(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0022710
(43) 공개일자 2025년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7043065
(22) 출원일자(국제) 2023년06월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년12월26일
(86) 국제출원번호 PCT/RU2023/050148
(87) 국제공개번호 WO 2023/239267
국제공개일자 2023년12월14일
(30) 우선권주장
2022115853 2022년06월10일 러시아(RU)

(71) 출원인
조인트 스탁 컴퍼니 "바이오케드"
러시아 198515 상트페테르부르크 포메슈 89 에스티알. 1 디. 38 유엘. 스비아지 브이엔. 테르. 쥐. 포셀록 스틀레나
(72) 발명자
블라소바 엘레나 베니아미노브나
러시아 186791 쥐. 소르타발라 레스프. 카렐리아 케이브이.3 (알유) 디.1 유엘. 퀴비쉐바
스트렐코바 안나 니콜라예브나
러시아 612261 쥐.야란스크 키로브스카야 오비엘. 케이브이 64 디. 65에이 유엘. 라구놉스카야
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

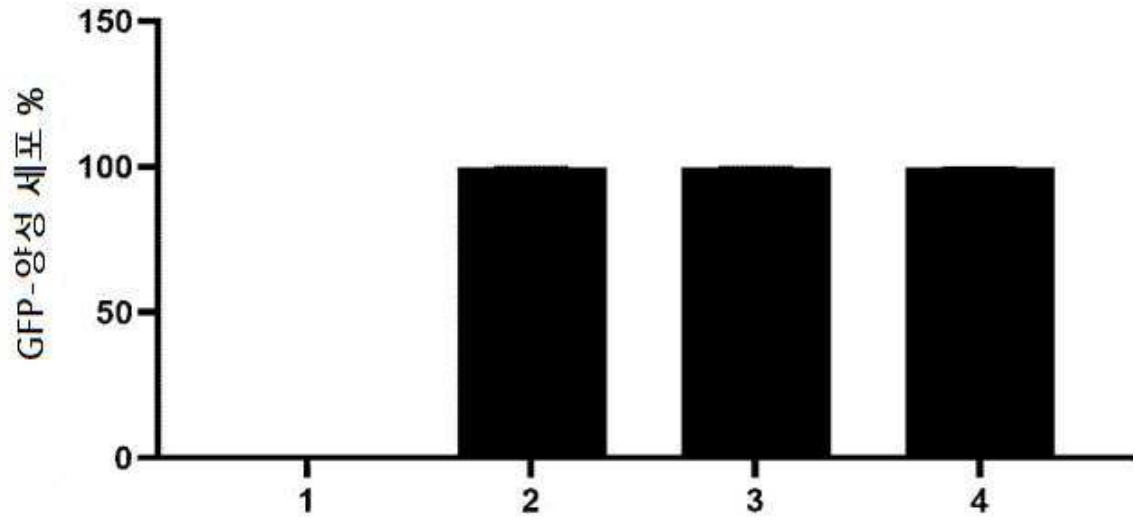
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **프로모터 활성을 가진 핵산 및 그 용도**

(57) 요 약

본 발명은 유전학, 유전자 요법 및 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 프로모터 활성을 가진 핵산 (변이체), 발현 카세트 및 이에 기반한 벡터, 표적 산물 또는 발현 벡터를 생산하기 위한 숙주 세포에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2830/008 (2013.01)
(72) 발명자
티슈추크 콘스탄틴 일리치
러시아 194352 상트페테르부르크 케이브이. 436 디. 41 피알. 후도즈니코브
게르쇼비치 파벨 미하일로비치
러시아 198328 상트페테르부르크 케이브이. 627 디. 45 페테르고프스코에 쇼세
페레펠키나 마리야 파블로브나
러시아 198328 상트페테르부르크 케이브이. 67 코프. 1 디. 16 유엘. 마샬라 자카로바
야코프레브 파벨 안드리비치
러시아 196135 상트페테르부르크 케이브이. 17 케이오알피. 3 디.28 피알-케이티. 유리야 가가리나
모로조프 드미트리 발렌티노비치
러시아 190000 상트페테르부르크 케이브이. 3 디. 20 유엘. 포치탐트스카야 아드미랄테이스키 알-엔

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15를 포함하는 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 프로모터 활성을 가진 핵산.

청구항 2

제1항에 따른 핵산 분자 및 작동 가능하게 연결된 이식 유전자를 포함하는 발현 카세트.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 이식 유전자가 단백질 또는 소형 저해성 핵산을 인코딩하는, 발현 카세트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 이식 유전자가 팩터 VIII 또는 이의 기능성 변이체, 팩터 IX 또는 이의 기능성 변이체, SMN1 단백질 (생존 운동신경세포 단백질), SARS-cov2의 RBD-S 폴리펩타이드 또는 치료학적 항체를 포함하는 군으로부터 선택되는 단백질을 인코딩하는, 발현 카세트.

청구항 5

제1항에 따른 핵산 또는 제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 플라스미드, AAV, 렌티바이러스 또는 아데노바이러스인, 발현 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서, 다음과 같은 AAV 혈청형들을 포함하는 군으로부터 선택되는 AAV인, 발현 벡터:

AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, rAAV.rh8, rAAV.rh10, rAAV.rh20, rAAV.rh39, rAAV.Rh74, rAAV.RHM4-1, AAV.hu37, rAAV.Anc80, rAAV.Anc80L65, rAAV.7m8, rAAV.PHP.B, rAAV2.5, rAAV2.6, rAAV2.8, rAAV2.9, rAAV2tYF, rAAV3B, rAAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15 또는 AAV.HSC16.

청구항 8

제1항에 따른 핵산 또는 제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 발현 카세트를 포함하는, 표적 생산물 또는 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터를 생산하기 위한 숙주 세포.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 유전학, 유전자 요법 및 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 프로모터 활성을 가진 핵산 (변이체), 발현 카세트 및 이에 기반한 벡터, 표적 생산물 또는 발현 벡터를 생산하기 위한 숙주 세포에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 프로모터는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉매하는 DNA 요소이다. 프로모터는 또한 프로모터/인핸서 요소의 일부일 수 있다. 프로모터 요소와 인핸서 요소 사이에 물리적 경계가 항상 명확한

것은 아니지만, 프로모터는 전형적으로 RNA 중합효소 및/또는 이의 부속 인자가 이에 결합하여 전사가 개시되는 핵산 분자 상의 부위를 지칭한다. 인핸서는 프로모터 활성을 시간적으로뿐 아니라 공간적으로 강화한다. 다수의 프로모터들이 광범위한 세포 타입들에서 전사 활성을 가진 것으로 알려져 있다. 프로모터는 2가지 계열로, 즉 구성적으로 작동하는 것과 유도 또는 억제에 의해 조절되는 것으로 나눌 수 있다. 이들 2가지 계열은 단백질을 발현하는 데 적합하다. 진핵생물 세포, 특히 포유류 세포에서 폴리펩타이드를 고 수준으로 생산하기 위해 사용되는 프로모터는 강력해야 하며, 바람직하게는 광범위한 세포 타입들에서 활성이어야 한다. 다수의 세포 타입에서 발현을 구동시킬 수 있는 강력한 구성적인 프로모터들이 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 여기서 상세히 기술할 필요가 없다.

[0003] 프로모터 및/또는 인핸서에 대한 예로는 레트로바이러스 LTR, 사이토메갈로바이러스 (CMV)(예를 들어, CMV 프로모터/인핸서), 유인원 바이러스 40 (SV40)(예를 들어, SV40 프로모터/인핸서), 아데노바이러스 (예를 들어, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터 (AdMLP))로부터 유래한 프로모터 및/또는 인핸서, CAG 프로모터뿐 아니라 TTR 프로모터 또는 EF1-α 프로모터와 같은 강력한 포유류 프로모터가 있다.

[0004] CMV 프로모터는 서브타입에 따라 589-1650 bp 길이이다 (Changyu Zheng ET ALL., All Human EF1α Promoters Are Not Equal: Markedly Affect Gene Expression in Constructs from Different Sources, Int J Med Sci. 2014; 11(5): 404-408, doi: 10.7150/ijms.8033). CAG 프로모터 (CMV 초기 인핸서/닭 β 액틴)는 868 bp 길이이다 (Nieuwenhuis, B., Haenzi, B., Hilton, S. *et al*. Optimization of adeno-associated viral vector-mediated transduction of the corticospinal tract: comparison of four promoters. *Gene Ther*. 2021; 28: 56-74, https://doi.org/10.1038/s41434-020-0169-1).

[0005] 전술한 프로모터들 모두 길이가 588 bp 이상이다. 발현 카세트에서 길이가 588 bp 이상인 프로모터는 다수의 발현 벡터를 이용해 거대 이식 유전자를 발현시키기에는 가장 적합한 옵션이 아니다.

[0006] 따라서, 짧은 프로모터를 구축할 필요가 있다.

[0007] CMV 프로모터를 비롯한 많은 프로모터들이 조직-특이적이지 않으며, 즉 특정 장기의 세포에서 치료학적 이식 유전자에 대해 선택적인 발현을 제공하지 못하며, 이런 사실은 유전자 요법 생산물을 제조하는 데 사용할 경우에 이들 프로모터의 명백한 단점이다.

[0008] 이에, 특정 장기의 세포에서 치료학적 이식 유전자에 대한 선택적인 발현을 제공하는 조직-특이적인 프로모터를 구축할 필요가 있다.

발명의 내용

[0009] 본 발명의 발명자들은 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15를 포함하는 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 가진 핵산이 프로모터 활성을 가진다는 것을 놀랍게도 발견하였다. 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15의 뉴클레오티드 서열을 가진 프로모터는 길이 범위가 123-252 bp이다. 아울러, 본 발명의 발명자들은 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15의 뉴클레오티드 서열을 가진 프로모터가 간세포 기원의 세포에서 조직-특이적인 프로모터 활성을 가진다는 것을 놀랍게도 발견하였다.

[0010] *정의 및 일반적인 방법*

[0011] 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 한, 본 발명과 관련하여 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어들은 당해 기술 분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 의미와 동일한 의미를 가질 것이다.

[0012] 아울러, 문맥상 달리 요구되지 않은 한, 단수형 용어는 용어의 복수를 망라할 것이며, 복수형 용어는 단수형 용어를 망라할 것이다. 전형적으로, 세포 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학, 분석 화학, 유기 합성 화학, 의학 및 제약 화학에서 분류 및 방법뿐 아니라 본 명세서에 기술된 단백질 및 핵산의 혼성화 및 화학은 당해 기술 분야에서 널리 사용되며, 당업자들에게 잘 공지되어 있다. 효소 반응 및 정제 방법은 제조사의 지침에 따라, 당해 기술 분야에서와 마찬가지로 또는 본 명세서에 기술된 바와 같이 수행된다.

[0013] 본 설명과 후속한 청구항에 사용된 바와 같이, 문맥상 달리 지시되지 않은 한, 용어 "함유한다" 및 "포함한다" 또는 이의 변형 형태, 예를 들어, "망라한다", "비롯하여", "포괄한다" 또는 "포함하는"은 언급된 정수 또는 정수들의 군을 내포하는 것으로 이해될 것이나, 임의의 다른 정수 또는 정수들의 군을 배제하는 것은 아니다.

[0014] *핵산 분자*

[0015] 본 설명에서 상호 호환적으로 사용되는 용어들 "핵산", "뉴클레익 서열", "핵산 서열", "폴리뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드", "폴리뉴클레오티드 서열" 및 "뉴클레오티드 서열"은, 비-천연 뉴클레오티드를 함유하거나 또는 함유하지 않는, 이중 가닥 DNA 또는 RNA, 단일 가닥 DNA 또는 RNA, 또는 이러한 DNA의 전사 산물로서, 핵산의 단편 또는 영역을 결정하는, 변형되거나 또는 변형되지 않은 정확한 뉴클레오티드 서열을 의미한다.

[0016] 본 설명에 사용된 바와 같이, 폴리뉴클레오티드는, 비-제한적인 예로서, 재조합 수단, 즉, 통상적인 클로닝 기술 및 PCR 등을 이용한, 재조합 라이브러리 또는 세포 게놈에서 핵산 서열의 클로닝 등을 비-제한적인 예로서 비롯하여, 당해 기술 분야에서 이용가능한 임의의 수단에 의해, 그리고 합성 수단에 의해 수득한 모든 핵산 서열을 망라한다.

[0017] 또한, 본원에서, 본 발명이 천연 염색체 환경, 즉 천연 상태의 뉴클레오티드 서열에 대한 것이 아닌 것 역시 포함하여야 한다. 본 발명의 서열은 단리 및/또는 정제된 것이며, 즉, 예를 들어, 복사 (copy)에 의해 직접 또는 간접적으로 샘플 수집된 것으로, 이의 환경이 적어도 부분적으로 변형된 것이다. 이에, 재조합 유전학에 의해, 예를 들어 숙주 세포를 이용하여 재조합 유전학에 의해 수득하거나 또는 화학 합성 방식에 의해 수득한 단리된 핵산 역시 본 발명에서 언급되어야 한다.

[0018] 달리 지칭되지 않은 한, 용어 뉴클레오티드 서열은 이의 상보체를 포함한다. 즉, 특정 서열을 가진 핵산은 이의 상보적인 서열을 가진 이의 상보적인 가닥을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다.

[0019] *벡터*

[0020] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "벡터"는 여기에 연결된 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 또한, 본원에서 용어 "벡터"는 핵산을 운반할 수 있는 재조합 바이러스 입자를 지칭한다.

[0021] 본 설명에 사용된 바와 같이, 용어 "발현"은 이의 프로모터에 의해 구동되는 특정 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 번역으로서 정의된다.

도면의 간단한 설명

[0022] **도 1**은 서열번호 1 및 2의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 EGFP 리포터 단백질을 발현하는 세포의 형광성 증가 비율을 도시한 그래프이다.

형질감염 후 EGFP-발현 세포의 비율:

1 - EGFP 이식 유전자를 함유하고 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 카세트 (대조군);

2 - EGFP 이식 유전자를 함유하고 사이토메갈로바이러스 (CMV) 바이러스 프로모터 영역이 추가된, 발현 카세트 (대조군);

3 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 2의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

4 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 1의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트.

도 2는 서열번호 3-7 및 서열번호 11-14의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 EGFP 리포터 단백질을 발현하는 세포의 형광성 증가 비율을 나타낸 그래프이다.

형질감염 후 EGFP-발현 세포의 비율:

1 - EGFP 이식 유전자를 함유하고 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 카세트 (대조군);

2 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 4의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

3 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 5의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

4 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 6의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

5 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 7의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

6 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 13의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

7 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 14의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

8 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 11의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

9 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 12의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

10 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 3의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트.

도 3은 서열번호 8-10 및 15의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 EGFP 리포터 단백질을 발현하는 세포의 형광성 증가 비율을 나타낸 그래프이다.

형질감염 후 EGFP-발현 세포의 비율:

1 - EGFP 이식 유전자를 함유하고 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 카세트 (대조군);

2 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 8의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

3 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 10의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

4 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 9의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

5 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 15의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트.

도 4는 서열번호 3-7 및 서열번호 11-14의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 EGFP 리포터 단백질을 발현하는 세포의 형광 강도 증가를 도시한 그래프이다.

형질감염 후 EGFP-발현 세포의 형광 강도:

1 - EGFP 이식 유전자를 함유하고 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 카세트 (대조군);

2 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 4의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

3 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 5의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

4 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 6의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

5 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 7의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

6 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 13의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

7 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 14의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

8 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 11의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

9 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 12의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

10 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 3의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트.

도 5는 서열번호 8-10 및 15의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 EGFP 리포터 단백질을 발현하는 세포의 형광 강도 증가를 보여주는 그래프이다.

형질감염 후 EGFP-발현 세포의 형광 강도:

1 - EGFP 이식 유전자를 함유하고 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 카세트 (대조군);

2 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 8의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

3 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 10의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현

카세트;

4 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 9의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

5 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 15의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트.

도 6은 서열번호 3, 11 및 14의 서열에 상응하는 프로모터 활성을 가진 핵산을 이용할 경우 응고 단백질의 생산 증가 수준을 도시한 그래프이다.

형질감염시 응고 단백질의 생산 수준:

1 - 응고 인자 이식 유전자를 함유하지만 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 카세트 (대조군);

2 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 3의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된, 발현 카세트;

3 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 11의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된, 발현 카세트;

4 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 14의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된, 발현 카세트.

도 7은 서열번호 3, 11 및 14의 서열에 상응하는 프로모터 활성을 가진 핵산을 이용할 경우, 응고 단백질의 활성 증가 수준을 도시한 그래프이다.

형질감염시 응고 단백질의 활성 수준:

1 - 응고 인자 이식 유전자를 함유하지만 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 카세트 (대조군);

2 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 3의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된, 발현 카세트;

3 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 11의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된, 발현 카세트;

4 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 14의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된, 발현 카세트.

도 8은 EGFP 리포터 단백질을 서열번호 3-7 및 서열번호 11-14의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 발현하는 세포의 비율 증가를 보여주는, Huh7 및 U87 세포주에서 신규 생산된 서열의 조직 특이성 측정 그래프이다.

형질감염 후 EGFP-발현 세포의 비율:

1 - EGFP 이식 유전자를 함유하고 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 카세트 (대조군);

2 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 4의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

3 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 5의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

4 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 6의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

5 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 7의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

6 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 13의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

7 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 14의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

8 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 11의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

9 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 12의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현

카세트;

10 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 3의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트.

도 9는 EGFP 리포터 단백질을 서열번호 7 및 11의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 발현하는 세포의 비율 증가를 보여주는, Huh7, HepG2 및 HEK293 세포주에서 신규 생산된 서열의 조직 특이성 측정 그래프이다.

형질감염 후 EGFP-발현 세포의 비율:

1 - EGFP 이식 유전자를 함유하고 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 카세트 (대조군);

2 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 7의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

3 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 11의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트.

도 10은 EGFP 리포터 단백질을 서열번호 1 및 2의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 발현하는 세포의 형광 강도 증가를 보여주는, CHO 세포주에서 생산된 서열의 조직 특이성 그래프이다.

형질감염 후 EGFP-발현 세포의 형광 강도:

1 - EGFP 이식 유전자를 함유하고 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 카세트 (대조군);

2 - EGFP 이식 유전자를 함유하고 사이토메갈로바이러스 (CMV) 바이러스 프로모터 영역이 추가된, 발현 카세트 (대조군);

3 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 2의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

4 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 1의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트.

도 11은 EGFP 리포터 단백질을 서열번호 1 및 2의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 발현하는 세포의 형광 강도 증가를 보여주는, HepG2 세포주에서 생산된 서열의 조직 특이성 측정 그래프이다.

형질감염 후 EGFP-발현 세포의 형광 강도:

1 - EGFP 이식 유전자를 함유하고 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 카세트 (대조군);

2 - EGFP 이식 유전자를 함유하고 사이토메갈로바이러스 (CMV) 바이러스 프로모터 영역이 추가된, 발현 카세트 (대조군);

3 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 2의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

4 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 1의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트.

도 12는 EGFP 리포터 단백질을 서열번호 3-7 및 서열번호 11-14의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 발현하는 세포의 형광 강도 증가를 보여주는, Huh7 및 U87 세포주에서 생산된 서열의 조직 특이성 측정 그래프이다.

형질감염 후 EGFP-발현 세포의 형광 강도:

1 - EGFP 이식 유전자를 함유하고 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 카세트 (대조군);

2 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 4의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

3 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 5의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

4 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 6의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

5 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 7의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

6 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 13의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

7 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 14의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현

카세트;

8 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 11의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

9 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 12의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

10 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 3의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트.

도 13은 EGFP 리포터 단백질을 서열번호 7 및 11의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 발현하는 세포의 형광 강도 증가를 보여주는, Huh7, HepG2 및 HEK293 세포주에서 생산된 서열의 조직 특이성 측정 그래프이다.

형질감염 후 EGFP-발현 세포의 형광 강도:

1 - EGFP 이식 유전자를 함유하고 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 카세트 (대조군);

2 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 7의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트;

3 - EGFP 이식 유전자를 서열번호 11의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 함유하는, 발현 카세트.

도 14는 응고 인자 서열을 서열번호 3, 8, 11 및 14에 해당하는 프로모터 영역의 통제 하에 AAV-기반의 발현 벡터 형태로 포함하는 발현 카세트 전달시, 응고 단백질의 생산 수준 증가를 보여주는 그래프이다.

형질도입시 응고 단백질의 생산 수준:

1 - 응고 인자 이식 유전자를 함유하지만 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 벡터 (대조군);

2 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 8의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된 카세트를 포함하는, 발현 벡터;

3 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 11의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된 카세트를 포함하는, 발현 벡터;

4 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 14의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된 카세트를 포함하는, 발현 벡터;

5 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 3의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된 카세트를 포함하는, 발현 벡터;

도 15는 응고 인자 서열을 서열번호 3, 8, 11 및 14에 해당하는 프로모터 영역의 통제 하에 AAV-기반의 발현 벡터 형태로 포함하는 발현 카세트 전달시, 응고 단백질의 활성 수준 증가를 보여주는 그래프이다.

형질도입시 응고 단백질의 활성 수준:

1 - 응고 인자 이식 유전자를 함유하지만 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 벡터 (대조군);

2 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 8의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된 카세트를 포함하는, 발현 벡터;

3 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 11의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된 카세트를 포함하는, 발현 벡터;

4 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 14의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된 카세트를 포함하는, 발현 벡터;

5 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 3의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된 카세트를 포함하는, 발현 벡터;

도 16은 응고 인자 서열을 서열번호 8 및 11에 해당하는 프로모터 영역의 통제 하에 rAAV5 또는 rAAV6-기반의 발현 벡터 형태로 포함하는 발현 카세트 전달시, 응고 단백질의 생산 수준 증가를 보여주는 그래프이다.

형질도입시 응고 단백질의 생산 수준:

1 - 응고 인자 이식 유전자를 함유하지만 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 벡터 (대조군);

2 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 11의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된 카세트를 포함하는, 발현 벡터;

3 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 8의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된 카세트를 포함하는, 발현 벡터.

도 17은 응고 인자 서열을 서열번호 8 및 11에 해당하는 프로모터 영역의 통제 하에 rAAV5 또는 rAAV6-기반의 발현 벡터 형태로 포함하는 발현 카세트 전달시, 응고 단백질의 활성 수준 증가를 보여주는 그래프이다.

형질도입시 응고 단백질의 활성 수준:

1 - 응고 인자 이식 유전자를 함유하지만 프로모터 영역은 비-함유한, 발현 벡터 (대조군);

2 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 11의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된 카세트를 포함하는, 발현 벡터;

3 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 8의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된 카세트를 포함하는, 발현 벡터.

도 18은 AAV-기반의 발현 벡터로서 B6.129S-F8tm1Smoc 마우스에 생체내 전달시, 서열번호 8 및 11의 핵산에 해당하는 프로모터 영역의 통제 하에 응고 인자 단백질의 수준 증가를 보여주는 그래프이다.

주입 후 동물 혈장에서의 응고 인자 단백질 수준:

1 - AAV 비-함유 대조군 용액 (음성 대조군).

2 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 8의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된 카세트를 포함하는 AAV-기반의 발현 벡터.

3 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 11의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된 카세트를 포함하는 AAV-기반의 발현 벡터.

도 19는 AAV-기반의 발현 벡터로서 B6.129S-F8tm1Smoc 마우스에 생체내 전달시, 서열번호 8 및 11의 핵산에 해당하는 프로모터 영역의 통제 하에 응고 인자 서열의 활성 수준 증가를 보여주는 그래프이다.

주입 후 동물 혈장에서의 응고 인자 단백질 수준:

1 - AAV 비-함유 대조군 용액 (음성 대조군).

2 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 8의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된 카세트를 포함하는 AAV-기반의 발현 벡터.

3 - 응고 인자 이식 유전자가 서열번호 11의 뉴클레익 서열에 해당하는 프로모터의 통제 하에 배치된 카세트를 포함하는 AAV-기반의 발현 벡터.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] *핵산*

[0024] 일 측면에서, 본 발명은 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15로 된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 함유한, 프로모터 활성을 가진 핵산에 관한 것이다.

[0025] 본 발명의 일부 구현예에서, 핵산은 단리된 핵산이다.

[0026] "단리된" 핵산 분자는 적어도 하나의 핵산 분자-불순물로부터 동정 및 분리된 것이다. 단리된 핵산 분자는 천연 조건에서 발견되는 형태 또는 세트와는 다르다. 즉, 단리된 핵산 분자는 천연 조건 하에 세포에 존재하는 핵산 분자와는 다르다.

[0027] 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15의 서열을 가진 모든 핵산이 프로모터 활성을 가진다.

[0028] 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15의 뉴클레오티드 서열을 가진 프로모터들 모두 간세포 기원의 세포에서 조직-특이적인 프로모터 활성을 가진다.

[0029] 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15의 뉴클레오티드 서열을 가진 프로모터들 모두 강력한 프로모터이고, 발현 벡터의 일부로서 이의 사용시 표적 단백질의 생산 및 활성 수준 증가가 유발된다.

[0030] *발현 카세트. 발현 벡터.*

[0031] 일 측면에서, 본 발명은 프로모터 활성을 가진 상기한 핵산들 중 임의의 것을 포함하는 발현 카세트에 관한 것이다.

[0032] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "를 발현하는 카세트" 또는 "발현 카세트"는 특히 적절한 상황에서 발현 카세트에 함유된 서열, 즉 대상 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현을 촉발할 수 있는 DNA 단편을 지칭한다. 발현 카세트는 숙주 세포 안으로 도입될 경우, 특히 대상 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 RNA로 전사한 다음 전형적으로 추가로 처리한 후 궁극적으로 대상 폴리펩타이드로 번역하는 세포 기전에 참여할 수 있다. 이러한 발현 카세트는 발현 벡터에 포함될 수 있다.

[0033] 일부 구현예에서, 발현 카세트는 5'-말단에서 3'-말단 방향으로 하기 요소들을 포함한다:

[0034] 좌측 (첫 번째) ITR (역위된 말단 반복부);

[0035] 프로모터 활성을 가진 전술한 핵산들 중 어느 하나;

[0036] 이식 유전자;

[0037] 폴리아데닐화 신호;

[0038] 우측 (두 번째) ITR.

[0039] 상기한 발현 카세트의 구조 요소들은 서로 작동 가능하게 연결된다.

[0040] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "작동 가능하게 연결된"은 폴리뉴클레오티드 (또는 폴리펩타이드) 요소들이 기능적인 관계로 연결된 것을 지칭한다. 핵산이 다른 핵산 서열과 기능적으로 연관된 상태로 존재한다면, 핵산이 "작동 가능하게 연결된" 것이다. 예를 들어, 전사 조절 서열이 코딩 서열의 전사에 영향을 미친다면, 이것은 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 것이다. 용어 "작동 가능하게 연결된"은, 연결되는 DNA 서열들이 전형적으로 인접하고, 단백질 코딩 영역 2개를 연결하는 것이 필요할 경우에는 또한 인접하며 리딩 프레임으로 존재하는 것을 의미한다.

[0041] 일부 구현예에서, 발현 카세트는 서열번호 16의 뉴클레오티드 서열을 가진 좌측 (첫 번째) ITR을 포함한다.

[0042] 일부 구현예에서, 발현 카세트는 서열번호 17의 뉴클레오티드 서열을 가진 폴리아데닐화 신호를 포함한다.

[0043] 일부 구현예에서, 발현 카세트는 서열번호 18의 뉴클레오티드 서열을 가진 우측 (두 번째) ITR을 포함한다.

[0044] 일부 구현예에서, 발현 카세트는 5'-말단에서 3'-말단으로 아래 요소들을 포함한다:

[0045] 서열번호 16의 뉴클레오티드 서열을 가진 좌측 (첫 번째) ITR (역위된 말단 반복부);

[0046] 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15로 된 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 가진 프로모터;

[0047] 이식 유전자;

[0048] 서열번호 17의 뉴클레오티드 서열을 가진 폴리아데닐화 신호;

[0049] 서열번호 18의 뉴클레오티드 서열을 가진 우측 (두 번째) ITR.

[0050] 일부 구현예에서, 발현 카세트는 단백질 또는 소형 저해성 핵산을 인코딩하는 이식 유전자를 포함한다.

[0051] 일부 구현예에서, 발현 카세트는 팩터 VIII 또는 이의 기능성 변이체, 팩터 IX 또는 이의 기능성 변이체, SMN1 단백질 (생존 운동신경세포 단백질), SARS-cov2의 RBD-S 폴리펩타이드 또는 치료학적 항체를 포함하는 군으로부터 선택되는 단백질을 인코딩하는 이식 유전자를 포함한다.

[0052] 일 측면에서, 본 발명은 프로모터 활성을 가진 전술한 핵산들 중 어느 하나 또는 전술한 발현 카세트들 중 어느

하나를 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다.

[0053] 본 발명의 일부 구현예에서, 벡터 (예를 들어, 박테리아 복제 오리진 부위를 가진 박테리아 벡터 및 에피솜 벡터)는 이것이 도입된 숙주 세포에서 자율적인 복제가 가능하다. 본 발명의 추가의 구현예에서, 벡터 (예를 들어, 비-에피솜 벡터)는 숙주 세포에 도입시 숙주 세포의 게놈으로 통합되어, 숙주 게놈과 함께 복제될 수 있다. 또한, 특정 벡터는 이것이 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 간단히 "발현 벡터")로 지칭된다.

[0054] 발현 벡터는 플라스미드, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-부속 바이러스 (AAV), 식물 바이러스, 예를 들어, 콜리플라워 모자이크 바이러스, 담배 모자이크 바이러스, 코스미드, YAC, EBV 등을 망라한다. DNA 분자는 벡터의 전사 및 번역 조절 서열이 DNA의 전사 및 번역을 제어하는 의도한 기능을 제공하도록 벡터에 삽입될 수 있다. 발현 벡터 및 발현 조절 서열은 사용되는 발현 숙주 세포와 양립 가능하도록 선택될 수 있다. DNA 분자는 표준 방법 (예를 들어, 상보적인 제한효소 부위들의 라이게이션 또는 제한효소 부위가 없을 경우에는 블런트 말단 라이게이션)을 통해 발현 벡터에 도입될 수 있다.

[0055] 본 발명의 일부 구현예에서, 벡터는 플라스미드, AAV, 아데노바이러스 또는 렌티바이러스이다.

[0056] 본 발명의 일부 구현예에서, 벡터는 플라스미드, 즉 추가의 DNA 분절이 삽입될 수 있는 원형의 이중 가닥 DNA이다.

[0057] 본 발명의 일부 구현예에서, 벡터는 추가의 DNA 분절이 바이러스 게놈에 삽입될 수 있는 바이러스 (발현) 벡터이다.

[0058] 일부 구현예에서, 발현 벡터는 재조합 아데노-부속 바이러스 (AAV)이다.

[0059] 일부 구현예에서, AAV는 다음과 같은 AAV 혈청형을 포함하는 군으로부터 선택된다: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, rAAV.rh8, rAAV.rh10, rAAV.rh20, rAAV.rh39, rAAV.Rh74, rAAV.RHM4-1, AAV.hu37, rAAV.Anc80, rAAV.Anc80L65, rAAV.7m8, rAAV.PHP.B, rAAV2.5, rAAV2.6, rAAV2.8, rAAV2.9, rAAV2tYF, rAAV3B, rAAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15 또는 AAV.HSC16.

[0060] 본 발명의 일부 구현예에서, 벡터 또는 카세트는 프로모터 외에도 다른 발현 조절 서열을 포함할 수 있다. 본 설명에 사용된 바와 같이, 용어 "다른 발현 조절 서열"은 이것이 삽입된 코딩 서열의 발현 및 프로세싱을 수행하는데 필수적인 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 발현 조절 서열의 선택을 비롯하여 발현 벡터 또는 카세트의 설계는 형질전환할 숙주 세포의 타입 선택, 단백질의 필요한 발현 수준 등과 같이 이러한 인자들에 따라 좌우될 수 있음을, 당해 기술 분야의 당업자라면 이해할 것이다. 발현 조절 서열은 프로모터 외에도 대응하는 전사 개시, 종결 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호와 같은 효율적인 RNA 프로세싱 신호; 세포질 mRNA를 안정화하는 서열; 번역 효율을 강화하는 서열 (즉, Kozak 컨센서스 서열); 단백질 안정성을 강화하는 서열; 및 요망하는 경우 단백질 분비를 강화하는 서열을 망라한다. 이러한 조절 서열들의 특성은 숙주 유기체에 따라 다르며, 원핵생물의 경우 이러한 조절 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 전사 종결 서열을 포함하고; 진핵생물의 경우 이러한 조절 서열은 전형적으로 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. 발현 조절 서열은 발현 및 프로세싱에 중요한 구성성분들을 적어도 모두 포괄한다.

[0061] 본 발명에 따른 재조합 발현 벡터는 전술한 유전자 및 발현 조절 서열 외에도, 숙주 세포에서 벡터의 복제를 제어하는 서열 (예를 들어, 복제 오리진) 및 선별가능한 마커 유전자와 같이 추가의 서열을 운반할 수 있다. 선별가능한 마커 유전자는 벡터 또는 카세트가 도입된 숙주 세포의 선별을 용이하게 한다.

[0062] 본 발명의 일 구현예에서, 발현 벡터는 하나 이상의 대상 폴리뉴클레오티드 서열, 대상 유전자, 또는 파보바이러스 서열 또는 역위된 말단 반복부 (ITR) 서열이 측면에 배치된 "이식 유전자"를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0063] 본 발명의 카세트도 벡터도 아데노-부속 바이러스의 비-구조 단백질 (Rep) 및 구조 단백질 (Cap)을 인코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열을 포함하지 않는다.

[0064] *숙주 세포*

[0065] 일 측면에서, 본 발명은 프로모터 활성을 가진 전술한 핵산들 중 어느 하나를 포함하는, 표적 생산물 또는 전술

한 발현 벡터들 중 어느 하나를 생산하기 위한 숙주 세포에 관한 것이다.

[0066] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는 본 발명에 따른 재조합 발현 벡터 또는 카세트가 도입된 세포를 지칭한다. "숙주 세포"는 특정 대상 세포뿐 아니라 이 세포의 자손도 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 돌연변이 또는 환경 영향으로 인해 후대 세대에서 변형이 발생할 수 있으므로, 이들 자손은 실제 부모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 이러한 세포는 여전히 본 명세서에서 사용되는 "숙주 세포"라는 용어의 범위에 포함된다.

[0067] 본 발명에 따른 발현 벡터 또는 카세트는 포유류 세포, 식물 세포, 박테리아 숙주 세포 또는 효모 숙주 세포의 형질감염에 이용할 수 있다. 형질감염은 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하는 임의의 공지된 기법을 통해 수행될 수 있다. 이종의 폴리뉴클레오티드를 포유류 세포에 도입하는 방법들은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 덱스트란-매개 형질감염, 양이온성 폴리머-핵산 복합체 형질감염, 칼슘 포스페이트 석출, 폴리브렌-매개 형질감염, 프로토플라스트 융합 (protoplast fusion), 리포솜에 의한 폴리뉴클레오티드의 캡슐화 및 핵에 DNA 직접 미세주입법 등이 있다. 아울러, 핵산 분자는 바이러스성 (발현) 벡터를 통해 포유류 세포에 도입할 수도 있다.

[0068] 형질감염시 숙주로 이용되는 포유류 세포주들은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 이용가능한 여러가지 불멸화된 세포주 등이 있다. 이러한 것으로는, 예를 들어, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, NS0 세포, SP2 세포, HEK-293T 세포, FreeStyle 293 세포 (Invitrogen), NIH-3T3 세포, HeLa 세포, 베이비 햄스터 신장 (BHK) 세포, 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (COS), 인간 간세포암 세포 (예를 들어, Hep G2), A549 세포, SK-HEP1, HUH7, Hep-RG 및 여러가지 기타 세포주 등이 있다. 세포주는 어떤 세포주가 높은 발현 수준을 달성하고 생산하는 단백질의 필요한 특징을 제공하는 지를 결정함으로써 선택한다. 이용할 수 있는 기타 세포주로는 Sf9 또는 Sf21 세포와 같은 곤충 세포주가 있다. 본 발명에 따른 재조합 발현 벡터를 포유류 숙주 세포에 도입하는 경우, 숙주 세포에서 표적 단백질을 발현하기에 또는 더 바람직하게는 표적 단백질을 숙주 세포를 배양하는 배양 배지로 분비하기에 충분한 기간 동안 숙주 세포를 배양함으로써 표적 단백질을 생산한다. 표적 단백질은 표준 단백질 정제 기법을 이용해 배양 배지에서 분리할 수 있다. 식물 숙주 세포로는 예를 들어 니코티아나 (Nicotiana), 아라비돕시스 (Arabidopsis), 개구리밥 (duckweed), 옥수수, 밀, 감자 등이 있다. 박테리아 숙주 세포로는 에스케리키아 (Escherichia) 및 스트렙토마이세스 (Streptomyces) 종을 포함한다. 효모 숙주 세포로는 스키조사카로마이세스 폼베 (Schizosaccharomyces pombe), 사카로마이세스 세레비지애 (Saccharomyces cerevisiae) 및 피키아 패스토리스 (Pichia pastoris)를 포함한다.

[0069] 상기한 숙주 세포는 인간 배아를 이용해 구축된 숙주 세포를 지칭하는 것은 아니다.

[0070] 상기한 숙주 세포는 인간 생식계열 세포의 유전자 무결성 (genetic integrity)을 변형함으로써 구축된 숙주 세포를 지칭하진 않는다.

[0071] **실시예**

[0072] 하기 실시예는 본 발명을 더 잘 이해하기 위해 제공된다. 실시예는 예시하기 위한 목적일 뿐, 어떠한 방식으로도 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0073] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 본 명세서에 원용에 의해 통합된다. 전술한 발명이 명확한 이해를 목적으로 예시로서 예를 들어 어느 정도 상세히 기술되었지만, 당해 기술 분야의 당업자라면 본 발명의 교시 내용에 비추어, 첨부된 구현예의 사상 또는 범위로부터 이탈하지 않으면서 이에 대해 일부 변경 및 수정을 행할 수 있음은 자명할 것이다.

[0074] **재료 및 일반적인 방법**

[0075] **재조합 DNA 기법**

[0076] Sambrook, J. et al, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012에 기재된 바와 같이 표준 방법으로 DNA를 조작하였다. 분자 생물학적 시약은 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하였다. 간략하게는, 플라스미드가 세포 집단에서 소실되지 않도록 항생제 선택압 하에 배양한 *E. coli* 세포에서 추가로 조작하기 위해 플라스미드 DNA를 생산하였다. 본 발명자들은 시판 키트를 사용해 세포에서 플라스미드 DNA를 단리하고, 농도를 측정하였으며, 제한효소 엔도뉴클레아제 처리 또는 PCR 증폭에 의한 클로닝에 이용하였다. DNA 단편들은 리가제를 사용해 서로 연결하고, 클론 선별 및 추가의 생산을 위해 박테리아 세포에 형질전환하였다. 구축된 모든 유전자 작제물은 제한효소 패턴 및 완전한 Sanger 서

열 분석에 의해 검증하였다.

[0077] **DNA 서열 결정**

[0078] DNA 서열은 생거 서열분석으로 결정하였다. DNA 및 단백질 서열을 분석하였으며, 서열 데이터를 서열 생성, 맵핑, 분석, 주석 및 예시를 위해 SnapGene Viewer 4.2 이상에서 처리하였다.

[0079] **세포 배양물의 배양**

[0080] 실험에는 HEK293 (인간 배아 신장 클론 293 세포주), HUH7 (인간 간세포암 세포주), U87-MG (Uppsala 87 악성 신경교종 세포주), CHO-K1-S (중국 햄스터 난소 세포주) 및 HepG2 (인간 간세포암 세포주)를 사용하였다. AAV를 생산하는 데 사용한 HEK293 현탁 세포는 FBS 및 항생제 비-함유 완전 배양 배지에서 37℃ 및 5% CO_2의 표준 조건 하에 배양하였다. EGFP 및 AAV 생산물의 발현 효능을 검사하기 위해 사용한 부착성 HEK293, HUH7 및 HepG2 세포는 10% FBS, 항생제/항진균제가 보충된 완전 DMEM 배지에서 37℃ 및 5% CO_2의 표준 조건 하에 배양하였다. 조직 특이성을 검사하기 위해 사용한 부착성 U87-MG 및 CHO-K1-S 세포는 각각 10% FBS, 항생제/항진균제가 보충된 완전 EMEM 영양 배지, 및 5% FBS, 항생제/항진균제가 보충된 DMEM/F12 배지에서 37℃ 및 5% CO_2의 표준 조건 하에 배양하였다.

[0081] 세포가 80~90% 컨플루언스에 도달하면 서브 배양하였다. TrypLE Select 효소 (10x)를 사용해 세포 단층을 해리하였다. 트리판 블루 염색과 일회용 세포 계수 챔버를 자동 Countess II 계수기에서 이용함으로써 세포 생존성을 평가하였다.

[0082] **세포 배양물의 형질감염**

[0083] 형질감염시 새로운 프로모터 변이체의 기능적인 활성을 평가하기 위해, 응고 인자 및 EGFP 이식 유전자에 대한 다양한 변이체를 발현하는 발현 카세트를 포함하는 플라스미드를 이용하였다. 12웰 플레이트의 웰에 모델 세포주를 10,000개 세포/cm^2 밀도로 예비 접종하였다. 1일 후, 검사 샘플 및 대조군 샘플의 플라스미드 DNA를 동일한 카피수로 리포펙타민 3000과의 복합체 형태로 첨가하였다. 녹색 형광 단백질 (EGFO)을 인코딩하는 유전자에 기반한 이식 유전자 변이체의 경우, 형질감염 후 3일차에, EGFP-발현 세포의 비율과 세포 형광 강도를 유세포 측정에 의해 확인하였다. 응고 인자에 기반한 이식 유전자 변이체의 경우, 형질감염 후 7일차에, 배양물 배지에서 응고 단백질의 함량 및 활성을 ELISA 및 발색 분석으로 확인하였다. 온전한 모델 세포주를 음성 대조군으로 사용하였다.

[0084] **AAV 재조합 벡터의 바이러스 입자 구축 및 정제**

[0085] 응고-인자-기반의 이식 유전자를 포함하는 재조합 AAV 바이러스 입자를 생산하기 위해, 하기 플라스미드 3종으로 형질감염된 HEK293 생산자 세포를 이용하였다:

[0086] ● 응고 인자를 발현시키기 위한 AAV 발현 카세트를 포함하는 플라스미드;

[0087] ● 혈청형 AAV6/AAV5의 Cap 유전자 및 혈청형 AAv2의 Rep 유전자를 포함하는 플라스미드, 각 유전자는 대안적인 리딩 프래임을 이용해 단백질 산물 여러개를 인코딩한다;

[0088] ● AAV 캡시드 조립 및 패키징에 필요한 Ad2 아데노바이러스 유전자를 포함하는 플라스미드.

[0089] 형질감염 후 72시간에, 세포 용해한 다음 여과, 크로마토그래피 및 초원심분리 방법을 이용해 바이러스 입자를 정제 및 농축하였다. 재조합 바이러스 게놈 영역에 대해 특이적인 프라이머 및 샘플을 이용한 정량적인 PCR에 의해 바이러스 입자의 역가를 확인하였으며, 1 ml 당 바이러스 게놈의 카피수로 나타내었다.

[0090] **세포 배양물의 형질도입**

[0091] HUH7 세포주를 12웰 플레이트에 10,000 세포/cm^2의 밀도로 예비 접종하였다. 세포가 부착성 기판에 부착된 후, AAV 제제를 MOI 500,000 vg/세포로 도입하였다. 형질도입 후 7일차에, 배양액에서 응고 단백질의 수준 및 활성을 ELISA 및 발색 분석으로 확인하였다. 배양물에서 응고 단백질의 수준 및 활성의 평가를 수반하는 실험은 6번의 독립 실험으로 수행하였다. 온전한 세포를 음성 대조군으로 이용하였다.

[0092] **유세포 측정을 이용한 EGFP 리포터 단백질을 발현하는 세포의 비율 및 세포 형광 강도 결정**

[0093] 유세포 측정기에서 EGFP 리포터 단백질의 발현을 평가하기 위해, 형질감염 후 3일차에 완충제 및 프로피듐 아이

오다이드 (PI)로 구성된 사전-제조 혼합물을 세포 석출물에 완충제 1 ml 당 10 ㎍/ml 농도의 PI 1 ㎕ 비율로 첨가하였다. 보완 (compensation)을 평가하기 위해 플라스미드 DNA (이소형)로 형질감염되지 않은 PI 비-염색 세포를 96웰 마이크로플레이트 웰로 옮기고, 마이크로플레이트의 나머지 웰에는 PI를 이용해 대조군 및 샘플을 측정하기 위해 완충제/PI 혼합물을 첨가하였다. 세포 샘플을 마이크로플레이트로 옮긴 후 광 차단 하에 5분간 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 후, 검사 세포 샘플이 든 마이크로플레이트를 분석하기 위해 유세포 측정기에 장착하였다. 유세포 측정을 이용해, EGFP를 포함하는 세포의 백분율과 형광 신호의 평균 강도를 결정하였다. 각 샘플은 기술적 리플리케이트 3회로 측정하였다 (분석 이벤트 수는 10,000 이상임).

[0094] **ELISA에 의한 응고 인자 단백질의 함량 결정**

[0095] HUH7 세포에 표적 후보물질을 형질감염 및 형질도입한 후 배양액에서 응고 인자 단백질의 함량을 비-경쟁적인 고상 효소 면역분석 (ELISA)의 샌드위치 방법으로 평가하였다. 간략하게는, 배양액 샘플을 시판 완충제에 희석하고, 1차 응고 인자-특이 항체로 감작화된 96웰 마이크로플레이트에 첨가하였다. 동일한 마이크로플레이트에 검량선을 작성하기 위한 표준물질, 즉 대조군을 첨가하였다. 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트 웰을 완충제로 세척한 후 바이오틴화된 항체, 호스래디시 퍼옥시다제가 접합된 스트렙타비딘 용액 및 테트라메틸벤지딘 (TMB) 기질을 투입하였다. 그 후, 바이오틴화된 검출 응고-인자-특이 항체가 함유된 용액을 투입한 다음 마이크로플레이트를 37℃에서 30분간 인큐베이션하였다. 형성된 복합체에 스트렙타비딘 호스래디시 퍼옥시다제 접합체 용액을 첨가하여, 플레이트를 37℃에서 30분간 인큐베이션하였다. 효소 반응을 가시화하기 위해 TMB 용액을 투입하였다. 필요한 염색 강도 수준에 도달하면, 모든 웰에 정지 용액을 첨가해 반응을 중단시켰다. 반응 중단 후 광학 밀도를 측정하였다. 검사 샘플내 응고 인자의 농도는 희석 전 인자를 고려해, 표준 샘플 검량선을 이용한 발색 염색 결과의 표준화를 통해 측정하였다.

[0096] **ELISA에 의한 응고 인자 단백질의 활성 수준 결정**

[0097] HUH7 세포를 표적 후보물질 및 대조군 샘플로 형질감염 및 형질도입한 후 배양물 배지에서 응고 인자 단백질의 활성을 발색 분석으로 평가하였다. 분석은, 칼슘 이온, 인지질 및 팩터 IXa의 존재 하에 팩터 X가 활성화된 형태 Xa로 변환되고, 팩터 VIII가 반응에 조인자로서 기능하고, 팩터 X 활성화 비율이 팩터 VIII의 수준과 선형적인 관계가 존재한다는 사실을 기반으로 한다. 간략하게는, 시판 완충제에 희석한 배양물 배지 샘플, 검량선 작성을 위한 표준물질 및 대조군을 96웰 마이크로플레이트로 옮겼다. 그런 후, 샘플을 37℃에서 3분간 인큐베이션한 다음 팩터 IXa, 팩터 X, 트롬빈, $CaCl_2$ 및 인지질을 포함하는 팩터 시약 용액을 마이크로플레이트 웰에 투입하였다. 그 후, 마이크로플레이트를 37℃에서 4분간 인큐베이션한 다음 발색 기질 용액 S-2765+I-2581를 웰에 투입하였다. 플레이트를 37℃에서 7분간 인큐베이션하였다. 필요한 염색 강도 수준에 도달하면, 20% 아세트산 용액을 모든 웰에 투입해 반응을 정지시켰다. 마이크로플레이트 웰에서 용액의 광학 밀도를 측정하였다. 검사 샘플내 응고 인자의 활성은 예비 희석을 감안해 표준 샘플 검량선에 의해 발색 염색 결과를 표준화함으로써 구하였다.

[0098] **생체내 실험 동물 연구**

[0099] 실험에는 응고 인자가 결핍된 B6.129S-F8tm1Smoc 마우스 (6-8주령의 수컷)를 이용하였다. 생산물을 동물에 꼬리 정맥을 통해 1회 정맥내 주사를 통해 투여하였다. 음성 대조군 동물에는 AAV 프리 완충액을 투여하였다. 주사 당일 생산물 투여하기 전, 그리고 발현 벡터를 투여한 후 70일차에 혈장 샘플을 채취하였다. 모든 동물 검사는 ARRIVE 지침에 완전히 준하여 수행하였다.

[0100] **통계학적 데이터 분석**

[0101] 결과는 평균값±표준편차 (SD)로 표시하고, 일원분산분석 (ANOVA) 및 이후 더넷의 다중 쌍별 비교를 채택해 실험 결과들을 비교하였으며, 이들은 통계학적으로 유의한 것으로 확인되었다.

[0102] **실시예 1.**

[0103] 대상 유전자의 발현 수준을 높이기 위해, 유전자 작제물 설계시 전사 인자 결합 부위에 기반하여 개발한 프로모터 패널 (서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15)을 사용하였다. 발현 카세트의 일부로서 이들 뉴클레오티드 서열은 서열번호 16의 서열에 해당하는 좌측 (첫 번째) ITR (역위된 말단 반복부), 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15를 포함하는 군으로부터 선택되는 프로모터, 대상 유전자, 폴리아데닐화 신호 (서열번호 17), 우측 (두 번째) ITR (서열번호 18)로 구성되며, 대상 유전자는 녹색 형광 단백질 (GFP) 서열 또는 응고 캐스케이드 단백질 서열이며, 이는 모델 세포주 (HEK293, HUH7, U87-

MG, CHO-K1-S 및 HepG2)의 형질감염 방식으로 시험관내에서 검사하였다. 대조군으로는 좌측 (첫 번째) ITR (서열번호 16), 대상 유전자, 폴리아데닐화 신호 (서열번호 17), 우측 (두 번째) ITR (서열번호 18)을 포함하는 발현 카세트를 사용하였다. 도 1 및 2는 또한 사이토메갈로바이러스 (CMV) 바이러스의 구성적인 프로모터가 추가된 동일한 발현 카세트 요소들을 포함하는 추가의 대조군들을 나타낸다.

[0104] 프로모터 영역인 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15의 핵산들 모두, 녹색 형광 단백질 서열을 대상 유전자로 이용하였을 경우, EGFP 리포터 단백질을 발현하는 세포의 비율 증가 (도 1-3) 및 EGFP 형광 강도 증가 (도 4-5)를 제공하였다. 응고 인자 서열을 대상 유전자로 이용하였을 경우, 응고 단백질의 생산 수준 (도 6) 및 활성 수준 (도 7)이 프로모터 영역 없이 대상 유전자 핵산을 이용한 경우에 비해 증가한 것으로 관찰되었다. 즉, 이들 핵산 (서열번호 1-15)은 모델 세포주 (Huh7, CHO-K1-S 및 HepG2)에 형질감염시 다양한 이식 유전자 변이체를 함유한 발현 카세트의 일부로서 프로모터 활성을 발휘하였다.

[0105] **실시예 2.**

[0106] 프로모터 활성을 가진, 개발한 핵산 서열 (서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15)의 조직 특이성을 측정하기 위해, 이들 뉴클레오티드 서열을 모델 세포주 (HEK293, HUH7, U87-MG, CHO-K1-S 및 HepG2)에 서열번호 16의 서열에 해당하는 좌측 (첫 번째) ITR (역위된 말단 반복부), 프로모터 (서열번호 1-15), 대상 유전자, 폴리아데닐화 신호 (서열번호 17), 우측 (두 번째) ITR (서열번호 18)로 구성되는 발현 카세트의 일부로서 시험관내 형질감염으로 검사하였으며, 이때 대상 유전자는 EGFP 단백질 서열 또는 응고 캐스케이드 단백질을 인코딩하는 핵산일 수 있다. 대조군으로는 좌측 (첫 번째) ITR (서열번호 16), 대상 유전자, 폴리아데닐화 신호 (서열번호 17), 우측 (두 번째) ITR (서열번호 18)을 포함하는 발현 카세트를 사용하였다. 또한, 도 8, 10, 11 및 12에서는, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 바이러스의 프로모터 영역이 추가된 발현 카세트의 동일한 요소들을 포함하는 대조군을 사용하였다.

[0107] 프로모터 영역인 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15의 핵산들 모두, 프로모터 영역 없이 핵산을 이용한 경우와 비교해 간세포 기원의 세포주에서 EGFP 리포터 단백질을 발현하는 세포의 비율 증가 (도 8 및 9) 및 EGFP 형광 강도 증가 (도 10-13)를 제공하였다. 즉, 이들 핵산 (서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15))은 간세포 기원의 세포에서 조직-특이적인 프로모터 활성을 가진다.

[0108] **실시예 3.**

[0109] 프로모터 활성을 가진 서열번호 8, 11 및 14의 핵산의 통제 하에 이식 유전자 (응고 인자)를 인코딩하는 발현 카세트를 포함하는 AAV-기반의 발현 벡터를 제작하였다. 이들 발현 벡터는 Huh7 세포에 시험관내 형질도입하여 확인하였다. 대조군으로는 프로모터 영역이 없는 AAV-기반의 발현 벡터를 사용하였다.

[0110] 서열번호 8, 11 및 14의 핵산을 포함하는 발현 벡터를 이용하였을 경우, 프로모터 영역이 없는 발현 벡터를 이용한 경우와 비교해, 응고 단백질의 생산 수준 (도 14) 및 활성 수준 (15)의 증가가 유도되었다. 서열번호 8 및 11의 핵산을 포함하는 다양한 혈청형 AAV에 기반한 발현 벡터를 이용하였을 경우, 대조군과 비교해, 응고 단백질의 생산 수준 (도 16) 및 활성 수준 (도 17)이 증가하였다. 이들 결과는 Huh7 세포의 형질감염시 수득한 데이터 (도 6 및 7)와 일치하였다. 즉, 핵산 (서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15)은 모델 세포주의 형질도입시 이식 유전자의 다양한 변이체를 가진 발현 벡터로서 전달되는 동안 프로모터 활성을 나타난다.

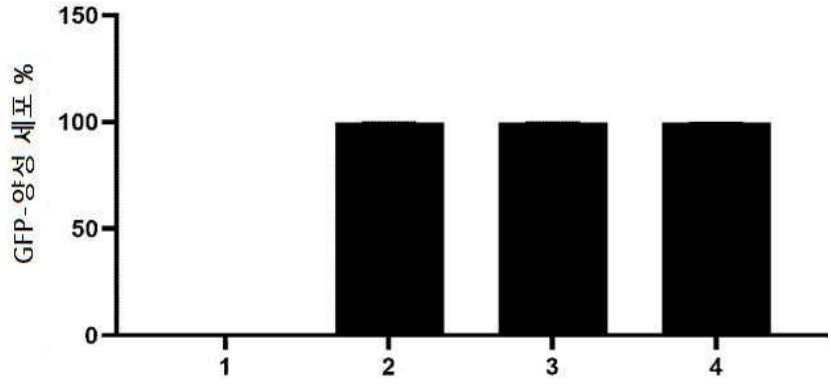
[0111] **실시예 4.**

[0112] 발현 벡터의 일부로서 서열번호 8 및 11의 핵산의 프로모터 활성을 생체내에서 측정하기 위해, 이식 유전자로서 응고 인자가 서열번호 8 또는 11의 핵산의 통제 하에 배치된 AAV-기반의 제품을 구축하였다. 그 후, 검사 제품을 B6.129S-F8tm1Smoc 실험 마우스에 투여하였다. 바이러스 제품을 희석하기 위한 AAV 입자 프리 완충제를 음성 대조군으로 사용하였다. AAV 제품을 꼬리 정맥으로 정맥내 유체역학적 1회 주사 방식으로 동물에 투여하였다. 제품 투여하기 전 주사 당일, 그리고 제품을 투여한 후 70일차에 혈장 샘플을 채취하였다.

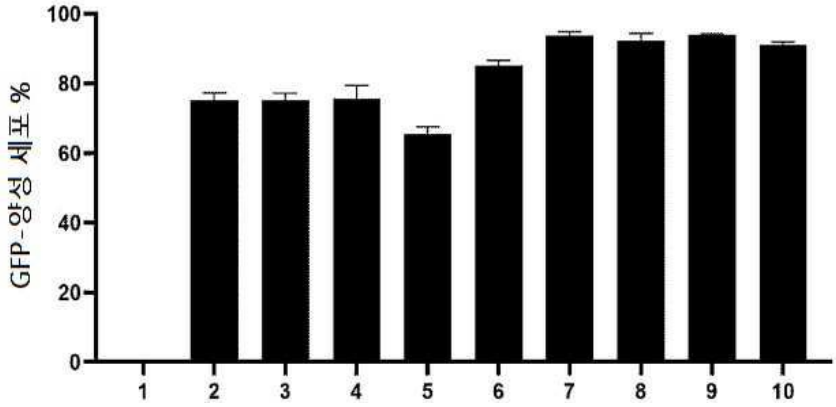
[0113] 생체내 실험 결과, 응고 인자 유전자 서열을 서열번호 8 및 11의 핵산의 통제 하에 포함하는 검사 약물을 이용하였을 경우, 제품 투여 후 70일차에 동물 혈장 내 응고 인자의 양 및 활성이 현저하게 증가한 것으로 관찰되었다 (도 18-19). 즉, 서열번호 8 및 11의 핵산은 AAV-기반의 발현 벡터로서 생체내 전달할 경우 프로모터 활성을 나타낸다.

도면

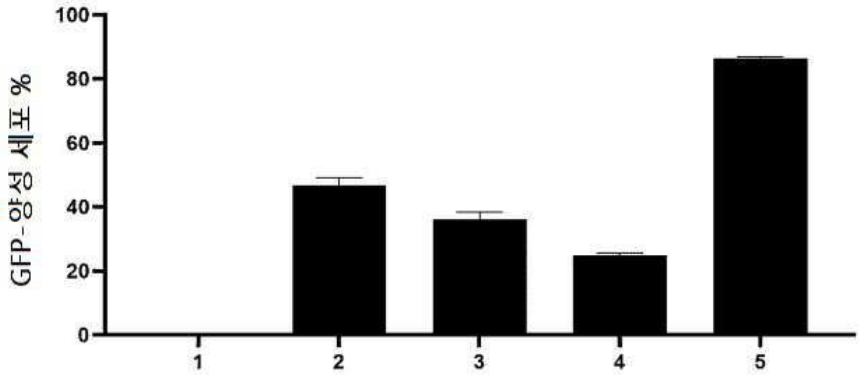
도면1



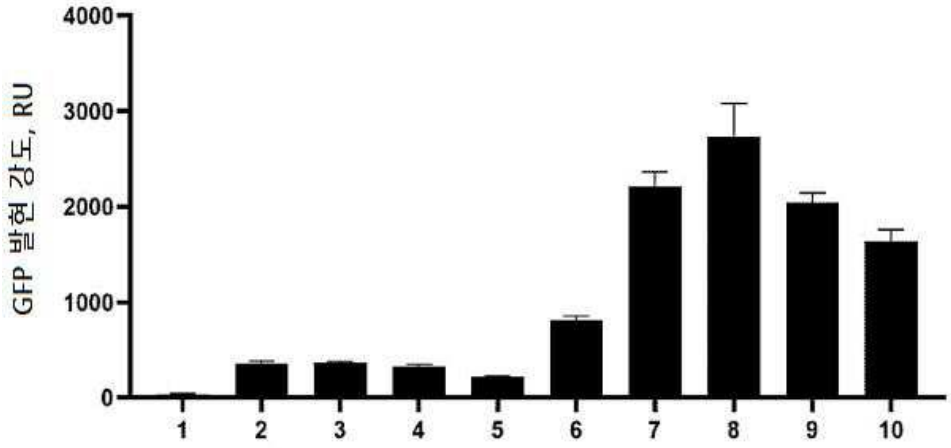
도면2



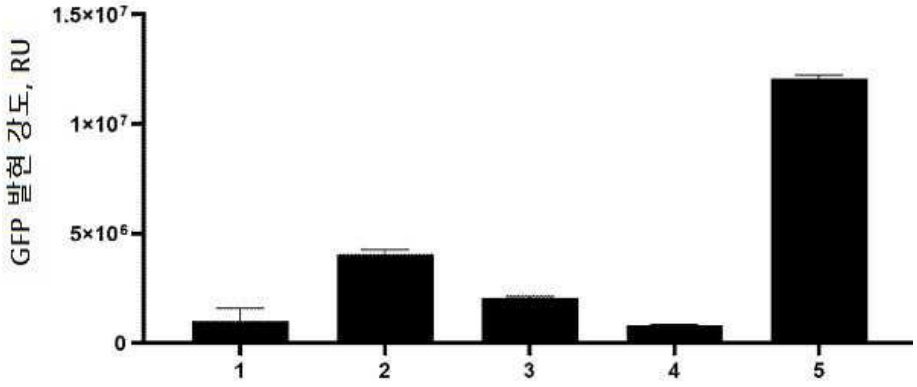
도면3



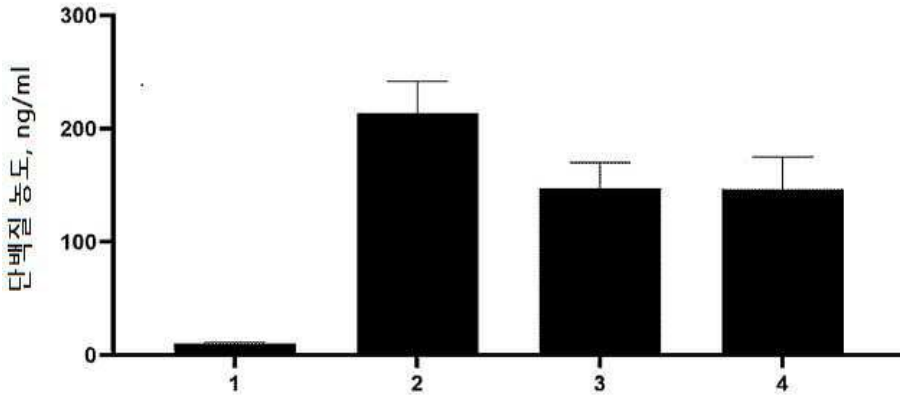
도면4


GFP 발현 강도, RU
4000
3000
2000
1000
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

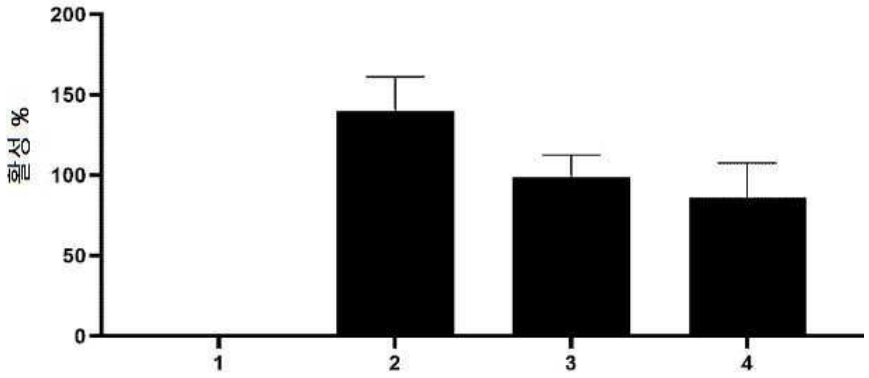
도면5


GFP 발현 강도, RU
1.5×10⁷
1×10⁷
5×10⁶
0
1
2
3
4
5

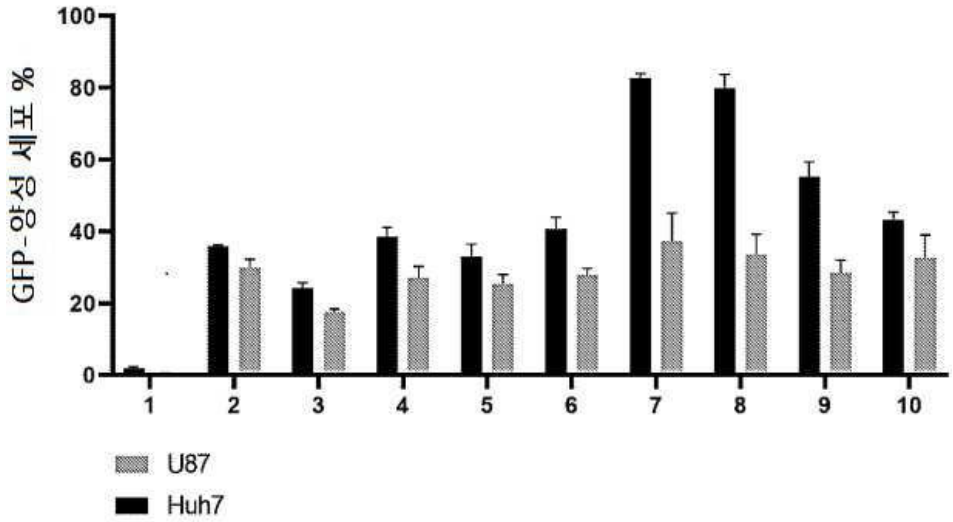
도면6


단백질 농도, ng/ml
300
200
100
0
1
2
3
4

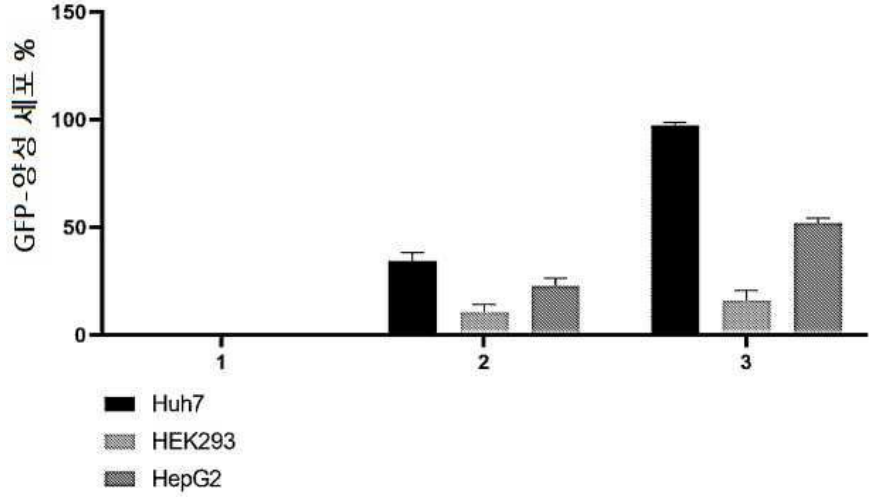
도면7


200
150
100
50
0
활성 %
1
2
3
4

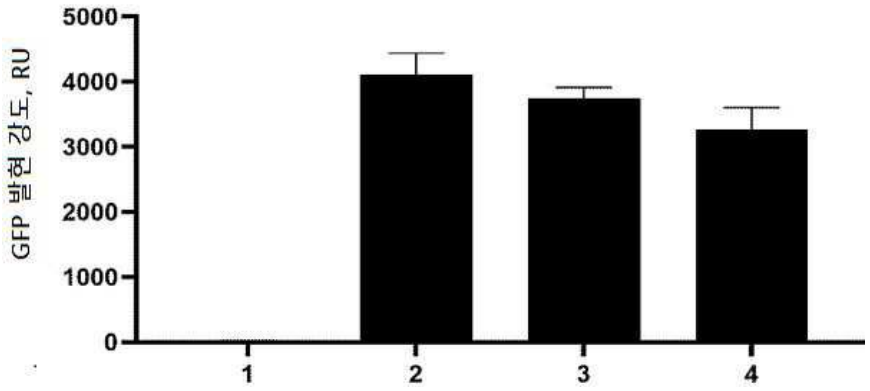
도면8


100
80
60
40
20
0
GFP-양성 세포 %
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
U87
Huh7

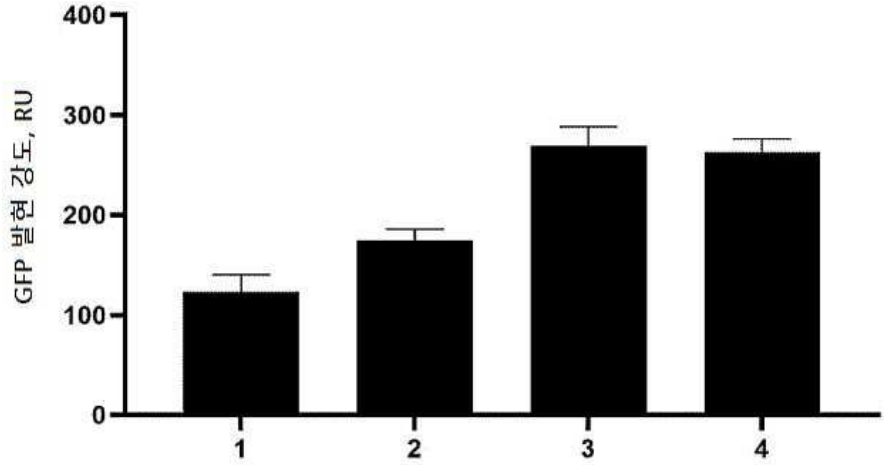
도면9


150
100
50
0
GFP-양성 세포 %
1
2
3
Huh7
HEK293
HepG2

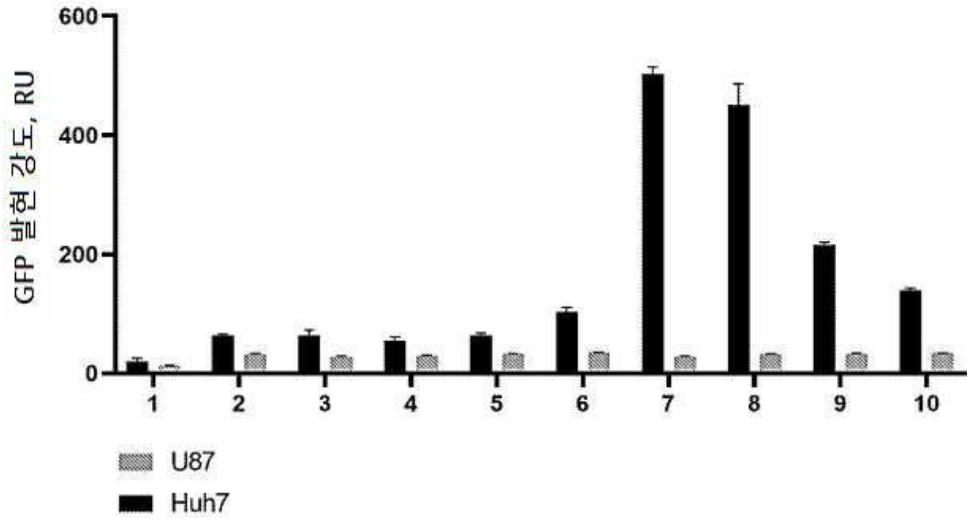
도면10



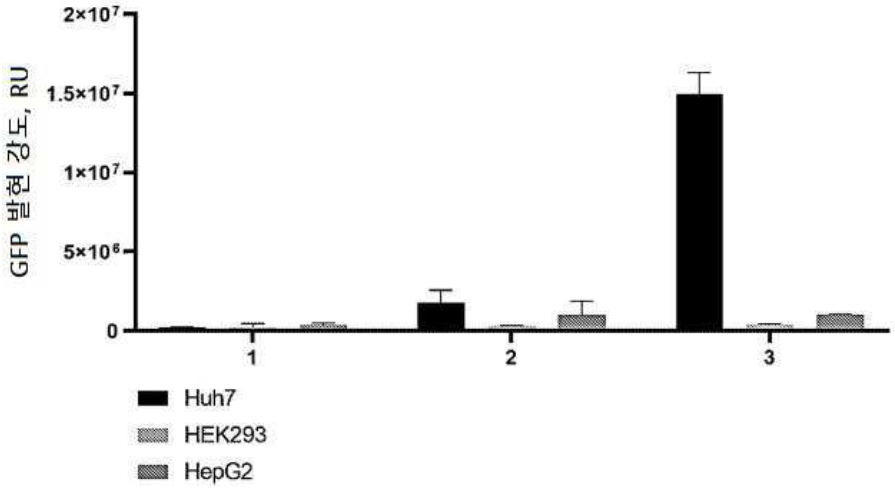
도면11



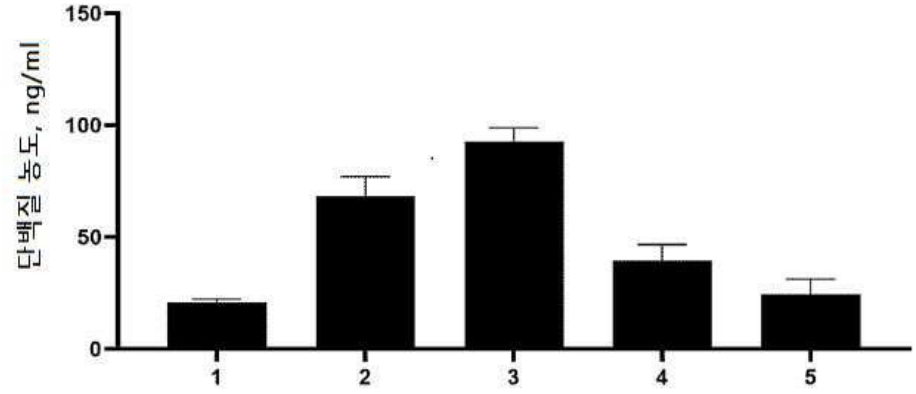
도면12



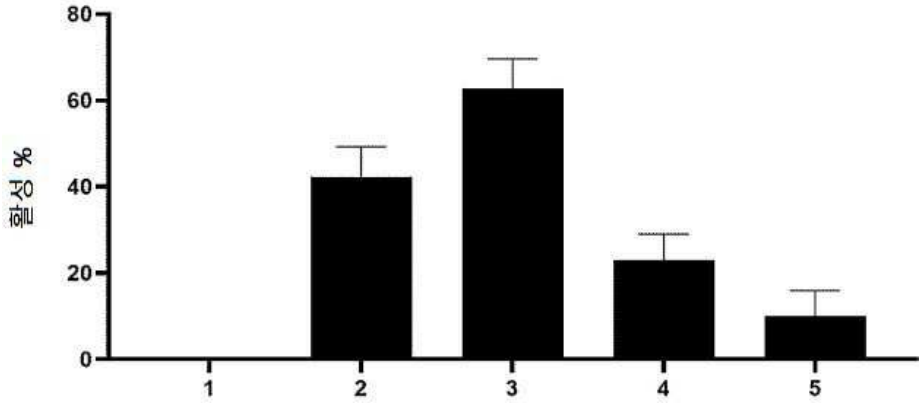
도면13



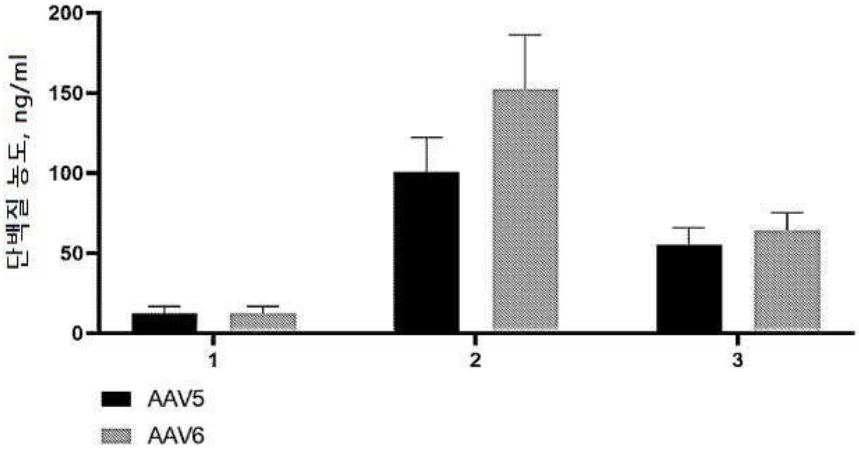
도면14



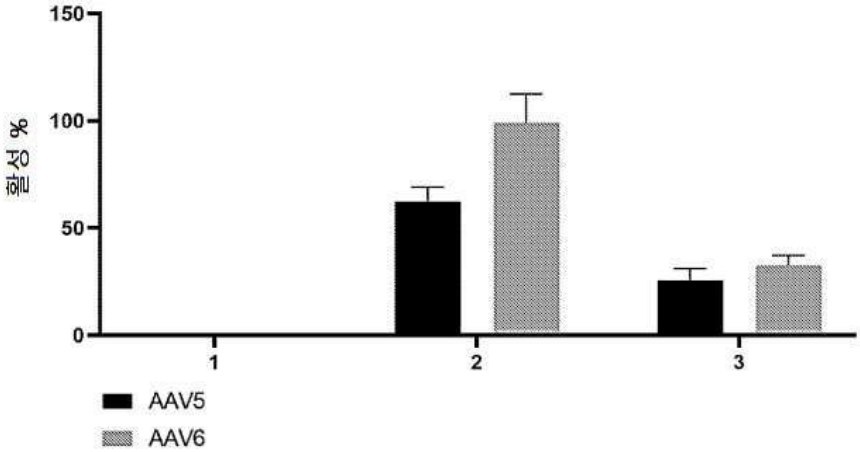
도면15



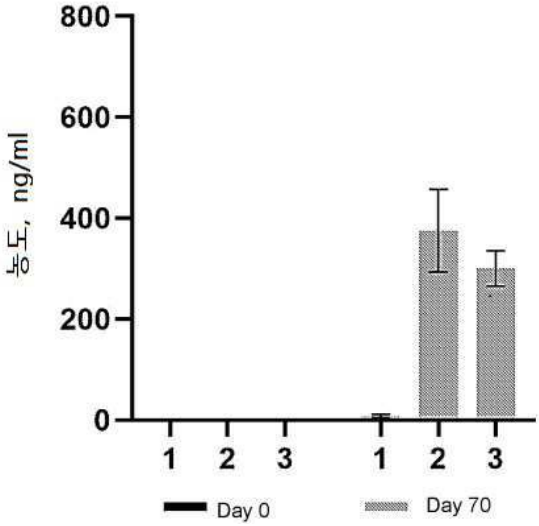
도면16



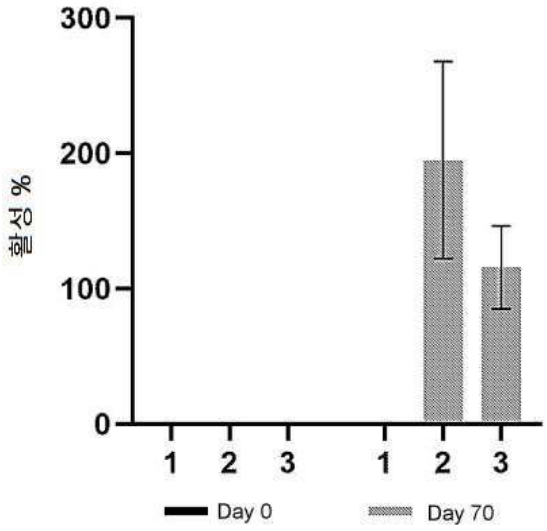
도면17



도면18



도면19



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.