



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년07월21일
 (11) 등록번호 10-1421063
 (24) 등록일자 2014년07월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/64 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2009-7007572
- (22) 출원일자(국제) 2007년10월10일
 심사청구일자 2012년05월21일
- (85) 번역문제출일자 2009년04월13일
- (65) 공개번호 10-2009-0092755
- (43) 공개일자 2009년09월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/KR2007/004940
- (87) 국제공개번호 WO 2008/044869
 국제공개일자 2008년04월17일
- (30) 우선권주장
 60/850,269 2006년10월10일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 Aude Sirven 등. Molecular therapy. Vol. 3, No. 4, 페이지 438-448 (2001.)
 Sam K. P. Kung 등. Journal of virology. Vol. 74, No. 8, 페이지 3668-3681 (2000.)

전체 청구항 수 : 총 28 항

심사관 : 이영기

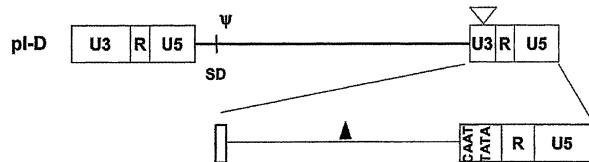
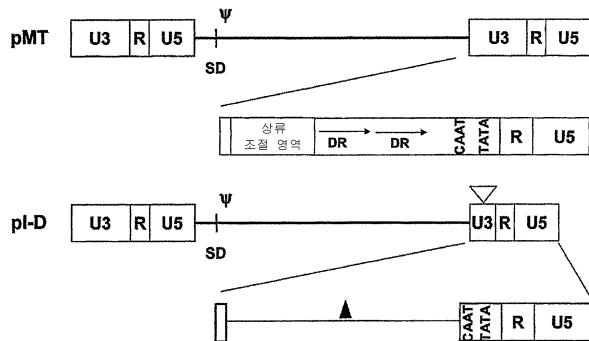
- (54) 발명의 명칭 안전성이 개선된 발현 벡터

(57) 요약

본 발명은 플라스미드 벡터 및 인핸서-결실 레트로바이러스 벡터를 포함하는 포유동물 발현 벡터에서 내부 프로모터의 용도에 관한 것이다. 레트로바이러스 벡터는 개선된 안전성 및 최적 수준의 전이유전자 발현을 및 벡터 역ガ를 갖는다.

대 표 도 - 도1

U3 불활성화 레트로바이러스 벡터



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호: 8의 951 내지 1143번째 뉴클레오티드를 포함하거나, 또는 서열번호: 8의 651 내지 1000번째 뉴클레오티드로 표시되는 이종 내부 프로모터; 및 인핸서-결실 U3 영역을 포함하는 발현 벡터.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 벡터는 5' 긴 말단 반복부(long terminal repeat, LTR) 및 3' LTR을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 3' LTR, 또는 3' LTR과 5' LTR의 U3 영역의 인핸서 요소가 결실된 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 이종 내부 프로모터가 서열번호: 8의 951 내지 1143번째 뉴클레오티드로 표시되는 발현 벡터.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 이종 내부 프로모터가 서열번호: 8의 901 내지 1143번째 뉴클레오티드로 표시되는 발현 벡터.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 이종 내부 프로모터가 서열번호: 8의 801 내지 1143번째 뉴클레오티드로 표시되는 발현 벡터.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 이종 내부 프로모터가 서열번호: 8의 651 내지 1143번째 뉴클레오티드로 표시되는 발현 벡터.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 이종 내부 프로모터가 서열번호: 8의 501 내지 1143번째 뉴클레오티드로 표시되는 발현 벡터.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

상기 이종 내부 프로모터가 서열번호: 8의 1 내지 1143번째 뉴클레오티드로 표시되는 발현 벡터.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

상기 벡터가 플라스미드 벡터인 발현 벡터.

청구항 13

제 1 항에 있어서,

상기 벡터가 레트로바이러스 벡터인 발현 벡터.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

상기 발현 벡터는 U3-작용성 벡터와 비교하여 20% 내지 200%의 바이러스 역가를 갖는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 15

제 13 항에 있어서,

상기 발현 벡터는 U3-작용성 벡터와 비교하여 20% 내지 200%의 이종 유전자 전사 또는 발현을 나타내는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 16

제 1 항에 있어서,

상기 프로모터가 하나 이상의 스플라이싱(slicing) 부위를 포함하는 발현 벡터.

청구항 17

제 13 항에 있어서,

상기 벡터가 온코레트로바이러스계(oncoretroviral-based) 레트로바이러스 벡터인 발현 벡터.

청구항 18

제 13 항에 있어서,

상기 벡터가 렌티바이러스계 레트로바이러스 벡터인 발현 벡터.

청구항 19

제 1 항에 있어서,

상기 벡터가 상기 이종 내부 프로모터에 작동가능하게 연결된 목적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

상기 목적 폴리뉴클레오티드가 폴리펩티드를 암호화하는 발현 벡터.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

상기 폴리펩티드가 치료 단백질 또는 리포터 단백질인 발현 벡터.

청구항 22

제 21 항에 있어서,

상기 폴리펩티드가 eGFP인 발현 벡터.

청구항 23

제 21 항에 있어서,

상기 폴리펩티드가 gp91인 발현 벡터.

청구항 24

제 19 항에 있어서,

상기 목적 폴리뉴클레오티드가 RNA, 안티센스 RNA, 소 간섭(small interfering) RNA 또는 리보자임을 암호화하는 발현 벡터.

청구항 25

제 19 항에 있어서,

상기 목적 폴리뉴클레오티드가 폴리아데닐화 서열, IRES, 인슬레이터 서열, 접합 서열 또는 그의 조합을 추가로 포함하는 발현 벡터.

청구항 26

제 1 항, 제 2 항 및 제 6 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 발현 벡터 및 담체를 포함하는 유전자 전달용 조성물.

청구항 27

제 1 항, 제 2 항 및 제 6 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 발현 벡터를 포함하는 세포.

청구항 28

제 27 항에 있어서,

상기 세포가 생산 세포주인 세포.

청구항 29

제 28 항의 생산 세포주를 배지에서 배양하고, 배지를 수거하고, 배지를 여과하여 무세포 바이러스 상등액을 수득하는 단계를 포함하는, 감염성 레트로바이러스 입자를 제조하는 방법.

청구항 30

포유동물 세포를 제 29 항의 무세포 바이러스 상등액과 함께 배양하는 단계를 포함하는, 시험관내(*in vitro*)에서 포유동물 세포를 형질도입시키거나, 또는 생체내(*in vivo*)에서 인간을 제외한 포유동물 세포를 형질도입시키는 방법.

청구항 31

제 1 항, 제 2 항 및 제 6 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항의 발현 벡터를 포함하는 키트.

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 목적 단백질을 발현시키는데 사용될 수 있는 내부 프로모터를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 한 태양에서, 본 발명은 인핸서(enhancer)-결실된 U3 영역을 포함하는 레트로바이러스 벡터를 제공한다.

배경 기술

[0002] 유전자 전달은, 통상적으로 전사 및 발현을 위해 세포로 유전 물질을 전달하는 것을 포함한다. 그 방법은 단백질 발현 및 치료 목적에 이상적이다. DNA 형질감염(transfection) 및 바이러스 형질도입(transduction)과 같은 다양한 전달 방법이 공지되어 있다. 전달 효율 및 높은 수준의 전달된 유전자 발현, 및 필요한 경우 천연 친화도 또는 슈도타이핑(pseudotyping)을 통해 특정 수용체 및/또는 세포 유형을 표적화할 가능성으로 인해 바이러스-매개 유전자 전달이 관심을 끈다.

[0003] 특히, 레트로바이러스 벡터는 세포 계놈 내에 삽입되는 그 능력으로 인해 보다 장기간 발현에 유용하다. 뮤린 백혈병 바이러스(murine leukemia virus, MLV)계 벡터가, 대부분의 용도에 적합하게 이용 가능한 많은 주쇄 플라스미드 및 패키징 세포주(packaging cell line)를 갖는 가장 일반적인 레트로바이러스 벡터이다(예를 들면, 문현 [Miller and Buttimore, *Mol. Cell. Biol.* 6:2895, 1986] 참조). 모든 "단순" 레트로바이러스, 예를 들어, 오직 구조적 및 효소적 바이러스 단백질을 암호화할 뿐 바이러스 부속 단백질(accessory protein)은 이용하지 않는 레트로바이러스와 유사하게, MLV 벡터는 단지 분열하는 세포 내에 삽입될 수 있다. 벡터로 사용하기에 잠재적으로 적합한 다른 단순 레트로바이러스로는 포유동물 C-형 바이러스(예를 들면, 뮤린 줄기 세포 바이러스, 하비(Harvey) 뮤린 육종 바이러스 및 비장 괴사 바이러스), B형 바이러스(예를 들면, 마우스 유방 종양 바이러스) 및 D형 바이러스(예를 들면, 메이슨-파이저(Mason-Pfizer) 원숭이 바이러스)의 다른 구성원들이 포함된다. 본 발명의 레트로바이러스 벡터로 사용하기에 적합한 다른 레트로바이러스로는 조류 레트로바이러스(예를 들면, 라우스 육종(Rous sarcoma) 바이러스), 스퍼마바이러스(spumaviruse)(예를 들면, 포말성(foamy) 바이러스) 및 HTLV-BLV 바이러스(예를 들면, HTLV-1)가 포함된다.

[0004] 렌티바이러스는 바이러스 부속 단백질을 발현하고 비-분열 세포 및 분열 세포에 형질감염되고 삽입될 수 있는 레트로바이러스의 하위집단이다. 렌티바이러스로부터 유래된 벡터는 분열 및 비-분열 세포의 계놈 내로 안정하게 삽입되고 장기간 유전자 발현을 매개하는 그의 능력으로 인해 표적 세포로 외래 유전자를 전달하기에 이상적인 도구이다[Gilbert et al., *Somat. Cell. Mol. Genet.* 26:83, 2001; Mitrophanous et al., *Gene Ther.* 6:1808, 1999; Naldini et al., *Science* 272:263, 1996; Sauter et al., *Somat. Cell Mol. Genet.* 26:99, 2001].

[0005] 렌티바이러스는 영장류, 예를 들면, 인간 및 원숭이 면역결핍 바이러스(HIV-1, HIV-2, SIV), 및 비-영장류, 예를 들면, 고양이 면역결핍 바이러스(FIV), 소 면역결핍 바이러스(BIV), 말 감염성 바이러스(EIAV), 염소 관절염뇌염 바이러스(CAEV) 및 비스나(visna) 바이러스를 포함하여 많은 척추동물 종으로부터 분리되었다. 이들 중에서, HIV 및 SIV가 현재 가장 잘 알려져 있다. 비-영장류 렌티바이러스 벡터중에서, FIV[Curran et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 261:75, 2002] 및 EIAV[미국 특허출원 제 2001/0044149 호]로부터 유래된 벡터가 가장 잘 특정되어 있다.

[0006] 벡터가 뮤린 백혈병 바이러스(MLV) 또는 렌티바이러스를 기초로 하는지 여부에 관계없이, 레트로바이러스 유전자 치료와 관련하여 상당한 주목을 받아 온 두가지 주된 안전성 측면이 존재한다. 구체적으로, 상기 측면은 복제 가능 레트로바이러스(replication competent retrovirus, RCR)의 존재 및 삽입 돌연변이유발의 발생이다. 앞의 문제는 벡터와 패키징 계놈 사이에 중복되는 바이러스 서열을 함유하지 않는 최소 크기의 레트로바이러스 벡터의 개발에 의해 크게 개선되었다. 그러나, 후자의 가능성은 주로 X-SCID 인간 시험에서 발견된 3가지의 백혈병 사례로 인해 최근에 중대한 관심을 일으켜 왔다[Hacein-Bey-Abina et al., *Science* 302:415, 2003]. 처음 두가지 백혈병 사례의 회귀 분석 결과 백혈병이 아마도 염색체 내에 레트로바이러스의 삽입, 및 긴 말단 반복부(long terminal repeat, LTR)에 의한 삽입 부위에 근접하여 위치한 LMO2 유전자의 후속 활성화로부터 비롯되는 것으로 밝혀졌다. 벡터-매개 종양발생이 상기 질환 및 그 유전자의 특정 성질로 인해 X-SCID 유전자 치료로 제한될 수도 있음이 논의되었지만, 현재 현실 세계에서 실행가능한 치료 형태가 되기 위해서는 레트로바이러스 벡터의 안전성이 더 개선될 필요가 있음을 명백하다.

[0007] 벡터-매개 종양발생의 가능성을 감소시키기 위한 여러 가지 접근방법이 존재한다. 한 접근방법은 LTR의 U3 영역을 제거하는 것이다[Yu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3194, 1986; Hawley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2406, 1987; Yee et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5197, 1987]. 레트로바이러스 LTR은 U3, R 및 U5 영역으로 이루어지며, U3 영역은 유전자 발현을 조절하는 인핸서 및 프로모터 서열을 함유한다[Sun et al., *J. Virol.* 69:4941, 1995; Wahlers et al., *Mol. Ther.* 6:313, 2002]. 그러므로, 벡터에 의한 삽입 활성화는 U3 영역을 제거함으로써 감소될 수 있다. 이 경우, U3-결실 벡터는 더 이상 LTR에 프로모터 서열을 함유하지 않기 때문에 표적 유전자의 발현을 유도하기 위해서는 벡터에 추가의 프로모터가 제공되어야 한다.

[0008] 앞에서 논의한 바와 같이, U3-불활성화된 레트로바이러스 벡터는 표적 유전자의 발현을 위해 내부 프로모터를 필요로 한다. 레트로바이러스 벡터에 가장 흔히 사용되는 내부 프로모터 중 하나는 인간 사이토메갈로바이러스(HCMV) 즉시 초기(immediate-early, IE) 프로모터([Jaalouk et al., *Virol. J.* 3:27, 2006]; BD 바이오사이언시즈에서 시판하는 pQCXIN) 또는 CA와 같은 관련 프로모터(HCMV IE 인핸서/닭 β-액틴 프로모터)[Ramezani et al., *Mol. Ther.* 14:245, 2006]이다. 그러나, HCMV IE 프로모터는 1차 인간 세포에서 신속히 불활성화되는 것으로 알려져 있지만, 특정 유전자는 작용하지 않는다[Herweijer et al., *J. Gene Med.* 3:280, 2001]. 따라서, 통상적으로 사용되는 프로모터는 이종 유전자의 발현을 감소시키고 특정 세포 유형에서 불활성이며 LTR-유도된 전사를 잠재적으로 활성화시키며, 이들 모두는 레트로바이러스 벡터의 안전성 및 효율을 감소시키는 것으로 밝혀졌다.

[0009] 마지막으로, U3-불활성화 레트로바이러스 벡터는, 패키징을 위한 계놈 RNA의 전사를 감소시키는, 통상적으로 사용되는 프로모터, 예를 들면, CMV 및 SV40에 의한 프로모터 억제에 기인하는 매우 낮은 역가와 관련된다[Jaalouk et al., *Virol. J.* 3:27, 2006]. 사실상, MLV계 U3-결실 벡터는 완전한 U3 영역을 갖는 필적하는 MLV 벡터보다 4배 미만의 역가와 관련된다[Olson et al., *J. Virol.* 68:7060, 1994]. 따라서, 높은 수준의 이종 유전자 전사를 유도할 뿐 아니라 높은 바이러스 역가가 제공될 수 있게 하는 프로모터를 찾은 것은 놀랍다. 그러므로, 레트로바이러스 벡터에 내부 프로모터로 사용하기 위해 새로운 프로모터가 개발되어야 한다.

[0010] 발명의 요약

[0011] 본 발명은 이종 내부 프로모터를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 한 태양에서, 상기 벡터는 5'LTR 및 3'LTR을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 다른 태양에서, 3'LTR 또는 3'LTR과 5'LTR 둘 다의 U3 영역의 인핸서 요소가 결실된다. 한 태양에서, 벡터는 플라스미드 벡터이다. 또 다른 태양에서, 벡터는, 하나 이상의 인핸서-결실 U3 영역을 포함하고, 레트로바이러스 벡터가 높은 바이러스 역가 및 이종 유전자의 높은 수준의 전사를 제공할 수 있도록 이종 유전자에 작동가능하게 연결된 내부 프로모터를 추가로 포함하는 레트로바이러스 벡터이다. 상기 벡터는 또한 레트로바이러스 벡터에 대해 당해 분야에 공지되어 있듯이, 역전사, 패키징 등에 필요한

시스-작용 요소를 포함한다. 또 다른 태양에서, 벡터는 하나 이상의 인핸서-결실 U3 영역을 포함하는 레트로바이러스 벡터를 암호화한다.

[0012] 본 발명의 한 태양에서, 내부 프로모터는 진핵세포, 원핵세포 또는 바이러스 프로모터이다. 다른 태양에서, 내부 프로모터는 포유동물 세포 유전자 프로모터이다. 또 다른 태양에서, 내부 프로모터는 RPL10 프로모터(서열번호: 8), LENG8 프로모터(서열번호: 9), SNX3 프로모터(서열번호: 10), UQCRCQ 프로모터(서열번호: 17) 또는 ITGB4BP 프로모터(서열번호: 16)로부터 선택된다. 다른 태양에서, 내부 프로모터는 전장(full length) 프로모터의 단편 또는 변이체이고 이종 유전자의 높은 수준의 전사를 유도할 수 있으면서, 프로모터를 포함하는 벡터는 높은 바이러스 역가를 제공할 수 있다. 한 태양에서, 프로모터의 단편 또는 변이체를 포함하는 벡터는 실질적으로 야생형 프로모터를 포함하는 벡터와 동일한, 높은 바이러스 역가 및 높은 수준의 전사를 제공하는 능력을 보유한다. 또 다른 태양에서, 내부 프로모터는 필수적으로 TATA 박스로 이루어진다.

[0013] 일부 태양에서, 내부 프로모터는 또한 높은 수준의 유전자 발현을 위한 스팡라이싱(splicing) 부위를 포함한다. 또 다른 태양에서, 벡터는 당해 분야에 공지되어 있는 바와 같이, 폴리아데닐화 부위, 인슐레이터(insulator) 서열, 스팡라이싱 부위, 내부 리보솜 유입 부위(IRES) 및 다른 전사 및 번역 작동인자 서열을 포함하여, 또 다른 서열을 추가로 포함하는 레트로바이러스 벡터이다.

[0014] 또 다른 태양에서, 벡터는 인핸서-결실 U3 영역을 갖는 3'LTR을 포함하는 레트로바이러스 벡터를 암호화하는 DNA를 포함하는 플라스미드이다. 또 다른 태양에서, 상기 플라스미드는 5' 및 3' LTR 모두에 인핸서-결실 U3 영역을 갖는 벡터를 암호화한다. 다른 태양에서, 두 LTR 모두에 인핸서-결실 U3 영역을 포함하는 벡터 RNA를 캡슐화하는 감염성 레트로바이러스 입자가 제공된다. 또 다른 태양에서, 상기 벡터는 하나 또는 두 개의 U3 영역이 인핸서가 결실된 RNA 또는 DNA 형태이다.

[0015] 또 다른 태양에서, 이종 유전자는 목적 전사물을 암호화한다. 다른 태양에서, 목적 전사물은 생물학적으로 활성인 전사물, 예를 들면, 소 간섭 RNA(small interfering RNA), 리보자임, 안티센스 RNA 또는 유인 RNA(decoy RNA)이나, 이로 한정되지는 않는다. 또 다른 태양에서, 이종 유전자는 폴리펩티드를 암호화한다. 폴리펩티드는 임의의 목적 단백질, 예를 들면, 치료용 단백질 또는 마커 단백질일 수 있다. 한 태양에서, 이종 유전자는 eGFP 또는 gp91을 암호화한다.

[0016] 벡터 및 적당한 담체를 포함하는 조성물도 또한 제공된다. 상기 조성물은 생체내 투여에 적합할 수 있다.

[0017] 벡터로 형질전환된 표적 세포, 또는 감염성 입자의 생성에 필요한 인자, 예를 들어, 레트로바이러스 *env* 및 *gag-pol*, 및 필요에 따라 다른 인자들을 암호화하는 추가의 서열 및 벡터를 포함하는 생산 세포를 포함하여, 본 발명의 벡터를 포함하는 세포가 제공된다. 표적 세포 및 생산 세포는 임의의 적당한 진핵세포 유형, 예를 들면, 포유동물 세포일 수 있다. 또 다른 태양에서, 상기 세포는 인간, 영장류 또는 뮤린 유래 세포일 수 있다. 세포는 1차배양 세포 또는 세포주일 수 있다.

[0018] 본 발명은 또한 전술한 바와 같은 레트로바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터를 암호화하는 플라스미드를 포함하는 생산 세포주를 배양하고, 상등액을 수거하고, 배지를 여과시켜 무세포 바이러스 상등액을 수득하는 것을 포함하는, 감염성 레트로바이러스 입자를 생산하는 방법을 제공한다. 생산 세포주 제작에 사용된 폐키징 세포주는 현재 당해 분야에 알려져 있는 임의의 세포주이거나, 또는 폐키징 신호를 포함하는 레트로바이러스 벡터가 일단 세포에서 전사되면 레트로바이러스 벡터가 감염성 입자에 폐키징되도록 필수 바이러스 단백질을 암호화하는 유전자를 세포주내에 전이시켜 제조된 세포주일 수 있다.

[0019] 본 발명은 또한 표적 세포를 전술한 바와 같이 제조되고 본 발명에 따른 감염성 레트로바이러스 입자를 포함하는 바이러스 상등액과 접촉시키는 것을 포함하는, 표적 세포를 형질도입시키는 방법을 제공한다. 전술한 바와 같이, 표적 세포는 포유동물 세포, 인간 세포, 영장류 세포 또는 뮤린 세포일 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다. 표적 세포는 1차배양 세포 또는 세포주일 수 있다.

[0020] 본 발명은 또한 이종 유전자가 치료적으로 유용한 폴리펩티드 또는 전사물을 암호화하는 본 발명의 벡터 및 적당한 벡터를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상을 치료하는 방법을 제공한다. 다른 태양에서, 상기 방법은 유전자 질환, 증식성 질환 또는 감염성 질환을 치료하기 위한 것이다.

[0021] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 벡터를 포함하는 키트를 제공한다.

발명의 상세한 설명

[0032]

본 발명은 이종 내부 프로모터를 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다. 한 태양에서, 벡터는 이종 유전자에 작동 가능하게 연결된 이종 프로모터를 갖는 하나 또는 두 LTR 모두에 인핸서-결실 U3 영역을 포함하고 이종 유전자의 높은 수준의 전사 및 높은 바이러스 역가를 제공할 수 있는 레트로바이러스 벡터이다. 또 다른 태양에서, 벡터는 하나 또는 두 LTR 모두에 인핸서-결실 U3 영역을 포함하는 레트로바이러스 벡터를 암호화한다.

[0033]

벡터

[0034]

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "레트로바이러스"는 그 복제 주기동안 역전사효소를 사용하는 RNA 바이러스에 관하여 사용된다. 레트로바이러스 게놈 RNA는 역전사효소에 의해 이종 가닥 DNA로 전환된다. 바이러스의 상기 이종 가닥 DNA 형태는 감염된 세포의 염색체 내에 삽입될 수 있으며; 일단 삽입되면, "프로바이러스"로 지칭된다. 프로바이러스는 RNA 폴리머라제 II에 대한 주형으로 작용하며, 새로운 바이러스 입자를 생산하는 데 필요한 구조 단백질 및 효소를 암호화하는 RNA 분자의 발현을 유도한다.

[0035]

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "벡터"는 적절한 조절 요소들과 결합될 때 복제될 수 있고 유전자 서열을 세포간에 전달할 수 있는 임의의 유전 요소, 예를 들면, 플라스미드, 파아지, 트랜스포손, 코스미드, 염색체, 레트로바이러스, 바이리온 등을 말한다. 따라서, 상기 용어는 클로닝 및 발현 비히를 뿐 아니라, RNA 또는 DNA 형태의 바이러스 벡터를 포함한다. 당업계에는 핵산을 조작하고, 반응요소 및 프로모터를 유전자 내 삽입하는데 이용 가능한 다양한 벡터들이 공지되어 있다. 가능한 벡터로는, 예를 들면, 람다 유도체와 같은 박테리오파아지, 또는 pBR322 또는 pUC 플라스미드 유도체와 같은 플라스미드, 또는 블루스크립트(Bluescript) 벡터를 포함하여, 예를 들면, 플라스미드 또는 변형된 바이러스가 포함된다. 바이러스 벡터, 특히 레트로바이러스 벡터가 세포 및 살아있는 동물 대상에서 매우 다양한 유전자 전달 용도에 사용되어 왔다. 사용될 수 있는 벡터로는 레트로바이러스, 아데노-관련 바이러스, 폭스바이러스, 바콜로바이러스, 백시니아 바이러스, 헤르페스 바이러스, 앱스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스, 아데노바이러스, 제미니바이러스 및 칼리모바이러스 벡터가 포함되나, 이들로 한정되지는 않는다. 비-바이러스 벡터로는 플라스미드, 리포솜, 전기 하전된 지질(사이토펙틴), DNA-단백질 복합체 및 생체중합체가 포함된다. 진핵세포 벡터의 예로는 스트레이티타진(Stratagene)에서 시판하는 pW-LNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 및 pSG; 아메샴 파마시아 바이오테크(Amersham Pharmacia Biotech)에서 시판하는 pSVK3, pBPV, pMSG 및 pSVL; 및 클론테크(Clontech)에서 시판하는 pCMVsRed2-익스프레스, pIRES2-DsRed2, pDsRed2-Mito 및 pCMV-EGFP가 포함되나, 이로 한정되지는 않는다. 많은 다른 벡터가 공지되어 있으며 상업적으로 시판한다. 적당한 벡터내에 반응 요소 및 프로모터에 상응하는 DNA 단편을 삽입하는 것은 적절한 DNA 단편을 상보성 점착성 말단을 갖는 선택된 벡터에 접합시킴으로써 달성될 수 있다. 또는, DNA 분자의 말단을 효소적으로 변형시키거나, 또는 뉴클레오티드 서열(링커)을 DNA 말단에 접합시킴으로써 임의의 부위를 생성 할 수 있다. 상기 벡터는 마커를 세포 게놈내에 혼입시킨 세포의 선별을 제공하는 선택성 마커 유전자를 함유하도록 처리될 수 있다. 상기 마커는 마커에 의해 암호화된 단백질을 혼입하고 발현하는 숙주 세포의 확인 및/ 또는 선별을 가능케 한다.

[0036]

전술한 바와 같이, 본 발명의 레트로바이러스 벡터 또는 본 발명의 벡터에 의해 암호화된 레트로바이러스 벡터는 단순 레트로바이러스, 예를 들면, MLV, 랜티바이러스, 예를 들면, HIV, 또는 임의의 다른 레트로바이러스를 기초로 할 수 있다. 이를 벡터는 감염성 입자의 생성에 필요한 시스 요소를 보유한다. 상기 요소는 바이러스 RNA를 바이러스 캡시드 또는 입자내에 캡슐화하는데 필요한 레트로바이러스 게놈의 5'LTR에 인접하여 위치한 패키징 신호를 포함한다. 여러 레트로바이러스 벡터는 바이러스 게놈의 캡시드화(encapsidation)에 필요한 최소 패키징 신호(싸이(Ψ) 서열로도 지칭됨)를 사용한다. 또 다른 시스 요소, 예를 들면, 프라이머 결합 부위, 폴리펩타이드 영역 및 다른 서열이 당해 분야에 공지되어 있으며, 레트로바이러스 벡터내에 포함된다. 그러나, 바이러스 단백질을 암호화하는 서열은 전장 바이러스 단백질이 발현되지 않도록 벡터로부터 제거된다. 감염성 입자의 생산에 필요한 임의의 바이러스 단백질은 패키징 구조물에 의해 트랜스로 제공된다.

[0037]

벡터는 또한 폴리아데닐화 서열, 인슬레이터 서열, 스플라이싱 부위, IRES 및 다른 전사 및 번역 작동인자 서열과 같은 서열을 포함할 수 있다.

[0038]

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "폴리아데닐화 부위", "폴리 A 부위" 또는 "폴리 A 서열"은 초기 RNA 전사물의 종료 및 폴리아데닐화 둘 다를 유도하는 DNA 서열을 의미한다. 폴리 A 꼬리가 결여된 전사물이 불안정하고 신속히 분해되기 때문에 재조합 전사물의 효과적인 폴리아데닐화가 바람직하다. 본 발명의 벡터에 사용되는 폴리

리 A 신호는 "이종" 또는 "내인성"일 수 있다. 내인성 폴리 A 신호는 게놈에서 해당 유전자의 암호화 영역의 3' 말단에서 친연적으로 발견되는 것이다. 이종 폴리 A 신호는 한 유전자로부터 분리되어 또 다른 유전자의 3' 말단에 배치된 것이다. 통상적으로 사용되는 이종 폴리 A 신호는 SV40 폴리 A 신호이다. SV40 폴리 A 신호는 237 bp BamHI/BclI 제한효소 단편상에 함유되며 종료 및 폴리아데닐화를 둘 다 유도한다. 본 발명의 적합한 폴리아데닐화 서열로는 또한 소 성장 호르몬(bGH) 폴리아데닐화 신호, β -글로빈 폴리A 부위 및 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제 폴리A 부위가 포함되나, 이로 한정되지는 않는다[Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp.16.7-16.8, 1989].

[0039] 본 발명의 벡터는 또한 세포로 하여금 벡터의 핵산에 의해 발현된 단백질을 효율적으로 및 효과적으로 처리하도록 하기에 충분한 또 다른 핵산 서열, 예를 들면, 인트론 서열, 접합 서열, 편재화 서열 또는 신호 서열을 함유할 수 있다. 인트론 서열의 예로는 β -글로빈 인트론 및 인간 EF-1 α 인트론(미국 특허 제 7,049,143 호)이 포함된다. 접합 신호는 1차 RNA 전사물로부터 인트론의 제거를 매개하며, 스팡라이스(splice) 공여체 및 수용체 부위로 이루어진다[Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp.16.7-16.8, 1989].

[0040] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "내부 리보솜 유입 부위" 또는 "IRES"는 다이시스트로닉(dicistronic) mRNA의 번역의 내부 개시에 의해 제 2의 유전자로부터 유래하는 발현 산물의 생성을 허용하는 폴리시스트로닉 유전자 사이에 위치하는 서열을 말한다. 내부 리보솜 유입 부위의 예로는 수족구병 바이러스(FDV), 뇌척수침증 바이러스, 폴리오바이러스 및 RDV로부터 유래된 것들이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다[Scheper et al., *Biochem.* 76:801, 1994; Meyer et al., *J. Virol.* 69:2819, 1995; Jang et al., *J. Virol.* 62:2636, 1998; Haller et al., *J. Virol.* 66:5075, 1995]. IRES를 혼입하는 벡터는 당해 분야에 공지된 바와 같이 제작될 수 있다. 예를 들면, 폴리시스트로닉 서열을 함유하는 벡터는 다음의 요소들을 작동가능한 관계로 함유할 수 있다: 내부 프로모터, 이종 유전자, 내부 리보솜 유입 부위 및 제 2 이종 유전자.

[0041] 상기 추가의 서열들은 전사가 필요한 경우 프로모터 서열과, 또는 추가로 번역 및 처리가 필요한 경우 개시 및 처리 서열과 작동가능하게 연결되도록 벡터내에 삽입된다. 또는, 삽입된 서열은 벡터내 임의의 위치에 놓일 수 있다.

[0042] 본 발명의 벡터 제작을 위한 표준 기술은 당해 분야에 통상의 기술을 가진 자에게 공지되어 있으며, [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989]와 같은 참조문헌에서 찾을 수 있다. DNA의 단편들을 접합시키기 위해 많은 방법을 이용할 수 있지만, 그 선택은 DNA 단편 말단의 성질에 따라 달라지며 숙련된 전문가에 의해 용이하게 선택될 수 있다.

[0043] 본 발명의 발현 벡터 및 적당한 담체를 포함하는 조성물도 또한 제공된다. 상기 담체는 당해 분야에 공지되어 있으며, 그와 함께 치료제가 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 비히클을 말한다. 상기 적당한 담체는 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원을 갖는 것들, 예를 들어, 낙화생유, 대두유, 광유, 호마유 등을 포함하여 물 및 오일과 같은 멀균 액체일 수 있다. 조성물을 정맥내 투여하는 경우 물이 바람직한 담체이다. 식염수액 및 텍스트로스 및 글리세롤 수용액도 또한, 특히 주사액에 액체 담체로서 사용될 수 있다. 적합한 약학적 부형제로는 전분, 글루코스, 락토스, 슈크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 염화나트륨, 탈지분유, 글리세롤, 프로필렌 글라이콜, 물, 에탄올 등이 포함된다. 경우에 따라, 조성물은 또한 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 혼탁액, 유화액, 정제, 환제, 캡슐, 분말, 서방성 제형 등의 형태를 취할 수 있다. 조성물은 통상적인 결합제 및 담체, 예를 들어, 트라이글리세라이드를 사용하여 좌약으로 제형화될 수 있다. 경구용 제형은 약제 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 셀룰로스, 탄산 마그네슘 등과 같은 표준 담체를 포함할 수 있다. 적당한 담체의 예는 마틴(E.W. Martin)의 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences]에 기술되어 있다. 상기 조성물은 환자에게 적절한 투여 형태를 제공하기 위해 적당량의 담체와 함께 치료 효과량의 본 발명의 레트로바이러스 벡터를 함유한다. 제형은 투여 방식에 적합해야 한다.

U3 영역

[0044] 앞에서 논의한 바와 같이, 레트로바이러스 게놈은 레트로바이러스 수명 주기동안 복제에 중요한 서열을 함유하는 게놈의 5' 및 3' 말단에 긴 말단 반복부(LTR)를 포함한다. U3 영역의 프로모터 및 인핸서 요소는 복제시 레

트로바이러스 게놈의 전장 전사물을 생성하는데 중요하다. 역전사시, 3' LTR의 일부분은 3' 및 5' LTR 둘 다에 주형으로 작용하므로, 3' LTR의 서열은 5' LTR로 복사된다. 그러므로, 3' U3 영역에서 결실 또는 돌연변이는 5' LTR로 복사되어, 두 U3 영역 모두가 실질적으로 불활성화된다. 3' LTR의 상기 복사는 패키징시 벡터 서열이 비변형 5' U3 영역을 함유하도록 하여, 5' LTR로부터의 전장 전사물이 생성되고 패키징되게 한다. 그러나, 복제시, 5' U3은 인핸서-결실 U3 영역을 포함하는 3' U3 영역의 5' LTR로의 복사로 인해 소실된다. 이렇게, 전장 전사물이 패키징동안 생성되지만, 벡터는 두 LTR이 모두 1회 복제후 전사 휴지기에 들어가기 때문에 자가-불활성화된다. 또는, 두 LTR 모두의 U3 영역이 인핸서-결실될 수 있으며, 이종 프로모터를 이용하여 전장 게놈 전사물이 생성될 수 있다.

[0046] "인핸서-결실된"은 본원에서 인핸서 내에서 및/또는 인핸서 주위에서 인핸서의 전체 또는 일부가 결실, 부가 및 또는 치환에 의해 변형되어 인핸서가 실질적으로 불활성화된 U3 영역을 말하기 위해 사용된다. 인핸서는 인핸서의 변형이 실질적으로 U3-유도된 전사물을 제거하기에 충분한 경우 실질적으로 불활성화되는 것으로 간주된다. 한 태양에서, 내부 프로모터-유도된 유전자 발현과 비교하여 전체 레트로바이러스 전사물의 1% 미만이 LTR의 U3 영역으로부터 유도된다. 본 발명의 한 태양에서, 전체 전사물의 0.1% 미만이 LTR의 U3 영역으로부터 유도된다. 또 다른 태양에서, 검출가능한 U3-유도된 전사물이 발견되지 않는다.

[0047] 본 발명의 한 태양에서, 인핸서-결실된 U3 영역은 실질적으로 상기 영역에서 인핸서 및 프로모터 요소의 일부 또는 전체의 결실에 의해 불활성화된다. 또 다른 태양에서, U3 영역은 실질적으로 U3 영역에서 뉴클레오티드의 치환 또는 삽입에 의해 불활성화된다. 다른 태양에서는, 전체 U3 영역이 결실된다. 공지된 레트로바이러스 벡터 및 본 발명에 사용하기에 적합한 야생형 레트로바이러스 둘 다의 U3 영역이 당해 분야에 공지되어 있으며 용이하게 인지된다[Coffin, JM, *Fundamental Virology*, pp. 790-800, Fields et al., eds., 3rd Ed., Lippincott-Raven Publ., 1996].

내부 프로모터

[0049] 본 발명에서, 인핸서-결실 U3 레트로바이러스 벡터 환경에서 높은 바이러스 역가 및 높은 수준의 유전자 발현을 제공할 수 있는 프로모터가 제공된다. 한 태양에서, 내부 프로모터는 벡터에 이종이다, 즉, 자연에서 발견되는 바와 같은 벡터에는 존재하지 않는다. HCMV IE 프로모터(서열번호: 1), MLV U3 영역(서열번호: 2), CMV 인핸서 /유비퀴틴 프로모터(서열번호: 3), 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 β-액틴(CAG) 프로모터(서열번호: 4), 인간 연장 인자 1 알파(EF-1 α) 프로모터(서열번호: 5), 인간 β-액틴(ACTB) 프로모터(서열번호: 6), 인간 글리세르알데하이드-3-포스페이트 테하이드로게나제(GAPDH) 프로모터(서열번호: 7), 인간 리보솜 단백질 L10(RPL10) 프로모터(서열번호: 8), 인간 백혈구 수용체군 구성원 8(LENG8) 프로모터(서열번호: 9), 인간 네신 부류 3(SNX3) 프로모터(서열번호: 10), 인간 CCR4-NOT 전사 복합체, 서브유니트 3(CNOT3) 프로모터(서열번호: 11), 인간 코핀 I(CPNE1) 프로모터(서열번호: 12), 인간 가설 단백질(HYPO) 프로모터(서열번호: 13)、인간 선천성 이상각화증 1, 다이스케린(dyskerin)(DKC1) 프로모터(서열번호: 14), 인간 액포 단백질 부류 72(VPS72) 프로모터(서열번호: 15), 인테그린 베타 4 결합 단백질(ITGB4BP) 프로모터(서열번호: 16) 및 유비퀴놀-사이토크롬 c 리덕타제, 복합체 III 서브유니트 VII(UQCRQ) 프로모터(서열번호: 17)를 포함하여 다양한 프로모터를 검사하였다. UQCRQ, SNX3, ITGB4BP, GAPDH, RPL10 및 LENG8 프로모터는 높은 바이러스 역가 및 높은 수준의 유전자 발현을 제공할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 상기 데이터는 본 발명의 세포 프로모터가 인핸서-결실 U3 레트로바이러스 벡터에서 유전자 발현을 유도할 수 있음을 보여준다. 본 발명의 한 태양에서, 내부 프로모터는 높은 바이러스 역가 및 높은 수준의 유전자 발현을 제공할 수 있는 상기 열거한 프로모터의 단편 또는 변이체일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 프로모터의 단편은 천연 프로모터와 동일하나 그의 전장보다 짧은 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 한 태양에서, 상기 단편은 전장 프로모터의 전사 활성의 약 20% 이상(예를 들면, 약, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90 또는 95%)을 갖는다. 사용될 수 있는 단편으로는, 제한하지 않고, 뉴클레오티드 서열 약 -50 내지 약 +143(대략 서열번호: 8의 뉴클레오티드 951 내지 1143), 약 -100 내지 약 +143(대략 서열 번호: 8의 뉴클레오티드 901 내지 1143), 약 -200 내지 약 +143(대략 서열번호: 8의 뉴클레오티드 801 내지 1143), 약 -350 내지 약 +143(대략 서열번호: 8의 뉴클레오티드 651 내지 1143), 약 -500 내지 약 +143(대략 서열번호: 8의 뉴클레오티드 501 내지 1143), 약 -1000 내지 약 +143(대략 서열번호: 8의 뉴클레오티드 1 내지 1143) 또는 약 -350 내지 약 -1(대략 서열번호: 8의 뉴클레오티드 651 내지 1001)을 포함하거나 또는 이들로 이루어진 RPL10 프로모터의 단편; 및 뉴클레오티드 서열 약 -50 내지 약 +305(대략 서열번호: 9의 뉴클레오티드 970 내지 1325), 약 -100 내지 약 +305(대략 서열번호: 9의 뉴클레오티드 920 내지 1325), 약 -200 내지 약 +305(대략 서열번호: 9의 뉴클레오티드 820 내지 1325), 약 -385 내지 약 +305(대략 서열번호: 9의 뉴클레오티드

드 635 내지 1325), 약 -1020 내지 약 +305(대략 서열번호: 9의 뉴클레오티드 1 내지 1325) 또는 약 -385 내지 약 +1(대략 서열번호: 9의 뉴클레오티드 635 내지 1020)을 포함하는 LENG8 프로모터의 단편이 포함된다(전사 개시 부위는 각 프로모터에 대해 +1인 것으로 간주된다). 본원에서 사용된 바와 같이, 프로모터의 변이체는 천연 프로모터의 서열과 약 70% 이상(예를 들면, 약 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99%) 동일하고 천연 프로모터의 전사 활성의 약 20% 이상(예를 들면, 약 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90 또는 95%)을 갖는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 프로모터의 변이체는 또한 상기 프로모터의 단편일 수 있다.

[0050] "높은 바이러스 역가"는 본원에서 인핸서-결실 U3 레트로바이러스 백터가 두 LTR 모두에 작용성 비변형 U3 영역을 갖는 동일 백터로서 상기 백터를 함유하는 감염성 레트로바이러스 입자를 10% 이상 생성하는 것을 의미하기 위해 사용된다. 다른 태양에서, 인핸서-결실 U3 백터의 역가는 U3-작용성 백터와 비교할 때 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200% 이상이다. 상기 역가 비교는 여러 방법으로, 예를 들면, 형질도입된 세포에서 리포터 유전자, 예를 들면, GFP 또는 루시퍼라제의 발현, 백터에 의해 발현된 선택성 마커를 이용한 형질도입 세포의 선별, 또는 백터에 의한 치료 유전자의 발현에 의해 이루어질 수 있다. 바이러스 역가를 측정하는 상기 많은 방법들이 당해 분야에 공지되어 있다.

[0051] "높은 수준의 이종 유전자 전사" 또는 "높은 수준의 유전자 발현"은 레트로바이러스 백터에 의해 생성된 전체 전사물의 70% 이상(예를 들면, 적어도 80, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99%)이고, 두 LTR 모두에 작용성 비변형 U3 영역을 갖는 동일 백터에서 동일 유전자의 전사 또는 발현의 10% 이상인 이종 유전자의 전사 또는 발현을 포함한다. 다른 태양에서, 인핸서-결실 U3 백터에서 이종 유전자의 전사 또는 발현은 U3-작용성 백터내 동일 유전자와 비교할 때 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200% 이상이다. 상기 비교는, 예를 들면, 리포터 유전자 발현을 측정함으로써, 또는 표준 분자 생물 기술을 이용하여, 예를 들어, 노던 블롯(Northern blot) 분석법, RT-PCR, 웨스턴 블롯(Western blot) 분석법, 면역조직화학 및 효소-결합 면역흡수 분석법(ELISA)에 의해 제조된 이종 전사물 또는 단백질의 양을 분석함으로써 이루어질 수 있다.

[0052] 본 발명의 프로모터는 진핵세포, 원핵세포 또는 바이러스 유래의 프로모터를 포함할 수 있으며, 세포에서 말단에 위치한 서열(프로모터 서열의 3' 말단에 결합된 서열)의 전사를 유도하기에 충분하다. 내부 프로모터는 생산 세포주에서 게놈 RNA의 생성 및 패키징 내내 높은 바이러스 역가를 또한 허용하면서 그에 작동 가능하게 연결된 이종 유전자의 높은 수준의 전사를 유도해야 한다. 상기 프로모터는 또한 추가로 인핸서 요소를 포함할 수 있다. 프로모터 및 인핸서는 전사에 수반되는 세포 단백질과 특이적으로 상호작용하는 DNA 서열의 짧은 배열로 이루어진다[Maniatis et al., *Science* 236: 1237, 1987]. 프로모터 및 인핸서 요소는 효모, 곤충 및 포유동물 세포, 및 바이러스의 유전자를 포함하여 다양한 진핵세포 공급원으로부터 분리되었다(유사한 조절 요소들이 또한 원핵세포에서도 발견된다). 특정 프로모터 및 인핸서의 선택은 목적 단백질을 발현하기 위해 어떤 세포 유형을 사용하는지에 따라 달라진다.

[0053] 프로모터, 인핸서 및 다른 조절 요소들은 조직 특이적 또는 세포 특이적일 수 있다. 용어 "조직 특이적"은, 조절 요소에 적용될 때, 특정 유형의 조직(예를 들면, 간)으로 이종 유전자의 선택적 발현을 다른 유형의 조직(예를 들면, 폐)에서 동일한 목적 뉴클레오티드 서열의 발현보다 크게 유도할 수 있는 조절 요소를 말한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "조직 특이적"(예를 들면, 간-특이적)은 발현의 절대 특이도를 필요로 하지 않는 상대적 용어이다. 즉, 용어 "조직 특이적"은 한 조직이 매우 높은 수준의 발현을 나타내고 또 다른 조직은 발현을 나타내지 않을 필요는 없다. 발현은 한 조직에서 또 다른 조직에서보다 더 크게 충분하다. 대조적으로, "엄격한" 또는 "절대적" 조직-특이적 발현은 다른 조직에서는 발현이 검출되지 않으면서 단일 조직 유형(예를 들면, 간)에서 발현을 나타내는 것을 의미한다. 유사하게, 용어 "세포 유형 특이적"은, 조절 요소에 적용될 때, 동일 조직내의 다른 유형의 세포(예를 들면, 과증식 세포, 예를 들면, 암세포)에서 동일한 목적 뉴클레오티드 서열의 발현보다 특정 유형의 세포에서 목적 뉴클레오티드 서열의 선택적 발현을 더 크게 유도할 수 있는 조절 요소를 말한다. 용어 "세포 유형 특이적"은 조절 요소에 적용될 때, 또한 단일 조직내 영역에서 목적 뉴클레오티드의 선택적 발현을 촉진할 수 있는 조절 요소를 의미한다.

[0054] 높은 바이러스 역가를 또한 제공하면서 높은 수준의 전사를 제공할 수 있는 임의의 내부 프로모터가 본 발명에 포함되지만, 한 태양에서, 내부 프로모터는 세포성 프로모터이다. 다른 태양에서, 내부 프로모터는 RPL10 프로모터(서열번호: 8), LENG8 프로모터(서열번호: 9), SNX3 프로모터(서열번호: 10), UQCRRQ 프로모터(서열번호: 17) 또는 ITGB4BP 프로모터(서열번호: 16)로부터 선택된다. 또 다른 태양에서, 내부 프로모터는 전장 프로모터

의 변이체이고 이종 유전자의 높은 수준의 전사를 유도할 수 있으면서, 프로모터를 포함하는 벡터는 높은 바이러스 역가를 제공할 수 있다. 다른 태양에서, 내부 프로모터는 필수적으로 TATA 박스로 이루어진다. 일부 태양에서, 내부 프로모터는 또한 높은 수준의 유전자 발현을 위한 하나 이상의 스플라이싱 부위를 포함한다.

[0055] 내부 프로모터로부터 삽입 활성화의 가능성을 감소시키기 위해, 인슐레이터 서열을 사용하여 주변 유전자에 대한 내부 프로모터의 활성화 효과를 차단할 수 있다[Ramezani et al., *Mol. Ther.* 14:245, 2006]. 또 다른 접근방법은 추가의 폴리아데닐화 신호를 삽입하여 벡터를 변형시켜 내부 프로모터로부터 연속관통(read-through)을 억제하는 것이다[Ramezani et al., *Mol. Ther.* 14:245, 2006].

[0056] 이종 유전자

용어 "작동가능하게 연결된"은 유전자 서열의 전사가 작동가능하게 연결된 프로모터 서열에 의해 유도되도록 유전자 서열과 프로모터 또는 다른 조절 또는 처리 서열 사이의 결합을 기술하기 위해 사용된다.

용어 "유전자"는 폴리펩티드 또는 전사물의 생성에 필수적인 조절 및 암호화 서열을 포함하는 DNA 서열을 말한다. 상기 용어는 또한 구조 유전자의 암호화 영역을 포함하며, 유전자가 전장 mRNA의 길이에 상응하도록 한쪽 말단상에 약 1 kb 이상의 길이로 5' 및 3' 말단 상의 암호화 영역에 인접하여 위치한 서열을 포함한다. 암호화 영역의 5' 말단에 위치하고 mRNA 상에 존재하는 서열은 5' 미번역 서열로 지칭된다. 암호화 영역의 3' 말단 또는 하류에 위치하고 mRNA 상에 존재하는 서열은 3' 미번역 서열로 지칭된다. 용어 "유전자"는 유전자의 cDNA 및 게놈 형태 둘 다를 포함한다. 유전자의 게놈 형태 또는 클론은 "인트론" 또는 "개재 영역(intervening region)" 또는 "개재 서열"로 지칭되는 비-암호화 서열로 차단된 암호화 영역을 함유한다. 인트론은 핵 RNA(hnRNA)로 전사되는 유전자 단편이며; 인트론은 인핸서와 같은 조절 요소를 함유할 수 있다. 인트론은 핵 또는 1차 전사물로부터 제거되거나 "배제(spliced out)"되므로; 인트론은 메신저 RNA(mRNA) 전사물에 존재하지 않는다. mRNA는 번역시에 초기 폴리펩티드에서 서열 또는 아미노산 순서를 지정하는 기능을 한다.

용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산 분자"는 본원에서 상호교환적으로 사용되는 바와 같이, 임의의 길이, 예를 들면, 2개 이상의 뉴클레오티드 중합체를 말하며, DNA 및 RNA를 둘 다 포함한다. 뉴클레오티드는 테옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유사체(변형된 포스페이트 잔기, 염기 또는 당 포함), 또는 적당한 효소, 예를 들어, DNA 폴리머라제 또는 RNA 폴리머라제에 의해 중합체내에 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다.

[0060] 당해 분야에 숙련된 자에게 인지되듯이, 삽입된 목적 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은 임의의 뉴클레오티드 서열일 수 있다. 예를 들면, 폴리뉴클레오티드 서열은 리포터 유전자 서열 또는 선택성 마커 유전자 서열일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 리포터 유전자 서열은, 발현될 때 그의 존재 또는 활성을 모니터할 수 있는 단백질의 생성을 야기하는 임의의 유전자 서열이다. 리포터 유전자의 예로는 루시퍼라제(예를 들면, 문헌 [deWet et al., *Mol. Cell. Biol.* 7:725, 1987] 및 미국 특허 제 6,074,859; 5,976,796; 5,674,713; 및 5,618,682 호(이들은 모두 본원에 참고로 인용된다) 참조), 녹색 형광 단백질(예를 들면, 유전자은행 등록 번호 U43284; 많은 GFP 변이체가 캘리포니아주 팔로 알토 소재의 클론텐크 래버ATORY(CLONTECH Laboratories)에서 상업적으로 시판한다), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제, β -갈락토시다제, 알칼리성 포스파타제 및 양고추냉이 퍼옥시다제가 포함되나, 이로 한정되지는 않는다. 또는, 리포터 유전자 서열은 그 발현이 세포 생리기능에 영향을 미치는 유전자 산물을 생성하는 임의의 유전자 서열일 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열은 이미 하나 이상의 프로모터, 개시 서열 또는 처리 서열을 갖는 하나 이상의 유전자 서열을 포함할 수 있다.

[0061] 리포터 유전자 서열은 선택성 마커일 수 있으며, 상기 선택성 마커는 그의 존재가 그를 함유하는 세포를 선택적으로 증식시키도록 하는 단백질을 발현시킬 수 있는 임의의 유전자 서열이다. 선택성 마커는 "우성"일 수 있으며; 우성 선택성 마커는 임의의 원핵세포주에서 검출될 수 있는 효소 활성을 암호화한다. 우성 선택성 마커의 예로는 포유동물 세포에서 약물 G418에 대한 내성을 제공하는 세균성 아미노글리코사이드 3' 포스포트랜스퍼라제 유전자(네오(neo) 유전자로도 지칭됨), 항생물질 하이그로마이신에 대한 내성을 제공하는 세균성 하이그로마이신 G 포스포트랜스퍼라제(hyg) 유전자, 및 마이코페놀산의 존재하에 성장하는 능력을 제공하는 세균성 잔틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 유전자(gpt 유전자로도 지칭됨)가 포함되나, 이로 한정되지는 않는다. 다른 선택성 마커는 관련된 효소 활성이 결여된 세포주와 함께 사용해야 한다는 점에서 우성이 아니다. 비-우성 선택성 마커의 예로는 tk⁻ 세포주와 함께 사용되는 티미딘 키나제(tk) 유전자, CAD-결핍 세포와 함께 사용되는 CAD 유전자, 및 hprt⁻ 세포주와 함께 사용되는 포유동물 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(hprt)

유전자가 포함된다. 포유동물 세포주에서 선택성 마커의 사용에 대한 개관은 문헌 [Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp.16.9-16.15, 1989]에 제공되어 있다.

[0062] 리포터 유전자 서열은 정상 세포에서 벡터의 인식 또는 선택을 허용하기에 충분하다. 본 발명의 한 태양에서, 리포터 유전자 서열은 정상적으로 포유동물 세포로부터 존재하지 않고, 따라서 그의 존재가 상기 세포에서 벡터의 존재를 결정적으로 확증시킬 수 있는 효소 또는 다른 단백질을 암호화할 수 있다.

[0063] 본 발명의 레트로바이러스 벡터는 바이러스 입자내에 이종 유전자를 혼입시켜, 그 안에 이종 핵산을 함유하는 감염된 숙주 세포의 수를 증폭시키는 수단을 제공한다. 이종 유전자의 혼입은 바이러스 입자내에서 이종 유전자의 복제, 및 그 안의 이종 전사물 또는 단백질의 후속 생성을 촉진한다. 유전자는 세포내에 유전자를 전달하기 위해 사용되는 벡터의 야생형에 친연적으로 존재하지 않는 경우 이종이라고 한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 이종 유전자는 핵산 분자를 말하기 위한 것이다.

[0064] 이종 유전자는 또한 생물학적으로 활성인 적당한 단백질 또는 폴리펩티드, 면역원 또는 항원 단백질 또는 폴리펩티드, 또는 치료 활성 단백질 또는 폴리펩티드와 같은 목적하는 생성물의 암호화 서열을 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 숙주 세포에서 내인성 단백질의 결핍 또는 부재 발현을 보충할 수 있다. 상기 유전자 서열은 DNA, cDNA, 합성 DNA, RNA 또는 그의 조합을 포함하여 다양한 공급원으로부터 유도될 수 있다. 상기 유전자 서열은 천연 인트론을 포함하거나 포함하지 않을 수 있는 게놈 DNA를 포함할 수 있다. 또한, 상기 게놈 DNA는 프로모터 서열 또는 폴리아데닐화 서열과 함께 수득될 수 있다. 본 발명의 유전자 서열은 바람직하게는 cDNA이다. 게놈 DNA 또는 cDNA는 많은 방법으로 수득될 수 있다. 게놈 DNA는 당해 분야에 공지된 방법에 의해 적당한 세포로부터 추출되고 정제될 수 있다. 또는, mRNA는 세포로부터 분리되어 역전사 또는 다른 방법에 의해 cDNA를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 또는, 폴리뉴클레오티드 서열은 RNA 서열에 상보성인 서열, 예를 들면, 안티센스 RNA 서열을 포함할 수 있으며, 상기 안티센스 서열은 개개인의 세포에서 상보성 폴리뉴클레오티드의 발현을 억제하기 위해 개개인에 투여될 수 있다.

[0065] 이종 유전자의 발현은 항체 반응을 달성하기 위해 면역원 또는 항원 단백질 또는 폴리펩티드를 제공할 수 있다. 상기와 같이 유도된 항체는 동물로부터 혈액, 혈청 또는 복수와 같은 체액중에 수거될 수 있다.

[0066] 이종 유전자는 또한 전사될 수 있는 임의의 목적 핵산일 수 있다. 일반적으로, 외래 유전자는 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 바람직하게, 폴리펩티드는 다소의 치료 이점을 갖는다. 폴리펩티드는 숙주 세포에서 내인성 단백질의 결핍 또는 부재 발현을 보충할 수 있다. 폴리펩티드는 키메라 신호전달 수용체와 같이, 숙주 세포상에 새로운 성질을 제공할 수 있다(미국 특허 제 5,359,046 호 참조). 통상의 기술을 가진 자라면 본원에 교시되고 당해 분야에 공지된 이종 유전자 실행 기술의 적절성을 결정할 수 있다. 예를 들면, 전문가라면 이종 유전자가 캡시드화에 적당한 크기를 가졌는지 및 이종 유전자 산물이 적절히 발현되지는 여부를 알 것이다.

[0067] 본 발명에 사용될 수 있는 특정 이종 유전자는 특별히 제한되지 않는다. 그러나, 한 태양에서, 이종 유전자는 사이토카인, 케모카인, 호르몬, 항체, 조작된 면역글로불린-유사 분자, 단일쇄 항체, 융합 단백질, 효소, 면역 성 공-자극 분자, 면역조절 분자, 안티센스 RNA, 리보자임, RNA 외부 안내(external guide) 서열, 표적 단백질의 트랜스도미넌트(transdominant) 음성 돌연변이, 독소, 잠정적 독소, 항원, 종양 억제제 단백질 및 성장 인자, 막 단백질, 혈관활성 단백질 및 웨პ티드, 항바이러스 단백질 또는 그의 변이체를 암호화한다.

[0068] 다른 태양에서, 이종 유전자는 다음을 포함하나 이들로 한정되지는 않는 폴리펩티드를 암호화할 수 있다: 면역 글로불린, 에리트로포이에틴, 알파-인터페론, 알파-1 프로테이나제 억제제, 안지오게닌, 항트롬빈 III, 베타산데카복실라제, 인간 성장 호르몬, 소 성장 호르몬, 폐지 성장 호르몬, 인간 혈청 알부민, 베타-인터페론, 송아지 장 알칼리 포스파타제, 낭포성 섬유증 막통과 조절제, 인자 VIII, 인자 IX, 인자 X, 인슐린, 락토페린, 조직 플라스미노겐 활성화제, 미엘린 염기성 단백질, 인슐린, 프로인슐린, 프로락チン, B형 간염 항원, 면역글로불린 단편(예를 들면, FAB), 단클론성 항체 CTLA4 Ig, Tag 72 단클론성 항체, Tag 72 단일쇄 항원 결합 단백질, 단백질 C, 예를 들면, 종양 괴사 인자 알파 및 베타, 그의 수용체 및 그의 유도체를 포함하여 사이토카인 및 그의 수용체; 레닌, 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지단백질; 알파-1-항트립신; 여포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체형성 호르몬; 글루카곤; 혈우병 인자; 심방 이뇨 인자; 폐 표면활성제; 유로기나제; 봄베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 엔케팔리나제; 인간 대식세포 염증 단백질(MIP-1-알파); 혈청 알부민, 예를 들면, 릴러판-억제 물질; 릴렉신 A-쇄; 릴렉신 B-쇄; 프로릴렉신; 마우스 성선자극호르몬-관련 웨პ티드; 베타-락타마제; DNA 분해효소; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자(VEGF); 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 인테그린; 단백질 A 또는 D; 류머티스 인자; 항신경성 인자, 예를 들면, 뼈-유래 향신경성 인자(BDNF), 뉴

로트로핀-3, -4, -5 또는 -6(NT-3, NT-4, NT-5 또는 NT-6), 또는 신경 성장 인자, 예를 들면, NGF-베타; 혈소판-유래 성장 인자(PDGF); 섬유아세포 성장 인자, 예를 들면, aFGF 및 bFGF; 표피 성장 인자(EGF); 형질전환 성장 인자(TGF), 예를 들면, TGF- α , 및 TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 또는 TGF- β 5를 포함하여 TGF- β ; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 II(IGF-I 및 IGF-II); 데스(1-3)-IGF-I(뇌 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질; CD 단백질, 예를 들면, CD-3, CD-4, CD-8 및 CD-19; 글유도 인자; 면역독소; 글형성 단백질(BMP); 인터페론, 예를 들면, 인터페론-알파, -베타 및-감마; 콜로니 자극 인자(CSF), 예를 들면, M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF; 인터류킨(IL), 예를 들면, IL-1 내지 IL-12; 초과산화물 디스뮤타제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 부酡 가속화 인자; 바이러스 항원, 예를 들면, AIDS 외피의 일부; 운반 단백질; 귀소 수용체; 처리 단백질; 조절 단백질; 항체; 키메라 단백질, 예를 들면, 면역접합체(immunoadhesin), 및 상기 열거한 폴리펩티드중 임의의 단편 또는 응합체. 다른 태양에서, 이종 유전자는 옥시다제, 특히 NADPH 옥시다제, 예를 들면, NADPH 옥시다제의 gp91 서브유니트를 암호화한다. 이들 단백질에 대한 핵산 및 단백질 서열은 유전자은행과 같은 공공 데이터베이스에서 이용가능하다.

[0069] 특정 단백질이 하나보다 많은 서브유니트(예를 들면, 면역글로불린)를 갖는 경우, 상기 서열을 암호화하는 유전자는 하나 이상의 IRES 요소에 의해 분리되어, 벡터에서 폴리시스템트로닉 서열로 정렬될 수 있다. 또는, 단백질의 상이한 서브유니트를 암호화하는 유전자는 별도의 벡터상에서 숙주 세포내에 도입될 수 있다. 본 발명에 따르면, 목적 단백질을 암호화하는 유전자는 바람직하게는 하나 이상의 인트론을 포함한다. 인트론은 통상적으로 유전자와 관련된 인트론일 수 있거나, 또는 합성 또는 외인성 인트론일 수 있다. 일부 태양에서, 유전자는 그의 통상적 보체보다 적은 인트론을 포함할 수 있다. 예를 들면, 나머지 인트론은 유지되면서 천연 인트론의 일부가 유전자로부터 제거될 수 있거나, 또는 하나 이상의 천연 인트론이 하나 이상의 외인성 인트론으로 대체될 수 있다.

[0070] "야생형" 또는 천연은 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열이 천연에서 발견되는 서열과 동일하다는 것이다.

[0071] "변이체"는 실질적으로 유사한 서열을 포함한다는 것이다. 따라서, 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열의 경우, 변이체는 기능적으로 동등한 서열, 예를 들면, 야생형 서열의 하나 이상의 활성의 20% 이상(예를 들면, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90%)을 보유하는 서열을 포함한다. 변이체 뉴클레오티드 서열은 또한, 예를 들면, 부위 지향 돌연변이유발에 의해 생성되었지만, 여전히 천연 서열의 기능을 보유하는 합성적으로 유도된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일반적으로, 본 발명의 뉴클레오티드 서열 변이체 또는 아미노산 서열 변이체는 그 각각의 천연 뉴클레오티드 서열에 대해 70% 이상, 일반적으로 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는다.

[0072] 숙련된 자라면 개시된 핵산 구조물의 많은 보존적 변이에 의해 기능적으로 동일한 구조물이 제공됨을 인지할 것이다. 특정 핵산 서열의 보존적 변이체는 동일하거나 필수적으로 동일한 아미노산 서열, 또는 핵산이 아미노산 서열을 암호화하지 않는 경우, 필수적으로 동일한 서열을 암호화하는 핵산을 말한다. 유전자 코드의 다의성으로 인해, 많은 기능적으로 동일한 핵산이 임의의 해당 폴리펩티드를 암호화한다. 예를 들면, 유전자 코드의 다의성으로 인해, "침묵 치환(silent substitution)"(예를 들면, 암호화된 폴리펩티드에 변형을 야기하지 않는 핵산 서열의 치환)은 아미노산을 암호화하는 모든 핵산 서열의 함축된 특징이다. 유사하게, 패키징 또는 패키징 가능한 구조물의 아미노산 서열중 하나 또는 소수의 아미노산이 매우 유사한 성질을 갖는 상이한 아미노산으로 치환되는 "보존적 아미노산 치환"은 또한 개시된 구조물에 매우 유사한 것으로 용이하게 확인된다. 예를 들면, 코돈 CGU, CGC, CGA, CGG, AGA 및 AGG는 모두 아미노산 아르기닌을 암호화한다. 따라서, 아르기닌이 코돈에 의해 지정된 모든 위치에서, 코돈은 암호화된 폴리펩티드를 변형시키지 않고 기술된 상응하는 코돈중 임의의 코돈으로 변형될 수 있다. 상기 핵산 변이는 "침묵 변이"이며, 이것은 "보존적으로 변형된 변이"의 한 종류이다. 본원에서 폴리펩티드를 암호화하는 모든 핵산 서열은 또한 가능한 침묵 변이를 기술한다. 숙련된 자라면 핵산에서 각각의 코돈(통상적으로 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG 제외)이 표준 기술에 의해 변형되어 기능적으로 동일한 문자를 생성할 수 있음을 인지할 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 각각의 "침묵 변이"는 임의의 기술된 서열에 내재되어 있다. 또한, 숙련된 자라면 암호화된 서열에서 단일 아미노산 또는 소비율의 아미노산(전형적으로 5% 미만, 보다 전형적으로는 1% 미만)을 변형, 부가 또는 결실시키는 개개의 치환, 결실 또는 부가가, 변형이 키메라성으로 유사한 아미노산에 의한 아미노산의 치환을 야기하는 "보존적으로 변형된 변이"임을 인지할 것이다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표가 당해 분야에 공지되어 있다. 다음의 6가지 군은 각각 서로에 대해 보존적 치환인 아미노산들을 포함한다:

1) 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T);

[0074] 2) 아스파트산(D), 글루탐산(E);

[0075] 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q);

[0076] 4) 아르기닌(R), 라이신(K);

[0077] 5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 및

[0078] 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W).

[0079] 또한, 문헌 [Creighton(1984) Proteins, W.H. Freeman and Company]을 참조하시오. 마지막으로, 핵산 분자의 활성을 변화시키지 않는 서열, 예를 들어, 비-작용성 서열의 부가는 염기성 핵산의 보존적 변형이다. 각각의 개시된 서열의 상기 보존적으로 치환된 변이는 본 발명의 특징이다.

[0080] 본 발명의 벡터 시스템에 사용된 다양한 전장 또는 성숙 폴리펩티드에 대한 아미노산 서열과 관련하여, 변이체는 천연 폴리펩티드의 N-말단 및/또는 C-말단에 하나 이상의 아미노산의 결실(소위 절두) 또는 부가; 천연 폴리펩티드의 하나 이상의 부위에서 하나 이상의 아미노산의 결실 또는 부가; 또는 천연 폴리펩티드의 하나 이상의 부위에서 하나 이상의 아미노산의 치환에 의해 천연 폴리펩티드로부터 유도된 폴리펩티드를 포함한다. 상기 변이체는, 예를 들면, 유전자 다형성으로부터 또는 인간 조작으로부터 비롯될 수 있다. 상기 조작 방법은 일반적으로 당해 분야에 공지되어 있다.

[0081] 숙련된 자라면 해당 핵산 구조물에서 변형을 야기하는 많은 방법을 인지할 것이다. 상기 공지된 방법으로는 부위-지향 돌연변이유발, 변성 올리고뉴클레오티드를 이용한 PCR 증폭, 돌연변이제 또는 방사선에 핵산 함유 세포의 노출, 목적 올리고뉴클레오티드의 화학적 합성(예를 들면, 거대 핵산을 생성하기 위한 접합 및/또는 클로닝과 함께), 및 다른 공지된 기술이 포함된다.

[0082] 천연 뉴클레오티드 서열 또는 천연 폴리펩티드의 변이체는 천연 서열 또는 천연 폴리펩티드와 실질적인 동일성을 갖는다. 변이체는 1 내지 10개 정도의 아미노산 잔기, 예를 들면, 6 내지 10개, 5 개정도, 4, 3, 2 또는 심지어 1개의 아미노산 잔기만큼 상이할 수 있다. 뉴클레오티드 서열의 변이체는 1 내지 30개 뉴클레오티드 정도, 예를 들면, 6 내지 20개, 5개 정도, 4, 3, 2 또는 심지어 1개의 뉴클레오티드 잔기만큼 상이할 수 있다.

[0083] "서열 동일성"은 변이체의 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열의 특정한 인접 단편을 정렬하고 기준 서열의 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열과 비교할 때 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기가 변이체 서열 및 기준 서열내에서 발견되는 것이다. 서열 정렬 및 서열간 동일성 측정 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 2개 뉴클레오티드 서열의 최적 정렬과 관련하여, 변이체 뉴클레오티드 서열의 인접 단편은 기준 뉴클레오티드 서열과 관련하여 부가적 뉴클레오티드 또는 결실된 뉴클레오티드를 가질 수 있다. 유사하게, 2개 아미노산 서열의 최적 정렬을 위해, 변이체 아미노산 서열의 인접 단편은 기준 아미노산 서열과 관련하여 부가 아미노산 잔기 또는 결실된 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 기준 뉴클레오티드 서열 또는 기준 아미노산 서열과 비교하기 위해 사용된 인접 단편은 20개 이상의 인접 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기를 포함할 것이며, 30, 40, 50, 100개 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기일 수 있다. 변이체 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열에서 갭(gap)의 혼입과 관련된 증가된 서열 동일성에 대한 조정은 갭페널티(gap penalty)를 지정함으로써 수행될 수 있다.

세포

[0084] 본 발명의 벡터를 포함하는 세포도 또한 포함된다. 한 태양에서, 인핸서-결실 U3 레트로바이러스 벡터를 포함하는 세포도 또한 포함된다. 본 발명의 벡터에 의해 형질도입된 표적 세포는 포유동물 세포, 조류 세포, 양서류 세포, 식물 세포, 어류 세포 및 곤충 세포를 포함하여, 시험관내 위치하든지 또는 생체내 위치하든지, 형질도입될 수 있는 임의의 진핵세포 유형일 수 있다. 한 태양에서, 표적 세포는 포유동물 세포, 특히 인간 세포이다. 표적 세포는 1차배양 세포 또는 세포주일 수 있다.

[0085] 한 태양에서, 본 발명의 벡터를 포함하는 감염성 레트로바이러스 입자를 생산하기 위해 필수적인 바이러스 단백질을 트랜스로 포함하는 생산 세포주가 본 발명에 포함된다. 상기 생산 세포주는 레트로바이러스 캡시드를 생산하고 레트로바이러스 벡터를 전사하는데, 전사물은 패키징 신호를 통해 바이러스 캡시드 안으로 들어간다. 생산 세포주의 제조에 필요한 패키징 세포주는 당해 분야에 공지되어 있으며, 전형적으로, 감염성 레트로바이러스 입자에 필요한 효소(예를 들면, 역전사효소) 및 구조 단백질(예를 들면, Gag 및 Env)을 제공하는 레트로바이러

스 *gap-pol* 및 *env* 유전자를 포함한다. 많은 상기 패키징 세포, 예를 들면, PG13, ψCRIP, PA317, GP+envAm12, FLYA13, FLYRD18, 페닉스-암포(Phoenix-Ampho), 페닉스-에코(Phoenix-Eco), 페닉스-GALV, PE501, GP+E86, PT67, BING, BOSC23, 프로팩(ProPak)-A 등, 및 렌티바이러스 패키징 세포주가 공지되어 있다[Logan et al., J Virol. 78:8421-8436, 2004]. 또한, 패키징 세포주는 단기간 사용을 위해 일시적으로 형질감염되거나, 또는 장기 사용을 위해 그 계놈 내로 삽입된 바이러스 유전자를 가질 수 있다.

[0087] 많은 패키징 세포주가 레트로바이러스 벡터가 기초되는 레트로바이러스의 천연 외피를 사용한다. 또 다른 밀접하게 관련된 바이러스로부터 외피 유전자를 이용함으로써 본 발명의 바이러스 벡터가 감염시킬 수 있는 세포의 숙주 범위를 변형시키는 것도 또한 가능하다. 즉, 다른 바이러스의 캡시드화에 관여하는 특정 바이러스의 외피 단백질의 능력의 이점을 취함으로써 본 발명의 레트로바이러스 벡터의 숙주 범위를 확장하는 것이 가능하다. 레트로바이러스-유래 *env* 유전자의 예로는 수포성-구내염 바이러스의 G-단백질(VSV-G), 긴팔원숭이 유인원 백혈병 바이러스(GaLV), 고양이 내재 바이러스 RD114, 라우스 육종 바이러스(RSV), 양친화성(amphotropic) 몰로니(Moloney) 뮤린 백혈병 바이러스(MoMuLV), 자기지향성(ecotropic) 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMuLV), 10A1 뮤린 백혈병 바이러스, 몰로니 링크 세포 포커스-유발 바이러스(MCFV), 무스 듀니(Mus dunnii) 내재 바이러스(MDEV), 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 및 인간 면역결핍 바이러스(HIV)가 포함되나, 이로 한정되지는 않는다. 이들 바이러스 외피 단백질은 모두 효과적으로 다른 바이러스의 계놈 및 세포간질 성분과 슈도타이프(pseudotype) 바이리온을 형성한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "슈도타이프"는 한 바이러스의 핵산과 또 다른 바이러스의 외피 단백질을 함유하는 바이러스 입자를 말한다. 일반적으로, VSV-G 또는 GaLV 슈도타이프 벡터는 매우 광범위한 숙주 범위를 가지며, 여전히 높은 수준의 감염성을 유지하면서 초원심분리에 의해 고농도의 역가로 펠릿화될 수 있다.

본 발명의 방법

[0089] 본 발명은 또한 전술한 바와 같은 생산 세포주를 배양하고, 세포 배양액으로부터 상등액을 수거하고, 상등액을 여과하여 무세포 바이러스 상등액을 수득함으로써 본 발명의 레트로바이러스 벡터를 포함하는 감염성 레트로바이러스 입자를 생산하는 방법을 제공한다. 당해 분야에 숙련된 자라면, 예를 들면, 적절한 배양 배지를 이용하고 최적 수거 시기 및 배양액 중 세포 밀도를 측정하여 우수한 바이러스 역가를 수득하기 위한 조건을 용이하게 최적화할 것이다.

[0090] 본원에서는 또한 표적 세포를 전술한 바와 같이 제조되고 본 발명에 따른 감염성 레트로바이러스 입자를 포함하는 바이러스 상등액과 접촉시키는 것을 포함하는, 표적 세포를 형질도입하는 방법이 제공된다. 전술한 바와 같이, 표적 세포는 포유동물 세포, 인간 세포, 영장류 세포 또는 뮤린 세포일 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다. 표적 세포는 1차배양 세포 또는 세포주일 수 있다. 상기 방법은 또한 바이러스 상등액에 형질도입을 증대시키기 위한 물질, 예를 들면, 폴리브렌, 레트로넥틴 및/또는 프로타민 설페이트의 첨가를 포함할 수 있다. 또한, 상기 방법은 추가로 일단 바이러스 상등액이 적용되면 세포의 저속 원심분리를 포함할 수 있다. 상기 및 다른 형질도입 최적화 기술은 공지되어 있으며 당해 분야에서 통상적이다.

[0091] 본 발명은 또한 이종 유전자가 치료적으로 유용한 폴리펩티드 또는 전사물을 암호화하는, 본 발명의 레트로바이러스 벡터로 형질도입된 세포를 투여함으로써 대상을 치료하는 방법을 제공한다. 한 태양에서, 상기 세포는 시험관내(*in vitro*) 또는 생체외(*ex vivo*)로 형질도입된다.

[0092] 본 발명은 또한 이종 유전자가 치료적으로 유용한 폴리펩티드 또는 전사물을 암호화하는, 본 발명의 발현 벡터 및 적당한 담체를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상을 치료하는 방법을 제공한다. 한 태양에서, 목적 핵산은 치료제를 암호화한다. 용어 "치료적으로 유용한"은 일반적인 의미로 사용되며, 치료제, 예방약제 및 대체약제를 포함한다. 치료제는 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 개선하거나 방지하는 경우 치료적인 것으로 간주될 수 있다. 본 발명의 벡터 및/또는 방법으로 치료될 수 있는 유전자 질환으로는 치료 핵산의 장기간 발현이 바람직한 질환이 포함된다. 다른 태양에서, 상기 방법은 유전자 질환, 증식성 질환 또는 감염성 질환을 치료하기 위한 것이다. 또 다른 태양은 신경 질환, 면역계 질환, 근육 질환, 출산 장애, 위장관 질환, 폐질환, 심혈관 질환, 신장 질환, 증식성 질환 및/또는 암 질환 및 질병을 포함하나, 이로 한정되지는 하나 이상의 질환, 질병 또는 증상을 치료하기 위한 방법을 포함한다. 또 다른 태양은 신경퇴행성 질환 또는 질병, 알츠하이머병, 정신분열증, 간질, 종양, 암 및 AIDS, 또는 목적 유전자의 대체 또는 상향 또는 하향 조절을 필요로 하는 다른 질환의 치료를 포함한다.

[0093] 본 발명의 발현 벡터를 투여하는 방법은 피부내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비강내, 경막외 및 경구 경로를 포함하나, 이로 한정되지는 않는다. 벡터 또는 조성물은 임의의 편리한 경로에 의해, 예를 들면, 주사 또는 정맥내 일시 주사(bolus injection)에 의해, 상피 또는 피부점막 내벽(예를 들면, 구강 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있으며, 다른 생물학적 활성 약제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신성이거나 국소적일 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터 또는 조성물을 뇌실내 및 경막내 주사를 포함하여 임의의 적당한 경로에 의해 중추신경계에 도입하는 것이 바람직할 수 있으며; 뇌실내 주사는 뇌실내 카테터, 예를 들면, 옴마야 수용기(Ommaya reservoir)와 같은 수용기에 부착된 뇌실내 카테터에 의해 촉진될 수 있다. 폐 투여, 예를 들면, 흡입기 또는 분무기의 사용 및 분무화제를 사용한 제형에 의한 폐 투여도 또한 이용될 수 있다.

[0094] 키트

[0095] 본원에 기술된 방법에 사용하기 위한 벡터를 포함하는 키트 또는 약물 전달 시스템을 제공하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다. 표적화 레트로바이러스 입자의 투여에 필요한 필수 물질 및 시약은 모두 키트에 구성될 수 있다(예를 들면, 패키징 세포 구조물 또는 세포주). 키트의 성분들은 다양한 제형으로 제공될 수 있다. 본 발명의 하나 이상의 레트로바이러스 벡터는 하나 이상의 약제(예를 들면, 화학치료제)와 함께 단일의 약학적으로 허용되는 조성물 또는 별도의 약학적으로 허용되는 조성물들로 제형화될 수 있다.

[0096] 상기 키트 또는 약물 전달 시스템의 성분들은 또한 건조 또는 동결건조 형태로 제공될 수 있다. 시약 또는 성분들이 건조 형태로 제공되는 경우, 복원은 일반적으로 또 다른 용기 수단에 제공될 수 있는 적당한 용매의 첨가에 의해 이루어진다. 본 발명의 키트는 또한 투여량 및/또는 투여 정보에 관한 설명서를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트 또는 약물 전달 시스템은 또한 전형적으로 상업적 판매를 위해 병을 밀폐 상태로 포함하기 위한 수단, 예를 들면, 목적하는 병이 보유되는 주사 또는 취입-성형된 플라스틱 용기를 포함한다. 용기의 수 또는 유형과 관계없이, 키트는 또한 대상의 체내에 최종 복합 조성물의 주사/투여 또는 배치를 촉진하기 위한 기구를 포함하거나 또는 기구와 함께 포장될 수 있다. 상기 기구는 도포구, 흡입기, 주사기, 피펫, 겹자, 계량 스푼, 점안기 또는 임의의 상기 의료적으로 승인된 전달 비히클일 수 있다.

[0097] 본 명세서 및 첨부된 청구의 범위에 사용된 바와 같이, 단수형 "하나(a), (an)", "그(the)" 등은 달리 명백히 나타내지 않는 한 복수의 의미를 포함함을 주지해야 한다. 따라서, 예를 들면, "폴리뉴클레오티드"에 대한 언급은 폴리뉴클레오티드들을 포함하며, "세포"는 다수의 세포들을 포함한다.

[0098] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "시험관내"는 인공적 환경, 및 인공 환경내에서 일어나는 과정 또는 반응을 말한다. 시험관내 환경은 시험관 및 세포 배양물로 이루어질 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다. 용어 "생체내"는 자연 환경(예를 들면, 동물 또는 세포), 및 자연 환경내에서 일어나는 과정 또는 반응을 말한다.

[0099] 하기의 실시예는 본 발명의 방법을 예시하며, 제한하지 않는다. 의학적 치료 및 약학 과학분야에서 통상적으로 접하며 당해 분야에 속련된 자에게 명백한 다양한 조건 및 파라미터의 다른 적절한 수정 및 변형은 본 발명의 진의 및 범위내에 속한다.

실시예

[0100] 실시예 1

[0101] 본 실시예에서는, 다양한 프로모터의 제작 과정이 제공된다.

[0102] (1) 인간 사이토메갈로바이러스(HCMV) 즉시 초기(IE) 프로모터(서열번호: 1)

[0103] HCMV IE 프로모터를 pCN 플라스미드[Lee et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272:230, 2000]로부터 수득하였다.

[0104] (2) MLV의 U3(서열번호: 2)

[0105] MLV LTR의 U3 영역은 강한 인핸서 및 프로모터 서열을 함유한다. MLV 3' LTR의 U3 영역은 주형으로 MLV 벡터,

MT(문헌 [Hong et al., *J. Gene. Med.* 6:724, 2004]; 미국 특허 제 6,451,595 호)를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. 하기의 프라이머 쌍을 PCR에 사용하였다:

ME5: ACGCGTGCAAGGCATGGAAAAA (SEQ ID NO:18)

MluI

MP3: ACGCGTAGATCTGAATTCTACCCGGCGACGCAGT(SEQ ID NO:19)

[0106] MluI BglII EcoRI

[0107]

[0108] 200 ng의 주형 플라스미드 DNA 및 1 μ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ μ l)를 함유하는 PCR 반응액 100 μ l를 확장 고성능(Expand High Fidelity) PCR 시스템(Cat# 92351824, 로슈(Roche))에 의해 35 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95 °C에서 30 초(변성), 55 °C에서 30 초(어닐링) 및 72 °C에서 30 초(중합)동안 수행되었다.

[0109] 455 bp의 증폭된 단편을 pGEM T easy 벡터(Cat#A1360, 프로메가(Promega), 미국 위스콘신주)내에 클로닝하여 pGEM-T-MTU3을 수득하였다.

[0110] (3) CMV/유비퀴틴 프로모터(서열번호: 3)

[0111] A. CMV 인핸서

[0112] 주형으로 pCK(PCT/KR99/00855)를 사용하여 PCR에 의해 CMV 인핸서를 증폭시켰다. 하기의 프라이머쌍을 PCR에 사용하였다:

CMV5: ACGCGTTGACATTGATTATTG (SEQ ID NO:20)

MluI

KMD1: TCTAGAGCCAAACAAACTCCCAT (SEQ ID NO:21)

[0113] XbaI

[0114] 200 ng의 주형 플라스미드 DNA 및 2 μ l의 각각의 프라이머(5 피코몰/ μ l)를 함유하는 PCR 반응액 50 μ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 94 °C에서 1 분(변성), 55 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 1 분(중합)동안 수행되었다.

[0115] 증폭된 단편을 pGEM T easy 벡터내에 클로닝하여 pGEM T-Enh를 수득하였다. 뉴클레오티드 서열은 서열분석에 의해 확인하였다.

[0116] B. 인간 폴리유비퀴틴 C 프로모터[Gill et al., *Gene Ther.* 8:1539, 2001]

[0117] 인간 폴리유비퀴틴 C 프로모터(-333 ~ +877)를 주형으로 HT1080 세포로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. 하기의 프라이머쌍을 PCR에 사용하였다.

KMD4: GCTAGCGGCCTCCGCGCCGGTTT (SEQ ID NO:22)

NheI

KMD5:ACGCGTAGATCTGAATTCTCGTCTAACAAAAAGCCAA(SEQ ID NO:23)

[0118] MluI BglII EcoRI

[0119] 200 ng의 주형 DNA 및 2 μ l의 각각의 프라이머(5 피코몰/ μ l)를 함유하는 PCR 반응액 50 μ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 94 °C에서 1 분(변성), 55 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.

[0120] 1230 bp의 증폭된 단편을 pGEM T easy 벡터내에 클로닝하여 pGEM T-UbC를 수득하였다. 뉴클레오티드 서열분석에 의해 확인하였다.

[0121] C. CMV 인핸서/UbC 프로모터

[0122] CMV 인핸서 및 UbC 프로모터로 이루어진 하이브리드 프로모터를 제작하기 위해, pGEM T easy-Enh로부터 SalI-

XbaI 단편을 절제하고 pGEM T Easy-UbC의 SalI-XbaI 부위에 삽입하여 pGEM T Easy-Enh+UbC를 생성하였다.

[0123] (4) CAG(사이토메갈로바이러스 인핸서, 닫 β -액틴 프로모터) 프로모터(서열번호: 4)

[0124] CAG 프로모터(사이토메갈로바이러스 인핸서, 닫 β -액틴 프로모터)(서열번호: 4)를 수득하기 위해, pAxCAwt(타카라 바이오(Takara Bio), 일본 오츠)로부터 클레나우(Klenow) 단편 처리된 SalI-SwaI 단편을 pGEM T easy(프로메가, 미국 위스콘신주)내에 클로닝하여 pGEM T easy-CAG를 생성하였다. 뉴클레오티드 서열을 서열분석에 의해 확인하였다.

[0125] (5) 인간 연장 인자 1 알파(EF1- α) 프로모터(서열번호: 5)[Kim et al., Gene 91:217, 1990]

[0126] 인간 연장 인자 1 알파(EF1- α) 프로모터(-341 ~ +1007)를 주형으로 HT1080 세포(인간 섬유육종 세포주, ATCC CCL-121)로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

EEF1A1F: ACGCGTGTAAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCACG

MluI (SEQ ID NO:24)

EEF1A1R: GGATCCTTGGCTTTAGGGTAGTTTCACGACACC

BamHI (SEQ ID NO:25)

[0127] [0128] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1 μ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ μ l) 및 5 μ l의 DMSO(다이메틸 셀록사이드)를 함유하는 PCR 반응액 50 μ l를 확장 고성능 PCR 시스템(Cat# 92351824, 로슈)에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95 °C에서 1 분(변성), 55 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.

[0129] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy 벡터내에 클로닝하여 pGEM T easy-EF를 수득하였다. 뉴클레오티드 서열은 서열분석에 의해 확인하였다.

[0130] (6) 인간 베타-액틴 프로모터(서열번호: 6)[Nakajima-Iijima et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6133, 1985; Miyamoto, Nucleic Acids Res. 15:9095, 1987]

[0131] 인간 β -액틴 프로모터(-387 ~ +944)를 주형으로 K562 세포(인간 골수성 세포주, ATCC CCL-243)로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

BApF: ACGCGTGAGATGTCCACACCTAGGATGTCC (SEQ ID NO:26)

MluI

BApR: GGATCCGGTGAGCTGCGAGAACAGCCG (SEQ ID NO:27)

BamHI

[0132] [0133] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1 μ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ μ l) 및 5 μ l의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50 μ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95 °C에서 1 분(변성), 55 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.

[0134] 증폭된 단편을 pGEM T easy에 클로닝하여 pGEM T easy-BA를 수득하였다. 뉴클레오티드 서열은 서열분석에 의해 확인하였다.

[0135] (7) 인간 글리세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로게나제(GAPDH) 프로모터(서열번호: 7)[Ercolani et al., J. Biol. Chem. 263:15335, 1988]

[0136] 인간 GAPDH(글리세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로게나제) 프로모터(-350 ~ +315)를 주형으로 HT1080 세포로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

GAPDHF: ACGCGTTCATCCAAGCGTGTAAGGG (SEQ ID NO:28)

MluI

GAPDHR: GTTTAAACGGGTCTGAGCGATGTGGCT (SEQ ID NO:29)

PmeI

[0137]

[0138] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1 μl의 각각의 프라이머(10 피코몰/μl) 및 5 μl의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50 μl를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95 °C에서 1 분(변성), 55 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.

[0139]

증폭된 단편을 pGEM T easy내에 클로닝하여 pGEM T easy-GAPDH를 수득하였다. 뉴클레오티드 서열은 서열분석에 의해 확인하였다.

[0140]

(8) 인간 리보솜 단백질 L10(RPL10) 프로모터(서열번호: 8)(NCBI 등록 번호: NM_006013, NT_011726; [Bignon et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184:1165, 1992])

[0141]

인간 RPL10(리보솜 단백질 L10) 프로모터(-350 ~ +143)(서열번호: 8의 뉴클레오티드 651 내지 1143)를 주형으로 HT1080 세포로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

RPLF: ACGCGTAGGCCACCTAGGGTACTTCCTTT (SEQ ID NO:30)

MluI

RPLR: GGATCCGGCGACACCAGGATCTCAGTGGCT (SEQ ID NO:31)

BamHI

[0142]

[0143] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1 μl의 각각의 프라이머(10 피코몰/μl) 및 5 μl의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50 μl를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95 °C에서 1 분(변성), 55 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.

[0144]

증폭된 단편을 pGEM T easy내에 클로닝하여 pGEM T easy-RPL을 수득하였다. 뉴클레오티드 서열은 서열분석에 의해 확인하였다.

[0145]

(9) 인간 백혈구 수용체군 구성원 8(LENG8) 프로모터(서열번호: 9)(NCBI 등록 번호: AL834532, NT_011109; [Cooper et al., *Genome Res.* 16:1, 2006])

[0146]

인간 LENG8(백혈구 수용체군(LRC) 구성원 8) 프로모터(-385 ~ +305, +1908 ~ +2121)(서열번호: 9의 뉴클레오티드 635 내지 1538)를 주형으로 HT1080 세포로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

LENG8F1: ACGCGTAGAATTGTTGAACCCAGGAGGC GG (SEQ ID NO:32)

MluI

LENG8R1: GTTTAAACAAAGTAGAAGACGACGGCGCACGCG

PmeI (SEQ ID NO:33)

LENG8F2: GTTTAAACCCACACCCAGAACTCTCAGATCCT

PmeI (SEQ ID NO:34)

LENG8R2: GAATTCTGGACCTGGGGTATAAGGGTGG (SEQ ID NO:35)

EcoRI

[0147]

[0148] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1 μl의 각각의 프라이머(10 피코몰/μl) 및 5 μl의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50 μl를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95 °C에서 1 분(변성), 55 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.

[0149]

증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy 내에 클로닝하여 pGEM T easy-ELNG1 및 LENG 2를 각각 수득하였다. 뉴클레오티드 서열을 확인한 후, pGEM T easy-LENG1의 MluI-PmeI 단편을 pGEM T easy-LENG2의 MluI-PmeI 부위내에 클로닝하여 pGEM T easy-LENG8을 제조하였다.

- [0150] (10) 인간 네신 부류 3(SNX3) 프로모터(서열번호: 10)(NCBI 등록 번호: NM_152828, NT_025741; [Haft et al., *Mol. Cell. Biol.* 18:7278-7287, 1998])
- [0151] 인간 SNX3(네신 부류 3) 프로모터(-353 ~ +338)를 주형으로 HT1080 세포로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- SNX3F: GAATTCAATCCAGACGCGTGTGGTGCAA (SEQ ID NO:36)
EcoRI
- SNX3R: GGATCCTTCGCTGTAGCTGCTG (SEQ ID NO:37)
- [0152] BamHI
- [0153] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1 μl의 각각의 프라이머(10 피코몰/ μl) 및 5 μl의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50 μl를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95 °C에서 1 분(변성), 55 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.
- [0154] 증폭된 단편을 pGEM T easy 내에 클로닝하여 pGEM T easy-SNX를 수득하였다. 뉴클레오티드 서열은 서열분석에 의해 확인하였다.
- [0155] (11) 인간 CNOT3(서열번호: 11)(CCR4-NOT 전사 복합체, 서브유니트 3) 프로모터(NCBI 등록 번호: NM_014516; [Albert et al., *Nucleic Acids Res.* 28:809, 2000])
- [0156] 인간 CNOT3(CCR4-NOT 전사 볍합체, 서브유니트 3) 프로모터(-350 ~ +654, +5076 ~ +5266)를 주형으로 HT1080 세포로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- CNOT3F1: ACGCGTAGCTCCTCCCCAGACCAATTGTTTAAG
MluI (SEQ ID NO:38)
- CNOT3R1: GGATCCTCCATCCTCCAGCCAGGAGCCAATACCGAC
BamHI (SEQ ID NO:39)
- CNOTF2: AGATCTGGGGCTGGCTCTTGTAGATAGC (SEQ ID NO:40)
BglII
- CNOTR2: GGATCCCTCCCTGCCCTACAGACGCCT (SEQ ID NO:41)
BamHI
- [0157] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1 μl의 각각의 프라이머(10 피코몰/ μl) 및 5 μl의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50 μl를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95 °C에서 1 분(변성), 55 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.
- [0158] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy 내에 클로닝하여 pGEM T easy-CNOT1 및 CNOT2를 각각 수득하였다. 뉴클레오티드 서열을 확인한 후, pGEM T easy-CNOT1의 MluI-BamHI 단편을 pGEM T easy-CNOT2의 MluI-BglII 부위내에 클로닝하여 pGEM T easy-CNOT3을 제조하였다.
- [0160] (12) 인간 CPNE1(코핀 I) 프로모터(서열번호: 12)(NCBI 등록 번호: NM_152926; [Creutz et al., *J. Biol. Chem.* 273:1393, 1998])
- [0161] 인간 CPNE1(코핀 I) 프로모터(-300 ~ +489, +5612 ~ +5999)를 주형으로 HT1080 세포로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- CPNE1F1: ACGCGTCCATTAAATCCTCAAAAAACTTA (SEQ ID NO:42)
MluI
- CPNE1R1: GGATCCTTTACTGCAGTCCCCGTTATTAGCTC
BamHI (SEQ ID NO:43)
- CPNE1F2: AGATCTAGCTGTGAAGCTGAGCTTATGACT (SEQ ID NO:44)
BglII
- CPNE1R2: GGATCCCTGATAAAACAAGAGATGAATTCC (SEQ ID NO:45)
BamHI
- [0162]

- [0163] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1 μ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ μ l) 및 5 μ l의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50 μ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95 °C에서 1 분(변성), 55 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.
- [0164] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy내에 클로닝하여 pGEM T easy-CPNEF 및 CPNER을 각각 수득하였다. 뉴클레오티드 서열을 확인한 후, pGEM T easy-CPNEF의 MluI-BamHI 단편을 pGEM T easy-CPNER의 MluI-BglII 부위내에 클로닝하여 pGEM T easy-CPNE1을 제조하였다.
- [0165] (13) 인간 HYPO(가설 단백질) 프로모터(서열번호: 13)(NCBI 등록 번호: AF351613)
- [0166] 인간 HYPO(가설 단백질) 프로모터(-350 ~ +66)를 주형으로 HT1080 세포로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- HYPOF: ACGCGTTCTTTACACGTTGGTTATGGT (SEQ ID NO:46)
MluI
- HYPOR: GGATCCGGCTGCAACAGGCCAGGAAACCTTC (SEQ ID NO:47)
BamHI
- [0167]
- [0168] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1 μ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ μ l) 및 5 μ l의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50 μ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95 °C에서 1 분(변성), 55 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.
- [0169] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy내에 클로닝하여 pGEM T easy-HYPO를 수득하였다. 뉴클레오티드 서열 분석에 의해 확인하였다.
- [0170] (14) 인간 DKC1(선천성 이상각화증, 다이스케린) 프로모터(서열번호: 14)(NCBI 등록 번호: BC 009928; [Strausberg et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:16899, 2002])
- [0171] 인간 DKC1(선천성 이상각화증 1, 다이스케린) 프로모터(-473 ~ +91)를 주형으로 HT1080 세포로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- DKC1F:ACGCGTGCACACTACTCCTATTGGC (SEQ ID NO:48)
MluI
- DKC1R:GAATTCTGTTACCCCTGCACCGCGTGC (SEQ ID NO:49)
EcoRI
- [0172]
- [0173] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1 μ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ μ l) 및 5 μ l의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50 μ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95 °C에서 1 분(변성), 55 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.
- [0174] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy 내에 클로닝하여 pGEM T easy-DKC1을 수득하였다. 뉴클레오티드 서열분석에 의해 확인하였다.
- [0175] (15) 인간 VPS72(액포 단백질 부류 72) 프로모터(서열번호: 15)(NCBI 등록 번호: NM_005997; [Horikawa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208:999, 1995])
- [0176] 인간 VPS72(액포 단백질 부류 72) 프로모터(-466 ~ +43)를 주형으로 HT1080 세포로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- VPS72F: ACGCGTACAAAAATTAGTTGGGCAT (SEQ ID NO:50)
MluI
- VPS72R: GAATTCACCGCCTACCGAGACTGCG (SEQ ID NO:51)
EcoRI
- [0177]
- [0178] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1 μ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ μ l) 및 5 μ l의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50 μ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95 °C에서 1 분

(변성), 55 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.

[0179] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy 내에 클로닝하여 pGEM T easy-VPS72를 수득하였다. 뉴클레오티드 서열을 서열분석에 의해 확인하였다.

[0180] (16) 인간 ITGB4BP(인테그린 베타 4 결합 단백질) 프로모터(서열번호: 16)(NCBI 등록 번호: BC011845, NT_028392; [Strausberg *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:16899, 2002])

[0181] 인간 ITGB4NP(인테그린 베타 4 결합 단백질) 프로모터(-350 ~ +304)를 주형으로 HT1080 세포로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

ITGB4BPF: ACGCGTTCTGTCCCTCAAGG CACAGCT (SEQ ID NO:52)

MluI

ITGB4BPR: GTTTAAACGAGGCCTAGGGCGGCCGGAGGCGGGAGTTCAA

PmeI (SEQ ID NO:53)

[0182] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1 μl의 각각의 프라이머(10 피코몰/ μl) 및 5 μl의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50 μl를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95 °C에서 1 분(변성), 55 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.

[0184] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy 내에 클로닝하여 pGEM T easy-ITGB4BP를 수득하였다. 뉴클레오티드 서열을 서열분석에 의해 확인하였다.

[0185] (17) 인간 UQCRQ(유비퀴놀-사이토크롬 c 리덕타제, 복합체 IIII 서브유니트 VII) 프로모터(서열번호: 17)(NCBI 등록 번호: BC090048, NT_034772; [Strausberg *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:16899, 2002])

[0186] 인간 UQCRQ(유비퀴놀-사이토크롬 c 리덕타제, 복합체 IIII 서브유니트 VII) 프로모터(-350 ~ +217)를 주형으로 HT1080 세포로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

UQCRRQF: ACGCGTGTCACCTTTGTTCCCTCCC (SEQ ID NO:54)

MluI

UQCRRQR: GTTTAAACTGTGGCGGCCCTGCAGG (SEQ ID NO:55)

PmeI

[0188] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1 μl의 각각의 프라이머(10 피코몰/ μl) 및 5 μl의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50 μl를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95 °C에서 1 분(변성), 55 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.

[0189] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy 내에 클로닝하여 pGEM T easy-UQCRQ를 수득하였다. 뉴클레오티드 서열을 서열분석에 의해 확인하였다.

0190] 실시예 2

[0191] 본 실시예에서는, 발현 벡터에서 강화 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescence protein, eGFP) 유전자 발현에 대한 실시예 1에서 제조된 프로모터의 효과를 비교하였다.

0192] 1. eGFP 발현 벡터의 제작

[0193] 먼저, PCR에 의해 pAxCAwt(타카라 바이오, 일본)로부터 토끼의 베타-글로빈 폴리A 서열을 수득하였다. PCR에 사용된 프라이머의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

RGpA F: GGATCCTTTCCTCTGCCAAA (SEQ ID NO:56)
 BamHI
 RGpA R: ACTAGTATAAGAGAAGAGGGACAGC (SEQ ID NO:57)
 SpeI

[0194]

[0195] 100 ng의 주형 pAxCAwt DNA($1 \mu l$), $1 \mu l$ 의 각각의 프라이머($10 \text{ 피코몰}/\mu l$) 및 $5 \mu l$ 의 dNTP(10 mM)를 함유하는 PCR 반응액 $50 \mu l$ 를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95°C 에서 1 분(변성), 55°C 에서 1 분(어닐링) 및 72°C 에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.

[0196] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy내에 클로닝하여 pGEM T easy-RGpA를 수득하였다. 뉴클레오티드 서열을 서열분석에 의해 확인하였다.

[0197] 이어서, pC-LND-GFP-n, pG-LND-GFP-n, pR-LND-GFP-n, pL-LND-GFP-n, pIT-LND-GFP-n 및 pU-LND-GFP-n(실시예 7에서 기술)으로부터의 MluI-BglII 단편을 pGEM T easy-RGpA의 MluI-BamHI 부위내에 클로닝하여 pC-GFP-RGpA, pG-GFP-RGpA, pR-GFP-RGpA, pL-GFP-RGpA, pIT-GFP-RGpA 및 pU-GFP-RGpA를 수득하였다. pS-GFP-RGpA를 제작하기 위해, pS-LND-GFP-n의 EcoRI-XbaI 단편을 평활하게 만든 후 pGEM T easy-RGpA의 평활화 BamHI 부위내에 클로닝하였다.

2. eGFP 발현 분석

[0199] eGFP 유전자를 함유하는 발현 벡터를 제조업자의 지시에 따라 FuGene6을 사용하여 293T 세포내에 형질감염시켰다. GFP 발현 수준을 유세포분석법(flow cytometry)으로 측정하였다. 유세포분석법은 다음과 같이 수행하였다: 형질감염 48 시간후에 293T 세포를 수확하고 0.1% 나트륨 아지드를 함유하는 포스페이트-완충 식염수(PBS)(FACS 완충액)로 1회 세척하였다. 이어서, 세포를 PBS에 재현탁하고, 셀퀘스트(CellQuest, 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson)) 데이터 획득 및 분석용 소프트웨어를 사용하여 FACSort(벡톤 디킨슨, 미국 캘리포니아주 로스엔젤레스)에 의해 분석하였다. 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

[0200]

GFP 발현 비교

| 프로모터 | 상대 평균 형광 강도 |
|---------|-------------|
| CMV | 100 |
| GAPDH | 102.5 |
| RPL10 | 81.9 |
| LENG8 | 66.6 |
| SNX3 | 36.4 |
| ITGB4BP | 76.4 |
| UQCRCQ | 47.1 |

[0201] 데이터는 HCMV 및 GAPDH 프로모터가 필적할만한 수준의 GFP 발현을 나타내었음을 보여준다. 다른 프로모터, 예를 들면, RPL10, LENG8 및 ITGB4BP도 또한 상당한 GFP 발현을 유도하여, 진핵세포 유전자 발현 시스템에서 프로모터로서 그의 사용 가능성을 나타내었다.

[0202]

실시예 3

[0203]

실시예 1에서 제조된 다양한 프로모터 중에서, RPL10 및 LENG8 프로모터를 선택하고, 유전자 발현에 필요한 프로모터 서열을 분석하기 위해 더 특성화하였다.

[0204]

1. 일련의 RPL10 프로모터의 제작

[0205]

(1) 일련의 RPL10 프로모터의 제작

[0206] 다양한 길이의 RPL10 프로모터를 PCR에 의해 제조하였다. 주형으로 HT1080의 게놈 DNA를 사용하여 RPL 프로모터를 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머 쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

| | |
|------------|--|
| RPL F50: | <u>ACGCGTACCGCGCGCAGACAGACCGCCTATATAAGCCAT</u> |
| | MluI (SEQ ID NO:58) |
| RPL F100: | <u>ACGCGTTGACGTCTGACAGAGCGTCCACCCGTCTTCG</u> |
| | MluI (SEQ ID NO:59) |
| RPL F200: | <u>ACGCGTCTGGCCGCCCGCGGCCCTGGTACCCGGTCACC</u> |
| | MluI (SEQ ID NO:60) |
| RPL F500: | <u>ACGCGTGTCTCCCCCTCCGGCCTCCGGGTTGACAAAGG</u> |
| | MluI (SEQ ID NO:61) |
| RPL F1000: | <u>ACGCGTGTGCGCTCGAGCAGGATTCCCTCCCGTCCTTCC</u> |
| | MluI (SEQ ID NO:62) |
| RPLR: | <u>GGATCCGGCGACACCAGGATTTCAAGTGGCT</u> (SEQ ID NO: 31) |
| | BamHI |
| RPL R TSS: | <u>GGATCCCGCCTCCGCCTGCGCATGGCTTATATA</u> |
| | BamHI (SEQ ID NO:63) |

[0207]

[0208] 1 μg의 주형 게놈 DNA, 1 μl의 각각의 프라이머(10 피코몰/ μl) 및 5 μl의 dNTP(10 mM)를 함유하는 PCR 반응액 50 μl를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95 °C에서 1 분(변성), 60 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.

[0209]

RPL 프로모터(-350 ~ +143)(서열번호: 8의 뉴클레오티드 651 내지 1143)를 실시예 1(8)에서 기술하였다.

[0210]

RPL50 프로모터(-50 ~ +143)(서열번호: 8의 뉴클레오티드 951 내지 1143)를 프라이머쌍 RPL F50 및 RPLR을 사용하여 증폭시키고 pGEM T easy에 클로닝시켜 pGem T easy-pRPL50을 수득하였다.

[0211]

RPL100 프로모터(-100 ~ +143)(서열번호: 8의 뉴클레오티드 901 내지 1143)를 프라이머쌍 RPL F100 및 RPLR을 사용하여 증폭시키고 pGEM T easy에 클로닝시켜 pGem T easy-pRPL100을 수득하였다.

[0212]

RPL200 프로모터(-200 ~ +143)(서열번호: 8의 뉴클레오티드 801 내지 1143)를 프라이머쌍 RPL F200 및 RPLR을 사용하여 증폭시키고 pGEM T easy에 클로닝시켜 pGem T easy-pRPL200을 수득하였다.

[0213]

RPL500 프로모터(-500 ~ +143)(서열번호: 8의 뉴클레오티드 501 내지 1143)를 프라이머쌍 RPL F500 및 RPLR을 사용하여 증폭시키고 pGEM T easy에 클로닝시켜 pGem T easy-pRPL500을 수득하였다.

[0214]

RPL1000 프로모터(-1000 ~ +143)(서열번호: 8의 뉴클레오티드 1 내지 1143)를 프라이머쌍 RPL F1000 및 RPLR을 사용하여 증폭시키고 pGEM T easy에 클로닝시켜 pGem T easy-pRPL1000을 수득하였다.

[0215]

RPL TSS 프로모터(-350 ~ -1)(서열번호: 8의 뉴클레오티드 651 내지 1000)를 프라이머쌍 RPL F 및 RPL R TSS를 사용하여 증폭시키고 pGEM T easy에 클로닝시켜 pGem T easy-pRPL TSS를 수득하였다.

[0216]

뉴클레오티드 서열은 서열분석에 의해 확인하였다.

[0217] (2) RPL 프로모터를 함유하는 일련의 eGFP 밸현 벡터의 제작

[0218]

pGem T easy-GFP(실시예 4에서 기술)로부터의 BamHI 단편을 pGem T easyRGpA(실시예 2에서 기술)의 BamHI 부위 내에 삽입하여 pGem T easy-GFP-RGpA를 제작하였다. 이어서, pGem T easy-pRPL 프로모터의 MluI-BamHI 단편을 pGem T easy-GFP-RGpA의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pRPL-, pRPL50-, pRPL100-, pRPL200-, pRPL500-, pRPL1000- 및 pRPL TSS-GFP-RGpA를 수득하였다.

[0219]

2. 일련의 LENG8 프로모터의 제작

[0220]

(1) 일련의 LENG8 프로모터의 제작

[0221]

실시예 1(9)에서 기술한 바와 같이, 2개의 단편(LENG1 및 LENG2)을 연결시켜 LENG8 프로모터를 제조하였다. 다양한 길이의 LENG8 프로모터를 제조하기 위해, 일련의 LENG1 단편들을 PCR로 수득하였다. 이어서, LENG1 단편을 실시예 1(9)에서 기술한 LENG2 단편에 연결시켜 최종 LENG 프로모터를 생성하였다. 주형으로 HT1080의 게놈

DNA를 사용하였다. PCR에 사용된 프라이머 쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

LENG F50: ACGCGTGTGACGTCAGGACGCCGCGGTCAGG (SEQ ID NO:64)

Mlu I

LENG F100: ACGCGTGGCGTCATTGGCTGTGCAGGGCC (SEQ ID NO:65)

Mlu I

LENG F200: ACGCGTTGTCCCCCTGGGGCCACCGTCCCC (SEQ ID NO:66)

Mlu I

LENG F1000: ACGCGTTGTATCAGAGTCCTGGACGGAAAC (SEQ ID NO:67)

Mlu I

LENG8R1: GTTTAAACAAAGTAGAAGACGACGGCGACGCG (SEQ ID NO:33)

Pme I

LENG R TSS: GTTTAACCTCTGGTCTTCTTGCTTCGACGT (SEQ ID NO:68)

Pme

주형 거

용액 50 μ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 94 °C에서 1 분(변성), 55 °C에서 1 분(어닐링) 및 72 °C에서 2 분(중합)동안 수행되었다.

하여 증폭시키고 pGEM T easy에 클로닝시켜 pGem T easy-pL50을 수득하였다.

L100 한정(100~1000) 주문번호: 921 유알데오리아 920 까지 1020)을 드리고, 상기 LEND P100 및 LENDER1을 이용하여 증폭시키고 pGEM T easy에 클로닝시켜 pGEM T easy-pL100을 수득하였다.

L200 단원(-200 ~ +505) 시설번호: 9의 뉴클레오티드 820 대시 1325)를 브나하여 정 LENG F200 및 LENGRT를 사용하여 증폭시키고 pGEM T easy에 클로닝시켜 pGem T easy-pL200을 수득하였다.

L1000 단편(-1020 ~ +305)(서열번호: 9의 뉴클레오티드 1 내지 1325)를 프라이머상 LENG F1000 및 LENG8R1을 사용하여 증폭시키고 pGEM T easy에 클로닝시켜 pGem T easy-pL1000을 수득하였다.

이어서, pGEM T easy-pL50, -pL100, -pL200 및 -pL1000의 MluI-PmeI 단편을 실시예 1(9)에서 기술한 pGEM T easy-LENG2의 MluI-PmeI 부위내에 클로닝하여 pGEM T easy-pLENG50P, -pLENG100P, -pLENG200P 및 -pLENG1000P를 생성하였다.

LENG TSS 프로모터(-385 ~ -1)(서열번호: 9의 뉴클레오티드 635 내지 1019)를 프라이머쌍 LENG F 및 LENG R TSS를 사용하여 증폭시키고 pGEM T easy에 클로닝하여 pGem T easy-pLENG TSS를 생성하였다.

LENG8 프로모터(-385 ~ +305, +1908 ~ +2121)(서열번호: 9의 뉴클레오티드 635 내지 1538)는 실시예 1(9)에서 기술하였다.

(2) L-ENG 표준터를 활용하는 이력의 GFP 박혀 베터이 제작

eGFP 유전자를 함유하는 발현 벡터를 제작하기 위해, pGem T easy-pLENG 프로모터의 MluI-EcoRI 단편(평활화된 EcoRI 부위)을 pGem T easy-GFP-RGpA의 MluI-BamHI 부위(평활화된 BamHI 부위)에 클로닝하여 pLENG-, pLENG50-, pLENG100-, pLENG200- 및 pLENG1000-GFP-RGpA를 수득하였다. pGem T easy-pLENG TSS의 MluI-PmeI 단편을 pGem T easy-GFP-RGpA의 MluI-BamHI 부위(평활화된 BamHI 부위)내에 클로닝하여 pLENG TSS-GFP-RGpA를 생성하였다.

3. eGFP 발현의 분석

293T 세포를 제조업자의 지시에 따라 FuGene6(로슈, 독일)을 사용하여 eGFP 발현 벡터로 형질감염시키고 48 시간동안 배양하였다. GFP 발현 수준은 유세포분석법으로 측정하였다. 유세포분석은 다음과 같이 수행하였다: 형질감염 48시간후에, 293 T 세포를 수확하고 0.1% 나트륨 아지드를 함유하는 PBS로 1회 세척하였다. 이어서, 세포를 PBS에 재현탁시키고, 셀퀘스트 데이터 획득 및 분석용 소프트웨어를 사용하여 FACSsort로 분석하였다. 결과는 표 2에 나타내었다.

표 2

eGFP 발현의 비교

A. RPL10 프로모터

| | 상대 평균 형광 강도 |
|-------------|-------------|
| RPL-GFP | 100 |
| RPL50-GFP | 20 |
| RPL100-GFP | 40 |
| RPL200-GFP | 70 |
| RPL500-GFP | 150 |
| RPL1000-GFP | 210 |
| RPL TSS-GFP | 20 |

B. LENG8 프로모터

| | 상대 평균 형광 강도 |
|--------------|-------------|
| LENG-GFP | 100 |
| LENG50-GFP | 14 |
| LENG100-GFP | 42 |
| LENG200-GFP | 87 |
| LENG1000-GFP | 170 |
| LENG TSS-GFP | 39 |

[0235]

[0236] 최단 프로모터 RPL50 또는 LENG50은 배경보다 상당히 높은 GFP 발현을 유도할 수 있어서, 전사 개시 부위의 50 bp 상류의 존재가 기본 활성에 충분함을 보여준다. 그러나, eGFP 발현율은, RPL10 및 LENG8 프로모터 둘 다에 대한 유전자 발현에 더 긴 프로모터를 사용하였을 때 더 높았다. 최장 RPL10 프로모터, RPL1000은 RPL500 또는 다른 것들보다 높은 eGFP 발현 수준을 유도할 수 있었다. 최장 LENG8 프로모터인 LENG1000도 또한 다양한 LENG 프로모터중에서 최고의 프로모터 활성을 나타내었다. 또한, 프로모터 활성을 전사 개시 부위(TSS)와 번역 개시 부위 사이에 요소가 포함된 경우에 더 우수하였다.

[0237]

실시예 4

[0238] 본 실시예에서는, 내부 프로모터를 레트로바이러스 벡터내에 클로닝하고, eGFP 유전자 발현의 바이러스 역가 및 수준에 대한 그의 효과를 비교하였다.

[0239]

1. eGFP 발현 레트로바이러스 벡터의 제작

[0240]

(1) 레트로바이러스 벡터의 제작

[0241]

1-1) I-D

[0242]

U3의 결실된 레트로바이러스 플라스미드를 제작하였다. 먼저, MLV의 정상적 3'LTR을 주형으로 pMT([Hong et al., *J. Gene Med.* 6:724, 2004]; 미국 특히 제 6,451,595 호)를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머 쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

SCV3LB: GGATCCCTCGAGCGATAAAATAAAAGATTTATTTAGTCTCC
BamHI Xhol (SEQ ID NO:69)

SCV3LRI: GAATTCTCGACTGAAAGACCCCCGCTGACGG (SEQ ID NO:70)
EcoRI SalI

[0243]

증폭된 단편은 초기에 pGEM T easy에 클로닝하여 pGEM T easy-3'LTR을 수득하였다.

- [0245] 3'LTR의 결실된 형태는 주형으로 pMT를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- 3'LTR-1: GCTAGCCCTGTGCCTTATTTGAA (SEQ ID NO:71)
NheI
SCV3LRI: GAATTCTCGACTGAAAGACCCCCGCTGACGG (SEQ ID NO:70)
- [0246] EcoRI Sall
- [0247] 증폭된 단편은 초기에 pGEM T easy에 클로닝하여 pGEM T easy-3'dLTR-1을 수득하였다. NheI-Sall 단편을 pGEM T easy-3'LTR의 NheI-Sall 부위에 클로닝하여 pPreSIN2를 수득하였다. pPreSIN2로부터 BamHI-Sall 단편을 pMT의 BamHI-Sall 부위에 클로닝하여 I-D를 제조하였다.
- [0248] 1-2) I-ND
- [0249] 클로닝을 촉진하기 위해, 새로운 다클로닝 부위(MCS)를 레트로바이러스 플라스미드 I-D 내에 도입하였다. 새로운 MCS의 52 bp-길이의 단편을 주형없이 폴리머라제 반응에 의해 제조하였다. 다음의 프라이머쌍을 사용하였다:
- NEWMCSF: ACGCGTTAACCGCGGAATT~~CGG~~CACATCGTG
MluI SacII BamHI (SEQ ID NO:72)
- NEWMCSR: CTCGAGATCTAGGCC~~T~~CACGATGTGGATCCGAATTC
XhoI StuI DraIII EcoRI (SEQ ID NO:73)
- [0250] MluI, PmeI, SacII, EcoRI, BamHI, DraIII, StuI, BgIII 및 XhoI에 대한 제한효소 부위를 함유하는 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy에 클로닝하였다. 뉴클레오티드 서열을 확인한 후, MluI-XhoI 단편을 I-D의 MluI-XhoI 부위에 클로닝하여 I-ND를 수득하였다.
- [0252] (2) eGFP 유전자를 함유하는 레트로바이러스 벡터의 제작
- [0253] 2-1) eGFP 유전자
- [0254] eGFP 유전자를 발현하는 레트로바이러스 벡터를 제작하기 위해, 하기의 프라이머쌍을 사용하여 pIRES2-EGFP(클론테크 래버리토리, 미국 캘리포니아주 팔로 알토, Cat.#6029-1)로부터 eGFP 유전자를 증폭시켰다:
- eGFP5: ACGCGTGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG 3'
MluI BamHI (SEQ ID NO:74)
- eGFP3: CTCGAGAGATCTTACTTGACAGCTCGTC 3' (SEQ ID NO:75)
XhoI BgIII
- [0255] 증폭된 eGFP 서열을 pGEM T easy에 클로닝하여 pGEM T easy-eGFP를 생성하였다. BamHI-BgIII 단편을 레트로바이러스 벡터 pI-D의 BamHI 부위에 클로닝하여 pI-D-GFP를 수득하고, 레트로바이러스 벡터 I-ND의 BamHI 부위에 삽입하여 I-ND-GFP를 제조하였다.
- [0257] 2-2) eGFP 유전자를 함유하는 레트로바이러스 벡터의 제작
- [0258] pGEM T easy-eGFP의 BamHI-BgIII 단편을 야생형 LTR을 함유하는 레트로바이러스 벡터 pMT의 BamHI 부위에 삽입하여 pMT-GFP [Kim et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:1017, 2006]를 제작하였다.
- [0259] 결손 LTR을 갖는 레트로바이러스 벡터를 위해, 실시예 1의 다양한 내부 프로모터들을 각각 GFP 서열을 함유하는 레트로바이러스 벡터에 클로닝하였다.
- [0260] pCN 플라스미드로부터의 MluI-BamHI 단편, HCMV IE 프로모터를 pI-D-GFP의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pCD-GFP를 수득하였다. pGEM T Easy-MTU3으로부터의 MluI 단편을 pI-D-GFP의 MluI 부위에 삽입하여 pMD-GFP를 제조하였다. pGEM T Easy-Enh+UbC로부터의 MluI 단편을 pI-D-GFP의 MluI 부위에 삽입하여 pCU-D-GFP를 생성하였다.

[0261] pCN 플라스미드로부터의 MluI-BamHI 단편, HCMV IE 프로모터를 pI-ND-GFP의 MluI-BamHI 부위내에 클로닝하여 C-ND-GFP를 수득하였다. pAxCAwt(타카라 바이오, 일본 오츠)로부터 클레나우 단편 처리된 SalI-SwaI 단편을 pI-ND-GFP의 PmeI 부위에 클로닝하여 pCA-ND-GFP를 수득하였다. pGEM T easy-EF로부터의 MluI-BamHI 단편을 pI-ND-GFP의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pE-ND-GFP를 수득하였다. pGEM T easy-BA로부터의 MluI-BamHI 단편을 pI-ND-GFP의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pB-ND-GFP를 수득하였다. pGEM T easy-GAPDH로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-ND-GFP의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pG-ND-GFP를 수득하였다. pGEM T easy-RPL로부터의 MluI-BamHI 단편을 pI-ND-GFP의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pR-ND-GFP를 수득하였다. pGEM T easy-LENG8로부터의 MluI-EcoRI 단편을 pI-ND-GFP의 MluI-EcoRI 부위에 클로닝하여 pLe-ND-GFP를 수득하였다. pGEM T easy-SNX로부터의 EcoRI-BamHI 단편을 pI-ND-GFP의 EcoRI-BamHI 부위에 클로닝하여 pS-ND-GFP를 수득하였다. pGEM T easy-CNOT3으로부터의 MluI-BamHI 단편을 pI-ND-GFP의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pCo-ND-GFP를 수득하였다. pGEM T easy-CPNE1으로부터의 MluI-BamHI 단편을 pI-ND-GFP의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pCP-ND-GFP를 수득하였다. pGEM T easy-HYPO로부터의 MluI-BamHI 단편을 pI-ND-GFP의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pHY-ND-GFP를 수득하였다. pGEM T easy-DKC1으로부터의 MluI-EcoRI 단편을 pI-ND-GFP의 MluI-EcoRI 부위에 클로닝하여 pD-ND-GFP를 수득하였다. pGEM T easy-VPS72로부터의 MluI-EcoRI 단편을 pI-ND-GFP의 MluI-EcoRI 부위에 클로닝하여 pV-ND-GFP를 수득하였다. pGEM T easy-ITGB4BP로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-ND-GFP의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pIT-ND-GFP를 수득하였다. pGEM T easy-UQCRR로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-ND-GFP의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pU-ND-GFP를 수득하였다.

2. eGFP 발현의 분석

[0263] 293T 세포를 양친화성 패키징 구조물, pVM-GP 및 pVM-AE[Yu et al., *Gene Ther.* 10:706, 2003]와 함께, eGFP 유전자를 함유하는 각각의 레트로바이러스 벡터로 형질감염시키고 48 시간동안 배양하였다. 배양 상등액을 $0.45 \mu\text{m}$ 여과지를 통해 여과시켜 무세포 바이러스액을 제조하고, 2×10^5 HT1080 및 K562 세포를 각각 형질도입하기 위해 사용하였다. 세포를 48 시간동안 배양하고 분석을 위해 수확하였다. GFP 양성 세포의 비율 및 GFP 발현 수준(평균 형광 강도)을 FACS 분석으로 측정하였다(표 3 및 4 참조).

[0264] FACS 분석을 다음과 같이 수행하였다: 형질감염 48 시간후에, HT1080 및 K562 세포를 수확하고 0.1% 나트륨 아지드를 함유하는 포스페이트-완충 식염수(PBS)(FACS 완충액)로 1회 세척하였다. 이어서, 세포를 PBS에 재현탁시키고, 셀퀘스트(베톤 디킨슨) 데이터 획득 및 분석용 소프트웨어를 사용하여 FACSsort(베톤 디킨슨, 미국 캘리포니아주 로스앤젤레스)로 분석하였다.

[0265] 먼저, 결손 LTR을 갖는 레트로바이러스 벡터로부터의 GFP 발현을 야생형 LTR을 함유하는 레트로바이러스 벡터 MT-GFP로부터의 발현과 비교하였다. 표 3에 나타낸 바와 같이, C-D-GFP 벡터 뿐 아니라 MT-GFP도 수행하였다. C-D-GFP로부터의 GFP 양성 세포의 비율은 HT1080 세포에서 더 높았으며, MT-GFP 벡터로부터 유도된 것과 비교하여 K562 세포에서는 80% 이상이었다. C-D-GFP 벡터로부터 유도된 GFP 발현 수준은 HT1080 세포에서 더 높았으며, MT-GFP 벡터로부터 유도된 것과 비교하여 K562 세포에서는 약 70%이었다. 상기 실험들로부터, HCMV 프로모터가 GFP 발현에 우수한 성능을 나타냄을 확인하였다. 그러나, HCMV 프로모터만큼 작용하는 다른 프로모터는 찾을 수 없었다. CMV/유비퀴틴 하이브리드 프로모터도 또한 HCMV 프로모터보다는 낮지만, 높은 바이러스 역가 및 높은 GFP 발현 수준을 제공하였다.

표 3

GFP 발현율 비교

| | HT1080 | | K562 | |
|----------|--------------------------|------------|--------------------------|------------|
| | GFP ⁺ 세포의 상대% | 상대 평균 형광강도 | GFP ⁺ 세포의 상대% | 상대 평균 형광강도 |
| MT-GFP | 100 | 100 | 100 | 100 |
| C-D-GFP | 110.2 | 243.3 | 81.4 | 67.2 |
| M-D-GFP | 29.6 | 54.4 | 21.7 | 19.9 |
| CU-D-GFP | 68.2 | 59.4 | 46.6 | 56.1 |

[0266]

[0267] 다음 단계로, HCMV 프로모터 이외의 다른 다양한 내부 프로모터를 함유하는 더 많은 레트로바이러스 백터를 시험하였다. 결과는 표 4에 나타내었다.

표 4

GFP 발현율 비교

| | HT1080 | | K562 | |
|-----------|--------------------------|------------|--------------------------|------------|
| | GFP ⁺ 세포의 상대% | 상대 평균 형광강도 | GFP ⁺ 세포의 상대% | 상대 평균 형광강도 |
| C-ND-GFP | 100 | 100 | 100 | 100 |
| CA-ND-GFP | 7.9 | 37.1 | 3.9 | 94.5 |
| E-ND-GFP | 28.4 | 21.0 | 19.2 | 157.1 |
| B-ND-GFP | 15.3 | 1.3 | 1.5 | 10.4 |
| G-ND-GFP | 84.1 | 9.8 | 68.9 | 51.6 |
| R-ND-GFP | 109.7 | 9.1 | 107.4 | 42.6 |
| L-ND-GFP | 112.2 | 6.1 | 124.4 | 33.3 |
| S-ND-GFP | 83.8 | 2.1 | 57.1 | 12.5 |
| CN-ND-GFP | 52.5 | 1.9 | 31.4 | 11.7 |
| CP-ND-GFP | 48.2 | 1.4 | 40.1 | 12.2 |
| HY-ND-GFP | 19.7 | 6.5 | 14.9 | 44.3 |
| D-ND-GFP | 42.2 | 1.7 | 44.7 | 17.0 |
| V-ND-GFP | 17.5 | 1.2 | 18.0 | 12.4 |
| IT-ND-GFP | 96.0 | 3.0 | 79.5 | 18.1 |
| U-ND-GFP | 89.7 | 2.6 | 82.9 | 17.7 |

[0268]

표 4에 나타낸 바와 같이, HCMV 프로모터는 HT1080 및 K562 세포 모두에서 최고 수준의 유전자 발현(평균 형광 강도 참조) 및 많은 수의 GFP 양성 세포를 나타내었다. 그러나, LENG8 및 RPL10 프로모터가 HT1080 및 K562 세포 모두에서 최고의 바이러스 역가(형질도입 세포의 비율)를 제공하였다. 상기 두 프로모터로부터 유도된 GFP 발현 수준은 HT1080 세포에서 비교적 낮았지만, K562 세포에서 HCMV 프로모터와 비교하여 30% 이상이었다. 그러므로, LENG8 및 RPL10 프로모터는 일부 세포 유형에서 레트로바이러스 백터 시스템에서의 유전자 발현에 사용될 수 있다. 또한, GAPDH, UQCRQ, ITGB4BP 및 SNX3 프로모터는 비교적 높은 바이러스 역가(CMV 프로모터의 80% 이상)를 제공하였다.

[0270]

CA-ND-GFP 및 E-ND-GFP 백터는 K562 세포에서 최고 수준의 GFP 발현을 제공하였으나, 이를 백터로부터의 바이러스 역가는 매우 낮아서 이를 백터의 사용을 어렵게 만들었다.

[0271]

실시예 5

[0272]

본 실시예에서는, 바이러스 역가 및 gp91 유전자 발현 수준에 대한 내부 프로모터의 효과를 비교하였다.

[0273]

1. gp91 발현 레트로바이러스 백터의 제작

[0274]

(1) gp91-phox 유전자(NCBI 등록번호: NM_000397)

[0275]

인간 gp91-phox를 발현하는 레트로바이러스 백터를 제작하기 위해, gp91 cDNA를 인간 말초혈 림프구의 전체 RNA로부터 RT-PCR에 의해 클로닝하였다. 이 단계에서 사용된 프라이머의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

GP91F: GGATCCATGGGAACTGGGCTGTGAAT (SEQ ID NO:76)

BamHI

GP91R: GGATCCCTCGAGTTAGAAGTTCCCTTGTGAAAA

BamHI XhoI (SEQ ID NO:77)

[0276]

[0277] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy에 클로닝하여 pGEM T easy-gp91을 생성하고 그 뉴클레오티드 서열을 확인하였다.

[0278]

(2) p프로모터-ND

[0279]

pCN 플라스미드로부터의 MluI-BamHI 단편, HCMV IE 프로모터를 pI-ND의 MluI-BamHI 부위내에 클로닝하여 pC-ND를 수득하였다. pGEM T easy-GAPDH로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-ND의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pG-ND를 수득하였다. pGEM T easy-RPL로부터의 MluI-BamHI 단편을 pI-ND의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pR-ND를 수득하였다. pGEM T easy-LENG8로부터의 MluI-EcoRI 단편을 pI-ND의 MluI-EcoRI 부위에 클로닝하여 pL-ND를 수득하였다. pGEM T easy-SNX로부터의 EcoRI-BamHI 단편을 pI-ND의 EcoRI-BamHI 부위에 클로닝하여 pS-ND를 수득하였다. pGEM T easy-ITGB4BP로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-ND의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pIT-ND를 수득하였다.

[0280]

(3) gp91 발현 레트로바이러스 벡터의 제작

[0281]

pGEM T easy-gp91의 BamHI 단편을 pMT에 삽입하여 MT-gp91 벡터를 제작하였다.

[0282]

pGEM T easy-gp91로부터의 BamHI-XhoI 단편을 pC-ND, pG-ND, pR-ND, pL-ND, pS-ND 및 pIT-ND의 BamHI-XhoI 부위내에 삽입하여 pC-ND-gp91, pG-ND-gp91, pR-ND-gp91, pL-ND-gp91, pS-ND-gp91 및 pIT-ND-gp91을 각각 수득함으로써, 내부 프로모터에 의해 gp91-phox 발현이 유도되는 레트로바이러스 벡터를 제작하였다.

[0283]

레트로바이러스 벡터 pR-LND-gp91-phox-n, pR1000-LND-gp91-n 및 pR1000-LND-gp91-pA-n-rev의 제작 과정은 실시예 7(3)에 기술되어 있다.

[0284]

2. gp91 발현의 분석

[0285]

인산칼슘 침전 방법에 의해, 패키징 구조물, pVM-GP 및 pVM-GeR[Kim et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:1017, 2006]과 함께, gp91 유전자를 함유하는 각각의 레트로바이러스 벡터로 293T 세포를 형질감염시키고 48 시간동안 배양하였다. 배양 상등액을 0.45 μm 여과지를 통해 여과시켜 무세포 바이러스액을 제조하고, K562 세포의 형질도입에 사용하였다.

[0286]

K562 세포의 형질도입을 위해, 형질도입 전날 6 웰 플레이트에 웰당 2.5×10^5 세포를 접종하였다. 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 폴리브렌의 존재하에 웰 당 동일 부피의 바이러스 상등액을 가하고, 플레이트를 32 °C에서 2800 rpm으로 90 분간 원심분리(에펜도르프(Eppendorf) 원심분리기 5810R)하였다. 형질도입후, 37 °C CO₂ 배양기에서 세포를 2 일 동안 배양하였다.

[0287]

gp91 단백질 발현은 유세포분석으로 분석하였다. K562 또는 PLB-985/gp91^{-/-} 세포를 형질도입한지 2일후에 수화하고 PBS로 세척하였다. 이어서, 세포를 100 μl PBS에 재현탁하고, 4 °C에서 1 μl 의 항-gp91 항체(7D5; MBL, 일본)로 30 분간 염색하였다. 이어서, 세포를 PBS로 2회 세척하고, 100 μl 의 PBS에 재현탁하고, 4 °C에서 양으로부터 수득된 FITC-결합 항-마우스 항체(서던 바이오테크놀로지 어쇼시에이츠 인코포레이티드(Southern Biotechnology Associates, Inc.), 미국 앤라배마주 버밍햄) 1 μl 로 30 분간 염색하였다. 이어서, 세포를 PBS로 3회 세척하고 500 μl 의 PBS에 현탁하였다. 셀웨스트(BD) 데이터 획득 및 분석용 소프트웨어를 이용하여 FACSsort(BD, 캘리포니아주 산호세)에 의해 유세포분석을 수행하였다.

[0288]

먼저, 레트로바이러스 벡터 MT-gp91, C-ND-gp91, G-ND-gp91, R-ND-gp91, L-ND-gp91, S-ND-gp91 및 IT-ND-gp91로부터의 gp91 발현을 비교하였다. 결과는 표 5에 나타내었다. 다양한 U3-결실 레트로바이러스 벡터로부터, R-ND-gp91 및 S-ND-gp91은 다른 것들보다 높은 바이러스 역가(K562 세포에서 MT-gp91의 70% 이상)를 제공하였다. R-ND-gp91 벡터로부터 유도된 gp91의 발현 수준은 K562 세포에서 S-ND-gp91 벡터로부터 유도된 것보다

높았다. C-ND-eGFP가 높은 eGFP 발현 수준을 제공할 수 있지만, C-ND-gp91 백터는 gp91 양성 세포를 생성하지 않았다(표 4).

표 5

gp91 발현 비교

| | K562 | |
|------------|---------------------------|------------|
| | gp91 ⁺ 세포의 상대% | 상대 평균 형광강도 |
| MT-gp91 | 100 | 100 |
| C-ND-gp91 | 2.4 | 1.9 |
| G-ND-gp91 | 14.0 | 3.3 |
| R-ND-gp91 | 75.5 | 18.9 |
| L-ND-gp91 | 35.4 | 5.8 |
| S-ND-gp91 | 79.4 | 9.9 |
| IT-ND-gp91 | 47.4 | 5.5 |

[0289]

[0290] 실시예 3에서는 더 긴 형태의 RPL10 프로모터가 짧은 것보다 높은 수준의 GFP 유전자 발현을 유도할 수 있는 것으로 나타났다. 이것이 gp91 발현에도 적용되는지 여부를 시험하였다. 최장 RPL10 프로모터, RPL1000(pR1000-LND-gp91-n)을 함유하는 gp91 발현 레트로바이러스 백터를 제작하고, gp91 유전자 발현에 대한 효과를 확인하였다. 또한, RPL1000 프로모터 유도된 gp91 유전자 발현 카세트가 역방향으로 삽입된 레트로바이러스 백터 pR1000-LND-gp91-n-rev를 제작하고, gp91 유전자 발현을 비교하였다. 결과는 표 6에 나타내었다.

표 6

gp91 발현 비교

| | K562 | |
|----------------------|---------------------------|------------|
| | gp91 ⁺ 세포의 상대% | 상대 평균 형광강도 |
| R-LND-gp91-n | 100 | 100 |
| R1000-LND-gp91-n | 95.5 | 145.6 |
| R1000-LND-gp91-n-rev | 58.6 | 193.9 |

[0291]

[0292] R1000-LND-gp91-n 백터는 R-LND-gp91-n 백터와 비교하여 필적하는 수준의 바이러스 역가(gp91⁺ 세포의 %) 및 더 높은 수준의 gp91 유전자 발현(상대 평균 형광 강도)을 제공할 수 있었다. R1000-LND-gp91-n-rev 백터는 최고 수준의 gp91 유전자 발현을 유도할 수 있었지만, 그로부터 제공된 바이러스 역가는 R-LND-gp91-n의 절반이었다.

[0293]

실시예 6

[0294]

본 발명의 레트로바이러스 백터는 생체외(*ex vivo*) 유전자 전달에 사용될 수 있다.

[0295]

CD34⁺ 조혈모세포를 대상으로부터 수거하였다. CD34⁺ 세포의 공급원은 골수 흡출물 또는 가동화 말초혈일 수 있다. 수거된 CD34⁺ 세포를, 37 °C에서 5% CO₂(사전-자극)하에, 300 ng/ml의 인간 줄기 세포 인자(SCF), 300 ng/ml의 인간 FLT-3L, 100 ng/ml의 인간 트롬보포이에틴(TPO) 및 20 ng/ml의 인간 IL-3를 함유하는 무혈청 SCGM 배지(셀 그로(Cell Gro), 독일)중에 뷰라이프(Vuelife) 배양백(culture bag)에서 2 일간 배양하였다. 인간 피브로넥틴(레트로넥틴(Retronectin), 타카라 바이오)의 CH296 단편으로 미리 코팅된 뷰라이프 배양백을 이

용하여 형질도입을 수행하였다. 사전-차극된 세포를 레트로넥틴-코팅된 뷰라이프 배양백으로 옮기고, 레트로바이러스 상등액을 2 일간 3 번 가하였다. 이어서, 세포를 수확하고 식염수로 3회 세척하고 주입액(1% 인간 혈청 알부민을 함유하는 식염수)에 재현탁하고 대상에게 주입하였다.

[0296] 실시예 7

[0297] 본 실시예에서는, 패키징 세포주 PG13에서 바이러스 역가 및 유전자 발현 수준에 대한 내부 프로모터의 효과를 시험하였다.

[0298] 1. eGFP 발현 레트로바이러스 벡터의 제작

[0299] (1) 레트로바이러스 벡터의 제작

[0300] 1-1) pI-LND

[0301] U3-결실 레트로바이러스 벡터는 5' 및 3' LTR 모두가 형질도입 후 결손되기 때문에 첫 주기의 레트로바이러스 형질도입 후 가동화될 수 없다. 따라서, 레트로바이러스 패키징 세포를 플라스미드 DNA(plasmid DNA)로 형질감염시켜 레트로바이러스 패키징 세포의 계놈에 벡터의 안정한 삽입을 가능케함으로써 안정한 생산 세포주를 수득하였다. 벡터 DNA의 선형화는 모든 형질감염체가 그의 염색체에 적절한 DNA 배열을 함유하게 하는 데에 중요하다.

[0302] 선형화에 편리한 레트로바이러스 벡터를 제작하기 위해, 선형화를 위한 2개의 제한효소 부위를 레트로바이러스 플라스미드 pI-ND에 도입하였다. 단편 L1을 약 200 bp의 거리에서 5' LTR의 전방에 삽입하고, 다른 부위 L2를 3' LTR의 후방에 삽입함으로써 제한효소 부위중 하나를 도입하였다. 폴리머라제 반응을 수행하여 L1 단편을 주형없이 제조하였다. L2 단편은 주형으로 pUC18(프로메가, 미국 위스콘신주)을 사용하여 증폭시켰다. 프라이머의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

```
L1F: 5' GCTCTCCGCTCACGTGTGATCAATTAAATTTCGAA
      SapI       PmlI        BclI     SwaI      BstBI (SEQ ID NO:78)
L1R: 5' AGCGGAAGAGCTTCGAAATTAAATTGATCACACGTG
      SapI       BstBI        SwaI     BclI      PmlI (SEQ ID NO:79)
L2F: 5' AGGCCTGGTCACCGGCCATTATGGCCACGTGATCATTAAATTG
      StuI       BstEII       SfiI          BclI
AAGCATTATCAGGGTTA (SEQ ID NO:80)
L2R: 5' TATTCGCGCGTTCCGGTGATGAATATT (SEQ ID NO:81)
```

[0303] SspI

[0304] SapI, PmlI, BclI, SwaI, BstBI 및 SapI에 대한 제한효소 부위를 함유하는 증폭된 L1 단편을 초기에 pGEM T easy(프로메가, 미국 위스콘신주)에 클로닝하여 pGem T easy-L1을 수득하였다. 뉴클레오티드 서열을 확인한 후, pGem T easy-L1으로부터 방출된 SapI 단편을 pI-ND의 SapI 부위에 삽입하여 pI-L1ND를 수득하였다. StuI, BstEII, SfiI, PmlI, BclI, SwaI 및 SspI에 대한 제한효소 부위를 함유하는 증폭된 L2 단편을 초기에 pGEM T easy(프로메가, 미국 위스콘신주)에 클로닝하여 pGem T easy-L2를 수득하였다. 뉴클레오티드 서열을 확인한 후, pGem T easy-L2로부터 방출된 StuI-SspI 단편을 pI-L1ND의 SspI 부위에 클로닝하여 pI-LND를 수득하였다.

[0305] 1-2) pI-LND-n

[0306] 높은 바이러스 역가를 갖는 생산 세포주를 제작하기 위해, 레트로바이러스 벡터 DNA를 함유하는 형질감염체를 선택하는 것이 중요하다. 이를 위해 약물-내성 유전자를 흔히 사용한다. 그러나, 벡터 계놈 내부에 약물-내성 유전자를 갖는 것은 바람직하지 않은데, 그 이유는 내부에 포함되는 경우 상기 유전자가 생체내로 발현될 것이기 때문이다. 그러므로, 레트로바이러스 계놈의 외부에 약물-내성 유전자 카세트를 갖는 벡터 구조물을 제조하였다.

[0307] 먼저, 형질감염체 선별을 위해 네오마이신-내성 유전자를 사용하였다. 네오마이신-내성 유전자의 발현을 위해, 인간 β -액틴 프로모터 및 폴리아데닐화 서열을 세균성 Neo 암호화 서열에 연결시켰다.

- [0308] 인간 β -액틴 프로모터를 K562로부터의 개놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- BApF: 5' GTCGACATTAATGCCGGTGAGTGAGCGGCCGCGGGGCCAA
Sall PshBI (SEQ ID NO:82)
- BApR: 5' GGATCCGGTGGCGCGTCGCCGCTGGTTTT (SEQ ID NO:83)
BamHI
- [0309]
- [0310] 증폭된 단편을 pGEM T easy에 클로닝하여 pGEM T easy-pBA를 수득하였다.
- [0311] 세균성 Neo 암호화 유전자를 pcDNA 3.1(인비트로겐(Invitrogen), 미국 캘리포니아주)을 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- NeoF: 5' AGATCTATGGGATCGGCCATTGAACAA (SEQ ID NO:84)
BglII
- pAR: 5' CATATGTCATAATCAGCCATACCACATT (SEQ ID NO:85)
NdeI
- [0312]
- [0313] 증폭된 단편을 pGEM T easy에 클로닝하여 pGEM T easy-Neo를 수득하였다.
- [0314] 폴리아데닐화 신호 서열은 pTet-On(클론테크, 타카라 바이오, 일본)을 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- SVpAF: CTCGAGATGGGATCGGCCATTGAACAA (SEQ ID NO:86)
XhoI
- SVpAR: CATATGAGTAATCAGCCATACCACATT (SEQ ID NO:87)
NdeI
- [0315]
- [0316] 증폭된 단편을 pGEM T easy에 클로닝하여 pGEM T easy-pA를 수득하였다.
- [0317] 뉴클레오티드 서열을 확인한 후, pGEM T easy-pA로부터 수득된 XhoI-NdeI 단편을 pGEM T easy-Neo의 XhoI-NdeI 부위에 삽입하여 pGEM T easy-NeopA를 수득하였다. BglII-NdeI 단편을 pGEM T easy-pBA의 BamHI-NdeI 부위에 클로닝하여 pGEM T easy-pBA-Neo-pA를 수득하였다. MluI-EcoRI-클레나우-처리된 단편을 pI-LND의 SspI 부위에 클로닝하여 pI-LND-n을 수득하였다.
- [0318] (2) eGFP 유전자를 함유하는 레트로바이러스 백터의 제작
- [0319] 2-1) pI-LND-GFP-n
- [0320] pGEM T easy-eGFP(실시예 2에서 기술)로부터 수득된 BamHI-BglII 단편을 pI-LND-n의 BamHI 부위에 클로닝하여 pI-LND-GFP-n을 수득하였다.
- [0321] 2-2) eGFP 유전자를 함유하는 레트로바이러스 백터의 제작
- [0322] 실시예 1의 다양한 내부 프로모터를 GFP 서열을 함유하는 레트로바이러스 백터 각각에 클로닝하였다.
- [0323] pCN 플라스미드로부터의 MluI-BamHI 단편, HCMV IE 프로모터를 pI-LND-GFP-n의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pC-LND-GFP-n을 수득하였다. pGEM T easy-GAPDH로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-LND-GFP-n의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pG-LND-GFP-n을 수득하였다. pGEM T easy-RPL로부터의 MluI-BamHI 단편을 pI-LND-GFP-n의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pR-LND-GFP-n을 수득하였다. pGEM T easy-LENG8로부터의 MluI-EcoRI 단편을 pI-LND-GFP-n의 MluI-EcoRI 부위에 클로닝하여 pL-LND-GFP-n을 수득하였다. pGEM T easy-SNX로부터의 EcoRI-BamHI 단편을 pI-LND-GFP-n의 EcoRI-BamHI 부위에 클로닝하여 pS-LND-GFP-n을 수득하였다. pGEM T easy-ITGB4BP로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-LND-GFP-n의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pIT-LND-GFP-n을 수득하였다. pGEM T easy-UQCRQ로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-LND-GFP-n의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pU-LND-GFP-n을 수득하였다.

- [0324] (3) gp91-phox 유전자를 함유하는 레트로바이러스 벡터의 제작
- [0325] 3-1) p프로모터-LND
- [0326] 실시예 1의 다양한 내부 프로모터를 pI-LND에 클로닝하였다.
- [0327] pCN 플라스미드로부터의 MluI-BamHI 단편, HCMV IE 프로모터를 pI-LND의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pC-LND를 수득하였다. pGEM T easy-GAPDH로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-LND의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pG-LND를 수득하였다. pGEM T easy-RPL로부터의 MluI-BamHI 단편을 pI-LND의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pR-LND를 수득하였다. pGEM T easy-LENG8로부터의 MluI-EcoRI 단편을 pI-LND의 MluI-EcoRI 부위에 클로닝하여 pL-LND를 수득하였다. pGEM T easy-SNX로부터의 EcoRI-BamHI 단편을 pI-LND의 EcoRI-BamHI 부위에 클로닝하여 pS-LND를 수득하였다. pGEM T easy-ITGB4BP로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-LND의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pIT-LND를 수득하였다. pGEM T easy-UQCRQ로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-LND의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pU-LND를 수득하였다. pGEM T easy-pR1000으로부터의 MluI-BamHI 단편을 pI-LND의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pR1000-LND를 수득하였다.
- [0328] 3-2) p프로모터-LND-n
- [0329] pGEM T easy-pBA-Neo-pA로부터의 MluI-EcoRI-클레나우-처리된 단편을 pC-LND, pG-LND, pR-LND, pL-LND, pS-LND, pIT-LND, pU-LND 및 pR1000-LND의 SspI 부위에 클로닝하여 pC-LND-n, pG-LND-n, pR-LND-n, pL-LND-n, pS-LND-n, pIT-LND-n, pU-LND-n 및 pR1000-LND-n을 생성하였다.
- [0330] 3-3) gp91-phox 유전자를 함유하는 레트로바이러스 벡터의 제작
- [0331] pGEM T easy-gp91로부터의 BamHI 단편을 pC-LND-n, pG-LND-n, pR-LND-n, pL-LND-n, pS-LND-n, pIT-LND-n, pU-LND-n 및 pR1000-LND-n의 BamHI 부위에 클로닝하여 pC-LND-gp91-phox-n, pG-LND-gp91-phox-n, pR-LND-gp91-phox-n, pL-LND-gp91-phox-n, pS-LND-gp91-phox-n, pIT-LND-gp91-phox-n, pU-LND-gp91-phox-n 및 pR1000-LND-gp91-phox-n을 생성하였다.
- [0332] gp91 유전자 발현 카세트가 역방향으로 삽입되는 레트로바이러스 벡터도 또한 제작하였다. (i) pC-LND-gp91-n으로부터의 MluI-BamHI 단편을 pI-LND-n의 BamHI-StuI 부위에 삽입하여 pC-LND-n-rev를 생성하고, (ii) pGEM T easy-gp91의 BamHI 단편을 pC-LND-n-rev의 BamHI 부위에 클로닝하여 pC-LND-gp91-n-rev를 생성하고, 이어서 (iii) pGEM T easy-RGpA의 EcoRI 단편을 pC-LND-gp91-n-rev의 PmeI 부위에 삽입하여 pC-LND-gp91-pA-n-rev를 수득함으로써 pC-LND-gp91-pA-n-rev를 제작하였다. (i) pR1000-LND-gp91-n으로부터의 MluI-BamHI 단편을 pI-LND-n의 BamHI-StuI 부위에 삽입하여 pR1000-LND-n-rev를 생성하고, (ii) pGEM T easy-gp91의 BamHI 단편을 pR1000-LND-n-rev의 BamHI 부위에 클로닝하여 pR1000-LND-gp91-n-rev를 생성하고, 이어서 (iii) pGEM T easy-RGpA의 EcoRI 단편을 pR1000-LND-gp91-n-rev의 PmeI 부위에 삽입하여 pR1000-LND-gp91-pA-n-rev를 수득함으로써 pR1000-LND-gp91-pA-n-rev를 제작하였다.
- [0333] 대조군으로, MluI-EcoRI 단편을 pMT-gp91의 SapI 부위에 삽입하여 pMT-gp91-n을 제작하였다
- [0334] 2. 생산 세포주의 제작
- [0335] (1) 레트로바이러스 벡터의 선형화
- [0336] eGFP 또는 gp91을 함유하는 레트로바이러스 벡터를 선형화하기 위해, 10 µg의 레트로바이러스 플라스미드를 제한효소(SwaI)로 16 시간동안 처리하였다. 레트로바이러스 벡터를 함유하는 DNA 단편을 아가로스 겔로부터 전개시키고 침전시키고 30 µl의 종류수에 재현탁하였다. DNA 농도를 측정한 후, 전기천공에 사용하였다.
- [0337] (2) 전기천공
- [0338] PG13 세포주를 전기천공에 사용하였다. 7.5×10^5 세포를 0.5 ml 부피의 무혈청 DMEM 배지중에서 0.4-cm 큐벳(바이오-래드 래버리토리즈, 헤르큘레스, 캘리포니아주)에 가하고 전기천공하기 전에 5 분동안 10 µl(1 µg/µ

1)의 선형화 레트로바이러스 플라스미드와 함께 두었다. 200 V의 전압하에 진 펄서 엑셀(Gene Pulser Xcell, 등록상표)(바이오-래드)을 사용하여 전기천공을 20 msec동안 수행하였다. 전기천공 후에, 혼탁액을 10% 프리미엄 FBS를 함유한 DMEM 배지에 즉시 플레이팅하였다.

[0339] (3) 선별

[0340] 전기천공 후 G-418(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도)을 사용하여 네오마이신 내성에 대해 세포를 선별하였다. 10 일간 선별한 후, 플라스미드가 삽입된 세포를 수득하였다.

[0341] 3. eGFP 발현 분석

[0342] PG13 생산 세포주 5×10^6 세포를 10% 프리미엄 FBS를 함유한 DMEM 배지중에서 100 mm 접시상에 플레이팅하였다. 48 시간후에, 상등액을 회수하고 0.45 μm 필터를 통해 여과시켰다. 상기 상등액을 사용하여 실시간 PCR을 이용해 바이러스 역가를 측정하고 HT1080 및 K562 세포를 각각 형질도입시켰다. 세포를 48 시간 동안 배양하고 분석하기 위해 수확하였다. GFP 양성 세포의 비율 및 GFP 발현 수준(평균 형광 강도)을 FACS 분석으로 측정하였다.

[0343] 4. gp91 발현의 분석

[0344] PG13 생산 세포주의 5×10^6 세포를 10% 프리미엄 FBS를 함유한 DMEM 배지중에서 100 mm 접시상에 플레이팅하였다. 48 시간후에, 바이러스를 함유하는 상등액을 회수하고 0.45 μm 필터를 통해 여과시켰다. 상기 상등액을 사용하여 K562 세포를 형질도입시켰다.

[0345] K562 세포의 형질도입을 위해, 형질도입 전날 6 웨일 플레이트에 웨일당 2.5×10^5 세포를 접종하였다. 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 폴리브렌의 존재하에 웨일 당 동량의 바이러스 상등액을 가하고, 플레이트를 32 °C에서 2800 rpm으로 90 분간 원심분리(에펜도르프 원심분리기 5810R)하였다. 형질도입후, 37 °C CO₂ 배양기에서 세포를 2 일동안 배양하였다.

[0346] gp91 단백질 발현의 정량 분석을 위해, FACS를 수행하였다. K562 세포를 수확하고 PBS로 세척하였다. 이어서, 세포를 100 μl PBS에 재현탁하고, 4 °C에서 1 μl 의 항-gp91 항체(7D5)로 30 분간 염색하였다. 이어서, 세포를 PBS로 2회 세척하고, 100 μl 의 PBS에 재현탁하고, 4 °C에서 양으로부터 수득된 PE-결합 항-마우스 항체(서던 바이오테크놀로지 어쇼시에이츠 인코포레이티드, 미국 엘라베마주 버밍햄) 1 μl 로 30 분간 염색하였다. 이어서, 세포를 PBS로 3회 세척하고 500 μl 의 PBS에 혼탁하였다. 셀퀘스트 데이터 획득 및 분석용 소프트웨어를 이용하여 FACSort에 의해 유세포분석을 수행하였다. 결과는 도 4에 나타내었다. gp91 양성 세포의 비율 및 평균 형광 강도(팔호안의 값)를 도면에 나타내었다. 도 4에 나타낸 바와 같이, R1000 프로모터는 높은 수준의 gp91 유전자 발현을 유도할 수 있었다. 또한, R1000 프로모터는, 발현 카세트가 역방향으로 삽입된 경우 더 높은 바이러스 역가 및 더 높은 유전자 발현 수준을 제공할 수 있었다. 사실상, 역방향으로 R1000 프로모터를 함유하는 벡터로부터 제공된 바이러스 역가는 야생형 MLV LTR을 갖는 MT-gp91-n으로부터 얻은 값보다 더 높았다(gp91 양성 세포의 비율 참조).

[0347] 세포를 0.5% DMF(다이메틸폼아마이드, C₃H₇NO)로 처리하여 세포 분화를 유도한 후 다이하이드로로다민-123(DHR) 분석에 의해 NADPH 옥시다제 활성 수준을 측정하였다. 세포를 DMF의 존재하에 6 일동안 배양하고 분석을 위해 수확하였다. 수확된 세포를 포스페이트-완충 식염수(PBS)로 2회 세척하였다. 세포를 PBS로 혼탁시키고 1.8 μl DHR(분자 프로브(Molecular Probes), 미국, 29 mM)과 혼합하였다. 37 °C에서 5 분간 배양한 후, 세포를 10 μl 의 포르볼(phorbol) 미리스테이트 아세테이트(PMA, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 자극하였다. 이어서, 활성 식균 세포의 비율 및 그의 옥시다제 활성을 FACS 분석에 의해 측정하였다.

[0348] 본 발명을 상세히 기술하였지만, 당해 분야에 통상의 기술을 가진 자라면 본 발명의 범위 또는 그의 임의의 태양에 영향을 미치지 않고 광범위하고 동등한 범위의 조건, 제형 및 기타 파라미터 내에서 동일하게 수행할 수 있음을 인지할 것이다. 본원에 인용된 모든 특허, 특히 출원 및 출판물은 본원에 그대로 참고로 인용된다.

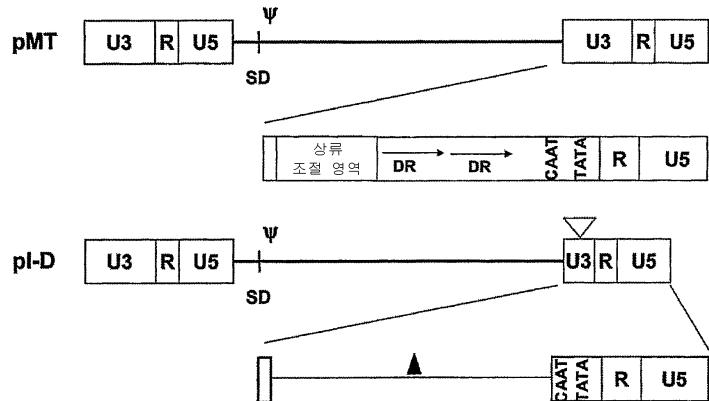
도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 인핸서-결실 U3 레트로바이러스 벡터 pMT 및 pI-D의 도면이다.
- [0023] 도 2는 인핸서-결실 U3 레트로바이러스 벡터 pI-ND의 도면이다.
- [0024] 도 3은 인핸서-결실 U3 레트로바이러스 벡터 pI-LND-n의 도면이다.
- [0025] 도 4는 표시된 프로모터를 포함하는 인핸서-결실 U3 레트로바이러스 벡터의 이종 유전자 발현(gp91) 수준을 나타낸 것이다. 대조군은 MT-gp91-n 벡터이다.
- [0026] 도 5는 GAPDH에 대한 프로모터 서열(서열번호: 7)을 나타낸 것이다.
- [0027] 도 6은 RPL10에 대한 프로모터 서열(서열번호: 8)을 나타낸 것이다.
- [0028] 도 7은 LENG8에 대한 프로모터 서열(서열번호: 9)을 나타낸 것이다.
- [0029] 도 8은 SNX3에 대한 프로모터 서열(서열번호: 10)을 나타낸 것이다.
- [0030] 도 9는 ITGB4BP에 대한 프로모터 서열(서열번호: 16)을 나타낸 것이다.
- [0031] 도 10은 UQCRQ에 대한 프로모터 서열(서열번호: 17)을 나타낸 것이다.

도면

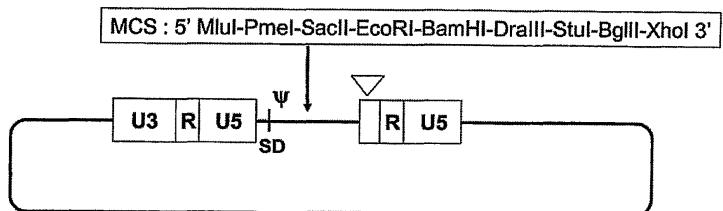
도면1

U3 불활성화 레트로바이러스 벡터



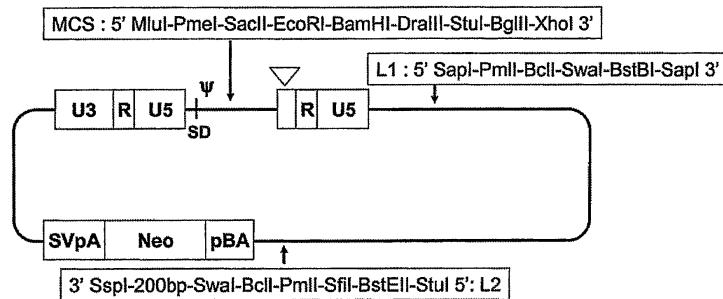
도면2

P1-ND



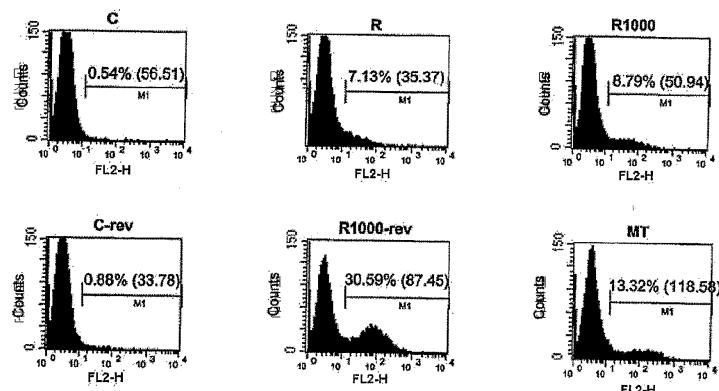
도면3

pL-LND-n



도면4

gp 91 발현



도면5

GAPDH 프로모터

TTCATCCAAGCGTGTAAGGGTCCCCGTCCCTGACTCCCTAGTGTCTGCCTGCCACAGTC
CAGTCCTGGAACCCAGCACCGATCACCTCCATCGGCCAATCTCAGTCCTTCCCCCT
ACGTGGGGCCCACACGCTGGTGGTCCCAGTGAACCAGGGCTGGAAAAAA
AAAAGCGGGAGAAAGTAGGGCCCGGCTACTAGCGGTTTACGGGCGCACGTAGCTCA
GGCTCAAGACCTGGGCGGGACTGGCTAGGCCIGGCGGGAGGCGGGTCCGACTCA
CCGCTGCCGCCCCCGGTTCTATAAAATTGACCCCGCAGCCTCCGCTCGCTCT
BRE TATA box +1
CTGCTCCCTGTCGACAGTCAGCCCATCTCTTTCGTCGCCAGGTGAAGACGGGC
GGAGAGAAACCCGGGAGCTAGGACGGCTGAAGGGCGCAAGGGCGGGCGCAGGC
CGGAATGTCTTCGGCGCTGGGGTGGGCCGGGCTCCGCATTGCAGGGCG
GGGGAGGACGTGATCCGGCGGGCTGGCATGGAGGGCTGGTGGGGAGGGAGGG
GAGGGCTGTGTGCGGCCCCGGCCACTAGGGCTCACATGTTCTCTCCCTCGGGCAGCC
GAGCCACATCGCTCAGACACC

도면6

RPL 10 프로모터

GTGCCCTCGACCAAGGATTCCCTCCCGTCTTCCTGTCAAAGGACGGAAAGACTTTGTTA
 CCCCACCGGCCCCACCTGCAGAATGGTGGACAGATACTCCAGATGCCACTTCCCCC
 AGGACGCCCGCTGCTCTGCCACCCTCCCCGGATGCCCTGGGGTGGGGGGTGGGG
 CGGCCCTGCTTCCCCACGACCCCCAGACGCACCCGGAGGGACTC
 TTGAGCACAGTGGAGTGGGAAGGGCGAGCTGGGGGGTGGCCAGGGAGAGCGGCTC
 ATGGGAGGGGGCGCCCGAGACGCAGCTCTCGGGACGGTGGGGTCAAGGGTGGGG
 AGCGGGGCTAGAGATGCCCGGGTTCCAAGCCATGAGTCCTCGTGAGAGATTCTCC
 TCGACCTCTCCCCGCCAATGTGCGAACCCCTGGGTCTCCAGGAACCGGGATAACGG
 GGCATGGCTCCAGCAAGGCCTGGTCCAGCCCTCCGGTAGGGGAATGGGTCTCCCCCT
 CCGGCTCCCGGGTTGACAAAGGAACGGGGCCAGATCCCGTATGGCGCTCACCG
 CCGGGGCTCTAGCCTAGAAGGAGCCACGGAGGGCTGCGAGACCCGTGCAAGCTC
 AGGGACACTCTCGCGGTCGCCGGAGGCCACCTAGGGTACCTTCTCCACTCTC
 AGAAATATACTGTCAGTTAACGGCAAACCCTAGGCAAGAGITCTACGCCAAG
 ATGGCCAGGGGAAGGGGCTCTCGCGACCATGGCGAACCCCATCTGTCAGCTGG
 CCGGGCGCCCCCTGGTACCGGTACCTCTGATCTGGCATGACGCTCTGACAGAGGGTCCAC
 GGGCGCAAGGCCAAGAGGGCTGCGTCTGGTATGACGCTGACAGAGGGTCCAC
 CCGCTTCGACAGGACTCTATGGTCTTACGGCGCAGACAGACCGCTATATAACCCAT
 TATA box
 GCGCAGGGGGAGGAGGCCCTTCTCCCTCGGTGTGGTGAGTAAGGGCAGTTGCGTCT
 +1
 CTGCGGTGCCGTGCTGGTCTCACACCTTTAGGTCTGTCGCTTCCGTTCCGACT
 CTCTTTTCGTTGCAGCCACTGAAGATCTGGTGTCCCC

도면7**LENG8 프로모터**

TCTGATCAGACTCTGGACCGAAACAGATGGCACTCAAAGGTGGCCGAGTCAGA
 GAAATGCCATATGTAACGGATTGGTCCAATGCCCTAGCCCTACGCTCAGGGACCTTCGGGG
 GTCIGCTCCGGCCCACCCCTACACATCTGACCCCCACACACTCCACCCAGCGCCA
 CTGCCAACAGCTACACCCATCCCCCTCCAACCGCGTCACTCCAGCTCCAGCCCTCGGTCCATCT
 GAACCTCGCGTGCCTCCCTCGCCCTCCAGATTCACTTGCTAGGGAGCCGCT
 CTICCGGGTGGAGCTGTCTCACTCCCTTCTTATCATCTCTCCCCAGGGCTCCACA
 TCACCGTCTGTGGACAATCCCGAACTCTGTCACTCCAGTTACATTAGGAACAGT
 AAATGGCTCCCACTGACTCACTCAAACAGGCTGGCCGGGACGGTGGCTCACGCC
 CGTAATCCCAGCACTITGGAGCCGAGACGGAGGGATCACGAGGTCAAGGAGTTGAG
 AACAGCCCTGGCGACATGGTAACCCCGCTTACAAAAACACAAAAATTAGCCGGG
 CATAGTGGCCGCGCCTGTAAATCCCACTCTCCGAGGCTGAGGAGGAGATCACGCCACTGTACTCTATCGTGGCG
 ACGACAGAGCAAGAGCAAGACTCCGCTCCGAGAACACAACAACAGCAACAAGAA
 AACACAATAAAAAAAATAAGGTGGTGGGAGGCAGAAAGAGCTAATGGCCACCG
 CTGGTCCCCCTGGGGCCACCGTCCCCACCCAGACITCCGGCTGCGCTAAATGTTGAG
 CGTAAGTGGTGGGAGGAAGGCGGCTCAAGGCCAGCTGCGCTGGCTTATGGCTGIG
 CAGGGCCGAGGGAGGCGTGCAGGCGCCGCGTCAAGGCCAGCTGCGCTGGGCTAGG
 ACCTCGAACCCAAAGAACAGGCCAGCGGGTGGCACAGCGTGTGGCTGGCG
 (+1) +1
 GTTGCTGATGCCCTGGTGGTGTGGCTGTCCTGCAGCGAAGGATCTGGTGGTAA
 GGGGAGCGGGGGCGAGCGAGGCGGGGGATAGCATCTCTTGGTCTGGCCCG
 GCGAGCCCCAGGGCTCTGGCCCTCGCAGCAGCACGCCGCGCGAGCGTCAC
 AGGGTGTGGGGCGCAGGGCAGCCACTGCGCTGCGCACCGGGCTGGGGCG
 TTGGGCACTAGCGCGCTGCGCCGTCGCTCTACITCCACACCCAGAACTCTCAGA
 TCCCTGACCCCACTGGCTTCACTGAGCTCACCCCTTCTGCCCAGCTCTGAGTCC
 ATCTACCTTCTCCCCACTTGTGACGTGTTAGCTCCCCCTAAGTCTCCCTAACTCA
 TCTCTCTCATAGGCACTGAAAAGCAGCTGGCTCCGAGGTCCACCCCTATACCC
 CAAGGTCCAG

도면8**SNX3 프로모터**

AATCCAGACGGTGTCTGGCAACGCTGGTTATGGAAAATCATCTCAGGCATT
 GCTAACCTCTCCAGAAAGGATTTCAAGGGTTCACAGTGAGACGGTGCACAGGTTG
 GCACAGAGTTAGTACGGGAGTTTGTCTGATTGCGGAAATCTCAAGATCTCTC
 GTTTAACCTCTCCCGCAATTCCAAAGCGCTAAAGCGTTCCGGCGCTACCCCC
 CCCCAGGCCAGGGCTGGCGCAGAGAGACAGGAAGGCCAGCTCTGGCGCTGGGTC
 CTGGCTCTGGCCCGAGCCCGCGGGCGCGCTGGGTGCAITGTGGCGCTGTA
 GTGGGGCCGAACCTGTTGCGACCCGAGTCCATGACACCGCTCTCCTCACACCC
 +1
 AGTCCGCACTGGCCCTCCCAAGCCCTGGGGGCTCCGGAGGCCGGCTGGCTTC
 CAGCTAGTGAGCGTTCTCCCTGGCTGGAGGCGGAAGCTTGAGGGGGCGGGGG
 GGAGCTTCCGTTGCGGGGTAACGCCGCTACGTGCTGTTCTCGCGACCGCTG
 CGCGGAGGGCGTGTCCCCACGGCGGCCAGCAGCGGGGGCGGGCGCTGAACGC
 GGAGGGGGCGAGGGAGCCCGGGCGGGAGCAGCTACAGCGAA

도면9**ITGB4BP 프로모터**

TCTGTCCCTCAAGGCACAGCTGGACTCATCCCTTCCCCAAACCTGCCCTCCTCCGGCT
TCATTCATCAATACTCATCATCAACCCCTCCGCGAGACACTCCCTGGCCCTCCCTC
CCTCATGCCATACAACCGACCAGCGGAGGTCTAGGTCTAGGTCTAGGTCTGGCCCTCC
CCTGAATGAATAATGAATGAACGGGACCGAGGCTAGGTCTGGGTGGGGCCAGGCGGGT
CGCGCCCAGACCGCTCGGACCATAGAGTCCGCCGGAGGCGGAGGTAGAGGGCTGG
ATGGTGGGGGGAGCGCCGGCTCTCCCGAAGTCTCCCTGGACGAAGTGGAAAGTGGAAACG
+1
GAAACCTTTAGGGACTCCAAGGTACAGTCGCCGCGTGCAGCTTGTTACTGGTACT
(+1)
TGGTAAGCTGGTGTGAGGGAAACCTGGGAGGGTCAAGCTCCGGTCCCTGGGAGGG
GTGGGGGCCAGAGGATTCAAGGCCGGAGCTCTGGTGGGGCCAGTGGGCGGGACCC
GAGGACGGAGGGGCCGGAGGCCAGAGGGGCCGGTGCAGGCCGGGCTGGAGGG
CGGAGGCCGGATACTGGAAAGGATCCGCCGCCCTGAACCTCCGCCCTCCGCC
CTAGGCCTC

도면10**UQCRQ 프로모터**

GTCACCTTTGTCCCTCCCCGCCCTCCGCATTGGCCGTTCTGACTGGGATTCAC
AGAAAAGCCGAGGGCTGAGGAGAAAGTGTGAGGCCCTCGCTGTCCACTGTCCCCAA
AGTCAGTCAATCCCGAACGCTCCGCTAGGCTCCACCCACCGGCCGGCAGGGCC
TCCAAGGCACCTCCACCTACGGGTACCCAGTCAGCCCACTTCTGGACAAAGG
CGTCATCCCTAGAGACAGTAGGAAAATGGTATCTCCCGAAGTACCTACGACCTCC
AAGAGCGGCTTCCAACCTGCCGGAAATGACGAACGAGTCACCGGATCGGTGACTGT
(+1) +1
GGAGGGCGAGCTGAGCCCTGCGCTAGTGGGTCTGGTTGTGCAGTGTCTGGACCC
TGGGAGGCTAGGGGCCGGCTGGCTGGAAAGGATAAGGAGTOCAGGGCAGGA
CTCTGGGGTGGGATGGACCCCCGGGGACTGCCGCCCTCGCGAAAGCGAGCCAA
GCCCTGTCCACCCCTGG TCTGCAGGGGCCGCCACA

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> VIROMED CO., LTD
<120> Expression Vectors with Improved Safety

<130> 200901-0130

<150> 60/850,269
<151> 2006-10-10

<160> 87

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 1567
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Virus HCMV IE promoter

<400> 1
tgacattgtat tttttttttt ttatccatgg cttttttttt agttttttttt 60

ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gccccctgg ctgaccggcc 120

aacgaccccc gcccatgtac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg 180

actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat 240

caagtgtatc atatgccaaag tacggccctt attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc 300

tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta ctggcagta catctacgt 360

tttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag 420

cggttgact cacgggatt tccaaatctc cacccatg acgtcaatgg gagttgtt 480

tggcacaaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaaca actccgcccc attgacgcaa 540

atggcggtt ggcgtgtacg gtggaggtc tatataagca gagctcgtt agtgaaccgt 600

cagatcgctt ggagacgcca tccacgtgt ttggacctcc atagaagaca ccgggaccga 660

tccagcctcc gcggccggga acgggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc caagagtgac 720

gtaagtaccg cctatagagt ctataggccc acccccttgg cttcttatgc atgctatact 780

gtttttggct tggggtctat acaccccccgc ttccatgtataggtgat ggtatagtt 840

agcctatagg tgggttat tgaccattat tgaccactcc cctattggtg acgatacttt 900
 ccattactaa tcacataacat ggctcttgc cacaactctc ttattggct atatgccaat 960
 acactgtcct tcagagactg acacggactc tgtatTTTA caggatgggg tctcattat 1020
 tatttacaaa ttcatatata caacaccacc gtccccagt cccgcagtt ttatTTAACA 1080
 taacgtggga tctccacgca aatctcggt acgtgtccg gacatggct ctttcgggt 1140
 agcggcggag ctctacatc cgagccctgc tccatgcct ccagcactc atggcgctc 1200
 ggcagctcct tgctctaact agtgaggcc agacttaggc acagcacat gcccaccacc 1260
 accagtgtgc cgccacaaggc cgtggcgta gggtatgtgt ctgaaaatga gctcgaggag 1320
 cgggcttgca ccgctgacgc atttggaga cttaaaggcag cggcagaaga agatgcaggc 1380
 agctgagttt ttgtttctg ataagagtca gaggttaactc ccgttgcggc gctgttaacg 1440
 gtggaggggca gtgttgtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac cagacataat 1500
 agctgacaga ctaacagact gttccttcc atgggtctt tctgcagtca ccgtccttga 1560
 cacatg 1567

<210> 2
 <211> 431
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Virus MLV U3 region

<400> 2
 gcaaggcatg gaaaaataca taactgagaa tagaaaaggc cagatcaagg tcaggaacag 60
 atggAACAGC tgaatatggg ccaaACAGGA tatctgtgg aAGCAGTCC tgccccggct 120

cagggccaag aacagatgga acagctgaat atggccaaa caggatatct gtgtaagca 180
 gttcccgccc cggtcaggg ccaagaacag atggccccca gatgcggtcc agccctcagc 240
 agtttctaga gaaccatcag atgttccag ggtgcccaa ggacctgaaa tgaccctgt 300
 ccttatttga actaaccaat cagttcgctt ctgcgttctg ttgcgcgcgt tctgctcccc 360
 gagctcaata aaagagccca caaccctca ctggcgccgc cagtcttccg atagactgcg 420
 tcgccccgggt a 431

<210> 3
 <211> 1703
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic CMV enhancer/ubiquitin promoter

<400> 3
 ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acgggtcat tagtcatag 60
 cccatatatg gagttccgctt tacataact tacggtaaat ggccgccttg gctgaccgc 120
 caacgacccc cgccatttga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccatagg 180
 gactttccat tgacgtcaat gggtgacta tttacggtaa actgcccact tggcagtaca 240
 tcaagtgtat catatgccaat gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggccgc 300
 ctggcattat gcccagtaca tgaccttagt ggactttcct acttggcagt acatctacgt 360
 attagtcatc gctattacca tggtgatcg gtttggcag tacatcaatg ggcgtggata 420
 gcggtttgcac tcacgggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg ggagtttgg 480
 ttggcictag cggcctccgc gccgggtttt ggcgcctccc gcgggcgcgc ccctccac 540

ggcgagcgct gccacgttag acgaaggcgc cagcgagcgt cctgatcctt ccgcggcgc 600
 gctcaggaca gcggcccgct gctcataaga ctggcctta gaacccagt atcagcagaa 660
 ggacatTTTA ggacggact tgggtgactc tagggcactg gtttcttc cagagagcgg 720
 aacaggcgag gaaaagttagt cccttctcg cgattctgca gagggatctc cgtggggcgg 780
 tgaacgccga tgattatata aggacgcgcc gggtgtggca cagctagttc cgtcgcagcc 840
 gggatttggg tcgcgttct ttttgtgga tcgctgtat cgtcacttgg tgagttagcgg 900
 gctgctggc tggccgggc ttctgtggcc gccggccgc tcgggtggac ggaagcgtgt 960
 ggagagaccg ccaaggcgtg tagtctgggt ccgcgagcaa ggtgccttg aactgggggt 1020
 tggggggagc gcagaaaaat ggcggctgtt cccgagtctt gaatgaaaga cgcttgtgag 1080
 gcggcctgtg aggtcggtga aacaagggtgg gggcatggt gggcggcaag aacccaaggt 1140
 cttagggcct tcgctaattgc gggaaagctc ttattcggtt gagatgggtt gggcacat 1200
 ctggggaccc tgacgtgaag ttgtcactg actggagaac tcggttgtc gtctgtcg 1260
 gggcggcag ttatggcggt ggcgttggc agtgcacccg taccttggg agcgcgcgc 1320
 ctcgctgtgt cgtgacgtca cccgttctgt tggctataa tgcagggtgg ggccacctgc 1380
 cggttaggtgt gcggtaggct ttctccgtc gcaggacgc ggttcggc ctaggttagg 1440
 ctctctgaa tcgacaggcg ccggacctct ggtgaggggaa gggataagtg aggcgtcagt 1500
 ttctttggtc ggttttatgt acctatcttca ttaagtagct gaagctccgg tttgaacta 1560
 tgcgctcggtt gtggcgagt gtgtttgtg aagttttta ggcacctttt gaaatgtaat 1620
 catttggtc aatatgtat ttctcgtttt agactagtaa attgtccgct aaattctggc 1680

cgaaaaattttggc tttttgtta gac 1703

<210> 4
<211> 1735
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic CAG promoter

<400> 4
attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg gtcatgggtt catagccat 60

atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga ccgccccaa 120

ccccccccc attgacgtca ataatgacgt atgttccat agtaacgcca ataggactt 180

tccattgacg tcaatgggtg gagttttac ggttaactgc ccacttggca gtacatcaag 240

tgtatcatat gccaagtacg ccccttattt acgtcaatga cgtaaatgg cccgcctggc 300

attatgccta gtacatgacc ttatggact ttcctacttg gcagtgatc tacgtattag 360

tcatcgat taccatggtc gaggtgagcc ccacgttctg cttcaacttc cccatctccc 420

ccccctcccc accccaatt ttgttattt ttatttttt attatttgt gcagcgatgg 480

gggggggggg gggggggggg cgccgcggccag gcgggggggg ggccggccggag gggggggggc 540

gggcgaggcg gagaggtgctg cggcgagcca atcagagccg cgcgtccga aagtttcctt 600

ttatggcgag cggcgccgg cggcgccct ataaaaagcg aagcgccgg cggcgccgg 660

tgcgtgcgc ctgccttcgc cccgtgcctt gctccgcgc cgcctgcgc cgccgcggcc 720

ggctctgact gaccgcgtta ctcccacagg tgagcggcg ggacggccct tctccctgg 780

gctgttaatta gcgcttggtt taatgacggc ttgtttcttt tctgtggctg cgtgaaagcc 840

ttgaggggct ccgggagggc ctttgcgt gggggagcgg ctgggggggt gcgtgcgtgt 900

gtgtgtgcgt ggggagcgcc gcgtgcggct cgcgcgtgcc cggcggtgt gagcgctgcg 960

ggcgcggcgc gggctttgt gcgcctcgca gtgtgcgcga ggggagcgcg gccggggcg 1020

gtgccccgcg gtgcgggggg ggctgcgagg gaaacaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg 1080

tgggggggtg agcaggggt gtggcgcgt cggtcggtc gcaacccccc ctgcacccccc 1140

ctccccgagt tgctgagcac ggcccggtt cgggtgcggg gctccgtacg gggcgtggcg 1200

cggggctcgc cgtccggc ggggggtggc ggcaggtgg ggtgcggc gggcggggc 1260

cgcctcggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg ccccgagc gccggcgct 1320

gtcgaggcgc ggcgagccgc agccattgcc tttatggta atcgtgcgag agggcgcagg 1380

gacttcctt gtccaaatc tgtgcggagc cgaaatctgg gaggcggcgc cgacacccct 1440

ctagcggcgc cggggcgaag cggtgccgc cggcaggaa ggaaatggc gggaggggcc 1500

ttcgtgcgtc gcccgcgc cgtcccttc tccctctca gcctcgggc tgtccgcggg 1560

gggacggcgt cctcgggg ggacgggca gggcggtt cggctctgg cgtgtgaccg 1620

gcggctctag agcctctgt aaccatgttc atgccttctt cttttccta cagctctgg 1680

gcaacgtgct gttattgtc ctgtctcatc atttggcaa agaattgatt tatcg 1735

<210> 5

<211> 1450

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens EF-lalpha promoter

<400> 5

gtaagccagc aatggtagag ggaagattct gcacgtccct tccaggcggc ctcccgta 60

ccacccccc caacccgccc cgaccggagc tgagagtaat tcatacaaaa ggactcgccc 120
 ctgccttggg gaatcccagg gaccgtcggt aaactccac taacgtagaa cccagagatc 180
 gctgcgttcc cgccccctca cccgcccgt ctgcgtcatca ctgaggtgga gaagagcatg 240
 cgtgaggctc cggtgcccgt cagtggcag agcgcacatc gcccacagt cccgagaagt 300
 tggggggagg ggtcggaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaaactggg 360
 aaagtgtatgt cgtgtactgg ctccgcctt ttcccgaggg tggggagaa ccgtatataa 420
 gtgcagtagt ccccgtaac gtttttttgc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 480
 gtgccgtgtg tggtccgc gggcctggcc tcttacggg ttatggccct tgcggtgcctt 540
 gaattacttc cacccccctg gctgcagttc gtgattcttgc atcccgagct tcgggttgg 600
 agtgggtggg agagttcgag gccttgcgt taaggagccc cttgcctcg tgcttgagtt 660
 gagggcctggc ctggcgctg gggccgcgcgt gtgcgaatct ggtggcacct tcgcgcctgt 720
 ctgcgtgtt tcgataagtc tctagccatt taaaattttt gatgacactgc tgcgacgttt 780
 ttttctggc aagatagtct tgtaaatgcg gccaagatc tgacacactgg tatttcggtt 840
 tttggggccg cggcgccgat cggggccgt gcgtcccagc gcacatgttgc ggcgaggcgg 900
 ggcctgcgag cggccacc gagaatcgga cggggtagt ctcaagctgg ccggcctgt 960
 ctgggtgcctg gcctcgccgc gccgtgtatc gccccgcctt gggcggcaag gctggccgg 1020
 tcggcaccag ttgcgtgagc gaaagatgg cgcgttcccg gcctgcgtc agggagctca 1080
 aaatggagga cgcggcgctc gggagagcgg gcgggtgagt cacccacaca aaggaaaagg 1140
 gccttccgt cctcagccgt cgcttcatgt gactccacgg agtaccggc gccgtccagg 1200

cacctcgatt agttctcgag ct₄ggagt acgtcg₂t taggttgggg ggagggg₂t 1260

tatgcgatgg agttcccc₂ cactgagtgg gtggagactg aagttaggcc agcttggcac 1320

ttgatgtaat ttc₂ttgga atttgc₂tt tttgagttg gatcttggtt cattctcaag 1380

cctcagacag tggttcaaag tt₄tttctt ccattcagg tgcgtgaaa actacccta 1440

aaagccaaaa 1450

<210> 6

<211> 1330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens ACTB promoter

<400> 6

gagatgtcca cacctaggat gtcccgcgtt gggtgggggg cccgagagac gggcaggccg 60

ggggcaggcc tggccatg₂g gggccgaacc gggcactg₂c cagcgtgggg cgccggggcc 120

acggcgcgcg cccccagccc cggggcccg caccccaagg cggccaaacgc caaaactctc 180

cctcctctc ttcc₂taatc tcgctctcg₂ tctttttt tttcgaaaaa ggagggaga 240

ggggtaaaa aaatgctgca ctgtgcggcg aagccggtaa gtgagccgcg cggggccaat 300

cagcgtgcgc cgttccgaaa gttgc₄ttt atggctcgag cggccgcggc ggcgc₂tat 360

aaaacccagc ggcgcgacgc gccaccac₂g ccgagaccgc gtccgc₄ccg cgagcacaga 420

gcctcg₂tt tgccgatccg cgc₂gtcc acacccgc₂g ccagtaa₂g cggccagcc 480

gaccggggca ggccgctac ggccggccg caggcggccg cggcccttc gcccgtgcag 540

agccgcgc₂c tggccgcag cggggggcgc atgggggggg aaccggaccg ccgtgggggg 600

cgcgggagaa gccctggc ctccggat ggggacacc ccacgccagt tcggaggcgc 660

gaggccgcgc tcgggaggcg cgctccggg gtgccgtct cggggcggg gcaaccggcg 720

gggtcttgt ctgagccggg ctttgcca tgggatcgc agggtggcg cggcgagcc 780

cccgccagc ccgggtgggg ctggggcgcc attgcgtcg cgcgtggc cttggcgc 840

taactgcgt cgccgtggga attggcgta attgcgtcg cgcgtggga ctcaaggcgc 900

taactgcgc tgcttctgg ggccggggt gcccggcct gggctgggc gaaggcggc 960

tccggccgaa ggggtggggt cgccggcgt cccggcgct tgccgcact tcctggcga 1020

gccgctggcc gcccggggt gtggccgtg cgtgcgcgcg cccgacccg gcgtgtttg 1080

aaccggcgg aggccccgtt ggcgcgggt tgggaggggg ttggggcctg gcttcctgcc 1140

gcgcgcgcg gggacgcctc cgaccagtgt ttgccttta tgtaataac gcggccggcc 1200

cggttcctt tgtcccaat ctggcgcgc gccggccccc cctggggcc taaggactcg 1260

gcgcgcggga agtgccagg gcggggcga cctcggtca cagcgcccc ggctattctc 1320

gcagctacc 1330

<210> 7

<211> 665

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens GAPDH promoter

<400> 7

ttcatccaag cgtgttaaggg tccccgtct tgactcccta gtgtcctgt gcccacagtc 60

cagtcctggg aaccagcacc gatcacctcc catcgccca atctcagtcc cttccccct 120

acgtcgggc ccacacgctc ggtgcgtgcc cagttgaacc aggccgctgc ggaaaaaaaaa 180
 aagcggggag aaagttagggc ccggctacta gcggtttac gggcgcacgt agctcaggcc 240
 tcaagacctt gggctggac tggctgagcc tggcggagg cgggtccga gtaccgcct 300
 gccggcgcccccgggttc tataaattga gcccgcagcc tcccgcttcg ctctctgctc 360
 ctccgttcg acagtcagcc gcattttctt ttgcgtgcc aggtgaagac gggcggagag 420
 aaacccggga ggctagggac ggcctgaagg cggcagggc gggcgccaggc cggatgtgtt 480
 cgccggctg cgggtggc cggggcgcc tccgcattgc agggcgggc ggaggacgtg 540
 atgcggcgcg ggctggcat ggaggcctgg tgggggaggg gaggggaggc gtgtgtgtcg 600
 gccggggcca ctaggcgctc actgttctct ccctccgcg agccgagcca catcgctcag 660
 acacc 665

<210> 8
 <211> 1143
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens RPL10 promoter

<400> 8
 gtgcgtcga gcaggatttc ctccgtct tcctgtaaa ggacggaaag actttgttac 60
 cccacccgc cccacctgca gaatggtgga cagataacctc cagatgccac ttccccagg 120
 acgcccgcct gctctgcgca cctctcccg gatgctgccc cgtggcgcc tggtggcc 180
 cctgctccc caacgaccccc agacgcaccc ggagggactc ttgagcacag tggagtggaa 240
 agggcgaggt gggcggtgc ccaggcgaga gcggctcatg ggaggccggc cccgagacgc 300

agctggtcgg gacggtgccg gtcagggtgg gcggagcggg gctagagatg ccccggtt 360
 tcccaggcca ttagtctccg tggagattc tcctcgacct ctccccgca gcaatgtcg 420
 aaccctgggt ctccaggaaa cgggatacg gggcatggct cccagcaagg cctggtccag 480
 cctctccggc agggaaatgg gtctccctt ccggcctccc gggttgcaca aggaacgcgg 540
 gcccagatcc ccgtatggcg cttcaccgcc ggggcctcta gcctagaagg aggacggag 600
 cgctgtccg agacccgtgc aagctcaggc acactctcgc ggtcgccggg aggcccacct 660
 aggtaacttt cttttttcc actctcagaa atatacgct gtcacagttt acggcaaagg 720
 ctagggcaag agttctacgc ccaagatggc cagccggaag cggcttctc ggcaccatgt 780
 ggcgaagccc cattcgtcag ctggccgcc gcccggctgg taccggta cctctctgat 840
 ctgcgcatgt gctggctac gcccggcgc aagcgccaa agcggctgcg tctatggta 900
 tgacgtctga cagacgtcc acccgcttc gacaggactc tatggttttt acgcgcgcag 960
 acagaccgcc tatataagcc atgcgcaggc ggaggagcgc ctcttccct tcggtgtgg 1020
 gagtaagcgc agttgtcgac tcttgcggtg ccgttgctgg ttctcacacc ttttaggtct 1080
 gttctcgct tccgtccga ctctctttt ttctggcag ccactgaaga tcctgggttc 1140
 gcc 1143

<210> 9
 <211> 1538
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens LENG8 promoter

<400> 9
 ttgtatcaga gtcctggacg gaaacagatg gcactcaaaa ggtggcgcgc agttcagaga 60

aatgcctatg tacggattt gtcacatgcc tcagcctgac ctcaggacc ttcggggtc 120
 tgctccgcgc ccacccttac acatctgtga cccccacacac ttccacccca ggcactgc 180
 caacagctac acccatcccc ctccaaccgc gtcagettcc agcctcggtc catctgaact 240
 cgccgtgccc cctccctgc gcccttccag attcatttc taggaaagcc cgctttccg 300
 ggtggagctg ttccatcc cttttttta tcattcttc cccaggcctt ccacatcacc 360
 gtgcgtgga caatccgga actcctgtca cgccagtttta cattaggaa cagtaatggc 420
 tcccaactgac tcagtcaaaa caaggctgctg gccgggcacg gtggctcacg cccgtaatcc 480
 cagcacttg ggaagccgag acggaggat cacgaggta ggagttcgag aacagcctgg 540
 ccgacatggt gaaacccgt ctttacaaaa acacaaaaat tagccggca tagtggcgcg 600
 cgcctgataat cccagctact ccggaggctg aggccagaatt gttgaaccc aggaggcgg 660
 ggttgcatgt agcagagatc acgccactgt actctatcgt gggcgacgc agagcaagag 720
 caagactccg tctccgagaa caacaacaac agcaacaaga aaacaacaat aaaaaaaaaata 780
 aggctgcgtg ggaggcagaa agagctaattt cggccacgt tttccctcg gggccaccgt 840
 ccccacccag acttccggc tgccttaaaa tttcatgcg taagtgcgtg ggcaggaagg 900
 cgggctcaag cgccagctcg ggcgttcatt ggctgtgcag ggccgaggaa ggcggcgtcaa 960
 ggccgcgcg tgacgtcagg acgcccggc caggacgtcg aagccaaaga agaccagagc 1020
 cagccgggtg gcacagcgg gtcgtggcc tggctgtat cgcctgggtg gtttgtggcg 1080
 tgtccctgca gcaaggatc ctggttggta aggggagcgg cggccgagca ggcggcggg 1140
 gatagcatct cttttggc ttgcgcggc cgagcccgaa ggccttcgc ggcgtcgcag 1200

cagcagacgc cgcgccgag cgtcgacagg gtgtggcggc gcagggcag ccactgcgc 1260

tgcgcaccgg gcctgggcc gcgcgttcgg gcactagcgc gcgtgcgcg tcgtttcta 1320

cttccacac ccagaactct ttagatcatt gacccagtgc tttttca 1380

ttttctgccc agttctttt gaggccatct actttcttc cccacttgtt gacgttttt 1440

tagctcccc ttaagtctcc ctaactcatt cttttctca taggcagtga aaaagcagtc 1500

tggctccga ggtccacccc ttataccca aggtccag 1538

<210> 10

<211> 691

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens SNX3 promoter

<400> 10

aatccagacg cgtgtctggt gcaacgctcg ggtttatggc aaaatcatct caggcatttg 60

cttaaccttc tccagaaagg catttcagg ggttcacagt gagacggtgc acaggttggc 120

acagagtttag tagggcagt ttgtttcga ttgcggca aatctctaag atctctccgt 180

ttaacttgc cccgaattc ccaaagccgc taaaggcgtt tccggcgctc taccccgcc 240

caggccgagg ctggcgcaga gagacaggaa ggcgcagctc tggcgtctg ggtctcgcc 300

tcctcgcccg cagccccgctc gcccgcgcgt cgcgggtgcatttgtggcgct gtatcgcc 360

cggaacctgt ttgcgacccc gagtcccatg acaccgcgtt tcccacacc ccagtccgca 420

gtgccccctcc ccagcctcgcc cgccgcctcc cgggagccgg gcgtggcggtt ccagctagtg 480

agccgtttct cccctggct cggaggcgaa agcttgagggg ggcgggggag gagcttcgca 540

tgccgggtga acgcccgtc tacgtgctcg ttctttcg gaccgctgca cgcgagcccc 600

gtgtccccac ggccggcagc agccggcgca gcggcggctg aacgcggagg gggcggaggg 660

agcccgccgc ggccgcagca gctacagcga a 691

<210> 11

<211> 1022

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens CNOT3 promoter

<400> 11

gttagctcctc ccccagacca attgtttaa gagaggggg cgatatacatc caatcagcac 60

gacacaggc tcttgattga ctttcgggtc ctgcgcgtgg cgttgtgtgc cctgaggcgg 120

gaggaggagg aggagcgggg aggaaaacct gagccaatcc tagcagcctg cgccggaggc 180

caatcgaacg ccgcgccttg gagcgatcac ccaatccgcg aaagggggca gggcgcatcc 240

ctgccagaa ccaatagaaa gcctccaagg gtcaggagcg acgttcagca ggagcaatga 300

ctggcctata ttccggactc gggggcgggt cggcgccaga gacgagaaga gaggagggga 360

ggcctcctcc gccgcgcaca tcttgaccg ggccggta gttccgcgg agccatcgcc 420

agacgcgcgc gcctcccttg agccccgacc cccgtcgta gaacaacccc gggcccaactc 480

ccccaaacccc acttccgcctt cgcgcgcata tcgcgatagc gcccggccccc gggcgcgag 540

aaaaaggcgg cggcgctcg cttcccccgc ctgtcgcgat acgttcctca gccgcggcgc 600

cagctcctgt ggtgagagcg tcaggctcg a tggccggta cccttccct tcctcccccc 660

ggcgccatcg gccgcctcc cgcgcgcata cggccctggc gacaccgccc tctgtcgca 720

catggcctcc cctgcctgc cccctgccgc cgcccttgca ggcggggct cccggcgaaa 780

ggcggctccc tccctctgca cctccgttc ctgcgcctct ttacgttcc ttggggctgg 840

tctttgtca gatagcaaat gtttttcttc ttaccaggc ccacctaccc cactatgtg 900

actaggtaa tgtctctggg ttttaccag ccaggaaata cgtgttaatt cctctccaaat 960

ctctccttagc agcgccgtc tccaagagag tatgaagaga gtgcgtctgt agggcaggaa 1020

ag 1022

<210> 12

<211> 1175

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens CPNE1 promoter

<400> 12

gtccatataa tcctaaaaaa acttagaggt aagcacaatt cgcccttcc gggaaactg 60

gaagacgtga agcaatttgc acagtcttgc agtgaagggc caagctagac actcataccc 120

agcccacccg ccaggccac tagcccaagg tcggtctgt ggcacaaacat tcgcaaggcag 180

ggactgaata tccccctttt agcacaaaaac ccagtaactt ccggagatc gcccggacc 240

gtcagcgccgc ttgcggcc ctttgacgtc aaccacggcc ttcctcccc ttctggaaacg 300

cggagccgct gagcggccgc acggccattt tgtgaagccgg cgaaggaggt ggtggctgca 360

ttgggctccg ggaagccgtt cggctgggg ctgtcgccgc cggggccggag gcactcgcc 420

gggggtaat tcgggtctg gtttctgggt cgcgcagct ttcccgta agactccgc 480

agccctgaa cgggtgggc tgtgcgggc tcgtgggcc cttgggtggc cggggccgg 540

gccttcggag gcctcgagc ccgcggcaac tagccccca cacaagggt cgaggcagg 600
 ctgcaggggg agtggatgc cacttaggcc tctgagatct gagaggatgc aaggaggacg 660
 caagaggatg agcctcgta ccgaagtggg gacgaggcca tagcgaggac tccccgtgg 720
 tctgagaggg ggcaggccag agctggctgg ctcagcggcc tgcgagctaa ccggggactg 780
 cagtaaaaaa gctgtgaagc ttagcttat gactgtttt atttcagt gattcgttat 840
 tggcttaagt taatgacact cttgtaaata tataattatt ttgagatact caaatttcaa 900
 agcaatacca actaaaaagc atgtgtggta ttttgttacg gtgtcttct tttttttt 960
 tttttgata tgcatctaa tgaagtactc tggtggttc agactcgct tcgtaatgta 1020
 cagtggtggcc tgtcggtttt gttttgttt tcctgcattt attttgcct ccgttattc 1080
 tctattgcag tctaaaagtt gtttttaatt gggtgcccac aggattgact tggcctctac 1140
 ttctgttaa gaaattcat ctctgtttt atcag 1175

<210> 13
 <211> 416
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens HYPO promoter

<400> 13
 tcttttacac gtttggtttt atggccgtt ggaggtttt tcacgctgag ggtgaagatt 60
 ctttagttcc tcaattagca taaaagctgc tccaaggctg ctgagtcctt agttccattc 120
 cattcaaaat gttaaattctt gagacacgca acctacgccc tactgtcctt tgtcccacgg 180
 cttctcgaga ttatctctgt gtttaatag ataaaacgcc ttctctcccc acccggtggg 240

tgcaaagcac agcgcatggg gctggtggcg cccgagagca acacacaacg catgcgccag 300

tccgcagggtg tggcggagg agaaatcgcg tcggcggcag gggatgacgt aaaaaggccg 360

cgctgtactg cggttgtgc cgcttcgca agaaggttc ctggctgtt gcagcc 416

<210> 14

<211> 564

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens DKC1 promoter

<400> 14

gcacactact cctattggcc atctgctcta gctggatggg aactgcaagc agcaaaggcc 60

tttcaacctc tccgagcttc aacatgttca cttatgcattt aggactgatc caacagcaac 120

ctgaaagggt cgggtgtgaga aagcaaagaa agaggtactg tttacggagc gttcagccgt 180

gagcccaggc gcaggcgcgg agctaaaccc ggaggtgaag caactacagc tggggccacg 240

cccacagact ccggcgtgtc ggggcggcgg gcactcgccgc ttccagcctg ggccaaccag 300

gctgctttag gctcgaagcg catgcgcgtt ctgcgcctcc gtactggccg agccagcaaa 360

tcgcatttgcg cagacgacca gccccgcctt cggatccgc ccccggtatg gccccgcctc 420

ctcccgcccc gggcaaggc acgcacaggg cagtgcgcgg gtgggtgggt cctagcagcg 480

cggcctgacg ggaccaaggc ggcgggagtc tgccgtcggtt ccctcggtt tggaccggc 540

ggcacgcacg cggtgcaagg taac 564

<210> 15

<211> 509

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens VPS72 promoter

<400> 15

acaaaaatta gtgggcattt gtggcgggg cctgttatcc cagctactcg gggactgag 60

gcaggagaat cggttcagcc cggggggacgg aggttgcaatc gagccgagat cgtgccactg 120

cactccatgc tggcacaga gcgaggcgg actccgtccc tacggaaaaaaa aaaaaccata 180

tatatatata aaataaaaaat aaataaaata aaatgtgtt acttagggtt atgggggtct 240

tcgttaccacc aagtggactc attgagcaag ggagatcgct gggtaactaga gcaagcggcc 300

tagagcatcc ggcaggagt aggagaggct gaagagtaaa gagggttag agggtggac 360

tgggatctc tcgacactct ttacttctg cctgttaaacg cccgacttcc gccgctgg 420

gccacccgca ggtgtgtatcg tcgagcgtcg agctccaaa accgagctgg tgaggggctg 480

caggtggcg cgcgtctcg gtggcggt 509

<210> 16

<211> 654

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens IT6B4BP promoter

<400> 16

tctgtccctc aaggcacagc tggactcatc cttttccccca aacctgcctt tcctccggct 60

tcatttccat caataacctcc atcatcaacc cttcccgag acactcctgg cccctccct 120

ccctcatgcc tcacaaccga ccagccggag gtcttaggtcg atgacagctc ctaaaaagct 180

cctgaatcaa taatgaatga atgaacgcga gcaggctagg cgtggggcca ggcggggctcg 240

cgcccagacc gctcgcgacc atagagtccg ccggaggccg gagtagagg ggctggatgc 300

gtggcgggga gcgcgggct ctcccgaaag tctccctgga cggaagtgga aacggaaacc 360

tttttaggga gtccaaggta cagtcgcccgt gtcggagct ttttacttgt tacttgtaa 420

gctggtgtga gggAACCTG ggagggtcag ctccggctt gggtcggag ggggggggc 480

cagaggattc agggccggag gttctggtgg gggcccagtggcgggaccc gaggacggag 540

ggccgggag gccgagaggg gcgggtcgc ggcggggctt gaggacgga ggccggata 600

cttggaaag gatccgcgg ctttgaactc ccgcctccgc cgccccctagg cctc 654

<210> 17

<211> 567

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens UQCRQ promoter

<400> 17

gtcaccttt tttccctcc cccgcctccc gcattcgccc gtttctgac tgggattcca 60

cagaaaagcc gaggctgag gagaagtgtg agcgctccg cctgtccact gtccccaaa 120

gtcagttcaa tccccacgt cctccgctag gctccacccc accggccgg gcagggcctc 180

caaggcacct cccacctaag ggtcacccag tcagcccact ttttctggg acaaaggcgt 240

catcccttag agacagtagg aaaatggat ctccggaaat ttacctcaag acctccaaga 300

gcggcttcca accttgccgg aaatgacgaa cgagtcaacc ggatcgggtga ctgtggaggg 360

cgagctgagc cctgtgcgtg agtgggtct gtttgcag tttcggtga ccctggagg 420

ctagggcgc cccgctggc tggaaagga taaggatgc agggcagga gtctgggtt 480

ggggatggac ccccgccggg actgcggcgc ttgcgaaag cgagccaagc gcctgtccac 540

cctcggtcct gcagggccgc cgccaca 567

<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ME5 primer

<400> 18
acgcgtgcaa ggcattggaaa aa 22

<210> 19
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MP3 primer

<400> 19
acgcgttagat ctgaattcta cccgggcgac gcagt 35

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CMV5 primer

<400> 20
acgcgttgac attgattatt g 21

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> KMD1 primer

<400> 21
tctagagcca aaacaaactc ccat 24

<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> KMD4 primer

<400> 22
gctagcgccc tccgcgcgg gttt 24

<210> 23
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> KMD5 primer

<400> 23
acgcgttagat ctgaattcgt ctaacaaaaa agccaa 36

<210> 24
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> EEF1A1F primer

<400> 24
acgcgtgtaa gccagcaatg gtagaggaa gattctgcac g 41

<210> 25
<211> 38
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EEF1A1R primer

<400> 25

ggatcccttt ggcttttagg ggttagtttc acgacacc

38

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BApF primer

<400> 26

acgcgtgaga tgtccacacc taggatgtcc

30

<210> 27

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BApR primer

<400> 27

ggatccggtg agctgcgaga atagccg

27

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GAPDH primer

<400> 28

acgcgttca tccaaggcgtg taaggg

26

<210> 29
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GAPDHR primer

<400> 29
gtttaaacgg tgtctgagcg atgtggct 28

<210> 30
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RPLF primer

<400> 30
acgcgttaggc ccacctaggg tacttcctt t 31

<210> 31
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RPLR primer

<400> 31
ggatccggcg acaccaggat cttcagtggc t 31

<210> 32
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LENG8F1 primer

<400> 32

acgcgtagaa ttgttgaac ccaggaggcg g

31

<210> 33
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LENG8R1 primer

<400> 33
 gtttaaacaa agtagaagac gacggcgcac gcg

33

<210> 34
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LENG8F2 primer

<400> 34
 gtttaaaccc acacccagaa ctttcagat cct

33

<210> 35
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LENG8R2 primer

<400> 35
 gaattcctgg accttgggt ataagggtg g

31

<210> 36
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> SNX3F primer

<400> 36
gaattcaatc cagacgcgtg tctggtgcaa

30

<210> 37
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SNX3R primer

<400> 37
ggatcccttcg ctgttagctgc tg

22

<210> 38
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CNOT3F1 primer

<400> 38
acgcgtgtag ctccctcccc agaccaattt ttttaag

37

<210> 39
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CNOT3R1 primer

<400> 39
ggatccctcca tccttccagc caggagccaa taccgac

37

<210> 40
<211> 31
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CNOTF2 primer

<400> 40

agatcttggg gctggctct tgtcagatag c

31

<210> 41

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CNOTR2 primer

<400> 41

ggatcccttc cctgcctac agacgcactc t

31

<210> 42

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CPNE1F1 primer

<400> 42

acgcgtgtcc atttaatcct caaaaaactt a

31

<210> 43

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CPNE1R1 primer

<400> 43

ggatcccttt tactgcagtc cccgttatta gctc

34

<210> 44
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CPNE1F2 primer

<400> 44
agatcttagct gtgaagctga gctttatgac t 31

<210> 45
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CPNE1R2 primer

<400> 45
ggatccctga taaaacaaga gatgaatttc c 31

<210> 46
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HYPOF primer

<400> 46
acgcgttctt ttacacgttt ggtttatgg t 31

<210> 47
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HYPOR primer

<400> 47

ggatccggct gcaacaggcc aggaaacctt c 31

<210> 48
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DKC1F primer

<400> 48
acgcgtcac actactccta ttggc 25

<210> 49
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DKC1R primer

<400> 49
gaattcgta ccctgcaccg cgtgc 25

<210> 50
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VPS72F primer

<400> 50
acgcgtacaa aaattagttg ggcatt 25

<210> 51
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VPS72R primer

<400> 51
gaattcaccg cctaccgaga ctgcg 25

<210> 52
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ITGB4BPF primer

<400> 52
acgcgttctg tccctaagg cacagct 27

<210> 53
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ITGB4BPR primer

<400> 53
gtttaaacgaa gccttagggg cggcgaggc gggagttcaa 40

<210> 54
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> UQCRQF primer

<400> 54
acgcgtgtca ccttttgtt ccctccc 27

<210> 55
<211> 28
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> UQCRQR primer

<400> 55

gtttaaactg tggcgccggc cctgcagg

28

<210> 56

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RGpA F primer

<400> 56

ggatcccttt ccctctgcca aa

22

<210> 57

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RGpA R primer

<400> 57

actagtataa gagaagaggg acagc

25

<210> 58

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RPL F50 primer

<400> 58

acgcgtacgc gcgcagacag accgcctata taagccat

38

<210> 59
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RPL F100 primer

<400> 59
acgcgttac gcttgacaga gcgtccaccc gtcttcg 37

<210> 60
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RPL F200 primer

<400> 60
acgcgtctgg ccgcggcgcc cctggtaacc cggtcacc 38

<210> 61
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RPL F500 primer

<400> 61
acgcgtgtct cccccccgg cctccgggt tgacaaagg 39

<210> 62
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RPL F1000 primer

<400> 62

acgcgtgtgc gctcgagcag gatttcctcc cgtccttcc

39

<210> 63
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RPL R TSS primer

<400> 63
 ggatccgcgc tcctccgcct gcgcattggct tatata 36

<210> 64
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LENG F50 primer

<400> 64
 acgcgtgtga cgtcaggacg ccgcggtcag g 31

<210> 65
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> LENG F100 primer

<400> 65
 acgcgttggc gttcattggc tgtgcaggcc 31

<210> 66
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> LENG F200 primer

<400> 66
acgcgttgt cccctgggg ccaccgtccc c

31

<210> 67
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LENG F1000 primer

<400> 67
acgcgttgt atcagagtcc tggacggaaa c

31

<210> 68
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> LENG R TSS primer

<400> 68
gtttaaacct ctggtcttct ttggcttcga cgt

33

<210> 69
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SCV3LB primer

<400> 69
ggatccctcg agcgataaaa taaaagattt tattagtct cc

42

<210> 70
<211> 32
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SCV3LRI primer

<400> 70

gaattcgctcg actgaaagac ccccgctgac gg

32

<210> 71

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3'LTR-1 primer

<400> 71

gctagccct gtgccttatt tgaa

24

<210> 72

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NEWMCSF primer

<400> 72

acgcgttaa accgcgaaat tcggatccac atcgtg

36

<210> 73

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NEWMCSR primer

<400> 73

ctcgagatct aggctcacg atgtggatcc gaattc

36

<210> 74
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> eGFP5 primer

<400> 74
acgcgtggat ccatggtag caagggcag 30

<210> 75
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> eGFP3 primer

<400> 75
ctcgagagat ctttacttgt acagctcg 30

<210> 76
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GP91F primer

<400> 76
ggatccatgg ggaactggc tgtgaat 27

<210> 77
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GP91R primer

<400> 77

ggatccctcg agttagaagt tttccttgaa gaaaa 35

<210> 78
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L1F primer

<400> 78
gctttccgc tcacgtgtga tcaatttaaa tttcgaa 37

<210> 79
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L1R primer

<400> 79
agcggaaagag cttcgaaatt taaattgatc acacgtg 37

<210> 80
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L2F primer

<400> 80
aggcctggtc accggccatt atggccacgt gatcattaa atttgaagca tttatcaggg 60

tta 63

<210> 81
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> L2R primer

<400> 81

tattcgcg tttcggtat gaatatt

27

<210> 82

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BApF primer

<400> 82

gtcgacatta atgccgtga gtgagcggcg cggggccaa

39

<210> 83

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BApR primer

<400> 83

ggatccggtg gcgcgtcgcg ccgctgggtt tt

32

<210> 84

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Neof primer

<400> 84

agatctatgg gatcgccat tgaacaa

27

<210> 85

<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pAR primer

<400> 85
catatgtcat aatcagccat accacattt

29

<210> 86
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SVpAF primer

<400> 86
ctcgagatgg gatcgccat tgaacaa

27

<210> 87
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SVpAR primer

<400> 87
catatgagta atcagccata ccacattt

28