



(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.)

(73) 특허권자  
주식회사 바이로메드  
서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교 자연과  
학대학 기초과학연구동 203동 (신림동)  
(72) 발명자  
김선영  
경기 포천시 소흘읍 이곡1길 37-12  
김수정  
서울특별시 관악구 봉천로 387, 두산아파트 103동  
1501호 (봉천동)  
이준태  
서울특별시 관악구 중앙1길 15, 밀레니엄빌딩 20  
5호 (봉천동)  
(74) 대리인  
제일특허법인, 김선장, 장성구

전체 청구항 수 : 총 28 항

심사관 : 이영기

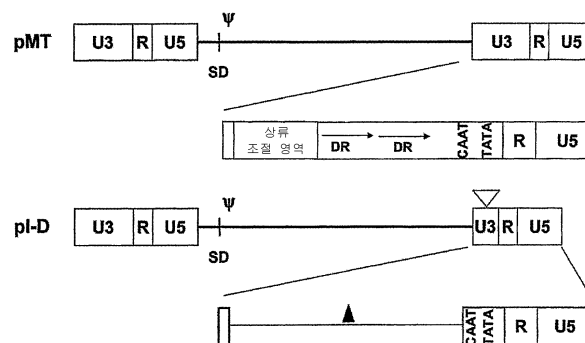
(54) 발명의 명칭 안전성이 개선된 발현 벡터

(57) 요약

본 발명은 플라스미드 벡터 및 인핸서-결실 레트로바이러스 벡터를 포함하는 포유동물 발현 벡터에서 내부 프로  
모터의 용도에 관한 것이다. 레트로바이러스 벡터는 개선된 안전성 및 최적 수준의 전이유전자 발현을 및 벡터  
역가를 갖는다.

대표도 - 도1

U3 불활성화 레트로바이러스 벡터



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호: 8의 951 내지 1143번째 뉴클레오타이드를 포함하거나, 또는 서열번호: 8의 651 내지 1000번째 뉴클레오타이드로 표시되는 이중 내부 프로모터; 및 인헨서-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 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 3' LTR, 또는 3' LTR과 5' LTR의 U3 영역의 인헨서 요소가 결실된 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

### 청구항 3

삭제

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

삭제

### 청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 이중 내부 프로모터가 서열번호: 8의 951 내지 1143번째 뉴클레오타이드로 표시되는 발현 벡터.

### 청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 이중 내부 프로모터가 서열번호: 8의 901 내지 1143번째 뉴클레오타이드로 표시되는 발현 벡터.

### 청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 이중 내부 프로모터가 서열번호: 8의 801 내지 1143번째 뉴클레오타이드로 표시되는 발현 벡터.

### 청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 이중 내부 프로모터가 서열번호: 8의 651 내지 1143번째 뉴클레오타이드로 표시되는 발현 벡터.

### 청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 이중 내부 프로모터가 서열번호: 8의 501 내지 1143번째 뉴클레오타이드로 표시되는 발현 벡터.

### 청구항 11

제 1 항에 있어서,

상기 이중 내부 프로모터가 서열번호: 8의 1 내지 1143번째 뉴클레오타이드로 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 이중 유전자 전사 또는 발현을 나타내는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

#### 청구항 16

제 1 항에 있어서,

상기 프로모터가 하나 이상의 스플라이싱(splicing) 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 이중 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, 인슐레이터 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

기술분야

[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.

배경기술

[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 게놈 내에 삽입되는 그 능력으로 인해 보다 장기간 발현에 유용하다. 무린 백혈병 바이러스(murine leukemia virus, MLV)계 벡터가, 대부분의 용도에 적합하게 이용가능한 많은 주쇄 플라스미드 및 패키징 세포주(packaging cell line)를 갖는 가장 일반적인 레트로바이러스 벡터이다(예를 들면, 문헌 [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, 무린 줄기 세포 바이러스, 하비(Harvey) 무린 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 게놈 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 관절염 뇌염 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 특징되어 있다.
- [0006] 벡터가 묶인 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 게놈 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 있음은 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  $\beta$ -액틴 프로모터)[Ramezani et al., *Mol. Ther.* 14:245, 2006]이다. 그러나, HCMV IE 프로모터는 1차 인간 세포에서 신속히 불활성화되는 것으로 알려져 있지만, 특정 유전자에는 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 게놈 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 찾는 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 뉴클레오타이드 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 인헨서-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), UQCRQ 프로모터(서열번호: 17) 또는 ITGB4BP 프로모터(서열번호: 16)로부터 선택된다. 다른 태양에서, 내부 프로모터는 전장(full length) 프로모터의 단편 또는 변이체이고 이중 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 스플라이싱(splicing) 부위를 포함한다. 또 다른 태양에서, 벡터는 당해 분야에 공지되어 있는 바와 같이, 폴리아데닐화 부위, 인슐레이터(insulator) 서열, 스플라이싱 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 인헨서-결실 U3 영역을 갖는 3'LTR을 포함하는 레트로바이러스 벡터를 암호화하는 DNA를 포함하는 플라스미드이다. 또 다른 태양에서, 상기 플라스미드는 5' 및 3' LTR 모두에 인헨서-결실 U3 영역을 갖는 벡터를 암호화한다. 다른 태양에서, 두 LTR 모두에 인헨서-결실 U3 영역을 포함하는 벡터 RNA를 캡슐화하는 감염성 레트로바이러스 입자가 제공된다. 또 다른 태양에서, 상기 벡터는 하나 또는 두 개의 U3 영역이 인헨서가 결실된 RNA 또는 DNA 형태이다.

[0015] 또 다른 태양에서, 이중 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, 이중 유전자는 폴리펩티드를 암호화한다. 폴리펩티드는 임의의 목적 단백질, 예를 들면, 치료용 단백질 또는 마커 단백질일 수 있다. 한 태양에서, 이중 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 무린 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 패키징 세포주는 현재 당해 분야에 알려져 있는 임의의 세포주이거나, 또는 패키징 신호를 포함하는 레트로바이러스 벡터가 일단 세포에서 전사되면 레트로바이러스 벡터가 감염성 입자에 패키징되도록 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 무린 세포일 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다. 표적 세포는 1차배양 세포 또는 세포주일 수 있다.

[0020] 본 발명은 또한 이중 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 이중 내부 프로모터를 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다. 한 태양에서, 벡터는 이중 유전자에 작동 가능하게 연결된 이중 프로모터를 갖는 하나 또는 두 LTR 모두에 인핸서-결실 U3 영역을 포함하고 이중 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 이중 가닥 DNA로 전환된다. 바이러스의 상기 이중 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 비히클 뿐 아니라, RNA 또는 DNA 형태의 바이러스 벡터를 포함한다. 당업계에는 핵산을 조작하고, 반응요소 및 프로모터를 유전자 내 삽입하는 데 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, 엡스타인-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 스트레이타진(Stratagene)에서 시판하는 pW-LNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 및 pSG; 아머샴 파마시아 바이오테크(Amersham Pharmacia Biotech)에서 시판하는 pSVK3, pBPV, pMSG 및 pSVL; 및 클론테크(Clontech)에서 시판하는 pCMVdsRed2-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 생성할 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, 렌티바이러스, 예를 들면, HIV, 또는 임의의 다른 레트로바이러스를 기초로 할 수 있다. 이들 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( $\Psi$ ) 서열로도 지칭됨)를 사용한다. 또 다른 시스 요소, 예를 들면, 프라이머 결합 부위, 폴리퓨린 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, 인슐레이터 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 폴

리 A 신호는 "이중" 또는 "내인성"일 수 있다. 내인성 폴리 A 신호는 게놈에서 해당 유전자의 암호화 영역의 3' 말단에서 천연적으로 발견되는 것이다. 이중 폴리 A 신호는 한 유전자로부터 분리되어 또 다른 유전자의 3' 말단에 배치된 것이다. 통상적으로 사용되는 이중 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,  $\beta$ -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  $\beta$ -글로빈 인트론 및 인간 EF-1 $\alpha$  인트론(미국 특허 제 7,049,143 호)이 포함된다. 접합 신호는 1차 RNA 전사물로부터 인트론의 제거를 매개하며, 스플라이스(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), 뇌척수심근염 바이러스, 폴리오바이러스 및 RDV로부터 유래된 것들이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다[Scheber 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, 이중 유전자, 내부 리보솜 유입 부위 및 제 2 이중 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 식유, 동물, 식물 또는 합성 기원을 갖는 것들, 예를 들어, 낙화생유, 대두유, 광유, 호마유 등을 포함하여 물 및 오일과 같은 멸균 액체일 수 있다. 조성물을 정맥내 투여하는 경우 물이 바람직한 담체이다. 식염수액 및 텍스트로스와 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, 현탁액, 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.

[0044] U3 영역

[0045] 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 인헨서-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 인헨서-결실될 수 있으며, 이중 프로모터를 이용하여 전장 게놈 전사물이 생성될 수 있다.

[0046] "인헨서-결실된"은 본원에서 인헨서 내에서 및/또는 인헨서 주위에서 인헨서의 전체 또는 일부가 결실, 부가 및 또는 치환에 의해 변형되어 인헨서가 실질적으로 불활성화된 U3 영역을 말하기 위해 사용된다. 인헨서는 인헨서의 변형이 실질적으로 U3-유도된 전사물을 제거하기에 충분한 경우 실질적으로 불활성화되는 것으로 간주된다. 한 태양에서, 내부 프로모터-유도된 유전자 발현과 비교하여 전체 레트로바이러스 전사물의 1% 미만 이 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, 인헨서-결실된 U3 영역은 실질적으로 상기 영역에서 인헨서 및 프로모터 요소의 일부 또는 전체의 결실에 의해 불활성화된다. 또 다른 태양에서, U3 영역은 실질적으로 U3 영역에서 뉴클레오타이드의 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].

#### [0048] 내부 프로모터

[0049] 본 발명에서, 인헨서-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 인헨서/유비퀴틴 프로모터(서열번호: 3), 사이토메갈로바이러스 인헨서/닭 β-액틴(CAG) 프로모터(서열번호: 4), 인간 연장 인자 1 알파(EF-1α) 프로모터(서열번호: 5), 인간 β-액틴(ACTB) 프로모터(서열번호: 6), 인간 글리세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로게나제(GAPDH) 프로모터(서열번호: 7), 인간 리보솜 단백질 L10(RPL10) 프로모터(서열번호: 8), 인간 백혈구 수용체군 구성원 8(LENG8) 프로모터(서열번호: 9), 인간 넥신 부류 3(SNX3) 프로모터(서열번호: 10), 인간 CCR4-NOT 전사 복합체, 서브유닛 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 서브유닛 VII(UQCQRQ) 프로모터(서열번호: 17)를 포함하여 다양한 프로모터를 검사하였다. UQCQRQ, 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 인헨서-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 폴리뉴클레오타이드를 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, 뉴클레오타이드 서열 약 -50 내지 약 +143(대략 서열번호: 8의 뉴클레오타이드 951 내지 1143), 약 -100 내지 약 +143(대략 서열번호: 8의 뉴클레오타이드 901 내지 1143), 약 -200 내지 약 +143(대략 서열번호: 8의 뉴클레오타이드 801 내지 1143), 약 -350 내지 약 +143(대략 서열번호: 8의 뉴클레오타이드 651 내지 1143), 약 -500 내지 약 +143(대략 서열번호: 8의 뉴클레오타이드 501 내지 1143), 약 -1000 내지 약 +143(대략 서열번호: 8의 뉴클레오타이드 1 내지 1143) 또는 약 -350 내지 약 -1(대략 서열번호: 8의 뉴클레오타이드 651 내지 1001)을 포함하거나 또는 이들로 이루어진 RPL10 프로모터의 단편; 및 뉴클레오타이드 서열 약 -50 내지 약 +305(대략 서열번호: 9의 뉴클레오타이드 970 내지 1325), 약 -100 내지 약 +305(대략 서열번호: 9의 뉴클레오타이드 920 내지 1325), 약 -200 내지 약 +305(대략 서열번호: 9의 뉴클레오타이드 820 내지 1325), 약 -385 내지 약 +305(대략 서열번호: 9의 뉴클레오타이드

드 635 내지 1325), 약 -1020 내지 약 +305(대략 서열번호: 9의 뉴클레오타이드 1 내지 1325) 또는 약 -385 내지 약 +1(대략 서열번호: 9의 뉴클레오타이드 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 폴리뉴클레오타이드를 말한다. 프로모터의 변이체는 또한 상기 프로모터의 단편일 수 있다.

[0050] "높은 바이러스 역가"는 본원에서 인헨서-결실 U3 레트로바이러스 벡터가 두 LTR 모두에 작용성 비변형 U3 영역을 갖는 동일 벡터로서 상기 벡터를 함유하는 감염성 레트로바이러스 입자를 10% 이상 생성하는 것을 의미하기 위해 사용된다. 다른 태양에서, 인헨서-결실 U3 벡터의 역가는 U3-작용성 벡터와 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 루시페라제의 발현, 벡터에 의해 발현된 선택성 마커를 이용한 형질도입 세포의 선별, 또는 벡터에 의한 치료 유전자의 발현에 의해 이루어질 수 있다. 바이러스 역가를 측정하는 상기 많은 방법들이 당해 분야에 공지되어 있다.

[0051] "높은 수준의 이중 유전자 전사" 또는 "높은 수준의 유전자 발현"은 레트로바이러스 벡터에 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 벡터에서 동일 유전자의 전사 또는 발현의 10% 이상인 이중 유전자의 전사 또는 발현을 포함한다. 다른 태양에서, 인헨서-결실 U3 벡터에서 이중 유전자의 전사 또는 발현은 U3-작용성 벡터내 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 이중 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 작동가능하게 연결된 이중 유전자의 높은 수준의 전사를 유도해야 한다. 상기 프로모터는 또한 추가로 인헨서 요소를 포함할 수 있다. 프로모터 및 인헨서는 전사에 수반되는 세포 단백질과 특이적으로 상호작용하는 DNA 서열의 짧은 배열로 이루어진다[Maniatis et al., *Science* 236:1237, 1987]. 프로모터 및 인헨서 요소는 효모, 곤충 및 포유동물 세포, 및 바이러스의 유전자를 포함하여 다양한 진핵세포 공급원으로부터 분리되었다(유사한 조절 요소들이 또한 원핵세포에서도 발견된다). 특정 프로모터 및 인헨서의 선택은 목적 단백질을 발현하기 위해 어떤 세포 유형을 사용하는지에 따라 달라진다.

[0053] 프로모터, 인헨서 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 이중 유전자의 선택적 발현을 다른 유형의 조직(예를 들면, 폐)에서 동일한 목적 뉴클레오타이드 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 크면 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, 과중식 세포, 예를 들면, 암세포)에서 동일한 목적 뉴클레오타이드 서열의 발현보다 특정 유형의 세포에서 목적 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드의 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), UQCRQ 프로모터(서열번호: 17) 또는 ITGB4BP 프로모터(서열번호: 16)로부터 선택된다. 또 다른 태양에서, 내부 프로모터는 전장 프로모터



의 변이체이고 이중 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 연속관독(read-through)을 억제하는 것이다[Ramezani et al., *Mol. Ther.* 14:245, 2006].

[0056] 이중 유전자

[0057] 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.

[0058] 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 인헨서와 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.

[0059] 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 데옥시리보뉴클레오티드, 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 모니터링할 수 있는 단백질의 생성을 야기하는 임의의 유전자 서열이다. 리포터 유전자의 예로는 루시페라제(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, 유전자는 등록 번호 U43284; 많은 GFP 변이체가 캘리포니아주 팔로 알토 소재의 클론테크 래버러토리(CLONTECH Laboratories)에서 상업적으로 시판한다), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제,  $\beta$ -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<sup>-</sup> 세포주와 함께 사용되는 티미딘 키나제(tk) 유전자, CAD-결핍 세포와 함께 사용되는 CAD 유전자, 및 hprt<sup>-</sup> 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 이중 유전자를 혼입시켜, 그 안에 이중 핵산을 함유하는 감염된 숙주 세포의 수를 증폭시키는 수단을 제공한다. 이중 유전자의 혼입은 바이러스 입자내에서 이중 유전자의 복제, 및 그 안의 이중 전사물 또는 단백질의 후속 생성을 촉진한다. 유전자는 세포내에 유전자를 전달하기 위해 사용되는 벡터의 야생형에 천연적으로 존재하지 않는 경우 이중이라고 한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 이중 유전자는 핵산 분자를 말하기 위한 것이다.

[0064] 이중 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, 폴리뉴클레오타이드 서열은 RNA 서열에 상보성인 서열, 예를 들면, 안티센스 RNA 서열을 포함할 수 있으며, 상기 안티센스 서열은 개개인의 세포에서 상보성 폴리뉴클레오타이드의 발현을 억제하기 위해 개개인에 투여될 수 있다.

[0065] 이중 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] 이중 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 이중 유전자 실행 기술의 적절성을 결정할 수 있다. 예를 들면, 전문가라면 이중 유전자가 캡시드화에 적당한 크기를 가졌는지 및 이중 유전자 산물이 적절히 발현되지는 여부를 알 것이다.

[0067] 본 발명에 사용될 수 있는 특정 이중 유전자는 특별히 제한되지 않는다. 그러나, 한 태양에서, 이중 유전자는 사이토카인, 케모카인, 호르몬, 항체, 조작된 면역글로불린-유사 분자, 단일쇄 항체, 융합 단백질, 효소, 면역성 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, 혈관형성 단백질 및 펩티드, 항바이러스 단백질 또는 그의 변이체를 암호화한다.

[0068] 다른 태양에서, 이중 유전자는 다음을 포함하나 이들로 한정되지는 않는 폴리펩티드를 암호화할 수 있다: 면역글로불린, 에리트로포이에틴, 알파-인터페론, 알파-1 프로테이나제 억제제, 안지오게닌, 항트롬빈 III, 베타산테카복실라제, 인간 성장 호르몬, 소 성장 호르몬, 돼지 성장 호르몬, 인간 혈청 알부민, 베타-인터페론, 송아지 장 알칼리 포스파타제, 낭포성 섬유증 막통과 조절제, 인자 VIII, 인자 IX, 인자 X, 인슐린, 락토페린, 조직플라스미노겐 활성화제, 미엘린 염기성 단백질, 인슐린, 프로인슐린, 프로락틴, 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 이노 인자; 폐 표면활성제; 유로키나제; 보메신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 엔케팔리나제; 인간 대식세포 염증 단백질(MIP-1-알파); 혈청 알부민, 예를 들면, 필러관-억제 물질; 림프신 A-쇄; 림프신 B-쇄; 프로틸렉신; 마우스 성선자극호르몬-관련 펩티드; 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 항신경성 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- $\alpha$ , 및 TGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  2, TGF- $\beta$  3, TGF- $\beta$  4 또는 TGF- $\beta$  5를 포함하여 TGF- $\beta$ ; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 II(IGF-I 및 IGF-II); 데스(1-3)-IGF-I(및 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질; CD 단백질, 예를 들면, CD-3, CD-4, CD-8 및 CD-19; 골유도 인자; 면역독소; 골형성 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 디스무타제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 부패 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 융합체. 다른 태양에서, 이중 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 폴리시스트로닉 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 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열이 천연에서 발견되는 서열과 동일하다는 것이다.

[0071] "변이체"는 실질적으로 유사한 서열을 포함한다는 것이다. 따라서, 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 서열은 또한, 예를 들면, 부위 지향 돌연변이유발에 의해 생성되었지만, 여전히 천연 서열의 기능을 보유하는 합성적으로 유도된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일반적으로, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열 변이체 또는 아미노산 서열 변이체는 그 각각의 천연 뉴클레오타이드 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 모든 가능한 침묵 변이를 기술한다. 숙련된 자라면 핵산에서 각각의 코돈(통상적으로 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG 제외)이 표준 기술에 의해 변형되어 기능적으로 동일한 분자를 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:

[0073] 1) 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T);

- [0074] 2) 아스파르트산(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 참조하십시오. 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 올리고뉴클레오타이드를 이용한 PCR 증폭, 돌연변이체 또는 방사선에 핵산 함유 세포의 노출, 목적 올리고뉴클레오타이드의 화학적 합성(예를 들면, 거대 핵산을 생성하기 위한 집합 및/또는 클로닝과 함께), 및 다른 공지된 기술이 포함된다.
- [0082] 천연 뉴클레오타이드 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. 뉴클레오타이드 서열의 변이체는 1 내지 30개 뉴클레오타이드 정도, 예를 들면, 6 내지 20개, 5개 정도, 4, 3, 2 또는 심지어 1개의 뉴클레오타이드 잔기만큼 상이할 수 있다.
- [0083] "서열 동일성"은 변이체의 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열의 특정한 인접 단편을 정렬하고 기준 서열의 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열과 비교할 때 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기가 변이체 서열 및 기준 서열내에서 발견되는 것이다. 서열 정렬 및 서열간 동일성 측정 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 2개 뉴클레오타이드 서열의 최적 정렬과 관련하여, 변이체 뉴클레오타이드 서열의 인접 단편은 기준 뉴클레오타이드 서열과 관련하여 부가적 뉴클레오타이드 또는 결실된 뉴클레오타이드를 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 뉴클레오타이드 서열 또는 기준 아미노산 서열과 비교하기 위해 사용된 인접 단편은 20개 이상의 인접 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기를 포함할 것이며, 30, 40, 50, 100개 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기일 수 있다. 변이체 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열에서 갭(gap)의 혼입과 관련된 증가된 서열 동일성에 대한 조정은 갭페널티(gap penalty)를 지정함으로써 수행될 수 있다.
- [0084] 세포
- [0085] 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 세포도 또한 포함된다. 한 태양에서, 인헨서-결실 U3 레트로바이러스 벡터를 포함하는 세포도 또한 포함된다. 본 발명의 발현 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.
- [0086] 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 레트로바이러스



스 *gap-pol* 및 *env* 유전자를 포함한다. 많은 상기 패키징 세포, 예를 들면, PG13,  $\psi$ CRIP, 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 게놈 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), 자가지향성(ecotropic) 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMuLV), 10A1 뮤린 백혈병 바이러스, 몰로니 밍크 세포 포커스-유발 바이러스(MCFV), 무스 듀니(Mus dunni) 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 게놈 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.

[0088] 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 배양액중 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, 레트로벡틴 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 이중 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 이중 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 않는 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, 검자, 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, "폴리뉴클레오타이드"에 대한 언급은 폴리뉴클레오타이드들을 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 숙련된 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: ACGCGTAGATCTGAATTCTACCCGGGCGACGCAGT(SEQ ID NO:19)

MluI BglIII EcoRI

[0106]

[0107]

[0108]

200 ng의 주형 플라스미드 DNA 및 1  $\mu$ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ $\mu$ l)를 함유하는 PCR 반응액 100  $\mu$ l를 확장 고성능(Expand High Fidelity) PCR 시스템(Cat# 92351824, 로슈(Roche))에 의해 35 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95  $^{\circ}$ C에서 30 초(변성), 55  $^{\circ}$ C에서 30 초(어닐링) 및 72  $^{\circ}$ 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: TCTAGAGCCAAAACAACTCCCAT (SEQ ID NO:21)

XbaI

[0113]

[0114]

200 ng의 주형 플라스미드 DNA 및 2  $\mu$ l의 각각의 프라이머(5 피코몰/ $\mu$ l)를 함유하는 PCR 반응액 50  $\mu$ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 94  $^{\circ}$ C에서 1 분(변성), 55  $^{\circ}$ C에서 1 분(어닐링) 및 72  $^{\circ}$ 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: GCTAGCGCCTCCGCGCCGGGTTT (SEQ ID NO:22)

NheI

KMD5: ACGCGTAGATCTGAATTCGTCTAACAAAAAAGCCAA(SEQ ID NO:23)

MluI BglIII EcoRI

[0118]

[0119]

200 ng의 주형 DNA 및 2  $\mu$ l의 각각의 프라이머(5 피코몰/ $\mu$ l)를 함유하는 PCR 반응액 50  $\mu$ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 94  $^{\circ}$ C에서 1 분(변성), 55  $^{\circ}$ C에서 1 분(어닐링) 및 72  $^{\circ}$ C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.

[0120]

1230 bp의 증폭된 단편을 pGEM T easy 벡터내에 클로닝하여 pGEM T-UbC를 수득하였다. 뉴클레오티드 서열은 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, 닭  $\beta$ -액틴 프로모터) 프로모터(서열번호: 4)
- [0124] CAG 프로모터(사이토메갈로바이러스 인핸서, 닭  $\beta$ -액틴 프로모터)(서열번호: 4)를 획득하기 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- $\alpha$ ) 프로모터(서열번호: 5)[Kim et al., *Gene* 91:217, 1990]
- [0126] 인간 연장 인자 1 알파(EF1- $\alpha$ ) 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: ACGCGTGTAAAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCACG  
MluI (SEQ ID NO:24)
- EEF1A1R: GGATCCTTTTGGCTTTTAGGGGTAGTTTTCACGACACC  
BamHI (SEQ ID NO:25)
- [0127]
- [0128] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1  $\mu$ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ $\mu$ l) 및 5  $\mu$ l의 DMSO(다이메틸 설펍사이드)를 함유하는 PCR 반응액 50  $\mu$ l를 확장 고성능 PCR 시스템(Cat# 92351824, 로슈)에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95  $^{\circ}$ C에서 1 분(변성), 55  $^{\circ}$ C에서 1 분(어닐링) 및 72  $^{\circ}$ C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.
- [0129] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy 벡터내에 클로닝하여 pGEM T easy-EF를 획득하였다. 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  $\beta$ -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: GGATCCGGTGAGCTGCGAGAATAGCCG (SEQ ID NO:27)  
BamHI
- [0132]
- [0133] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1  $\mu$ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ $\mu$ l) 및 5  $\mu$ l의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50  $\mu$ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95  $^{\circ}$ C에서 1 분(변성), 55  $^{\circ}$ C에서 1 분(어닐링) 및 72  $^{\circ}$ C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.
- [0134] 증폭된 단편을 pGEM T easy에 클로닝하여 pGEM T easy-BA를 획득하였다. 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: ACGCGTTTCATCCAAGCGTGTAAGGG (SEQ ID NO:28)  
MluI  
GAPDHR: GTTTAAACGGTGTCTGAGCGATGTGGCT (SEQ ID NO:29)  
PmeI

[0137]

[0138] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1  $\mu$ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ $\mu$ l) 및 5  $\mu$ l의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50  $\mu$ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95  $^{\circ}$ C에서 1 분(변성), 55  $^{\circ}$ C에서 1 분(어닐링) 및 72  $^{\circ}$ 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: ACGCGTAGGCCACCTAGGGTACTTTCCTTT (SEQ ID NO:30)  
MluI  
RPLR: GGATCCGGCGACACCAGGATCTTCAGTGGCT (SEQ ID NO:31)  
BamHI

[0142]

[0143] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1  $\mu$ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ $\mu$ l) 및 5  $\mu$ l의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50  $\mu$ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95  $^{\circ}$ C에서 1 분(변성), 55  $^{\circ}$ C에서 1 분(어닐링) 및 72  $^{\circ}$ 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: ACGCGTAGAATTGTTTGAACCCAGGAGGCGG (SEQ ID NO:32)  
MluI  
LENG8R1: GTTTAAACAAAGTAGAAGACGACGGCGCACGCG  
PmeI (SEQ ID NO:33)  
LENG8F2: GTTTAAACCCACACCCAGAACTCTTCAGATCCT  
PmeI (SEQ ID NO:34)  
LENG8R2: GAATTCCTGGACCTTGGGGTATAAGGGGTGG (SEQ ID NO:35)  
EcoRI

[0147]

[0148] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1  $\mu$ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ $\mu$ l) 및 5  $\mu$ l의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50  $\mu$ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95  $^{\circ}$ C에서 1 분(변성), 55  $^{\circ}$ C에서 1 분(어닐링) 및 72  $^{\circ}$ C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.

[0149] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy 내에 클로닝하여 pGEM T easy-LENG1 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 넥신 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(넥신 부류 3) 프로모터(-353 ~ +338)를 주형으로 HT1080 세포로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- SNX3F: GAATTCAATCCAGACGCGTGTCTGGTGCAA (SEQ ID NO:36)  
EcoRI
- SNX3R: GGATCCTTCGCTGTAGCTGCTG (SEQ ID NO:37)  
BamHI
- [0152]
- [0153] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1  $\mu$ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ $\mu$ l) 및 5  $\mu$ l의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50  $\mu$ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95  $^{\circ}$ C에서 1 분(변성), 55  $^{\circ}$ C에서 1 분(어닐링) 및 72  $^{\circ}$ C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.
- [0154] 증폭된 단편을 pGEM T easy 내에 클로닝하여 pGEM T easy-SNX를 획득하였다. 뉴클레오티드 서열은 서열분석에 의해 확인하였다.
- [0155] (11) 인간 CNOT3(서열번호: 11)(CCR4-NOT 전사 복합체, 서브유닛 3) 프로모터(NCBI 등록 번호: NM\_014516; [Albert et al., *Nucleic Acids Res.* 28:809, 2000])
- [0156] 인간 CNOT3(CCR4-NOT 전사 복합체, 서브유닛 3) 프로모터(-350 ~ +654, +5076 ~ +5266)를 주형으로 HT1080 세포로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- CNOT3F1: ACGCGTGTAGCTCCTCCCCAGACCAATTGTTTAAAG  
MluI (SEQ ID NO:38)
- CNOT3R1: GGATCCTCCATCCTTCCAGCCAGGAGCCAATACCGAC  
BamHI (SEQ ID NO:39)
- CNOTF2: AGATCTTGGGGCTGGTCTCTTGTCTAGATAGC (SEQ ID NO:40)  
BglII
- CNOTR2: GGATCCCTTCCCTGCCCTACAGACGCACTCT (SEQ ID NO:41)  
BamHI
- [0157]
- [0158] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1  $\mu$ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ $\mu$ l) 및 5  $\mu$ l의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50  $\mu$ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95  $^{\circ}$ C에서 1 분(변성), 55  $^{\circ}$ C에서 1 분(어닐링) 및 72  $^{\circ}$ C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.
- [0159] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy 내에 클로닝하여 pGEM T easy-CNOT1 및 CNOT2를 각각 획득하였다. 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: ACGCGTGTCCATTTAATCCTCAAAAACTTA (SEQ ID NO:42)  
MluI
- CPNE1R1: GGATCCTTTTTACTGCAGTCCCCGTTATTAGCTC  
BamHI (SEQ ID NO:43)
- CPNE1F2: AGATCTAGCTGTGAAGCTGAGCTTTATGACT (SEQ ID NO:44)  
BglII
- CPNE1R2: GGATCCCTGATAAAACAAGAGATGAATTTC (SEQ ID NO:45)  
BamHI
- [0162]

- [0163] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1  $\mu$ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ $\mu$ l) 및 5  $\mu$ l의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50  $\mu$ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95  $^{\circ}$ C에서 1 분(변성), 55  $^{\circ}$ C에서 1 분(어닐링) 및 72  $^{\circ}$ C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.
- [0164] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy내에 클로닝하여 pGEM T easy-CPNEF 및 CPNER을 각각 수득하였다. 뉴클레오타이드 서열을 확인한 후, pGEM T easy-CPNEF의 MluI-BamHI 단편을 pGEM T easy-CPNER의 MluI-BglIII 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 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다:
- HYPOF: ACGCGTTCTTTTACACGTTTGGTTTATGGT (SEQ ID NO:46)  
MluI  
HYPOR: GGATCCGGCTGCAACAGGCCAGGAAACCTTC (SEQ ID NO:47)  
BamHI
- [0167]
- [0168] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1  $\mu$ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ $\mu$ l) 및 5  $\mu$ l의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50  $\mu$ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95  $^{\circ}$ C에서 1 분(변성), 55  $^{\circ}$ C에서 1 분(어닐링) 및 72  $^{\circ}$ C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.
- [0169] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy내에 클로닝하여 pGEM T easy-HYPO를 수득하였다. 뉴클레오타이드 서열을 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 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다:
- DKC1F: ACGCGTGACACTACTCCTATTGGC (SEQ ID NO:48)  
MluI  
DKC1R: GAATTCGTTACCTGCACCGCGTGC (SEQ ID NO:49)  
EcoRI
- [0172]
- [0173] 500 ng의 주형 게놈 DNA, 1  $\mu$ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ $\mu$ l) 및 5  $\mu$ l의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50  $\mu$ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95  $^{\circ}$ C에서 1 분(변성), 55  $^{\circ}$ C에서 1 분(어닐링) 및 72  $^{\circ}$ C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.
- [0174] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy 내에 클로닝하여 pGEM T easy-DKC1을 수득하였다. 뉴클레오타이드 서열을 서열 분석에 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 뉴클레오타이드 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  $\mu$ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ $\mu$ l) 및 5  $\mu$ l의 DMSO를 함유하는 PCR 반응액 50  $\mu$ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95  $^{\circ}$ C에서 1 분

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

- [0179] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy 내에 클로닝하여 pGEM T easy-VPS72를 획득하였다. 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: GTTTAAACGAGGCCTAGGGGCGGCGGAGGCGGGAGTTCAA  
PmeI (SEQ ID NO:53)
- [0182]
- [0183] 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 ℃에서 1 분(변성), 55 ℃에서 1 분(어닐링) 및 72 ℃에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.
- [0184] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy 내에 클로닝하여 pGEM T easy-ITGB4BP를 획득하였다. 뉴클레오티드 서열을 서열분석에 의해 확인하였다.
- [0185] (17) 인간 UQCRQ(유비퀴놀-사이토크롬 c 리덕타제, 복합체 III 서브유닛 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 III 서브유닛 VII) 프로모터(-350 ~ +217)를 주형으로 HT1080 세포로부터 분리된 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머쌍의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- UQCRQF: ACGCGTGTACCTTTTGTTCCTCCC (SEQ ID NO:54)  
MluI
- UQCRQR: GTTTAAACTGTGGCGGCGGCCCTGCAGG (SEQ ID NO:55)  
PmeI
- [0187]
- [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 ℃에서 1 분(변성), 55 ℃에서 1 분(어닐링) 및 72 ℃에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.
- [0189] 증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy 내에 클로닝하여 pGEM T easy-UQCRQ를 획득하였다. 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 획득하였다. PCR에 사용된 프라이머의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:



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

[0194]

[0195]

100 ng의 주형 pAxCawt DNA(1  $\mu$ l), 1  $\mu$ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ $\mu$ l) 및 5  $\mu$ l의 dNTP(10 mM)를 함유하는 PCR 반응액 50  $\mu$ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95  $^{\circ}$ C에서 1 분(변성), 55  $^{\circ}$ C에서 1 분(어닐링) 및 72  $^{\circ}$ C에서 1 분 30 초(중합)동안 수행되었다.

[0196]

증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy내에 클로닝하여 pGEM T easy-RGpA를 획득하였다. 뉴클레오타이드 서열을 서열 분석에 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 획득하였다. pS-GFP-RGpA를 제작하기 위해, pS-LND-GFP-n의 EcoRI-XhoI 단편을 평활하게 만든 후 pGEM T easy-RGpA의 평활화 BamHI 부위내에 클로닝하였다.

[0198]

## 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 FACSsort(벡톤 디킨슨, 미국 캘리포니아주 로스앤젤레스)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
UQCRC	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: ACGCGTACGCGCGCAGACAGACCGCCTATATAAGCCAT  
MluI (SEQ ID NO:58)  
RPL F100: ACGCGTTGACGTCTGACAGAGCGTCCACCCGTCTTCG  
MluI (SEQ ID NO:59)  
RPL F200: ACGCGTCTGGCCGCCCGCGGCCCTGGTACCCGGTCACC  
MluI (SEQ ID NO:60)  
RPL F500: ACGCGTGTCTCCCCCTCCGGCCTCCCGGGTTGACAAAGG  
MluI (SEQ ID NO:61)  
RPL F1000: ACGCGTGTGCGCTCGAGCAGGATTTCTCTCCCGTCCTTCC  
MluI (SEQ ID NO:62)  
RPLR: GGATCCGGCGACACCAGGATCTTCAGTGGCT (SEQ ID NO: 31)  
BamHI  
RPL R TSS: GGATCCCGCGCTCTCCGCCTGCGCATGGCTTATATA  
BamHI (SEQ ID NO:63)

[0207]

[0208] 1  $\mu$ g의 주형 게놈 DNA, 1  $\mu$ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ $\mu$ l) 및 5  $\mu$ l의 dNTP(10 mM)를 함유하는 PCR 반응액 50  $\mu$ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 95  $^{\circ}$ C에서 1 분(변성), 60  $^{\circ}$ C에서 1 분(어닐링) 및 72  $^{\circ}$ 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 획득하였다.

[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 획득하였다.

[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 획득하였다.

[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 획득하였다.

[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 획득하였다.

[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 획득하였다.

[0216] 뉴클레오티드 서열은 서열분석에 의해 확인하였다.

[0217] (2) RPL 프로모터를 함유하는 일련의 eGFP 발현 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 획득하였다.

[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 획득하였다. 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: ACGCGTTGGCGTTCATTGGCTGTGCAGGGCC (SEQ ID NO:65)

Mlu I

LENG F200: ACGCGTTTGTCCCTCGGGGCCACCGTCCCC (SEQ ID NO:66)

Mlu I

LENG F1000: ACGCGTTTGTATCAGAGTCCTGGACGGAAAC (SEQ ID NO:67)

Mlu I

LENG8R1: GTTTAAACAAAGTAGAAGACGACGGCGCACGCG (SEQ ID NO:33)

Pme I

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

Pme I

[0222]

[0223]

1  $\mu$ g의 주형 게놈 DNA, 1  $\mu$ l의 각각의 프라이머(10 피코몰/ $\mu$ l) 및 5  $\mu$ l의 dNTP(10 mM)를 함유하는 PCR 반응액 50  $\mu$ l를 확장 고성능 PCR 시스템에 의해 30 주기의 PCR 증폭 반응에 적용하였다. 각각의 주기는 94  $^{\circ}$ C에서 1 분(변성), 55  $^{\circ}$ C에서 1 분(어닐링) 및 72  $^{\circ}$ C에서 2 분(중합)동안 수행되었다.

[0224]

L50 단편(-50 ~ +305)(서열번호: 9의 뉴클레오티드 970 내지 1325)을 프라이머쌍 LENG F50 및 LENG8R1을 사용하여 증폭시키고 pGEM T easy에 클로닝시켜 pGem T easy-pL50을 획득하였다.

[0225]

L100 단편(-100 ~ +305)(서열번호: 9의 뉴클레오티드 920 내지 1325)을 프라이머쌍 LENG F100 및 LENG8R1을 사용하여 증폭시키고 pGEM T easy에 클로닝시켜 pGem T easy-pL100을 획득하였다.

[0226]

L200 단편(-200 ~ +305)(서열번호: 9의 뉴클레오티드 820 내지 1325)를 프라이머쌍 LENG F200 및 LENG8R1을 사용하여 증폭시키고 pGEM T easy에 클로닝시켜 pGem T easy-pL200을 획득하였다.

[0227]

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

[0228]

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.

[0229]

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.

[0230]

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

[0231]

(2) LENG 프로모터를 함유하는 일련의 eGFP 발현 벡터의 제작

[0232]

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 획득하였다. 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.

[0233]

### 3. eGFP 발현의 분석

[0234]

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 48 시간후에, 293 T 세포를 수확하고 0.1% 나트륨 아지드를 함유하는 PBS로 1회 세척하였다. 이어서, 세포를 PBS에 재현탁시키고, 셀렉스트 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 활성화에 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 프로모터들에서 최고의 프로모터 활성을 나타내었다. 또한, 프로모터 활성은 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]

U3이 결실된 레트로바이러스 플라스미드를 제작하였다. 먼저, MLV의 정상적 3' LTR을 주형으로 pMT([Hong et al., *J. Gene Med.* 6:724, 2004]; 미국 특허 제 6,451,595 호)를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머 쌍의 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다:

SCV3LB: GGATCCCTCGAGCGATAAAATAAAAGATTTTATTAGTCTCC  
BamHI XhoI (SEQ ID NO:69)

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

[0243]

[0244]

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: GAATTCGTCGACTGAAAGACCCCGCTGACGG (SEQ ID NO:70)  
EcoRI SalI
- [0246]
- [0247] 증폭된 단편은 초기에 pGEM T easy에 클로닝하여 pGEM T easy-3'dLTR-1을 수득하였다. NheI-SalI 단편을 pGEM T easy-3'LTR의 NheI-SalI 부위에 클로닝하여 pPreSIN2를 수득하였다. pPreSIN2로부터 BamHI-SalI 단편을 pMT의 BamHI-SalI 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: ACGCGTTTAAACCGCGGAATTCGGATCCACATCGTG  
MluI SacII BamHI (SEQ ID NO:72)
- NEWMCSR: CTCGAGATCTAGGCCTCACGATGTGGATCCGAATTC  
XhoI StuI DraIII EcoRI (SEQ ID NO:73)
- [0250]
- [0251] MluI, PmeI, SacII, EcoRI, BamHI, DraIII, StuI, BglII 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 래버러토리, 미국 캘리포니아주 팔로 알토, Cat.#6029-1)로부터 eGFP 유전자를 증폭시켰다:
- eGFP5: ACGCGTGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG 3'  
MluI BamHI (SEQ ID NO:74)
- eGFP3: CTCGAGAGATCTTTACTTGTACAGCTCGTC 3' (SEQ ID NO:75)  
XhoI BglII
- [0255]
- [0256] 증폭된 eGFP 서열을 pGEM T easy에 클로닝하여 pGEM T easy-eGFP를 생성하였다. BamHI-BglII 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-BglII 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 pC-D-GFP를 수득하였다. pGEM T Easy-MTU3으로부터의 MluI 단편을 pI-D-GFP의 MluI 부위에 삽입하여 pM-D-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 오즈)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-UQCRQ로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-ND-GFP의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pU-ND-GFP를 수득하였다.

[0262] 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  $\mu$ m 여과지를 통해 여과시켜 무세포 바이러스액을 제조하고,  $2 \times 10^5$  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, 셀렉스트(백톤 디킨슨) 데이터 획득 및 분석용 소프트웨어를 사용하여 FACSort(백톤 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 나타난 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 발현을 비교

	HT1080		K562	
	GFP <sup>+</sup> 세포의 상대%	상대 평균 형광강도	GFP <sup>+</sup> 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 벡터를 시험하였다. 결과는 표 4에 나타내었다.

**표 4**

GFP 발현을 비교

	HT1080		K562	
	GFP <sup>+</sup> 세포의 상대%	상대 평균 형광강도	GFP <sup>+</sup> 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]

[0269] 표 4에 나타낸 바와 같이, HCMV 프로모터는 HT1080 및 K562 세포 모두에서 최고 수준의 유전자 발현(평균 형광강도 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 벡터 시스템에서의 유전자 발현에 사용될 수 있다. 또한, GAPDH, UQCRCQ, ITGB4BP 및 SNX3 프로모터는 비교적 높은 바이러스 역가(CMV 프로모터의 80% 이상)를 제공하였다.

[0270] CA-ND-GFP 및 E-ND-GFP 벡터는 K562 세포에서 최고 수준의 GFP 발현을 제공하였으나, 이들 벡터로부터의 바이러스 역가는 매우 낮아서 이들 벡터의 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 벡터의 제작

[0274] (1) gp91-phox 유전자(NCBI 등록번호: NM\_000397)

[0275] 인간 gp91-phox를 발현하는 레트로바이러스 벡터를 제작하기 위해, gp91 cDNA를 인간 말초혈 림프구의 전체 RNA로부터 RT-PCR에 의해 클로닝하였다. 이 단계에서 사용된 프라이머의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

GP91F: GGATCCATGGGGAACTGGGCTGTGAAT (SEQ ID NO:76)

BamHI

GP91R: GGATCCCTCGAGTTAGAAAGTTTTCCTTGTTGAAAA

BamHI XhoI (SEQ ID NO:77)

[0276]

[0277]

증폭된 단편을 초기에 pGEM T easy에 클로닝하여 pGEM T easy-gp91을 생성하고 그 뉴클레오타이드 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  $\mu$ m 여과지를 통해 여과시켜 무세포 바이러스액을 제조하고, K562 세포의 형질도입에 사용하였다.

[0286]

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

[0287]

gp91 단백질 발현은 유세포분석으로 분석하였다. K562 또는 PLB-985/gp91<sup>-/-</sup> 세포를 형질도입한지 2일후에 수확하고 PBS로 세척하였다. 이어서, 세포를 100  $\mu$ l PBS에 재현탁하고, 4  $^{\circ}$ C에서 1  $\mu$ l의 항-gp91 항체(7D5; MBL, 일본)로 30 분간 염색하였다. 이어서, 세포를 PBS로 2회 세척하고, 100  $\mu$ l의 PBS에 재현탁하고, 4  $^{\circ}$ C에서 양으로부터 수득된 FITC-결합 항-마우스 항체(서던 바이오테크놀로지 어쇼시에이즈 인코포레이티드(Southern Biotechnology Associates, Inc.), 미국 앨라배마주 버밍햄) 1  $\mu$ l로 30 분간 염색하였다. 이어서, 세포를 PBS로 3회 세척하고 500  $\mu$ l의 PBS에 현탁하였다. 셀렉스트(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 벡터는 gp91 양성 세포를 생성하지 않았다(표 4).

## 표 5

### gp91 발현 비교

	K562	
	gp91 <sup>+</sup> 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 벡터를 제작하고, gp91 유전자 발현에 대한 효과를 확인하였다. 또한, RPL1000 프로모터 유도된 gp91 유전자 발현 카세트가 역방향으로 삽입된 레트로바이러스 벡터 pR1000-LND-gp91-n-rev를 제작하고, gp91 유전자 발현을 비교하였다. 결과는 표 6에 나타내었다.

## 표 6

### gp91 발현 비교

	K562	
	gp91 <sup>+</sup> 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 벡터는 R-LND-gp91-n 벡터와 비교하여 필적하는 수준의 바이러스 역가(gp91<sup>+</sup> 세포의 %) 및 더 높은 수준의 gp91 유전자 발현(상대 평균 형광 강도)을 제공할 수 있었다. R1000-LND-gp91-n-rev 벡터는 최고 수준의 gp91 유전자 발현을 유도할 수 있었지만, 그로부터 제공된 바이러스 역가는 R-LND-gp91-n의 절반이었다.

[0293]

### 실시예 6

[0294]

본 발명의 레트로바이러스 벡터는 생체의(ex vivo) 유전자 전달에 사용될 수 있다.

[0295]

CD34<sup>+</sup> 조혈모세포를 대상으로부터 수거하였다. CD34<sup>+</sup> 세포의 공급원은 골수 흡출물 또는 가동화 말초혈일 수 있다. 수거된 CD34<sup>+</sup> 세포를, 37 °C에서 5% CO<sub>2</sub>(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-자극된 세포를 레트로벡터-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 게놈에 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' GCTCTCCGCTCACGTGTGATCAATTTAAATTTTCGAA  
           SapI        PmlI            BclI        SmaI        BstBI (SEQ ID NO:78)  
 L1R: 5' AGCGGAAGAGCTTCGAAATTTAAATTGATCACACGTG  
           SapI                    BstBI        SmaI        BclI        PmlI (SEQ ID NO:79)  
 L2F: 5' AGGCCTGGTCACCGGCCATTATGGCCACGTGATCATTTAAATTTG  
           StuI        BstEII        SfiI                            BclI  
 AAGCATTTATCAGGGTTA (SEQ ID NO:80)  
 L2R: 5' TATTCGCGCGTTTCGGTGATGAATATT (SEQ ID NO:81)

[0303] SspI

[0304] SapI, PmlI, BclI, SmaI, 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, SmaI 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 게놈 내부에 약물-내성 유전자를 갖는 것은 바람직하지 않은데, 그 이유는 내부에 포함되는 경우 상기 유전자가 생체내로 발현될 것이기 때문이다. 그러므로, 레트로바이러스 게놈의 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  $\beta$ -액틴 프로모터를 K562로부터의 게놈 DNA를 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- BAPF: 5' GTCGACATTAATGCCGGTGAGTGAGCGGCGCGGGGCCAA  
SalI PshBI (SEQ ID NO:82)
- BAPR: 5' GGATCCGGTGGCGCGTCGCGCCGCTGGGTTT (SEQ ID NO:83)  
BamHI
- [0309]
- [0310] 증폭된 단편을 pGEM T easy에 클로닝하여 pGEM T easy-pBA를 획득하였다.
- [0311] 세균성 Neo 암호화 유전자를 pcDNA 3.1(인비트로젠(Invitrogen), 미국 캘리포니아주)을 사용하여 증폭시켰다. PCR에 사용된 프라이머의 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:
- NeoF: 5' AGATCTATGGGATCGGCCATTGAACAA (SEQ ID NO:84)  
BglII
- pAR: 5' CATATGTCATAATCAGCCATACCACATTT (SEQ ID NO:85)  
NdeI
- [0312]
- [0313] 증폭된 단편을 pGEM T easy에 클로닝하여 pGEM T easy-Neo를 획득하였다.
- [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: CATATGAGTAATCAGCCATACCACATTT (SEQ ID NO:87)  
NdeI
- [0315]
- [0316] 증폭된 단편을 pGEM T easy에 클로닝하여 pGEM T easy-pA를 획득하였다.
- [0317] 뉴클레오티드 서열을 확인한 후, pGEM T easy-pA로부터 획득된 XhoI-NdeI 단편을 pGEM T easy-Neo의 XhoI-NdeI 부위에 삽입하여 pGEM T easy-NeopA를 획득하였다. BglII-NdeI 단편을 pGEM T easy-pBA의 BamHI-NdeI 부위에 클로닝하여 pGEM T easy-pBA-Neo-pA를 획득하였다. MluI-EcoRI-클레나우-처리된 단편을 pI-LND의 SspI 부위에 클로닝하여 pI-LND-n을 획득하였다.
- [0318] (2) eGFP 유전자를 함유하는 레트로바이러스 벡터의 제작
- [0319] 2-1) pI-LND-GFP-n
- [0320] pGem T easy-eGFP(실시에 2에서 기술)로부터 획득된 BamHI-BglII 단편을 pI-LND-n의 BamHI 부위에 클로닝하여 pI-LND-GFP-n을 획득하였다.
- [0321] 2-2) eGFP 유전자를 함유하는 레트로바이러스 벡터의 제작
- [0322] 실시예 1의 다양한 내부 프로모터를 GFP 서열을 함유하는 레트로바이러스 벡터 각각에 클로닝하였다.
- [0323] pCN 플라스미드로부터의 MluI-BamHI 단편, HCMV IE 프로모터를 pI-LND-GFP-n의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pC-LND-GFP-n을 획득하였다. pGEM T easy-GAPDH로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-LND-GFP-n의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pG-LND-GFP-n을 획득하였다. pGEM T easy-RPL로부터의 MluI-BamHI 단편을 pI-LND-GFP-n의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pR-LND-GFP-n을 획득하였다. pGEM T easy-LENG8로부터의 MluI-EcoRI 단편을 pI-LND-GFP-n의 MluI-EcoRI 부위에 클로닝하여 pL-LND-GFP-n을 획득하였다. pGEM T easy-SNX로부터의 EcoRI-BamHI 단편을 pI-LND-GFP-n의 EcoRI-BamHI 부위에 클로닝하여 pS-LND-GFP-n을 획득하였다. pGEM T easy-ITGB4BP로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-LND-GFP-n의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pIT-LND-GFP-n을 획득하였다. pGEM T easy-UQCQR로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-LND-GFP-n의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pU-LND-GFP-n을 획득하였다.

- [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 획득하였다. pGEM T easy-GAPDH로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-LND의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pG-LND를 획득하였다. pGEM T easy-RPL로부터의 MluI-BamHI 단편을 pI-LND의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pR-LND를 획득하였다. pGEM T easy-LENG8로부터의 MluI-EcoRI 단편을 pI-LND의 MluI-EcoRI 부위에 클로닝하여 pL-LND를 획득하였다. pGEM T easy-SNX로부터의 EcoRI-BamHI 단편을 pI-LND의 EcoRI-BamHI 부위에 클로닝하여 pS-LND를 획득하였다. pGEM T easy-ITGB4BP로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-LND의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pIT-LND를 획득하였다. pGEM T easy-UQCQRQ로부터의 MluI-PmeI 단편을 pI-LND의 MluI-PmeI 부위에 클로닝하여 pU-LND를 획득하였다. pGEM T easy-pR1000으로부터의 MluI-BamHI 단편을 pI-LND의 MluI-BamHI 부위에 클로닝하여 pR1000-LND를 획득하였다.
- [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 획득함으로써 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 획득함으로써 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  $\mu$ g의 레트로바이러스 플라스미드를 제한효소(SwaI)로 16 시간동안 처리하였다. 레트로바이러스 벡터를 함유하는 DNA 단편을 아가로스 겔로부터 전개시키고 침전시키고 30  $\mu$ l의 증류수에 재현탁하였다. DNA 농도를 측정된 후, 전기천공에 사용하였다.
- [0337] (2) 전기천공
- [0338] PG13 세포주를 전기천공에 사용하였다.  $7.5 \times 10^5$  세포를 0.5 ml 부피의 무혈청 DMEM 배지중에서 0.4-cm 큐벳(바이오-레드 래버러토리즈, 헤르클레스, 캘리포니아주)에 가하고 전기천공하기 전에 5 분동안 10  $\mu$ l(1  $\mu$ g/ $\mu$

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

[0339] (3) 선별

[0340] 전기천공 후 G-418( $1 \mu\text{g/ml}$ 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  $5 \times 10^6$  세포를 10% 프리미엄 FBS를 함유한 DMEM 배지중에서 100 mm 접시상에 플레이팅하였다. 48 시간후에, 상등액을 회수하고  $0.45 \mu\text{m}$  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  $5 \times 10^6$  세포를 10% 프리미엄 FBS를 함유한 DMEM 배지중에서 100 mm 접시상에 플레이팅하였다. 48 시간후에, 바이러스를 함유하는 상등액을 회수하고  $0.45 \mu\text{m}$  필터를 통해 여과시켰다. 상기 상등액을 사용하여 K562 세포를 형질도입시켰다.

[0345] K562 세포의 형질도입을 위해, 형질도입 전날 6 웰 플레이트에 웰당  $2.5 \times 10^5$  세포를 접종하였다.  $8 \mu\text{g/ml}$  폴리브렌의 존재하에 웰 당 동량의 바이러스 상등액을 가하고, 플레이트를  $32^\circ\text{C}$ 에서 2800 rpm으로 90 분간 원심분리(에펜도르프 원심분리기 5810R)하였다. 형질도입후,  $37^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$  배양기에서 세포를 2 일동안 배양하였다.

[0346] gp91 단백질 발현의 정량 분석을 위해, FACS를 수행하였다. K562 세포를 수확하고 PBS로 세척하였다. 이어서, 세포를  $100 \mu\text{l}$  PBS에 재현탁하고,  $4^\circ\text{C}$ 에서  $1 \mu\text{l}$ 의 항-gp91 항체(7D5)로 30 분간 염색하였다. 이어서, 세포를 PBS로 2회 세척하고,  $100 \mu\text{l}$ 의 PBS에 재현탁하고,  $4^\circ\text{C}$ 에서 양으로부터 수득된 PE-결합 항-마우스 항체(서던 바이오테크놀로지 어쇼시에이즈 인코포레이티드, 미국 앨라배마주 버밍햄)  $1 \mu\text{l}$ 로 30 분간 염색하였다. 이어서, 세포를 PBS로 3회 세척하고  $500 \mu\text{l}$ 의 PBS에 현탁하였다. 셀렉스트 데이터 획득 및 분석용 소프트웨어를 이용하여 FACSsort에 의해 유세포분석을 수행하였다. 결과는 도 4에 나타내었다. gp91 양성 세포의 비율 및 평균 형광 강도(광호안의 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,  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ )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 현탁시키고  $1.8 \mu\text{l}$  DHR(분자 프로브(Molecular Probes), 미국, 29 mM)과 혼합하였다.  $37^\circ\text{C}$ 에서 5 분간 배양한 후, 세포를  $10 \mu\text{l}$ 의 포르볼(phorbol) 미리스테이트 아세테이트(PMA,  $1 \mu\text{g/ml}$ )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, 특허 출원 및 출판물은 본원에 그대로 참고로 인용된다.

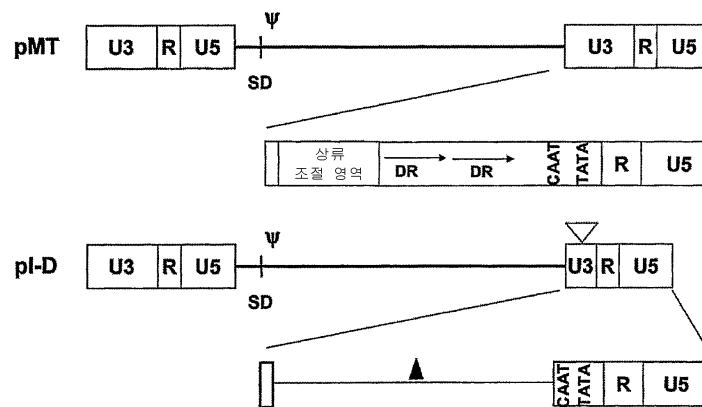
## 도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 인헨서-결실 U3 레트로바이러스 벡터 pMT 및 pI-D의 도면이다.
- [0023] 도 2는 인헨서-결실 U3 레트로바이러스 벡터 pI-ND의 도면이다.
- [0024] 도 3은 인헨서-결실 U3 레트로바이러스 벡터 pI-LND-n의 도면이다.
- [0025] 도 4는 표시된 프로모터를 포함하는 인헨서-결실 U3 레트로바이러스 벡터의 이중 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

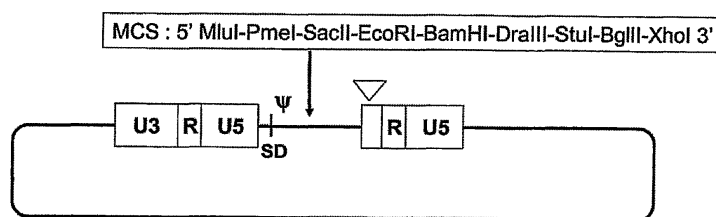
### 도면1

U3 불활성화 레트로바이러스 벡터



### 도면2

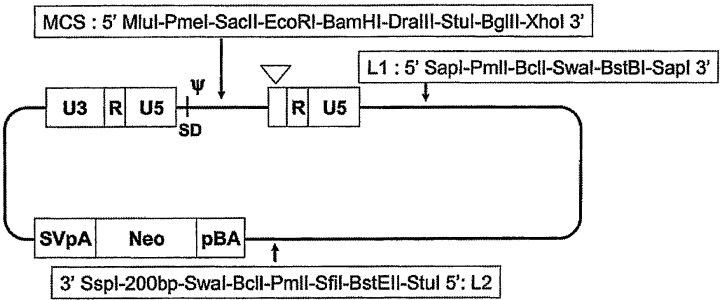
### P1-ND





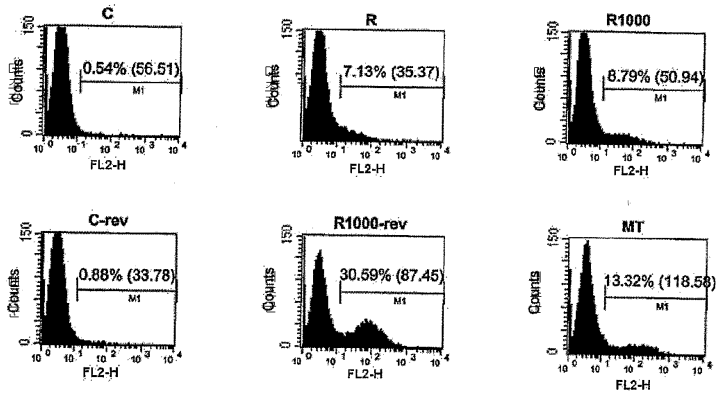
도면3

pl-LND-n



도면4

gp 91 발현



도면5

GAPDH 프로모터

```
TTCATCCAAGCGTGTAAAGGTCCCGTCTTGACTCCCTAGTGTCTGCTGCCCCACAGTC
CAGTCCTGGGAACCGAGCAGGATCACCTCCCATCGGGCCAATCTCAGTCCCTTCCCCCT
ACGTCGGGGCCACACGCTCGGTGCGTGCCAGTTGAACAGGCGGCTGCGGAAAAAA
AAAAGCGGGGAGAAAGTAGGGCCCGCTACTAGCGGTTTACGGGCGCACGTAGCTCA
GGCCTCAAGACCTTGGGCTGGGACTGGCTGAGCCTGGCGGGAGGCGGGTCCGAGTCA
CCGCTGCGCGCCCGCCCGCCCGGTTTCTATAAAATTGAGCCCGCAGCCTCCCGCTTCGCTCT
BRE TATA box +1
CTGCTCCTCTGTTCGACAGTCAGCCGATCTTCTTTTTCGCTGCCAGGTGAAGACGGGC
GGAGAGAAACCGGGAGGCTAGGGACGGCTGAAGGCGGCAGGGCGGGCGCAGGC
CGGATGTGTTCGCGCCGCTGCGGGGTGGGCCGGCGGCTCCGATTCAGGGGCGG
GCGGAGGACGTGATGCGCGCGGGCTGGCCATGGAGGCTGGTGGGGAGGGGAGGG
GAGGCGTGTGTGCGCGGGGCCACTAGGCGCTCACTGTCTCTCCCTCCGCGCAGCC
GAGCCACATCGCTCAGACACC
```

도면6

## RPL 10 프로모터

```

GTGCGCTCGAGCAGGATTTCCTCCCGTCTTCTCTGTCAAAGGACGGGAAGACTTTGTTA
CCCCACCGCGCCCACTGCAGAATGGTGGACAGATACCTCCAGATGCCACTTCCCCC
AGGAAGCGCCGCTGCTCTGCGCACCTCTCCCCGGATGCTGCCCGTGGCGGGTGGGGC
CGGCCCTGCTTCCCCACGACCCCCAGACGCACCCGGAGGGACTC
TTGAGCACAGTGGAGTGGGAAGGGCGAGGTGGGGCGGTGCCAGGCGAGAGCGGCTC
ATGGGAGGCGGCGCCGAGACGCAGCTGGTCGGGACGGTGCAGGTGAGGTGGGCGG
AGCGGGGCTAGAGATGCCCCGGGGTTTCCAGGCCATGAGTCTCCGTGAGATTCTCC
TCGACCTCTTCCCCCGGCAATGTGCGAACCTGGGTCTCCAGGAAACGGGGATACGG
GGCATGGCTCCCAGCAAGGCCTGGTCCAGCCTCTCCGTAGGGGAATGGGTCTCCCCCT
CGGGCTCCCGGGTTGACAAAGGAACGCGGGCCAGATCCCGTATGGCGCTTCACCG
CGGGGCTCTAGCCTAGAAAGGAGGCACGAGCGCGTGTCCGAGACCCGTGCAAGCTC
AGGGACACTCTCGCGTCCCGGAGGCCACCTAGGGTACTTTCCTTTTTCCTACTCTC
AGAAATATACGTCTGTACAGTTAACGGCAAACCTAGGGCAAGAGTTCTACGCCCAAG
ATGGCCAGCCGGAAGCGGGCTTCTCGCGACCATGTGGCGAAGCCCCATTGTCAGCTGG
CCGCCGCGGCCCTGGTACCCGGTCACCTCTCTGATCTGCGCATGTGCTGGGCTACGCC
GGCGCAAGGCCAAGAGCGGCTGCGTCTATGGTCATGACGTCTGACAGAGCGTCCAC
CCGTCTTCGACAGGACTCTATGTTCTTACGCGCGCAGACAGACCGCCATATAAGCCAT
TATA box
CGCAGGCGGAGGAGCGCTCTTCCCTCGGTGTGGTGAGTAAGCGCAGTTGTGCTCT
+1
CTTGGGTGCGGTTGCTGGTCTCACACCTTTAGGTCTGTTCTCGTCTTCCGTTCCGACT
CTCTCTTTTTCGTGCGCACTGAAGATCCTGGTGTGCGC

```



도면7

## LENG8 프로모터

TTGTATCAGAGTCCTGGACGGAACAGATGGCACTCAAAAGGTGGCGCGCAGTTCAGA  
 GAAATGCCTATGTACCGATTGTGTCCAATGCCTCAGCCTGACCTCAGGGACCTTCGGGG  
 GTCTGCTCCGCGCCACCCCTTACACATCTGTGACCCACACACTTCCACCCAGCGCCA  
 CTGCCAACAGCTACACCCATCCCCCTCCAACCGCGTCAGCTTCCAGCCTCGGTCCATCT  
 GAACTCGCGGTGCCCCCTCCCCTGCGCCCTTCCAGATTCAATTGCTAGGGAAGCCCGCT  
 CTTCGGGTGGAGCTGTCTCATCCCCCTTCTTTATCATTTCTCTCCCGAGGGCTTCCACA  
 TCACCGTGCTGTGGACAATCCCGGAATCCTGTACGCCAGTTTACATTTAGGAACAGT  
 AATGGCTCCCACTGACTCAGTCAAAACAAGGCTGCGGCCGGGCACGGTGGCTCACGCC  
 CGTAATCCAGCACTTTGGGAAGCCGAGACGGAGGGAATCAGAGGTCAGGAGTTCGAG  
 AACAGCCTGGCCGACATGGTGAAACCCCGTCTTACAAAAACACAAAAATTAGCCGGG  
 CATAGTGGCGCGCCCTGTAATCCAGCTACTCCGGAGGCTGAGGCAGAAATTGTTTGAA  
 CCCAGGAGCGCGAGGTTGCAGTGAGCAGAGATCAGCCACTGTACTCTATCGTGGGCG  
 ACGACAGAGCAAGAGCAAGACTCCGTCTCCGAGAACAAACAACAGCAACAAGAA  
 AACAAACAATAAAAAAATAAGGCTGCGTGGGAGGCAGAAAGAGCTAATGCGGCCACG  
 CTGTGCTCCCTCGGGGCCACCGTCCCCACCCAGACTTCCGGTCTGCCTTAAATGTTTATG  
 CGTAAAGTGCCTGGGCAGGAAGGCGGGCTCAAGCGCAGCTCGTGGCGTTCATTGGCTGTG  
 CAGGGCCGAGGGAGGCGGTGCAAGGCCCGCGGTGACGTCAGGACGCGCGGTTCAGG  
 ACGTCGAAGCCAAAGAAGACAGAGCCAGCCGGGTGGCACAGCGGTGTCGTGGCCGT  
 (+1) +1  
 GTTGCTGATCGCCTGGGTGGTGTGTGGCGTGTCCCTGCAGCGAAGGATCCTGGTTGGTAA  
 GGGGAGCGGCGGGCGAGCAGCGGGCGGGGATAGCATCTCCTTTTGGTCTTTCGCCCC  
 GCGAGCCCCGAGCGCTTCTCGGCCGTGCGAGCAGCAGACGCGCGCGCGAGCGTCGAC  
 AGGGTGTGGCGCGCAGGGGCAGCCACTGCGCCTGCGCACCGGGCGCTGGGGCGCGCG  
 TTCCGGGCACTAGCGCGCGTGCGCCGTGCTTCTACTTTCCACACCCAGAACTCTTCAGA  
 TCCTTGACCCAGTGGCTTTTTCAGTCAGCCTCCCCCTTTCTGCCCAGCTTCTCTGAGTCC  
 ATCTACTTTTCTTCCCACTTTGTGACGTGTTTTAGCTCCCCCTTAAGTCTCCCTAACTCA  
 TTCTTTTCTCATAGGCAGTGAAAAAGCAGTCTGGCTCCCCGAGGTCCACCCCTTATACCC  
 CAAGGTCCAG

도면8

## SNX3 프로모터

AATCCAGACGCGTGTCTGGTGCAACGCTCGGGTTTATGGCAAAATCATCTCAGGCATTT  
 GCTTAAACCTTCTCCAGAAAGGCATTTTCAGGGGTTTACAGTGAGACGGTGACAGGTTG  
 GCACAGAGTTAGTAGGGCAGTTTGTTCGATTTGCGGGCAAACTCTAAGATCTCTGCC  
 GTTTAACTTTCGCCCCGAATTCCCAAAGCCGCTAAAGCCGTTTCCGGCGCTTACCCCC  
 CCGCAGGCGGAGGCTGGCGCAGAGAGACAGGAAGCGCCAGCTTGGGCGTCTGGGTC  
 CTGCGCTCCTCGGCCGACGCCCGCGGCGCGCGCTCGCGGTGCAATTGTGGGCGCTGTA  
 GTCCGGCCGGAACCTGTTTTCGACCCCGAGTCCCATGACACCGCTTCTCCTCACACCCC  
 +1  
 AGTCCGCACTGCCCCCTCCCCAGCCTCGGCCGGGCTCCCGGAGCGGGCGTGGCGTTC  
 CAGCTAGTGAGCCGTTTCTCCCTGGGCTCGGAGGCGGAAGCTTGAGGGGCGCGGGGA  
 GGAGCTTCCGCTGCGGGGTGAACGCCCGCTCTACGTGCTGTTCTCTTCCGACCGCTG  
 CGCGCGAGCCCCGTGCCCCACGGCGGGCAGCAGCGGCGGGCGGGCGGCTGAACGC  
 GGAGGGGGCGGAGGGAGCCCGCGGCGGCGGCGCAGCAGCTACAGCGAA

도면9

# ITGB4BP 프로모터

TCTGTCCCTCAAGGCACAGCTGGACTCATCCCTTTCCCCAAACCTGCCCTTCCTCCGGCT  
TCATTTCCATCAATACCTCCATCATCAACCTTCCGCGAGACACTCCTGGCCCTCCTCTC  
CCTCATGCCTCACAACCGACCGCCGAGGTCTAGGTCGATGACAGCTCCTAAAAAGCT  
CCTGAATGAATAATGAATGAACGCGAGCAGGCTAGGCGTGCGGCCAGGCGGGT  
CGCGCCAGACCGCTCGCGACCATAGAGTCCGCGGAGGCCGAGGTAGAGGGGCTGG  
ATGCGTGGCGGGAGCGCCGGCTCTCCCGAAGTCTCCCTGGACGGAAGTGAACG  
GAAACCTTTTATAGGAGTCCAGGTACAGTCGCGCGTGGCGAGCTTGTACTGGTTACT  
(+1)  
TGTTAAGCTGGTGTGAGGGGAACCTGGGAGGGTCAGCTCCGGTCCCTGGGTGGGAGGG  
GTGGGGGCCAGAGGATCAGGGCCGAGGTTCTGGTGGGGGCCAGTGGGCGGGACCC  
GAGGACGAGGGGCCGGGAGGCCGAGAGGGCGGGTCCGCGCGGGGCTGAGGGA  
CGGAGGCCGGGATCTGGGAAAGGATCCCGCGGCTTGAACCTCCCGCTCCCGCGCC  
CTAGGCTC

도면10

# UQCRQ 프로모터

GTCACCTTTTGTCCCTCCCCGCCCTCCGCATTGGCCGCTTCTGACTGGGATCCAC  
AGAAAAGCCGAGGGCTGAGGAGAAGTGTGAGCGCTCCGCTGTCCACTGTCCCCAA  
AGTCAGTTCAATCCCCGACGTCTCCGCTAGGCTCCACCCACCGGCCCGGGCAGGGCC  
TCCAAGGCACCTCCACCTACGGGTACCCAGTCAGCCACTTCTTTCTGGACAAAGG  
CGTCATCCCTAGAGACAGTAGGAAAATGTTATCTCCCGGAAGTTACCTCACGACCTCC  
AAGAGCGGCTTCCAACCTTGCCGGAATGACGAACGAGTCAACCGGATCGGTGACTGT  
(+1) +1  
GGAGGGCGAGCTGAGCCCTGTGCTGAGTGGGTCTGGTTGTGAGTGTCTGTGGACCC  
TGGGAGGCTAGGGGCCCGCTGGCTGGGAAAGGATAAGGAGTGCAGGGGCAGGA  
CTCTGGGTGGGATGGACCCCGCGGGACTGCGCGCTTCGCGAAAGCGAGCCAA  
CGGCTGTCCACCTCGGTCCTGCAGGGCCCGCCACA

## 서열 목록

### 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

tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc	60
ccatatatgg agttccgctg tacataactt acggtaaatg gcccgctgg ctgaccgcc	120
aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaatagg	180
actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat	240
caagtgtatc atatgccaag tacgccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgc	300
tggcattatg ccagttacat gacctatgg gactttccta ctggcagta catctacgt	360
ttagtcatcg ctattacat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag	420
cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccctatg acgtcaatgg gagtttgtt	480
tggcaccaaa atcaacggga ctttcaaaa tgcgttaaca actccgccc attgacgaa	540
atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgtt agtgaaccgt	600
cagatgcct ggagacgcca tccacgtgt tttgacctc atagaagaca ccgggaccga	660
tccagctcc gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc caagagtgc	720
gtaagtaccg cctatagagt ctataggecc accccttgg cttcttatgc atgtatact	780
gtttttggct tgggtctat acaccccgcc ttcctcatgt tatagggtat ggtatagctt	840

agcctatagg tgtgggttat tgaccattat tgaccactcc cctatitgggtg acgatacttt 900

ccattactaa tccataacat ggctcttttc cacaactctc tttatitgggt atatgccaat 960

acactgtcct tcagagactg acacggactc tgtatitttta caggatgggg tctcatttat 1020

tatttaciaa ttcacatata caacaccacc gtccccagtg cccgcagttt ttattaaaca 1080

taacgtggga tctccacgag aatctcgggt acgtgttccg gacatgggct cttctccggt 1140

agcggcggag cttctacatc cgagccctgc tcccatgcct ccagcgactc atggtcgctc 1200

ggcagctcct tgctcctaac agtggaggcc agacttaggc acagcacgat gccaccacc 1260

accagtgtgc cgcacaaggc cgtggcggta ggttatgtgt ctgaaaatga gctcggggag 1320

gggcttgca ccgtgacgc atttgaaga ctttaaggcag cggcagaaga agatgcaggc 1380

agctgagttg ttgtgttctg ataagagtca gaggttaactc ccgttgcggt gctgttaacg 1440

gtggagggca gtgtagtctg agcagtactc gttgtgccg cgcgcgccac cagacataat 1500

agctgacaga ctaacagact gtccctttcc atgggtcttt tctgcagtca ccgtccttga 1560

cacgatg 1567

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

<220>  
 <223> Virus MLV U3 region

<400> 2  
 gcaaggcatg gaaaaatata taactgagaa tagaaaagtt cagatcaagg tcaggaacag 60

atggaacagc tgaatatggg ccaaacagga tatctgtggt aagcagttcc tgccccggt 120

caggccaag aacagatgga acagctgaat atgggcaaaa caggatatct gtgtaagca 180  
gttctgccc cggtcaggg ccaagaacag atggtccca gatgcgtcc agccctcagc 240  
agtttctaga gaaccatcag atgtttccag ggtgcccaca ggacctgaaa tgacctgtg 300  
ccttatttga actaaccaat cagttcgctt ctgcctctg ttgcgcgct tctgtcccc 360  
gagctcaata aaagagccca caaccctca ctggcgcgcg cagtcttcg atagactgcg 420  
tcgcccgggt a 431

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

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

<400> 3  
ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag 60  
cccatatatg gagtcccgcg ttacataact tacggtaaat ggccgcgctg gctgaccgcc 120  
caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg 180  
gactttccat tgacgtcaat ggggtggacta ttacggtaa actgcccact tggcagtaca 240  
tcaagtgtat catatgcaaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggt aatggccgcg 300  
ctggcattat gccagttaca tgaccttatg ggactttctt acttggcagt acatctacgt 360  
attagtcac gctattacca tggatgatcg gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata 420  
gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg ggagtttgtt 480  
ttggctctag cggcctcgc gccgggtttt ggcgctccc gcggcgccc cctctctac 540

ggcgagcgct gccacgtcag acgaagggcg cagcgagcgt cctgatacctt ccgcccggac 600

gtcaggaca gcggcccgt gtcataaga ctcggcctta gaaccccagt atcagcagaa 660

ggacatttta ggacgggact tgggtgactc tagggcactg gttttcttc cagagagcgg 720

aacaggcgag gaaaagtagt cccttctcgg cgattctgcg gagggatctc cgtggggcgg 780

tgaacccga tgattatata aggacgcgcc ggggtgtggca cagctagttc cgtcgcagcc 840

gggatttggg tcgcgttct tgtttgtgga tcgctgtgat cgtcacttgg tgagtagcgg 900

gctgctgggc tggccggggc tttcgtggcc gccggggccgc tcggtgggac ggaagcgtgt 960

ggagagaccg ccaagggtc tagtctgggt ccgcgagcaa ggttgcctg aactgggggt 1020

tggggggagc gcagcaaat ggcggtgtt cccgagtctt gaatggaaga cgcttgtgag 1080

gggcctgtg aggtcgttga aacaaggtgg ggggcatggt gggcggaag aacccaaggt 1140

cttgaggcct tcgctaagc gggaaagctc ttattcgggt gagatgggt ggggcacat 1200

ctggggacc tgacgtgaag tttgtcactg actggagaac tcggtttgtc gtctgttgcg 1260

ggggcggcag ttatggcgt gccgttggc agtgcaccg tacctttggg agcgcgcgcc 1320

ctcgtcgtgt cgtgacgtca cccgttctgt tggcttataa tgcagggtgg ggccacctgc 1380

cggtaggtgt gcgtaggct tttctccgtc gcaggacga gggttcgggc ctagggtagg 1440

ctctcctgaa tcgacaggc ccggacctct ggtgagggga gggataagt aggcgtcagt 1500

ttctttggc ggttttatgt acctatctc ttaagtagct gaagctccg ttttgaacta 1560

tgcgtcggg gttggcgagt gtgtttgtg aagttttta ggcaccttt gaaatgtaat 1620

catttgggtc aatatgtaat tticagtgt agactagtaa attgtccgt aaattctggc 1680



cgtttttggc ttttttgtta gac 1703

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

<220>  
 <223> Synthetic CAG promoter

<400> 4  
 attgattatt gactagttaa taatagtaat caattacggg gtcattagtt catagcccat 60  
 atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga ccgcccaacg 120  
 acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaaccca atagggactt 180  
 tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccacttgga gtacatcaag 240  
 tgtatcatat gccaaagtacg cccctattg acgtcaatga cggtaaattg cccgcctggc 300  
 attatgccca gtacatgacc ttatgggact ttctacttg gcagtacatc tacgtattag 360  
 tcatcgctat taccatggtc gagtgagcc ccacgttctg cttcactctc cccatctccc 420  
 cccctcccc accccaatt ttgtatttat ttatttttta attattttgt gcagcgatgg 480  
 gggcgggggg gggggggggg cgcggccag gcggggcggg gcggggcgag gggcggggcg 540  
 gggcgaggcg gagaggtgcg gcggcagcca atcagagcgg cgcgctccga aagtttcctt 600  
 ttatggcgag gcggcggcgg cggcggccct ataaaaagcg aagcgcgcg cgggcgggag 660  
 tcgtgcgcg ctgccttcgc cccgtgcccc gctccgccgc cgcctcgcgc cggccgcccc 720  
 ggctctgact gaccgcgtta ctcccacagg tgagcgggag ggacggccct tctcctccgg 780  
 gctgtaatta gcgttggtt taatgacggc ttgtttcttt tctgtggctg cgtgaaagcc 840

ttgaggggct ccgggagggc cctttgtgcg gggggagcgg ctcggggggt gcgtgcgtgt 900

gtgtgtgctg ggggagcgcc gcgtgcggct ccgcgtgcc cggcggtgt gagcgctgcg 960

ggcgccggcg ggggctttgt gcgctccga gtgtgcgca ggggagcgcg gccggggcg 1020

gtgccccgcg gtgcggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgctg 1080

tgggggggtg agcaggggggt gtggcgcgct cggtcgggct gcaaccccc ctgcaccccc 1140

ctccccgagt tgctgagcac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtacg gggcgtggcg 1200

cggggctcgc cgtgccgggc ggggggtggc ggacagtggt ggtgccgggc ggggcggggc 1260

gcctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcgcgcg ccccgagc gccggcggt 1320

gtcagggcg gcgagccgc agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgcgagg 1380

gacttccttt gtcccaaate tgtgcggagc cgaatctgg gagcgccgc cgcacccct 1440

ctagcgggcg cggggcgaag cggtcggcg ccggcaggaa ggaaatggc ggggagggcc 1500

ttcgtgcgtc gccgcgcgc cgtcccttc tccctctcca gcctcgggc tgtccgagg 1560

gggacggctg ccttcggggg ggacggggca gggcggggtt cggcttctgg cgtgtgaccg 1620

gcggctctag agcctctgct aaccatgtt atgccttctt cttttccta cagctcctgg 1680

gcaacgtgct ggtattgtg ctgtctcatc attttgcaa agaattgatt tatcg 1735

<210> 5

<211> 1450

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens EF-1alpha promoter

<400> 5

gtaagccagc aatggtagag ggaagattct gcacgtccct tccaggcggc ctccccgtca 60

ccaccccccc caaccgccc cgaccggagc tgagagtaat tcatacaaaa ggactcgccc	120
ctgccttggg gaatcccagg gaccgtcgtt aaactccac taacgtagaa cccagagatc	180
gtgcgttcc cgccccctca cccgccgct ctggtcatca ctgaggtgga gaagagcatg	240
cgtgaggctc cggcgccgt cagtgggcag agcgcacatc gccacagtc cccgagaagt	300
tggggggagg ggtcggcaat tgaaccgtg cctagagaag gtggcgcggt gtaactggg	360
aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt tccccagggt tgggggagaa ccgtatataa	420
gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa	480
gtgccgtgtg tggttccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggcct tgcgtgcctt	540
gaattacttc cagccccctg gctgcagtac gtgattcttg atcccagct tcgggttga	600
agtgggtggg agagttcgag gccttgcgt taaggagccc cttgcctcg tgcttgagtt	660
gaggcctggc ctgggcgtg gggccgccc gtgcgaatct ggtggcacct tcgcgcctgt	720
ctcgtgctt tcgataagtc tctagccatt taaaattttt gatgacctgc tgcgacgctt	780
ttttctggc aagatagtct tgtaaatgcg ggccaagatc tgcacactgg tatctcggtt	840
tttggggcgg cggggggcga cggggccgt ggtgccagc gcacatgttc ggcgaggcgg	900
ggcctgcgag cgcgccacc gagaatcgga cgggggtagt ctaagctgg ccggcctgct	960
ctggtgcctg gcctcgccc gccgtgtatc gccccgcct gggcggaag gctggcccgg	1020
tcggcaccag ttgcgtgagc ggaaagatgg ccgttcccg gccctgctgc agggagctca	1080
aatggagga cgcggcgtc gggagagcgg gcgggtgagt caccacaca aaggaaaagg	1140
gcctttccgt cctcagccgt cgcttcatgt gactccagg agtaccgggc gccgtccagg	1200

cacctcgatt agttctcgag cttttggagt acgtcgtctt taggttgggg ggaggggttt 1260  
 tatgcatgg agtttccca cactgagtgg gtggagactg aagttaggcc agcttggcac 1320  
 ttgatgtaat tcctcttga atttgccctt tttgagttt gatcttggtt cattctcaag 1380  
 cctcagacag tggttcaaag ttttttctt ccatttcagg tgtcgtgaaa actacccta 1440  
 aaagccaaaa 1450

<210> 6  
 <211> 1330  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Homo sapiens ACTB promoter

<400> 6  
 gagatgtcca cacctaggat gtcccgcggt gggtgggggg cccgagagac gggcaggccg 60  
 ggggcaggcc tggccatgcg gggccgaacc gggcactgcc cagcgtgggg cgcgggggcc 120  
 acggcgcgcg cccccagccc ccggggccag caccccaagg cggccaacgc caaaactctc 180  
 cctcctctc ttctcaatc tcgtctcgc tcttttttt tttcgcaaaa ggaggggaga 240  
 gggggtaaaa aaatgtgca ctgtcggcg aagccgtga gtgagcggcg cggggccaat 300  
 cagcgtgcgc cgttccgaaa gttgccttt atggctcgag cggccgcg gcgcacctat 360  
 aaaaccagc ggcgcgacgc gccaccaccg ccgagaccgc gtccgccccg cgagcacaga 420  
 gcctcgctt tgccgatccg ccggccgtcc acaccgccc ccaggtaagc ccggccagcc 480  
 gaccggggca ggcggctcac ggcccggccg caggcgccg cgccccctt gcccgtcag 540  
 agccgccgtc tgggcgcgag cggggggcgc atgggggggg aaccggaccg ccgtgggggg 600

cgcgggagaa gcccttgggc ctccggagat gggggacacc ccacccagt tcggaggcgc 660

gaggccgcgc tcggaggcg cgctccgggg gtgccgtctt cgggcgggg gcaaccggcg 720

gggtctttgt ctgagccggg ctcttgccaa tggggatcgc agggctggcg cggcggagcc 780

cccgcaggc ccggtggggg ctggggcgcc attgcgctg cgcgtggtc ctttggcgcg 840

taactgcgtg cgcgtggga attggcgcta attgcgctg cgcgtggga ctcaaggcg 900

taactgcgcg tgcgttctgg gggccgggt gccgcgcct gggctgggc gaaggcggc 960

tcggccgaa ggggtgggt cgccggcgt cccggcgct tgcgcgact tctgcccga 1020

gccgtggcc gcccagggt gtggcgctg cgtgcgcgc cgccaccg gcgtgtttg 1080

aaccggcgg aggcggggct ggcccccgt tggaggggg ttgggcctg gtttcttgc 1140

gcgcgccgcg gggacgcctc cgaccagtgt ttgccttta tgtaataac gcggccggcc 1200

cggttctctt tgtcccaat ctggcgcg gcggcgccc cctggcgcc taaggactcg 1260

gcgcgccgga agtggccagg gcggggcg cctcggtca cagcgcccc ggctattctc 1320

gcagctcacc 1330

<210> 7  
 <211> 665  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Homo sapiens GAPDH promoter

<400> 7  
 ttcatccaag cgtgtaaggg tccccgtcct tgactcccta gtgtcctgct gccacagtc 60

cagtcttggg aaccagcacc gatcacctcc catcgggcca atctcagtc cttccccct 120

acgtcggggc ccacacgttc ggtgcgtgcc cagttgaacc aggcggctgc ggaaaaaaaa 180

aagcggggag aaagtagggc ccggctacta gcggttttac gggcgcacgt agctcaggcc 240

tcaagacctt gggctgggac tggctgagcc tggcgggagg cggggtccga gtcaccgcct 300

gccgcgcgc ccccggtttc tataaatga gcccgcagcc tcccgttcg ctctctgctc 360

ctctgttcg acagtcagcc gcattcttct ttgcgtgcc aggtgaagac gggcggagag 420

aaaccggga ggctaggac ggcctgaagg cggcaggggc gggcgagcc cggatgtgtt 480

cgcgccgtg cggggtgggc ccgggcggcc tccgattgc aggggcgggc ggaggacgtg 540

atgcggcgc ggctgggcat ggaggcctgg tgggggaggg gaggggagc gtgtgtgtcg 600

gccggggcca ctaggcgtc actgttctct cctccgcgc agccgagcca catcgtcag 660

acacc 665

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

<220>  
 <223> Homo sapiens RPL10 promoter

<400> 8  
 gtgcgtcga gcaggatttc ctccgtctt tctgtcaaa ggacgggaag actttgttac 60

cccaccgcgc ccacactgca gaatgggtga cagatactc cagatgccac ttccccagc 120

acgccgcct gctctgcga cctctcccc gatgctgcc cgtgggcggg tgggggcggc 180

cctgtctccc cagaccccc agacgcacc ggagggactc ttgagcacag tggagtggga 240

agggcgaggt ggggcgggtc ccaggcgaga gcggctcatg ggaggcggc cccgagacgc 300



agctggtcgg gacggtgcgg gtcaggggtgg gcggagcggg gctagagatg ccccggggtt 360

tcccaggcca tgagtctcgg tggagatttc tctcgacct cttccccgcg gcaatgtgcg 420

aaccttgggt ctccaggaaa cggggatacg gggcatggct cccagcaagg cctgggccag 480

cctctccggt aggggaatgg gtctccccct ccggcctccc gggttgacaa aggaacgcgg 540

gcccagatcc ccgatggcg cttcaccgcc ggggcctcta gcctagaagg aggcacggag 600

cgcgtgtcgg agaccctgc aagctcaggg acactctcgc ggtcgccggg aggccacct 660

agggtacttt cttttttcc actctcagaa atatacgtct gtcacagtta acggcaaagc 720

ctagggcaag agttctacgc ccaagatggc cagccggaag cgggcttctc gcgacatgt 780

ggcgaagccc cattcgtcag ctggccgcc gcggccctgg taccgggtca cctctctgat 840

ctgcgcatgt gctgggttac gcccgggcgc aagcgccaag agcggctgcg tctatggta 900

tgacgtctga cagagcgtcc acccgtcttc gacaggactc tatggttctt acgcgcgcag 960

acagaccgcc tatataagcc atgcgcaggc ggaggagcgc ctctttccct tcggtgtggt 1020

gagtaagcgc agttgtcgtc tcttgcggtg ccgttgctgg ttctcacacc ttttaggtct 1080

gttctcgtct tccgttccga ctctctcttt ttcgttcag ccaactgaaga tctggtgtc 1140

gcc 1143

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

<220>  
 <223> Homo sapiens LENG8 promoter

<400> 9  
 ttgtatcaga gtcttgacg gaaacagatg gcactcaaaa ggtggcgcgc agttcagaga 60

aatgcctatg tacgatttg gtccaatgcc tcagcctgac ctcagggacc ttcgggggtc	120
tgctccgcgc ccacccttac acatctgtga cccacacac ttcacccca gcgccactgc	180
caacagctac acccatcccc ctccaaccgc gtcagcttcc agcctcggtc catctgaact	240
cgccgtgccc cctccccgc gcccttccag attcatttgc tagggaagcc cgtcttccg	300
ggtggagctg ttctcatcc cttttcttta tcattctctc cccagggctt ccacatcacc	360
gtgctgtgga caatcccga actcctgtca cgccagtta catttaggaa cagtaatggc	420
tcccactgac tcagtcaaaa caaggctgcg gccgggcacg gtggctcacg cccgtaatcc	480
cagcactttg ggaagccgag acggagggat cacgaggtca ggagttcgag aacagcctgg	540
ccgacatggt gaaacccgt ctttcaaaa acacaaaaat tagccgggca tagtggcgcg	600
cgctgtaat cccagctact ccggaggctg aggcagaatt gtttgaacc aggaggcggga	660
ggttgagtg agcagagatc acgccactgt actctatcgt gggcgacgac agagcaagag	720
caagactccg tctccgagaa caacaacaac agcaacaaga aaacaacaat aaaaaaata	780
aggctgcgtg ggaggcagaa agagctaatt cgccacgct tgtccctcg gggccaccgt	840
ccccaccag acttccggtc tgccttaaaa tgttcatgag taagtgcgtg ggcaggaagg	900
cgggctcaag cgagctcgt ggcgttcatt ggctgtgcag ggccgagga ggcggtgcaa	960
ggccgccgcg tgacgtcagg acgcccggt caggacgtcg aagccaaaga agaccagagc	1020
cagccgggtg gcacagcgt gtcgtggccg tgttgctgat cgcctgggtg gttgttggcg	1080
tgtccctgca gcgaaggatc ctggttggta aggggagcgg cggcgagca ggcgggcggg	1140
gatagcatct ctttttggtc ttgcgccccg cgagccccga ggccttctcg gccgtcgcag	1200

cagcagacgc cgcgcgcgag cgtcgacagg gtgtggcggc gcaggggcag ccactgcgcc 1260

tgcgcaccgg gcctggggcc gcgcgttcgg gcactagcgc gcgtgcgccg tcgtcttcta 1320

ctttccacac ccagaactct tcagatcctt gaccccagtg gcttttcagt cagcctcccc 1380

ttttctgcc agcttctctt gaggccatct acttttcttc cccactttgt gacgtgtttt 1440

tagtccccc ttaagtctcc ctaactcatt ctttttctca taggcagtga aaaagcagtc 1500

tggctccga ggtccacccc ttatacccca aggtccag 1538

<210> 10  
 <211> 691  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Homo sapiens SNX3 promoter

<400> 10  
 aatccagacg cgtgtctggt gcaacgctcg gggttatggc aaaatcatct caggcatttg 60

cttaaccttc tccagaaagg cattttcagg gggtcacagt gagacggtgc acaggttggc 120

acagagttag taggggcagt ttgttttga ttgcgggca aatctctaag atctctccgt 180

ttaactttcg cccgcaattc ccaaagccgc taaagccgtt tccggcgctc taccccgccg 240

caggccgagg ctggcgcaga gagacaggaa gcgccagctc tgggcgtctg ggtcctcgcc 300

tcctcggccg cagccccgcg gcggcgcgct cgcggtgcat tgtggcgct gtagtccggc 360

cggaacctgt ttgcgacccc gagtcccatg acaccgttc tctcacacc ccagtccgca 420

gtgcccctcc ccagcctcgg ccgggcctcc cgggagccgg gcgtggcggt ccagctagtg 480

agccgtttct ccctgggct cggaggcgga agcttgaggg gcgcggggag gagcttcgcg 540

tgcgggggtga acgcccgcctc tacgtgctcg ttctcttcgc gaccgctgcg cgcgagcccc 600  
 gtgtcccccac ggccgggcagc agcggcggcg gcggcggctg aacgcggagg ggccggaggg 660  
 agcccgcggc ggccggcagca gctacagcga a 691  
  
 <210> 11  
 <211> 1022  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Homo sapiens CNOT3 promoter  
  
 <400> 11  
 gtagctcttc cccagacca attgttttaa gagagggggg cggatacatc caatcagcac 60  
  
 gacacaggtc tcttgattga cgttcgggtc ctgcgctgg cgtgttgtc cctgaggcgg 120  
  
 gaggaggagg aggagcgggg aggaaaacct gagccaatcc tagcagcctg cgcgggaggc 180  
  
 caatcgaacg ccgcgccttg gagcgatcac ccaatccgcg aaagggggca gggcgcatcc 240  
  
 ctgccaggaa ccaatagaaa gcctccaagg gtcaggagcg acgttcagca ggagcaatga 300  
  
 ctggcctata ttccggactc gggggcgggt cggcgccaga gacgagaaga gaggagggga 360  
  
 ggctctctcc gccgcgcga tcttgaccg ggcccgtca gcttccgagg agccatcggc 420  
  
 agacgcgcg gcctcccttg agccccgacc ccgctcgta gaacaaccc ggcccactc 480  
  
 ccccaacccc acttcgctt cgcgccgcta tcgcgatagc gcccgggccc ggggcgcgag 540  
  
 aaaaaggcgg cgggcgctcg cctccccgc ctgtcgcgat acgtctctca gcggcggcgc 600  
  
 cagctcctgt ggtgagagcg tcaggctcga ctggccgga ccccttcct tctcccccc 660  
  
 ggcgccatcg gccgcctcc ccgcgcctc ccgccttggc gacaccgcg tetgtcgga 720

catggcctcc cctcgccctgc cccctgccgc cgcctctgca gcgcggggct cccggcgggg 780

ggcggctccc tcctctcgc cctcccggtc ctgcgcctct ttcacgttcc ttggggctgg 840

tctcttgta gatagcaaat gctttcttc tttaccagtc ccacctacct cactatgctg 900

actaggtcca tgctctggg tttttaccag ccaggaata cgtgttaatt cctctccaat 960

ctctcctagc agcgtccgtc tccaagagag tatgaagaga gtgcgtctgt agggcaggga 1020

ag 1022

<210> 12  
 <211> 1175  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Homo sapiens CPNE1 promoter

<400> 12  
 gtccatttaa tctcaaaaa acttagaggt aagcacaatt cgctccttcc gcggaaactg 60

gaagacgtga agcaatttgc acagtcttgc agtgaagggc caagctagac actcatacce 120

agcccacccg ccagggccac tagcccaagg tcggtcctgt gcgccaacag tcgcaagcag 180

ggactgaata tccccctctt agcacaaaac ccagtaactt ccgggagatc gcccagagacc 240

gtcagcgcgc ttgcgcggcc ccttgacgtc aaccacgccg ttcttcccc ttctggaacg 300

cggagccgct gagcggggccg acggccattt tgtgaagcgg cgaaggaggt ggtggctgcg 360

ttgggtccg ggaagccgtt cgggctgggg ctgtcgccg cggggcggag gcactcgcgc 420

gggggtaat tcgggtctg ggttctggtg ccgcgcagct ttccccgta agactccgc 480

agccctgaa cgggtggggc tgtgcggggc tcgtggtgcc ccttggtggc cggggcggg 540

gccttcggag gccttcgagc ccgcggcaac tagcgcccca cacaaagggt cgaggcaggt 600

ctgcaggggg agtgggatgc cacttaggcc tctgagatct gagaggatgc aaggaggacg 660

caagaggatg agcctgcgta ccgaagtggg gacgaggcca tagcaggac tccccgtgg 720

tctgagaggg ggcaggccag agctggctgg ctacgaggcc tgcgagctaa ccggggactg 780

cagtaaaaaa gctgtgaagc tgagctttat gactgtttta atttccagtg gattcgttat 840

tgggctaagt taatgacact cttgtaaata tataattatt ttgagatact caaatttgaa 900

agcaatacca actaaaaagc atgtgtggga ttttgttacg gtgtctttct ttttttttt 960

tttttgata tgcattctaa tgaagtactc tgggtgtttc agactgcct tcgtaatgta 1020

cagtgtggcc tgtgcgtgtt gttttgtgtt tccatgattg attttgcct ccgtttattc 1080

tctattgcag tctaaaagtt ggttttaatt ggttgccac aggattgact tggcctctac 1140

ttcttgtaa ggaaattcat ctctgtttt atcag 1175

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

<220>  
 <223> Homo sapiens HYPO promoter

<400> 13  
 tcttttacac gtttggtttt atgggccgtt ggaggttttt tcacgtgag ggtgaagatt 60

cttagtttcc tcaattagca taaaagctgc tccaaggctg ctgagtcttc agttccattc 120

cattcaaaat gtaattcct gagacacgca acctacgcc tactgtcctt tgteccacgg 180

cttctcgaga ttatctctgt gttttaatag ataaaacgcc ttctctcccc acccgtgggg 240



tgcaaagcac agcgcattggg gctggtggcg cccgagagca acacacaacg catgcgccag 300

tccgcagggtg tgggcggagg agaaatcgcg tcggcggcag gggatgacgt aaaaaggccg 360

cgctgtactg cggcttgtgc cgcttccgca agaaggtttc ctggcctgtt gcagcc 416

<210> 14

<211> 564

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens DKC1 promoter

<400> 14

gcacactact cctattggcc atctgctcia gctggatggg aactgcaagc agcaaaggcc 60

tttcaacctc tccgagcttc aacatgttca cttatgcata aggactgata caacagcaac 120

ctgaaagggt cggtgtgaga aagcaaagaa agaggctactg ttacggagc gttcagccgt 180

gagcccaggc gcaggcgcgg agctaaacc ggaggtgaag caactacagc tggggccacg 240

cccacagact cgggctgtc ggggcgggcg gcaactcgcg ttcagcctg ggccaaccag 300

gctgcttgag gctcgaagcg catgcgcggt ctgcctcc gtactggccg agccagcaaa 360

tcgcattgcg cagacgacca gcgggcgcct cggattccgc ccccggtatg gccccgcctc 420

ctccccccc gcggcaaggc acgcacaggg cagtgcgcgg gtgggtgggt cctagcagcg 480

cggcctgacg ggaccaaggc ggccgggagtc tgcggtcgtt ccctcggctg tggaccgggc 540

ggcacgcacg cggcgcaggg taac 564

<210> 15

<211> 509

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens VPS72 promoter

<400> 15

acaaaaatta gttgggcatg gtggcgggcg cctgtaatcc cagctactcg ggggactgag	60
gcaggagaat cgcttcagcc cgggggacgg aggttgagct gagccgagat cgtgccactg	120
cactccagtc tggcgacaga gcgaggcgag actccgtccc tacggaaaaa aaaaaccata	180
tatatatata aaataaaaat aaataaaata aaatgtgttg acttaggggtt atgggggtct	240
tcgtaccacc aagtggactc attgagcaag ggagatcgct gggtagtaga gcaagcggcc	300
tagagcatcc gcgcaggagt aggagaggct gaagagtaaa gagggtttag aggggtgggac	360
tgggagtctc tcgacactct gttacttctg cctgtaaagc cccgacttcc gccgctgggtg	420
gccacccgca ggtagtgatg tcgagcgtcg agtcccaaa accgagctgg tgaggggctg	480
caggtggcgg cgcagctctg gtaggcggt	509

<210> 16

<211> 654

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens IT6B4BP promoter

<400> 16

tctgtccctc aaggcacagc tggactcatc cctttcccca aacctgccct tctccggct	60
tcatttccat caatacctcc atcatcaacc ctcccgag acactcctgg ccctcctct	120
ccctcatgcc tcacaaccga ccagccggag gtctaggtcg atgacagctc ctaaaaagct	180
cctgaatgaa taatgaatga atgaacgca gcaggctagg cgtggggcca ggcggggctcg	240
cgcccagacc gctcgcgacc atagagtccg ccggaggccg gaggtagagg ggctggatgc	300

gtggcgggga gcgccgggct ctcccgaag tctccctgga cggaagtgga aacggaaacc 360

tttttaggga gtccaaggta cagtcgccgc gtgcggagct tgttactggt tacttggtaa 420

gctgggtgta ggggaacctg ggagggtcag ctccggtcct gggtcgggag gggtgggggc 480

cagaggattc agggccggag gttctggtgg gggcccagtg ggcgggaccc gaggacggag 540

gggccgggag gccgagaggg gcggggtcgc ggcggggcct gagggacgga gcccgggata 600

cttgggaaag gatccgccgg cttgaactc ccgctccgc cgccctagg cctc 654

<210> 17  
 <211> 567  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Homo sapiens UQRQ promoter

<400> 17  
 gtcacctttt tgttccctcc cccgcctccc gcattcggcc gcttcctgac tgggattcca 60

cagaaaagcc gagggctgag gagaagtgtg agcgcctccg cctgtccact gtccccaaa 120

gtcagttcaa tccccacgt cctccgtag gctccacccc accggccccg gcagggcctc 180

caaggcacct cccacctacg ggtcaccag tcagccact tctttctggg acaaaggcgt 240

catcccttag agacagtagg aaaatggtat ctcccgaag ttacctcacg acctccaaga 300

gcggcttcca accttgccgg aaatgacgaa cgagtcaacc ggatcgggtga ctgtggaggg 360

cgagctgagc cctgtgcgtg agtggggtct ggttgtgcag tgttcgtgga ccctgggagg 420

ctaggggcgc cccgctgggc tgggaaagga taaggagtgc aggggcagga gtctggggtt 480

gggatggac ccccgcgggg actgcggcgc ttcgcgaaag cgagccaagc gcctgtccac 540

cctcggtcct gcagggccgc cgccaca

567

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ME5 primer

<400> 18

acgcgtgcaa ggcatggaaa aa

22

<210> 19

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MP3 primer

<400> 19

acgcgtagat ctgaattcta cccgggcgac gcagt

35

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CMV5 primer

<400> 20

acgcgtgac 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

gctagcggcc tccgcgccgg gttt

24

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> KMD5 primer

<400> 23

acgcgtagat 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

ggatcctttt ggcttttagg ggtagttttc 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> GAPDHF primer

<400> 28

acgcgtttca tccaagcgtg 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  
 acgcgtaggc ccacctaggg tactttcctt 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 ttgtttgaac ccaggaggcg g 31

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

<220>  
 <223> LENG8R1 primer

<400> 33  
 gtttaaaca agtagaagac gacggcgcac gcg 33

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

<220>  
 <223> LENG8F2 primer

<400> 34  
 gtttaaacc acaccagaa ctcttcagat cct 33

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

<220>  
 <223> LENG8R2 primer

<400> 35  
 gaattcctgg accttggggt ataaggggtg 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

ggatccttcg ctgtagctgc tg

22

<210> 38

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CNOT3F1 primer

<400> 38

acgcgtgtag ctctccccc agaccaattg ttttaag

37

<210> 39

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CNOT3R1 primer

<400> 39

ggatcctcca tcctccagc caggagccaa taccgac

37

<210> 40

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CNOTF2 primer

<400> 40

agatcttggg gctggctctt tgtcagatag c

31

<210> 41

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CNOTR2 primer

<400> 41

ggatcccttc cctgccctac agacgcactc t

31

<210> 42

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CPNE1F1 primer

<400> 42

acgcgtgtcc atttaactct caaaaaactt a

31

<210> 43

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CPNE1R1 primer

<400> 43

ggatcctttt tactgcagtc cccgttatta gctc

34

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

<220>  
 <223> CPNE1F2 primer

<400> 44  
 agatctagct 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 ggttttatgg 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  
 acgcgtgcac 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 ggcat 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 tccctcaagg cacagct

27

<210> 53

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ITGB4BPR primer

<400> 53

gtttaaacga ggcctagggg cggcggaggc gggagttcaa

40

<210> 54

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> UQCRQF primer

<400> 54

acgcgtgtca cctttttgtt ccctccc

27

<210> 55

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> UQCRQR primer

<400> 55

gtttaaactg tggcggcggc cctgcagg

28

<210> 56

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RGpA F primer

<400> 56

ggatcctttt 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

accggtacgc ggcgagacag accgcctata taagccat

38



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

<220>  
 <223> RPL F100 primer

<400> 59  
 acgcgttgac gtctgacaga gcgtccaccc gtcttcg 37

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

<220>  
 <223> RPL F200 primer

<400> 60  
 acgcgtctgg ccgcccgcgg cctcgggtacc cggtcacc 38

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

<220>  
 <223> RPL F500 primer

<400> 61  
 acgcgtgtct cccctccgg 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 ccgcgggtcag g 31

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

<220>  
 <223> LENG F100 primer

<400> 65  
 acgcgttggc gttcattggc tgtgcagggc c 31

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

<220>

<223> LENG F200 primer

<400> 66

acgcgtttgt cccctcgggg ccacgtccc c

31

<210> 67

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LENG F1000 primer

<400> 67

acgcgtttgt 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 tatttagtct cc

42

<210> 70

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SCV3LRI primer

<400> 70

gaattcgtcg actgaaagac ccccgctgac gg

32

<210> 71

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3'LTR-1 primer

<400> 71

gctagcccct gtgccttatt tgaa

24

<210> 72

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NEWMCSF primer

<400> 72

acgcgtttaa accgcggaat tcggatccac atcgtg

36

<210> 73

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NEWMCSR primer

<400> 73

ctcgagatct aggcctcacg atgtggatcc gaattc

36

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

<220>  
 <223> eGFP5 primer

<400> 74  
 acgcgtggat ccatggtgag caagggcgag 30

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

<220>  
 <223> eGFP3 primer

<400> 75  
 ctcgagagat cttacttgt acagctcgtc 30

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

<220>  
 <223> GP91F primer

<400> 76  
 ggatccatgg ggaactgggc tgtgaat 27

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

<220>  
 <223> GP91R primer

<400> 77

ggatccctcg agttagaagt ttctcttggt gaaaa 35

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

<220>  
 <223> L1F primer

<400> 78  
 gctcttcgc tcacgtgtga tcaatttaa ttctgaa 37

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

<220>  
 <223> L1R primer

<400> 79  
 agcggagag ctctgaaatt taaattgat acacgtg 37

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

<220>  
 <223> L2F primer

<400> 80  
 aggctggc accggcatt atggccacgt gatcatttaa attgaagca ttatcaggg 60

tta 63

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

<220>	<223> L2R primer	
<400> 81	tattcgcgcg tttcggatgat 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	ggatccgtg 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