



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0016100
(43) 공개일자 2022년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/86 (2006.01) *A61K 38/28* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/86 (2013.01)
A61K 38/28 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7040646

(22) 출원일자(국제) 2020년05월29일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2021년12월10일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/065018

(87) 국제공개번호 WO 2020/239995

국제공개일자 2020년12월03일

(30) 우선권주장

19382447.1 2019년05월31일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

유니버시티트 아우토노마 데 바르셀로나

스페인 08193 세르다놀라 델 발레스 에디피시 아
캄푸스 데 라 우아베 에세/에네

(72) 발명자

보쉬 투베르트 파티마

스페인, 08193 세르다놀라 델 바레스, 에디피시
아- 캄푸스 데 라 우아베 에세/에네

엘리아스 푸이그도미니크 이벳

스페인, 08193 세르다놀라 델 바레스, 에디피시
크바테그 캄푸스 데 라 우아베 에세/에네

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인한얼

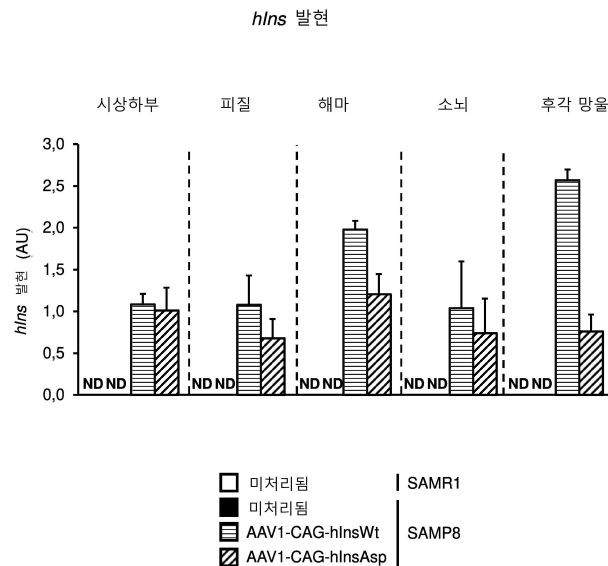
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 인슐린 유전자 요법

(57) 요약

신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 작제물이 본원에 기재된다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A61K 48/0058 (2013.01)

A61K 48/0075 (2013.01)

A61P 25/28 (2018.01)

C07K 14/62 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

(72) 발명자

리베라 산체스 알베르트

스페인, 08187 산타 올라리아 데 론카나, 21, 카레르 칸 코스타

그라스 코스타 이그나시

스페인, 08203 사바텔, 3-1, 카레르 사문타다 57

명세서

청구범위

청구항 1

신경염증(neuroinflammation), 신경퇴행(neurodegeneration) 및/또는 인지 저하(cognitive decline), 또는 이와 관련된 질환 또는 상태(condition)의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 인슐린을 인코딩(encoding)하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 작제물(gene construct).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이 유비쿼터스 프로모터(ubiquitous promoter)에 작동 가능하게 연결되는, 사용하기 위한 유전자 작제물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 유비쿼터스 프로모터가 CAG 프로모터 및 CMV 프로모터로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 바람직하게는 상기 유비쿼터스 프로모터가 CAG 프로모터인, 사용하기 위한 유전자 작제물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 작제물이 인슐린의 발현을 방지되는 것을 원하는 조직에서 발현된 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열을 포함하고, 바람직하게는 상기 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열이 포유동물의 심장 및/또는 간에서 발현되는 microRNA에 결합하는 이들 표적 서열로부터 선택되는, 사용하기 위한 유전자 작제물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 유전자 작제물이 간에서 발현되는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열 및 심장에서 발현되는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열을 포함하며, 바람직하게는 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열이 서열번호 8 및 16-20로부터 선택되고, 간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열이 서열번호 7 및 9-15로부터 선택되며, 더욱 바람직하게는 상기 유전자 작제물이 microRNA-122a의 표적 서열(서열번호 7) 및 microRNA-1의 표적 서열(서열번호 8)을 포함하는, 사용하기 위한 유전자 작제물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 사용하기 위한 유전자 작제물:

(a) 서열번호 1, 2 또는 3의 아미노산 서열과 적어도 60%의 서열 동일성(sequence identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열;

(b) 서열번호 4, 5 또는 6의 뉴클레오티드 서열과 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열; 및

(c) 유전 코드(gene code)의 축퇴(degeneracy)로 인해, 서열이 (b)의 뉴클레오티드 서열의 서열과 상이한 뉴클레오티드 서열.

청구항 7

신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 정의된 유전자 작제물을 포함하는 발현 벡터(expression vector).

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 발현 벡터가 바이러스 벡터이고, 바람직하게는 상기 발현 벡터가 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스 벡터로 이루어진 그룹으로부터 선택된 바이러스 벡터이고, 더욱 바람직하게는 상기 발현 벡터가 아데노 관련 바이러스 벡터인, 사용하기 위한 발현 벡터.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 발현 벡터가 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, rh10, rh8, Cb4, rh74, DJ, 2/5, 2/1, 1/2 또는 Anc80의 아데노 관련 바이러스 벡터이고, 바람직하게는 상기 발현 벡터가 혈청형 1, 2 또는 9의 아데노 관련 바이러스 벡터이고, 보다 바람직하게는 상기 발현 벡터가 혈청형 1 또는 9의 아데노 관련 바이러스 벡터인, 사용하기 위한 발현 벡터.

청구항 10

신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 정의된 유전자 작제물 및/또는 제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 정의된 발현 벡터를 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 성분과 함께 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서 및/또는 제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서 및/또는 제10항에 있어서, 상기 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 장애와 관련된 질환 또는 상태가 인지 장애(cognitive disorder), 치매(dementia), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 혈관성 치매(vascular dementia), 루이체 치매(Lewy body dementia), 전두측두엽 치매(frontotemporal dementia; FTD), 파킨슨병(Parkinson's disease), 파킨슨 유사 질환(Parkinson-like disease), 파킨슨증(Parkinsonism), 헌팅턴병(Huntington's disease), 외상성 뇌 손상(traumatic brain injury), 프리온병(prion disease), HIV 감염(HIV infection)으로 인한 치매/신경 인지 문제(dementia/neurocognitive issues), 노화로 인한 치매/신경인지 문제, 타우병증(tauopathy), 다발성 경화증(multiple sclerosis) 및 기타 신경염증성/신경퇴행성 질환(other neuroinflammatory/neurodegenerative diseases), 바람직하게는 알츠하이머병, 파킨슨병 및/또는 파킨슨-유사 질환, 보다 바람직하게는 알츠하이머병 또는 파킨슨병으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 사용하기 위한 유전자 작제물 및/또는 사용하기 위한 발현 벡터 및/또는 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제7항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서 및/또는 제7항 내지 제9항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서 및/또는 제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 약제학적 조성물이 CSF내 투여(intra-CSF administration)에 의해 투여되는, 사용하기 위한 유전자 작제물 및/또는 사용하기 위한 발현 벡터 및/또는 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 13

인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 작제물로서, 상기 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 유비퀴틴스 프로모터에 작동 가능하게 연결되고, 상기 유전자 작제물이 인슐린의 발현이 방지되는 것을 원하는 조직에서 발현되는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열을 포함하고, 바람직하게는, 상기 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열이 포유동물의 심장 및/또는 간에서 발현되는 microRNA에 결합하는 이들 표적 서열로부터 선택되는, 유전자 작제물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 유전자 작제물이 간에서 발현되는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열 및 심장에서 발현되는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열을 포함하고, 바람직하게는 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열이 서열번호 8 및 16-20으로부터 선택되고, 간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열이 서열번호 7 및 9-15로부터 선택되며, 보다 바람직하게는 상기 유전자 작제물이 microRNA-122a의 표적 서열(서열번호 7) 및 microRNA-1의 표적 서열(서열번호 8)을 포함하는, 유전자 작제물.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 정의된 유전자 작제물을 포함하는 발현 벡터로서, 바람직하게는 상기 발현 벡터가 바이러스 벡터이고, 보다 바람직하게는 상기 발현 벡터가 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스 벡터로 이루어진 그룹으로부터 선택된 바이러스 벡터이고, 가장 바람직하게는 상기 발현 벡터가 아데노 관련 바이러스 벡터인, 발현 벡터.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원의 측면은 포유동물, 특히 인간에서 신경염증(neuroinflammation), 신경퇴행(neurodegeneration) 및/또는 인지 저하(cognitive decline)의 치료에 사용하기 위한 인슐린 유전자 요법을 포함하는 의료 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 알츠하이머병(Alzheimer disease; AD), 당뇨병(diabetes) 및 비만(obesity)은 전세계적으로 증가하는 전염병이며, 기대 수명의 감소와 삶의 질의 저하로 이어진다(IDF Atlas 2015, www.idf.org; Mayeux, R. *et al.* 2012, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012, 2:a006239). 최근 데이터는 중추 신경계(CNS)의 염증과 인슐린 저항성이 당뇨병과 비만뿐만 아니라 인지 노화와 치매의 기초가 되는 AD와 다른 신경병리학 과정의 공통된 특징이다(De Felice, F.G., 2013, *J. Clin. Invest.* 123:531-539; Kullmann, S. *et al.* 2016, *Physiol. Rev* 96:1169-1209; Guillemot-Legrís, O. *et al.*, 2017, *Trends Neurosci.* 40 :237-253; Dutheil S. *et al.* 2016, *Neuropsychopharmacology.* 41:1874-1887).

[0003] 몇몇 보고서는 중추 신경계(CNS)에 도달하기 위해 비강내 경로를 사용하여 재조합 인슐린을 투여하면 인지 장애가 있는 개체와 정상 성인 모두의 기억 기능을 향상시킨다는 것을 나타냈다(Craft, S. *et al.*, 2012, *Arch. Neurol.* 69:29-38; Reger, M.A. *et al.*, 2006, *Neurobiology of aging*, 27:451-458). AD의 래트 모델에 장기간 비강내 인슐린 주입은 인지를 개선하고, tau 과인산화를 감소시키고, 미세아교세포 활성화를 약화시키고, 신경발생을 촉진시킨다(Guo, Z. *et al.*, 2017, *Sci. Rep.* 7:1-12).

[0004] 그러나, 인간의 비강 인슐린 스프레이의 약동학은 불량하며, 비강내 인슐린 투여 후 60분 후에 급격히 감소하는 뇌척수액(CSF)에 인슐린 피크가 존재한다(Born, J., *et al.*, 2002, *Nat. Neurosci.* 5(6):514-516). 따라서, 이 접근법은 다수의 투여를 필요로 하며, 인슐린에의 비점막의 장기간 노출에는 몇몇 국소 부작용이 있다(Schmid, V. *et al.*, 2018, *Diabetes Obes Metab.* 20:1563-1577).

[0005] 신경염증과 신경발생이 인지 저하에서 역할을 하는 중요성을 감안할 때, CNS의 염증을 완화하고 기존 치료법의 모든 단점을 갖지 않는 신경발생을 자극하는 새로운 치료적 접근법이 매우 중요할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 제1 측면에서, 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태(condition)의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 인슐린을 인코딩(encoding)하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 작제물(gene construct)이 제공된다.

과제의 해결 수단

[0007] 바람직한 구현예에서, 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 유비쿼터스 프로모터(ubiquitous promoter)에 작동 가능하게 연결된다.

[0008] 또 다른 바람직한 구현예에서, 유비쿼터스 프로모터는 CAG 프로모터 및 CMV 프로모터로 이루어진 그룹으로부터 선택되며, 바람직하게는 유비쿼터스 프로모터는 CAG 프로모터이다.

[0009] 또 다른 바람직한 구현예에서, 유전자 작제물은 인슐린의 발현이 방지되기를 원하는 조직에서 발현되는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열을 포함하고, 바람직하게는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열은 포유동물의 심장 및/또는 간에서 발현되는 microRNA에 결합하는 표적 서열로부터 선택된다.

[0010] 또 다른 바람직한 구현예에서, 유전자 작제물은 간에서 발현되는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열 및 심장에서 발현되는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열을 포함하며, 바람직하게는 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열은 서열번호 8 및 16-20으로부터 선택되고, 간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열은 서열번호 7 및 9-15로부터 선택되며, 보다 바람직하게는 유전자 작제물은 microRNA-122a의 표적 서열(서열번호 7) 및 microRNA-1의 표적 서열(서열번호 8)을 포함한다.

- [0011] 또 다른 바람직한 구현예에서, 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다:
- [0012] (a) 서열번호 1, 2 또는 3의 아미노산 서열과 적어도 60%의 서열 동일성(sequence identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- [0013] (b) 서열번호 4, 5 또는 6의 뉴클레오티드 서열과 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열; 및
- [0014] (c) 유전 코드(genetic code)의 축퇴(degeneracy)로 인해, 서열이 (b)의 뉴클레오티드 서열의 서열과 상이한 뉴클레오티드 서열.
- [0015] 제2 측면에서, 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 제1 측면에 따르는 유전자 작제물을 포함하는 발현 벡터(expression vector)가 제공된다.
- [0016] 바람직한 구현예에서, 발현 벡터는 바이러스 벡터이고, 바람직하게는 상기 발현 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스 벡터로 이루어진 그룹으로부터 선택된 바이러스 벡터, 보다 바람직하게는 아데노 관련 바이러스 벡터이다.
- [0017] 바람직한 구현예에서, 발현 벡터는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, rh10, rh8, Cb4, rh74, DJ, 2/5, 2/1, 1/2 또는 Anc80의 아데노-관련 바이러스 벡터, 바람직하게는 혈청형 1, 2 또는 9의 아데노-관련 바이러스 벡터; 더욱 바람직하게는 혈청형 1 또는 9의 아데노-관련 바이러스 벡터이다.
- [0018] 제3 측면에서, 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 성분과 함께 제1 측면에 따르는 유전자 작제물 및/또는 제2 측면에 따르는 발현 벡터를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0019] 제1 측면에 따라 사용하기 위한 유전자 작제물 및/또는 제2 측면에 따라 사용하기 위한 발현 벡터 및/또는 제3 측면에 따라 사용하기 위한 약제학적 조성물이 또한 제공되고, 여기서 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 장애와 관련된 질환 또는 상태는 인지 장애(cognitive disorder), 치매(dementia), 알츠하이머병, 혈관성 치매(vascular dementia), 루이체 치매(Lewy body dementia), 전두측두엽 치매(frontotemporal dementia; FTD), 파킨슨병(Parkinson's disease), 파킨슨 유사 질환(Parkinson-like disease), 파킨슨증(Parkinsonism), 헌팅턴병(Huntington's disease), 외상성 뇌 손상(traumatic brain injury), 프리온병(prion disease), HIV 감염(HIV infection)으로 인한 치매/신경인지 문제(dementia/neurocognitive issues), 노화에 따른 치매/신경인지 문제, 타우병증(tauopathy), 다발성 경화증(multiple sclerosis) 및 기타 신경염증성/신경퇴행성 질환(other neuroinflammatory/neurodegenerative diseases), 바람직하게는 알츠하이머병, 파킨슨병 및/또는 파킨슨-유사 질환, 보다 바람직하게는 알츠하이머병 또는 파킨슨병으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0020] 일부 구현예에서, 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 약제학적 조성물은 CSF내 투여(intra-CSF administration)로 투여된다.
- [0021] 또 다른 측면에서, 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 작제물이 제공되고, 여기서 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 유비쿼터스 프로모터에 작동 가능하게 연결되고, 유전자 작제물은 인슐린의 발현이 방지되기를 원하는 조직에서 발현되는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열을 포함하고, 바람직하게는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열은 포유동물의 심장 및/또는 간에서 발현되는 microRNA에 결합하는 표적 서열로부터 선택된다.
- [0022] 바람직한 구현예에서, 유전자 작제물은 간에서 발현되는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열 및 심장에서 발현되는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열을 포함하며, 바람직하게는 심장에서 발현되는 microRNA는 서열번호 8 및 16 내지 20으로부터 선택되고, 간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열은 서열번호 7 및 9 내지 15로부터 선택되며, 더욱 바람직하게는 유전자 작제물은 microRNA-122a의 표적 서열(서열번호 7) 및 microRNA-1의 표적 서열(서열번호 8)을 포함한다.
- [0023] 또 다른 측면에서, 이전 측면에서 정의된 유전자 작제물을 포함하는 발현 벡터가 제공되며, 바람직하게는 상기 발현 벡터는 바이러스 벡터이고, 보다 바람직하게는 발현 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스 벡터로 이루어진 그룹으로부터 선택된 바이러스 벡터 이고, 가장 바람직하게는 발현 벡터는 아데노 관련 바이러스 벡터이다.
- [0024] **설명**

- [0025] 본 발명자들은 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하에 대항하기 위해 중추 신경계(CNS)에 지시된 인슐린 유전자 요법에 기초한 개선된 유전자 요법 전략을 개발하였다. 본 발명의 벡터의 단일 CSF내 투여에 의해 제공되는 인슐린의 장기간 및 효과적인 발현은 다른 요법에 비해 중요한 이점을 나타낸다. 특히, 실험 부분에서 상세히 논의된 바와 같이, 본 발명자들은 뇌 지시된 인슐린 유전자 요법의 다음과 같은 예기치 않은 이점을 발견하였다:
- [0026] · 본원에 기재된 유전자 작제물 및 벡터는 시상하부, 피질, 해마, 소뇌 및 후각 망울을 포함하는 뇌에서 강력하고 광범위한 과발현을 수득할 수 있다(실시예 1, 2, 3, 5).
- [0027] · 신경염증과 같은 노화 관련 뇌 병리를 갖는 널리 사용되는 노화의 마우스 모델에서, 본 발명에 따르는 유전자 작제물 및 벡터를 사용하는 뇌에서 인슐린의 발현은 신경염증의 명백한 감소, 신경발생의 증가 및 정상세포 수의 증가(실시예 1)뿐만 아니라 단기 기억, 장기 기억, 학습 능력의 개선(실시예 5)을 유도하였다.
- [0028] · 신경염증 및 인지 저하와 관련된 널리 사용되는 비만 및 당뇨병 마우스 모델에서, 본 발명에 따르는 유전자 작제물 및 벡터를 사용하는 뇌에서의 인슐린의 발현은 신경염증의 명백한 감소 및 정상세포 수의 증가를 유도하였다(실시예 2).
- [0029] 따라서, 본원에 기재된 본 발명의 측면 및 구현에는 본원에 기재된 문제점 및 필요성 중 적어도 일부를 해결한다.
- [0030] 유전자 작제물
- [0031] 제1 측면에서, 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 작제물이 제공된다. 바람직하게는, 본원에 기재된 유전자 작제물은 약제로서 사용하기 위한 것이다. 더욱 바람직하게는, 본원에 기재된 유전자 작제물은 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 것이다.
- [0032] 본원에 기재된 "유전자 작제물"은 본 개시내용을 고려하여 당업자에 의해 이해되는 관례적이고 통상적인 의미를 갖는다. "유전자 작제물"은 "발현 카세트(cassette)" 또는 "발현 작제물"이라고 칭명될 수도 있으며, 관심 단백질의 인코딩하는 유전자를 포함하는 유전자 또는 유전자의 그룹을 지칭하며, 이는 이의 발현을 조절하는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. "일반 정보"로 표제된 본 출원의 부분은 "유전자 작제물"에 관한 보다 상세한 내용을 포함한다. 본원에 사용된 "작동 가능하게 연결된"은 "일반 정보"로 표제된 본 출원의 부분에서 추가로 기재된다.
- [0033] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 작제물은 포유동물의 발현에 적합하다. 본원에 사용된 바와 같이, "포유동물에서 발현에 적합한"은 유전자 작제물이 발현에 사용되는 포유류 숙주 세포에 기초하여 선택되고 발현되는 뉴클레오타이드 서열에서 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 조절 서열을 포함한다는 것을 의미할 수 있다. 바람직하게는, 발현에 사용되는 상기 포유류 숙주 세포는 인간, 무린 또는 개 세포이다.
- [0034] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 유전자 작제물은 CNS, 바람직하게는 뇌, 임의로 포유동물의 CNS 및/또는 뇌에서 발현되는 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 유전자 작제물은 CNS, 바람직하게는 뇌에서 발현에 적합하다. 일부 구현예에서, 뇌에서 유전자 작제물의 발현은 시상하부 및/또는 피질 및/또는 해마 및/또는 소뇌 및/또는 후각 망울에서 유전자 작제물의 발현을 의미할 수 있다. 따라서, 뇌에서 유전자 작제물의 발현은 시상하부, 피질, 해마, 소뇌 및 후각 망울로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개 또는 모든 뇌 영역에서 유전자 작제물의 발현을 의미할 수 있다. 발현은 "일반 정보"라는 표제 섹션(section)하에 기재된 바와 같이 qPCR, 웨스턴 블롯 분석 또는 ELISA와 같은 기술을 사용하여 평가될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 구현예의 맥락에서, CNS 및/또는 뇌에서 발현되는 인슐린; 및 CNS 및/또는 뇌에서의 발현에 적합한 유전자 작제물은 다른 기관 또는 조직과 비교하여 CNS 및/또는 뇌에서 인슐린의 우선적 또는 우세한(적어도 10% 높은, 적어도 20% 높은, 적어도 30% 높은, 적어도 40% 높은, 적어도 50% 높은, 적어도 60% 높은, 적어도 70% 높은, 적어도 80% 높은, 적어도 90% 높은, 적어도 100% 높은, 적어도 150% 높은, 적어도 2배 높은, 적어도 3배 높은, 적어도 4배 높은, 적어도 5배 높은, 적어도 6배 높은, 적어도 7배 높은, 적어도 8배 높은, 적어도 9배 높은, 적어도 10배 높은 또는 그 이상인) 발현을 지칭한다. 다른 기관 또는 조직은 간, 췌장, 지방 조직, 골격근, 심장, 신장, 결장, 조혈 조직, 폐, 난소, 비장, 위, 고환 및 기타일 수 있다. 바람직하게는, 다른 기관은 간 및/또는 심장이다. 다른 기관은 또한 골격근일 수 있다. 한 구현예에서, 발현은 간, 췌장, 지방 조직, 골

격근, 심장, 신장, 결장, 조혈 조직, 폐, 난소, 비장, 위 및/또는 고환에서 검출될 수 없다. 바람직한 구현예에서, 발현은 간 및/또는 심장에서 검출될 수 없다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 발현은 골격근에서 검출될 수 없다. 일부 구현예에서, 발현은 간, 췌장, 지방 조직, 골격근, 심장, 신장, 결장, 조혈 조직, 폐, 난소, 비장, 위 및 고환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 모든 기관에서 검출될 수 없다. 발현은 "일반 정보"라는 표제 섹션하에 기재된 바와 같이 qPCR, 웨스턴 블롯 분석 또는 ELISA와 같은 기술을 사용하여 평가될 수 있다.

[0036] 일부 구현예에서, 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 유비퀴틴스 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.

[0037] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 유비퀴틴스 프로모터는 CAG 프로모터, CMV 프로모터, 미니-CMV 프로모터, β -액틴 프로모터, 라우스-육종-바이러스(RSV) 프로모터, 신장 인자 1 알파(EF1 α) 프로모터, 초기 성장 반응 인자-1(Egr-1) 프로모터, 진핵생물 개시 인자 4A(eIF4A) 프로모터, 페리틴 중쇄 인코딩 유전자(FerH) 프로모터, 페리틴 경쇄 인코딩 유전자(FerL) 프로모터, 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소(GAPDH) 프로모터, GRP78 프로모터, GRP94 프로모터, 열충격 단백질 70(hsp70) 프로모터, 유비퀴틴 B 프로모터, SV40 프로모터, 베타-키네신 프로모터, ROSA26 프로모터 및 PGK-1 프로모터로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0038] 바람직한 구현예에서, 유비퀴틴스 프로모터는 CAG 프로모터 및 CMV 프로모터로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 유비퀴틴스 프로모터는 CAG 프로모터이다. CAG 프로모터는 본 발명에 따르는 유전자 작제물에서의 사용에 적합한 것으로 실시예에서 입증되었다.

[0039] 일부 구현예에서, CAG 프로모터는 서열번호 22와 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 본질적으로 이로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 22의 일부, 예를 들어, 서열번호 22의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.

[0040] 또 다른 바람직한 유비퀴틴스 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터이다. 일부 구현예에서, CMV 프로모터는 서열번호 23과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 본질적으로 이로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 23의 일부, 예를 들어, 서열번호 23의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.

[0041] 바람직하게는, 상기 CMV 프로모터는 인트론 서열과 함께 사용된다. 일부 구현예에서, 인트론 서열은 서열번호 21과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 본질적으로 이로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 21의 일부, 예를 들어, 서열번호 21의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.

[0042] 또 다른 바람직한 유비퀴틴스 프로모터는 미니-CMV 프로모터이다. 일부 구현예에서, 미니-CMV 프로모터는 서열번호 25와 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일

성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 본질적으로 이로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 25의 일부, 예를 들어, 서열번호 25의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.

[0043] 또 다른 바람직한 유비쿼터스 프로모터는 EF1 α 프로모터이다. 일부 구현예에서, EF1 α 프로모터는 서열번호 26과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 본질적으로 이로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 26의 일부, 예를 들어, 서열번호 26의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.

[0044] 또 다른 바람직한 유비쿼터스 프로모터는 RSV 프로모터이다. 일부 구현예에서, RSV 프로모터는 서열번호 27과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 본질적으로 이로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 27의 일부, 예를 들어, 서열번호 27의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.

[0045] 일부 구현예에서, 유전자 작제물은 인슐린의 발현이 방지되는 것을 원하는 조직에서 발현되는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 유비쿼터스 프로모터에 작동 가능하게 연결되고, 유전자 작제물은 인슐린의 발현이 방지되는 것을 원하는 조직에서 발현되는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열을 포함한다.

[0046] "유비쿼터스 프로모터", "작동 가능하게 연결된" 및 "microRNA"에 대한 설명은 "일반 정보"라는 표제 섹션하에 제공된다. 본원에 사용된 "조직에서 발현되는 microRNA의 표적 서열" 또는 "조직에서 발현되는 microRNA에 결합하는 표적 서열" 또는 "조직에서 발현되는 microRNA의 결합 부위"는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 상기 조직에서 발현된 microRNA의 적어도 일부에 상보적이거나 부분적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 발현은 "일반 정보"라는 표제 섹션하에 기재된 바와 같은 qPCR, 웨스턴 블롯 분석 또는 ELISA와 같은 기술을 사용하여 평가될 수 있다.

[0047] 일부 구현예에서, microRNA의 적어도 하나의 표적 서열은 포유동물의 심장 및/또는 간에서 발현되는 microRNA에 결합하는 그의 표적 서열로부터 선택된다. 바람직하게는, 일부 구현예에서, 유전자 작제물은 간에서 발현되는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열 및 심장에서 발현되는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열을 포함한다.

[0048] 본원에서 사용되는 "간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열" 또는 "간에서 발현되는 microRNA에 결합하는 표적 서열" 또는 "간에서 발현되는 microRNA의 결합 부위"는 간에서 발현되는 microRNA의 적어도 일부에 상보적이거나 부분적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 유사하게, 본원에서 사용되는 "심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열" 또는 "심장에서 발현되는 microRNA에 결합하는 표적 서열" 또는 "심장에서 발현되는 microRNA의 결합 부위"는 심장에서 발현되는 microRNA의 적어도 일부에 상보적이거나 부분적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다.

[0049] 본원에 기재된 바와 같이, 간에서 발현되는 microRNA의 일부 또는 심장에서 발현되는 microRNA의 일부는 상기 microRNA 중 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개 또는 적어도 7개 연속 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 결합 부위 서열은 발현된 microRNA의 적어도 일부에 대해 완전한 상보성을 가질 수 있고, 이는 서열이 임의의 불일치가 발생하지 않고 완전히 일치함을 의미한다. 대안적으로, 결합 부위 서열은 발현된 microRNA의 적어도 일부에 부분적으로 상보적일 수 있고, 이는 4개, 5개, 6개 또는 7개 연속 뉴클레오타이드에서 하나의 불일치가 일어날 수 있음을 의미한다. 부분적으로 상보적인 결합 부위는 바람직하게는 microRNA의 시드 영역(seed region)에 대해 완전하거나 거의 완전한 상보성을 함유하고, 이는 microRNA의 시드 영역과 그의 결합 부위 사이에서 4, 5, 6, 또는 7개 연속 뉴클레오타이드당 불일치가 없거나(완전한 상보성) 또는 하나의 불일치(거의

완전한 상보성)가 발생할 수 있음을 의미한다. microRNA의 시드 영역은 microRNA의 약 뉴클레오티드 2 내지 약 뉴클레오티드 8까지의 microRNA의 5' 영역으로 구성된다. 본원에 기재된 부분은 바람직하게는 상기 microRNA의 시드 영역이다. 간에서 발현되는 microRNA 또는 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열을 함유하는 메신저 RNA(mRNA)의 분해는 RNA 간섭 경로를 통하거나 mRNA의 직접 번역 제어(억제)를 통해 발생할 수 있다. 본 발명은 도입유전자 또는 인코딩된 단백질의 발현을 억제할 때 miRNA에 의해 궁극적으로 이용되는 경로에 의해 결코 제한되지 않는다.

[0050] 본 발명의 맥락에서, 간에서 발현되는 microRNA에 결합하는 표적 서열은 서열번호 7 또는 9 내지 15와 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 대체될 수 있다. 일부 구현예에서, 간에서 발현되는 microRNA에 결합하는 표적 서열은 서열번호 7 또는 9 내지 15의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23개 이상의 뉴클레오티드의 연속 스트레치와 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 대체될 수 있다.

[0051] 바람직한 구현예에서, 간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열은 서열번호 7과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 대체될 수 있다. 일부 구현예에서, 간에서 발현되는 microRNA에 결합하는 표적 서열은 서열번호 7의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23개 이상의 뉴클레오티드의 연속 스트레치와 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 대체될 수 있다. 추가의 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같이 간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열의 적어도 하나의 카피는 본 발명의 유전자 작제물에 존재한다. 추가의 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같이 간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열의 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 카피가 본 발명의 유전자 작제물에 존재한다. 바람직한 구현예에서, 서열 miRT-122a(서열번호 7)의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 카피가 본 발명의 유전자 작제물에 존재한다. 본원에 기재된 바와 같이 간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열의 바람직한 카피 수는 4개이다.

[0052] 본원에서 사용되는 바와 같이 간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열은 당업자에게 공지된 바와 같이 간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열의 적어도 검출 가능한 수준의 활성을 발휘한다. 간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열의 활성은 간에서 발현되는 그의 동족 microRNA에 결합하고, 도입유전자에 작동 가능하게 연결되는 경우, 간에서 도입유전자 발현의 탈표적화를 중재하는 것이다. 이러한 활성은 qPCR, 웨스턴 블롯 분석 또는 ELISA와 같은 당업자에게 공지된 표준 검정에 의해 mRNA 또는 단백질의 수준에서 간에서 도입유전자 발현 수준을 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0053] 본 발명의 맥락에서, 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열은 서열번호 8 또는 16 내지 20과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적

어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 대체될 수 있다. 일부 구현예에서, 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열은 서열번호 8 또는 16 내지 20의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23개 이상의 뉴클레오티드의 연속 스트레치와 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 대체될 수 있다.

[0054] 바람직한 구현예에서, 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열은 서열번호 8과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 대체될 수 있다. 일부 구현예에서, 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열은 서열번호 8의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23개 이상의 뉴클레오티드의 연속 스트레치와 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 대체될 수 있다.

[0055] 추가의 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같이 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열의 적어도 하나의 카피는 본 발명의 유전자 작제물에 존재한다. 추가의 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같이 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열의 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 카피가 본 발명의 유전자 작제물에 존재한다. 바람직한 구현예에서, miRT-1(서열번호 8)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 카피가 본 발명의 유전자 작제물에 존재한다. 본원에 기재된 바와 같이 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열의 바람직한 카피 수는 4개이다.

[0056] 본원에 사용된 바와 같이 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열은 당업자에게 공지된 바와 같이 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열의 적어도 검출 가능한 수준의 활성을 발휘한다. 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열의 활성은 심장에서 발현되는 그의 동족 microRNA에 결합하고, 도입유전자에 작동 가능하게 연결되는 경우, 심장에서 도입유전자 발현의 탈표적화를 중재하는 것이다. 이러한 활성은 qPCR, 웨스턴 블롯 분석 또는 ELISA와 같은 당업자에게 공지된 표준 검정에 의해 mRNA 또는 단백질의 수준에서 심장에서 도입유전자 발현 수준을 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0057] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같이 간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열의 적어도 하나의 카피, 및 본원에 기재된 바와 같이 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열의 적어도 하나의 카피는 본 발명의 유전자 작제물에 존재한다. 추가의 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같이 간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열의 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 카피, 및 본원에 기재된 바와 같이 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열의 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 카피는 본 발명의 유전자 작제물에 존재한다. 추가의 구현예에서, miRT-122a(서열번호 7)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 카피 및 miRT-1(서열번호 8)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 카피는 본 발명의 유전자 작제물에서 조합된다. 추가의 구현예에서, miRT-122a(서열번호 7)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 4개의 카피 및 miRT-1(서열번호 8)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 4개의 카피는 본 발명의 유전자 작제물에서 조합된다.

[0058] 일부 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 유전자 작제물이 제공되며, 여기서 간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열 및 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열은 서열번호 7 내지 20의 서열 및/또는 이들의 조합으로 이루

어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 유전자 작제물이 제공되며, 여기서 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열은 서열번호 8 및 16 내지 20으로부터 선택되고, 간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열은 서열번호 7 및 9 내지 15로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 유전자 작제물이 제공되며, 여기서 상기 유전자 작제물은 microRNA-122a의 표적 서열(서열번호 7) 및 microRNA-1의 표적 서열(서열번호 8)을 포함한다.

[0059] 본원에 기재된 바와 같이 간에서 발현되는 microRNA의 표적 서열 및/또는 심장에서 발현되는 microRNA의 표적 서열은 적어도 검출 가능한 수준의 활성을 발휘한다. microRNA의 표적 서열의 활성은 상기 microRNA의 표적 서열을 함유하는 mRNA의 분해일 수 있다. 이러한 분해는 당업자에게 공지된 임의의 기술을 사용하여, 예를 들어, 상기 mRNA의 발현/존재를 측정함으로써 평가될 수 있다. 발현은 "일반 정보"라는 표제 섹션하에 기재된 바와 같이 qPCR, 웨스턴 블롯 분석 또는 ELISA와 같은 기술을 사용하여 평가될 수 있다.

[0060] 본 발명에 따르는 유전자 작제물에 존재하는 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 돌연변이된 인슐린 유전자 또는 인슐린 코딩 서열, 또는 코돈 최적화 인슐린 유전자 또는 인슐린 코딩 서열을 포함하는 임의의 인슐린 유전자 또는 인슐린 코딩 서열로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 뮤린, 개, 또는 인간 인슐린 유전자 또는 인슐린 코딩 서열, 뮤린, 개, 또는 인간 돌연변이된 인슐린 유전자 또는 인슐린 코딩 서열, 또는 뮤린, 개, 또는 인간 코돈 최적화된 인슐린 유전자 또는 인슐린 코딩 서열이다. 일부 구현예에서, 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 인간, 침팬지, 마우스, 래트 또는 개로부터의 인슐린 유전자 또는 인슐린 코딩 서열; 또는 인간, 침팬지, 마우스, 래트 또는 개로부터 돌연변이된 인슐린 유전자 또는 인슐린 코딩 서열; 또는 인간, 침팬지, 마우스, 래트 또는 개로부터 코돈 최적화된 인슐린 유전자 또는 인슐린 코딩 서열이다. 인간 서열이 바람직하다.

[0061] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따르는 유전자 작제물에 존재하는 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 퓨린 절단 부위를 갖는 조작된 인슐린을 인코딩한다. 퓨린 절단 부위를 갖는 이러한 조작된 인슐린은 비체장 조직에서 성숙한 인슐린을 생성하기 위해 매우 효율적인 방식으로 처리되는 것으로 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 퓨린 절단 부위를 갖는 조작된 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다:

[0062] (a) 서열번호 41 또는 42의 아미노산 서열과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열;

[0063] (b) 서열번호 45 또는 46의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열; 및

[0064] (c) 유전 코드의 축퇴로 인해, 서열이 (a) 또는 (b)의 뉴클레오타이드 서열의 서열과 상이한 뉴클레오타이드 서열.

[0065] 따라서, 일부 구현예에서, 인슐린을 인코딩하는 바람직한 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1 내지 3 또는 41 내지 44와 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩한다. 서열번호 1은 인간 인슐린의 아미노산 서열을 나타낸다. 서열번호 2는 뮤린 인슐린의 아미노산 서열을 나타낸다. 서열번호 3은 개 인슐린의 아미노산 서열을 나타낸다. 서열번호 41은 퓨린 절단 부위를 갖는 인간 인슐린의 아미노산 서열을 나타낸다. 서열번호 42는 퓨린 절단 부위를 갖는 인간 인슐린 돌연변이체 His-B10-Asp의 아미노산 서열을 나타낸다. 서열번호 43은 뮤린

인슐린의 아미노산 서열을 나타낸다. 서열번호 44는 침팬지 인슐린의 아미노산 서열을 나타낸다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 1 내지 3 또는 41 내지 44의 일부, 예를 들어, 서열번호 1 내지 3 또는 41 내지 44의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.

[0066] 일부 구현예에서, 본 발명에 따르는 유전자 작제물에 존재하는 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 4 내지 6 또는 45 내지 48로 이루어진 그룹으로부터 선택된 임의의 서열과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다. 서열번호 4는 인간 인슐린의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 서열번호 5는 류린 인슐린의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 서열번호 6은 개 인슐린의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 서열번호 45는 류린 절단 부위를 갖는 인간 인슐린의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 서열번호 46은 류린 절단 부위를 갖는 인간 인슐린 돌연변이체 His-B10-Asp의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 서열번호 47은 류린 인슐린의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 서열번호 48은 침팬지 인슐린의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 4 내지 6 또는 45 내지 48의 일부, 예를 들어, 서열번호 4 내지 6 또는 45 내지 48의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.

[0067] "동일성" 또는 "서열 동일성" 및 "유사성" 또는 "서열 유사성"에 대한 설명은 "일반 정보"라는 표제 섹션하에 제공된다.

[0068] 일부 구현예에서, 본 발명에 따르는 유전자 작제물에 존재하는 인간 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 4와 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 4의 일부, 예를 들어, 서열번호 4의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.

[0069] 일부 구현예에서, 본 발명에 따르는 유전자 작제물에 존재하는 류린 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 5 또는 47과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 5 또는 47의 일부, 예를 들어, 서열번호 5 또는 47의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.

[0070] 일부 구현예에서, 본 발명에 따르는 유전자 작제물에 존재하는 개 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 6과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 6의 일부, 예를 들어, 서열번호 6의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.

[0071] 일부 구현예에서, 본 발명에 따르는 유전자 작제물에 존재하는 인간 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 45 또는 46과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적

어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 45 또는 46의 일부, 예를 들어, 서열번호 45 또는 46의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.

[0072] 일부 구현예에서, 본 발명에 따르는 유전자 작제물에 존재하는 침팬지 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 48과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 48의 일부, 예를 들어, 서열번호 48의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.

[0073] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 작제물이 제공되며, 여기서 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다:

[0074] (a) 서열번호 1 내지 3 또는 41 내지 44의 아미노산 서열과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열;

[0075] (b) 서열번호 4 내지 6 또는 45 내지 48의 뉴클레오티드 서열과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열; 및

[0076] (c) 유전 코드의 축퇴로 인해, 서열이 (a) 또는 (b)의 뉴클레오티드 서열의 서열과 상이한 뉴클레오티드 서열.

[0077] 본원에 기재된 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 인슐린(특히, 인슐린 서열이 소정의 서열번호와 최소의 동일성 백분율을 갖는 것으로 기재되는 경우)은 인슐린의 적어도 검출 가능한 수준의 활성을 발휘한다. 인슐린의 활성은 고혈당의 조절일 수 있다. 보다 적절하게는, 본 개시내용의 맥락에서, 인슐린의 활성은 인슐린 신호전달 캐스케이드(cascade)의 수준에서 평가될 수 있다. 예를 들어, 인슐린 신호전달 캐스케이드의 상이한 단백질의 인산화 상태, 예를 들어, IRS-1/2의 티로신 인산화, AKT의 인산화 등이 결정될 수 있다. 인산화 상태는, 예를 들어, 인산화된 티로신 잔기를 인식하는 항체 및/또는 IRS-1/2 및 AKT와 같은 단백질의 인산화된 형태를 특이적으로 인식하는 항체를 사용하는 웨스턴 블롯 분석에 의해 평가될 수 있다. 인슐린의 활성은 또한 신경염증을 감소시키거나, 신경발생을 증가시키거나, 정상세포를 증가시키는 것일 수 있다. 이러한 활성은 당업자에게 공지된 방법에 의해, 예를 들어, 실험 섹션에 기재된 바와 같이, 염증성 분자, 정상세포 마커 및/또는 신경원성 마커의 발현 수준을 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0078] 하기 표는 본 발명의 유전자 작제물에 사용하기에 적합한 대표적인 수의 인슐린 서열에 대한 DNA 및 단백질 수준에서의 서열 동일성을 요약한다.

[0079] [표 1]

쌍별 정렬에 의해 결정된 동일성 %. HomoloGene 는 기본 매개변수와 함께 사용되었다
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>).

종	동일성 (%)	
	단백질	DNA
에이치. 사피엔스	(서열번호 1)	(서열번호 4)
vs. 피. 트로글로다이트	98.2 (서열번호 44)	98.2 (서열번호 48)
vs. 씨. 루푸스	88.2 (서열번호 3)	86.1 (서열번호 6)
vs. 엠. 무스쿨루스	81.8 (서열번호 2)	82.4 (서열번호 5)
vs. 알. 노르베기쿠스	82.7 (서열번호 43)	81.2 (서열번호 47)
피. 트로글로다이트	(서열번호 44)	(서열번호 48)
vs. 에이치. 사피엔스	98.2 (서열번호 1)	98.2 (서열번호 4)
vs. 씨. 루푸스	87.3 (서열번호 3)	85.8 (서열번호 6)
vs. 엠. 무스쿨루스	80.9 (서열번호 2)	82.1 (서열번호 5)
vs. 알. 노르베기쿠스	81.8 (서열번호 43)	81.2 (서열번호 47)
씨. 루푸스	(서열번호 3)	(서열번호 6)
vs. 에이치. 사피엔스	88.2 (서열번호 1)	86.1 (서열번호 4)
vs. 피. 트로글로다이트	87.3 (서열번호 44)	85.8 (서열번호 48)
vs. 엠. 무스쿨루스	80.9 (서열번호 2)	81.8 (서열번호 5)
vs. 알. 노르베기쿠스	80.0 (서열번호 43)	80.0 (서열번호 47)
엠. 무스쿨루스	(서열번호 2)	(서열번호 5)
vs. 에이치. 사피엔스	81.8 (서열번호 1)	82.4 (서열번호 4)
vs. 피. 트로글로다이트	80.9 (서열번호 44)	82.1 (서열번호 48)
vs. 씨. 루푸스	80.9 (서열번호 3)	81.8 (서열번호 6)
vs. 알. 노르베기쿠스	94.5 (서열번호 43)	94.2 (서열번호 47)
알. 노르베기쿠스	(서열번호 43)	(서열번호 47)
vs. 에이치. 사피엔스	82.7 (서열번호 1)	81.2 (서열번호 4)
vs. 피. 트로글로다이트	81.8 (서열번호 44)	81.2 (서열번호 48)
vs. 씨. 루푸스	80.0 (서열번호 3)	80.0 (서열번호 6)
vs. 엠. 무스쿨루스	94.5 (서열번호 2)	94.2 (서열번호 5)
에이치. 사피엔스	(서열번호 1)	(서열번호 4)
vs. 에이치. 사피엔스 퓨린	97.2 (서열번호 41)	97.8 (서열번호 45)
vs. 에이치. 사피엔스 퓨린 asp	96.3 (서열번호 42)	97.2 (서열번호 46)

[0080]

[0081]

일부 구현예에서, 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 조직 특이적 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 바람직한 구현예에서, 조직 특이적 프로모터는 CNS 특이적 프로모터, 보다 바람직하게는 뇌 특이적 프로모터이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, CNS 및/또는 뇌 특이적 프로모터는 또한 CNS 및/또는 뇌의 특정 영역 또는 세포 서브세트에서 발현을 지시하는 프로모터를 포함한다. 따라서, CNS 및/또는 뇌 특이적 프로모터는 또한 해마 특이적 프로모터, 소뇌 특이적 프로모터, 피질 특이적 프로모터, 시상하부 특이적 프로모터 및/또는 후각 망울 특이적 프로모터, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택될 수 있다.

[0082]

"조직 특이적 프로모터"에 대한 설명은 "일반 정보"라는 표제 섹션하에 제공되어 있다.

[0083]

일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 CNS 특이적 프로모터는 시냅신 1 프로모터, 뉴런 특이적 에놀라제 (NSE) 프로모터, 칼슘/칼모둘린 의존성 단백질 키나제 II (CaMKII) 프로모터, 티로신 하이드록실라제 (TH) 프로모터, 포크헤드 박스 A2 (FOXA2) 프로모터, 알파-인터벡신 (INA) 프로모터, 네스틴 (NES) 프로모터, 아교 섬유성 산성 단백질 (GFAP) 프로모터, 알데히드 데하이드로게나제 1 패밀리 구성원 L1 (ALDH1L1) 프로모터, 미엘린 관련 올리고덴드로사이트 염기성 단백질 (MOBP) 프로모터, 호메오박스 단백질 9 (HB9) 프로모터, 고나도트로핀 방출 호르몬 (GnRH) 프로모터 및 미엘린 염기성 단백질 (MBP) 프로모터로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

- [0084] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 뇌 특이적 프로모터는 시냅신 1 프로모터, 뉴런 특이적 에놀라제 (NSE) 프로모터, 칼슘/칼모둘린 의존성 단백질 키나제 II(CaMKII) 프로모터, 티로신 하이드록실라제(TH) 프로모터, 포크헤드 박스 A2(FOXA2) 프로모터, 알파-인터넥신(INA) 프로모터, 네스틴(NES) 프로모터, 아교 섬유성 산성 단백질(GFAP) 프로모터, 알데히드 데하이드로게나제 1 패밀리 구성원 L1(ALDH1L1) 프로모터, 미엘린 관련 올리고덴드로사이트 염기성 단백질(MOBP) 프로모터, 고나도트로핀 방출 호르몬(GnRH) 프로모터 및 미엘린 염기성 단백질(MBP) 프로모터로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0085] 바람직한 구현예에서, CNS 및/또는 뇌 특이적 프로모터는 시냅신 1 프로모터이다. 일부 구현예에서, 시냅신 1 프로모터는 서열번호 28과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 이루어지거나, 이러한 서열로 이루어진다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 28의 일부, 예를 들어, 서열번호 28의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.
- [0086] 또 다른 바람직한 CNS 및/또는 뇌 특이적 프로모터는 칼슘/칼모둘린 의존성 단백질 키나제 II(CaMKII) 프로모터이다. 일부 구현예에서, 칼슘/칼모둘린 의존성 단백질 키나제 II(CaMKII) 프로모터는 서열번호 29와 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 이루어지거나, 이러한 서열로 이루어진다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 29의 일부, 예를 들어, 서열번호 29의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.
- [0087] 또 다른 바람직한 CNS 및/또는 뇌 특이적 프로모터는 아교 섬유성 산성 단백질(GFAP) 프로모터이다. 일부 구현예에서, 아교 섬유성 산성 단백질(GFAP) 프로모터는 서열번호 30과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 이루어지거나, 이러한 서열로 이루어진다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 30의 일부, 예를 들어, 서열번호 30의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.
- [0088] 또 다른 바람직한 CNS 및/또는 뇌 특이적 프로모터는 네스틴 프로모터이다. 일부 구현예에서, 네스틴 프로모터는 서열번호 31과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 이루어지거나, 이러한 서열로 이루어진다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 31의 일부, 예를 들어, 서열번호 31의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.
- [0089] 또 다른 바람직한 CNS 특이적 프로모터는 호메오박스 단백질 9(HB9) 프로모터이다. 일부 구현예에서, 호메오박스 단백질 9(HB9) 프로모터는 서열번호 32와 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적

어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 이루어지거나, 이러한 서열로 이루어진다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 32의 일부, 예를 들어, 서열번호 32의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.

[0090] 또 다른 바람직한 CNS 및/또는 뇌 특이적 프로모터는 티로신 하이드록실라제(TH) 프로모터이다. 일부 구현예에서, 티로신 하이드록실라제(TH) 프로모터는 서열번호 33과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 이루어지거나, 이러한 서열로 이루어진다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 33의 일부, 예를 들어, 서열번호 33의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.

[0091] 또 다른 바람직한 CNS 및/또는 뇌 특이적 프로모터는 미엘린 염기성 단백질(MBP) 프로모터이다. 일부 구현예에서, 미엘린 염기성 단백질(MBP) 프로모터는 서열번호 34와 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 본질적으로 이루어지거나, 이러한 서열로 이루어진다. 일부 구현예에서, 동일성은 서열번호 34의 일부, 예를 들어, 서열번호 34의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%에 대해 평가될 수 있다.

[0092] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 CNS 및/또는 뇌 특이적 프로모터는 CNS 및/또는 뇌의 적어도 하나의 세포에서 상기 뉴클레오타이드 서열의 발현을 지시한다. 바람직하게는, 상기 프로모터는 CNS 및/또는 뇌 세포의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%에서 발현을 지시한다. 본원에서 사용된 바와 같이, CNS 및/또는 뇌 특이적 프로모터는 또한 CNS 및/또는 뇌의 특정 영역 또는 세포 서브세트에서 발현을 지시하는 프로모터를 포함한다. 따라서, 본원에 기재된 바와 같은 CNS 및/또는 뇌 특이적 프로모터는 또한 해마, 소뇌, 피질, 시상하부 및/또는 후각 망울의 세포의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%에서 발현을 지시할 수 있다. 발현은 "일반 정보"라는 표제 섹션하에 기재된 바와 같은 qPCR, 웨스턴 블롯 분석 또는 ELISA와 같은 기술을 사용하여 평가될 수 있다.

[0093] 본원에서 사용된 프로모터(특히, 프로모터 서열이 소정의 서열번호와 최소의 동일성 백분율을 갖는 것으로 기재되는 경우)는 적어도 당업자에게 공지된 프로모터의 활성을 발휘해야 한다. 바람직하게는, 소정의 서열번호와 최소의 동일성 백분율을 갖는 것으로 기재된 프로모터는 당업자에게 공지된 검정에서 평가되는 바와 같이 작동 가능하게 연결된 뉴클레오타이드 서열(즉, 적어도 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열)의 전사를 조절해야 한다. 예를 들어, 이러한 검정은 도입유전자의 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 발현은 "일반 정보"라는 표제 섹션하에 기재된 바와 같은 qPCR, 웨스턴 블롯 분석 또는 ELISA와 같은 기술을 사용하여 평가될 수 있다.

[0094] 추가의 서열이 본 발명의 유전자 작제물에 존재할 수 있다. 본원에서 적합한 예시적인 추가의 서열은 역전된 말단 반복체(ITR), SV40 폴리아데닐화 신호(서열번호 37), 토끼 β -글로빈 폴리아데닐화 신호(서열번호 38), CMV 인핸서 서열(서열번호 24)을 포함한다. 본 발명의 맥락 내에서, "ITR"은 각각 AAV의 게놈으로부터 유래되는 하나의 5' ITR 및 하나의 3' ITR을 포함하는 것으로 의도된다. 바람직한 ITR은 AAV2로부터 유래되며, 서열번호 35(5' ITR) 및 서열번호 36(3' ITR)으로 표시된다. 본 발명의 맥락 내에서, CMV 인핸서 서열(서열번호 24) 및 CMV 프로모터 서열(서열번호 23)을 2개의 별개의 서열로서 또는 단일 서열(서열번호 39)로서 사용하는 것을 포함한다. 이들 추가의 서열 각각은 본 발명에 따르는 유전자 작제물에 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 추가로 하나의 5' ITR 및 하나의 3' ITR, 바람직하게는 AAV2 ITR, 보다 바람직하게는 서열번호 30(5' ITR) 및 서열번호 31(3' ITR)로 표시되는 AAV2 ITR을 포함하는 유전자 작제물이 제공된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 추가로 폴리아데닐화 신호, 바람직하게는 SV40 폴리아데닐화 신호(바람직하게는 서열번호 32로 표시됨) 및/또는 토끼 β -글로빈 폴리아데닐화 신호(바람직하게는 서열번호 33으로 표시됨)를 포함하는 유전자 작제물이 제공된다.

- [0095] 임의로, 추가의 뉴클레오티드 서열은 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열(들), 예를 들어, 신호 서열, 핵국소화 신호, 발현 인핸서 등을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다.
- [0096] 일부 구현예에서, 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 작제물이 제공되며, 임의로 유전자 작제물은 인슐린의 발현이 방지되는 것을 원하는 조직에서 발현되는 microRNA의 표적 서열을 포함하지 않는다.
- [0097] 일부 구현예에서, 본원에 사용된 서열 동일성 또는 유사성의 수준은 바람직하게는 70%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 80%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 90%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 95%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 99%이다.
- [0098] 발현 벡터
- [0099] 본원에 기재된 유전자 작제물은 발현 벡터에 위치될 수 있다. 따라서, 다른 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 작제물을 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 바람직하게는, 본원에 기재된 발현 벡터는 약제로서 사용하기 위한 것이다. 바람직하게는, 본원에 기재된 발현 벡터는 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 것이다.
- [0100] "발현 벡터"에 대한 설명은 "일반 정보"라는 표제 섹션하에 제공되어 있다.
- [0101] 일부 구현예에서, 발현 벡터는 바이러스 발현 벡터이다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스 벡터로 이루어진 그룹으로부터 선택된 바이러스 벡터일 수 있다. 바람직한 바이러스 벡터는 아데노 관련 바이러스 벡터이다.
- [0102] "바이러스 발현 벡터"에 대한 설명은 "일반 정보"라는 표제 섹션하에 제공되어 있다. 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 유래 벡터로도 공지되어 있고, 아데노 관련 바이러스 벡터는 아데노 관련 바이러스 유래 벡터로도 공지되어 있으며, 레트로바이러스 벡터는 레트로바이러스 유래 벡터로도 공지되어 있으며, 렌티바이러스 벡터는 렌티바이러스 유래 벡터로서 공지되어 있다. 바람직한 바이러스 벡터는 아데노 관련 바이러스 벡터이다. "아데노 관련 바이러스 벡터"에 대한 설명은 "일반 정보"라는 표제 섹션하에 제공되어 있다.
- [0103] 일부 구현예에서, 벡터는 아데노-관련 벡터 또는 아데노-관련 바이러스 벡터, 또는 혈청형 1의 AAV(AAV1), 혈청형 2의 AAV(AAV2), 혈청형 3의 AAV(AAV3), 혈청형 4의 AAV(AAV4), 혈청형 5의 AAV(AAV5), 혈청형 6의 AAV(AAV6), 혈청형 7의 AAV(AAV7), 혈청형 8의 AAV(AAV8), 혈청형 9의 AAV(AAV9), 혈청형 rh10의 AAV(AAVrh10), 혈청형 rh8의 AAV(AAVrh8), 혈청형 Cb4의 AAV(AAVCb4), 혈청형 rh74의 AAV(AAVrh74), 혈청형 DJ의 AAV(AAVDJ), 혈청형 2/5의 AAV(AAV2/5), 혈청형 2/1의 AAV(AAV2/1), 혈청형 1/2의 AAV(AAV1/2), 혈청형 Anc80의 AAV(AAVAnc80)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아데노 관련 바이러스 벡터(AAV)이다. 바람직한 구현예에서, 벡터는 혈청형 1, 2 또는 9의 AAV(AAV1, AAV2, 또는 AAV9)이다. 이들 AAV 혈청형은 본 발명에 따르는 발현 벡터로서 사용하기에 적합한 것으로 실시예에서 입증되어 있다. 특히 바람직한 구현예에서, 발현 벡터는 혈청형 9 또는 1의 아데노 관련 바이러스 벡터이다.
- [0104] 바람직한 구현예에서, 발현 벡터는 AAV1 또는 AAV9, 바람직하게는 AAV9이고, 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 작제물을 포함하며, 여기서 유전자 작제물은 인슐린의 발현이 방지되는 것을 원하는 조직에서 발현되는 microRNA의 적어도 하나의 표적 서열을 포함한다.
- [0105] 또 다른 바람직한 구현예에서, 발현 벡터는 AAV1 또는 AAV9, 바람직하게는 AAV1이고, 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 작제물을 포함하며, 임의로 유전자 작제물은 인슐린의 발현이 방지되는 것을 원하는 조직에서 발현되는 microRNA의 표적 서열을 포함하지 않는다.
- [0106] 바람직한 구현예에서, 발현 벡터는 CAG 프로모터 및 miRNA 표적 서열 miRT-1 및 miRT-122a에 작동 가능하게 연결된 인간 인슐린을 인코딩하는 유전자 작제물을 포함하는 AAV9-CAG-hIns-dmiRT이다. 임의로, 유전자 작제물은 토끼 β-글로빈 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함한다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 발현 벡터는 CAG 프로모터에 작동 가능하게 연결된 인간 인슐린을 인코딩하는 유전자 작제물을 포함하는 AAV1-CAG-hIns이다. 임의로, 유전자 작제물은 토끼 β-글로빈 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함한다.
- [0107] 조성물
- [0108] 추가의 측면에서, 본원에 기재된 유전자 작제물 및/또는 본원에 기재된 바이러스 벡터를 임의로 하나 이상의 약

제약적으로 허용되는 성분과 함께 포함하는 조성물이 제공된다. 바람직하게는, 본원에 기재된 조성물은 약제로서 사용하기 위한 것이다. 바람직하게는, 본원에 기재된 조성물은 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 것이다. 바람직하게는, 일부 구현예에서, 조성물은 약제학적 조성물이다. 본원에 기재된 바와 같은 이러한 조성물은 유전자 요법 조성물로 지칭될 수도 있다.

[0109] 본원에 사용된 "약제학적으로 허용되는 성분"은 약제학적으로 허용되는 담체, 충전제, 방부제, 가용화제, 비히클(vehicle), 희석제 및/또는 부형제를 포함할 수 있다. 따라서, 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 성분은 약제학적으로 허용되는 담체, 충전제, 방부제, 가용화제, 비히클, 희석제 및/또는 부형제로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 이러한 약제학적으로 허용되는 담체, 충전제, 방부제, 가용화제, 비히클, 희석제 및/또는 부형제는, 예를 들어, 문헌[참조: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd edition, Pharmaceutical Press (2013)]에서 발견될 수 있다.

[0110] 추가의 화합물이 본 발명의 조성물에 존재할 수 있다. 상기 화합물은 조성물의 전달에 도움이 될 수 있다. 이러한 맥락에서 적합한 화합물은 세포막을 통해 소포 또는 리포솜에 복합체화되거나 포획된 본원에 기재된 각 성분을 전달하는 복합체, 나노입자, 미셀 및/또는 리포솜을 형성할 수 있는 화합물이다. 이들 화합물 중 다수는 당업계에 공지되어 있다. 적합한 화합물은 폴리에틸렌이민(PEI), 또는 폴리프로필렌이민 또는 폴리에틸렌이민 공중합체(PEC) 및 유도체를 포함하는 유사한 양이온성 중합체; 합성 양친매성 물질(SAINT-18); 리포펙틴™; DOTAP를 포함한다. 당업자는 어느 유형의 제형이 본원에 기재된 조성물에 가장 적합한지를 알 것이다.

[0111] 방법 및 용도

[0112] 추가의 측면에서, 약제로서 사용하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 작제물이 제공된다. 약제로서 사용하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 발현 벡터가 추가로 제공된다. 약제로서 사용하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 약제학적 조성물이 추가로 제공된다. 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 작제물도 제공된다. 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 발현 벡터가 추가로 제공된다. 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 약제학적 조성물이 추가로 제공된다.

[0113] 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 기재된 유전자 작제물 및/또는 본원에 기재된 발현 벡터 및/또는 본원에 기재된 약제학적 조성물은 신경염증의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 것이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 유전자 작제물 및/또는 본원에 기재된 발현 벡터 및/또는 본원에 기재된 약제학적 조성물은 신경퇴행의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 것이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 유전자 작제물 및/또는 본원에 기재된 발현 벡터 및/또는 본원에 기재된 약제학적 조성물은 인지 저하의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 것이다. 본 발명의 맥락에서, "신경염증", "신경퇴행" 및 "인지 저하"는 각각 "신경염증 또는 이와 관련된 질환 또는 상태", "신경퇴행 또는 이와 관련된 질환 또는 상태" 및 "인지 저하 또는 이와 관련된 질환 또는 상태"로 대체될 수 있다.

[0114] 일부 구현예에서, 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하와 관련된 질환 또는 상태는 인지 장애, 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전두측두엽 치매(FTD), 파킨슨병, 파킨슨-유사 질환, 파킨슨증, 헌팅턴병, 외상성 뇌 손상, 프리온병, HIV 감염으로 인한 치매/신경인지 문제, 노화에 따른 치매/신경인지 문제, 타우병증, 다발성 경화증 및 기타 신경염증성/신경퇴행성 질환일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하와 관련된 질환 또는 상태는 알츠하이머병, 파킨슨병 및/또는 파킨슨-유사 질환, 바람직하게는 알츠하이머병 및/또는 파킨슨병일 수 있다.

[0115] 따라서, 본원에 기재된 유전자 작제물 및/또는 본원에 기재된 발현 벡터 및/또는 본원에 기재된 약제학적 조성물은 항신경염증성 약제, 항신경퇴행성 약제 및/또는 항인지 저하 약제로서 간주될 수 있다. 따라서, 그것은 또한 노화 방지제로서 간주될 수 있다.

[0116] 본원에 개시된 구현예는 또한 임의의 전술한 상태와 관련된 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하를 치료 및/또는 예방하는 데 사용될 수 있다.

[0117] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같이 사용하기 위한 유전자 작제물 및/또는 사용하기 위한 발현 벡터 및/

또는 사용하기 위한 약제학적 조성물은 CNS, 바람직하게는 뇌에서 유전자 작제물의 발현을 포함한다.

- [0118] 바람직하게는, 일부 구현예에 따르면, 본원에 기재된 바와 같이 사용하기 위한 유전자 작제물 및/또는 사용하기 위한 발현 벡터 및/또는 사용하기 위한 약제학적 조성물은 CSF내 투여에 의해 투여된다.
- [0119] 추가의 측면에서, 본원에 기재된 유전자 작제물, 발현 벡터, 또는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법이 제공된다. 바람직하게는, 치료 방법은 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방을 위한 것이다. 일부 구현예에서, 유전자 작제물, 발현 벡터 또는 약제학적 조성물을 투여하는 것은 치료학적 유효량의 유전자 작제물, 발현 벡터 또는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 의미한다.
- [0120] 추가의 측면에서, 약제를 제조하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 작제물, 발현 벡터 또는 약제학적 조성물의 용도가 제공된다. 바람직하게는, 일부 구현예에서, 상기 약제는 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 것이다.
- [0121] 추가의 측면에서, 의학적 치료를 위한, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 작제물, 발현 벡터 또는 약제학적 조성물의 용도가 제공된다. 바람직하게는, 일부 구현예에서, 상기 의학적 치료는 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태의 치료 및/또는 예방이다.
- [0122] 다른 측면에서, 대상체에서 기억 및/또는 학습을 개선하기 위한 방법이 제공되며, 상기 방법은 본원에 기재된 유전자 작제물 및/또는 본원에 기재된 발현 벡터 및/또는 본원에 기재된 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 유효량의 유전자 작제물, 발현 벡터 또는 조성물이 투여된다. 본원에서 사용된 "유효량"은 유익하거나 목적하는 결과를 발휘하기에 충분한 양이다. 바람직한 구현예에서, 치료되는 대상체는 노인 대상체 및/또는 대사 장애 또는 질환, 바람직하게는 비만 및/또는 당뇨병으로 진단된 대상체이다. 일부 구현예에서, 기억은 인식 및/또는 회상 기억, 바람직하게는 인식 기억일 수 있다. 일부 구현예에서, 기억은 감각 기억; 단기 기억 및/또는 장기 기억일 수 있고, 바람직하게는 단기 기억 및/또는 장기 기억일 수 있다. 일부 구현예에서, 기억은 암시적(또는 절차적) 및/또는 명시적(또는 선언적) 기억일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 기억은 또한 공간 기억에 기인할 수 있다. 일부 구현예에서, 학습은 공간 학습일 수 있다. 상이한 유형의 기억에 대한 추가의 설명은 "일반 정보"라는 표제 섹션에 포함되어 있다.
- [0123] 사용하기 위한 유전자 작제물, 사용하기 위한 발현 벡터, 사용하기 위한 조성물, 본 발명에 따르는 방법 및 용도에 따른 바람직한 구현예에서, 치료되는 대상체는 노인 대상체 및/또는 대사 장애 또는 질환으로 진단된 대상체이다. 즉, 일부 구현예에서, 사용하기 위한 유전자 작제물, 사용하기 위한 발현 벡터, 사용하기 위한 조성물, 본 발명에 따르는 방법 및 용도에 따른 일부 구현예에서, 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태는 노화 및/또는 대사 장애 또는 질환과 관련되고/되거나 이에 의해 유발된다. 대사 장애 또는 질환의 합병증도 포함될 수 있다.
- [0124] 본원에 사용된 노인 대상체는 바람직하게는 50세 이상, 바람직하게는 55세 이상, 보다 바람직하게는 60세 이상, 가장 바람직하게는 65세 이상의 대상체를 의미할 수 있다.
- [0125] 사용하기 위한 유전자 작제물, 사용하기 위한 발현 벡터, 사용하기 위한 조성물, 본 발명에 따르는 방법 및 용도에 따르는 다른 구현예에서, 치료되는 대상체는 노인 대상체가 아니고/아니거나 50세 이하, 45세 이하, 40세 이하, 35세 이하, 30세 이하, 25세 이하의 대상체이다.
- [0126] 사용하기 위한 유전자 작제물, 사용하기 위한 발현 벡터, 사용하기 위한 조성물, 본 발명에 따르는 방법 및 용도에 따른 다른 구현예에서, 치료되는 대상체는 대사 장애 또는 질환으로 진단되지 않은 대상체이다. 즉, 사용하기 위한 유전자 작제물, 사용하기 위한 발현 벡터, 사용하기 위한 조성물, 본 발명에 따르는 방법 및 용도에 따르는 일부 구현예에서, 중추 신경계 장애 또는 질환, 또는 이와 관련된 상태는 노화 및/또는 대사 장애 또는 질환과 관련되지 않고/않거나 이에 의해 유발되지 않는다.
- [0127] 대사 장애 및 질환은 대사 증후군(metabolic syndrome), 당뇨병, 비만, 비만 관련 합병증(obesity-related comorbidity), 당뇨병 관련 합병증(diabetes-related comorbidity), 고혈당(hyperglycaemia), 인슐린 저항성(insulin resistance), 글루코스 불내성(glucose intolerance), 간 지방증(hepatic steatosis), 알콜성 간 질환(alcoholic liver diseases; ALD), 비알콜성 지방 간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD), 비알콜성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis; NASH), 관상동맥 심장 질환(coronary heart disease; CHD), 고지혈증(hyperlipidemia), 아테롬성 동맥경화증(atherosclerosis), 내분비병증(endocrinopathies), 골육종성 비만 증후군(osteosarcopenic obesity syndrome; OSO), 당뇨병성 신증(diabetic nephropathy), 만성 신장 질환

(chronic kidney disease; CKD), 심장 비대(cardiac hypertrophy), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy), 당뇨병성 신증, 당뇨병성 신경병증(diabetic neuropathy), 관절염(arthritis), 패혈증(sepsis), 눈 혈관신생(ocular neovascularization), 신경퇴행, 치매를 포함할 수 있고, 또한 우울증(depression), 선종(adenoma), 암종(carcinoma)을 포함할 수 있다. 당뇨병은 전당뇨병(prediabetes), 고혈당, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 젊은 성인의 성숙 발병 당뇨병(maturity-onset diabetes of the young; MODY), 단일유전자형 당뇨병(monogenic diabetes), 신생아 당뇨병(neonatal diabetes), 임신성 당뇨병(gestational diabetes), 취성 당뇨병(brittle diabetes), 특발성 당뇨병(idiopathic diabetes), 약물 또는 화학 물질 유발 당뇨병(drug- or chemical-induced diabetes), 강직 인간 증후군(Stiff-man syndrome), 지방 위축성 당뇨병(lipoatrophic diabetes), 성인의 잠재성 자가면역 당뇨병(latent autoimmune diabetes in adults; LADA)을 포함한다. 비만은 과체중(overweight), 중추/상반신 비만(central/upper body obesity), 말초/하반신 비만(peripheral/lower body obesity), 병적 비만(morbid obesity), 골육종성 비만 증후군(OSO), 소아 비만(pediatric obesity), 멘델 (단일유전자) 증후군성 비만(Mendelian (monogenic) syndromic obesity), 멘델 비증후군성 비만(Mendelian non-syndromic obesity), 다유전자성 비만(polygenic obesity)을 포함할 수 있다. 바람직한 대사 장애 또는 질환은 비만 및/또는 당뇨병이다.

[0128] 사용하기 위한 유전자 작제물, 사용하기 위한 발현 벡터, 사용하기 위한 조성물, 본 발명에 따르는 방법 및 용도에 따르는 일부 구현예에서, 치료되는 대상체는 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 저하, 또는 이와 관련된 질환 또는 상태가 발병할 위험이 있는 대상체이다.

[0129] 사용하기 위한 유전자 작제물, 사용하기 위한 발현 벡터, 사용하기 위한 약제학적 조성물, 본 발명에 따르는 방법 및 용도의 맥락 내에서, 요법 및/또는 치료 및/또는 약제는 CNS, 바람직하게는 뇌에서 유전자 작제물의 발현을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CNS 및/또는 뇌 이외의 다른 조직에서 검출 가능한 발현은 없다. 일부 구현예에서, 뇌에서 유전자 작제물의 발현은 시상하부 및/또는 피질 및/또는 해마 및/또는 소뇌 및/또는 후각 망울에서 유전자 작제물의 발현을 의미할 수 있다. 따라서, 뇌에서 유전자 작제물의 발현은 시상하부, 피질, 해마, 소뇌 및 후각 망울로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개 또는 모든 뇌 영역에서 유전자 작제물의 발현을 의미할 수 있다. 일부 구현예에서, CNS 및/또는 뇌에서 발현은 CNS 및/또는 뇌에서의 특이적 발현을 의미할 수 있다. 한 구현예에서, 발현은 간, 췌장, 지방 조직, 골격근, 심장, 신장, 결장, 조혈 조직, 폐, 난소, 비장, 위 및/또는 고환에서 검출될 수 없다. 바람직한 구현예에서, 발현은 간 및/또는 심장에서 검출될 수 없다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 발현은 골격근에서 검출될 수 없다. 일부 구현예에서, 발현은 간, 췌장, 지방 조직, 골격근, 심장, 신장, 결장, 조혈 조직, 폐, 난소, 비장, 위, 고환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 모두 기관에서의 발현을 포함하지 않는다. CNS 및/또는 뇌 특이적 발현에 대한 설명은 "일반 정보"라는 표제 섹션하에 제공되어 있다.

[0130] 발현은 "일반 정보"라는 표제 섹션하에 기재된 바와 같은 qPCR, 웨스턴 블롯 분석 또는 ELISA와 같은 기술을 사용하여 평가될 수 있다. "CNS", "뇌", "시상하부", "해마", "소뇌", "피질" 및 "후각 망울"에 대한 설명은 "일반 정보"라는 표제 섹션하에 제공되어 있다.

[0131] 사용하기 위한 유전자 작제물, 사용하기 위한 발현 벡터, 사용하기 위한 약제학적 조성물, 본 발명에 따르는 방법 및 용도의 맥락 내에서, 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 약제학적 조성물 및/또는 약제는 CSF(뇌척수액)내 투여에 의해 (대조, 척수강내 또는 뇌실내 전달을 통해) 투여될 수 있다. 바람직한 투여 방식, 임의로 인간에서의 바람직한 투여 방식은 뇌실내이다.

[0132] 사용하기 위한 유전자 작제물, 사용하기 위한 발현 벡터, 사용하기 위한 약제학적 조성물, 본 발명에 따르는 방법 및 용도의 맥락 내에서, 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 약제학적 조성물 및/또는 약제는 실질내 투여에 의해 투여될 수 있다.

[0133] 사용하기 위한 유전자 작제물, 사용하기 위한 발현 벡터, 사용하기 위한 약제학적 조성물, 본 발명에 따르는 방법 및 용도의 맥락 내에서, 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 약제학적 조성물 및/또는 약제는 비강내 투여에 의해 투여될 수 있다.

[0134] 본원에 사용된 바와 같이, "CSF내 투여", "비강내 투여", "뇌실질내 투여", "대조내 투여", "척수강내 투여" 및 "뇌실내 투여"는 "일반 정보"로 표제된 본 출원의 일부에 기재되어 있다.

[0135] 바람직한 구현예에서, 본원에 기재된 치료 또는 요법 또는 약제의 사용 또는 투여는 반복될 필요가 없다. 일부

구현예에서, 본원에 기재된 치료 또는 요법 또는 약제의 사용 또는 투여는 나열된 값 중 임의의 둘 사이의 간격을 포함하여 매년 또는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10년 마다 반복될 수 있다.

- [0136] 치료되는 대상체는 고급 포유동물, 예를 들어, 고양이, 설치류, (바람직하게는 마우스, 래트, 저빌 및 기니 피그, 보다 바람직하게는 마우스 및 래트), 개, 또는 인간일 수 있다.
- [0137] 사용하기 위한 유전자 작제물, 사용하기 위한 발현 벡터, 사용하기 위한 약제학적 조성물, 본 발명에 따르는 방법 및 용도의 맥락 내에서, 본원에 기재된 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 약제학적 조성물 및/또는 약제는 바람직하게는 하기 중 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 전부를 나타낸다:
- [0138] - 신경염증의 감소;
- [0139] - 신경발생의 증가;
- [0140] - 성상세포 수의 증가;
- [0141] - 신경퇴행의 감소;
- [0142] - 증상의 완화(본원에서 이후에 기재된 바와 같음); 및
- [0143] - 매개변수의 개선(본원에서 이후에 기재된 바와 같음).
- [0144] 신경염증의 감소는 신경 조직의 염증이 감소된다는 것을 의미할 수 있다. 이는, 예를 들어, 실험 부분에서 수행되는 바와 같이 (신경)염증성 마커의 측정과 같은 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 평가될 수 있다. 이와 관련하여 사용될 수 있는 예시적인 마커는 II-1b, II-6 및 NfκB이다. 이러한 맥락에서, "감소하다"(각각 "개선")는 당업자에게 공지된 검정, 예를 들어, 실험 부분에서 수행된 바와 같은 검정을 사용하는 적어도 검출 가능한 감소(각각 검출 가능한 개선)를 의미한다. 감소는 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 100%의 감소일 수 있다. 감소는 본 발명의 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 조성물을 사용하는 적어도 1주일, 1개월, 6개월, 1년 이상의 치료 후에 나타날 수 있다. 바람직하게는, 감소는 단일 투여 후에 관찰된다. 일부 구현예에서, 감소는 바람직하게는 단일 투여 후 적어도 1주일, 1개월, 6개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 12년, 15년, 20년 이상의 지속 기간 동안 관찰된다.
- [0145] 신경발생의 증가는 뉴런이 신경 줄기 세포에 의해 생성된다는 것을 의미할 수 있다. 이는, 예를 들어, 실험 부분에서 수행되는 바와 같이, 신경발생 마커의 측정과 같은 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 평가될 수 있다. 이와 관련하여 사용될 수 있는 예시적인 마커는 Dcx, Ncam 및 Sox2이다. 이러한 맥락에서, "증가하다"(각각 "개선")는 당업자에게 공지된 검정, 예를 들어, 실험 부분에서 수행된 바와 같은 검정을 사용하는 적어도 검출 가능한 증가(각각 검출 가능한 개선)를 의미한다. 감소는 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 100%의 감소일 수 있다. 증가는 본 발명의 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 조성물을 사용하는 적어도 1주일, 1개월, 6개월, 1년 이상의 치료 후에 나타날 수 있다. 바람직하게는, 증가는 단일 투여 후에 관찰된다. 일부 구현예에서, 증가는 바람직하게는 단일 투여 후 적어도 1주일, 1개월, 6개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 12년, 15년, 20년 이상의 지속 기간 동안 관찰된다.
- [0146] 성상세포의 수가 증가하는 것은 성상세포의 수가 증가된다는 것을 의미할 수 있다. 이는, 예를 들어, 실험 부분에서 수행되는 바와 같이, 성상세포 마커의 측정과 같은 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 평가될 수 있다. 이와 관련하여 사용될 수 있는 예시적인 마커는 Gfap 및 S100b이다. 이러한 맥락에서, "증가하다"(각각 "개선")는 당업자에게 공지된 검정, 예를 들어, 실험 부분에서 수행된 바와 같은 검정을 사용하는 적어도 검출 가능한 증가(각각 검출 가능한 개선)를 의미한다. 감소는 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 100%의 감소일 수 있다. 증가는 본 발명의 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 조성물을 사용하는 적어도 1주일, 1개월, 6개월, 1년 이상의 치료 후에 나타날 수 있다. 바람직하게는, 증가는 단일 투여 후에 관찰된다. 일부 구현예에서, 증가는 바람직하게는 단일 투여 후 적어도 1주일, 1개월, 6개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 12년, 15년, 20년 이상의 지속 기간 동안 관찰된다.
- [0147] 신경퇴행의 감소는 뉴런의 사망을 포함하여 뉴런의 구조 또는 기능의 손실이 감소된다는 것을 의미할 수 있다. 이는 면역세포화학, 면역조직화학과 같은 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 MRI와 같은 의료 영상 기술에 의해 뉴런 형태 및 시냅스 변성을 연구함으로써 (시냅스에 위치한 단백질의 밀도를 측정함으로써) 또는 일부 노화

및 신경퇴행 마커의 발현 수준을 분석함으로써 평가될 수 있다. 이러한 맥락에서, "감소하다"(각각 "개선")는 당업자에게 공지된 검정, 예를 들어, 실험 부분에서 수행된 바와 같은 검정을 사용하는 적어도 검출 가능한 감소(각각 검출 가능한 개선)를 의미한다. 감소는 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 100%의 감소일 수 있다. 증가는 본 발명의 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 조성물을 사용하는 적어도 1주일, 1개월, 6개월, 1년 이상의 치료 후에 나타날 수 있다. 바람직하게는, 증가는 단일 투여 후에 관찰된다. 일부 구현예에서, 증가는 바람직하게는 단일 투여 후 적어도 1주일, 1개월, 6개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 12년, 15년, 20년 이상의 지속 기간 동안 관찰된다.

[0148] 증상의 완화는 전형적인 증상(예: 신경염증, 신경퇴행, 인지 저하, 기억 상실, 학습 능력 저하, 시냅스 상실, tau 인산화)의 진행이 의사가 평가한 바와 같이 개체, 상기 개체의 세포, 조직 또는 기관에서 속도가 지연되었음을 의미할 수 있다. 전형적인 증상의 감소는 증상 발달의 진행의 지연 또는 증상의 완전한 소실을 의미할 수 있다. 증상, 및 따라서 증상의 감소는 임상 검사 및 일상적인 실험실 테스트를 포함하여 신경염증, 신경퇴행, 인지 저하 및 이와 관련된 질환의 진단에 사용되는 것과 거의 동일한 방법으로 다양한 방법을 사용하여 평가할 수 있다. 임상 검사에는 거동 테스트와 인지 테스트가 포함될 수 있다. 실험실 테스트는 거시적 및 미시적 방법, 분자 방법, X-선과 같은 방사선학적 방법, 생화학적 방법, 면역조직화학적 방법 등을 포함할 수 있다. 기억과 학습은, 예를 들어, 실험 부분에서 기재된 바와 같이, 예를 들어, 새로운 물체 인식 테스트 및/또는 모리스 물 미로 테스트에 의해 마우스에서 평가될 수 있다. 증상의 완화는 본 발명의 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 조성물을 사용한 적어도 1주일, 1개월, 6개월, 1년 이상의 치료 후에 나타날 수 있다. 바람직하게는, 완화는 단일 투여 후에 관찰된다. 일부 구현예에서, 완화는 바람직하게는 단일 투여 후 적어도 1주일, 1개월, 6개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 12년, 15년, 20년 이상의 지속 기간 동안 관찰된다.

[0149] 매개변수의 개선은 거동 테스트 후 결과의 개선, 혈청 및 CSF 마커의 발현의 개선, 아픔토시스/신경발생 세포 마커의 발현의 개선 등을 의미할 수 있다. 매개변수의 개선은 본 발명의 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 조성물을 사용하는 적어도 1주일, 1개월, 6개월, 1년 이상의 치료 후에 나타날 수 있다. 바람직하게는, 개선은 단일 투여 후에 관찰된다. 일부 구현예에서, 개선은 바람직하게는 단일 투여 후 적어도 1주일, 1개월, 6개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 12년, 15년, 20년 이상의 지속 기간 동안 관찰된다.

[0150] 사용하기 위한 유전자 작제물, 사용하기 위한 발현 벡터, 사용하기 위한 약제학적 조성물, 본 발명에 따르는 방법 및 용도의 맥락 내에서, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 약제학적 조성물은 바람직하게는 개체, 상기 개체의 세포, 조직 또는 기관에서 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 장애, 또는 이와 관련된 질환의 하나 이상의 증상(들)을 완화하거나, 상기 개체의 세포, 조직 또는 기관의 하나 이상의 특징(들) 또는 증상(들)을 완화시킨다.

[0151] 본원에 기재된 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 약제학적 조성물은 바람직하게는 본 발명의 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 조성물을 사용하는 적어도 1주일, 1개월, 6개월, 1년 이상의 치료 후에 본원에 기재된 바와 같이, 상기 증상 또는 특징이 감소된 경우(예: 더 이상 검출될 수 없거나 지연된 경우) 환자의 또는 상기 환자의 세포, 조직 또는 기관의 증상 또는 특징을 완화시킬 수 있다.

[0152] 본원에 기재된 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 약제학적 조성물 및/또는 약제는 me 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 장애, 또는 이와 관련된 질환에 의해 영향을 받거나 이를 발병시킬 위험에 있는 개체의 생체내 세포, 조직 및/또는 기관에 투여하기에 적합할 수 있고, 생체내, 생체외 또는 시험관내로 투여될 수 있다. 상기 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 약제학적 조성물 및/또는 약제는 신경염증, 신경퇴행 및/또는 인지 장애, 또는 이와 관련된 질환에 의해 영향을 받거나 이를 발병시킬 위험에 있는 개체의 생체내 세포, 조직 및/또는 기관에 직접 또는 간접적으로 투여될 수 있고, 생체내, 생체외 또는 시험관내에서 직접 또는 간접적으로 투여될 수 있다.

[0153] 투여 방식은 정맥내, 근육내, 척수강내, 뇌실내, 복강내, 흡입, 비강내, 안내 및/또는 실질내 투여일 수 있다. 바람직한 투여 방식은 비강내, 실질내 및 CSF내(대조, 척수강내 또는 뇌실내 전달을 통해) 투여이다. CSF내 투여가 가장 바람직하다. 바람직한 투여 방식, 임의로 인간에서의 바람직한 투여 방식은 뇌실내이다.

[0154] 본 발명의 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 조성물 및/또는 약제는 당업계에 공지된 적절한 수단을 사용하여 직접 또는 간접적으로 투여될 수 있다. 이미 지금까지 달성된 진행을 고려하여, 개체 또는 상기 개체의

세포, 조직, 기관에 본 발명의 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 조성물 및/또는 약제를 제공하기 위한 수단의 개선이 예상된다. 본 발명의 언급된 효과를 달성하기 위해 이러한 미래의 개선이 물론 포함될 수 있다. 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 조성물 및/또는 약제는 개체, 상기 개체의 세포, 조직 또는 기관에 그대로 전달될 수 있다. 질환 또는 상태에 따라, 상기 개체의 세포, 조직 또는 기관은 본원에서 전술한 바와 같을 수 있다. 본 발명의 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 조성물 및/또는 약제를 투여하는 경우, 이러한 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 조성물 및/또는 약제를 전달 방법에 적합한 용액에 용해시키는 것이 바람직하다.

[0155] 본원에 포함되는 바와 같이, 전술한 바와 같은 치료학적 유효량의 유전자 작제물 및/또는 발현 벡터 및/또는 조성물은 바람직하게는 단일의 고유 투여량으로 투여되고, 따라서 반복되는 주기적 투여를 피한다.

[0156] 일반 정보

[0157] 달리 명시되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 관례적으로 그리고 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖고, 본 개시내용의 관점에서 판독된다.

[0158] 서열 동일성/유사성

[0159] 본 발명의 맥락에서, 인슐린을 인코딩하는 핵산 분자와 같은 핵산 분자는 단백질 단편 또는 폴리펩티드 또는 펩티드 또는 유도된 펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열로 표시된다. 본 발명의 맥락에서, 인슐린 단백질 단편 또는 폴리펩티드 또는 펩티드 또는 유도된 펩티드는 아미노산 서열로 표시된다.

[0160] 소정의 서열 동일성 번호(서열번호)에 의해 본원에서 동정된 각각의 핵산 분자 또는 단백질 단편 또는 폴리펩티드 또는 펩티드 또는 유도된 펩티드 또는 작제물은 개시된 이러한 특정 서열에 제한되지 않는 것으로 이해해야 한다. 본원에서 동정된 각각의 코딩 서열은 소정의 단백질 단편 또는 폴리펩티드 또는 펩티드 또는 유도된 펩티드 또는 작제물을 인코딩하거나, 그 자체가 단백질 단편 또는 폴리펩티드 또는 작제물 또는 펩티드 또는 유도된 펩티드이다. 본 출원 전반에 걸쳐, 소정의 단백질 단편 또는 폴리펩티드 또는 펩티드 또는 유도된 펩티드를 인코딩하는 서열번호(예로서, 서열번호 X를 취함)의 특정 뉴클레오티드 서열을 참조할 때마다, 이를 다음으로 대체할 수 있다:

[0161] i. 서열번호 X와 적어도 60% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열;

[0162] ii. 유전 코드의 축퇴로 인해 서열이 (i)의 핵산 분자의 서열과 다른 뉴클레오티드 서열; 또는

[0163] iii. 서열번호 X의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 아미노산 서열과 적어도 60% 아미노산 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열.

[0164] 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 70%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 80%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 90%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 95%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 99%이다.

[0165] 본 출원 전반에 걸쳐, 서열번호(예로서, 서열번호 Y를 취함)의 특정 아미노산 서열을 참조할 때마다, 이를 서열번호 Y의 아미노산 서열과 적어도 60% 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로 대체할 수 있다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 70%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 80%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 90%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 95%이다. 서열 동일성 또는 유사성의 또 다른 바람직한 수준은 99%이다.

[0166] 소정의 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열과의 동일성 또는 유사성 백분율에 의해 본원에 기재된 각각의 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열은 각각 추가의 바람직한 구현예에서 각각 소정의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성 또는 유사성을 갖는다.

[0167] 각각의 비코딩된 뉴클레오티드 서열(즉, 프로모터 또는 다른 조절 영역의)은 서열번호(예로서 서열번호 A를 취

함)의 특정 뉴클레오타이드 서열과 적어도 60% 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 대체될 수 있다. 바람직한 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 A와 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다. 바람직한 구현예에서, 프로모터와 같은 이러한 비코딩 뉴클레오타이드 서열은 적어도 당업자에게 공지된 바와 같은 프로모터의 활성화와 같은 이러한 비코딩 뉴클레오타이드 서열의 활성을 나타내거나 발휘한다. 예를 들어, 이러한 활성은 인슐린 코딩 서열과 같은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 뉴클레오타이드 서열의 검출 가능한 발현을 유도한다.

[0168] 용어 "상동성", "서열 동일성", "동일성" 등은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 서열 동일성은 본원에서 서열을 비교함으로써 결정된 바와 같이, 2개 이상의 아미노산 서열(펩티드 또는 폴리펩티드 또는 단백질) 또는 2개 이상의 핵산 서열(폴리뉴클레오타이드) 사이의 관계로서 기재되어 있다. 2개의 아미노산 서열 사이의 "유사성" 또는 "서열 유사성"은 아미노산 서열과 이의 하나의 폴리펩티드의 보존된 아미노산 치환체를 제2 폴리펩티드의 서열과 비교함으로써 결정된다. "동일성" 및 "유사성"은 문헌(참조: Bioinformatics and the Cell: Modern Computational Approaches in Genomics, Proteomics and transcriptomics, Xia X., Springer International Publishing, New York, 2018; 및 Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis, Mount D., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2004)에 기재되어 있는 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는 공지된 방법에 의해 쉽게 계산될 수 있다.

[0169] 서열 동일성 또는 유사성은 2개의 소정의 서열번호의 전장(full length) 또는 이의 일부에 기초하여 계산될 수 있다. 일부 구현예에서, 이의 일부는 두 서열번호의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%를 의미한다. 바람직한 구현예에서, 서열 동일성 또는 유사성은 본원에서 동정된 서열의 전체 길이를 비교함으로써 결정된다. 본원에서 달리 지시되지 않는 한, 소정의 서열번호와의 동일성 또는 유사성은 상기 서열의 전장에 기초한 (즉, 전체 길이에 걸쳐 또는 전체로서) 동일성 또는 유사성을 의미한다. 당업계에서, "동일성"은 또한 경우에 따라 이러한 서열의 스트링 사이의 일치에 의해 결정되는 아미노산 또는 뉴클레오타이드 사열 사이의 서열 관련성의 정도를 지칭한다.

[0170] 서열 동일성 또는 유사성은 2개의 서열의 길이에 따라 글로벌 또는 로컬 정렬 알고리즘을 사용하는 2개의 펩티드 또는 2개의 뉴클레오타이드 서열의 정렬에 의해 결정될 수 있다. 유사한 길이의 서열은 바람직하게는 전체 길이에 걸쳐 서열을 최적으로 정렬시키는 글로벌 정렬 알고리즘(예를 들어, 니들맨-분쉬(Needleman-Wunsch))를 사용하여 정렬되는 반면, 실질적으로 상이한 길이의 서열은 바람직하게는 로컬 정렬 알고리즘(예: 스미스-워터맨(Smith-Waterman))을 사용하여 정렬된다. 이어서, 서열은 그들이 (예를 들어, 기본 매개변수를 사용하는 프로그램 EMBOSS 바늘 또는 EMBOSS 물에 의해 최적으로 정렬되는 경우) 서열 동일성 또는 유사성(이하 기재되는 바와 같음)의 적어도 특정 최소 백분율을 공유하는 경우 "실질적으로 동일한" 또는 "본질적으로 유사한"으로 지칭될 수 있다.

[0171] 글로벌 정렬은 두 서열이 유사한 길이를 갖는 경우 서열 동일성 또는 유사성을 결정하는 데 적절하게 사용된다. 서열이 실질적으로 상이한 전체 길이를 갖는 경우, 스미스-워터맨 알고리즘을 사용하는 것들과 같은 로컬 정렬이 바람직하다. EMBOSS 바늘은 니들맨-분쉬 글로벌 정렬 알고리즘을 사용하여 두 서열을 전체 길이(전장)에 걸쳐 정렬하고 일치 수를 최대화하고 갭(gap) 수를 최소화한다. EMBOSS 물은 스미스-워터맨 로컬 정렬 알고리즘을 사용한다. 일반적으로, EMBOSS 바늘과 EMBOSS 물 기본 매개변수가 갭 오픈 페널티 = 10 (뉴클레오타이드 서열)/10 (단백질) 및 갭 확장 페널티 = 0.5 (뉴클레오타이드 서열)/0.5 (단백질)와 함께 사용될 수 있다. 뉴클레오타이드 서열의 경우, 사용된 기본 스코어링 매트릭스는 DNAsfull이고, 단백질의 경우, 기본 스코어링 매트릭스는 Blosum62이다(Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919).

[0172] 대안적으로 백분율 유사성 또는 동일성은 FASTA, BLAST 등의 알고리즘을 사용하여 공용 데이터베이스에 대해 검색함으로써 결정될 수 있다. 바람직하게는, 기본 매개변수를 변경하지 않고 동종유전자가 또한 사용될 수 있다(<https://en.wikipedia.org/wiki/HomoloGene>). 따라서, 본 발명의 일부 구현예의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은, 예를 들어, 다른 패밀리를 구성원 또는 관련 서열을 동정하기 위해 공용 데이터베이스에 대한 검색을 수행하기 위한 "질의 서열"로서 추가로 사용될 수 있다. 이러한 검색은 문헌(참조: Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10)의 BLASTn 및 BLASTx 프로그램(버전 2.0)을 사용하여 수행될 수 있다. BLAST 뉴클레오타이드 검색은 NBLAST 프로그램, 스코어 = 100, 워드 길이 = 12로 수행하여 본 발명의 핵산 분자에 상동성인, 바

람직하게는 인술린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 수득할 수 있다. BLAST 단백질 검색은 본 발명의 단백질 분자와 상동성인 아미노산 서열을 수득하기 위해 BLASTx 프로그램, 스코어 = 50, 워드 길이 = 3으로 수행될 수 있다. 비교 목적으로 겹쳐 정렬을 수득하기 위해, 문헌(참조: Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402)에 기재된 바와 같이 겹쳐 BLAST가 사용될 수 있다. BLAST 및 겹쳐 BLAST 프로그램을 이용하는 경우, 각각의 프로그램의 기본 매개변수(예: BLASTx 및 BLASTn)가 사용될 수 있다. www.ncbi.nlm.nih.gov/의 월드 와이드 웹을 통해 접근할 수 있는 국립 생명공학 정보 센터의 홈페이지를 참조한다.

[0173] 임의로, 아미노산 유사성의 정도를 결정할 때, 당업자는 또한 소위 보존적 아미노산 치환을 고려할 수 있다.

[0174] 본원에서 사용된 바와 같이, "보존적" 아미노산 치환은 유사한 측쇄를 갖는 잔기의 호환성을 지칭한다. 보존적 치환을 위한 아미노산 잔기의 부류의 예를 하기에 나타낸다.

산성 잔기	Asp (D) 및 Glu (E)
염기성 잔기	Lys (K), Arg (R), 및 His (H)
친수성 비하전 잔기	Ser (S), Thr (T), Asn (N), 및 Gln (Q)
지방족 비하전 잔기	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), 및 Ile (I)
비극성 비하전 잔기	Cys (C), Met (M), 및 Pro (P)
방향족 잔기	Phe (F), Tyr (Y), 및 Trp (W)

[0175]

[0176] 대안적인 보존적 아미노산 잔기 치환 부류는 다음과 같다:

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

[0177]

[0178] 아미노산 잔기의 대안적인 물리적 및 기능적 분류:

알콜 그룹 함유 잔기	S 및 T
지방족 잔기	I, L, V, 및 M
사이클로알케닐 관련 잔기	F, H, W, 및 Y
소수성 잔기	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, 및 Y
음으로 하전된 잔기	D 및 E
극성 잔기	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T
양으로 하전된 잔기	H, K, 및 R
작은 잔기	A, C, D, G, N, P, S, T, 및 V
매우 작은 잔기	A, G, 및 S
회전 형성에 관련된 잔기	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P 및 T
가소성 잔기	Q, T, K, S, G, P, D, E, 및 R

[0179]

[0180] 예를 들어, 지방족 측쇄를 갖는 아미노산 그룹은 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신이고; 지방족 하이드록실 측쇄를 갖는 아미노산 그룹은 세린 및 트레오닌이고; 아미드 함유 측쇄를 갖는 아미노산 그룹은 아스파라긴 및 글루타민이고; 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 그룹은 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판이고; 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 그룹은 리신, 아르기닌 및 히스티딘이고; 황 함유 측쇄를 갖는 아미노산 그룹은 시스테인 및 메티오닌이다. 바람직한 보존적 아미노산 치환 그룹은 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린 및 아스파라긴-글루타민이다. 본원에 개시된 아미노산 서열의 치환 변이체는 개시된 서열 중 적어도 하나의 잔기가 제거되고 그 위치에 상이한 잔기가 삽입된 것들이다. 바람직하게는, 아미노산 변화는 보존적이다. 천연 아미노산 각각의 바람직한 보존적 치환은 다음과 같다: Ala 대 Ser; Arg 대 Lys; Asn 대 Gln 또는 His; Asp 대 Glu; Cys 대 Ser 또는 Ala; Gln 대 Asn; Glu 대 Asp; Gly 대 Pro; His 대 Asn 또는 Gln; Ile 대 Leu 또는 Val; Leu 대 Ile 또는 Val; Lys 대 Arg; Gln 또는 Glu; Met 대 Leu 또는 Ile; Phe 대 Met, Leu 또는 Tyr; Ser 대 Thr; Thr 대 Ser; Trp 대 Tyr; Tyr 대 Trp 또는 Phe; 및 Val 대 Ile 또는 Leu.

[0181] 유전자 또는 코딩 서열

[0182] "유전자"는 기능을 갖는 분자를 코딩하는 DNA 또는 RNA의 뉴클레오타이드 서열이다. 뉴클레오타이드 서열은 "비코딩 서열" 및 "코딩 서열"을 포함할 수 있다. (코딩 서열로부터) CDS로도 공지된 "유전자"의 코딩 영역은 단백질을 코딩하는 유전자의 DNA 또는 RNA의 일부이다. 비코딩 서열의 예는 본원의 다른 곳에 기재된 프로모터 및 microRNA 표적 서열이다. 용어 "유전자"는 적절한 조절 영역(예: 프로모터)에 작동 가능하게 연결된 세포 내의 RNA 분자(예: mRNA)로 전사되는 영역(전사된 영역)을 포함하는 DNA 단편을 의미한다. 유전자는 일반적으로, 예를 들어, 폴리아데닐화 및/또는 전사 종결 부위를 포함하는 프로모터, 5' 리더 서열, 코딩 영역 및 3'-비번역 서열(3'-말단)과 같은 다수의 작동 가능하게 연결된 단편을 포함한다. 키메라 또는 재조합 유전자(예: 키메라 또는 재조합 인슐린 유전자)는 일반적으로 자연에서 발견되지 않는 유전자, 예를 들어, 프로모터가 전사된 DNA 영역의 일부 또는 전부와 본질적으로 관련되지 않는 유전자이다. "유전자의 발현"은 적절한 조절 영역, 특히 프로모터에 작동 가능하게 연결된 DNA 영역이 생물학적으로 활성인, 예를 들어, 생물학적 활성 단백질 또는 펩티드로 번역될 수 있는 RNA로 전사되는 과정을 지칭한다.

[0183] "도입유전자"는 본원에서 세포 내로 새로 도입된 뉴클레오타이드 서열(즉, 인슐린을 인코딩하는 분자)로 표시되는 유전자 또는 코딩 서열 또는 핵산 분자, 즉 존재할 수 있지만, 일반적으로 세포 내에서는 발현되지 않거나 불충분한 수준으로 발현될 수 있는 유전자로서 기재된다. 이러한 맥락에서, "불충분한"은 상기 인슐린이 세포 내에서 발현되지만, 본원에 기재된 상태 및/또는 질환이 여전히 발병될 수 있음을 의미한다. 이 경우, 본 발명은 인슐린의 과발현을 가능하게 한다. 도입유전자는 세포에 고유한 서열, 세포 내에서 자연적으로 발생하지 않는 서열을 포함할 수 있으며, 둘의 조합을 포함할 수 있다. 도입유전자는 세포내 인슐린을 코딩하는 서열의 발현을 위한 적절한 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있는, 본원에서 이전에 동정된 인슐린 및/또는 추가 단백질을 코딩하는 서열을 함유할 수 있다. 바람직하게는, 도입유전자는 숙주 세포의 게놈에 통합되지 않는다.

[0184] 프로모터

[0185] 본원에서 사용되는 용어 "프로모터" 또는 "전사 조절 서열"은 하나 이상의 코딩 서열의 전사를 제어하는 기능을 하며, 코딩 서열의 전사 개시 부위의 전사 방향에 대해 상류에 위치하며, DNA 의존성 RNA 폴리머라제의 결합 부위, 전사 개시 부위, 및 전사 인자 결합 부위, 억제인자 및 활성화제 단백질 결합 부위 및 프로모터로부터 전사의 양을 조절하기 위해 직접 또는 간접적으로 작용하는 것으로 당업자에게 공지되어 있는 임의의 다른 뉴클레오타이드 서열을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 다른 DNA 서열의 존재에 의해 구조적으로 동정되는 핵산 단편을 지칭한다. "구성적" 프로모터는 대부분의 생리적 및 발달 조건하에서 대부분의 조직에서 활성인 프로모터이다. "유도성" 프로모터는 생리적으로 또는 발달적으로 또는 다르게는, 예를 들어, 화학적 유도제의 적용에 의해 조절되는 프로모터이다.

[0186] "유비쿼터스 프로모터"는 유기체의 실질적으로 모든 조직, 기관 및 세포에서 활성이다. 일부 구현예에서, 유비쿼터스 프로모터는 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 상이한 유형의 조직, 기관 및/또는 세포에서 발현을 구동한다.

[0187] "기관 특이적" 또는 "조직 특이적" 프로모터는 각각 특정 유형의 기관 또는 조직에서 활성인 프로모터이다. 기관 특이적 및 조직 특이적 프로모터는 주로 하나의 기관 또는 조직에서 하나의 유전자 (또는 코딩 서열)의 발현을 조절하지만, 다른 기관 또는 조직에서도 검출 가능한 수준("누출")의 발현을 가능하게 할 수 있다. 다른 기관 또는 조직에서의 누출 발현은 당업자에게 공지된 표준 검정(예: qPCR, 웨스턴 블롯 분석, ELISA)에 의해 mRNA 또는 단백질 수준에 대해 평가할 때 기관 특이적 또는 조직 특이적 발현과 비교하여 적어도 1배, 적어

도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배 또는 적어도 10배 낮지만, 여전히 검출 가능한 발현을 의미한다. 누출 발현이 검출될 수 있는 기관 또는 조직의 최대 수는 5, 6, 7 또는 8이다.

[0188] "CNS 및/또는 뇌 특이적 프로모터"는 CNS 및/또는 뇌에서 전사를 개시할 수 있는 한편, 다른 (최대 5, 6, 7, 또는 8개) 기관 및 신체의 일부에서의 임의의 누출 발현을 가능하게 하는 프로모터이다. CNS 및/또는 뇌에서의 전사는 CNS 및/또는 뇌 및/또는 시상하부 및/또는 피질 및/또는 해마 및/또는 소뇌 및/또는 후각 망울과 같은 관련 영역, 및 뉴런 및/또는 신경교 세포와 같은 세포에서 검출될 수 있다.

[0189] 본 발명의 맥락에서, CNS 및/또는 뇌 특이적 프로모터는 다른 기관 또는 조직과 비교하여 CNS 및/또는 뇌에서 인슐린의 우선적 또는 우세한(적어도 10% 높은, 적어도 20% 높은, 적어도 30% 높은, 적어도 40% 높은, 적어도 50% 높은, 적어도 60% 높은, 적어도 70% 높은, 적어도 80% 높은, 적어도 90% 높은, 적어도 100% 높은, 적어도 150% 높은, 적어도 200% 높은 또는 그 이상인) 발현을 구동할 수 있는 프로모터일 수 있다. 다른 기관 또는 조직은 간, 췌장, 지방 조직, 골격근, 심장, 신장, 결장, 조혈 조직, 폐, 난소, 비장, 위, 고환 및 기타일 수 있다. 바람직하게는, 다른 기관은 간 및/또는 심장이다. 다른 기관은 또한 골격근일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, CNS 및/또는 뇌 특이적 프로모터는 또한 CNS 및/또는 뇌의 특정 영역 또는 세포 서브세트에서 발현을 지시하는 프로모터를 포함한다. 따라서, CNS 및/또는 뇌 특이적 프로모터는 또한 해마 특이적 프로모터, 소뇌 특이적 프로모터, 피질 특이적 프로모터, 시상하부 특이적 프로모터 및/또는 후각 망울 특이적 프로모터, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택될 수 있다. 발현은 "일반 정보"라는 표제 색션하에 기재된 바와 같은 qPCR, 웨스턴 블롯 분석 또는 ELISA와 같은 기술을 사용하여 평가될 수 있다.

[0190] 본 출원 전반에 걸쳐, CNS 및/또는 뇌 특이적이 발현의 맥락에서 언급되는 경우, CNS 및/또는 뇌를 구성하는 세포 유형(들)의 세포 유형 특이적 발현이 또한 각각 구상된다.

[0191] 작동 가능하게 연결됨

[0192] 본원에 사용된 용어 "작동 가능하게 연결된"은 기능적 관계에서 폴리뉴클레오티드 요소의 연결을 지칭한다. 핵산은 다른 핵산 분자와의 기능적인 관계에 놓일 때 "작동 가능하게 연결된다". 예를 들어, 전사 조절 서열은 코딩 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다. 작동 가능하게 연결된다는 것은 연결되는 DNA 서열이 전형적으로 인접하고, 2개의 단백질 인코딩 영역을 연결하는 것이 필요한 경우 인접하고 판독 프레임 내에 있음을 의미한다. 연결은 편리한 제한 부위에서 또는 이의 대신에 삽입된 어댑터 또는 링커에서의 절찰에 의해, 또는 유전자 합성에 의해, 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 방법에 의해 달성될 수 있다.

[0193] *microRNA*

[0194] 본원에서 사용되는 바와 같이, "microRNA" 또는 "miRNA" 또는 "miR"은 본 개시내용을 고려하여 당업자에 의해 이해되는 바와 같이 그의 관계적이고 통상적인 의미를 갖는다. microRNA는 식물, 동물 및 일부 바이러스에서 발견되는 작은 비코딩 RNA 분자이며, RNA 침묵 및 유전자 발현의 전사 후 조절에서 기능할 수 있다. microRNA의 표적 서열은 "miRT"로 표시될 수 있다. 예를 들어, microRNA-1 또는 miRNA-1 또는 miR-1의 표적 서열은 miRT-1로 표시될 수 있다.

[0195] 단백질 및 아미노산

[0196] 용어 "단백질" 또는 "폴리펩티드" 또는 "아미노산 서열"은 상호교환적으로 사용되며, 특정 작용 방식, 크기, 3차원 구조 또는 기원에 대한 언급 없이, 아미노산 채로 구성되는 분자를 지칭한다. 본원에 기재된 아미노산 서열에서, 아미노산 또는 "잔기"는 3-문자 기호로 표시된다. 이들 3-문자 기호 및 상응하는 1-문자 기호는 당업자에게 익히 공지되어 있으며, 다음의 의미를 갖는다: A(Ala)는 알라닌, C(Cys)는 시스테인, D(Asp)는 아스파르트산, E(Glu)는 글루탐산, F(Phe)는 페닐알라닌, G(Gly)는 글리신, H(His)는 히스티딘, I(Ile)는 이소류신, K(Lys)는 리신, L(Leu)은 류신, M(Met)은 메티오닌, N(Asn)은 아스파라긴, P(Pro)는 프롤린, Q(Gln)는 글루타민, R(Arg)은 아르기닌, S(Ser)는 세린, T(Thr)는 트레오닌, V(Val)는 발린, W(Trp)는 트립토판, Y(Tyr)는 티로신이다. 잔기는 임의의 단백질 생성 아미노산일 수 있지만, D-아미노산 및 번역후 변형에 의해 형성되는 변형된 아미노산과 같은 임의의 비단백질 생성 아미노산, 및 임의의 비천연 아미노산일 수 있다.

[0197] 유전자 작제물

[0198] 본원에 기재된 유전자 작제물은 당업자에게 공지된 임의의 클로닝 및/또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될

수 있으며, 여기서 상기 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 적절한 세포, 예를 들어, 문헌(참조: Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987) 및 Sambrook and Russell (2001, *supra*); 이들 모두 전문이 본원에 참조로 포함된다)에 기재된 것과 같은 배양된 세포 또는 다세포 유기체의 세포에서 발현된다. 또한, 문헌(Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82:488 (부위 지시된 돌연변이발생을 기술) 및 Roberts *et al.* (1987) Nature 328:731-734 또는 Wells, J.A., *et al.* (1985) Gene 34: 315 (카세트 돌연변이발생을 기술))을 참조한다.

[0199] 발현 벡터

[0200] 용어 "발현 벡터" 또는 "벡터"는 일반적으로 이러한 서열과 호환가능한 숙주에서 유전자 또는 코딩 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 발현 벡터는 안정화되고, 세포 내에 에피솜을 유지할 수 있는 계놈을 보유한다. 본 발명의 맥락 내에서, 세포는 작제물을 제조하는데 사용되는 세포 또는 작제물이 투여될 세포를 포함하는 것을 의미할 수 있다. 대안적으로, 벡터는, 예를 들어, 상동성 재조합 또는 다른 방식을 통해 세포의 계놈에 혼입될 수 있다.

[0201] 이들 발현 벡터는 전형적으로 적어도 적절한 프로모터 서열 및 임의로 전사 종결 신호를 포함한다. 발현을 수행하는 데 필요하거나 도움이 되는 추가 인자가 또한 본원에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다. 인슐린을 인코딩하는 핵산 또는 DNA 또는 뉴클레오티드 서열은 시험관내 세포 배양물로 도입 및 발현될 수 있는 DNA 작제물에 통합된다. 구체적으로, DNA 작제물은 원핵생물 숙주, 예를 들어, 박테리아, 예를 들어, 이. 콜라이(*E. coli*)에서의 복제에 적합하거나 배양된 포유류, 식물, 곤충(예: Sf9), 효모, 진균 또는 다른 진핵 세포주에 도입될 수 있다.

[0202] 특정 숙주로의 도입을 위해 제조된 DNA 작제물은 숙주에 의해 인식되는 복제 시스템, 목적하는 폴리펩티드를 인코딩하는 의도된 DNA 세그먼트, 및 폴리펩티드 인코딩 세그먼트에 작동 가능하게 연결된 전사 및 번역 개시 및 종결 조절 서열을 포함할 수 있다. "작동 가능하게 연결된"이라는 용어는 본원에서 이미 기재되어 있다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사를 자극하는 경우 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다. 신호 서열의 DNA는 폴리펩티드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우, 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA에 작동 가능하게 연결된다. 일반적으로, 작동 가능하게 연결된 DNA 서열은 인접하고, 신호 서열의 경우, 모두 인접하고, 관독 프레임 내에 있다. 그러나, 인핸서는 전사를 제어하는 코딩 서열과 인접할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 부위 또는 이의 대신에 삽입된 어댑터 또는 링커에서 결합에 의해, 또는 유전자 합성에 의해, 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 방법에 의해 달성된다.

[0203] 적합한 프로모터 서열의 선택은 일반적으로 DNA 세그먼트의 발현을 위해 선택된 숙주 세포에 의존한다. 적합한 프로모터 서열의 예는 당업계에 익히 공지된 원핵생물 및 진핵생물 프로모터를 포함한다(참조: 예를 들어, Sambrook and Russell, 2001, 상기). 전사 조절 서열은 전형적으로 숙주에 의해 인식되는 이중성 인핸서 또는 프로모터를 포함한다. 적절한 프로모터의 선택은 숙주에 따라 다르지만, trp, lac 및 파지 프로모터, tRNA 프로모터 및 해당 효소 프로모터와 같은 프로모터가 공지되어 있고 이용 가능하다(참조: 예를 들어, Sambrook and Russell, 2001, 상기). 발현 벡터는 폴리펩티드 인코딩 세그먼트의 삽입 부위와 함께 복제 시스템 및 전사 및 번역 조절 서열을 포함한다. 대부분의 경우, 복제 시스템은 벡터를 제조하는 데 사용되는 세포(이. 콜라이와 같은 박테리아 세포)에서만 기능적이다. 대부분의 플라스미드와 벡터는 벡터로 감염된 세포에서 복제되지 않는다. 세포주 및 발현 벡터의 실행 가능한 조합의 예는 문헌(참조: Sambrook and Russell (2001, 상기) 및 Metzger *et al.* (1988) Nature 334:31-36)에 기재되어 있다. 예를 들어, 적합한 발현 벡터는 효모, 예를 들어, 에스. 세레비지에(*S. cerevisiae*), 곤충 세포, 예를 들어, Sf9 세포, 포유류 세포, 예를 들어, CHO 세포, 및 박테리아 세포, 예를 들어, 이. 콜라이에서 발현될 수 있다. 따라서, 세포는 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포일 수 있다. 세포는 액체 또는 고체 배지에서의 배양에 적합한 세포일 수 있다.

[0204] 대안적으로, 숙주 세포는 유전자도입 식물 또는 동물과 같은 다세포 유기체의 일부인 세포이다.

[0205] 바이러스 벡터

[0206] 바이러스 벡터 또는 바이러스 발현 벡터 또는 바이러스 유전자 요법 벡터는 본원에 기재된 유전자 작제물을 포함하는 벡터이다.

[0207] 바이러스 벡터 또는 바이러스 유전자 요법 벡터는 유전자 요법에 적합한 벡터이다. 유전자 요법에 적합한 벡터는 문헌(참조: Anderson 1998, Nature 392: 25-30; Walther and Stein, 2000, Drugs 60: 249-71; Kay *et al.*, 2001, Nat. Med. 7: 33-40; Russell, 2000, J. Gen. Virol. 81: 2573-604; Amado and Chen, 1999, Science

285: 674-6; Federico, 1999, Curr. Opin. Biotechnol.10: 448-53; Vigna and Naldini, 2000, J. Gene Med. 2: 308-16; Marin *et al.*, 1997, Mol. Med. Today 3: 396-403; Peng and Russell, 1999, Curr. Opin. Biotechnol. 10: 454-7; Sommerfelt, 1999, J. Gen. Virol. 80: 3049-64; Reiser, 2000, Gene Ther. 7: 910-3; 및 이에 인용된 참고문헌)에 기재되어 있다. 유전자 요법 벡터를 기재하는 추가의 참고문헌은 Naldini 2015, Nature 552(7573):351-360; Wang *et al.* 2019 Nat Rev Drug Discov 18(5):358-378; Dunbar *et al.* 2018 Science 359(6372); Lukashey *et al.* 2016 Bioscience (Mosc) 81(7):700-708이다.

[0208] 특히 적합한 유전자 요법 벡터는 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터를 포함한다. 이들 벡터는 활막 세포 및 간 세포를 포함하는 다양한 분열 세포 및 비분열 세포 유형을 감염시킨다. 세포 진입 후 아데노 바이러스 및 AAV 벡터의 에피솜의 특성으로 인해 이들 벡터는 상기 표시된 바와 같은 치료적 용도에 적합하게 된다(참조: Russell, 2000, J. Gen. Virol. 81: 2573-2604; Goncalves, 2005, Virol J. 2(1):43). AAV 벡터가 도입유전자 발현의 매우 안정한 장기 발현을 초래하는 것으로 공지되어 있기 때문에 더욱 바람직하다(개에서는 최대 9년(Niemeyer *et al.*, Blood. 2009 Jan 22;113(4):797-806) 및 인간에서 약 10년(Buchlis, G. *et al.*, Blood. 2012 Mar 29;119(13):3038-41)). 바람직한 아데노바이러스 벡터는 문헌(참조: Russell (2000, 상기))에 의해 검토된 바와 같이 숙주 반응을 감소시키도록 변형된다. AAV 벡터를 사용하는 유전자 요법 방법은 문헌(참조: Wang *et al.*, 2005, J Gene Med. March 9 (Epub ahead of print), Mandel *et al.*, 2004, Curr Opin Mol Ther. 6(5):482-90, and Martin *et al.*, 2004, Eye 18(11):1049-55, Nathwani *et al.*, N Engl J Med. 2011 Dec 22;365(25):2357-65, Apparailly *et al.*, Hum Gene Ther. 2005 Apr;16(4):426-34)에 기재되어 있다.

[0209] 또 다른 적합한 유전자 요법 벡터는 레트로바이러스 벡터를 포함한다. 본 발명에 적용하기 위한 바람직한 레트로바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 발현 작제물이다. 렌티바이러스 벡터는 분열 및 비분열 세포의 계놈을 감염시키고 안정적으로 통합하는 능력을 갖는다(참조: Amado and Chen, 1999 Science 285: 674-6). 렌티바이러스 기반 발현 작제물의 구축 및 사용 방법은 미국 특허 제6,165,782호, 제6,207,455호, 제6,218,181호, 제6,277,633호 및 제6,323,031호 및 문헌(참조: Federico (1999, Curr Opin Biotechnol 10: 448-53) 및 Vigna *et al.* (2000, J Gene Med 2000; 2: 308-16))에 기재되어 있다.

[0210] 다른 적합한 유전자 요법 벡터는 아데노바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 폴리오마 바이러스 벡터 또는 백시니아 바이러스 벡터를 포함한다.

[0211] 아데노 관련 바이러스 벡터(AAV 벡터)

[0212] 본원에서 동의어로 사용되는 용어 "아데노-관련 바이러스", "AAV 바이러스", "AAV 비리온", "AAV 바이러스 입자" 및 "AAV 입자"는 AAV의 적어도 하나의 캡시드 단백질(바람직하게는 특정 AAV 혈청형의 모든 캡시드 단백질로 구성됨) 및 AAV 계놈의 캡슐화된 폴리뉴클레오티드로 구성된 바이러스 입자를 지칭한다. 입자가 AAV 역전된 말단 반복체에 의해 인접된 이중성 폴리뉴클레오티드(즉, 포유류 세포로 전달되는 도입유전자와 같은 야생형 AAV 계놈과 상이한 폴리뉴클레오티드)를 포함하는 경우, 그들은 전형적으로 "AAV 벡터 입자" 또는 "AAV 바이러스 벡터" 또는 "AAV 벡터"로서 공지되어 있다. AAV는 디펜도바이러스속(the genus Dependovirus) 파르보바이러스과(family Parvoviridae)에 속하는 바이러스를 지칭한다. AAV 계놈은 길이가 약 4.7Kb이고, 양성 또는 음성으로 검출될 수 있는 단일 가닥 데옥시리보핵산(ssDNA)으로 구성된다. 본 발명은 또한 dsAAV 또는 scAAV라고도 칭명되는 이중 가닥 AAV의 사용을 포함한다. 계놈은 DNA 가닥의 양쪽 말단에 역전된 말단 반복체(ITR), 및 2개의 개방 판독 프레임(ORF): rep와 cap를 포함한다. 프레임 rep는 AAV 라이프사이클에 필요한 단백질 Rep를 인코딩하는 4개의 중첩 유전자로 구성된다. 프레임 cap는 20면체 대칭의 캡시드를 형성하기 위해 상호작용하는 캡시드 단백질: VP1, VP2 및 VP3과 중첩되는 뉴클레오티드 서열을 함유한다(참조: Carter and Samulski, Int J Mol Med 2000, 6(1):17-27, Gao *et al.*, 2004).

[0213] 바람직한 바이러스 벡터 또는 바람직한 유전자 요법 벡터는 AAV 벡터이다. 본원에서 사용되는 AAV 벡터는 바람직하게는 재조합 AAV 벡터(rAAV 벡터)를 포함한다. 본원에서 사용된 "rAAV 벡터"는 본원에서 설명된 바와 같은 AAV 혈청형으로부터 유래된 캡시드 단백질의 단백질 쉘(shell)에 캡시드화된 AAV 계놈의 일부를 포함하는 재조합 벡터를 지칭한다. AAV 계놈의 일부는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 및 기타와 같은 아데노-관련 바이러스 혈청형으로부터 유래된 역전된 말단 반복체(ITR)를 함유할 수 있다. 바람직한 ITR은 서열번호 35(5' ITR) 및 서열번호 36(3' ITR)을 포함하거나, 본질적으로 이로 이루어지거나, 이로 이루어진 서열로 표시되는 AAV2의 것들이다. 본 발명은 또한 바람직하게는 5' ITR로서 서열번호 35와 적어도 80%(또는 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%)

동일성을 갖는 서열 및 3' ITR로서 서열번호 36과 적어도 80%(또는 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 동일성을 갖는 서열의 사용을 포함한다.

[0214] 캡시드 단백질로 구성된 단백질 셀은 임의의 AAV 혈청형으로부터 유래될 수 있다. 단백질 셀은 또한 캡시드 단백질 셀이라고 칭명된다. rAAV 벡터는 결실된 하나의 또는 바람직하게는 모든 야생형 AAV 유전자를 가질 수 있지만, 여전히 기능적 ITR 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 기능적 ITR 서열은 AAV 비리온의 복제, 구조 및 패키징에 필요하다. ITR 서열은 야생형 서열일 수 있거나, 야생형 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 가질 수 있거나, 그들이 기능적으로 잔류하는 한, 예를 들어, 뉴클레오타이드의 삽입, 돌연변이, 결실 또는 치환에 의해 변경될 수 있다. 이 맥락에서, 기능성은 계놈의 패키징을 캡시드 셀로 지시한 다음 감염될 숙주 세포 또는 표적 세포에서의 발현을 허용하는 능력을 지칭한다. 본 발명의 맥락에서, 캡시드 단백질 셀은 rAAV 벡터 계놈 ITR과 상이한 혈청형일 수 있다.

[0215] 바람직하게는 인슐린을 인코딩하는, 선택된 뉴클레오타이드 서열에 의해 표현되는 핵산 분자는 바람직하게는 상기에서 동정된 rAAV 계놈 또는 ITR 서열 사이에, 예를 들어, 코딩 서열 및 3' 말단 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 조절 요소를 포함하는 발현 작제물에 삽입된다. 상기 핵산 분자는 또한 도입유전자로 칭명될 수 있다.

[0216] "AAV 헬퍼 기능"은 일반적으로 트랜스로 rAAV 벡터에 공급되는 rAAV 복제 및 패키징에 필요한 상응하는 AAV 기능을 지칭한다. AAV 헬퍼 기능은 rAAV 벡터에 없는 AAV 기능을 보완하지만, 그들은 AAV ITR(rAAV 벡터 계놈에 의해 제공됨)이 결여된다. AAV 헬퍼 기능은 AAV의 2개의 주요 ORF, 즉 rep 코딩 영역 및 cap 코딩 영역, 또는 이들의 기능적인 실질적으로 동일한 서열을 포함한다. Rep 및 Cap 영역은 당업계에 익히 공지되어 있고, 예를 들어, 본원에 참조로 인용된 문헌(Chiorini *et al.* (1999, J. of Virology, Vol 73(2): 1309-1319) 또는 미국 특허 제5,139,941호)을 참조한다. AAV 헬퍼 기능은 AAV 헬퍼 작제물에 제공될 수 있다. 헬퍼 작제물의 숙주 세포로의 도입은, 예를 들어, 본원에서 동정된 바와 같은 rAAV 벡터에 존재하는 rAAV 계놈의 도입 전 또는 도입과 동시에 형질전환, 형질감염 또는 형질도입에 의해 일어날 수 있다. 따라서, 본 발명의 AAV 헬퍼 작제물은 한편으로 rAAV 벡터의 캡시드 단백질 셀 및 다른 한편으로는 상기 rAAV 벡터 복제 및 패키징에 존재하는 rAAV 계놈의 혈청형의 목적하는 조합을 생성하도록 선택될 수 있다.

[0217] "AAV 헬퍼 바이러스"는 AAV 복제 및 패키징에 필요한 추가 기능을 제공한다. 적합한 AAV 헬퍼 바이러스에는 아데노바이러스, 단순 헤르페스 바이러스(예: HSV 유형 1 및 2) 및 백시니아 바이러스가 포함된다. 헬퍼 바이러스에 의해 제공되는 추가의 기능은 또한 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제6,531,456호에 기재된 바와 같이 플라스미드를 통해 숙주 세포 내로 도입될 수 있다.

[0218] "형질도입"은 바이러스 벡터에 의한 수령자 숙주 세포로의 인슐린의 전달을 지칭한다. 예를 들어, 본 발명의 rAAV 벡터에 의한 표적 세포의 형질도입은 그 벡터에 함유된 rAAV 계놈의 형질도입된 세포로의 전달을 유도한다. "숙주 세포" 또는 "표적 세포"는 DNA 전달이 수행되는 세포, 예를 들어, 대상체의 근세포를 지칭한다. AAV 벡터는 분열 세포와 비분열 세포 모두에 형질도입될 수 있다.

[0219] AAV 벡터의 생산

[0220] 도입유전자를 벡터화하기 위한 재조합 AAV(rAAV)의 생산은 이전에 기재되어 있다. 문헌(Ayuso E, *et al.*, Curr. Gene Ther. 2010; 10:423-436, Okada T, *et al.*, Hum. Gene Ther. 2009; 20:1013-1021, Zhang H, *et al.*, Hum. Gene Ther. 2009; 20:922-929, and Virag T, *et al.*, Hum. Gene Ther. 2009; 20:807-817)을 참조한다. 이들 프로토콜은 본 발명의 AAV를 생성하기 위해 사용되거나 적용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 생산자 세포주는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(ITR에 인접한 발현 카세트 포함) 및 rep 및 cap 단백질을 인코딩하고 헬퍼 기능을 제공하는 작제물(들)로 일시적으로 형질감염된다. 또 다른 구현예에서, 세포주는 헬퍼 기능을 안정적으로 공급하고 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(ITR에 인접한 발현 카세트 포함) 및 rep 및 cap 단백질을 인코딩하는 작제물(들)로 일시적으로 형질감염된다. 또 다른 구현예에서, 세포주는 rep 및 cap 단백질 및 헬퍼 기능을 안정적으로 공급하고 본 발명의 폴리뉴클레오타이드로 일시적으로 형질감염된다. 또 다른 구현예에서, 세포주는 rep 및 cap 단백질을 안정적으로 공급하고 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 헬퍼 기능을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드로 일시적으로 형질감염된다. 또 다른 구현예에서, 세포주는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, rep 및 cap 단백질을 안정적으로 공급한다. 이들 및 다른 AAV 생산 시스템을 제조하고 사용하는 방법은

당업계에 기재되어 있다. 문헌(Muzyczka N, *et al.*, US 5,139,941, Zhou X, *et al.*, US 5,741,683, Samulski R, *et al.*, US 6,057,152, Samulski R, *et al.*, US 6,204,059, Samulski R, *et al.*, US 6,268,213, Rabinowitz J, *et al.*, US 6,491,907, Zolotukhin S, *et al.*, US 6,660,514, Shenk T, *et al.*, US 6,951,753, Snyder R, *et al.*, US 7,094,604, Rabinowitz J, *et al.*, US 7,172,893, Monahan P, *et al.*, US 7,201,898, Samulski R, *et al.*, US 7,229,823, and Ferrari F, *et al.*, US 7,439,065)을 참조한다.

[0221] rAAV 벡터에 존재하는 rAAV 게놈은 적어도 AAV 혈청형 중 하나(바람직하게는, 본원에서 앞서 개시된 혈청형 AAV2의 것들)의 역전된 말단 반복 영역(ITR)의 뉴클레오티드 서열, 또는 이와 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열 또는 이와 적어도 60% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열, 및 2개의 ITR 사이에 삽입된 (적절한 조절 요소의 제어하에) 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 벡터 게놈은 rAAV 캡시드로 벡터 게놈의 효율적인 패키징을 가능하게 하는 인접하는 5' 및 3' ITR 서열의 사용을 필요로 한다.

[0222] 일부 AAV 혈청형 및 상응하는 ITR의 완전한 게놈이 서열분석되었다(Chiorini *et al.* 1999, J. of Virology Vol. 73, No.2, p1309-1319). 그들은, 예를 들어, Applied Biosystems Inc.(Fosters, CA, USA)에 의해 공급되는 올리고뉴클레오티드 신디사이저 또는 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 당업계에 공지된 화학적 합성에 의해 클로닝되거나 제조될 수 있다. ITR은 AAV 바이러스 게놈으로부터 클로닝되거나 AAV ITR을 포함하는 벡터로부터 절단될 수 있다. ITR 뉴클레오티드 서열은 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 하나 이상의 치료 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 어느 하나의 말단에서 결합될 수 있거나, ITR 사이의 AAV 서열이 목적하는 뉴클레오티드 서열로 대체될 수 있다.

[0223] 바람직하게는, rAAV 벡터에 존재하는 rAAV 게놈은 AAV의 rep(복제) 또는 cap(캡시드) 유전자와 같은 바이러스 단백질을 인코딩하는 임의의 뉴클레오티드 서열을 포함하지 않는다. 이 rAAV 게놈은, 예를 들어, 항생제 내성 유전자, 형광 단백질(예: gfp)을 인코딩하는 유전자, 또는 당업계에 공지된 화학적, 효소적, 또는 달리 검출 가능한 및/또는 선택 가능한 생성물(예: lacZ, aph 등)을 인코딩하는 유전자와 같은 마커 또는 리포터 유전자를 추가로 포함할 수 있다.

[0224] 상기 rAAV 벡터에 존재하는 rAAV 게놈은 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터 서열을 추가로 포함한다.

[0225] 적합한 3' 비번역 서열은 또한 인슐린을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 적합한 3' 비번역 영역은 뉴클레오티드 서열과 자연적으로 관련된 것들일 수 있거나, 예를 들어, SV40 폴리아데닐화 신호(서열번호 37) 및 토끼 β-글로빈 폴리아데닐화 신호(서열번호 38)와 같은 상이한 유전자로부터 유래될 수 있다.

[0226] 발현

[0227] 발현은 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 발현은 qPCR, 웨스턴 블롯 분석 또는 ELISA와 같은 당업자에게 공지된 표준 검정에 의해 mRNA 또는 단백질의 수준에서 간에서 도입유전자 발현 수준을 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0228] 발현은 본원에 기재된 유전자 작제물, 발현 벡터 또는 조성물의 투여 후 언제든지 평가될 수 있다.

[0229] 본원의 일부 구현예에서, 발현은 1일, 2일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주 또는 10주 후 즉시 검출될 수 있다.

[0230] 본원의 일부 구현예에서, 발현은 적어도 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 14주, 16주, 18주, 20주, 22주, 24주, 28주, 32주, 36주, 40주, 44주, 48주, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 12년, 15년, 20년 이상 지속될 수 있다. 즉, 이는 발현이 투여 후 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 14주, 16주, 18주, 20주, 22주, 24주, 28주, 32주, 36주, 40주, 44주, 48주, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 12년, 15년, 20년 이상에서 여전히 검출될 수 있음을 의미한다.

[0231] 일부 구현예에서, 이 발현은 단일 투여 후에 검출된다.

[0232] 본 발명의 맥락에서, CNS 및/또는 뇌 및/또는 시상하부 및/또는 피질 및/또는 해마 및/또는 소뇌 및/또는 후각 망울 특이적 발현은 다른 기관 또는 조직과 비교하여 CNS 및/또는 뇌 및/또는 시상하부 및/또는 피질 및/또는 해마 및/또는 소뇌 및/또는 후각 망울에서 인슐린의 우선적 또는 우세한(적어도 10% 높은, 적어도 20% 높은, 적어도 30% 높은, 적어도 40% 높은, 적어도 50% 높은, 적어도 60% 높은, 적어도 70% 높은, 적어도 80% 높은, 적어도 90% 높은, 적어도 100% 높은, 적어도 150% 높은, 적어도 200% 높은 또는 그 이상인) 발현을 지칭한다. 다른

기관 또는 조직은 간, 췌장, 지방 조직, 골격근, 심장 및 기타일 수 있다. 하나의 구현예에서, 발현은 간, 췌장, 지방 조직, 골격근 및/또는 심장에서 검출될 수 없다. 일부 구현예에서, 발현은 간, 췌장, 지방 조직, 골격근 및 심장으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 모든 기관에서 검출될 수 없다. 발현은 상기한 바와 같이 평가될 수 있다.

[0233] 본 출원 전반에 걸쳐, CNS 및/또는 뇌 및/또는 시상하부 및/또는 피질 및/또는 해마 및/또는 소뇌 및/또는 후각 망울 특이적이 발현의 맥락에서 언급되는 경우, CNS 및/또는 뇌 및/또는 시상하부 및/또는 피질 및/또는 해마 및/또는 소뇌 및/또는 후각 망울을 구성하는 세포 유형(들)의 세포 유형 특이적 발현이 또한 각각 예상된다.

[0234] 투여

[0235] 본원에 사용된 바와 같이, "CSF내 투여"는 뇌를 둘러싸는 수막의 지주막과 연막층 사이의 지주막하 공간에 위치된 CSF에의 직접 투여를 의미한다. CSF내 투여는 대조내, 뇌실내 또는 척수강내 투여를 통해 수행될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "대조내 투여"는 소뇌와 연수의 등면 사이에 위치하는 지주막하 공간의 개구부인 대조내의 투여를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, "뇌실내 투여"는 뇌의 양측 뇌실 중 어느 하나에의 투여를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, "척수강내 투여"는 척주의 척수강내 공간 내 CSF로의 직접 투여를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "뇌실질내 투여"는 뇌실질의 임의의 영역으로의 직접 국소 투여를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, "비강내 투여"는 코의 구조에 의한 투여를 의미한다.

[0236] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따르는 유전자 작제물, 발현 벡터 및 조성물은 단일 투여량으로서 투여된다.

[0237] 코돈 최적화

[0238] 본원에 사용된 바와 같이, "코돈 최적화"는 기존의 코딩 서열을 변경하거나 코딩 서열을 설계하기 위해, 예를 들어, 코딩 서열로부터 전사된 전사체 RNA 분자의 발현 숙주 세포 또는 유기체에서 번역을 개선하거나 코딩 서열의 전사를 향상시키는 데 사용되는 과정을 지칭한다. 코돈 최적화는 발현 숙주 유기체의 코돈 선호에 적합하도록 코딩 서열의 코돈을 선택하는 단계를 포함하는 과정을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 포유류, 바람직하게는 무인, 개, 또는 인간 발현 숙주의 코돈 선호에 적합하게 하기 위해. 코돈 최적화는 또한 RNA의 안정성 및/또는 번역에 부정적으로 잠재적으로 영향을 미치는 요소(예: 종결 서열, TATA 박스, 스플라이스 부위, 리보솜 진입 부위, 반복 및/또는 GC 풍부 서열 및 RNA 이차 구조 또는 불안정성 모티프)를 제거한다. 일부 구현예에서, 코돈 최적화 서열은 전사, RNA 안정성 및/또는 번역의 적어도 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상의 증가를 보여준다.

[0239] CNS 및 뇌

[0240] 본원에 사용된 바와 같이, "중추 신경계" 또는 "CNS"는 감각 자극이 전달되고, 운동 자극이 전달되며, 전체 신경계의 활성을 조정하는 뇌와 척수를 포함하는 신경계의 일부를 지칭한다.

[0241] 본원에 사용된 바와 같이, "뇌"는 신경계의 중추 기관을 지칭하며, 대뇌, 뇌간 및 소뇌로 구성된다. 그것은 신체의 대부분의 활성을 제어하고 감각 기관으로부터 받은 정보를 처리, 통합, 조정하고 신체의 나머지 부분으로 전송되는 지시에 대한 결정을 한다.

[0242] 특히, 본원에 사용된 바와 같이, "시상하부"는 자율 신경계 및 뇌하수체의 활성을 모두 조정하고, 체온, 갈증, 배고픔 및 기타 항상성 시스템을 제어하고 수면과 정서적 활동에 관련된 시상 아래의 전뇌 영역을 지칭한다. 본원에서 사용된 "해마"는 변연계에 속하며, 단기 기억에서 장기 기억으로의 정보의 통합 및 탐색을 가능하게 하는 공간 기억에서 중요한 역할을 한다. 해마는 대뇌 피질(이중피질) 아래에 위치되며, 영장류의 내측 측두엽에 위치된다. 본원에서 사용되는 "피질" 또는 "대뇌 피질"은 인간 및 다른 포유동물에서 뇌의 대뇌의 신경 조직의 외층이다. 그것은 기억, 주의, 지각, 의식, 사고, 언어 및 자각에서 중추적인 역할을 한다. 본원에서 사용되는 "소뇌"는 모든 척추동물의 후뇌의 주요 특징을 지칭한다. 인간에서, 그것은 운동 조절에 중요한 역할을 한다. 또한, 그것은 주의 및 언어 등의 일부 인지 기능뿐만 아니라 두려움 및 쾌락 반응을 조절하는 데에도 관여할 수 있다. 본원에서 사용되는 "후각 망울"은 후각 시스템(후각에 전념하는 시스템)의 본질적인 구조를 지칭한다. 후각 망울은 편도체, 안와전두 피질(OFC) 및 해마에서 추가로 처리되는 정보를 전송하고, 여기서 그것은 감정, 기억 및 학습에서 역할을 한다.

[0243] 기억

[0244] 기억은 일반적으로 데이터 또는 정보가 필요에 따라 인코딩, 저장 및 검색되는 뇌의 능력으로 이해된다. 상이한 유형 또는 기억이 기재된다. 하나의 가능한 차이는 감각 기억, 단기 기억 및 장기 기억이다. 감각 기억은

항목이 인식된 후 1초 미만에 감각 정보를 유지한다. 단기(작업 기억으로 공지되기도 함) 기억에서는 전형적으로 리허설 없이 몇 초 내지 1분의 기간 동안 회상할 수 있도록 한다. 반대로, 장기 기억은 잠재적으로 무한한 기간(최대 수명까지) 동안 훨씬 더 많은 양의 정보를 저장할 수 있다.

- [0245] 또 다른 차이점은 절차적 기억(또는 암묵적 기억)과 명시적 기억(또는 선언적 기억)을 포함한다. 암묵적 기억은 정보의 의식적인 회상을 기반으로 하지 않고 암묵적 학습, 즉 무언가를 하는 방법을 기억하는 것에 기초한다. 명시적(또는 선언적) 기억은 사실 정보, 이전 경험 및 개념의 의식적이고 의도적인 기억이다.
- [0246] 회상 기억과 인식 기억을 구별할 수도 있다. 인식은 이벤트 또는 정보의 조각을 친숙한 것으로 "인식하는" 능력을 지칭하며, 회상은 기억에서 관련 세부 사항을 검색하는 것을 지정한다.
- [0247] 공간 기억은 자신의 환경과 공간 배향에 관한 정보의 기록을 담당하는 기억의 한 형태이다.
- [0248] 본 문서 및 청구범위에서, 동사 "포함하다" 및 그의 활용은 비제한적인 의미로 사용되어 그 단어 뒤에 오는 항목이 포함되지만, 구체적으로 언급되지 않은 항목은 제외되지 않는다는 것을 의미한다. 또한, 동사 "구성하다"는 "본질적으로 ~로 구성하다"로 대체될 수 있으며, 이는 본원에 기재된 유전자 작제물, 발현 벡터 또는 조성물이 구체적으로 동정된 것 이외의 추가의 구성 요소(들)를 포함할 수 있음을 의미하며, 상기 추가의 구성 요소(들)는 본 발명의 고유한 특성을 변경하지 않는다.
- [0249] 부정관사 "a" 또는 "an"에 의한 요소에 대한 언급은 문맥이 요소 중 하나 및 하나만이 존재한다는 것을 명확히 요구하지 않는 한 하나 이상의 요소가 존재할 가능성을 배제하지 않는다. 따라서, 부정관사 "a" 또는 "an"은 일반적으로 "적어도 하나"를 의미한다.
- [0250] 본원에 사용된 "적어도" 특정 값은 그 특정 값 이상을 의미한다. 예를 들어, "적어도 2"는 "2 이상", 즉, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15... 등과 동일한 것으로 이해된다.
- [0251] 개별 수치 값은 값에 "약" 또는 "대략"이라는 단어가 선행되는 것처럼 근사치로 표시된다. 유사하게, 달리 명시적으로 표시되지 않는 한, 본 출원에 명시된 다양한 범위의 수치 값은 표시된 범위 내의 최소값 및 최대값 모두에 "약" 또는 "대략"이라는 단어가 선행되는 것처럼 근사치로 표시된다. 본원에 사용되는 바와 같이, 수치 값을 언급할 때 용어 "약" 및 "대략"은 개시된 주제가 가장 밀접하게 관련되는 기술 분야 또는 문제의 범위 또는 요소에 관련된 기술 분야의 숙련자에게 이들의 명백하고 통상의 의미를 가질 것이다. 엄격한 수치 경계로부터 확장되는 양은 많은 요인에 의존한다. 예를 들어, 고려될 수 있는 요인 중 일부는 요소의 임계성 및/또는 소정의 변동량이 청구된 주제의 성능에 미치는 영향, 및 당업자에게 공지된 다른 고려사항을 포함한다. 임의의 반대의 고려 사항의 부재하에, 수치(예: 약 10)와 관련하여 사용되는 경우, "약" 또는 "대략"이라는 단어는 바람직하게는 그 값이 그 값의 1% 이상 또는 이하의 소정의 값(10의)일 수 있음을 의미한다.
- [0252] 본원에 사용된 용어 "및/또는"은 언급된 경우 중 하나 이상이 단독으로 또는 언급된 경우 중 적어도 하나와 조합하여, 언급된 경우 모두까지 발생할 수 있음을 나타낸다.
- [0253] 본원에 기재된 각 구현예는 달리 표시되지 않는 한, 본원에 기재된 임의의 다른 구현예와 함께 조합될 수 있다.
- [0254] 본원에 인용된 모든 특허 출원, 특허 및 인쇄된 간행물은 이 개시내용의 언어가 제어하는 경우, 임의의 정의, 주제의 면책사항 또는 부인을 제외하고, 그리고 포함된 자료가 본원의 명시적 개시내용과 모순되는 정도를 제외하고, 전체가 참조로 본원에 포함된다.
- [0255] 당업자는 본 발명의 실시예에 사용될 수 있는 본원에 기재된 것들과 유사하거나 등가인 많은 방법 및 재료를 인식할 것이다. 실제로, 본 발명은 기재된 방법 및 재료에 결코 제한되지 않는다.
- [0256] 본 발명은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 되는 하기 실시예에 의해 추가로 기재된다.

도면의 간단한 설명

- [0257] **도 1. SAMP8 마우스의 뇌에서 hIns의 발현.** 인간 인슐린(hIns) 코딩 서열의 발현 수준은 SAMP8 마우스의 시상하부, 피질, 해마 및 소뇌에서 RTqPCR에 의해 측정되었고, Rp1p0 값으로 정규화되었다. 분석은 5×10^{10} vg/마우스의 AAV9-CAG-hIns-dmiRT 벡터의 CSF내 투여 14주 후에 수행되었다. 결과는 평균 $\pm$ SEM, n = 9 동물/그룹으로 표현된다. ND, 검출되지 않음.

도 2. AAV9-hIns 벡터로 처리된 SAMP8 마우스에서 뇌 염증의 감소. 염증성 분자(Nfkb, II1b, II6)의 발현 수준은 SAMP8 마우스의 시상하부, 해마 및 소뇌에서 RTqPCR에 의해 측정되었고, Rp1p0 값으로 정규화되었다. 분

석은 5×10^{10} vg/마우스의 AAV9-CAG-hIns-dmiRT 벡터의 CSF내 투여 14주 후에 수행되었다. 결과는 평균 $\pm$ SEM, $n = 9$ 동물/그룹으로 표현된다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs 미처리 마우스. Nfkb, 핵 인자 카파 B; II1b, 인터류킨-1 베타; II6, 인터류킨-6.

도 3. AAV9-hIns 벡터로 처리된 SAMP8 마우스의 뇌에서 정상세포 마커의 발현 증가. 정상세포 마커(Gfap 및 S100b)의 발현 수준은 SAMP8 마우스의 시상하부, 피질, 해마 및 소뇌에서 RTqPCR에 의해 측정되었고, Rplp0 값으로 정규화되었다. 분석은 5×10^{10} vg/마우스의 AAV9-CAG-hIns-dmiRT 벡터의 CSF내 투여 14주 후에 수행되었다. 결과는 평균 $\pm$ SEM, $n = 9$ 동물/그룹으로 표현된다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs 미처리 마우스. Gfap, 신경교 섬유성 산성 단백질; S100b, 칼슘 결합 단백질 B.

도 4. AAV9-hIns 처리된 SAMP8 마우스의 뇌에서 신경발생의 증가. 신경원성 마커(Dcx, Ncam, Sox2)의 발현 수준은 SAMP8 마우스의 피질에서 RTqPCR에 의해 측정되었고, Rplp0 값으로 정규화되었다. 분석은 5×10^{10} vg/마우스의 AAV9-CAG-hIns-dmiRT 벡터의 CSF내 투여 14주 후에 수행되었다. 결과는 평균 $\pm$ SEM, $n = 9$ 동물/그룹으로 표현된다. * $p < 0.05$ vs 미처리 마우스. Dcx, 더블코르틴; Ncam, 신경 세포 접착 분자; Sox2, 성별 결정 영역 Y 박스 2.

도 5. db/db 마우스의 뇌에서 hIns의 발현. 인간 인슐린(hIns) 코딩 서열의 발현 수준은 db/db 마우스의 시상하부, 피질, 해마 및 소뇌에서 RTqPCR에 의해 측정되었고, Rplp0 값으로 정규화되었다. 분석은 5×10^{10} vg/마우스의 AAV9-CAG-hIns-dmiRT 벡터의 CSF내 투여 12주 후에 수행되었다. 결과는 평균 $\pm$ SEM, $n = 9$ 동물/그룹으로 표현된다. ND, 검출되지 않음.

도 6. AAV9-hIns 벡터로 처리된 db/db 마우스에서 뇌 염증의 감소. 염증성 분자(Nfkb, II1b, II6)의 발현 수준은 db/db 마우스의 시상하부, 해마 및 소뇌에서 RTqPCR에 의해 측정되었고 Rplp0 값으로 정규화되었다. 분석은 5×10^{10} vg/마우스의 AAV9-CAG-hIns-dmiRT 벡터의 CSF내 투여 12주 후에 수행되었다. 결과는 평균 $\pm$ SEM, $n = 9$ 동물/그룹으로 표현된다. ** $p < 0.01$ vs 미처리 마우스. Nfkb, 핵 인자 카파 B; II1b, 인터류킨-1 베타; II6, 인터류킨-6.

도 7. AAV9-hIns 벡터로 처리된 db/db 마우스의 뇌에서 정상세포 마커의 발현 증가. 정상세포 마커(Gfap 및 S100b)의 발현 수준은 db/db 마우스의 시상하부, 피질, 해마 및 소뇌에서 RTqPCR에 의해 측정되었고, Rplp0 값으로 정규화되었다. 분석은 5×10^{10} vg/마우스의 AAV9-CAG-hIns-dmiRT 벡터의 CSF내 투여 12주 후에 수행되었다. 결과는 평균 $\pm$ SEM, $n = 9$ 동물/그룹으로 표현된다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs 미처리 마우스. Gfap, 신경교 섬유성 산성 단백질; S100b, 칼슘 결합 단백질 B.

도 8. AAV1-hIns, AAV2-hIns 및 AAV9-hIns 벡터의 CSF내 투여 후 뇌의 형질도입. (a) 벡터 게놈의 카피 수는 hIns에 특이적인 프라이머를 이용한 정량적 PCR에 의해 5×10^{10} vg/마우스의 AAV1-CAG-hIns-dmiRT, AAV2-CAG-hIns-dmiRT 또는 AAV9-CAG-hIns-dmiRT 벡터의 CSF내 투여 3주 후에 야생형 마우스의 시상하부, 피질, 해마 및 소뇌로부터 분리된 DNA에서 결정되었다. (b) 인간 인슐린(hIns)의 발현 수준은 동일한 동물의 시상하부, 피질, 해마 및 소뇌에서 RTqPCR에 의해 측정되었다. 결과는 Rplp0 값으로 정규화되었다. 결과는 평균 $\pm$ SEM, $n = 5$ 동물/그룹으로 표현된다. ND, 검출되지 않음.

도 9. SAMP8 마우스의 뇌에서 hIns의 발현. 인간 인슐린(hIns) 코딩 서열의 발현 수준은 SAMP8 마우스의 시상하부, 피질, 해마, 소뇌 및 후각 망울에서 RTqPCR에 의해 측정되었고, Rplp0 값으로 정규화되었다. 분석은 각각 5×10^{10} vg/마우스의 AAV1-CAG-hInsAsp 및 AAV1-CAG-hInsWt 벡터의 CSF내 투여 34주 후에 수행되었다. 결과는 평균 $\pm$ SEM, $n = 5$ 동물/그룹으로 표현된다. ND, 검출되지 않음.

도 10. AAV1-CAG-hInsWt 및 AAV1-CAG-hInsAsp 벡터에 의한 CSF내 유전자 요법 후 SAMP8 마우스의 단기 및 장기 기억 개선. (a) 단기 및 (b) 장기 식별 지수는 33주령 SAMR1 미처리, SAMP8 미처리, SAMP8 AAV1-CAG-hInsWt 처리 및 SAMP8 AAV1-CAG-hInsAsp-처리 마우스에서 신규 물체 인식 테스트 동안 측정되었고, 실시예의 일반적인 절차에 설명된 바와 같이 계산하였다. 결과는 평균 $\pm$ SEM, $n = 5$ 동물/그룹으로 표현된다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs SAMP8 미처리 마우스.

도 11. AAV1-CAG-hInsWt에 의한 CSF내 유전자 요법 후 SAMP8 마우스의 학습 능력 개선. 학습 능력은 39주령의 SAMR1 미처리, SAMP8 미처리 및 SAMP8 AAV1-CAG-hInsWt 처리 마우스의 모리스 물 미로 테스트 동안 측정되었고, 실시예의 일반적인 절차에 기재된 바와 같이 계산하였다. 결과는 평균 $\pm$ SEM, $n = 5$ 동물/그룹으로 표현된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

AAV 벡터를 사용하여 이 기관에서 과발현될 때 뇌에 대한 인슐린의 영향을 연구하기 위해, 세 가지 다른 실험이 수행되었다:

· AAV9-Ins에 의한 SAMP8 마우스의 치료. 사용된 투여량: 5×10^{10} vg/마우스 (실시예 1).

· AAV9-Ins에 의한 db/db 마우스의 치료. 사용된 투여량: 5×10^{10} vg/마우스 (실시예 2).

· AAV1-CAG-hInsAsp 및 AAV1-CAG-hInsWt에 의한 SAMP8 마우스의 치료. 사용된 투여량: 5×10^{10} vg/마우스 (실시예 5).

또한, 본 발명자들은 또한 야생형 마우스의 CSF내 투여 후 AAV1-hIns, AAV2-hIns 및 AAV9-hIns 벡터에 의한 뇌 형질도입 효율을 조사하였다(실시예 3).

실시예의 일반적인 절차

대상체 특징

수컷 SAMP8/TaHsd(SAMP8), BKS.Cg-+Lepr^{db}/+Lepr^{db} OlaHsd(db/db) 및 C57B1/6J(야생형) 마우스를 사용하였다. 실시예 5의 경우, SAMR1/TaHsd(SAMR1)가 사용되었다. 마우스에게 자유롭게 표준 식이(2018S Teklad Global Diets®, Harlan Labs., Inc., Madison, WI, US)를 공급하였고, 12시간의 명암 사이클(오전 8시에 점등)과 안정한 온도($22^{\circ}\text{C} \pm 2$)하에 유지시켰다. 조직 샘플링을 위해, 마우스를 흡입 마취제 이소플루란(IsoFlo®, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, US)으로 마취시키고 탈모시켰다. 관심 조직을 절제하고, 분석까지 -80°C 에서 유지시켰다. 모든 실험 절차는 바르셀로나 자치 대학의 동물 및 인체 실험을 위한 윤리 위원회(the Ethics Committee for Animal and Human Experimentation of the Universitat Autònoma de Barcelona)에 의해 승인되었다.

제조합 AAV 벡터

혈청형 1, 2 및 9의 단일 가닥 AAV 벡터는 표준 방법에 따라 HEK293 세포의 삼중 형질감염에 의해 생성되었다(참조: Ayuso, E. *et al.*, 2010. *Curr Gene Ther.* 10(6):423-36). 실시예 1 내지 3의 경우, 세포를 DMEM 10% FBS 내지 80% 컨플루언스에서 10개의 롤러 병(850cm^2 , 평면; Corning™, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, US)에서 배양하고, AAV2 ITR(서열번호 40)에 인접한 발현 카세트를 보유하는 플라스미드, AAV2 rep 유전자 및 각각 혈청형 1, 2 또는 9 cap 유전자의 AAV를 보유하는 헬퍼 플라스미드, 및 아데노바이러스 헬퍼 기능을 보유하는 플라스미드를 사용하는 인산칼슘 방법에 의해 공동형질감염시켰다. 사용된 도입유전자는 초기 인헨서/닭 베타 액틴(CAG) 프로모터(서열번호 22)에 의해 구동되는 인간 인슐린 코딩 서열(서열번호 46)이었고, miR-122a 서열(5'CAAACACCATGTGTCACCTCA3', 서열번호 7)의 4개의 탠덤 반복체 및 발현 카세트의 3' 비번역 영역에 클로닝된 miR-1 서열(5'TTACATACTTCTTTACATTCA3', 서열번호 8)의 4개의 탠덤 반복체가 첨가되었다. 실시예 5의 경우, 세포는 AAV2 ITR(서열번호 49 또는 서열번호 50)에 인접한 발현 카세트를 보유하는 플라스미드, AAV2 rep 유전자 및 혈청형 1의 AAV를 보유하는 헬퍼 플라스미드, 및 아데노바이러스 헬퍼 기능을 보유하는 플라스미드로 공동 형질감염시켰다. 사용된 도입유전자는 초기 인헨서/닭 베타 액틴(CAG) 프로모터(서열번호 22)에 의해 구동된 각각 퓨린 절단 부위를 함유하는 인간 인슐린 아스파르트산 코딩 서열(서열번호 46) 또는 퓨린 절단 부위를 함유하는 인간 인슐린 야생형 코딩 서열(서열번호 45)이었다. AAV는 폴리에틸렌 글리콜 침전 단계와 2개의 연속적인 염화세슘(CsCl) 구배에 기초하는 최적화된 방식으로 정제되었다. 이 2세대 CsCl 기반 프로토콜은 빈 AAV 캡시드와 DNA 및 단백질 불순물을 극적으로 감소시켰다(참조: Ayuso, E. *et al.*, 2010. *Curr Gene Ther.* 10(6):423-36)). 정제된 AAV 벡터를 PBS에 대하여 투석하고, 여과하고 -80°C 에서 저장하였다. 바이러스 게놈의 역가는 표준 곡선으로서 선형화된 플라스미드 DNA를 사용하는 AAV2 참조 표준재료에 대해 기재된 프로토콜에

따르는 정량적 PCR에 의해 결정되었다(참조: Lock M., *et al.*, Hum. Gene Ther. 2010; 21:1273-1285). 벡터는 당업계에 익히 공지된 분자 생물학 기술에 따라 작제되었다.

[0269] AAV 벡터의 생체내 CSF내 투여

[0270] 케타민(100mg/kg)과 자일라진(10mg/kg)의 복강내 주사로 마우스를 마취시키고, 귀 뒤에서 대략 건갑골 사이까지 후두부의 피부를 면도하고 에탄올로 세정하였다. 마우스는 머리가 약간 아래쪽으로 기울어진 상태로 옆드린 자세로 유지시켰다. 2mm의 문미 절개를 수행하여 해밀턴 주사기를 45-55° 각도로 후두와 C1-척추 사이의 대조에 도입하고 5μl의 벡터 희석액을 투여했다. CNS가 벡터 전달의 주요 표적 구획임을 감안할 때, 체중에 관계 없이 마우스에게 동일한 수의 벡터 게놈(vg)/마우스(5×10^{10} vg/마우스)을 투여하였다.

[0271] RNA 분석

[0272] 총 RNA는 시상하부, 피질, 해마, 소뇌 및 후각 망울로부터 Tripure 단리 시약(Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, US) 및 해마 샘플용 RNeasy 미니 키트 또는 RNeasy 마이크로 키트(Qiagen NV, Venlo, NL)를 사용하여 수득하였다. 잔류성 바이러스 게놈을 제거하기 위해, 총 RNA는 DNaseI(Qiagen NV, Venlo, NL)로 처리하였다. RT-PCR 분석을 위해, 1μg의 RNA 샘플을 전사자 제1 가닥 cDNA 합성 키트(04379012001, Roche, California, USA)를 사용하여 역전사시켰다. 실시간 정량적 PCR은 TB Green Premix Ex TaqII(Takara Bio Europe, France)를 사용하여 LightCycler 480 II(Roche, Mannheim, Germany)에서 수행되었다. 데이터는 Rplp0 값으로 정규화되고, 앞서 기재된 바와 같이 분석되었다(참조: Pfaffl, M., Nucleic Acids Res. 2001; 29(9):e45).

[0273] 벡터 생체 분포

[0274] 시상하부, 피질, 해마, 소뇌 및 후각 망울을 프로테이나제 K(0.2mg/mL)로 밤새 소화시켰다. 총 DNA는 MasterPure DNA 정제 키트(Epicenter Biotechnologies, Madison, WI, US)를 사용하여 단리시켰다. 벡터 게놈의 카피 수는 인간 인슐린에 특이적인 프라이머와 프로브를 사용하여 TaqMan qPCR에 의해 20ng의 게놈 DNA에서 결정되었다. 샘플당 벡터 게놈은 20ng의 비형질도입 게놈 DNA에 스파이킹된 표적 서열을 보유하는 선형화된 플라스미드의 연속 희석에 의해 구축된 표준 곡선으로부터 보간되었다.

[0275] 새로운 물체 인식 테스트.

[0276] 새로운 물체 인식 테스트는 개방 필드 박스에서 수행되었다. 개방 필드 테스트를 사용하여 마우스를 박스에 적응시켰다. 다음날, 첫 번째 실험을 수행하기 위해, 두 개의 동일한 물체(A와 B)를 박스의 오른쪽 상단과 왼쪽 상단 사분면에 배치한 다음, 마우스를 두 물체에 거꾸로 배치했다. 10분 탐색 후, 마우스를 박스로부터 꺼내고, 10분 동안 휴식시켰다. 두 번째 실험에서, 동일한 물체 중 하나(A 또는 B)는 물체 C(새로운 물체)로 대체시켰다. 이어서, 단기 기억을 평가하기 위해 마우스를 추가로 10분 동안 탐색하기 위해 박스에 다시 넣었다. 두 번째 실험 24시간 후에, 세 번째 실험을 수행하여 물체 C를 새로운 물체(D)로 대체하였다. 이어서, 장기 기억을 평가하기 위해 마우스를 추가로 10분 동안 탐색하기 위해 박스에 다시 넣었다. 동물이 새로운 물체를 탐색하는 데 소요된 시간을 비디오 추적 시스템(SMART Junior; Panlab)을 사용하여 기록하고 평가했다. 새로운 물체 인식 테스트 기억의 평가는 다음 식에 따라 계산된 식별 비율의 백분율로 표현되었다: 식별 비율(%) = $(N-F)/(N+F) \times 100\%$, 여기서 N은 새로운 물체를 탐색하는 데 소요된 시간을 나타내고, F는 동일한 물체를 탐색하는 데 소요된 시간을 나타낸다.

[0277] 모리스 물 미로.

[0278] 마우스는 수영과 외부 가지 신호에 의존하여 물 탱크(직경 1m, 온도 26-28°C)에서 수중 플랫폼(직경 10cm)을 찾도록 훈련시켰다. 5일 절차: 친숙화(1일째), 마우스를 보이는 플랫폼에 놓고 30초 동안 방치시켰다. 그런 다음, 두 번의 연속 실험에서 마우스를 두 개의 상이한 시작점에서 미로에 삽입했다. 마우스가 60초 이내에 플랫폼에 도달하지 않으면 플랫폼으로 안내되었다. 보이는 플랫폼에 도달할 때까지의 대기 시간을 측정했다; 훈련(2-4일째), 마우스를 상이한 미로 사분면에 무작위로 배치했다. 숨겨진 플랫폼('올바른' 사분면에 배치됨)에 도달할 때까지의 대기 시간은 60초 컷오프로 하루에 2개 세션(세션 간 1시간)에 대해 세션당 두 번의 실험으로 측정되었다. 테스트(5일째), 훈련의 마지막 세션 이후에 프로브 실험이 이어졌다. 숨겨진 플랫폼을 제거하고, 마우스를 풀의 중앙에 놓고 플랫폼이 배치된 영역을 가로지르는 대기 시간을 비디오 추적 시스템(Viewpoint, France)을 사용하여 측정했다.

[0279] 실시예 1 내지 4에서, 퓨린 절단 부위를 갖는 에이치. 사피엔스(*H. sapiens*) 인슐린 돌연변이체 His-B10-Asp의

뉴클레오티드 서열(hInsAsp; 서열번호 46)이 사용된다. 실시예 5에서, 퓨린 절단 부위를 갖는 에이치. 사피엔스 인슐린 돌연변이체 His-B10-Asp의 뉴클레오티드 서열(hInsAsp; 서열번호 46) 및 퓨린 절단 부위를 갖는 에이치. 사피엔스 인슐린 야생형의 뉴클레오티드 서열(hInswt; 서열번호 45) 모두가 사용된다.

[0280] 유전자 조작된 퓨린 엔도프로테아제 절단 부위를 비체장 조직에서 성숙한 인슐린의 매우 효율적인 생산을 가능하게 하고; 총 인슐린 생산의 85-93%는 성숙한 인슐린이다(참조: Gros et al., Hum Gene Ther. 1997 Dec 10;8(18):2249-59; Gros et al. Hum Gene Ther. 1999 May 1;10(7):1207-17 and Riu et al. Diabetes. 2002 Mar;51(3):704-11). 퓨린은 상이한 뇌 영역에 존재하는 것으로 공지되어 있고(참조: Foti et al. Gene Ther. 2009 November;16(11):1314-1319), 이 기관에서 퓨린 절단 부위를 함유하는 서열로부터 성숙한 인슐린의 효율적인 생산을 가능하게 한다.

[0281] 실시예 1. AAV9-CAG-hIns-dmiRT 벡터의 CSF내 투여에 의한 SAMP8 마우스의 신경염증 감소 및 신경발생 증가

[0282] 본 발명자들은 신경염증과 신경발생에 대한 인슐린에 의한 뇌의 AAV 매개 유전 공학의 치료 가능성을 평가했다. 이를 위해, 본 발명자들은 신경염증과 같은 노화 관련 뇌 병리를 동반한 널리 사용되는 노화의 마우스 모델인 노화 가속 마우스 경향 8(SAMP8) 마우스를 사용했다(참조: Takeda T., Neurochem. Res. 2009, 34(4):639-659; Grinan-Ferre C. et al. Mol. Neurobiol. 2016, 53(4):2435-2450).

[0283] 7주령의 수컷 SAMP8 마우스에게 간 특이적 miR122 및 심장 특이적 miR1(AAV9-CAG-hIns-dmiRT)의 표적 부위를 포함한 CAG 유비쿼터스 프로모터의 제어하에 인간 인슐린을 인코딩하는 5×10^{10} vg/마우스의 AAV9 벡터를 대조를 통해 CSF내에 국소 투여하였다. 대조군으로서, 미처리된 SAMP8 동물이 사용되었다. 21주령에 동물을 안락사시키고, 분석을 위해 조직 샘플을 채취하였다.

[0284] AAV9-CAG-hIns-dmiRT 벡터의 CSF내 투여는 SAMP8 마우스의 시상하부, 피질, 해마 및 소뇌와 같은 뇌의 상이한 영역에서 인간 인슐린의 발현 수준의 증가에 의해 입증되는 바와 같이 뇌에서 인슐린의 광범위한 과발현을 중재했다(도 1).

[0285] 신경염증은 뇌의 상이한 영역에서 전염증성 분자 Nfkb, II1b 및 II6의 발현을 통해 분석되었다. 주목할 만하게, 이들 전염증성 분자의 발현은 분석된 모든 뇌 영역에서 감소되었다(도 2).

[0286] 성상세포 마커 Gfap 및 S100b의 발현을 분석하였다. CSF내에서 AAV9-CAG-hIns-dmiRT 벡터로 처리된 SAMP8 마우스는 시상하부, 피질, 해마 및 소뇌에서 Gfap의 발현 증가(도 3) 및 피질에서 S100b의 발현 증가(도 3)를 보여주었다. 성상세포는 신경전달물질과 ATP를 분비할 수 있으며, 이들은 인근 뉴런의 활성을 조절할 수 있다(참조: Cai W. et al. Journal of Clinical Investigation 2018, 128(7):2914-2926). 따라서, 성상세포 수의 증가는 신경 활성을 지원하고 항불안 및 항우울 효과를 가질 수 있다. 또한, 성상세포 마커의 증가에 따른 전염증성 마커의 감소는 인슐린 유전자 요법 치료 후 증가하는 성상세포의 집단이 "A2 성상세포"로서 칭명되기도 하는 "유익한 성상세포"의 집단임을 나타낸다.

[0287] SAMP8 처리 마우스의 신경발생을 연구하기 위해, 신경원성 마커의 실시간 PCR을 수행했다. 더블코르틴(Dcx), 신경 세포 접착 분자(Ncam) 및 성별 결정 영역 Y 박스 2(Sox2) 발현은 AAV9-CAG-hIns-dmiRT 처리 마우스의 피질에서 증가했다(도 4).

[0288] 실시예 2. AAV9-CAG-hIns-dmiRT 벡터의 CSF내 투여에 의한 db/db 마우스의 신경염증 감소

[0289] 본 발명자들은 db/db 마우스에서 비만 및/또는 당뇨병과 관련된 신경염증에 대한 인슐린의 효과를 평가하였다. Db/db 마우스는 렙틴 신호 전달의 결핍을 특징으로 하는 비만과 당뇨병의 널리 사용되는 유전적 마우스 모델이다. 또한, 이들 마우스는 지방 조직 및 간과 같은 말초 조직뿐만 아니라 뇌에서도 염증을 나타낸다(참조: Dey et al, J. Neuroimmunol. 2014).

[0290] 이를 위해, 7주령의 수컷 db/db 마우스에게 대조를 통해 5×10^{10} vg/마우스의 AAV9-CAG-hIns-dmiRT 벡터를 CSF내 투여하였다. 대조군으로서, 미처리 db/db 동물을 사용하였다. 19주령에, 동물을 안락사시키고, 분석을 위해 조직 샘플을 채취하였다.

[0291] SAMP8 마우스에서 수행된 관찰과 유사하게, AAV9-CAG-hIns-dmiRT 벡터의 CSF내 투여는 db/db 마우스의 시상하부, 피질, 해마 및 소뇌에서 인슐린의 강력한 과발현을 매개하였다(도 5).

[0292] 인슐린 인코딩 벡터로 처리된 db/db 마우스에서, 전염증성 분자 Nfkb, II1b 및 II6의 발현은 분석된 모든 뇌 영역에서 감소되었다(도 6). 또한, db/db 처리 마우스는 시상하부, 피질 및 해마에서 성상세포 마커 Gfap의 발현

증가 및 피질에서 정상세포 마커 S100b의 발현 증가를 나타내었다(도 7). 정상세포는 신경전달물질과 ATP를 분비할 수 있으며, 이들은 인근 뉴런의 활성을 조절할 수 있다(참조: Cai W. et al. Journal of Clinical Investigation 2018, 128(7):2914-2926). 따라서, 정상세포 수의 증가는 신경 활성을 지원하고 항불안 및 항우울 효과를 가질 수 있다. 또한, 정상세포 마커의 증가에 따른 전염증성 마커의 감소는 인슐린 유전자 요법 치료 후 증가하는 정상세포의 집단이 "A2 정상세포"로서 증명되기도 하는 "유익한 정상세포"의 집단을 나타낸다.

[0293] 실시예 3. AAV1-CAG-hIns-dmiRT, AAV2-CAG-hIns-dmiRT 및 AAV9-CAG-hIns-dmiRT 벡터의 CSF내 투여 후 뇌 형질 도입.

[0294] 상이한 AAV 혈청형이 뇌를 효율적으로 형질도입할 수 있는지를 조사하기 위해, 야생형 마우스를 CSF내에서 간 특이적 miR-122a 및 심장 특이적 miR-1의 표적 부위(각각 AAV1-CAG-hIns-dmiRT, AAV2-CAG-hIns-dmiRT 및 AAV9-CAG-hIns-dmiRT)가 포함된 CAG 유비쿼터스 프로모터의 제어하에 인간 인슐린 코딩 서열을 인코딩하는 5×10^{10} vg/마우스의 AAV1, AAV2 및 AAV9 벡터로 처리하였다. 대조군으로서, 미처리된 야생형 마우스를 사용하였다.

[0295] AAV 벡터의 CSF내 투여 3주 후, 뇌 샘플을 수득하고, 벡터 게놈의 카피 수와 인간 인슐린 발현을 결정하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, 본 발명자들은 AAV1, AAV2, AAV9의 CSF내 투여 후, 시상하부, 피질, 해마 및 소뇌의 형질도입(도 8a) 및 동일한 뇌 영역에서의 hIns의 발현(도 8b)을 발견했다.

[0296] 실시예 4. 알츠하이머병 마우스 모델에서 AAV1-CAG-hIns 벡터의 CSF내 투여.

[0297] 알츠하이머병에 대한 인슐린에 의한 뇌의 AAV 매개 유전 공학의 치료 가능성을 평가하기 위해, 3xTg-AD(B6; 129Tg(APPswe, tauP301L) 1Lfa Psen1^{tm1Mpm}) 마우스 모델이 사용된다. 3xTg-AD는 알츠하이머병의 널리 사용되는 마우스 모델이며, 3개의 돌연변이체 대립유전자 모두에 대해 동형접합성이고, Psen1 돌연변이에 대해 동형접합성이며, 공동주입된 APPswe 및 tauP301L 도입유전자에 대해 동형접합성이다(Belfiore, R., Aging Cell. 2019, 18(1):e12873).

[0298] 3xTg-AD 마우스는 CAG 유비쿼터스 프로모터의 제어하에 인간 인슐린을 인코딩하는 5×10^{10} vg/마우스의 AAV1 벡터를 대조를 통해 CSF내로 국소 투여했다. 대조군으로서, 미처리된 3xTg-AD 동물이 사용된다. 이 마우스에서 Y-미로, 개방-필드, 모리스 물 미로로서 여러 거동 테스트가 수행된다. 생후 12개월에, 동물을 안락사시키고, 분석을 위해 혈청 및 조직 샘플을 채취한다.

[0299] 이러한 샘플의 분석은 신경발생(Sox2, NeuN, Dcx와 같은 뉴런 마커의 발현), 신경염증(GFAP, Iba1 및 여러 사이토카인 수준의 발현), 아밀로이드-베타(가용성 아밀로이드 및 플라크)의 수준에 대한 연구, 시냅스 변성(시냅소피신의 단백질 수준과 척추 밀도), tau 인산화 수준에 대한 연구를 포함한다.

[0300] 실시예 5. AAV1-CAG-hInsAsp 및 AAV1-CAG-hInsWt 벡터의 CSF내 투여에 의한 SAMP8 마우스의 단기 및 장기 기억 및 학습 능력 개선

[0301] 본 발명자들은 인지 저하에 대한 인슐린에 의한 뇌의 AAV 매개 유전 공학의 치료 가능성을 평가했다. 이를 위해, 본 발명자들은 8-12개월령까지 인지 저하를 나타내는 SAMP8 마우스 모델을 사용하였다(Miyamoto, M., Physiol Behav. 1986; 38(3):399-406; Markowska, AL., Physiol Behav. 1998; 64(1):15-26).

[0302] 7주령의 수컷 SAMP8 마우스에게 CAG 유비쿼터스 프로모터의 제어하에 인간 인슐린 아스파르트산 또는 인간 인슐린 야생형 코딩 서열을 인코딩하는 5×10^{10} vg/마우스의 AAV1 벡터를 대조를 통해 CSF내에 국소 투여하였다(AAV1-CAG-hInsAsp 및 AAV1-CAG-hInsWt 벡터). 대조군으로서, 미처리 SAMP8 동물 및 미처리 SAM/내성 1(SAMR1) 동물을 사용하였다.

[0303] AAV1-CAG-hInsAsp 및 AAV1-CAG-hInsWt 벡터의 CSF내 투여는 41주령의 SAMP8 마우스의 시상하부, 피질, 해마, 소뇌 및 후각 망울과 같은 뇌의 상이한 영역에서 인간 인슐린의 발현 수준의 증가에 의해 입증되는 바와 같이 뇌에서 인슐린의 광범위한 과발현을 중재했다(도 9).

[0304] 기억에 대한 인슐린을 인코딩하는 바이러스 벡터에 의한 CSF내 치료의 효과를 테스트하기 위해, 33주령에 새로운 물체 인식 테스트를 실시했다. AAV1-CAG-hInsAsp 또는 AAV1-CAG-hInsWt 인코딩 벡터 중 하나로 처리된 SAMP8 마우스는 미처리 SAMP8 코호트보다 현저하게 잘 수행되었고(도 10), 그들의 식별 지수는 SAMR1 미처리 대조군 마우스와 유사하였고, 첫 번째 시험 10분 후(도 10a) 및 24시간 후(도 10b) 모두, 유전자 요법 후 단기 및

장기 기억의 증가를 나타낸다.

[0305]

학습 능력은 39주령의 AAV1-CAG-hInsWt 마우스에서 모리스 물 미로 테스트를 사용하여 평가되었으며, 처리된 마우스의 플랫폼에 처음 들어갈 때까지의 대기 시간이 유전자 요법 치료 후 SAMP8 마우스에서 단축되었고(도 11), CNS에 AAV1-CAG-hInsWt 투여는 SAMP8 마우스의 학습 능력을 향상시킨다는 것을 나타낸다.

서열

서열번호	서열의 설명
1	호모 <i>사피엔스</i> 인슐린의 아미노산 서열
2	무스 <i>무스쿨루스</i> 인슐린의 아미노산 서열
3	<i>카니스 루푸스 파밀리아리스</i> 인슐린의 아미노산 서열
4	호모 <i>사피엔스</i> 인슐린의 뉴클레오티드 서열
5	무스 <i>무스쿨루스</i> 인슐린의 뉴클레오티드 서열
6	<i>카니스 루푸스 파밀리아리스</i> 인슐린의 뉴클레오티드 서열
7	miRT-122a 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
8	miRT-1 을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
9	miRT-152 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
10	miRT-199a-5p 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
11	miRT-199a-3p 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
12	miRT-215 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
13	miRT-192 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
14	miRT-148a 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
15	miRT-194 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
16	miRT-133a 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
17	miRT-206 을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
18	miRT-208a-5p 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
19	miRT-208a-3p 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
20	miRT-499-5p 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열
21	인간 β -글로빈 및 면역글로불린 중쇄 유전자로부터의 인트론으로 구성된 키메라 인트론의 뉴클레오티드 서열
22	CAG 프로모터의 뉴클레오티드 서열
23	CMV 프로모터의 뉴클레오티드 서열
24	CMV 인핸서의 뉴클레오티드 서열
25	미니-CMV 프로모터
26	EF1 α 프로모터
27	RSV 프로모터
28	시냅신 1 프로모터
29	칼슘/칼로둘린 의존성 단백질 키나제 II (CaMKII) 프로모터
30	신경교 섬유성 산성 단백질 (GFAP) 프로모터

[0306]

31	네스틴 프로모터
32	호메오박스 단백질 9 (HB9) 프로모터
33	티로신 하이드록실라제 (TH) 프로모터
34	미엘린 염기성 단백질 (MBP) 프로모터
35	절단된 AAV2 5' ITR
36	절단된 AAV2 3' ITR
37	SV40 폴리아데닐화 신호
38	토끼 β -글로빈 폴리아데닐화 신호
39	CMV 프로모터 및 CMV 인핸서 서열
40	pAAV-CAG-hIns-dmiRT
41	퓨린 절단 부위를 갖는 에이치. 사피엔스 인슐린의 아미노산 서열
42	퓨린 절단 부위를 갖는 에이치. 사피엔스 인슐린 돌연변이체 His-B10-Asp의 아미노산 서열
43	알. 노르베기쿠스 인슐린의 아미노산 서열
44	피. 트로글로다이트 인슐린의 아미노산 서열
45	퓨린 절단 부위를 갖는 에이치. 사피엔스 인슐린의 뉴클레오티드 서열
46	퓨린 절단 부위를 갖는 에이치. 사피엔스 인슐린 돌연변이체 His-B10-Asp의 뉴클레오티드 서열
47	알. 노르베기쿠스 인슐린의 뉴클레오티드 서열
48	피. 트로글로다이트 인슐린의 뉴클레오티드 서열
49	pAAV-CAG-hInsAsp
50	pAAV-CAG-hInsWt

[0307]

[0308] 뉴클레오티드 서열 에이치. 사피엔스 인슐린 (서열번호 4)

ATGGCCCTGTGGATGCGCCTCCTGCCCCCTGCTGGCGCTGCTGGCCCTCTGGGGACCTGA
CCCAGCCGCGAGCCTTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGGAAGCTCTCTA
CCTAGTGTGCGGGGAACGAGGCTTCTTCTACACACCCAAGACCCGCCGGGAGGCAGAGG
ACCTGCAGGTGGGGCAGGTGGAGCTGGGCGGGGGCCCTGGTGCAGGCAGCCTGCAGCC
CTTGGCCCTGGAGGGGTCCCTGCAGAAGCGTGGCATTGTGGAACAATGCTGTACCAGCAT
CTGCTCCCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAG

[0309]

[0310] 아미노산 서열 에이치. 사피엔스 인슐린 (서열번호 1)

MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQV
GQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN

[0311]

[0312] 퓨린 절단 부위를 갖는 뉴클레오티드 서열 에이치. 사피엔스 인슐린 (서열번호 45)

ATGGCCCTGTGGATGCGCCTCCTGCCCCCTGCTGGCGCTGCTGGCCCTCTGGGGACCTGA
CCCAGCCGCGAGCCTTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGGAAGCTCTCTA
CCTAGTGTGCGGGGAACGAGGCTTCTTCTACACACCCAGGACCAAGCGGGAGGCAGAGG
ACCTGCAGGTGGGGCAGGTGGAGCTGGGCGGGGGCCCTGGTGCAGGCAGCCTGCAGCC
CTTGGCCCTGGAGGGGTGCGGACAGAAGCGTGGCATTGTGGAACAATGCTGTACCAGCAT
CTGCTCCCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAG

[0313]

[0314] 퓨린 절단 부위를 갖는 아미노산 서열 에이치. 사피엔스 인슐린 (서열번호 41)

MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPRTKREAEDLQV
GQVELGGGPGAGSLQPLALEGSRQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN

[0315]

[0316] 퓨린 절단 부위를 갖는 뉴클레오타이드 서열 에이치. 사피엔스 인슐린 돌연변이체 (His-B10-Asp) (서열번호 46)

ATGGCCCTGTGGATGCGCCTCCTGCCCCCTGCTGGCGCTGCTGGCCCTCTGGGGACCTGA
CCCAGCCGCAGCCTTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCAGATCTGGTGAAGCTCTCTA
CCTAGTGTGCGGGGAACGAGGCTTCTTCTACACACCCAGGACCAAGCGGGAGGCAGAGG
ACCTGCAGGTGGGGCAGGTGGAGCTGGGCGGGGGCCCTGGTGCAGGCAGCCTGCAGCC
CTTGGCCCTGGAGGGGTCGCGACAGAAGCGTGGCATTGTGGAACAATGCTGTACCAGCAT
CTGCTCCCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAG

[0317]

[0318] 퓨린 절단 부위를 갖는 아미노산 서열 에이치. 사피엔스 인슐린 돌연변이체 (His-B10-Asp) (서열번호 42)

MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLGSDLVLEALYLCGERGFFYTPRTKREAEDLQV
GQVELGGGPGAGSLQPLALEGSRQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN

[0319]

[0320] 뉴클레오타이드 서열 엠. 무스쿨루스(M.musculus) 인슐린 (서열번호 5)

ATGGCCCTGTGGATGCGCTTCCTGCCCCCTGCTGGCCCTGCTCTTCCTCTGGGAGTCCCAC
CCCACCCAGGCTTTTGTCAAGCAGCACCTTTGTGGTTCCACCTGGTGGAGGCTCTCTAC
CTGGTGTGTGGGAGCGTGGCTTCTTCTACACACCCATGTCCCGCCGTGAAGTGGAGGAC
CCACAAGTGGCACAACCTGGAGCTGGGTGGAGGCCCGGGAGCAGGTGACCTTCAGACCTT
GGCACTGGAGGTGGCCAGCAGAAGCGTGGCATTGTAGATCAGTGCTGCACCAGCATCT
GCTCCCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAG

[0321]

[0322] 아미노산 서열 엠. 무스쿨루스 인슐린 (서열번호 2)

MALWMRFLPLLALLFLWESHPTQAFVKQHLGSHLVEALYLCGERGFFYTPMSRREVEDPQ
VAQLELGGGPGAGDLQTLALEVAQQKRGIVDQCCTSICSLYQLENYCN

[0323]

[0324] 뉴클레오타이드 서열 알. 노르베기쿠스(R. norvegicus) 인슐린 (서열번호 47)

atggccctgtggatccgcttctgcccctgtggccctgtctatcctctgggagccccgccctgccaggctttgtcaaacagcacctt
gtgttctcacttggtgaagctctctacctggtgtgtgggagcggtgattctctacacacccatgtccgcccgaagtggaggacc
cacaagtggcacaactggagctgggtggaggcccggggaggtgaccttcagacctggcactggaggtggcccgccagaagc
gcggcatcgtggatcagtgctgcaccagcatctgctctctaccaactggagaactactgcaactag

[0325]

[0326] 아미노산 서열 알. 노르베기쿠스 인슐린 (서열번호 43)

MALWIRFLPLLALLILWEPRPAQAFVKQHLGSHLVEALYLCGERGFFYTPMSRREVEDPQVA
QLELGGGPGAGDLQTLALEVARQKRGIVDQCCTSICSLYQLENYCN

[0327]

[0328] 뉴클레오타이드 서열 씨. 루푸스 파밀리아리스(C. lupus familiaris) 인슐린 (서열번호 6)

atggccctctggatgcgcctcctgcccctgtggccctgtggccctctggcgcccgcccacccagccttcgttaaccagcacct
gtgtggctcccacctgtagaggctctgtacctggtgtgcgggagcgcggtcttctacacgcctaaggcccgccgggaggtgga
ggacctgcaggtgagggacgtggagctgcccggggcgccctggcgagggcgccctgcagccctggccctggagggggccctgc
agaagcgaggcatcgtggagcagtgctgcaccagcatctgctccctctaccagctggagaattactgcaactag

[0329]

[0330] 아미노산 서열 씨. 루푸스 파밀리아리스 인슐린 (서열번호 3)

MALWMRLLPLLALLALWAPAPTRAFVNQHLGSHLVEALYLCGERGFFYTPKARREVEDLQV
RDVELAGAPGEGGLQPLALEGALQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN

[0331]

뉴클레오티드 서열 표. 트로글로다이트(P.troglydites) 인슐린 (서열번호 48)

atggccctgtggatgcgcctcctgccccctgctggtgctgctggccctctggggacctgaccagcctcggcctttgtgaaccaaacct
gtgcggctcccacctgtggaagctctacctaagtgtgcggggaacgaggcttctctacacaccaagaaccgcggggaggcag
aggacctgcagggtggggcagggtggagctgggcgggggcccctgtgctaggcagcctgcagcccttggccctggaggggtcctgc
agaagcgtggtatcgtggaacaatgctgtaccagcatctgctccctctaccagctggagaactactgcaactag

[0333]

[0334]

아미노산 서열 피. 트로글로다이트 인슐린 (서열번호 44)

MALWMRLPLLVLLALWGPDPAFAFVNQHLCSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQV
GQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSIQSLYQLENYCN

[0335]

[0336]

CAG 프로모터의 뉴클레오티드 서열(서열번호 22)

gacattgattattgactgattattaatagtaatcaattacggggcattagttcatagcccataatatggagttccgcgttacataacttacggt
aatggcccgccctggtgacccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggga
cttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtaacgccccctatt
gacgtcaatgacggtaaattggcccgccctggcattatgccagttacatgaccttatgggaccttctacttggcagtaacctactgattag
tcacgtctattaccatggctgagggtgagcccaagttctgcttcaactccccatctccccccctccccaccccaatttgtattatttattt

[0337]

[illegible]

[0338]

[0339]

CMV 프로모터의 뉴클레오티드 서열(서열번호 23)

gtgatgcggttttggcagtaccaaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggattccaagctccaccccaattgacgtcaatggg
agttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactcgcatcgccgcccggtgacgcaaatgggcggtag
gcgtgtacggtgggagggtctatataagcagagct

[0340]

[0341]

CMV 인핸서의 뉴클레오티드 서열(서열번호 24)

ggcattgattatgactagttattaatagtaatacaattacggggtcattagtgtcatagcccataataggagtccgcgttacataactacggt
aataggcccgctggtgacggcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaataggga
cttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgccacttggcagttacatcaagtgtatcatatgccaaagtcgccccctatt
gacgtcaatgacggtaaatggcccgctggtcattatgccagttacatgacctacgggacttctacttggcagttacatctacgtatta
gtcatcgctattaccatg

[0342]

- [0343] CMV 프로모터 및 CMV 인핸서 서열(서열번호 39)
- ggcattgatttactagttattaatagtaataacggtggtcattagttcatagcccatatattggagttccggttacataacttacggt
 aaatggcccgctggctgacgcccacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaataggga
 cttccattgacgtcaatgggtggagtattacggtaaactgcccactggcagttacatcaagtgtatcatatgccaagtccgccccctatt
 gacgtcaatgacggtaaatggccgctggcattatgccagttacatgaccttaccgggacttctacttggcagttacatctacgtatta
 gtcatcgctattaccatgggtgatgcggtttggcagttacaccaatgggctggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccacc
 ccattgacgtcaatgggagttgtttggcaccaaaatcaacgggacttccaaaatgtcgtacaactgcgatgcccgcggcggtga
 cgcaaatgggctggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagct
- [0344]
- [0345] 절단된 AAV2 5' ITR(서열번호 35)
- gcgcgctc gctcgctcac tgaggccgc cgggcaaacg cgggctgcg ggcgacctt ggtcgcccg cctcagtgag
 cgagcgagcg cgagagaggg gagggtgcaa ctccatcact aggggttctt
- [0346]
- [0347] 절단된 AAV2 3' ITR(서열번호 36)
- aggaaacctt agtgatggag ttggccactc cctctctcg cgctcgctcg ctactgagg cggggcgacc aaaggtcgcc
 cgacgccccg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcg
- [0348]
- [0349] 토끼 β -글로빈 폴리아데닐화 신호(3' UTR 및 polyA 신호를 포함하는 토끼 베타-글로빈의 인접 영역)(서열번호 38)
- gatacttttccctctgcaaaaaattatgggacatcatgaagccccttgagcatctgactctggctaataaaggaaatttttatttgcga
 atagtgtgtgaatttttgtgtctcactcggaaggacatatgggagggcaaatcatttaaacatcagaatgagtattgttttagagt
 ttggcaacatatgcccatactgctggctgcatgaacaaagggttggtataaagaggtcatcagttatgaaacagccccctgctgtcca
 ttcttattccatagaaaagcctgactgaggttagattttttatattttgtgtgtatttttttaaacctcctaaaattttcttacatgttt
 actagccagattttctctctcctgactactccagtcagctgtccctcttcttatggagatc
- [0350]
- [0351] miRT 서열
- [0352] miRT-122a (서열번호 7): 5' CAAACACCATTGTCACACTCCA 3', 간에서 발현되는 microRNA-122a (miRBase 데이터베이스 MI0000442에 대한 수탁 번호)의 표적.
- [0353] miRT-152 (서열번호 9): 5' CCAAGTTCTGTCATGCACTGA 3', 간에서 발현되는 microRNA-152 (MI0000462)의 표적.
- [0354] miRT-199a-5p (서열번호 10): 5' GAACAGGTAGTCTGAACACTGGG 3', 간에서 발현되는 microRNA 199a (MI0000242)의 표적.
- [0355] miRT-199a-3p (서열번호 11): 5' TAACCAATGTGCAGACTACTGT 3', 간에서 발현되는 microRNA-199a (MI0000242)의 표적.
- [0356] miRT-215 (서열번호 12): 5'GTCTGTCAATTCATAGGTCAT 3', 간에서 발현되는 microRNA-215(MI0000291)의 표적.
- [0357] miRT-192 (서열번호 13): 5' GTCTGTCAATTCATAGGTCAT 3', 간에서 발현되는 microRNA-192 (MI0000234)의 표적.
- [0358] miRT-148a(서열번호 14): 5' ACAAAGTTCTGTAGTCACTGA 3', 간에서 발현되는 microRNA-148a(MI0000253)의 표적.
- [0359] miRT-194(서열번호 15): 5' TCCACATGGAGTTGCTGTTACA 3', 간에서 발현되는 microRNA-194(MI0000488)의 표적.
- [0360] miRT-133a (서열번호 16): 5' CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA 3', 심장에서 발현되는 microRNA-133a (MI0000450)의 표적.
- [0361] miRT-206(서열번호 17): 5' CCACACACTTCCTTACATTCCA 3', 심장에서 발현되는 microRNA-206(MI0000490)의 표적.
- [0362] miRT-1(서열번호 8): 5' TTACATACTTCTTTACATTCCA 3', 심장에서 발현되는 microRNA-1(MI0000651)의 표적.
- [0363] miRT-208a-5p (서열번호 18): 5' GTATAACCGGGCCAAAAGCTC 3', 심장에서 발현되는 microRNA-208a (MI0000251)의 표적.

[0366] 미니-CMV: cmv 중간 초기 프로모터(서열번호 25)

[0367]

[0369] EF1 α 프로모터의 뉴클레오티드 서열(서열번호 26)

[0370]

[0371]

[0372]

[0373]

[0374]

[0375] 칼슘/칼모둘린 의존성 단백질 키나제 II(CaMKII) 프로모터 (서열번호 29)

taacattatggccttaggtcacttcattcctcctgggttcttctgatttttagaaaatgagatgggggtgcagagagcttcctcagtga
cctgccagggtcacatcagaaatgtcagagctagaactgaactcagattactaatctaaatccatgccttggggcatgcaagta
cgatatacagaaggagtgaactcattagggcagatgaccaatgagtttagaaagaagagtcaggggcagggtacatctacacca
cccgccagccctgggtgagtcagccacgttcacctcattatagttgcctctcctcagtcctaccttgacgggaagcacaagcagaa
actgggacaggagccccaggagaccaaactctcatgttccctctgggaggatgggtgggagagctgtggcagaggcctcagga
ggggccctgctgctcagtggtgacagataggggtgagaaagcagacagagtcattccgtcagcattctgggtctgttggtagtcttct
cacgctaagggtggcggtgtgatgacaaatggctaaaaagcaggggagagctggaagaacaaggacagagacagaggcca

[0376] agtcaaccagaccaatccagaggaagcaagaaccattacagagactacaaggggaagggaaggagagatgaattagc
ttccccgttaaacccttagaaccagctgttccaggggcaacggggcaatacctgtctctcagaggagatgaagttgcagggttaact
acatcctgtcttttcaaggaccatcccagaatgtggcaccactagccgttaccatagcaactgcctctttccccacttaatcccattcc
cgtctgttaaaagggccctatagttggagggtggggaggtaggaagagcgatgactgtggactaagttgttcgcatccccttctc
caacccccctcagtagcatcacctgggggaacagggtccactgtctcggggccacacagtcctgcagtattgtgtatataaggccag
ggcaaagaggagcaggttttaagttaaaggcaggcaggtgttggggaggcagttaccggggcaacgggaacagggcgtttcgg
agggtgttccatggggacctggatgctgacgaaggctcgagggctgtgagcagccacagtgccctgctcagaagccccaagct
cgtcagtaacgcccgttctcgtttgactcaggagcacgggcaggcgagtgggccctagttctgggggcagcgggg

[0377] 신경교 섬유성 산성 단백질 (GFAP) 프로모터 (서열번호 30)

cgcgtagtctaacatatcctggtgtagtaggggacgtgctctgacagaggctcgggggcctgagctgctctgtgagctggga
ggaggcagacagccaggcctgtctgcaagcagacctggcagcattgggtggtcgccccccagggcctccttctatgcccagtg
aatgactcaccttgccacagacacaatgttcgggtgggcacagtgctgtcccgccgacccccagccccctcaaatgccttcc
gagaagccattgagcagggggctgtcattgacccccagcctgacagcctggcatcttgggataaaagcagcacagccccctagg
ggctgcccctgtctgtgtggcgccacggcggtggagaacaaggctctattcagcctgtgccaggaaggggatcaggggatgcc
aggcatgacagtggtgtgaggggggagaggaggctgtctgtctccagaagtccaaggacacaaatgggtgaggggaga
gtctctcccatagctgggtgctggcccaacccccccccctcaggtatccaggggtgtgtccaggggcacccgggcacgcca
gtctagcccactcctcataaagccctcgatcccaggagcgagcagagccagagcaggttgagaggagcgcacaccccgcc
tgctcgcggggtctagagtcga

[0379] 네스틴 프로모터 (서열번호 31)

gaaggcagccccggaggtcaaaggctgggcacgcgggaggagaggccagagtcagaggctcgggtatctcagatatgaag
gaaagatgagagaggctcaggaagaggttaagaaaagacacaagagaccagagaagggaagaattagagaggaggca
gaggaccgtgtctctacagacatagctgttagagactggagggaaggatgaacccctgagcgcaggaagggaagggtggct
gggtgtatattgaggatgtagctgggcccagggaagatcctgcactaaaaatctgaagctaaaaataacaggacacgggtgga
gaggcgaaaggaggcagattgagcagagagactgagaggcctgggatgtgggcattccggtagggcacacagttcactgt
cttctctttccaggaggccaagatgctgacctcaagaactcataataccccagtggggaccaccgcatcagccctgttacaag
aagtgaggagatgtccttttctccagactggaatccattacatcccagggtcaggttctgtgtgtcatctctgtgtgtgttctgt
gggcctacctaaagtctaagcacagctctcaagcagatccgaggcgactaagatgctagtaggggtgtctggagagaagagcc
gaggagggtggctgtgatgagtcagttcagcttcaataaaaaggcggttttatattctgtgtcaggttcgtgaacccctgtgtgggctt
ctccatctgtctgggttagtacctgccactatactggaataaggagacgcctgttccctcgagttggtggacaaggttatgagcatcc
gtgtactattgggttccagcttggtctctggtatgcccgggcccctccccaccggttcgggtccccaccaccacccgctcgtacgt
gcgtctccgctgcagctcttgactatcggggccccgggtcacatgcgtctcgctctataggcgccgccccctgccccccc
ccgcccgcgtgggagccgcagccgcccactcctctctctgcgcgcgcgcgcgtcaccaccgccaccgcccggctgagt
ctgcagtcctccgaaacgggcccctct

[0382] 호메오박스 단백질 9 프로모터 (HB9) 프로모터 (서열번호 32)

tgaataaatftaagcaggctaattaatatataaactagctcaattgtcaagttgattgtatfttagttaattgtgaaagtaattaccacatgg
tcaaattaacagctttctggaatgaccaagcctgaggtttatctctcctgggtgaagaaaattcattttccaagctctgtatgtatga
ataaaagtcataaatctgggtgattgggtcaggcagagctctaaatggctcatttttaggttaataagaatattcatgctctgtttta
atgaaattaatftaagggggatggggctagagtggttagctgatgaattgacaaaaactaatcagctttattgggaaacagggttaag
ggcagcgagctgtcaataacgctcagcctgacccccctctccattagctaggcaggctgattaga

[0383]

[0384] 티로신 하이드록실라제 (TH) 프로모터 (서열번호 33)

ctgctaggggctgctccagctactcctctggtccggtggtgctcctccagcctgtgtgtctgtctggagagcctttaagcctcacttcc
accaactagaagtctctcccaacccctgacctcaagtcacctctcaagtcaggtttagcagctgcagctgggggacctga
atccaccctgctgtctcctgaagacagaaggtgtgggagctgaggtctgggttagagactggctgtatccagagaagtagt
gtgtctctgggctcagattccctctgtagaacaggtttgtgaaatggagaggtgtgtctcctctgagggcctagtgaggagtcacc
atgagtggttaaagatccagctgtctttgtgtgagctttgagaggaggttaacagggctgagttctggaagcctgaccaagggcaga
cttaaggggctctgtgagttgtctcatcaaattggggatgggacacagctaaagtgccagggtctctgtgtcccacagatgcttag
atcttggcagagtggtctaccagctgtctctctgtgtatatatgtattcatagacagtgtagtggtggtgtgtctatcaggct
ggatattggacagaggaagagttgtggcagcagttatctccaagagagtgcaaaagacatcatgtttcaagtttaggcccagggtgcta
ctgagagagctcagacacagacaaaggtctggagagcacatgtcctccacccacctagcttctgtgcaagcacctccagccg
agacaagagaacgaattaaaagcaattttgtgtcagtgtaagacattgcccgaaggttaaatccacattcgtgtgtcagagc
agccccctatgcaggatttttagatacagctcctcctacccctgtgccagctgagcaaacgcccagggtgggtgggtggaacccag
cctgggttgctcaccctgcaatccccccagcacctctaaaggaggacccctgtgtgtggcatgcagacctagggactgggcatag
ataaccttgggttgggcaacagccccactcctcaggttgaaggctaagggtgagccagctctgcctcatgggtgggaatgtctcc
acgtgaccccttctgggtgtggaagaactcagagaagagtcctgggtgagcaggcaggccagggtgtgtgtgggtcatgtttag
acaggagtggtgtaagccagcagagtgctgacccaggaagagttcagaaggggcatggaacatggggaggggtccatagtg
agagagagcaggcagtgacagtaaatagtcctgagctgggggtatgggattgagggagctgtctcagagaaggcagaggag
agatgtctgcgccaagctgggtatcacagagcctcagactcctggaacaggaaactgtgggggtcagggtcagggggaggttaggg
agtgtcccttgtactgacttagcattatcctgctctaggggggaaggggggaggggggtgacagcaaggcagtgatgtgg
caggcagcctgcgggagctcctgttctgtgtgtaaaagctgggaaggaagagggtgggtctggttaagtacagcaggcagttg
gctcctgagagtcgaagccctgtctagagggtgagtgagattcagaggagagctaacgggggtgggggtggggagtcagg
cttctggtcctgctaataactcagtgctgtgggtcctcagaacctcagggtggcattttcagggtgagagctctgtccttggcacttctgc
agactccagatccagaggaataaagatggtactctcctcagttcccttagtgagaggacaccttctctgaagggttgggcagttgtc
ctgaaccattgctgaaggaaggactgactccaggacatagaatgggtcagcataagtcctctgtagtagagaagggtccctc
tctggtctccttagagatcctgttctgtgctgaggaagctaggggtgatttgtgtagtgggtgtggtatgctcactggaatcaaaag
gccccctgtgttagacctgggggtgcatgggagagttgatcagtgctgccccttaccatgggggagcctgagaatggggctgctc
ctagctcgagaccatgatgcaggagtgagtggggaggtcaggatactctaaactaaagcagaggtctgtccccccaggggagggg
aggtcagaagaccctagggagatgcaaaaggctaggggtggcaccatgttgagggtgtgtcttcaaggagatgataatcagagga
atcgaaacctgcaaaagtgggagctcttagatacactatagaggaataatctctgaacattctgtgtctcataggacctgctgagg
accagcccccagtgccagcacatacactggggcagtgagtagatagatactttgtacatgggctggggggacatggcctgtgcct
ggaggggacttgaagacatcaaaaagctagtgagagggtcctagattattgtctccaagggtatataagccttcaacatga
acccttgggttaatccagcatggggcgtcccatatgcctgtgttattagagagctctagatgtctcctgtccagaacaccagccagc
cctgtcttcatgtctgtctaggggcggagggtgattcagaggcaggtgcctgcgacagtggtgcaattagatctaattgggacggag
gcctctctcgtccgtgcctcgtctgtgtcccacccccctcctcaggcacagcaggcgtggagaggatgcgaggaggtagg
agggtgggggacccagaggggctttagctgagcctggcctttaaggaggccgctgctggcaagggcgtggagagagaactcgg
gaccaccagcttgcact

[0385]

[0386]

미엘린 염기성 단백질 (MBP) 프로모터 (서열번호 34)

caccgtggcttaacacttagagaaaatgcatccccctaataaagtcacgacagtggttagatggaggaacggcagtgcgta
gtaggatgcgtgcaagcatagtctcgtgcatgggtgcatagatcgctgggcaggtggacaaggtgggggtggataaagaagtggt
agatgattgatgttaggtaaatacactgggtggacagatgggtgtaggtgtaggtggttagaatagtcagaagaggatggatt
gataaggtgaacagatgataaatgggtgtagactggaagggtgtcaaaagaggataagggaggtgtagctagccgtatttctaa

[0387]

ggtcagtaataagagttgggagaagaggttaagttacatccatttaaacctcacacgaagctgagagggaatggactgtgcccgtgg
tgaggaaagcgttgcatctccgtgtgctggtgtgaagtgtcaggtcccatgaagcagtcaggttactgcggcttacagaggag
ccagatccaaatgccccgagtaagcacgtccccgagccagaggcctccagcggaatccgggagagggattgctcagtgccctgct
tccctggactgtaagctgcagaagatgtgggaagtcctgttctccactgagaacactaaaagcacctttgtcaaacgaccgcttcac
atctggggctgtgactggtggccttttaaccagagacaacccacaagatacctaacctgcggggctctctggtacagtgcgaac
tcaggaaatgcttggctttagtctgtgggtctcaggccatcgccctctggagtgttctttaaagagaacctgaagattggcccctga
gccatgtataccaagcaagctcaatccaggttagctccctctggtggggcaagctaactgtctcttggccccgcgtaactgtgc
gtttataggagacagctagttaagacccaggaagaaagcggttctccctctaggcctctacagggccacattcatatctcat
tgtgtgacaggggagcagatgcgaatccagaacaatgggacctcggtgagacacggcggtgacagactccaagcacacagc
agacccaaagaataactggcaaggcgccccccagctgacccaggaaccgccccactgtatccgctctttcccgagatgcc
ccgggaagggaggacaacacctcaagacagggccctcagagtcgacgagctcagaccatccaagaagatcccacagcagc
ttcgaagaattctgcagtcgacggtaccgcgggcccggtatc

[0388]

SV40 polyA 신호(서열번호 37)

taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaattgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaacctat
tataagctgc aataaacaagtt

[0390]

인간 β -글로빈 및 면역글로불린 중쇄 유전자로부터의 인트론으로 구성된 키메라 인트론 (서열번호 21)

gtaagtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg ctgtcgagacagagaagac tcttgcgttt
ctgataggca cctattggct ttactgacat ccactttgcctttctctcca cag

[0392]

pAAV-CAG-hIns-dmiRT(서열번호 40)

1 AGTGAGCGAG CGAGCGCGCA GCTGCATTAA TGAATCGGCC AACGCGCGGG
51 GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GCGCTCTTC CGCTTCCTCG CTTACTGACT
101 CGCTGCGCTC GGTCTGTCGG CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG
151 GCGGTAATAC GGTATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT
201 GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC
251 TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA
301 CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGAATATAAA GATACCAGGC
351 GTTTCCTCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC
401 TTACCGGATA CTTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GCGCTTTCT
451 CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA
501 GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCGCGACCGC TCGCCTTAT
551 CCGGTAAC TA TCGTCTTGTG TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA
601 CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG
651 TGCTACAGAG TTTCTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGAA
701 CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA
751 GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT
801 TTTTGTGTTG AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAGGA TCTCAAGAAG
851 ATCTTTTGAT CTTTCTTACG GGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAACTCA
901 CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT
951 CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT

[0394]

1001 AAACCTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA
 1051 GCGATCTGTC TATTTCTGTT ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA
 1101 GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA
 1151 TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACCCAG
 1201 CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC
 1251 CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG
 1301 TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTC
 1351 CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCATTGAGC TCCGGTTCCC AACGATCAAG
 1401 GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG
 1451 GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT ATCACTCATG
 1501 GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG
 1551 CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA
 1601 TGCGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG
 1651 CCACATAGCA GAACTTTAAA AGTGCTCATC ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG
 1701 GCGAAAATC TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC
 1751 CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTTACTTT CACCAGCGTT
 1801 TCTGGGTGAG CAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAA AGGGAATAAG
 1851 GGCGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCTTTTT CAATATTATT
 1901 GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT
 1951 ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCCG CGCACATTTT CCCGAAAAGT
 2001 GCCACCTGAC GTCTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA
 2051 ATAGCGGTAT CACGAGGCC TTTCTGCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT
 2101 GAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA
 2151 AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTG
 2201 GCGGGTGTG GGGCTGGCTT AACTATGCGG CATCAGAGCA GATTGTACTG
 2251 AGAGTGCACC ATATGCGGTG TGAAATACCG CACAGATGCG TAAGGAGAAA
 2301 ATACCGCATC AGGCGATTCC AACATCCAAT AAATCATACA GGCAAGGCAA
 2351 AGAATTAGCA AAATTAAGCA ATAAAGCCTC AGAGCATAAA GCTAAATCGG
 2401 TTGTACCAAA AACATTATGA CCCTGTAATA CTTTTGCGGG AGAAGCCTTT
 2451 ATTTCAACGC AAGGATAAAA ATTTTATAGAA CCCTCATATA TTTTAAATGC
 2501 AATGCCTGAG TAATGTGTAG GTAAAGATTC AAACGGGTGA GAAAGGCCGG
 2551 AGACAGTCAA ATCACCATCA ATATGATATT CAACCGTTCT AGCTGATAAA
 2601 TTCATGCCGG AGAGGGTAGC TATTTTGTAG AGGTCTCTAC AAAGGCTATC
 2651 AGGTCAATGC CTGAGAGTCT GGAGCAACA AGAGAATCGA TGAACGGTAA
 2701 TCGTAAACT AGCATGTCAA TCATATGTAC CCCGTTGAT AATCAGAAAA
 2751 GCCCCAAAA CAGGAAGATT GTATAAGCAA ATATTTAAAT TGTAAGCGTT
 2801 AATATTTTGT TAAAATTCGC GTTAAATTTT TGTAAATCA GCTCATTTTT
 2851 TAACCAATAG GCCGAAATCG GCAAAATCCC TTATAAATCA AAAGAATAGA
 2901 CCGAGATAGG GTTGAGTGTG GTTCCAGTTT GGAACAAGAG TCCACTATTA
 2951 AAGAACGTGG ACTCCAACGT CAAAGGGCGA AAAACCGTCT ATCAGGGCGA

[0395]

3001 TGGCCCACTA CGTGAACCAT CACCCTAATC AAGTTTTTTG GGGTCGAGGT
 3051 GCCGTAAAGC ACTAAATCGG AACCCCTAAAG GGAGCCCCCG ATTTAGAGCT
 3101 TGACGGGGAA AGCCGGCGAA CGTGGCGAGA AAGGAAGGA AGAAAGCGAA
 3151 AGGAGCGGGC GCTAGGGCGC TGGCAAGTGT AGCGGTCACG CTGCGCGTAA
 3201 CCACCACACC CGCCGCGCTT AATGCGCCGC TACAGGGCGC GTACTATGGT
 3251 TGCTTTGACG AGCACGTATA ACGTGCTTTC CTCGTTAGAA TCAGAGCGGG
 3301 AGCTAAACAG GAGGCCGATT AAAGGGATTT TAGACAGGAA CGGTACGCCA
 3351 GAATCCTGAG AAGTGTTTTT ATAATCAGTG AGGCCACCGA GTAAAAGAGT
 3401 CTGTCCATCA CGCAAATTAA CCGTTGTGCG AATACTTCTT TGATTAGTAA
 3451 TAACATCACT TGCCTGAGTA GAAGAACTCA AACTATCGGC CTTGCTGGTA
 3501 ATATCCAGAA CAATATTACC GCCAGCCATT GCAACGGAAT CGCCATTTCG
 3551 CATTGAGGCT GCGCAACTGT TGGGAAGGGC GATCGGTGCG GGCCTCTTCC
 3601 ACTGAGGCCC AGCTGCGCGC TCGCTCGCTC ACTGAGGCCG CCCGGGCAAA
 3651 GCGCGGCGCT CGGGCGACCT TTGGTCGCCC GGCCTCAGTG AGCGAGCGAG
 3701 CGCGCAGAGA GGGAGTGGCC AACTCCATCA CTAGGGGTTT CTTGTAGTTA
 3751 ATGATTAACC CGCCATGCTA CTTATCTACT CGACATTGAT TATTGACTAG
 3801 TTATTAATAG TAATCAATTA CGGGGTCATT AGTTCATAGC CCATATATGG
 3851 AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG GCCCGCCTGG CTGACCGCCC
 3901 AACGACCCCC GCCCATTGAC GTCAATAATG ACGTATGTTT CCATAGTAAC
 3951 GCCAATAGGG ACTTTCCATT GACGTCAATG GGTGGAGTAT TTACGGTAAA
 4001 CTGCCCCTT GGCAGTACAT CAAGTGTATC ATATGCCAAG TACGCCCCCT
 4051 ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCATTATG CCCAGTACAT
 4101 GACCTTATGG GACTTTCCTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA TTAGTCATCG
 4151 CTATTACCAT GGTGAGGGTG AGCCCCACGT TCTGCTTCAC TCTCCCCATC
 4201 TCCCCCCCCC CCCCACCCCC AATTTTGTAT TTATTATTTT TTTAATTATT
 4251 TTGTGCAGCG ATGGGGGCGG GGGGGGGGGG GGGGCGCGCG CCAGGCGGGG
 4301 CGGGGCGGGG CGAGGGGCGG GCGGGGCGGA GCGGAGAGG TGCGGCGGCA
 4351 GCCAATCAGA GCGGCGCGCT CCGAAAGTTT CCTTTTATGG CGAGGCGGCG
 4401 GCGGCGGCGG CCCTATAAAA AGCGAAGCGC GCGGCGGGCG GGAGTCGCTG
 4451 CGTTGCCTTC GCGGCGTGCC CCGCTCCGCG CCGCCTCGCG CCGCCCGCCC
 4501 CGGCTCTGAC TGACCGCGTT ACTCCACAG GTGAGCGGGG GGGACGGCCC
 4551 TTCTCCTCCG GCGTGTAAAT AGCGCTTGGT TTAATGACGG CTTGTTTCTT
 4601 TTCTGTGGCT GCGTGAAAGC CTTGAGGGGC TCCGGGAGGG CCCTTTGTGC
 4651 GGGGGGAGCG GCTCGGGGGG TCGGTGCGTG TGTGTGTGCG TGGGGAGCGC
 4701 CGCGTGCGGC TCCGCGCTGC CCGGCGGCTG TGAGCGCTGC GGGCGCGGCG
 4751 CGGGGCTTTG TCGCTCCGCG AGTGTGCGCG AGGGGAGCGC GGGCGGGGGC
 4801 GGTGCCCCGC GGTGCGGGGG GCTGCGAGGG GAACAAAGGC TCGGTGCGGG
 4851 GTGTGTGCGT GGGGGGGTGA GCAGGGGGTG TGGGCGCGTC GGTGCGGCTG
 4901 CAACCCCCC TGACCCCCC TCCCCGAGTT GCTGAGCACG GCGGCGCTTC
 4951 GGGTGCGGGG CTCCGTACGG GCGGTGGCGC GGGGCTCGCC GTGCGGGGCG

[0396]

5001 GGGGGTGGCG GCAGGTGGGG GTGCCGGGCG GGGCGGGGCC GCCTCGGGCC
5051 GGGGAGGGCT CGGGGAGGG GCGCGGCGGC CCCCGGAGCG CCGGCGGCTG
5101 TCGAGGCGCG GCGAGCCGCA GCCATTGCCT TTTATGGTAA TCGTGCAGAG
5151 GGGCGCAGGG ACTTCCTTTG TCCCAAATCT GTGCGGAGCC GAAATCTGGG
5201 AGGCGCCGCC GCACCCCTC TAGCGGGCGC GGGGCGAAGC GGTGCGGCGC
5251 CGGCAGGAAG GAAATGGGCG GGGAGGGCCT TCGTGCCTCG CCGCGCCGCC
5301 GTCCCTTCT CCCTCTCCAG CCTCGGGGCT GTCCGCGGGG GGACGGCTGC
5351 CTTCGGGGGG GACGGGGCAG GCGGGGGTTC GGCTTCTGTC GTGTGACCGG
5401 CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA ACCATGTTCA TGCCTTCTTC TTTTTCCTAC
5451 AGCTCCTGGG CAACGTGCTG GTTATTGTGC TGTCTCATCA TTTTGGCAAA
5501 GAATTGATTA ATTGAGCGA ACGCGTCGAG TCGCTCGGTA CGATTTAAAT
5551 TGAATTGGCC TCGAGCGCAA GCTTGAGCTA GGACCTTCTG CCATGGCCCT
5601 GTGGATGCGC CTCCTGCCCC TGCTGGCGCT GCTGGCCCTC TGGGGACCTG
5651 ACCCAGCCGC AGCCTTTGTG AACCAACACC TGTGCGGCTC AGATCTGGTG
5701 GAAGCTCTCT ACCTAGTGTG CGGGGAACGA GGCTTCTTCT ACACACCCAG
5751 GACCAAGCGG GAGGCAGAGG ACCTGCAGGT GGGGCGAGTG GAGCTGGGCG
5801 GGGGCCCTGG TGCAGGCAGC CTGCAGCCCT TGGCCCTGGA GGGGTCGCGA
5851 CAGAAGCGTG GCATTGTGGA ACAATGCTGT ACCAGCATCT GCTCCCTCTA
5901 CCAGCTGGAG AACTACTGCA ACTAGACGCA GCCGTCGGCC GCTAATTCTA
5951 GATCGCGAAC AAACACCAAT GTCACACTCC AGTATACACA AACACCATTG
6001 TCACACTCCA GATATCACA ACACCATTGT CACACTCCA GCGGAACAAA
6051 CACCATTGTC ACACTCCAAG GCTATTCTAG ATCGCGAATT ACATACTTCT
6101 TTACATTCCA GTATACATTA CATACTTCTT TACATTCCAG ATATCATTAC
6151 ATACTTCTTT ACATTCCAAG GCGAATTACA TACTTCTTTA CATTTCAAGG
6201 CTACCTGAGG CCCGGGGGTA CCTCTTAATT AACTGGCCTC ATGGGCCCTC
6251 CGCTCACTGC CCGCTTTCCA GTCGGGAAAC CTGTCGTGCC AGTCAGGTGC
6301 AGGCTGCCTA TCAGAAGGTG GTGGCTGGTG TGGCCAATGC CCTGGCTCAC
6351 AAATACCACT GAGATCTTTT TCCCTCTGCC AAAAATTATG GGGACATCAT
6401 GAAGCCCTTT GAGCATCTGA CTTCTGGCTA ATAAAGGAAA TTTATTTTCA
6451 TTGCAATAGT GTGTTGGAAT TTTTGTGTGC TCTCACTCGG AAGGACATAT
6501 GGGAGGGCAA ATCATTTAAA ACATCAGAAAT GAGTATTTGG TTTAGAGTTT
6551 GGCAACATAT GCCCATATGC TGGCTGCCAT GAACAAAGGT TGGCTATAAA
6601 GAGGTCATCA GTATATGAAA CAGCCCCCTG CTGTCCATTC CTTATTCCAT
6651 AGAAAAGCCT TGACTTGAGG TTAGATTTTT TTTATATTTT GTTTTGTGTT
6701 ATTTTTTTCT TTAACATCCC TAAAATTTTC CTTACATGTT TTAGTAGCCA
6751 GATTTTTTCT CCTCTCCTGA CTACTCCCAG TCATAGCTGT CCCTCTTCTC
6801 TTATGGAGAT CCCTCGACCT GCAGCCCAAG CTGTAGATAA GTAGCATGGC
6851 GGGTTAATCA TTAACACAA GGAACCCCTA GTGATGGAGT TGGCCACTCC
6901 CTCTCTGCGC GCTCGCTCGC TCACTGAGGC CGGGCGACCA AAGGTCGCCC
6951 GACGCGCGGG CTTTGCCCGG GCGGCCTCAG TGAGCGAGCG AGCGCGCAGC
7001 TGGCGTAA

[0397]

[0398]

AAV2 5' ITR: 3612-3742 bp

[0399]

CAG 프로모터: 3779-5423 bp

[0400]

h인슐린(hIns): 5586-5932 bp

[0401]

dmiRT(miRT-122a의 4개의 카피 및 miRT-1의 4개의 카피): 5943-6203 bp

[0402]

토끼 β-글로빈 polyA 신호(polyA 신호를 포함하는 토끼 베타-글로빈의 3' UTR 및 3' 인접 영역): 6293-6811 bp

[0403]

AAV2 3' ITR: 6870-7000bp

[0404] pAAV-CAG-hInsAsp (서열번호 49)

```

1 AGTGAGCGAG CGAGCGCGCA GCTGCATTAA TGAATCGGCC AACGCGCGGG GAGAGGCGGT
61 TTGCGTATTG GCGCTCTTCG CGTTTCTCTG CTCACTGACT CGTGCGCTC GGTCTTTCGG
121 CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTATCCAC AGAATCAGGG
181 GATAACGCGAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG
241 GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA
301 CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGAATAAA GATACCAGGC GTTTCCCTCT
361 GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC
421 TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GCGCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCT
481 GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCTTCA GCCCGACCGC
541 TGGCCTTAT CCGGTAAC TA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA
601 CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG
661 TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG TATCTGCGCT
721 CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC
781 ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTTCG AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAGGA
841 TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAACTCA
901 CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT
961 TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACCTGGTC TGACAGTTAC
1021 CAATGCTTAA TCCGGAAGC ACCATCTCA GCGATCTGTC TATTTCTGTT ATCCATAGTT
1081 GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC TGCCCCCAGT
1141 GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACCCAG
1201 CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT
1261 ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCCGCGG TTAATAGTTT GCGCAACGTT
1321 GTTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCG CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCATTGAGC
1381 TCCGTTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTTGTGCAA AAAAGCGGTT
1441 AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGT ATCACTCATG
1501 GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTTCTGTG
1561 ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA TGCGGCGACC GAGTTGCTCT
1621 TGCCCGGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAACCTTAAA AGTGCTCATC
1681 ATTGGAAGAA GTTCTTCGGG GCGAAAACTC TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT
1741 TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTTACTTT CACCAGCGTT
1801 TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAAA AGGGAATAAG GCGGACACGG
1861 AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCTTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA TCAGGGTTAT
1921 TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCCG
1981 CGCACATTTT CCCGAAAAGT GCCACCTGAC GTCTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTA
2041 ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCC TTTCTGCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT
2101 GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC
2161 GGGAGCAGAG AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTTG GCGGGTGTG GGGCTGGCTT
2221 AACTATGCGG CATCAGAGCA GATTGTACTG AGAGTGACCC ATATGCGGTG TGAATACCG
2281 CACAGATGCG TAAGGAGAAA ATACCGCATC AGGCGATTCC AACATCCAAT AAATCATACA
2341 GGCAAGGCAA AGAATTAGCA AAATTAAGCA ATAAAGCCTC AGAGCATAAA GCTAAATCGG
2401 TTGTACCAAA AACATTATGA CCCTGTAATA CTTTTGCGGG AGAAGCCTTT ATTTCAACGC
2461 AAGGATAAAA ATTTTTAGAA CCCTCATATA TTTTAAATGC AATGCCTGAG TAATGTGTAG

```

[0405]

2521 GTAAAGATTC AAACGGGTGA GAAAGGCCGG AGACAGTCAA ATCACCATCA ATATGATATT
2581 CAACCGTTCT AGCTGATAAA TTCATGCCGG AGAGGGTAGC TATTTTGTAG AGGTCTCTAC
2641 AAAGGCTATC AGGTCAATTGC CTGAGAGTCT GGAGCAAACA AGAGAATCGA TGAACGGTAA
2701 TCGTAAAACT AGCATGTCAA TCATATGTAC CCCGGTTGAT AATCAGAAAA GCCCCAAAAA
2761 CAGGAAGATT TGTAAAGCAA ATATTTAAAT TGTAAGCGTT AATATTTTGT TAAAAATTCG
2821 GTTAAATTTT TGTTAAATCA GCTCATTTTT TAACCAATAG GCCGAAATCG GCAAAATCCC
2881 TTATAAATCA AAAGAATAGA CCGAGATAGG GTTGAGTGTT GTTCCAGTTT GGAACAAGAG
2941 TCCACTATTA AAGAACGTGG ACTCCAACGT CAAAGGGCGA AAAACCGTCT ATCAGGGCGA
3001 TGGCCCACTA CGTGAACCAT CACCCTAATC AAGTTTTTTG GGGTCGAGGT GCCGTAAAGC
3061 ACTAAATCGG AACCTAAAG GGAGCCCCCG ATTTAGAGCT TGACGGGGAA AGCCGGCGAA
3121 CGTGGCGAGA AAGGAAGGGA AGAAAGCGAA AGGAGCGGGC GCTAGGGCGC TGGCAAGTGT
3181 AGCGGTCACG CTGCGCGTAA CCACCACACC CGCCGCGCTT AATGCGCCG TACAGGGCGC
3241 GTAATATGTT TGCTTTGACG AGCACGTATA ACGTGCTTTC CTCGTTAGAA TCAGAGCGGG
3301 AGCTAAACAG GAGGCCGATT AAAGGGATTT TAGACAGGAA CGGTACGCCA GAATCCTGAG
3361 AAGTGTTTTT ATAATCAGTG AGGCCACCGA GTAAAAGAGT CTGTCCATCA CGCAAATTAA
3421 CCGTTGTGCG AATACTTCTT TGATTAGTAA TAACATCACT TGCCTGAGTA GAAGAACTCA
3481 AACTATCGCG CTGCTGTTGA ATATCCAGAA CAATATTACC GCCAGCCATT GCAACGGAAT
3541 CGCCATTCGC CATTACAGCT GCGCAACTGT TGGGAAGGGC GATCGGTGCG GGCCTCTTCC
3601 ACTGAGGCCG AGTGCAGCGC TCGCTCGCTC ACTGAGGCCG CCCGGGCAAA GCCCGGGCGT
3661 CGGGCGACCT TTGTCGCCCC GGCCTCAGTG AGCGAGCGAG CGCGCAGAGA GGGAGTGGCC
3721 AACTCCATCA CTAGGGGTTT CTTGTAGTTA ATGATTAACC GCCTATGCTA CTTATCTACT
3781 CGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA CGGGGTCATT AGTTCATAGC
3841 CCATATATGG AGTTCGCGT TACATAACTT ACGGTAATG GCCCGCCTGG CTGACCGCCC
3901 AACGACCCCC GCCCATTGAC GTCAATAATG ACGTATGTTT CCATAGTAAC GCCAATAGGG
3961 ACTTTTCTAT AGCGCTTGGT TTAATGACGG CTTGTTTCTT TTCTGTGGCT GCGTGAAGC
4021 CAAGTGTATC ATATGCCAAG TACGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC
4081 TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTATGG GACTTTCTTA CTGGCAGTA CATCTACGTA
4141 TTAGTCATCG CATTACCAT GGTGAGGTG AGCCCCACGT TCTGCTTCA TCTCCCCATC
4201 TCCCCCCCCC CCCCACCCCC AATTTTGTAT TTATTTATTT TTTAATTATT TTGTGCAGCG
4261 ATGGGGGCGG GGGGGGGGGG GGGGCGCGCG CCAGGCGGGG CGGGGCGGGG CGAGGGGCGG
4321 GCGGGGCGGA GGGGAGAGG TCGGGCGGCA GCCAATCAGA GCGGCGCGCT CCGAAAGTTT
4381 CCTTTTATGG CGAGGCGGCG GCGGCGGCGG CCTATAAAAA AGCGAAGCGC GCGGCGGGCG
4441 GGAGTCGCTG CGTTGCCCTT CCCCCGTGCC CCGCTCCGCG CGGCTCGCG CGGCGCGCCC
4501 CGGCTCTGAC TGACCGCGTT ACTCCACAG GTGAGCGGGC GGGACGGCCC TTCTCTCCG
4561 GGCTGTATTT GACGCTTGGT TTAATGACGG CTTGTTTCTT TTCTGTGGCT GCGTGAAGC
4621 CTTGAGGGGC TCCGGGAGGG CCGTTTGTGC GGGGGGAGCG GCTCGGGGGG TCGTGCCTG
4681 TGTGTGTGCG TGGGGAGCGC CGCGTGCGGC TCCGCGCTGC CCGGCGGCTG TGAGCGCTGC
4741 GGGCGCGGCG CGGGGCTTTG TGCCTCCG AGTGTGCGG AGGGAGAGCG GGCAGGGGCG
4801 GGTGCCCCGC GGTGCGGGGG GCTGCGAGGG GAACAAAGGC TCGTGCGGG GTGTGTGCGT
4861 GGGGGGGTGA GCAGGGGGTG TGGGCGCGTC GGTGCGGCTG CAACCCCCC TGCACCCCCC
4921 TCCCCGAGTT GCTGAGCACG GCCCGGCTTC GGGTGCGGGG CTCCGTACGG GGCCTGGGCG
4981 GGGGCTCGCC GTGCCGGGCG GGGGGTGGCG GCAGGTGGGG GTGCCGGGCG GGGCGGGGCC
5041 GCCTCGGGCC GGGGAGGGCT CGGGGGAGGG GCGCGGCGGC CCCCAGAGCG CCGGCGGCTG
5101 TCGAGGCGCG GCGAGCCGCA GCCATTGCCT TTTATGGTAA TCGTGCAGGA GGGCGCAGGG
5161 ACTTCTTTTG TCCCAAATCT GTGCGGAGCC GAAATCTGGG AGGCGCCGCG GCACCCCCCT
5221 TAGCGGGCGC GGGGCGAAGC GGTGCGGCGC CGCAGGAAG GAAATGGGCG GGGAGGGCCT
5281 TCGTGCCTGC CCGCGCCGCC GTCCCCCTCT CCCTCTCCAG CCTCGGGGCT GTCCGCGGGG
5341 GGACGGCTGC CTTGCGGGGG GACGGGGCAG GCGGGGGTTC GGCTTCTGCG GTGTGACCGG
5401 CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA ACCATGTTCA TGCCTTCTTC TTTTCTCTAC AGCTCTTGGG
5461 CAACGTGCTG GTTATTGTGC TGTCTCATCA TTTTGGCAAA GAATTGATTA ATTCGAGCGA
5521 ACGCGTCGAG TCGCTCGGTA CGATTTAAAT TGAATTGGCC TCGAGCGCAA GCTTGAGCTA
5581 GCGTCGACCT TCTGCGATGG CCCTGTGGAT GCGCCTCCTG CCCCTGCTGG CGCTGCTGGC
5641 CCTCTGGGGA CCTGACCCAG CCGCAGCCTT TGTGAACCAA CACCTGTGCG GCTCAGATCT
5701 GGTGGAAGCT CTCTACCTAG TGTGCGGGGA ACGAGGCTTC TTCTACACAC CCAGGACCAA
5761 GCGGGAGGCA GAGGACCTGC AGGTGGGGCA GGTGGAAGCT GCGGGGGGCC CTGGTGACGG
5821 CAGCCTCGAG CCCTTGCGCC TGGAGGGGTC GCGACAGAAG CGTGGCATTG TGGAAACATG
5881 CTGTACCAAG ATCTGCTCCC TCTACCAAGT GGAGAAGTAC TGCAACTAGA CGCAGCGGCT
5941 GACGGTACCC CCGACGCGGC CTAACGGGCC TCATGGGCC TCCGCTCACT GCCCGCTTTC

6001 CAGTCGGGAA ACCTGTCGTG CCAGTCAGGT GCAGGCTGCC TATCAGAAGG TGGTGGCTGG
6061 TGTGGCCAAT GCCCTGGCTC ACAAATACCA CTGAGATCTT TTTCCCTCTG CCAAAAATTA
6121 TGGGGACATC ATGAAGCCCC TTGAGCATCT GACTTCTGGC TAATAAAGGA AATTTATTTT
6181 CATTGCAATA GTGTGTTGGA ATTTTTTGTG TCTCTCACTC GGAAGGACAT ATGGGAGGGC
6241 AAATCATTTA AAACATCAGA ATGAGTATTT GGTTTAGAGT TTGGCAACAT ATGCCCATAT
6301 GCTGGCTGCC ATGAACAAAG GTTGGCTATA AAGAGGTCAT CAGTATATGA AACAGCCCCC
6361 TGCTGTCCAT TCCTTATTTCC ATAGAAAAGC CTTGACTTGA GGTTAGATTT TTTTATATT
6421 TTGTTTTGTG TTATTTTTTT CTTAACAATC CCTAAAATTT TCCTTACATG TTTTACTAGC
6481 CAGATTTTTT CTCTCTCCT GACTACTCCC AGTCATAGCT GTCCCTCTTC TCTTATGGAG
6541 ATCCCTCGAC CTGCGAGCCA AGCTGTAGAT AAGTAGCATG GCGGGTTAAT CATTAACTAC
6601 AAGGAACCCC TAGTGATGGA GTTGGCCACT CCCTCTCTGC GCGCTCGCTC GCTCACTGAG
6661 GCCGGGCGAC CAAAGGTCGC CCGACGCCCG GGCCTTGGCC GGGCGGCCCT AGTGAGCGAG
6721 CGAGCGCGCA GCTGGCGTAA

AAV2 5' ITR: 3601-3742 bp

CAG 프로모터: 3779-5423 bp

h인슐린 아스파르트산(hInsAsp): 5590-5936 bp

토끼 β-글로빈 polyA 신호(polyA 신호를 포함하는 토끼 베타-글로빈의 3' UTR 및 3' 인접 영역): 6025-6543

bp

[0412] AAV2 3' ITR: 6602-6743 bp

[0413] pAAV-CAG-hInsWt (서열번호 50)

```

1 AGTGAGCGAG CGAGCGCGCA GCTGCATTAA TGAATCGGCC AACGCGCGGG GAGAGGCGGT
61 TTGCGTATTG GGCCTCTTC CGCTTCCTCG CTCCTGACT CGCTGCGCTC GGTCTTCGG
121 CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTATCCAC AGAATCAGGG
181 GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG
241 GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC GCGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA
301 CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGAATAAAA GATACCAAGC GTTTCCTCCT
361 GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC
421 TTTCTCCTTT CGGGAAGCGT GGCCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCCG
481 GTGTAGGTCG TTCCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCTTCA GCCCGACCGC
541 TGCGCTTAT CCGGTAACCTA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA
601 CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG
661 TTCTTGAAGT GGTGGCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG TATCTGCGCT
721 CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC
781 ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTTCG AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAGGA
841 TCTCAAGAAG ATCTTTTAT CTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAACTCA
901 CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT
961 TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACCTGGTC TGACAGTTAC
1021 CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTCGTTC ATCCATAGTT
1081 GCCTGACTCC CCGTCTGTGA GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT
1141 GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACAG
1201 CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT
1261 ATTAATTGTT GCCGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT
1321 GTTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCATTACGC
1381 TCCGGTTCCT AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTTGTGCAA AAAAGCGGTT
1441 AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT CGTTGTGAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGT ATCACTCATG
1501 GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTCTGTG
1561 ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA TCGGGCGACC GAGTTGCTCT
1621 TGCCCGCGGT CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAACTTTAAA AGTGCTCATC
1681 ATTGGAAGAC GTTCTTCGGG GCGAAAACTC TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT
1741 TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTACTTT CACCAGCGTT
1801 TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAAA AGGGAATAAG GCGGACACGG
1861 AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA TCAGGGTTAT
1921 TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCGG
1981 CGCACATTTT CCCGAAAAGT GCCACCTGAC GTCTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTA

```

[0414]

2041 ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCC TTTCTGCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT
 2101 GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC
 2161 GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTG GCGGGTGTG GGGCTGGCTT
 2221 AACTATGCGG CATCAGAGCA GATTGTACTG AGAGTGCACC ATATGCGGTG TGAAATACCG
 2281 CACAGATGCG TAAGGAGAAA ATACCGCATC AGGCGATTCC AACATCCAAAT AAATCATACA
 2341 GGCAAGGCAA AGAATTAGCA AAATTAAGCA ATAAAGCCTC AGAGCATAAA GCTAAATCGG
 2401 TTGTACCAAA AACATTATGA CCCTGTAATA CTTTTGCGGG AGAAGCCTTT ATTTCAACGC
 2461 AAGGATAAAA ATTTTATAGAA CCCTCATATA TTTTAAATGC AATGCCTGAG TAATGTGTAG
 2521 GTAAAGATTG AAACGGGTGA GAAAGGCCGG AGACAGTCAA ATCACCATCA ATATGATATT
 2581 CAACCGTTCT AGCTGATAAA TTCATGCCGG AGAGGGTAGC TATTTTGTAG AGGTCTCTAC
 2641 AAAGGCTATC AGGTCAATTG CTGAGAGTCT GGAGCAAAAC AGAGAATCGA TGAACGGTAA
 2701 TCGTAAAACT AGCATGTCAA TCATATGTAC CCCGGTTGAT AATCAGAAAA GCCCCAAAAA
 2761 CAGGAAGATT GTATAAGCAA ATATTTAAAT TGTAAAGCGT AATATTTTGT TAAAAATTCGC
 2821 GTTAAATTTT TGTAAATCA GCTCATTTTT TAACCAATAG GCCGAAATCG GCAAAATCCC
 2881 TTATAAATCA AAAGAATAGA CCGAGATAGG GTTGAGTGTG GTTCCAGTTT GGAACAAGAG
 2941 TCCACTATTA AAGAACGTGG ACTCCAACGT CAAAGGGCGA AAAACCGTCT ATCAGGGCGA
 3001 TGGCCCACTA CGTGAACCAT CACCCTAATC AAGTTTTTTG GGGTCGAGGT GCCGTAAAGC
 3061 ACTAAATCGG AACCTTAAAG GGAGCCCCCG ATTTAGAGCT TGACGGGGAA AGCCGGCGAA
 3121 CGTGGCGAGA AAGGAAGGGA AGAAAGCGAA AGGAGCGGGC GCTAGGGCGC TGGCAAGTGT
 3181 AGCGGTCACG CTGCGCGTAA CCACCACACC CGCCGCGCTT AATGCGCGCG TACAGGGCGC
 3241 GTACTATGGT TGCTTTGACG AGCACGTATA ACGTGCTTTC CTCGTTAGAA TCAGAGCGGG
 3301 AGCTAAACAG GAGGCCGATT AAAGGGATTT TAGACAGGAA CGGTACGCCA GAATCCTGAG
 3361 AAGTGTTTTT ATAATCAGTG AGGCCACCGA GTAAAAGAGT CTGTCCATCA CGCAAAATTA
 3421 CCGTTGTGCG AATGCTTCTT TGATTAGTAA TAACATCACT TGCTGAGTA GAAGAATCA
 3481 AACTATCGGC CTTGCTGGTA ATATCCAGAA CAATATTACC GCCAGCCATT GCAACGGAAT
 3541 CGCCATTGCG CATTGAGCT GCGCAACTGT TGGGAAGGGC GATCGGTGCG GGCTCTTCC
 3601 ACTGAGGCC AGCTGCGCGC TCGCTCGCTC ACTGAGGCCG CCCGGGCAAA GCGCGGCGCT
 3661 GGGGCGACCT TTGGTCGCCC GGCCTCAGTG AGCGAGCGAG CGCGCAGAGA GGGAGTGCC
 3721 AACTCCATCA CTAGGGGTTT CTTGTAGTTA ATGATTAACC CGCCATGCTA CTTATCTACT
 3781 CGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA CGGGGTCTAT AGTTCATAGC
 3841 CCATATATGG AGTTCGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG GCCCGCTGG CTGACCGCCC
 3901 AACGACCCCC GCCCATTTGAC GTCAATAATG ACGTATGTTC CCATAGTAAC GCCAATAGGG
 3961 ACTTTCCATT GACGTCAATG GGTGGAGTAT TTACGGTAAA CTGCCCACTT GGCAGTACAT
 4021 CAAGTGATC ATATGCCAAG TACGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC
 4081 TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTATGG GACTTTCCTA CTTGCGAGTA CATCTACGTA
 4141 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGAGGGTG AGCCCCACGT TCTGCTTAC TCTCCCCATC
 4201 TCCCCCCCCT CCCCCCCCC AATTTTGTAT TTATTTATTT TTTAATTATT TTGTGCAGCG
 4261 ATGGGGGCGG GGGGGGGGGG GGGGCGCGCG CCAGGCGGGG CGGGGCGGGG CGAGGGGCGG
 4321 GCGGGGCGGA GCGGAGAGG TGCGGCGGCA GCCAATCAGA GCGGCGCGCT CCGAAAGTTT
 4381 CCTTTTATGG CGAGGCGGCG GCGGCGGCGG CCTATAAAA AGCGAAGCGC GCGGCGGGCG
 4441 GGAGTCGCTG CGTTGCCTTC GCCCCGTGCC CGCTCCGCG CGGCTCGCG CCGCCCGCCC
 4501 CGGCTCTGAC TGACCGCGTT ACTCCACAG GTGAGCGGGC GGGACGGCCC TTCTCTCCG
 4561 GGCTGTAATT AGCGTTTGGT TTAATGACGG CTTGTTTCTT TTCTGTGGCT GCGTGAAGC
 4621 CTTGAGGGG TCCGGGAGGG CCTTTTGTGC GGGGGGAGCG GCTCGGGGGG TGCGTGCGTG
 4681 TGTGTGTGCG TGGGAGCGC CGCGTGCGGC TCCGCGCTGC CCGCGGGCTG TGAGCGCTGC
 4741 GGGCGCGGCG CGGGGCTTTG TCGCTCCGC AGTGTCGCG AGGGGAGCGC GGCCGGGGG
 4801 GGTGCCCCCG GGTGCGGGG GCTGCGAGGG GAACAAAGGC TCGTGCGGG GTGTGTGCGT
 4861 GGGGGGGTGA GCAGGGGGTG TGGGCGCGTC GGTGCGGCTG CAACCCCCC TGACCCCCC
 4921 TCCCCGAGTT GCTGAGCAG GCCCGGCTTC GGGTGCGGGG CTCCGTACGG GCGTGCGCG
 4981 GGGGCTCGCC GTGCCGGGCG GGGGGTGCG GCAGGTGGGG GTGCCGGGCG GGGCGGGGCC
 5041 GCCTCGGGCC GGGGAGGGCT CGGGGAGGG GCGCGGCGGC CCCCGGAGCG CCGGCGGCTG
 5101 TCGAGGCGCG GCGAGCCGCA GCCATTGCCT TTTATGTTAA TCGTGCGAGA GGGCGCAGGG
 5161 ACTTCCTTTG TCCCAATCT GTGCGGAGCC GAAATCTGG AGGCGCCGCC GCACCCCCC
 5221 TAGCGGGCGC GGGGCGAAGC GGTGCGGCG CGGCAGGAAG GAAATGGGCG GGGAGGGCCT
 5281 TCGTGCGTCG CCGCGCCGCC GTCCCTTCT CCCTCTCCAG CCTCGGGCT GTCCGCGGGG
 5341 GGACGCTGCG CTTGCGGGG GACGGGCGAG GCGGGGTTT GGTCTCTGGC GTGTGACCGG
 5401 CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA ACCATGTTCA TGCCTTCTTC TTTTCTCTAC AGCTCCTGGG
 5461 CAACGTGCTG GTTATTGTGC TGTCTCATCA TTTTGCAAA GAATTGATTA ATTCGAGCGA

5521 ACGCGTCGAG TCGCTCGGTA CGATTAAAT TGAATTGGCC TCGAGCGCAA GCTTGAGCTA
5581 GCGTCGAGGG GTCGACATGG CCCTGTGGAT GCGCCTCTG CCCCTGCTGG CGCTGCTGGC
5641 CCTCTGGGGA CCTGACCCAG CCGCAGCCTT TGTGAACCAA CACCTGTGCG GCTCACACCT
5701 GGTGGAAGCT CTCTACCTAG TGTGCGGGGA ACGAGGCTTC TTCTACACAC CCAGGACCAA
5761 GCGGGAGGCA GAGGACCTGC AGGTGGGGCA GGTGGAGCTG GCGGGGGGCC CTGGTGCAAG
5821 CAGCCTGCAG CCCTTGCCCC TGGAGGGGTC GCGACAGAAG CGTGGCATTG TGAACAATG
5881 CTGTACCAAGC ATCTGCTCCC TCTACCAAGCT GGAGAATAC TGCAACTAGG TCGACCCCTC
5941 GACGGTACCC CCGACGCGGC CTAAGTGGCC TCATGGGCTT TCCGCTCACT GCCCGCTTTC
6001 CAGTCGGGAA ACCTGTCTG CCAAGTCAGGT GCAGGCTGCC TATCAGAAGG TGGTGGCTGG
6061 TGTGGCCAAT GCCCTGGCTC ACAAATACCA CTGAGATCTT TTTCCCTCTG CCAAAAATTA
6121 TGGGGACATC ATGAAGCCCC TTGAGCATCT GACTTCTGGC TAATAAAGGA AATTTATTTT
6181 CATTGCAATA GTGTGTTGGA ATTTTTTGTG TCTCTCACTC GGAAGGACAT ATGGGAGGGC
6241 AAATCATTTA AAACATCAGA ATGAGTATTT GGTTTAGAGT TTGGCAACAT ATGCCCATAT
6301 GCTGGCTGCC ATGAACAAAG GTTGGCTATA AAGAGGTCAT CAGTATATGA AACAGCCCCC
6361 TGCTGTCCAT TCCTTATTCC ATAGAAAAGC CTTGACTTGA GGTTAGATTT TTTTATATT
6421 TTGTTTTGTG TTATTTTTTT CTTTAACATC CCTAAAATTT TCCTTACATG TTTTACTAGC
6481 CAGATTTTTC CTCCTCTCCT GACTACTCCC AGTCATAGCT GTCCCTCTTC TCTTATGGAG
6541 ATCCCTCGAC CTGCAGCCCA AGCTGTAGAT AAGTAGCATG GCGGGTTAAT CATTAACTAC
6601 AAGGAACCCC TAGTGATGGA GTTGGCCACT CCCTCTCTGC GCGCTCGCTC GCTCACTGAG
6661 GCCGGGCGAC CAAAGGTCGC CCGACGCCCG GGCTTTGCCC GGGCGGCCTC AGTGAGCGAG
6721 CGAGCGCGCA GCTGGCGTAA

[0416]

[0417]

AAV2 5' ITR: 3601-3742 bp

[0418]

CAG 프로모터: 3779-5423 bp

[0419]

h인슐린 야생형 (hInsWt): 5597-5929 bp

[0420]

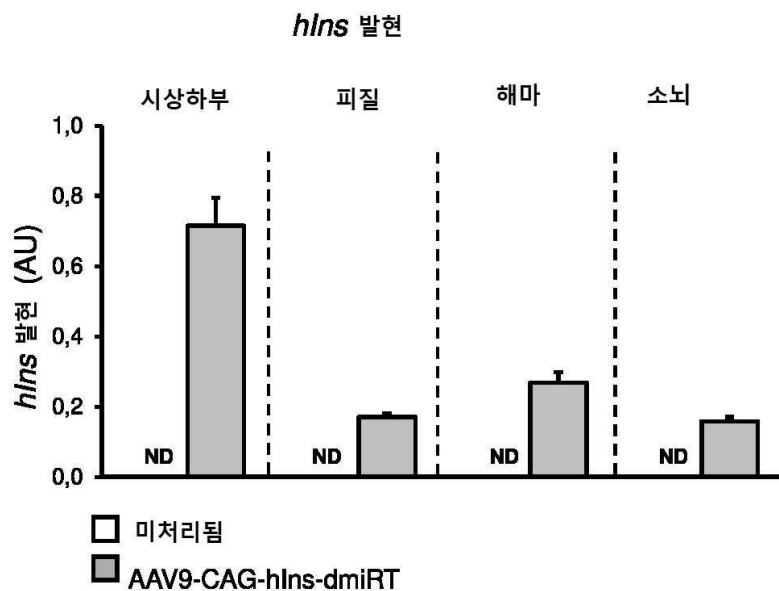
토끼 β -글로빈 polyA 신호(polyA 신호를 포함하는 토끼 베타-글로빈의 3' UTR 및 3' 인접 영역): 6025-6543 bp

[0421]

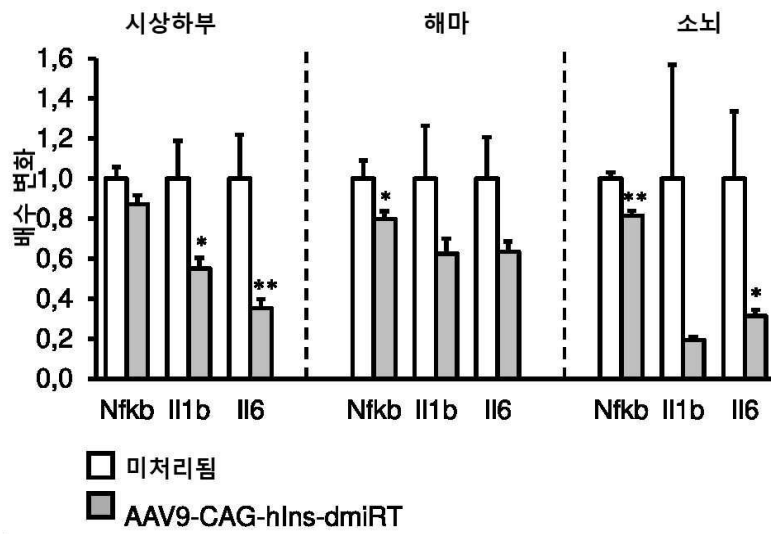
AAV2 3' ITR: 6602-6743 bp

도면

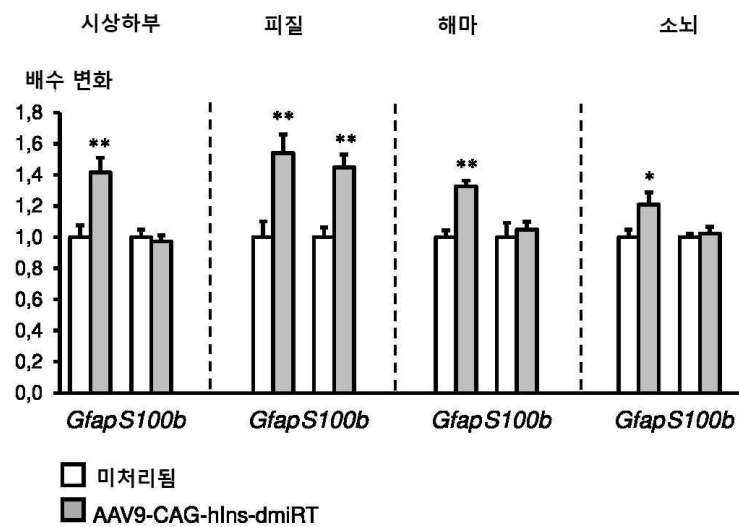
도면1



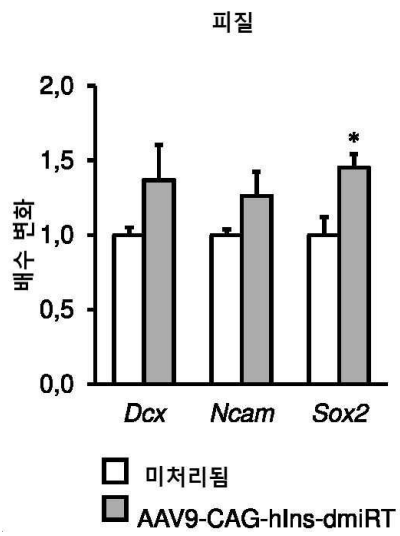
도면2



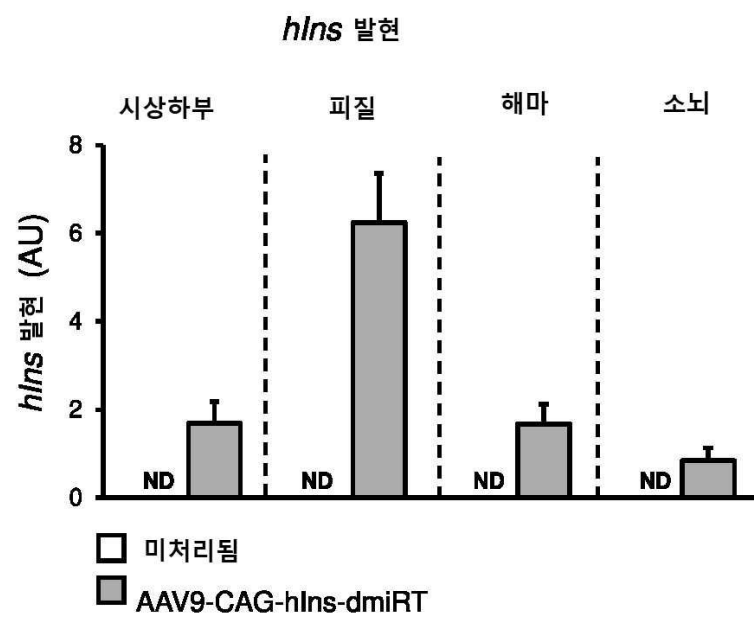
도면3



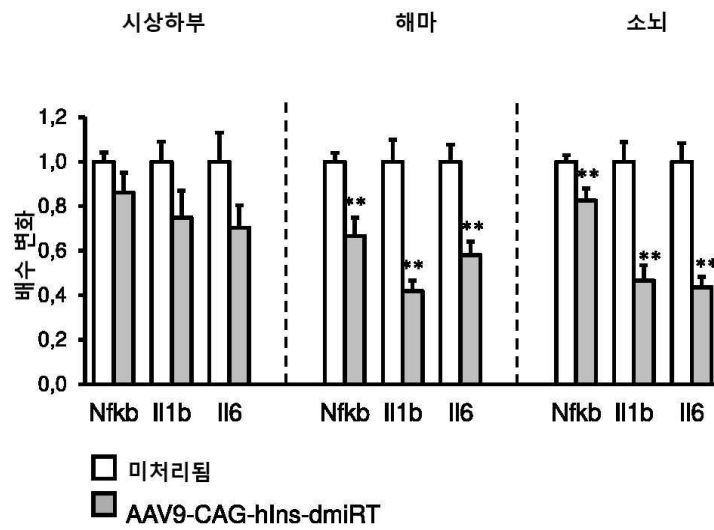
도면4



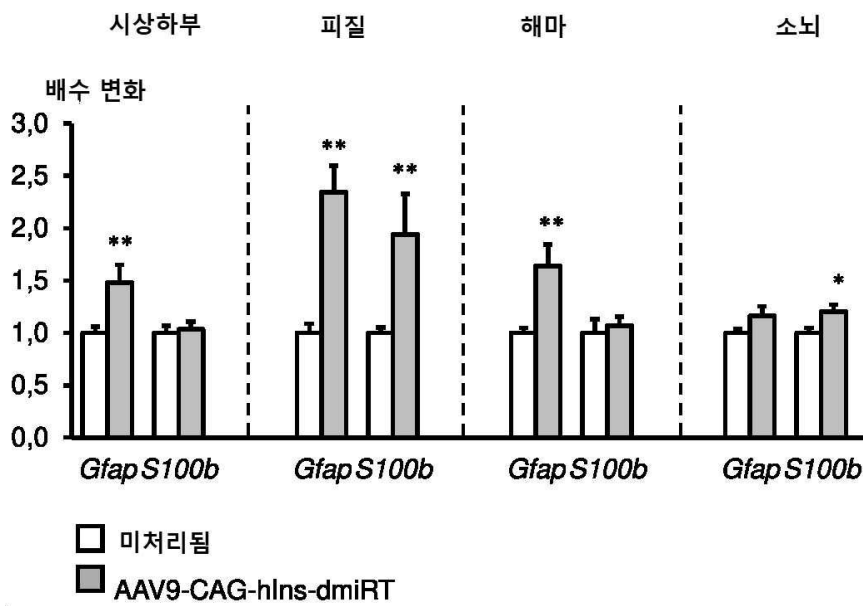
도면5



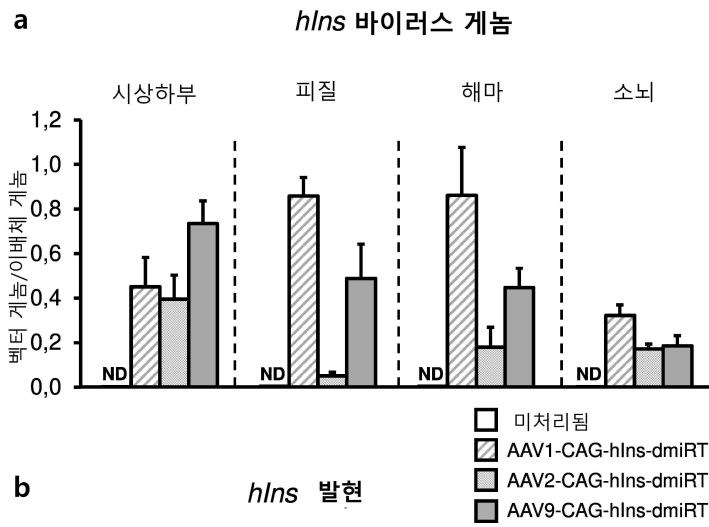
도면6



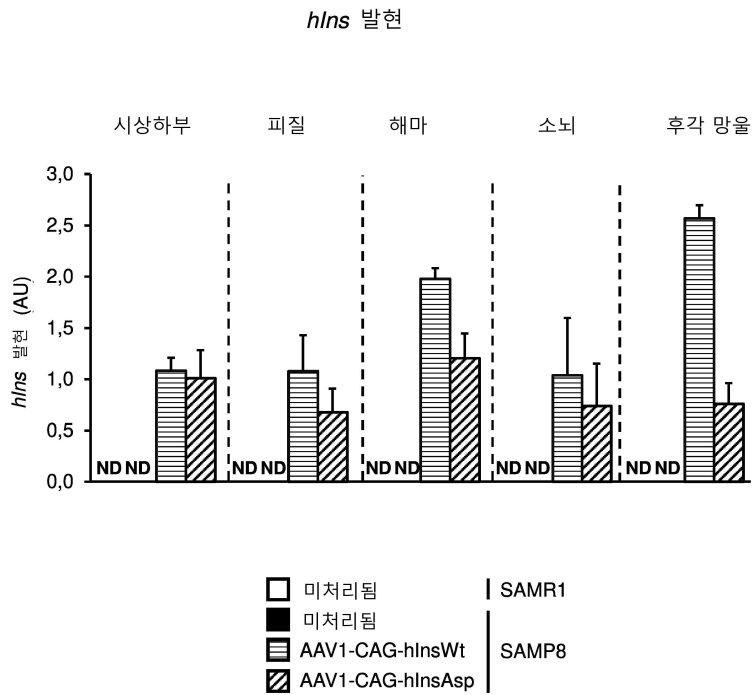
도면7



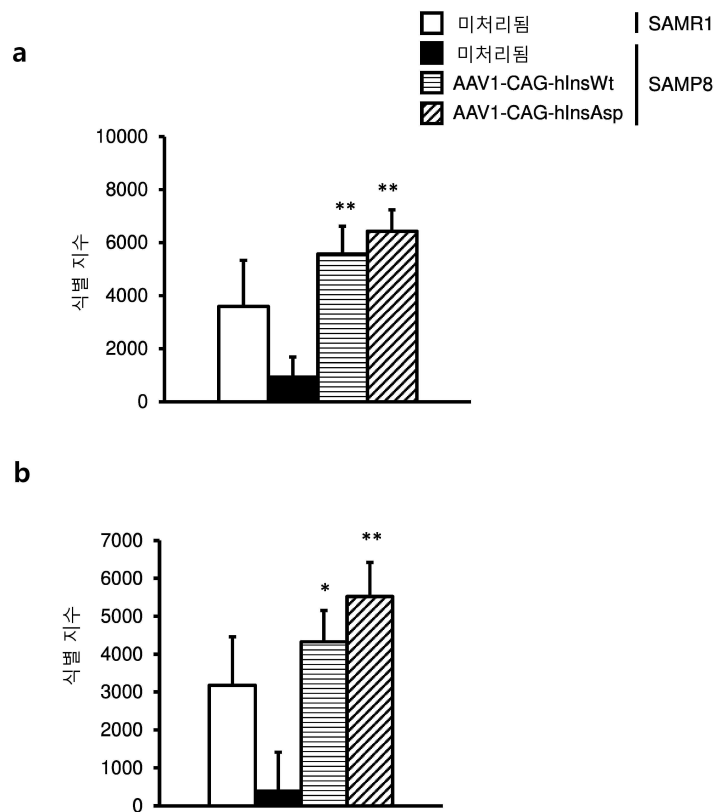
도면8



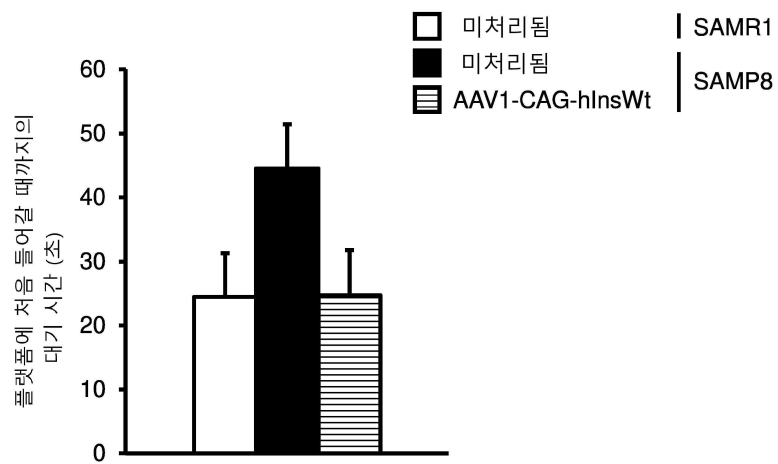
도면9



도면10



도면11



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Universitat Aut?oma de Barcelona

<120> Insulin gene therapy

<130> P6080613PCT

<150> EP19382447.1

<151> 2019-05-31

<160> 50

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu

1 5 10 15

Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly

20 25 30

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe

35 40 45

Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly

50 55 60

Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu

65 70 75 80

Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys

85 90 95

Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

100 105 110

<210> 2

<211> 110

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Ala Leu Trp Met Arg Phe Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Phe Leu

1 5 10 15

Trp Glu Ser His Pro Thr Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly

20 25 30

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe

35 40 45
Phe Tyr Thr Pro Met Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Ala
50 55 60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr Leu
65 70 75 80
Ala Leu Glu Val Ala Gln Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys
85 90 95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

100 105 110

<210> 3

<211> 110

<212> PRT

<213> Canis lupus familiaris

<400> 3

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15
Trp Ala Pro Ala Pro Thr Arg Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
20 25 30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
35 40 45

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

<210> 4

<211> 333

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atggccctgt ggatgcgcct cctgccccctg ctggcgctgc tggccctctg gggacctgac	60
ccagccgcag cctttgtgaa ccaacacctg tgcggctcac acctggtgga agctctctac	120
ctagtgtgcg gggaacgagg cttcttctac acaccaaga cccgccggga ggcagaggac	180
ctgcaggtgg ggcaggtgga gctgggcggg ggccctggtg caggcagcct gcagcccttg	240
gccctggagg ggtccctgca gaagcgtggc attgtggaac aatgctgtac cagcatctgc	300
tccctctacc agctggagaa ctactgcaac tag	333

<210> 5

<211> 333

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 5

atggccctgt ggatgcgctt cctgccccctg ctggccctgc tcttctctg ggagtccac	60
cccacccagg cttttgtcaa gcagcacctt tgtggttccc acctggtgga ggctctctac	120
ctggtgtgtg gggagcgtgg cttcttctac acacccatgt cccgccgtga agtggaggac	180
ccacaagtgg cacaactgga gctgggtgga ggcccgggag caggtagcct tcagaccttg	240
gcactggagg tggcccagca gaagcgtggc attgtagatc agtgtgtcac cagcatctgc	300
tccctctacc agctggagaa ctactgcaac tag	333

<210> 6

<211> 333

<212> DNA

<213> Canis lupus familiaris

<400> 6

atggccctct ggatgcgcct cctgccccctg ctggccctgc tggccctctg ggcgcccgcg	60
cccacccgag ctttcgttaa ccagcacctg tgtggctccc acctggtaga ggctctgtac	120
ctggtgtgcg gggagcgcgg cttcttctac acgcctaagg cccgccggga ggtggaggac	180
ctgcaggtga gggacgtgga gctggccggg ggcctggcg agggcggcct gcagccctg	240
gccctggagg gggccctgca gaagcgaggc atcgtggagc agtgtgtcac cagcatctgc	300
tccctctacc agctggagaa ttactgcaac tag	333

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence
 <220><223> miRT-122a
 <400> 7
 caaacaccat tgcacactc ca 22
 <210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> miRT-1
 <400> 8
 ttacatactt ctttacattc ca 22
 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> miRT-152
 <400> 9
 ccaagttctg tcatgcactg a 21

 <210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> miRT-199a-5p
 <400> 10
 gaacaggtag tctgaacact ggg 23
 <210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> miRT-199a-3p
 <400> 11
 taaccaatgt gcagactact gt 22
 <210> 12
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> miRT-215
 <400> 12
 gtctgtcaat tcataggta t 21

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> miRT-192
 <400> 13
 ggctgtcaat tcataggta g 21

<210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> miRT-148a
 <400> 14
 acaaagttct gtagtgact ga 22

<210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> miRT-194
 <400> 15
 tccacatgga gttgctgtta ca 22

<210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> miRT-133a
 <400> 16
 cagctggttg aaggggacca aa 22

<210> 17
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> miRT-206
 <400> 17
 ccacacactt ccttacattc ca 22
 <210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> miRT-208a-5p
 <400> 18
 gtataaccg ggccaaaagc tc 22

 <210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> miRT-208a-3p
 <400> 19
 acaagctttt tgctcgtctt at 22
 <210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> miRT-499-5p
 <400> 20
 aaacatcact gcaagtctta a 21
 <210> 21
 <211> 133
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> chimeric intron composed of introns from human beta-globin and

immunoglobulin heavy chain genes

<400> 21

gtaagtatca aggttacaag acaggttttaa ggagaccaat agaaactggg ctgtgcgaga 60
cagagaagac tcttgcgttt ctgataggca cctattgggtc ttactgacat ccactttgcc 120
tttctctcca cag 133

<210> 22

<211> 1671

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> CAG promoter

<400> 22

gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60
catatatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgcca 120
acgacccccg ccattgacg tcaataatga cgtatgttc catagtaacg ccaataggga 180

ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240
aagtgtatca tatgccaaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgct 300
ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360
tagtcatcgc tattaccatg gtcgaggtga gccccacgtt ctgcttact ctccccatct 420
ccccccctc cccaccccca attttgtatt tatttatatt ttaattattt tgtgcagcga 480
tgggggcggg gggggggggg gggcgcgcg caggcggggc ggggcggggc gaggggcggg 540
gcggggcgag gcggagaggt gcggcggcag ccaatcagag cggcgcgctc cgaaagtttc 600

cttttatggc gaggcggcgg cggcggcggc cctataaaaa gcgaagcgcg cggcggcgcg 660
gagtcgtgc gttgccctcg ccccgctgcc cgctccgcgc cgcctcgcgc cggccgcccc 720
ggctctgact gaccgcgtta ctcccacagg tgagcgggcg ggacggccct tctcctccgg 780
gctgtaatta gccttggtt taatgacggc ttgtttcttt tctgtggctg cgtgaaagcc 840
ttgaggggct ccgggagggc cctttgtgcg gggggagcgg ctcggggggt gcgtgcgtgt 900
gtgtgtgcgt ggggagcgcc gcgtcggct ccgcgctgcc cggcggtgt gagcgtgcg 960
ggcgcgcgcg ggggctttgt gcgtccgca gtgtgcgca ggggagcgc gccggggcg 1020

gtgccccgcg gtgcgggggg ctgcgagggg aacaaaggct gcgtgcggg tgtgtgcgtg 1080
ggggggtgag cagggggtgt gggcgcgctg gtcgggtgc aacccccct gcacccccct 1140
ccccgagttg ctgagcacgg cccgcttcg ggtgcggggc tccgtacggg gcgtggcgcg 1200

gggctcgccg tgccgggcgg ggggtggcgg caggtggggg tgccgggcgg ggcggggccg 1260
 cctcgggcgg gggagggtc gggggagggg cgccggcgcc cccggagcgc cggcggtgt 1320
 cgaggcgccg cgagccgcag ccattgcctt ttatggtaat cgtgcgagag ggcgcaggga 1380
 cttcctttgt cccaaatctg tgcggagccg aaatctggga ggcgccgccc caccctct 1440

 agcgggcgcg gggcgaagcg gtgcggcgcc ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt 1500
 cgtgcgtcgc cgcgcgcggc tcccccttc cctctccagc ctcggggctg tccgcggggg 1560
 gacggctgcc ttgggggggg acggggcagg gcgggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc 1620
 ggctctagag cctctgctaa ccatgttcat gccttcttct ttttctaca g 1671

 <210> 23
 <211> 212
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> CMV promoter
 <400> 23

 gtgatcggt ttggcagta caccaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt 60
 ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaaa tcaacgggac 120

 tttccaaaat gtcgtaacaa ctgcgacgc cgcgccggtt gacgcaaag ggcggtaggc 180
 gtgtacgggtg ggaggtctat ataagcagag ct 212

 <210> 24
 <211> 380
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> CMV enhancer
 <400> 24

 ggcattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60
 cataatatga gtccgcgtt acataactta cggtaaattg cccgcctggc tgaccgcca 120
 acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 180
 ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240

 aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgct 300
 ggcattatgc ccagtacatg accttacggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360
 tagtcatcgc tattaccatg 380

 <210> 25

<211> 411

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> mini-CMV promoter

<400> 25

tatgccaaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgctt ggcattatgc	60
ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc	120
tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc	180
acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcaccaaaa	240
tcaacgggac ttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc ttagcgcaaa tgggcggtag	300
gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctctctgg ctaactagag aaccactgc	360
ttaactggct tatcgaaatt aatacgactc actataggga gaccaagct t	411

<210> 26

<211> 1178

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> EF1alpha promoter

<400> 26

ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgcca cagtccccga gaagttgggg	60
ggaggggtcg gcaattgaac cggcgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt	120
gatgtcgtgt actggctccg cctttttccc gaggggtggg gagaaccgta tataagtga	180
gtagtgcgag tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgcc	240
gtgtgtggtt cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg gcccttgctg gccttgaatt	300
acttccactg gctgcagtac gtgattcttg atcccagct tcgggttgga agtgggtggg	360
agagtccgag gccttgctgt taaggagccc cttcgcctcg tgcttgagtt gaggcctggc	420
ctgggcgctg gggccgccc gtgcgaatct ggtggcacct tcgcgcctgt ctgcctgctt	480
tcgataagtc tctagccatt taaaattttt gatgacctgc tgcgacgctt tttttctggc	540
aagatagtct tgtaaattcg ggccaagatc tgcacactgg tatctcggtt tttggggccg	600
cgggcggcga cggggcccg gcgtcccagc gcacatgttc ggcgaggcgg ggcctgcgag	660
cgcgccacc gagaatcgga cgggggtagt ctcaagctgg ccggcctgct ctggtgcctg	720
gcctcgcgcc gccgtgtatc gcccgcctt gggcggcaag gctggcccgg tcggcaccag	780
ttgcgtgagc ggaaagatgg ccgcttccc gcctgtctgc agggagctca aaatggagga	840

cgcggcgctc gggagagcgg gcgggtgagt cacccacaca aaggaaaagg gcctttccgt 900
cctcagccgt cgcttcatgt gactccacgg agtaccgggc gccgtccagg cacctcgatt 960

agttctcgag cttttggagt acgtcgtctt taggttgggg ggagggggtt tatgcgatgg 1020
agtttcccca cactgagtgg gtggagactg aagttaggcc agcttggcac ttgatgtaat 1080
tctccttgga atttgcctt tttgagtttg gatcttggtt cattctcaag cctcagacag 1140
tggttcaaag ttttttctt ccatttcagg tgcgtga 1178

<210> 27
<211> 623
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> RSV promoter
<400> 27

catgtttgac agcttatcat cgcagatccg tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg 60
atgccgcata gtttaagccag tatctgctcc ctgcttgtgt gttggaggtc gctgagtagt 120

gcgcgagcaa aatttaagct acaacaaggc aaggcttgac cgacaattgc atgaagaatc 180
tgcttagggg taggcgtttt gcgctgcttc gcgatgtacg ggccagatat tcgcgtatct 240
gaggggacta ggggtgtgtt aggcgaaaag cggggcttcg gttgtacgcg gttaggagtc 300
ccctcaggat atagtagttt cgcttttgca tagggagggg gaaatgtagt cttatgcaat 360
actctttag tagtctgaaca tggtaacgat gagtttagcaa catgccttac aaggagagaa 420
aaagcaccgt gcatgccgat tgggtggaagt aagggtgtac gatcgtgcct tattaggaag 480
gcaacagacg ggtctgacat ggattggacg aaccactaaa ttccgcattg cagagatatt 540

gtatttaagt gcctagctcg atacaataaa cgccatttga ccattcacca cattggtgtg 600
cacctccaag ctgggtacca gct 623

<210> 28
<211> 448
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> Synapsin 1 promoter
<400> 28

ctgcgtcttc aggcacgaca cgactcctcc gctgcccacc gcagactgag gcagcgctga 60
gtcgccggcg ccgcagcgca gatggtcgcg cccgtgcccc cctatctcgc gcctcgcgtg 120
gtgcggtccg gctgggcccgg cggcggcgcg gacgcgacca aggtggccgg gaaggggagt 180

ttgcggggga ccggcgagtg acgtcagcgc gccttcagtg ctgaggcggc ggtggcgcgc 240

gccgccaggc gggggcgaag gcactgtccg cggtgctgaa gctggcagtg cgcacgcgcc 300

tcgcccatc ctgtttcccc tccccctctc tgataggga tgcgcaattt ggggaatggg 360

ggttgggtgc ttgtccagtg ggtcggggtc ggtcgtcagg taggcacccc caccgcct 420

catcctggtc ctaaaacca ctgtcact 448

<210> 29

<211> 1296

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) promoter

<400> 29

taacattatg gccttaggtc acttcatctc catggggttc ttcttctgat ttctagaaa 60

atgagatggg ggtgcagaga gcttcctcag tgacctgcc aggtcacat cagaaatgtc 120

agagctagaa cttagaacta gattactaat cttaaattcc atgccttggg ggcattgcaag 180

tacgatatac agaaggagtg aactcattag ggcagatgac caatgagttt aggaaagaag 240

agtcaggggc aggttacatc tacaccacc gccagccct gggtgagtc agccacgttc 300

acctcattat agttgcctct ctccagtcct accttgacgg gaagcacaag cagaaactgg 360

gacaggagcc ccaggagacc aaatcttcat ggtccctctg ggaggatggg tggggagagc 420

tgtggcagag gcctcaggag gggccctgct gctcagtggt gacagatagg ggtgagaaag 480

cagacagagt cattccgtca gcattctggg tctgtttggt acttcttctc acgctaaggt 540

ggcgggtgtga tatgcacaat ggctaaaaag caggagagc tggaaagaaa caaggacaga 600

gacagaggcc aagtcaacca gaccaattcc cagaggaagc aaagaaacca ttacagagac 660

tacaaggggg aagggaagga gagatgaatt agcttccct gtaaacctta gaaccagct 720

gttgccagg caacggggca atacctgtct ctccagagga gatgaagttg ccagggtaac 780

tacatcctgt ctttctcaag gaccatccca gaatgtggca cccactagcc gttacatag 840

caactgcctc ttgccccac ttaatcccat cccgtctgtt aaaagggcc tatagttgga 900

ggtgggggag gtaggaagag cgatgatcac ttgtggacta agtttgttcg catcccttc 960

tccaaccccc tcagtacatc accttggggg aacagggtcc acttgctcct gggccacac 1020

agtcctgcag tattgtgtat ataaggccag ggcaaagagg agcaggtttt aaagtgaaag 1080

gcaggcaggt gttggggagg cagttaccgg ggcaacggga acagggcgtt tcggaggtgg 1140

ttgccatggg gacctggatg ctgacgaagg ctgcgaggc tgtgagcagc cacagtcccc 1200

tgctcagaag cccaagctc gtcagtcaag ccggttctcc gtttgactc aggagcacgg 1260
gcaggcgagt ggcccctagt tctgggggca gcgggg 1296

<210> 30

<211> 706

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Glial fibrillary acidic protein (GFAP) promoter

<400> 30

cgctgatct aacataatcct ggtgtggagt aggggacgct gctctgacag aggctcgggg 60
gcctgagctg gctctgtgag ctggggagga ggagacagc caggccttgt ctgcaagcag 120
acctggcagc attgggctgg cggccccca gggcctctc ttcattgcca gtgaatgact 180
caccttgga cagacacaat gttcgggtg ggcacagtgc ctgcttccg ccgacccca 240
gccccctca aatgccttcc gagaagcca ttgagcagg ggcttgcat gcacccagc 300

ctgacagcct ggcatcttgg gataaaagca gcacagcccc ctaggggctg cctttgctgt 360
gtggcgccac cggcgggtga gaacaaggct ctattcagcc tgtgcccagg aaaggggatc 420
aggggatgcc caggcatgga cagtgggtgg caggggggga gaggaggct gctgtcttc 480
cagaagtcca aggacacaaa tgggtgagg gagagctct cccatagctg ggctgcggcc 540
caacccacc cctcaggct atgccagggg gtgttgccag gggcaccgg gcatgccag 600
tctagccac tcttcataa agcctcgca tcccaggagc gagcagagcc agagcaggtt 660
ggagaggaga cgcatacct ccgtgctcg cgggtctag agtcga 706

<210> 31

<211> 1153

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Nestin promoter

<400> 31

gaaggcagcc cccggaggtc aaagctggg cacgcgggag gagaggccag agtcagaggc 60
tgccggtatc tcagatatga aggaagatg agagaggctc aggaagaggt aagaaaagac 120
acaagagacc agagaaggga gaagaattag agaggaggc agaggaccgc tgtctctaca 180
gacatagctg gtagagactg ggaggaagg atgaacctg agcgcataa gggaaggagg 240
tggtggtgg tatatggagg atgtagctgg gccagggaaa agatcctgca ctaaaaatct 300

gaagctaaaa ataacaggac acgggggtgga gaggcgaaag gagggcagat tgaggcagag 360

agactgagag gcctggggat gtgggcattc cggtaggga cacagttcac ttgtcttctc 420

ttttccagg aggccaaaga tgctgacctc aagaactcat aataccccag tggggaccac 480

cgcattcata gccctgttac aagaagtggg agatgttctt tttgtccca gactggaaat 540

ccattacatc ccgaggctca ggttctgtgg tggtcacatc tgtgtggctt gttctgtggg 600

cctacctaaa gtcctaagca cagctctcaa gcagatccga ggcgactaag atgctagtag 660

gggttgtctg gagagaagag ccgaggaggt gggctgtgat ggatcagttc agctttcaaa 720

taaaaaggcg tttttatatt ctgtgtcgag ttcgtgaacc cctgtggtgg gcttctccat 780

ctgtctgggt tagtacctgc cactatactg gaataaggag acgcctgctt ccctcgagtt 840

ggctggacaa ggttatgagc atccgtgtac ttatggggtt gccagcttgg tcttgatcg 900

cccgggccct tccccacc gttcgggttc ccaccaccac ccgcgctcgt acgtgcgtct 960

ccgcctcgag ctcttgactc atcggggccc ccgggtcaca tgcgctcgct cggtctata 1020

ggcgccgccc cctgcccacc ccccgcccg gctgggagcc gcagccgccc cactcctgc 1080

tctctctcgc ccgcccggt caccaccgcc accgccaccg gctgagctcg cagtcctcgc 1140

aaacgggccc tct 1153

<210> 32

<211> 438

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Homeobox Protein 9 (HB9) promoter

<400> 32

tgaataaatt taagcaggct aattaatata taaactagct caatttgtca agttgatttg 60

tattttagtt aattgtgaaa gtaattacca catggtcaaa ttaacagctt tctggaaatg 120

accaagcctg aggttttatt tcttctctgg gtgaagaaaa ttcatttttc caagctcttg 180

atgtgatgaa taaaagtcatt aaatctgggt gattgggtgca ggcagagtct aaatggcttc 240

atatttcatt ttaggtttta tagaaatatt catgctctgt tttaatgaaa ttaaattgaa 300

gggggatggg gctagagtgg ttagctgatg aattgacaaa aactaatcag ctttattggg 360

aaacaggttt aagggcacgg acgtgtcaat aacgctcagc ctgacccctt cttccattag 420

ctaggcaggc tgattaga 438

<210> 33

<211> 3015

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Tyrosine hydroxylase (TH) promoter

<400> 33

ctgctagggg ctgcttccca gctactctc ttggctccgt ggcttgcctt ccagcctgtg	60
tgctgtctgg agagccttta aagcctcact tccaccaact agaagtctct ccccaaccct	120
gccctgacct caagtgcacc tcttcaaagt caggtttagc agctgcagct gggggccctg	180
aatccacccc ctgctgtctt ccttgaagac agaagtgttg ggagctgagg atctgggcta	240
gagactggct gtatgatcca gagaagtagt gtgcttcttg gcctcagatt tcccttctgt	300
agaacagggt tgctgaaat ggagagggtg gtgctcctct gcagggccta gtgggagtca	360
ccatgagtgg ttaaaagatc cagcttgtct ttgggtgagc tttagagga ggtaacaggg	420
ctgagttctg gaagcctgac caagggcaga ctttaagggc ctcttgaggt gtgttcacac	480
aaatggggat gggacacagc taaagtgcc agggcttctc tgtgccaca gatgctttag	540
atcttggcac agtgtggtct accagctgtc tctctctgtg tataatatatg tatttcatag	600
acagtgtaca gtggcctggg ttgtgctatc aggcctggata tggacagagg caagagtttg	660
tggcagcagt tatctccaa gagagtccaa agacatcatg ttttcaagtt taggccaggt	720
gctacttgag agagctcaga cacagacaaa ggcttgaga gcacatgtcc tccaccccca	780
cctagcttct gttgcaagca cctccagccg agacaagaga acgaattaaa aagcaatatt	840
tgtgtcagtg taagacattt gccgaaaggt taaatccaca ttcgtgttgc tgcagagcag	900
ccccctatgc aggatttgtt agatacagct ccgtcctacc ctgtgccagc tgagcaaacg	960
ccaggctggg tggggtggaa ccagcctgg gtttcctca ccctgcaatc cccccagcac	1020
cctctaaagg aggacctgt ggtgggcatg cagacctagg gactgggcat agataacctt	1080
tgggtttggg caacagcccc cactcctcag gattgaaggc taaggtgcag ccagctctgc	1140
cttcatgggt ggaatgtctc cactgaccc ctttctgggc tgtggagaac actcagagaa	1200
gagtcctggg atgccaggca ggccagggtg gtgctgggca tgttgagaca ggagtgggct	1260
aagccagcag agttgctgac ccaggaagag ttcagaaagg ggcatggaac atggggaggg	1320
gtccatagtg agagagagca ggcagtgcag agtaaatagt ccctgagctg ggggttatgg	1380
gatttgcagg agcttgcctc gagaaggcag aggagagatg ctgcgccaag ctgggtatca	1440
cagagcctca gactcctgga acaggaactg tgggggtcag gtcagcaggg gaggttaggg	1500
agtgttccct ttgtactgac ttagcattta tctgtcttct aggggggaag gggggccagt	1560
gggggatgca cagcaaggca gtgatgtggc aggcagcctg cgggagctcc tggttcctgg	1620

tgtgaaaaag ctgggaagga agagggtctg gtctggtaag tacagcaggc agttggctcc 1680
 tgagagtcca agccctgtct agagggtgga gtgagatttc agaggagag ctaaacgggg 1740
 tgggggtctg ggagtcagg cttctggctc ctgctaatac tcagtgtgct gggtcctcag 1800
 aacctcaggg tggccatttt cagggtgaga gctctgtcct ttggcacttc tgcagactcc 1860

 agtatccaga ggaataaaga tggctactct cctcagttcc cttagtgaaga ggacaccttt 1920
 ctctgaaggg cttgggcagt tgtctgaac cattgcctga aggaaggact tgactccagg 1980
 gacatagaat gggctcagca taagtccct gtagtagaga aaggtccct ctctggctc 2040
 cttagagatc ctgtttcctt ggctgaggaa gctagggtgg atctttgtgt aagtgggtgt 2100
 ggatgctcac tggaaatcaa aaggccctt ggtgttagac cttgggtgc catgggagag 2160
 ttgatcactg agtgcgcctt tacatggggg ccagctgaga atggggctgc ctctagctcg 2220
 agaccatgat gcaggagtg agtgggggag ttcaggatac tcttaactaa agcagaggtc 2280

 tgtccccca gggaggggag gtcagaagac cctagggaga tgccaaaggc taggggtggc 2340
 accatgttg aggtgtgtc ttcaaggaga tgataatcag aggaatcgaa cctgcaaaag 2400
 tgggccagtc ttagatacac tatagaggaa taatcttctg aaacattctg tgtctcatag 2460
 gacctgcctg aggaccagc cccagtgcc gcacatacac tggggcagtg agtagatagt 2520
 atactttgtt acatgggctg gggggacatg gcctgtgccc tggaggggac ttgaagacat 2580
 ccaaaaagct agtgagaggg ctctagatt tatttgtct caagggtat atatgcctt 2640
 cctaactga acccttgggt aatccagcat gggcgctccc atatgccctg gtttgattag 2700

 agagctctag atgtctcctg tcccagaaca ccagccagcc cctgtcttca tgtcgtgtct 2760
 agggcgagg gtgattcaga ggcagggtgcc tgcgacagt gatgcaatta gatctaattg 2820
 gacggaggcc tctctgtcc gtcgcctctg ctctgtgccc accccgcct ccctcaggca 2880
 cagcaggcgt ggagaggatg cgcaggaggt aggaggtggg ggaccagag gggctttgac 2940
 gtcagcctgg ctttaagag gccgcctgcc tggcaagggc cgtggagaca gaactcggga 3000
 ccaccagctt gact 3015

 <210> 34
 <211> 1353
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220><223> Myelin basic protein (MBP) promoter
 <400> 34
 caccgtggct ttaacactta gagaaatgc atcccctcta atcaataagt catcgacagt 60

gggtagatgg aggaacggca gtgcgtagta ggatgcgtgc aagcatagtc tcgtgcatgg 120
 gtgcatagat cgctgggcag gtggacaagg tgggggtgga taaagaagtg ggtagatgat 180
 tgatgttagg taaatatcac tgggtggaca gatgggtggg aggtggatgg atggtagaa 240
 tagtcagaag agggatggat tgataagggt aacagatgat aaatgggtga tagactggaa 300
 gggttgtcaa aagaggataa gggaagtgtg agctagccgt atttctaagg tcagtaatag 360

agttgggaga agaggttaag ttacatccat ttaaacctca cacgaagctg agagggaatg 420
 gacttgctgc cgttggtgag gaaagcgttg catttccgt gtgcttggtt gtgaagtgt 480
 caggtccac atgaagcagt caggttactg cggcttacag aggagccaga tccaaatgcc 540
 ccgagtaagc acgtccccga gccagaggcc tccagcggaa tccgggagag ggattgtca 600
 gtgccctgct tccctggact gtaagctgca gaaagatgtg ggaagtcctg ttctccactg 660
 agaacactaa aagcaccttt tgtcaaacga ccgttcaca tctggggctt gtgactgggt 720
 ggccctttta accagagaca acccacaaga tacctaacct gcggggctct ctggtacagt 780

gagcaactca ggaatgctt tggcttgatt gctgtgggct ctcaggccat cgcctctgg 840
 agtggttctt ttaatgagaa cctgaagatt ggccctgag ccatgtatac caagcaagct 900
 caatccaggt tagctccctc tggttggggc aagctaactg gctccttggg ccccgcgct 960
 aactgtgcgt tttataggag acagctagtt caagacccca ggaagaaaagc ggctttgtcc 1020
 ccctctagge ctcgtacagg ccacattca tatctattg ttgttgagg ggaggcagat 1080
 gcgatccaga acaatgggac ctcggctgag gacacggcgg tgacagactc caagcacaca 1140
 gcagacccaa agaataactg gcaaggcgcc caccagctg acccaggga cgcggccac 1200

ttgatccgcc tcttttcccg agatgccccg ggaaggagg acaacacctt caaagacagg 1260
 ccctcagagt ccgacgagct tcagaccatc caagaagatc ccacagcagc ttccgaagaa 1320
 ttctgcagtc gacggtaccg cgggccccggg atc 1353

<210> 35
 <211> 128
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Truncated AAV2 5' ITR
 <400> 35

gcgcgctcgc tcgtcactg aggccgccc ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttgg 60
 tcgccggccc tcagttagcg agcgagcgcg cagagaggga gtggccaact ccatcactag 120
 gggttcct 128

<210> 36
 <211> 128
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Truncated AAV2 3' ITR
 <400> 36
 aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60
 ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120
 gagcgcgc 128
 <210> 37
 <211> 122
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> SV40 polyadenylation signal
 <400> 37
 taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta 60
 tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag 120
 tt 122
 <210> 38
 <211> 449
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Rabbit beta-globin polyadenylation signal
 <400> 38
 gatctttttc cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agccccttga gcatctgact 60
 tctggctaataaaggaattt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc 120
 tcactcggaa ggacatatgg gagggcaaat catttaaac atcagaatga gtatttggtt 180
 tagagtttgg caacatatgc ccatatgctg gctgccaatga acaaaggttg gctataaaga 240
 ggtcatcagt atatgaaaca gcccctgct gtccattcct tattccatag aaaagccttg 300
 acttgaggtt agattttttt tataattttgt tttgtgttat tttttcttt aacatcccta 360
 aaattttcct tacatgtttt actagccaga tttttctctc tctcctgact actcccagtc 420
 atagctgtcc ctcttctctt atggagatc 449
 <210> 39

<211> 592

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> CMV promoter and CMV enhancer sequence

<400> 39

ggcattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc	60
catatatgga gticcgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgcccc	120
acgacccccg ccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga	180
ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc	240
aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgctt	300
ggcattatgc ccagtacatg accttacggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat	360
tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta caccaatggg cgtggatagc	420
ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt	480
ggcacaaaa tcaacgggac ttccaaaaat gtcgtaacaa ctgcgatcgc ccgccccgtt	540
gacgcaaag ggcggtagcg gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag ct	592

<210> 40

<211> 7008

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> pAAV-CAG-hIns-dmiRT

<400> 40

agtgagcgag cgagcgcga gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcgg	60
ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg	120
ctgcggcgag cggatcagc tcaactaaag gcggtaatc ggttatccac agaatacagg	180
gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag	240
gccgcgttgc tggcggtttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga	300
cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct	360
ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc	420
tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg	480
gtgtaggctg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc	540
tgcgcttat ccggtaaacta tcgtcttgag tccaaccggg taagacacga cttatcgcca	600

ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag	660
ttcttgaagt gggtgcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct	720
ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc	780
accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga	840
tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggtctgacg ctacgtggaa cgaaaactca	900
cgtaagga ttttggcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat	960
taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac	1020
caatgcttaa tcagtgagc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt	1080
gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt	1140
gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag	1200
ccagccggaa ggcccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct	1260
attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatatgtt gcgcaacgtt	1320
gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc	1380
tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttggtgcaa aaaagcggtt	1440
agctccttcg gtctccgat cgtttgcaga agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg	1500
gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgcat ccgtaagatg cttttctgtg	1560
actggtagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgccgagacc gagttgctct	1620
tgccccgct caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc	1680
attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgtgtt gagatccagt	1740
tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt	1800
tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaa agggaataag ggcgacacgg	1860
aaatgttgaa tactcatact ctctcttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat	1920
tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataacaaat aggggttccg	1980
cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta	2040
acctataaaa ataggcgtat cagcaggccc tttcgtctcg cgcgtttcgg tgatgacggt	2100
gaaaacctct gacacatgca gctcccgag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc	2160
gggagcagac aagccccgta gggcgctgca gcgggtgttg gcgggtgtcg gggctggctt	2220
aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaaataccg	2280
cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatc aggcgattcc aacatccaat aaatcataca	2340
ggcaaggcaa agaattagca aaattaagca ataaagcctc agagcataaa gctaaatcgg	2400
ttgtacaaa aacattatga ccctgtaata cttttgcggg agaagccttt atttcaacgc	2460

aaggataaaa atttttagaa ccctcataata ttttaaagtc aatgcctgag taatgtgtag 2520
gtaaagattc aaacgggtga gaaaggccgg agacagtcaa atcaccatca atatgatatt 2580
caaccgttct agctgataaa ttcatgccgg agagggtagc tatttttgag aggtctctac 2640
aaaggctatc aggtcattgc ctgagagtct ggagcaaaca agagaatcga tgaacggtaa 2700

tcgtaaaact agcatgtcaa tcatatgtac cccggttgat aatcagaaaa gccccaaaaa 2760
caggaagatt gtataagcaa atatttaaatt tgaagcggtt aatatittgt taaaattcgc 2820
gttaaatttt tgtaaataca gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc 2880
ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag 2940
tccactatta aagaacgtgg actccaacgt caaaggcgga aaaaccgtct atcaggcgga 3000
tggcccacta cgigaacat caccctaatac aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc 3060
actaaatcgg aaccctaag ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa 3120

cgtggcgaga aaggaaggga agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt 3180
agcggtcacg ctgcgcgtaa ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc 3240
gtactatggt tgctttgacg agcacgtata acgtgctttc ctcttagaa tcagacgggg 3300
agctaacag gaggccgatt aaagggattt tagacaggaa cggtacgcca gaatcctgag 3360
aagtgttttt ataatacgtg aggccaccga gtaaaagagt ctgtccatca cgcaaattaa 3420
ccgttgctgc aatacttctt tgattagtaa taacatcact tgctgagta gaagaactca 3480
aactatcggc ctgtctggtg atatccagaa caatattacc gccagccatt gcaacggaat 3540

cgccattcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgc ggcctcttcc 3600
actgaggccc agctgcgcgc tcgctcgctc actgaggccg cccgggcaaa gcccgggcgt 3660
cgggcgacct ttggtcgccc ggcctcagt agcgagcgag cgcgagaga gggagtggcc 3720
aactccatca ctagggttc ctgttagtta atgattaacc cgccatgcta ctatctact 3780
cgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc 3840
ccatatatgg agttccgct tacataactt acggtaaatg gccgcctgg ctgaccgcc 3900
aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg 3960

actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat 4020
caagtgtatc atatgccaag tacgccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc 4080
tggcattatg ccagttacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta 4140
ttagtcacg ctattacat ggtcgagggt agccccacgt tctgttcac tctccccatc 4200
tccccccct cccaccccc aattttgtat ttattttttt ttttaattatt ttgtgcagcg 4260
atgggggcgg gggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg cgaggggcgg 4320

ggcggggcga ggcggagagg tgcggcggca gccaatcaga gcggcgcgct ccgaaagttt 4380

ccttttatgg cgaggcggcg gcggcggcgg ccctataaaa agcgaagcgc gcggcgggcg 4440

ggagtgcgtg cgttgccctt gccccgtgcc ccgctccgcg ccgcctcgcg ccgcccgcgc 4500

cggctctgac tgaccgcgtt actccacag gtgagcgggc gggacggccc ttctcctccg 4560

ggctgtaatt agcgccttgg ttaatgacgg cttgtttctt ttctgtggct gcgtgaaagc 4620

cttgaggggc tccgggaggg ccctttgtgc ggggggagcg gctcgggggg tgcgtgcgtg 4680

tgtgtgtgcg tggggagcgc cgcgtgcggc tccgcgtgc ccggcggctg tgagcgtgc 4740

gggcgcggcg cggggctttg tgcgtccgc agtgtgcgc aggggagcgc ggccgggggc 4800

ggtgccccgc ggtgcggggg gctgcgaggg gaacaaaggc tgcgtgcggg gtgtgtgcgt 4860

gggggggtga gcagggggtg tgggcgcgtc ggtcgggctg caaccccccc tgcaccccc 4920

tccccagatt gctgagcacg gcccggttc ggtgcggggg ctccgtacgg ggcgtggcgc 4980

ggggctcgcc gtgccggcg ggggtggcg gcaggtgggg gtgccggcg gggcggggcc 5040

gcctcgggcc ggggagggct cgggggaggg gcgcggcgcc ccccgagcg ccggcggctg 5100

tcgagcgcg gcgagccga gccattgcct tttatgtaa tcgtgcgaga gggcgaggg 5160

acttcctttg tcccaaatct gtgcggagcc gaaatctggg aggcgccgc gcacccctc 5220

tagcggcgcg ggggcgaagc ggtgcggcg cggcaggaag gaaatggcg gggaggccct 5280

tcgtgcgtcg ccgcgccgc gtccctttct cctctccag cctcggggct gtcccgggg 5340

ggacggctgc cttcggggg gacggggcag ggcggggttc ggcttctggt gtgtgaccgg 5400

cggctctaga gcctctgta accatgttca tgcctttct ttttctctac agctcctggg 5460

caacgtgctg gttattgtg tgtctcatca ttttgcaaa gaattgatta attcgagcga 5520

acgcgtcgag tcgctcggtg cgatttaaat tgaattggcc tcgagcgcaa gcttagcta 5580

ggaccttctg ccattggcct gtggatgcgc ctctgcccc tgcgtggcgt getggccctc 5640

tggggacctg accagccgc agcctttgtg aaccaacacc tgtcgggctc agatctggtg 5700

gaagctctct acctagtgtg cggggaacga ggcttctct acacaccag gaccaagcgg 5760

gaggcagagg acctgcaggt ggggcagggt gagctggcg ggggccctgg tgcaggcagc 5820

ctgcagccct tggccctgga ggggtcgca cagaagcgtg gcattgtgga acaatgctgt 5880

accagcatct gctccctcta ccagctggag aactactgca actagacga gccgtcgcc 5940

gctaattcta gatcgcaac aaacaccatt gtcacactcc agtatacaca aacaccattg 6000

tcacactcca gatatacaa acaccattgt cacactccaa gggaacaaa caccattgtc 6060

acactccaag gctattctag atcgcgaaatt acatacttct ttacattcca gtatacatta 6120
catacttctt tacattccag atatcattac atacttcttt acattccaag gcgaattaca 6180
tacttcttta cattccaagg ctacctgagg cccgggggta cctcttaatt aactggcctc 6240
atgggccttc cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agtcaggatgc 6300
aggctgccta tcagaagggt gtggctgggtg tggccaatgc cctggctcac aaataccact 6360
gagatctttt tcctctgcc aaaaattatg gggacatcat gaagccctt gagcatctga 6420
cttctggcta ataaaggaaa tttattttca ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc 6480

tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa atcatttaaa acatcagaat gagtatttgg 6540
ttagagttt ggcaacatat gcccatatgc tggctgcat gaacaaagggt tggctataaa 6600
gaggtcatca gtatatgaaa cagccccctg ctgtccattc cttattccat agaaaagcct 6660
tgacttgagg ttagattttt tttatatttt gttttgtgtt attttttct ttaacatccc 6720
taaaattttc cttacatgtt ttactagcca gatttttct cctctcctga ctactcccag 6780
tcatagctgt cctcttctc ttatggagat cctcgcacct gcagcccaag ctgtagataa 6840
gtagcatggc gggtaataca ttaactacaa ggaacccta gtgatggagt tggccactcc 6900

ctctctgcgc gctcgtcgc tctactgaggc cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg 6960
ctttgcccg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgagc tggcgtaa 7008

<210> 41

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H. sapiens insulin with furin cleavage sites

<400> 41

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu

1 5 10 15

Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly

20 25 30

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe

35 40 45

Phe Tyr Thr Pro Arg Thr Lys Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly

50 55 60

Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu

65 70 75 80

Ala Leu Glu Gly Ser Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
85 90 95

Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
100 105 110

<210> 42

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> H. sapiens insulin mutant His-B10-Asp with furin cleavage sites

<400> 42

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu

1 5 10 15

Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly

20 25 30

Ser Asp Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe

35 40 45

Phe Tyr Thr Pro Arg Thr Lys Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly

50 55 60

Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu

65 70 75 80

Ala Leu Glu Gly Ser Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys

85 90 95

Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

100 105 110

<210> 43

<211> 110

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 43

Met Ala Leu Trp Ile Arg Phe Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ile Leu

1 5 10 15

Trp Glu Pro Arg Pro Ala Gln Ala Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly

20 25 30
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe

35 40 45
Phe Tyr Thr Pro Met Ser Arg Arg Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Ala

50 55 60
Gln Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr Leu

65 70 75 80
Ala Leu Glu Val Ala Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys

85 90 95
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

100 105 110

<210> 44

<211> 110

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 44

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Val Leu Leu Ala Leu

1 5 10 15

Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ser Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly

20 25 30

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe

35 40 45

Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly

50 55 60

Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu

65 70 75 80

Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys

85 90 95

Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

100 105 110

<210> 45

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> H. sapiens insulin with furin cleavage sites

<400> 45

atggccctgt ggatgcgcct cctgcccctg ctggcgctgc tggccctctg gggacctgac	60
ccagccgcag cttttgtgaa ccaacacctg tgcggctcac acctggtgga agctctctac	120
ctagtgtgcg gggaacgagg cttcttctac acaccagga ccaagcggga ggcagaggac	180
ctgcaggtgg ggcaggtgga gctgggcggg ggccctggtg caggcagcct gcagcccttg	240
gccctggagg ggtcgcgaca gaagcgtggc attgtggaac aatgctgtac cagcatctgc	300
tcctctacc agctggagaa ctactgcaac tag	333

<210> 46

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> H. sapiens insulin mutant His-B10-Asp with furin cleavage sites

<400> 46

atggccctgt ggatgcgcct cctgcccctg ctggcgctgc tggccctctg gggacctgac	60
ccagccgcag cttttgtgaa ccaacacctg tgcggctcag atctggtgga agctctctac	120
ctagtgtgcg gggaacgagg cttcttctac acaccagga ccaagcggga ggcagaggac	180
ctgcaggtgg ggcaggtgga gctgggcggg ggccctggtg caggcagcct gcagcccttg	240
gccctggagg ggtcgcgaca gaagcgtggc attgtggaac aatgctgtac cagcatctgc	300
tcctctacc agctggagaa ctactgcaac tag	333

<210> 47

<211> 333

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 47

atggccctgt ggatccgctt cctgcccctg ctggccctgc tcactctctg ggagcccccgc	60
cctgcccagg cttttgtcaa acagacacctt tgtggttctc acttggtgga agctctctac	120
ctggtgtgtg gggagcgtgg attcttctac acacccatgt cccgccgcga agtggaggac	180
ccacaagtgg cacaactgga gctgggtgga ggccccgggg caggtgacct tcagaccttg	240

gcactggagg tggcccgga gaagcgcgc atcgtggatc agtgctgcac cagcatctgc 300
tctctctacc aactggagaa ctactgcaac tag 333
<210> 48
<211> 333
<212> DNA
<213> Pan troglodytes
<400> 48
atggccctgt ggatgcgcct cctgcccctg ctggtgctgc tggccctctg gggacctgac 60
ccagcctcgg cctttgtgaa ccaacacctg tgcggctccc acctggtgga agctctctac 120
ctagtgtgcg gggaacgagg cttcttctac acaccaaga cccgccggga ggcagaggac 180
ctgcaggtgg ggcaggtgga gctgggcggg ggccctggtg caggcagcct gcagcccttg 240

gccctggagg ggtccctgca gaagcgtggt atcgtggaac aatgctgtac cagcatctgc 300
tccctctacc agctggagaa ctactgcaac tag 333
<210> 49
<211> 6740
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> pAAV-CAG-hInsAsp
<400> 49
agtgagcgag cgagcgcga gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcgt 60
ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttctctg ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg 120
ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcggtatcac gggtatccac agaatacagg 180
gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag 240

gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga 300
cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct 360
ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc 420
tttctccctt cggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg 480
gtgtaggtcg ttgcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc 540
tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag tccaaccggg taagacacga cttatcgcca 600
ctggcagcag cacttgtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag 660

ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct 720
ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc 780

accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga	840
tctcaagaag atccttttgat cttttctacg gggctctgacg ctacgtggaa cgaaaactca	900
cgtaagga ttttggcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat	960
taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac	1020
caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt	1080
gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt	1140
gctgcaatga taccgcgaga ccacagctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag	1200
ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgctc catccagtct	1260
attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt	1320
gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc	1380
tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttggtgca aaaagcggtt	1440
agctccttcg gtctccgat cgttgtcaga agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg	1500
gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg	1560
actggtgagt actcaaccaa gtcatctga gaatagtga tgcggcgacc gagttgctct	1620
tgccccgct caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc	1680
attgaaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgtgtt gagatccagt	1740
tcgatgtaac cactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt	1800
tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaa agggaataag ggcgacacgg	1860
aaatgtgaa tactcatact ctctcttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat	1920
tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataacaaat aggggttccg	1980
cgcatatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta	2040
acctataaaa ataggcgtat cacgaggccc ttctgtctcg cgcgtttcgg tgatgacggt	2100
gaaaacctct gacacatgca gctcccgag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc	2160
gggagcagac aagccccgca gggcgcgtca gcgggtgttg gcgggtgtcg gggctggctt	2220
aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaaataccg	2280
cacagatcgc taaggagaaa ataccgcac aggcgattcc aacatccaat aatcataca	2340
ggcaaggcaa agaattagca aaattaagca ataaagcctc agagcataaa gctaaatcgg	2400
ttgtacaaa aacattatga ccctgtaata cttttgcggg agaagccttt atttcaacgc	2460
aaggataaaa atttttagaa ccctcatata ttttaaatgc aatgcctgag taatgtgtag	2520
gtaaagattc aaacgggtga gaaaggccgg agacagtcaa atccatca atatgatatt	2580
caaccgttct agctgataaa ttcatgccgg agagggtagc tatttttgag aggtctctac	2640

aaaggtatc aggtcattgc ctgagagtct ggagcaaaca agagaatcga tgaacggtaa	2700
tcgtaaaact agcatgtcaa tcatatgtac cccggttgat aatcagaaaa gccccaaaa	2760
caggaagatt gtataagcaa atatttaa at tgaagcgtt aatatittgt taaaattcgc	2820
gttaaatttt tgttaaata gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc	2880
ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag	2940
tccactatta aagaacgtgg actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga	3000
tggcccacta cgigaacat caccctaatac aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc	3060
actaaatcgg aaccctaag ggagccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa	3120
cgtggcgaga aaggaagga agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt	3180
agcggtcacg ctgcgcgtaa ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc	3240
gtactatggt tgctttgacg agcacgtata acgtgctttc ctcttagaa tcagacggg	3300
agctaacag gaggccgatt aaagggattt tagacaggaa cggtagcca gaatcctgag	3360
aagtgtttt ataatacgtg aggccaccga gtaaaagagt ctgtccatca cgcaaatata	3420
ccgttgtcgc aatacttctt tgattagtaa taacatcact tgctgagta gaagaactca	3480
aactatcggc ctgtctggtg atatccagaa caatattacc gccagccatt gcaacggaat	3540
cgccattcgc cattcaggt gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgcg ggcctcttc	3600
actgaggccc agctgcgcgc tcgtctgctc actgaggccg cccgggcaaa gcccgggcgt	3660
cgggcgacct ttggtcgcgc ggcctcagtg agcgagcgag cgcgagaga gggagtggcc	3720
aactccatca ctagggttc cttgtagtta atgattaacc cgccatgcta cttatctact	3780
cgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc	3840
ccatatatgg agttccgct tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgccc	3900
aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaatagg	3960
actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacgtaaa ctgcccactt ggcagtacat	4020
caagtgtatc atatgccaag tacgccccct attgacgtca atgacgtaa atggcccgc	4080
tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta	4140
ttagtcacg ctattacat ggtcgagggt agccccacgt tctgttcac tctccccatc	4200
tccccccct cccaccccc aattttgtat ttatttattt tttaattatt ttgtgcagcg	4260
atgggggcgg gggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg cgaggggcgg	4320
ggcggggcga ggcggagagg tgcggcgga gccaatcaga gcggcgcgct ccgaaagttt	4380

ccttttatgg cgaggcggcg gcggcggcgg ccctataaaa agcgaagcgc gcggcgggcg 4440

 ggagtcgctg cgttgccttc gccccgtgcc ccgctccgcg ccgcctcgcg ccgccccccc 4500
 cggtcttgac tgaccgcgtt actccacacag gtgagcgggc gggacggccc ttctctccg 4560
 ggctgtaatt agcgcttggc ttaatgacgg ctgtttctt ttctgtggct gcgtgaaagc 4620
 cttagggggc tccgggaggg ccctttgtgc ggggggagcg gctcgggggg tgcgtgcgtg 4680
 tgtgtgtgcg tggggagcgc cgctgcggc tccgcgtgc ccggcggctg tgagcgtgc 4740
 gggcgcgcg cggggctttg tgcgtccgc agtgtgcgc aggggagcgc ggccgggggc 4800
 ggtgccccgc ggtcggggg gctgcgaggg gaacaaaggc tgcgtgcggg gtgtgtgcgt 4860

 gggggggtga gcagggggtg tgggcgcgtc ggtcgggctg caaccccc tgcaccccc 4920
 tccccgagtt gctgagcacg gcccggcttc ggtgctgggg ctccgtacgg ggcgtggcgc 4980
 ggggctgcgc gtgccggcg gggggtggcg gcaggtgggg gtgccggcg gggcggggcc 5040
 gcctcgggc ggggagggct cgggggaggg gcgcggcggc ccccgagcg ccggcggctg 5100
 tcgagcgcg gcgagccga gccattgcct ttatggtaa tcgtgcgaga gggcgaggg 5160
 acttcctttg tccaaatct gtgcggagcc gaaatctggg aggcgcgcc gcacccctc 5220
 tagcgggcgc ggggcgaagc ggtgcggcgc cggcaggaag gaaatggcg gggagggcct 5280

 tcgtgcgtcg ccgcgccgc gtecccttct ccctctccag cctcgggct gtccgcgggg 5340
 ggacggctgc cticgggggg gacggggcag ggcggggttc ggcttctggc gtgtgaccgg 5400
 cggtctaga gcctctgcta accatgttca tgccttctt ttttcttac agctcctggg 5460
 caacgtgctg gttattgtgc tgtctcatca ttttgcaaa gaattgatta attcgagcga 5520
 acgcgtcgag tcgtcggta cgatttaa tgaattggcc tcgagcgcaa gcttgagcta 5580
 gcgtcgacct tctgcatgg ccctgtggat gcgcctctg cccctgctgg cgtctctggc 5640
 cctctgggga cctgaccag ccgcagcctt tgtgaacaa cacctgtgcg gctcagatct 5700

 ggtggaagct ctctacctag tgtgcgggga acgaggcttc ttctacacac ccaggaccaa 5760
 gcgggagga gaggacctgc aggtggggca ggtggagctg ggcgggggcc ctggtgcagg 5820
 cagcctgcag cccttggccc tggaggggtc gcgacagaag cgtggcattg tggaacaatg 5880
 ctgtaccagc atctgtccc tctaccagct ggagaactac tgcaactaga cgcagccgtc 5940
 gacggtaccc ccgacgcgc ctaactggcc tcatgggcct tccgtcact gcccgtttc 6000
 cagtcgggaa acctgtcgtg ccagtcaggt gcaggctgcc tatcagaagg tggtagctgg 6060
 tgtggccaat gccctggctc acaaatacca ctgagatctt tttcctctg ccaaaaatta 6120

tggggacatc atgaagcccc ttgagcatct gacttctggc taataaagga aatttatatt 6180
 cattgcaata gtgtgttgga atttttgtg tctctcactc ggaaggacat atgggagggc 6240
 aaatcattta aaacatcaga atgagtattt ggttttagagt ttggcaacat atgcccatat 6300
 gctggctgcc atgaacaaag gttggctata aagaggatcat cagtatatga aacagccccc 6360
 tgctgtccat tccttattcc atagaaaagc ctgacttga ggtagattt ttttatatt 6420
 ttgtttgtg ttatTTTTT cttaacatc cctaaaattt tccttacatg ttttactagc 6480
 cagatttttc ctctctctt gactactccc agtcatagct gtcctcttc tcttatggag 6540

 atccctcgac ctgcagccca agctgtagat aagtagcatg gcgggttaat cattaactac 6600
 aaggaacccc tagtgatgga gttggccact cctctctgc gcgtcgtc gctcactgag 6660
 gccggcgac caaaggtgc cgcagcccg ggctttgcc gggcggcctc agtgagcgag 6720
 cgagcgcgca gctggcgtaa 6740
 <210> 50
 <211> 6740
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> pAAV-CAG-hInsWt
 <400> 50
 agtgagcgag cgagcgcgca gctgcatata tgaatcgcc aacgcgcggg gagaggcgg 60
 ttgcgtattg ggcgtcttc cgttctctg ctactgact cgctgcgtc ggtcgttcg 120

 ctgcggcgag cggtatcagc tcaactaaaag gcgtaatac ggttatccac agaatcaggg 180
 gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag 240
 gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgtccctctg acgagcatca caaaaatcga 300
 cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct 360
 ggaagctccc tcgtgcgtc tcctgttcg accctgccg ttaccggata cctgtccgcc 420
 tttctccctt cgggaagcgt ggcgtttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg 480
 gtgtaggtcg ttcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca gcccgaccgc 540

 tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga cttatcgcca 600
 ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgagg atgtaggcg tgctacagag 660
 ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgt 720
 ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccg caaacaacc 780
 accgctggta gcgttggtt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcg aaaaaagga 840
 tctcaagaag atcctttgat cttttctac gggtctgacg ctcagtgga cgaaaactca 900

cgttaaggga ttttggcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ccttttaaat 960

taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac 1020

caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt 1080

gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt 1140

gctgcaatga taccgcgaga cccacgtca ccggctccag atttatcagc aataaaccag 1200

ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct 1260

attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt 1320

gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc 1380

tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa aaaagcggtt 1440

agctccttcg gtctccgat cgttgtcaga agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg 1500

gttatggcag cactgcaata ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg 1560

actggtgagt actcaaccaa gtcatcttga gaatagtga tgcggcgacc gagttgctct 1620

tgccccgct caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc 1680

attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt 1740

tcgatgtaac cactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt 1800

tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaaa aggggaataag ggcgacacgg 1860

aatgttgaa tactcatact ctctctttt caatattatt gaagcattta tcagggttat 1920

tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg 1980

cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta 2040

acctataaaa ataggcgtat cagcaggccc ttctgtctcg cgcgtttcgg tgatgacggt 2100

gaaaacctct gacacatgca gctcccgag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc 2160

gggagcagac aagcccgta gggcgctca gcgggtgttg gcgggtgtcg gggctggctt 2220

aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaaataccg 2280

cacagatgag taaggagaaa ataccgcatc aggcgattcc aacatccaat aatcataca 2340

ggcaaggcaa agaattagca aaattaagca ataaagcctc agagcataaa gctaaatcgg 2400

ttgtacaaa aacattatga ccctgtaata cttttcgagg agaagcctt atttcaacgc 2460

aaggataaaa atttttagaa cctcatata ttttaaatgc aatgcctgag taatgtgtag 2520

gtaaagattc aaacgggtga gaaaggccgg agacagtcaa atcaccatca atatgatatt 2580

caaccgttct agctgataaa ttcatgccgg agagggtagc ttttttgag aggtctctac 2640

aaaggtatc aggtcattgc ctgagagtct ggagcaaaca agagaatcga tgaacggtaa	2700
tcgtaaaact agcatgtcaa tcatatgtac cccggttgat aatcagaaaa gccccaaaa	2760
caggaagatt gtataagcaa atatttaa atgtaaagcgtt aatattttgt taaaattcgc	2820
gttaaat tttt gttaaatca gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc	2880
ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagtggt gttccagttt ggaacaagag	2940
tccactatta aagaacgtgg actccaacgt caaaggcgga aaaaccgtct atcaggcgga	3000
tggcccacta cgtgaacat caccctaatt aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc	3060
actaaatcgg aaccctaag ggagccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa	3120
cgtggcgaga aaggaaggga agaaagcgaa aggagcgggc gctaggcggc tggcaagtgt	3180
agcggtcacg ctgcgcgtaa ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgcgcg tacaggcggc	3240
gtactatggt tgctttgacg agcacgtata acgtgctttc ctgcttagaa tcagagcggg	3300
agctaacag gaggcgatt aaagggattt tagacaggaa cggtagcca gaatcctgag	3360
aagtgtttt ataatacgtg aggccaccga gtaaaagagt ctgtccatca cgcaaatata	3420
ccgttgctgc aatacttctt tgattagtaa taacatcact tgctgagta gaagaactca	3480
aactatcggc ctgtctggtat atatccagaa caatattacc gccagccatt gcaacggaat	3540
cgccattcgc cattcaggt gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgcg ggcctcttc	3600
actgaggccc agctgcgcgc tcgtcgcgc actgaggccg cccgggcaaa gcccgggcgt	3660
cgggcgacct ttggtcgcgc ggcctcagtg agcagcgag cgcgagaga gggagtggcc	3720
aactccatca ctaggggttc cttgtagtta atgattaacc cgccatgcta cttatctact	3780
cgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc	3840
ccatatatgg agttccgct tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgcc	3900
aacgacccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg	3960
actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgccactt ggcagtacat	4020
caagtgtatc atatgccaag tacgccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgc	4080
tggcattatg ccagttacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta	4140
ttagtcacg ctattacat ggtcgagggt agccccacgt tctgcttcac tctccccatc	4200
tccccccct cccaccccc aattttgtat ttattttttt tttaattatt ttgtgcagcg	4260
atgggggcgg gggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg cgaggggcgg	4320
ggcggggcga ggcggagagg tgcggcgga gccaatcaga gcggcgcgct ccgaaagttt	4380
ccttttatgg cgaggcggcg gcggcgcgcg cctataaaaa agcgaagcgc gcggcgggcg	4440
ggagtcgctg cgttgccttc gcccgtgcc ccgctccgcg ccgctcgcg ccgcccgc	4500

cggtcttgac tgaccgcgtt actccacag gtgagcgggc gggacggccc ttctctccg 4560
ggctgtaatt agcgtttggt ttaatgacgg ctgttttctt ttctgtggct gcgtgaaagc 4620
cttgaggggc tccgggaggg ccccttgtgc ggggggagcg gctcgggggg tgcgtgcgtg 4680
tgtgtgtgcg tggggagcgc cgcgtgcggc tccgcgtgc cggcggctg tgagcgtgc 4740

gggcgcggcg cggggctttg tgcgtccgc agtgtgcgc aggggagcgc gcccgggggc 4800
ggtgccccgc ggtgcggggg gctgcgaggg gaacaaagc tgctgcggg gtgtgtcgt 4860
gggggggtga gcagggggtg tgggcgcgtc ggtcgggctg caaccccc tgcaccccc 4920
tccccgagtt gctgagcacg gcccggttc ggtgcgggg ctccgtacgg ggcgtggcgc 4980
ggggctcgcc gtgccggcg ggggtggcg gcaggtggg gtgccggcg gggcggggc 5040
gcctcgggc ggggagggt cgggggaggg gcgcggcg ccccgagcg cggcggctg 5100
tcgagcgcg gcgagccga gccattgcct ttatggtaa tcgtgcgaga gggcgcagg 5160

acttcctttg tcccaaact gtgcggagc gaaatctggg aggcgccgc gcacccctc 5220
tagcgggcgc ggggcgaagc ggtgcggcg cggcaggaag gaaatggcg gggaggcct 5280
tcgtgcgtcg ccgcgccgc gtcccttct cctctccag cctcgggct gtcccgggg 5340
ggacggctgc cttcggggg gacggggcag ggcggggtc ggcttctggc gtgtgaccg 5400
cggtctaga gcctctgta accatgtca tgccttctt ttttctac agctcctggg 5460
caacgtgctg gttattgtc tgtctcatca ttttggcaa gaattgatta attcagcga 5520
acgcgtcgag tcgctcgga cgatttaaat tgaattggc tcgagcgaa gcttgagcta 5580

gcgtcgagg gtgcacatg ccctgtggat gcgcctctg ccctgctgg cgtgctggc 5640
cctctggga cctgaccag ccgcagcctt tgtgaacaa cacctgtgc gtcacacct 5700
ggtggaagct ctctactag tgtgcggga acgaggttc ttctacacac ccaggacaa 5760
gcgggaggca gaggacctgc aggtggggca ggtggagctg ggcgggggc ctggtgcagg 5820
cagcctgcag cccttggccc tggaggggtc gcgacagaag cgtggcattg tggaacaatg 5880
ctgtaccagc atctgtccc tctaccagc ggagaactac tgcaactagg tcgaccctc 5940
gacggtaccc ccgacgcgc ctaactggc tcatggcct tccgtcact gcccgttct 6000

cagtcgggaa acctgtcgt ccagtcaggt gcaggctgcc tatcagaagg tgggtgctgg 6060
tgtggcaat gccctggctc acaaatacca ctgagatctt tttccctctg ccaaaaatta 6120
tggggacatc atgaagcccc ttgagcatct gacttctggc taataaagga aatttattt 6180
cattgcaata gtgtgttga atttttgtg tctctactc ggaaggacat atgggagggc 6240
aatcattta aaacatcaga atgagtattt ggtttagagt ttggcaacat atgccatat 6300
gctggctgcc atgaacaaag gttggctata aagaggtcat cagtatatga aacagcccc 6360

tgctgtccat tccttattcc atagaaaagc cttgacttga ggtagattt tttttatatt	6420
ttgttttgtg ttatTTTTTT ctttaacatc cctaaaattt tccttacatg ttttactagc	6480
cagatttttc ctctctcct gactactccc agtcatagtc gtcctcttc tcttatggag	6540
atccctcgac ctgcagccca agctgtagat aagtagcatg gcgggttaat cattaactac	6600
aaggaacccc tagtgatgga gttggccact ccctctctgc gcgctcgtc gctcactgag	6660
gccggcgac caaaggcgc cgcagcccg ggctttgcc ggcggcctc agtgagcgag	6720
cgagcgcgca gctggcgtaa	6740