced by "FIFV".

<400> 96

Met Thr Phe Ile Phe Val Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met

1 5 10 15

Lys Ala

<210> 97

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but the "atccttttcctt" sequence of SEQ ID No. 61 has been replaced by "ttcatcttcggtt".

<400> 97

atgaccttca ttttcgttac tatggttatt tcatacttcg gttgcatgaa ggcg 54

<210> 98

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the "ILFL" sequence of SEQ ID No. 60 has been replaced by "FFFI".

<400> 98

Met Thr Phe Phe Phe Ile Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala

<210> 99

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but the

"atccttttctt" sequence of SEQ ID No. 61 has been replaced by "ttctttctc".

<400> 99

atgaccttct tcttcatcac tatggttatt tcatacttcg gttgcatgaa ggcg 54

<210> 100

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the "ILFL" sequence of SEQ ID No. 60 has been replaced by "FFFV".

<400> 100

Met Thr Phe Phe Phe Val Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
 1 5 10 15

Lys Ala

<210> 101

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but the "atccttttcctt" sequence of SEQ ID No. 61 has been replaced by "ttcatccttttcctt".

<400> 101

atgaccttct tcttcgttac tatggttatt tcatacttcg gttgcatgaa ggcg 54

<210> 102

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 60 but the "ILFL" sequence of SEQ ID No. 60 has been replaced by "FILFL".

<400> 102

Met Thr Phe Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys

1 5 10 15

Met Lys Ala

<210> 103

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence: Same sequence as SEQ ID No. 61 but the "atccttttcctt" sequence of SEQ ID No. 61 has been replaced by "ttcttcttcggtt".

<400> 103

atgaccttca tccttttctt tactatggtt atttcatact tcggttgcag gaaggcg 57

<210> 104

<211> 1203

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence of QTA021P, which is a plasmid containing codon optimised sequence for mBDNF-viral-2A peptide-eGFP.

<400> 104

atgactatcc tgtttctgac aatggttatt agctatttcg gttgcatgaa ggctcacagt 60

gatcccgcac gccgaggaga acttagcgtg tgcgacagca tcagcgagtg ggtcaccgcc 120
gccgataaga agaccgctgt ggatatgtcc ggcgggaccg tcactgtact cgaaaaagtt 180
ccagtgagca aaggccaact gaaacaatat ttctatgaaa ctaagtgcaa ccccatgggg 240

tacaccaagg agggctgccg gggaatcgac aagagacact ggaattcca gtgccggacc 300
actcagact acgtccgcgc cttgacgatg gattcaaaga agcgcacatcg atggcggttc 360
ataagaatcg acaccagtig tgtgtgcacg ctgacgataa aacgggggcg ggccccctg 420
aagcagacc tgaactttga ttgctcaag ttggcggggg atgtggaaag caatcccggg 480
ccaatggtga gcaaggcgca ggagctgttc accggcgttg tgccaatact ggttgagttg 540
gatggcgatg tcaacggaca caaathtagc gtaagcgggg agggagaggg cgacccaca 600
tatggcaagc tgaccctgaa gttcatttgc acgaccggca aattgccctg cccttgccc 660

acacttgtga cgaccctgac ttatggcgta cagtgcctca gcaggtacce tgatcatatg 720
aagcaacacg acttctttaa gagtgccatg ccagagggat acgtccagga aagaaccata 780
ttcttcaaag atgatgaaa ttacaaaacc cgggcagagg tcaagtttga aggcgacacc 840
ctggtgaaca ggatcgaact caaaggcatc gatttcaaag aggacggaaa catcctcgga 900
cacaactgg aatacaatta caacagccac aacgtctaca tcatggcaga taacaaaag 960
aacggtatta aagtgaactt caagatccgg cacaacatcg aagacggctc cgtccagctt 1020
gccgaccact accagcaaaa taceccgatc ggcgacggcc ccgttctctt ccccgataat 1080

cactacctga gtacacagtc agccttgagc aaagacccta atgaaaagcg ggaccacatg 1140
gttttctgg agttcgttac cgcagcgggt attacgtgg gtatggacga gctttacaag 1200
taa 1203

<210> 105
<211> 1203
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nucleic acid sequence of QTA022P, which is a plasmid containing
codon optimised sequence for mBDNF-non-functional viral-2A
peptide-eGFP.
<400> 105
atgactatcc tgtttctgac aatggttatt agctatttcg gttgcatgaa ggctcacagt 60

gatcccgcac gccgaggaga acttagcgtg tgcgacagca tcagcgagtg ggtcaccgcc 120
gccgataaga agaccgctgt ggatatgtcc ggcgggaccg tcactgtact cgaaaaagtt 180

ccagtgagca aaggccaact gaaacaatat ttctatgaaa ctaagtgcaa ccccatgggg 240
 tacaccaagg agggctgccg gggaatcgac aagagacact ggaattccca gtgccggacc 300
 actcagagct acgtccgcgc cttgacgatg gattcaaaga agcgcacatcg atggcggttc 360
 ataagaatcg acaccagtig tgtgtgcacg ctgacgataa aacgggggcg ggcccctgtc 420
 aaacaaacce tcaatittga cttgctgaag cttgctgggg atgtcgagtc cgctgccgcg 480

gctatggtga gcaagggcga ggagctgttc accggcgttg tgccaatact ggttgagttg 540
 gatggcgatg tcaacggaca caaatitagc gtaagcgggg agggagaggg cgacgccaca 600
 tatggcaagc tgacctgaa gttcatttgc acgaccgca aattgcccg tccctggccc 660
 acacttgtga cgacctgac ttatggcgta cagtgttca gcaggtacc tgatcatatg 720
 aagcaacacg acttctttaa gaggccatg ccagaggat acgtccagga aagaaccata 780
 ttcttcaaag atgatgaaa ttacaaaacc cgggcagagg tcaagtttga aggcgacacc 840
 ctggtgaaca ggatcgaact caaaggcatc gatttcaaag aggacggaaa catcctcgga 900

cacaaactgg aatacaatta caacagccac aacgtctaca tcatggcaga taaacaaaag 960
 aacggtatta aagtgaactt caagatccgg cacaacatcg aagacggctc cgtccagctt 1020
 gccgaccact accagcaaaa taccctgatc ggcgacggcc ccgttctcct ccccgataat 1080
 cactacctga gtacacagtc agccttgagc aaagacccta atgaaaagcg ggaccacatg 1140
 gttttgctgg agttcgttac cgcagcgggt attacgtgg gtatggacga gctttacaag 1200
 taa 1203

<210> 106

<211> 1203

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence of QTA023P, which is a plasmid containing
 codon optimised sequence for eGFP-viral-2A peptide-mBDNF.

<400> 106

atggtgagca agggcgagga gctgttacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
 ctcgtgacca cctgacctc cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360

gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccc tgctgctgcc cgacaaccac 600
tacctgagca cccagtccgc cctgagcaag gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaaggct 720

cccgttaaac aaactctgaa cttcgacctg ctgaagctgg ctggagacgt ggagtccaac 780
cctggaccta tgaccatcct tttccttact atggttattt catacttcgg ttgcatgaag 840
gcgcaactccg accctgcccc ccgtggggag ctgagcgtgt gtgacagtat tagcgagtgg 900
gtcacagcgg cagataaaaa gactgcagtg gacatgtctg gcgggacggt cacagtccca 960
gagaaagtcc cggtatccaa aggccaaactg aagcagtatt tctacgagac caagtgtaat 1020
cccatgggtt acaccaagga aggctgcagg ggcatagaca aaaggcactg gaactcgcaa 1080
tgccgaacta cccaatcgta tgttcgggcc cttactatgg atagcaaaaa gagaattggc 1140

tgcgattca taagataga cacttcctgt gtatgtacac tgaccattaa aaggggaaga 1200
tag 1203

<210> 107
<211> 2940
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nucleic acid coding sequence of codon optimised 2940 bp sequence
for murine TrkB receptor-viral-2A peptide-mBDNF contained within
the plasmid QTA020P (and the vector QTA020V)
<400> 107

atgagcccat ggctgaagtg gcacggacca gcaatggcaa gactgtgggg cctgtgcctg 60

ctggtgctgg gcttctggag agccagcctg gctgtgctcaa cctcctgcaa gtgtagctcc 120
gccaggatct ggtgcacaga gccttctcca ggcacgtgg cctttccccg cctggagcct 180
aacagcgtgg atcccagaaa taccaccgag atcctgatcg ccaaccagaa gcggtggag 240
atcatcaatg aggacgatgt ggaggcctac gtgggcctga gaaacctgac aatcgtggac 300
tccggcctga agttcgtggc ctataaggcc tttctgaaga actctaactc gaggcacatc 360
aacttcaccg gcaataagct gacatctctg agccggagac actttcggca cctggatctg 420
tccgacctga tctgaccgg caatccattc acatgctctt gtgacatcat gtggctgaag 480

accctgcagg agacaaagtc tagcccccgat acccaggacc tgtactgtct gaacgagtcc 540
 tctaagaata tgcctctggc caacctgcag atccctaatt gtggactgcc aagcgcccgg 600
 ctggccgcac ctaacctgac agtggaggag ggcaagtccg tgacactgtc ctgttctgtg 660
 ggcgcgatc ccctgcctac cctgtattgg gacgtgggca acctggtgtc taagcacatg 720
 aatgagacct cccacacaca gggctctctg agaatcaca atalcagctc cgacgatagc 780
 ggcaagcaga tctcttgctg ggcaagaaac ctggtgggag aggatcagga cagcgtgaat 840
 ctgaccgtgc acttcgcccc caccatcaca ttctctggagt ctctaccag cgatcaccac 900

 tggatgatcc ccttcacagt gcggggaaac ccaaagcccg ccctgcagtg gttttacaac 960
 ggcgcatcc tgaatgagtc caagtataac tgtaccaaga tccacgtgac caaccacaca 1020
 gagtaccacg gctgcctgca gctggataat cccaccacaca tgaacaatgg cgactacaca 1080
 ctgatggcca agaacgagta tggcaaggac gagaggcaga tcagcgccca ctctcatgggc 1140
 cgccctggag tggattatga gaccaaccct aattaccag aggtgctgta tgaggactgg 1200
 accacaccta ccgatatcgg cgacaccaca aacaagtcta atgagatccc aagcacagat 1260
 gtggccgacc agtctaacag ggagcacctg agcgtgtacg cagtgggtgt catcgctcc 1320

 gtgggtggct tctgcctgct ggtcatgctg ctgctgtga agctggcccg cactctaaag 1380
 tttggcatga agggcccagc ctccgtgac tctaatgacg atgacagcgc cagccccctg 1440
 caccacatca gcaacggctc caataccctt tctagctccg agggcggccc agatgccgtg 1500
 atcatcggca tgacaaagat ccccgtgac gagaaccctc agtacttcgg catcaccaat 1560
 tcccagctga agcctgacac atttgtgcag cacatcaagc ggcaacaat cgtgctgaag 1620
 agggaaactgg gagaggagc cttcggcaag gtgtttctgg ccgagtgcta taacctgtgc 1680
 ccagagcagg ataagatcct ggtggccgtg aagaccctga aggatgccag cgacaacgcc 1740

 cggaaggact tccacagaga ggccgagctg ctgacaaatc tgcagcacga gcacatcgtg 1800
 aagttttacg gcgtgtgctg ggaggcgac cctctgatca tgggtttcga gtatatgaag 1860
 cacggcgatc tgaacaagtt tctgagagca cacggaccag atgccgtgct gatggcagag 1920
 ggaaatcccc ctaccgagct gacacagtct cagatgctgc acattgcaca gcagattgca 1980
 gcaggaatgg tgiacctggc cagccagcac ttcgtgcaca gggatctggc aaccagaaac 2040
 tgctgtgtgg gagagaatct gctggtgaag atcggcgact ttggcatgtc cggggacgtg 2100
 tactctaccg actactatag agtggcgggc cacacaatgc tgcccatcag gtggatgcca 2160

 cccgagagca tcatgtatcg caagttcacc acagagtctg acgtgtggag cctgggcgtg 2220
 gtgctgtggg agatctttac ctacggcaag cagccttggg atcagctgtc caacaatgaa 2280
 gtgatcgagt gtattacaca gggacgcgtg ctgcagaggc cacgcacatg cccccaggag 2340

gtgtacgagc tgatgctggg ctgttggcag cgggagccac acaccagaaa gaacatcaag 2400
agcatccaca cactgctgca gaatctggcc aaggcctccc ccgtgtatct ggacatcctg 2460
ggcagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaacct 2520
ggacctatga gaatccttct tcttactatg gttatttcat acttcggttg catgaaggcg 2580

cactccgacc ctgcccccg tggggagctg agcgtgtgtg acagtattag cgagtgggtc 2640
acagcggcag ataaaaagac tgcagtggac atgtctggcg ggacggtcac agtcctagag 2700
aaagtcccgg tatccaaagg ccaactgaag cagtatttct acgagaccaa gtgtaatccc 2760
atgggttaca ccaaggaagg ctgcaggggc atagacaaaa ggcaactgaa ctgcaatgc 2820
cgaactacce aatcgtatgt tcgggccctt actatggata gcaaaaagag aattggctgg 2880
cgattcataa ggatagacac ttctgtgta tgtacactga ccattaaaag gggaagatag 2940
2940

<210> 108

<211> 2943

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid coding sequence of codon optimised 2943 bp sequence
for human TrkB receptor-viral-2A peptide-mBDNF contained within
the plasmid QTA029P (and the vector QTA029V)

<400> 108

atgtcatctt ggatccgctg gcacgggcca gcatggccc gattgtgggg cttctgctgg 60
cttgtttagt gcttctggcg cgcgcgcttc gcgtgtccga cctcttgcaa atgctcagca 120
agccgaattt ggtgctcaga ccctagtcca ggaattgttg cattcccccg actggaacca 180

aactccgtcg acccgagaaa tataactgag atatttattg caaatcaaaa acgccttgaa 240
atcattaacg aggatgacgt ggaggcctac gttggtttga gaaatcttac tattgtcgac 300
tccggactta aattttagc tcataaagcc ttctgaaga actctaactc gcagcacatt 360
aatttcacga gaaataagct gaccagcttg tcccgaagc atttccgcca tctcgacctg 420
agcgagctca tactggtcgg aaaccattt acgtgctcct gtgacatcat gtggatcaaa 480
actctgcaag aggcgaaaag tagtccggat acccaagacc tttactgtct taatgaaagc 540
tcaaaaaata tcccgtggc caacctgcag ataccgaact gcggacttcc tagtgcaat 600

ttggtgccc caaatcttac cgtegaagaa ggcaaatcaa tcacgcttcc ttgttctgta 660
gctggagatc cagtgcctaa tatgtattgg gacgtgggta acctcgtctc aaaacatag 720

aacgaaacga gccacaccca gggctctttg cggataacaa acatctcctc tgatgattct 780
 ggaaagcaaa tcagttgcgt agctgaaaat ctggttggcg aagatcaaga ttcagtcaat 840
 ctgacagtcc atttgcccc aacgatcacc tttctggaga gccaactag cgatcaccac 900
 tgggtgattc cgittacggt aaaaggaaat ccaaaacctg cactccaatg gttttataat 960
 ggagccatct tgaatgaaag caaatatata tgfactaaaa tccatgtgac gaatcacacc 1020

 gagtatcacg ggtgtcttca attggataat ccaaccata tgaataatgg tgattatact 1080
 ttgatagcga agaacgaata cggcaaagac gaaaagcaaa tatccgcaca tttcatgggt 1140
 tggcctggca tcgacgacgg tgcgaacctg aactaccag atgttattta cgaggattat 1200
 gggactgchg caaacgacat tggcgacacc acaaacgaa gcaacgagat accaagtact 1260
 gacgtcactg acaaacggg tcgagagcat ttgtctgttt acgccgttgt tgttatcgcc 1320
 tcagttgtcg gattttgctt gttggtcatg ctttctctcc tgaagctcgc ggcgatttcc 1380
 aagtttggca tgaaggggcc agcaagtgtt atatccaatg atgatgatag cgcttctcca 1440

 ttgcaccaca taagtaacgg ctcaaacacg cegtcatcta gtgaaggtgg accagacgcg 1500
 gtcattatag ggatgactaa aattcccgta atcgaaaacc ctcagtactt cggcataacc 1560
 aacagtcagc ttaaaccca tactttcgtg cagcacatca aaaggcacia catagtcctc 1620
 aagcgcgaac tcggggaggg agccttcgga aaggtctttc ttgctgagtg ctataatttg 1680
 tgtcctgagc aggataaaa tcttgtggct gtaaaaacte tcaaagatgc ttccgacaac 1740
 gcacggaagg attttcatcg ggaggccgaa ctgttgacga atttcagca cgagcatata 1800
 gtaaagtctt acggggtatg tgttgagggg gacccttga ttatggtctt cgagtatatg 1860

 aagcacgggg acctgaacaa atttttgctc gcccatgggc ctgatgccgt ccttatggca 1920
 gaaggaacc ctccaacaga actcaccag agtcagatgt tgccatagc gcaacagatc 1980
 gcggccggca tggtttacct ggccagtcaa cacttcgtgc atagagatct tgccactcgc 2040
 aactgtttgg tcggggagaa ccttctggtt aagattggtg actttggtat gtcacgagat 2100
 gtgtattcca ctgactatta cagagttggg ggtcatacaa tgcctctat tcggtggatg 2160
 cccccgaat ceatcatgta cagaaagttc acgacagaga gtgatgtttg gagtctcggc 2220
 tgggtgctct gggaaatfff cacatcggga aagcagccgt ggtatcaact tagcaacaat 2280

 gaggtgatag agtgtattac acagggtcgg gtgttcagc gccctcgaac gtgccacaaa 2340
 gaagtatatg aacttatgct cgggtgctgg caaagagaac cacatatgag aaaaaatata 2400
 aaggggatac atacattgct tcagaacttg gccaaagcat caccctcta cctcgatata 2460
 ctgggcagcg gagtactaaa cttcagcctg ctgaagcagg ctggagacgt ggaggagaac 2520
 cctggaccta tgagaatcct tcttcttact atggttattt catacttcgg ttgcatgaag 2580

gcgcactccg accctgcccg ccgtggggag ctgagcgtgt gtgacagtat tagcgagtgg	2640
gtcacagcgg cagataaaaa gactgcagtg gacatgtctg gcgggacggt cacagtccta	2700
gagaaagtcc cggtatccaa aggccaactg aagcagtatt tctacgagac caagtgtaat	2760
cccatgggtt acaccaagga aggctgcagg ggcatagaca aaaggcactg gaactcga	2820
tgccgaacta cccaatcgta tgttcgggcc cttactatgg atagcaaaaa gagaattggc	2880
tggcgattca taaggataga cacttcctgt gtatgtacac tgaccattaa aagggaaga	2940
tag	2943