

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2021-0125014**(43) 공개일자** 2021년10월15일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) C12Q 1/6897 (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
C12Q 1/6897 (2018.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7027131</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2020년02월05일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2021년08월25일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2020/016787</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2020/163475
국제공개일자 2020년08월13일</p> <p>(30) 우선권주장
62/801,524 2019년02월05일 미국(US)
62/950,848 2019년12월19일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
더 트러스티즈 오브 프린스턴 유니버시티
미국, 뉴저지 08544, 프린스턴, 87 프로스펙트 애비뉴, 프린스턴 유니버시티</p> <p>(72) 발명자
엔젤, 에스데반
미국 뉴저지주 08544 프린스턴 87 프로스펙트 애비뉴
마투라나, 카롤라
미국 뉴저지주 08544 프린스턴 87 프로스펙트 애비뉴
엔퀴스트, 린
미국 뉴저지주 08544 프린스턴 87 프로스펙트 애비뉴</p> <p>(74) 대리인
특허법인 광장리앤코</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 149 항

(54) 발명의 명칭 **알파헤르페스바이러스 프로모터 서열을 함유하는 재조합 핵산****(57) 요약**

숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위한 재조합 핵산(예를 들어, 벡터), 및 관련 방법이 제공된다. 재조합 핵산은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8 및 서열번호 9로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터; 표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위; 및 숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위해 요구되는 적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소를 포함한다.

(52) CPC특허분류
C12N 2750/14143 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터;

표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위; 및

숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위해 요구되는 적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소를 포함하는,

숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위한 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

벡터가 바이러스 벡터인 재조합 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서,

바이러스 벡터가 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터인 재조합 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

벡터가 비-바이러스 벡터인 재조합 벡터.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

숙주 세포가 포유동물 세포인 재조합 벡터.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

숙주 세포가 시험관내(*in vitro*) 뉴런 세포, 생체외(*ex vivo*) 뉴런 세포, 또는 둘 다를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

숙주 세포가 대상체의 뉴런 세포를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 8

제7항에 있어서,

뉴런 세포가 대상체의 일차 운동 영역, 이차 운동 영역, 일차 체성감각 영역, 보조 체성감각 영역, 시각 영역, 해마체, 선조체, 담창구, 시상, 시상하부, 중뇌 영역, 후뇌, 후각 영역 또는 이의 조합 내에 상주하는 재조합 벡터.

청구항 9

제8항에 있어서,

중뇌 영역이 운동-관련 영역, 감각-관련 영역, 또는 둘 다를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 10

제7항에 있어서,

뉴런 세포가 대상체의 피질, 치상회, 선조체, 소뇌, 후구 또는 이의 조합 내에 상주하는 재조합 벡터.

청구항 11

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

뉴런 세포가 뉴런, 미세아교 세포, 별아교세포, 또는 이의 조합을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 12

제11항에 있어서,

뉴런 세포가 뉴런을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 13

제7항에 있어서,

뉴런 세포가 대상체의 척수 내에 상주하는 재조합 벡터.

청구항 14

제13항에 있어서,

뉴런 세포가 척수의 후각 내에 상주하는 재조합 벡터.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서,

뉴런 세포가 요추 척수, 흉곽 척수, 경부 척수 또는 이의 조합 내에 상주하는 재조합 벡터.

청구항 16

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

숙주 세포가 방광 세포, 혈액 세포, 골세포, 내피 세포, 상피 세포, 지방 세포, 심장 세포, 장 세포, 신장 세포, 간 세포, 폐 세포, 근육 세포, 췌장 세포, 망막 세포, 성세포, 피부 세포, 비장 세포, 줄기 세포, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 재조합 벡터.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

프로모터가 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 18

제17항에 있어서,

프로모터가 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소가 인핸서 요소를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,
적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소가 유도인자 요소를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,
선택가능한 마커 요소를 추가로 포함하는 재조합 벡터.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 재조합 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 23

표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고, 핵산이 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 24

제23항에 있어서,
프로모터가 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 25

제24항에 있어서,
프로모터가 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,
표적 유전자를 코딩하는 핵산이 4 킬로염기 초과를 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 27

표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위를 포함하고, 클로닝 부위가 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 28

제27항에 있어서,
프로모터가 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 29

제28항에 있어서,
프로모터가 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 30

숙주 세포를 재조합 폴리뉴클레오티드 분자와 접촉시켜 재조합 폴리뉴클레오티드 분자가 숙주 세포 내로 도입되는 단계를 포함하고,

이에 의해 표적 유전자의 발현이 숙주 세포에서 발생하며,

이때, 재조합 폴리뉴클레오티드 분자가 표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고, 핵산이 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인,

숙주 세포에서 표적 유전자를 발현하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서,

프로모터가 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 32

제31항에 있어서,

프로모터가 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 33

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

재조합 폴리뉴클레오티드 분자가 숙주 세포와 재조합 폴리뉴클레오티드의 접촉시 형질도입에 의해 숙주 세포 내로 도입되는 것인 방법.

청구항 34

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

재조합 폴리뉴클레오티드 분자가 숙주 세포와 재조합 폴리뉴클레오티드의 접촉시 형질주입에 의해 숙주 세포 내로 도입되는 것인 방법.

청구항 35

제30항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,

숙주 세포가 포유동물 세포인 방법.

청구항 36

제30항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서,

숙주 세포가 시험관내 뉴런 세포, 생체외 뉴런 세포, 또는 둘 다를 포함하는 것인 방법.

청구항 37

제30항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서,

숙주 세포가 대상체의 뉴런 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 38

제37항에 있어서,

뉴런 세포가 대상체의 일차 운동 영역, 이차 운동 영역, 일차 체성감각 영역, 보조 체성감각 영역, 시각 영역, 해마체, 선조체, 담창구, 시상, 시상하부, 중뇌 영역, 후뇌, 후각 영역 또는 이의 조합 내에 상주하는 것인 방법.

청구항 39

제38항에 있어서,

중뇌 영역이 운동-관련 영역, 감각-관련 영역, 또는 둘 다를 포함하는 것인 방법.

청구항 40

제37항에 있어서,

뉴런 세포가 대상체의 피질, 치상회, 선조체, 소뇌, 후구 또는 이의 조합 내에 상주하는 것인 방법.

청구항 41

제36항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서,

뉴런 세포가 뉴런, 미세아교 세포, 별아교세포, 또는 이의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 42

제41항에 있어서,

뉴런 세포가 뉴런을 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제37항에 있어서,

뉴런 세포가 대상체의 척수 내에 상주하는 것인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서,

뉴런 세포가 척수의 후각 내에 상주하는 것인 방법.

청구항 45

제43항 또는 제44항에 있어서,

뉴런 세포가 요추 척수, 흉곽 척수, 경부 척수 또는 이의 조합 내에 상주하는 것인 방법.

청구항 46

제30항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서,

숙주 세포가 방광 세포, 혈액 세포, 골세포, 내피 세포, 상피 세포, 지방 세포, 심장 세포, 장 세포, 신장 세포, 간 세포, 폐 세포, 근육 세포, 췌장 세포, 망막 세포, 성세포, 피부 세포, 비장 세포, 줄기 세포, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 47

서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터;

표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위; 및

숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위해 요구되는 적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소

를 포함하는,

숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위한 재조합 벡터.

청구항 48

제47항에 있어서,
백터가 바이러스 백터인 재조합 백터.

청구항 49

제48항에 있어서,
바이러스 백터가 아데노-연관 바이러스(AAV) 백터인 재조합 백터.

청구항 50

제47항에 있어서,
백터가 비-바이러스 백터인 재조합 백터.

청구항 51

제47항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서,
숙주 세포가 포유동물 세포인 재조합 백터.

청구항 52

제47항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서,
숙주 세포가 *시험관내* 뉴런 세포, *생체외* 뉴런 세포, 또는 둘 다를 포함하는 재조합 백터.

청구항 53

제47항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서,
숙주 세포가 대상체의 뉴런 세포를 포함하는 재조합 백터.

청구항 54

제53항에 있어서,
뉴런 세포가 대상체의 일차 운동 영역, 이차 운동 영역, 일차 체성감각 영역, 보조 체성감각 영역, 시각 영역, 해마체, 선조체, 담창구, 시상, 시상하부, 중뇌 영역, 후뇌, 후각 영역 또는 이의 조합 내에 상주하는 재조합 백터.

청구항 55

제54항에 있어서,
중뇌 영역이 운동-관련 영역, 감각-관련 영역, 또는 둘 다를 포함하는 재조합 백터.

청구항 56

제53항에 있어서,
뉴런 세포가 대상체의 피질, 치상회, 선조체, 소뇌, 후구 또는 이의 조합 내에 상주하는 재조합 백터.

청구항 57

제52항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서,
뉴런 세포가 뉴런, 미세아교 세포, 별아교세포, 또는 이의 조합을 포함하는 재조합 백터.

청구항 58

제57항에 있어서,
뉴런 세포가 뉴런을 포함하는 재조합 백터.

청구항 59

제53항에 있어서,
뉴런 세포가 대상체의 척수 내에 상주하는 재조합 벡터.

청구항 60

제59항에 있어서,
뉴런 세포가 척수의 후각 내에 상주하는 재조합 벡터.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 있어서,
뉴런 세포가 요추 척수, 흉곽 척수, 경부 척수 또는 이의 조합 내에 상주하는 재조합 벡터.

청구항 62

제47항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서,
숙주 세포가 방광 세포, 혈액 세포, 골세포, 내피 세포, 상피 세포, 지방 세포, 심장 세포, 장 세포, 신장 세포, 간 세포, 폐 세포, 근육 세포, 췌장 세포, 망막 세포, 성세포, 피부 세포, 비장 세포, 줄기 세포, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 재조합 벡터.

청구항 63

제47항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서,
프로모터가 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 64

제63항에 있어서,
프로모터가 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 65

제47항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서,
적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소가 인핸서 요소를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 66

제47항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서,
적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소가 유도인자 요소를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 67

제47항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서,
선택가능한 마커 요소를 추가로 포함하는 재조합 벡터.

청구항 68

제47항 내지 제67항 중 어느 한 항의 재조합 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 69

표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고, 핵산이 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어

진 군으로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 70

제69항에 있어서,

프로모터가 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 71

제70항에 있어서,

프로모터가 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 72

제69항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서,

표적 유전자를 코딩하는 핵산이 4 킬로염기 초과를 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 73

표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위를 포함하고, 클로닝 부위가 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 74

제73항에 있어서,

프로모터가 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 75

제74항에 있어서,

프로모터가 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 76

숙주 세포를 재조합 폴리뉴클레오티드 분자와 접촉시켜 재조합 폴리뉴클레오티드 분자가 숙주 세포 내로 도입되는 단계를 포함하고,

이에 의해 표적 유전자의 발현이 숙주 세포에서 발생하며,

이때, 재조합 폴리뉴클레오티드 분자가 표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고 핵산이 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인,

숙주 세포에서 표적 유전자를 발현하는 방법.

청구항 77

제76항에 있어서,

숙주 세포가 포유동물 세포인 방법.

청구항 78

제76항 또는 제77항에 있어서,

숙주 세포가 시험관내 뉴런 세포, 생체의 뉴런 세포, 또는 둘 다를 포함하는 것인 방법.

청구항 79

제76항 또는 제77항에 있어서,

숙주 세포가 대상체의 뉴런 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 80

제79항에 있어서,

뉴런 세포가 대상체의 일차 운동 영역, 이차 운동 영역, 일차 체성감각 영역, 보조 체성감각 영역, 시각 영역, 해마체, 선조체, 담창구, 시상, 시상하부, 중뇌 영역, 후뇌, 후각 영역 또는 이의 조합 내에 상주하는 것인 방법.

청구항 81

제80항에 있어서,

중뇌 영역이 운동-관련 영역, 감각-관련 영역, 또는 둘 다를 포함하는 것인 방법.

청구항 82

제79항에 있어서,

뉴런 세포가 대상체의 피질, 치상회, 선조체, 소뇌, 후구 또는 이의 조합 내에 상주하는 것인 방법.

청구항 83

제78항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서,

뉴런 세포가 뉴런, 미세아교 세포, 별아교세포, 또는 이의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 84

제83항에 있어서,

뉴런 세포가 뉴런을 포함하는 것인 방법.

청구항 85

제79항에 있어서,

뉴런 세포가 대상체의 척수 내에 상주하는 것인 방법.

청구항 86

제85항에 있어서,

뉴런 세포가 척수의 후각 내에 상주하는 것인 방법.

청구항 87

제85항 또는 제86항에 있어서,

뉴런 세포가 요추 척수, 흉곽 척수, 경부 척수 또는 이의 조합 내에 상주하는 것인 방법.

청구항 88

제76항 또는 제77항에 있어서,

숙주 세포가 방광 세포, 혈액 세포, 골세포, 내피 세포, 상피 세포, 지방 세포, 심장 세포, 장 세포, 신장 세포, 간 세포, 폐 세포, 근육 세포, 췌장 세포, 망막 세포, 성세포, 피부 세포, 비장 세포, 줄기 세포, 및 이

의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 89

제76항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서,

프로모터가 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 90

제89항에 있어서,

프로모터가 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 91

제76항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서,

제조합 폴리뉴클레오티드 분자가 숙주 세포와 제조합 폴리뉴클레오티드의 접촉시 형질도입에 의해 숙주 세포 내로 도입되는 것인 방법.

청구항 92

제76항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서,

제조합 폴리뉴클레오티드 분자가 숙주 세포와 제조합 폴리뉴클레오티드의 접촉시 형질주입에 의해 숙주 세포 내로 도입되는 것인 방법.

청구항 93

서열번호 9와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터;

표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위; 및

숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위해 요구되는 적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소를 포함하는,

숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위한 제조합 벡터.

청구항 94

제93항에 있어서,

벡터가 바이러스 벡터인 제조합 벡터.

청구항 95

제94항에 있어서,

바이러스 벡터가 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터인 제조합 벡터.

청구항 96

제93항에 있어서,

벡터가 비-바이러스 벡터인 제조합 벡터.

청구항 97

제93항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서,

숙주 세포가 포유동물 세포인 제조합 벡터.

청구항 98

제93항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서,
숙주 세포가 시험관내 뉴런 세포, 생체외 뉴런 세포, 또는 둘 다를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 99

제93항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서,
숙주 세포가 대상체의 뉴런 세포를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 100

제99항에 있어서,
뉴런 세포가 대상체의 일차 운동 영역, 이차 운동 영역, 일차 체성감각 영역, 보조 체성감각 영역, 시각 영역, 해마체, 선조체, 담창구, 시상, 시상하부, 중뇌 영역, 후뇌, 후각 영역 또는 이의 조합 내에 상주하는 재조합 벡터.

청구항 101

제100항에 있어서,
중뇌 영역이 운동-관련 영역, 감각-관련 영역, 또는 둘 다를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 102

제99항에 있어서,
뉴런 세포가 대상체의 피질, 치상회, 선조체, 소뇌, 후구 또는 이의 조합 내에 상주하는 재조합 벡터.

청구항 103

제98항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서,
뉴런 세포가 뉴런, 미세아교 세포, 별아교세포, 또는 이의 조합을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 104

제103항에 있어서,
뉴런 세포가 뉴런을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 105

제99항에 있어서,
뉴런 세포가 대상체의 척수 내에 상주하는 재조합 벡터.

청구항 106

제105항에 있어서,
뉴런 세포가 척수의 후각 내에 상주하는 재조합 벡터.

청구항 107

제105항 또는 제106항에 있어서,
뉴런 세포가 요추 척수, 흉곽 척수, 경부 척수 또는 이의 조합 내에 상주하는 재조합 벡터.

청구항 108

제93항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서,

숙주 세포가 방광 세포, 혈액 세포, 골세포, 내피 세포, 상피 세포, 지방 세포, 심장 세포, 장 세포, 신장 세포, 간 세포, 폐 세포, 근육 세포, 췌장 세포, 망막 세포, 성세포, 피부 세포, 비장 세포, 줄기 세포, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 재조합 벡터.

청구항 109

제93항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서,

프로모터가 서열번호 9의 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 110

제109항에 있어서,

프로모터가 서열번호 9를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 111

제93항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서,

프로모터가 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 또는 이의 조합의 핵산 서열을 추가로 포함하는 재조합 벡터.

청구항 112

제93항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서,

프로모터가 서열번호 13-58로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 113

제112항에 있어서,

프로모터가 서열번호 13-58로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 114

제93항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소가 인핸서 요소를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 115

제93항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소가 유도인자 요소를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 116

제93항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서,

선택가능한 마커 요소를 추가로 포함하는 재조합 벡터.

청구항 117

제93항 내지 제116항 중 어느 한 항의 재조합 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 118

표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고, 핵산이 서열번호 9와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 재조합 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 119

제118항에 있어서,

프로모터가 서열번호 9의 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 120

제119항에 있어서,

프로모터가 서열번호 9를 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 121

제118항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서,

프로모터가 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 또는 이의 조합의 핵산 서열을 추가로 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 122

제118항에 있어서,

프로모터가 서열번호 13-58로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 123

제118항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서,

표적 유전자를 코딩하는 핵산이 4 킬로염기 초과를 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 124

표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위를 포함하고, 클로닝 부위가 서열번호 9와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 125

제124항에 있어서,

프로모터가 서열번호 9의 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 126

제125항에 있어서,

프로모터가 서열번호 9를 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 127

제124항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서,

프로모터가 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 또는 이의 조합의 핵산 서열을 추가로 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 128

제124항에 있어서,

프로모터가 서열번호 13-58로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 129

제128항에 있어서,

프로모터가 서열번호 13-58로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 130

숙주 세포를 재조합 폴리뉴클레오타이드 분자와 접촉시켜 재조합 폴리뉴클레오타이드 분자가 숙주 세포 내로 도입되는 단계를 포함하고,

이에 의해 표적 유전자의 발현이 숙주 세포에서 발생하며,

이때, 재조합 폴리뉴클레오타이드 분자가 표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고 핵산이 서열번호 9와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인,

숙주 세포에서 표적 유전자를 발현하는 방법.

청구항 131

제130항에 있어서,

프로모터가 서열번호 9의 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 132

제131항에 있어서,

프로모터가 서열번호 9를 포함하는 것인 방법.

청구항 133

제130항 내지 제132항 중 어느 한 항에 있어서,

프로모터가 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 또는 이의 조합의 핵산 서열을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 134

제130항에 있어서,

프로모터가 서열번호 13-58로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 135

제134항에 있어서,

프로모터가 서열번호 13-58로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 136

제130항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서,

재조합 폴리뉴클레오타이드 분자가 숙주 세포와 재조합 폴리뉴클레오타이드의 접촉시 형질도입에 의해 숙주 세포 내로 도입되는 것인 방법.

청구항 137

제130항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서,

재조합 폴리뉴클레오타이드 분자가 숙주 세포와 재조합 폴리뉴클레오타이드의 접촉시 형질주입에 의해 숙주 세포 내로 도입되는 것인 방법.

청구항 138

제130항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서,
숙주 세포가 포유동물 세포인 방법.

청구항 139

제130항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서,
숙주 세포가 *시험관내* 뉴런 세포, *생체외* 뉴런 세포, 또는 둘 다를 포함하는 것인 방법.

청구항 140

제130항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서,
숙주 세포가 대상체의 뉴런 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 141

제140항에 있어서,
뉴런 세포가 대상체의 일차 운동 영역, 이차 운동 영역, 일차 체성감각 영역, 보조 체성감각 영역, 시각 영역, 해마체, 선조체, 담창구, 시상, 시상하부, 중뇌 영역, 후뇌, 후각 영역 또는 이의 조합 내에 상주하는 것인 방법.

청구항 142

제141항에 있어서,
중뇌 영역이 운동-관련 영역, 감각-관련 영역, 또는 둘 다를 포함하는 것인 방법.

청구항 143

제140항에 있어서,
뉴런 세포가 대상체의 피질, 치상회, 선조체, 소뇌, 후구 또는 이의 조합 내에 상주하는 것인 방법.

청구항 144

제140항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서,
뉴런 세포가 뉴런, 미세아교 세포, 별아교세포, 또는 이의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 145

제144항에 있어서,
뉴런 세포가 뉴런을 포함하는 것인 방법.

청구항 146

제140항에 있어서,
뉴런 세포가 대상체의 척수 내에 상주하는 것인 방법.

청구항 147

제146항에 있어서,
뉴런 세포가 척수의 후각 내에 상주하는 것인 방법.

청구항 148

제146항 또는 제147항에 있어서,
뉴런 세포가 요추 척수, 흉곽 척수, 경부 척수 또는 이의 조합 내에 상주하는 것인 방법.

청구항 149

제130항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서,

숙주 세포가 방광 세포, 혈액 세포, 골세포, 내피 세포, 상피 세포, 지방 세포, 심장 세포, 장 세포, 신장 세포, 간 세포, 폐 세포, 근육 세포, 췌장 세포, 망막 세포, 성세포, 피부 세포, 비장 세포, 줄기 세포, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2019년 2월 5일자로 출원된 미국 가특허 출원 제62/801,524호, 및 2019년 12월 19일자로 출원된 미국 가특허 출원 제62/950,848호의 우선권의 이익을 주장한다. 상기 출원의 전체 교시는 본원에 참고로 포함된다.

배경 기술

[0003] 배경

[0004] 바이러스는 이의 숙주를 감염시키고 이의 복제 사이클의 일부로서 이의 유전자 물질을 숙주의 세포 내로 도입시킨다. 이 유전자 물질은 바이러스의 요구에 제공하기 위해 신체의 정상적인 생산 기계를 장악함으로써 이들 바이러스의 더 많은 복제물을 생산하기 위한 기본 "지시"를 함유한다. 숙주 세포는 이들 지시를 수행하고 바이러스의 추가 복제물을 생산하여, 더욱 많은 숙주의 세포가 감염되게 야기할 것이다. 이와 같이, 바이러스는 세포 내에 치료 이득을 제공할 수 있는 유전자를 전달하기 위한 비히클로서 사용될 수 있다.

발명의 내용

[0005] 요약

[0006] 일 양태에서, 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터; 표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위; 및 숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위해 요구되는 적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소를 포함하는, 숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위한 재조합 벡터를 제공한다.

[0007] 다른 양태에서, 본 발명은 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터; 표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위; 및 숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위해 요구되는 적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소를 포함하는, 숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위한 재조합 벡터를 제공한다.

[0008] 다른 양태에서, 본 발명은 서열번호 9와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터; 표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위; 및 숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위해 요구되는 적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소를 포함하는, 숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위한 재조합 벡터를 제공한다.

[0009] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소는 인핸서 요소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소는 유도인자 요소를 포함한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 재조합 벡터는 선택가능한 마커 요소를 추가로 포함한다.

[0011] 일부 실시양태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 특정 실시양태에서, 바이러스 벡터는 아테노-연관 바이러스(AAV) 벡터이다.

[0012] 일부 실시양태에서, 벡터는 비-바이러스 벡터이다.

[0013] 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 뉴런 세포이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 비-뉴런 세포(예를 들어, 간 세포, 신장 세포, 망막 세포)이다.

[0014] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 재조합 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

- [0015] 일 양태에서, 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터를 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고, 핵산이 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다.
- [0016] 다른 양태에서, 본 발명은 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 및 서열번호 8로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터를 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고, 핵산이 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 및 서열번호 8로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다.
- [0017] 다른 양태에서, 본 발명은 서열번호 9와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터를 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고, 핵산이 서열번호 9와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다.
- [0018] 다른 양태에서, 본 발명은 표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위를 포함하고, 클로닝 부위가 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다.
- [0019] 다른 양태에서, 본 발명은 표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위를 포함하고, 클로닝 부위가 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 및 서열번호 8로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다.
- [0020] 다른 양태에서, 본 발명은 표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위를 포함하고, 클로닝 부위가 서열번호 9와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다.
- [0021] 다른 양태에서, 본 발명은 숙주 세포를 재조합 폴리뉴클레오티드 분자와 접촉시켜 재조합 폴리뉴클레오티드 분자가 숙주 세포 내로 도입되는 단계를 포함하고, 이에 의해 표적 유전자의 발현이 숙주 세포에서 발생하며, 이때, 재조합 폴리뉴클레오티드 분자가 표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고, 핵산이 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인, 숙주 세포에서 표적 유전자를 발현하는 방법을 제공한다.
- [0022] 다른 양태에서, 본 발명은 숙주 세포를 재조합 폴리뉴클레오티드 분자와 접촉시켜 재조합 폴리뉴클레오티드 분자가 숙주 세포 내로 도입되는 단계를 포함하고, 이에 의해 표적 유전자의 발현이 숙주 세포에서 발생하며, 이때, 재조합 폴리뉴클레오티드 분자가 표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고, 핵산이 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 및 서열번호 8로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인, 숙주 세포에서 표적 유전자를 발현하는 방법을 제공한다.
- [0023] 다른 양태에서, 본 발명은 숙주 세포를 재조합 폴리뉴클레오티드 분자와 접촉시켜 재조합 폴리뉴클레오티드 분자가 숙주 세포 내로 도입되는 단계를 포함하고, 이에 의해 표적 유전자의 발현이 숙주 세포에서 발생하며, 이때, 재조합 폴리뉴클레오티드 분자가 표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고, 핵산이 서열번호 9와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인, 숙주 세포에서 표적 유전자를 발현하는 방법을 제공한다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 재조합 폴리뉴클레오티드 분자는 숙주 세포와 재조합 폴리뉴클레오티드의 접촉시 형질도입에 의해 숙주 세포 내로 도입된다. 다른 양태에서, 재조합 폴리뉴클레오티드 분자는 숙주 세포와 재조합 폴리뉴클레오티드의 접촉시 형질주입에 의해 숙주 세포 내로 도입된다.
- [0025] 본원에 개시된 LAP 서열의 특징은 다음을 포함한다: i) EF1 α , CAG, TH, CaMKIIa 등과 같은 유사한 프로모터와 비교하였을 때 작은 크기. 이는 제한된 유전자 페이로드(payload)를 갖는 AAV 벡터의 맥락에서 유리하다. ii) 전사를 억제하는 경향이 덜 있는 장기 발현. 본원에 개시된 LAP 서열은 트랜스유전자의 장기, 만성 전사를 달성한다. 이는 치료 트랜스유전자가 환자/숙주의 수명 동안 발현될 필요가 있을 수 있는 유전자 요법에 특히 유용하다.

도면의 간단한 설명

도면의 간단한 설명

특허 또는 출원 파일은 색으로 나타낸 적어도 하나의 도면을 포함한다. 유색 도면(들)을 갖는 이 특허 또는 특허 출원 공보의 사본은 요청 및 필요한 수수료의 납부시 관청에 의해 제공될 것이다.

상기 것들은 유사한 참조 특징이 상이한 시점을 통틀어 동일한 부분을 지칭하는 첨부된 도면에 나타난 바와 같이, 다음의 예시적 실시양태의 더욱 구체적인 설명으로부터 명확해질 것이다. 도면은 반드시 축적에 맞춰진 것은 아니며, 대신에 실시양태를 나타내는데 주안점을 둔다.

도 1a-1d는 PRV 잠복-연관 전사물 프로모터(LAP)의 특징화를 나타낸다. **도 1a**는 902 염기 쌍(bp)의 PRV LAP, 및 498 bp의 서브-영역 LAP1(볼드체 및 밑줄), 404 bp의 LAP2(밑줄), 및 880 bp의 LAP1_2의 완전 뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. LAP1_2는 LAP1 및 LAP2 서열의 대부분을 포함하지만, LAP1의 첫번째 22 개 뉴클레오타이드는 결여되어 있다. 흑색 박스는 GC 박스: 특이성 단백질 1 및 3(Sp1 및 Sp3); CCAAT 박스: 핵 인자 Y(NF-Y); 및 TATA 박스: TATA-결합 단백질(TBP)을 포함한 전사 인자(TF)에 대한 컨센서스 서열을 나타낸다. 유색 박스는 TF: 1, 녹색: SRY-Box 10(SOX10); 2, 적색: cAMP 반응 요소-결합 단백질(CREB); 3, 청색: CCCTC-결합 인자(CTCF); 4, 갈색: 희소돌기신경교 전사 인자 2(Olig2); 5, 분홍색: 전사의 신호 변환인자 및 활성인자(STAT1)의 결합 모티프 부위에 대한 좌표를 나타낸다. **도 1b**는 LAP1, LAP2, LAP1_2 및 EF1 α 프로모터로부터 mCherry 형광 리포터를 전사하도록 설계된 4 개의 AAV의 플라스미드 맵을 나타낸다. 609 bp의 WPRE는 우드척 간염 바이러스(woodchuck hepatitis virus) 전사후 인핸서 요소이다. 모든 AAV는 각각 479 bp 인간 성장 호르몬(hGH 폴리A) 폴리 아데닐화 서열, 및 141 bp의 측면 AAV2 역위 말단 반복부(ITR)를 함유한다. 벡터를 AAV-PhP.eB 혈청형 캡시드 내로 패키징하였다. 인핸서-프로모터 요소 및 프로모터 서열의 총 크기는 AAV-LAP1: 1.87 Kb; AAV-LAP2: 1.77 Kb; AAV-LAP1_2: 2.25 Kb; 및 AAV-EF1 α : 2.63 Kb이다. **도 1c**는 래트 SCG 뉴런의 일차 배양액을 형질도입하여, 90-일 시간-경과에 걸친 mCherry 발현을 정량화하기 위해 사용된 4 개의 AAV를 나타낸다. mCherry 발현의 상대 형광 강도를 3×10^{11} AAV 계층으로 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 34, 38, 41, 45, 49, 52, 59, 67, 73, 82, 및 90 감염 후 일(days post infection)(dpi)에서 측정하였다. 기준자 = 100 μ m. 데이터는 평균 $\pm$ SEM; n = 그룹 당 3 SCG 배양액 접시로서 나타낸다. **도 1d**는 LAP1-mCherry, LAP2-mCherry, LAP1_2-mCherry, 또는 EF1 α -mCherry로 AAV 형질도입 후 28 일에 SCG 세포 몸체에서 AAV-구동된 mCherry 발현을 나타낸다.

도 2a-2p는 안정적인 장기 LAP-매개된 트랜스유전자 발현을 나타낸다. **도 2a**는 AAV 투여 및 CNS 조직 처리의 전신 경로의 도식적 다이어그램이다. AAV 벡터의 정맥내 투여를 마우스 안구 뒤 부비강 내로의 편측 주사에 의해 수행하였다(4×10^{11} vg/마우스). 뇌 및 척수를 30 dpi 및 190 dpi에 수집하였다. 뇌의 우반구를 iDISCO+ 조직 세척 및 광-시트 현미경 분석을 위해 처리하였다. 뇌의 좌반구를 면역형광 및 공초점 현미경 분석을 위해 50 μ m로 시상으로 절단하였다. 척수를 면역형광 및 공초점 현미경 분석을 위해 20 μ m로 횡단면으로 슬라이싱하였다. **도 2b-2p**는 30 dpi 및 190 dpi에 iDISCO+-세척된 조직 샘플에서 상이한 뇌 영역에 걸쳐 mm³ 당 mCherry 양성 세포의 밀도를 정량화한다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM; n = 그룹 당 2 마리 동물, 동물 당 5 내지 10 개 500 μ m 섹션으로서 나타낸다. 데이터를 비히클-주사된 대조군 동물의 것에 대해 정규화하였다. 유의성을 스튜던트 t-검정(Student's t-test)(2 개 그룹만을 비교한 경우), 또는 분산 일원 분석(ANOVA) 후 본페로니(Bonferroni) 사후 검정(2 개 초과 그룹을 비교한 경우)으로 결정하였다. < 0.05의 p 값은 통계학적으로 유의미하였다(*p < 0.033; **p < 0.002; ***p < 0.001).

도 3a-3jd는 3 개 AAV-LAP 서열 전부가 안구 뒤 주사 후 뇌에 걸친 광범위한 장기 트랜스유전자 발현을 구동한다는 것을 나타낸다. 시상 섹션의 대표적인 면역형광 이미지는 190 dpi에 AAV-LAP1(**도 3a**), AAV-LAP2(**도 3b**), AAV-LAP1_2(**도 3c**), 및 AAV-EF1 α (**도 3d**)에 대한 항-mCherry 염색(녹색)의 전체-뇌 분포를 나타낸다. Cx, 피질; Hip, 해마; MRN, 중뇌 망상핵; Cb, 소뇌; Thal, 시상; Pn, 뇌교; Hypo, 시상하부; Str, 선조체; OB, 후구. 기준선 = 1mm. 대표적인 공초점 이미지는 30 dpi 및 190 dpi에 피질(**도 3e**), 치상회(**도 3f**), 선조체(**도 3g**) 및 소뇌(**도 3h**)에서의 항-mCherry 신호(녹색)를 나타낸다. 모든 이미지는 적층 공초점 섹션이다. 기준선 = 100 μ m. **도 3ia-3id**는 피질, 치상회, 선조체 및 소뇌에서 30 dpi 및 190 dpi에 AAV-LAP 서열 및 AAV-EF1 α 에 의해 구동되는 항-mCherry 신호의 간접 형광 강도를 정량화한다. **도 3ja-3jd**는 피질, 치상회, 선조체 및 소뇌에서 190 dpi에 면역조직화학(IHC)에 의해 픽셀² 당 mCherry 신호를 발현하는 세포의 수를 정량화한다. 데이터는

평균 $\pm$ SEM; $n = 2$ 마리 동물 및 동물 당 6 개 조직 섹션으로서 나타낸다. 데이터를 비히클-주사된 대조군 동물의 것에 대해 정규화하였다. 유의성을 스튜던트 t-검정(2 개 그룹만을 비교한 경우), 또는 분산 일원 분석(ANOVA) 후 본페로니 사후 검정(2 개 초과 그룹을 비교한 경우)으로 결정하였다. < 0.05 의 p 값은 통계학적으로 유의미하였다(* $p < 0.033$; ** $p < 0.002$; *** $p < 0.001$).

도 4a-4ed는 LAP2가 뇌에서 안정적인 장기 트랜스유전자 발현을 구동한다는 것을 나타낸다. 대표적인 공초점 이미지는 30 dpi 및 190 dpi에 피질(**도 4a**), 치상회(**도 4b**), 선조체(**도 4c**) 및 소뇌(**도 4d**)에서 AAV-LAP1, AAV-LAP2, AAV-LAP1_2, 및 AAV-EF1 α 에 대한 천연 mCherry 형광(적색)을 나타낸다. 모든 이미지는 적층 공초점 섹션이다. 기준선 = 100 μ m. **도 4ea-4ed**는 피질, 치상회, 선조체 및 소뇌에서 나타난 30 dpi 및 190 dpi에 AAV-LAP 서열 및 AAV-EF1 α 에 의해 구동되는 천연 mCherry 신호의 직접 형광 강도를 정량화한다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM; $n = 2$ 마리 동물 및 동물 당 6 개 조직 섹션으로서 나타낸다. 데이터를 비히클-주사된 대조군 동물의 것에 대해 정규화하였다. 유의성을 스튜던트 t-검정(2 개 그룹만을 비교한 경우) 또는 분산 일원 분석(ANOVA) 후 본페로니 사후 검정(2 개 초과 그룹을 비교한 경우)으로 결정하였다. < 0.05 의 p 값은 통계학적으로 유의미하였다(* $p < 0.033$; ** $p < 0.002$; *** $p < 0.001$).

도 5a-5e는 AAV-LAP2가 CNS에서 장기 트랜스유전자 전사를 구동한다는 것을 나타낸다. mCherry mRNA의 존재를 mCherry(녹색)에 대해 특이적인 리보탐침을 사용하여 190 dpi에 뇌 조직에서 FISH에 의해 확인하였다. 핵을 DAPI로 대비염색하였다(청색). **도 5a-5e**는 각각 피질, 치상회, 선조체, 소뇌 및 후구에서 AAV-LAP2 또는 AAV-EF1 α 에 대한 20- μ m 시상 뇌 슬라이스를 나타낸다. 패널 2 및 4는 각각 패널 1 및 3에 나타난 영역(사각형)의 고배율 이미지를 나타낸다. 이미지는 적층 공초점 섹션이다. 기준선 = 100 μ m.

도 6a-6f는 AAV-LAP 트랜스유전자 발현이 회소돌기신경교가 아닌 뉴런에서 주로 있다는 것을 나타낸다. 30 dpi에 피질 또는 치상회에서 뉴런(**도 6a** 및 **6b**: 범-뉴런 마커 NeuN에 대해 녹색 표지) 또는 회소돌기신경교(**도 6c** 및 **6d**: 회소돌기신경교 마커 Olig2에 대해 녹색 표지)에서 AAV-매개된 mCherry 발현(적색)의 대표적인 공초점 이미지. 세포를 DAPI로 대비염색하였다(청색). NeuN 신호는 뉴런 세포 핵뿐 아니라, 세포질로 국소화될 수 있는 한편, Olig2 신호에 대한 염색은 대부분 핵이다. 화살표는 세포 마커와 mCherry 사이의 공동-표지를 나타낸다. 기준선 = 100 μ m. **도 6e** 및 **6f**는 각각의 프로모터에 대해 피질(Cx) 또는 치상회(DG)에서 뉴런(NeuN-양성) 또는 회소돌기신경교(Olig2-양성)에 상응하는 mCherry 표지된 세포의 비율을 정량화한다. 이미지는 적층 공초점 섹션이다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM; $n = 2$ 마리 동물 및 동물 당 6 개 조직 섹션으로서 나타낸다.

도 7a-7d는 AAV-LAP 트랜스유전자 발현이 미세아교세포 및 별아교세포에서 검출되지 않는다는 것을 나타낸다. 30 dpi에 피질 및 치상회에서 항-mCherry 신호(적색), 미세아교세포(**도 7a** 및 **7b**: 녹색, Iba1-양성으로서 표지됨), 별아교세포(**도 7c** 및 **7d**: 녹색, S100-양성으로서 표지됨)의 대표적인 공초점 면역형광 이미지. 별아교세포 및 미세아교세포에서 mCherry 사이의 공동-표지의 부재는 별(*)로 나타내어진다. 세포를 DAPI로 대비염색하였다(청색). 이미지는 적층 공초점 섹션이다. 기준선 = 100 μ m.

도 8a-8f는 LAP 서열이 척수에서 광범위한 장기 트랜스유전자 발현을 구동한다는 것을 나타낸다. 척수(요추 영역)를 20 μ m로 횡단 방식으로 절단하였다. AAV-LAP1, AAV-LAP2, AAV-LAP1_2 및 AAV-EF1 α 에 대한 천연 AAV-매개된 mCherry 발현(적색, 패널 1 및 4), 범-뉴런 마커 NeuroTrace(녹색, 패널 2 및 5), 및 병합 신호(황색, 패널 3 및 6)의 190 dpi의 대표적인 공초점 이미지. 이미지는 적층 공초점 섹션이다. DH: 후각; VH: 전각. 고배율 이미지가 패널 4-6에 나타내어진다. 기준선 = 100 μ m.

도 9a-9c는 LAP 서열이 돼지 신장 세포에서 효율적인 트랜스유전자 발현을 구동한다는 것을 나타낸다. LAP1(**도 9a**), LAP2(**도 9b**) 또는 LAP1_2(**도 9c**)에 의해 구동되는 mCherry를 포함하는 리포터 플라스미드의 형질주입 후 48 시간에 PK15 세포의 대표적인 이미지. 패널 1: 명시야(bright field); 패널 2: 형광; 패널 3: 병합. 기준선 = 50 μ m.

도 10a 및 **10b**는 LAP2가 인간 신장 세포에서 효율적인 트랜스유전자 발현을 구동한다는 것을 나타낸다. LAP2(**도 10a**) 또는 EF1 α -프로모터(**도 10b**)에 의해 구동되는 mCherry를 포함하는 리포터 플라스미드의 형질주입 후 48 시간에 HEK-293 세포의 대표적인 이미지. 패널 1: 명시야; 패널 2: 형광; 패널 3: 병합. 기준선 = 50 μ m.

도 11a 및 **11b**는 LAP2가 인간 간 세포에서 효율적인 트랜스유전자 발현을 구동한다는 것을 나타낸다. LAP2(**도 11a**) 또는 EF1 α -프로모터(**도 11b**)에 의해 구동되는 mCherry를 포함하는 리포터 플라스미드의 형질주입 후 48 시간에 HepG2 세포의 대표적인 이미지. 패널 1: 명시야; 패널 2: 형광; 패널 3: 병합. 기준선 = 50 μ m.

도 12aa-12bd는 LAP2가 간에 걸쳐 장기 트랜스유전자 발현을 구동한다는 것을 나타낸다. AAV-LAP2(**도 12aa-**

12ad) 또는 AAV-EF1 α -벡터(도 12ba-12bd)의 정맥내 투여를 마우스 안구 뒤 부비강 내로의 편측 주사에 의해 수행하였다(4×10^{11} vg/마우스). 간을 190 dpi에 수집하고 IHC 및 공초점 현미경 분석을 위해 20 μ m로 종단면으로 절단하였다. 천연 mCherry 형광(도 12aa 및 12ba: 적색), 항-mCherry 면역염색(도 12ab 및 12bb: 녹색), DAPI 핵 대비염색(도 12ac 및 12bc: 청색), 및 병합된 면역-형광 및 DAPI 이미지(도 12ad 및 12bd)의 대표적인 공초점 이미지. CV: 중심 정맥. 기준선 = 75 μ m.

도 13aa-13bd는 LAP2가 마우스 신장에서 장기 트랜스유전자 발현을 구동한다는 것을 나타낸다. AAV-LAP2(도 13aa-13ad) 또는 AAV-EF1 α -벡터(도 13ba-13bd)의 정맥내 투여를 마우스 안구 뒤 부비강 내로의 편측 주사에 의해 수행하였다(4×10^{11} vg/마우스). 신장을 190 dpi에 수집하고 IHC 및 공초점-현미경 분석을 위해 20 μ m로 종단면으로 절단하였다. 대표적인 공초점 이미지는 천연 mCherry 형광(도 13aa 및 13ba: 적색), 항-mCherry 면역염색(도 13ab 및 13bb: 녹색), DAPI 핵 대비염색(도 13ac 및 13bc: 청색), 및 병합된 면역-형광 및 DAPI 이미지(도 13ad 및 13bd)를 나타낸다. AV: 공상 혈관. 기준선 = 75 μ m.

도 14aa-14bd는 LAP2가 마우스 망막에서 장기 트랜스유전자 발현을 구동한다는 것을 나타낸다. AAV-LAP2(도 14aa-14ad) 또는 AAV-EF1 α -벡터(도 14ba-14bd)의 정맥내 투여를 마우스 안구 뒤 부비강 내로의 편측 주사에 의해 수행하였다(4×10^{11} vg/마우스). 망막을 190 dpi에 수집하고 IHC 및 공초점-현미경 분석을 위해 20 μ m로 횡단면으로 동결절단하였다. 대표적인 공초점 이미지는 천연 mCherry 형광(도 14aa 및 14ba: 적색), 항-mCherry 면역염색(도 14ab 및 14bb: 녹색), DAPI 핵 대비염색(도 14ac 및 14bc: 청색), 및 병합된 면역형광 및 DAPI 이미지(도 14ad 및 14bd)를 나타낸다. GCL: 신경절-세포층; INL: 내핵층; ONL: 외핵층. 기준선 = 75 μ m.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 상세한 설명
- [0028] 예시적 실시양태의 설명이 뒤따른다.
- [0029] 본 발명의 몇몇 양태가 예시적 목적만을 위한 실시예를 참고하여 하기에 기재된다. 많은 구체적 상세내용, 관계, 및 방법은 본 발명의 완전한 이해를 제공하기 위해 기재된다는 것이 이해되어야 한다. 그러나, 관련 업계의 통상의 기술자는 본 발명이 하나 이상의 구체적 상세내용 없이 실시될 수 있거나 다른 방법, 프로토콜, 시약, 세포주 및 동물로 실시될 수 있다는 것을 용이하게 인식할 것이다. 본 발명은 행동 또는 사건의 예시된 순서에 의해 제한되지 않으며, 이는 일부 행동이 다른 행동 또는 사건과 상이한 순서로 및/또는 이와 동시에 발생할 수 있기 때문이다. 또한, 모든 예시된 행동, 단계 또는 사건이 본 발명에 따른 방법론을 실시하기 위해 요구되는 것은 아니다. 본원에 기재되거나, 인용된 많은 기술 및 절차는 통상의 기술자에 의해 잘 이해될 것이며 보통 종래의 방법론을 사용하여 이용될 것이다.
- [0030] 달리 정의되지 않는 경우, 본원에 사용된 업계의 모든 용어, 표기법 및 다른 과학 용어 또는 전문용어는 본 발명이 속하는 업계의 통상의 기술자에 의해 보통 이해되는 의미를 갖는 것으로 의도된다. 일부 경우에, 보통 이해되는 의미를 갖는 용어가 명확성 및/또는 용이한 참고를 위해 본원에 정의되고, 본원의 이러한 정의의 포함은 당업계에서 일반적으로 이해되는 것에 대해 실질적인 차이를 나타내는 것으로 반드시 이해되어서는 안된다. 일반적으로 사용된 사전에 정의된 것과 같은 용어는 관련 업계의 맥락에서 이들의 의미와 일치하는 의미를 갖고/갖거나 이와 달리 본원에 정의된 바와 같이 해석되어야 한다는 것이 추가로 이해될 것이다.
- [0031] 본원에 사용된 전문용어는 구체적 실시양태를 설명하는 목적을 위한 것일 뿐이며 제한인 것으로 의도되지 않는다. 본원에 사용된 바와 같이, 부정 관사 "a", "an" 및 "the"는 맥락이 명확하게 달리 나타내지 않는 경우, 복수의 참고를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0032] 본원에 사용된 바와 같이, "클로닝 부위"는 벡터 내로 뉴클레오타이드 "표적 유전자" 또는 "관심 유전자"를 삽입하게 하는 하나 이상의 고유한 제한 부위를 함유하는 벡터 내의 뉴클레오타이드의 짧은 세그먼트를 지칭한다.
- [0033] 본원에 사용된 바와 같이, "프로모터"는 RNA 폴리머라아제가 결합하고 (예를 들어, 유전자의) 전사를 개시하는 DNA의 영역을 지칭한다.
- [0034] 본원에 사용된 바와 같이, "비-프로모터 조절 요소"는 재조합 벡터 내의 특정 유전자의 발현을 증가시키거나 감소시킬 수 있는 핵산 분자의 비-프로모터 서열(들)을 지칭한다. 이러한 비-프로모터 조절 요소는, 비제한적으로, 예를 들어 인핸서 요소, 유도인자 요소, 침묵인자 요소, 5' 비번역 영역(UTR), 3'UTR, 종결인자 요소, CAAT 박스, CCAAT 박스, 프리브노우(Pribnow) 박스, SECIS 요소, 폴리아데닐화 신호, A-박스, Z-박스,

C-박스, E-박스, G-박스, 및 Cis-조절 요소(CRE)를 포함한다.

- [0035] 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "작동가능하게 연결"은 핵산이 그것이 연결되는 요소(예를 들어, 프로모터)의 제어 하에 핵산의 발현을 가능하게 하는 방식으로 재조합 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 벡터 내에 배치된다는 것을 의미한다.
- [0036] 본원에 사용된 바와 같이, "선택가능한 마커 요소"는 인공 선택을 위해 적합한 특성을 부여하는 요소이다. 본 발명에 유용한 선택가능한 마커 요소의 예는, 비제한적으로, 베타-락타마아제, 네오마이신 저항성 유전자, 트리클로산 저항성을 부여하는 돌연변이체 *FabI* 유전자, *URA3* 요소, 형광 유전자 생산물, 친화도 태그, 예컨대 GST, His, CBP, MBP, 및 에피토프 태그, 예컨대 Myc HA, FLAG를 포함한다. 선택가능한 마커 요소는 음성 또는 양성 선택 마커일 수 있다.
- [0037] 다양한 실시양태에서, 본 발명은 관심 유전자의 장기-지속 전사를 아직 제공할 수 있는 크기가 작은 프로모터 서열을 함유하는 벡터, 예컨대 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV))를 제공한다. 프로모터 서열은 많은 일반적으로 사용되는 프로모터의 것에 비해 작은 크기를 갖고, 대부분의 조직 및 세포 유형에서(예를 들어, 포유동물에서) 트랜스유전자의 전사를 구동할 수 있다. 본원에 개시된 프로모터 서열은 억제 또는 비활성화 경향이 덜 있어, 이들이 치료 트랜스유전자의 만성 발현을 요구하는 유전자 요법에 특히 유용하게 한다.
- [0038] 일 양태에서, 본 발명은 관심 유전자를 발현하는 유전자 전달 벡터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 유전자 전달 벡터는 알파헤르페스바이러스 게놈의 게놈 영역으로부터, 예를 들어 가성광견병 바이러스로부터 유래된 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 알파헤르페스바이러스 게놈으로부터의 잠복-연관 프로모터(LAP) 영역을 포함한다.
- [0039] 특별한 실시양태에서, 본 발명의 벡터에서 이용되는 LAP 영역은 서열번호 1(본원에서 LAP1로도 지칭됨), 서열번호 2(본원에서 LAP2로도 지칭됨), 서열번호 3(본원에서 LAP1_2로도 지칭됨), 및 서열번호 4(서열번호 1로부터 선택된다. LAP1_2(880 bp)는 LAP1(498 bp)의 476-bp 서열 및 완전 LAP2 서열(404 bp), 즉 탄뎀(tandem) 내이지만, LAP1 서열의 첫번째 22 bp가 결여된 LAP1 및 LAP2를 포함한다. 서열번호 4(902 bp)는 서열번호 1 및 서열번호 2의 완전 서열을 포함하고, 서열번호 3에 비해 22 bp 길다.
- [0040] 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0041] 이론에 구애됨 없이, 알파헤르페스바이러스 게놈으로부터의 LAP 영역의 특정 활성 부분 또는 단편은 다양한 세포 및 조직 유형에서 트랜스유전자의 발현을 구동할 수 있는 것으로 여겨진다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 사용되는 프로모터는 서열번호 9(서열번호 1)와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 서열번호 9는 LAP2의 232-bp "코어" 서열로 구성되고 TATA 박스 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 9와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 9를 포함한다.
- [0042] 이론에 구애됨 없이, 서열번호 10, 서열번호 11, 및/또는 서열번호 12(서열번호 1)를 추가로 포함하는 LAP 서열은 개선된 전사 성능을 가질 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 프로모터는 예를 들어, 서열번호 9의 5' 또는 3'에서 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 또는 이의 조합을 추가로 포함한다. 서열번호 10("CTCF" 모티프)은 헤르페스 바이러스 유전자 발현의 후성적 조절, 염색질 리모델링 및 전사 인자 및 단백질의 모집에 관여하는 것으로 나타났다(Lang et al., 2017, Lee et al., 2018). 서열번호 11("엡스트림 안정제를 갖는 대안적 CTCF" 모티프)은 대안적 CTCF 모티프를 안정화시키고 4 개 초과 아연 집게(zinc finger) 도메인의 결합을 용이하게 하는 것으로 나타났다(Zimmerman et al., 2018). 서열번호 12("핵 전사 인자 Y(NFY)" 모티프)는 몇몇 진핵생물의 프로모터 영역 내에 위치한 CAAT 박스에 결합하는 전사 인자에 의해 인식된다(Chikhirzhina et al., 2008; Fleming et al., 2013).

표 1. 잠복-여관 프로모터 (LAP) 핵산 서열

[illegible]

[illegible]

	CCCTCGGGAAGAACGCGGTCTGAAAGCGCGGCACCCAGGCCCATCGGTTTGCTGCGCGGTGGCTATGTGCCGCTCGTCCACA AAGTCGGCTGCCCGAGCCCCAGACCCGAGACTGTGCGGAGGTC
마카신 (Macaine) 헤르페스- 바이러스 1 서열번호 8	GAGCGGCGCGCCAGGCTCGGGGAAGAGCGGTGTGCTGCTCAGCTCGGCGACGACGCGCGGGGCGCAGTAGGCCCTCGAGGG CGCGGCGGAGGCGCGGCGGTGTGCTGCGGCGCCCGGCGGCGACCGGCGCCACCGCGCGGGGTGCGGCGCGGCGGCGGT CGCGGCTCAGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGGT TTGCGCGCGGCGGCGAGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGGT GCGCGCGCGGTCTGCTGCGGCGACGAGGGGCGCAGGCTCTGTTCTGGAAGAGCAAGTTCGGCGGCGCGGCGCGGCGCGGCGGT CGACCTGGCGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG CTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG GAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG GGTCGCGCGGTAGCCCTCGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG CGTCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT GGCGCGAGCGCGGTCTGCGCGCGATGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGGT CGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG CTGGTGATGAGGAAGCCC
서열번호 9	ATATATCTTTT TTTATTTTGTCTGGGCTTGAGACCCGACGAGGAGCGGAGGTGGTTCGGGGCCGGAGCGGAGCAGGACC GGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGAGCCGAAAGTGGGG GCAGGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
서열번호 10	CCGCGAGGAGGCAG
서열번호 11	TGGTGCCCTCTGGTGGTCTTCTAGAGGAATTGCA
서열번호 12	TCAGCCAATCAGCGAG
LAP2.1 (232 bp) 서열번호 13	ATATATCTTTT TTTATTTTGTCTGGGCTTGAGACCCGACGAGGAGCGGAGGTGGTTCGGGGCCGGAGCGGAGCAGGACC GGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGAGCCGAAAGTGGGG GCAGGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
LAP2.2 (246 bp) 서열번호 14	ATATATCTTTT TTTATTTTGTCTGGGCTTGAGACCCGACGAGGAGCGGAGGTGGTTCGGGGCCGGAGCGGAGCAGGACC GGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGAGCCGAAAGTGGGG GCAGGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG

[0045]

LAP2.3 (266 bp) 서열번호 15	<u>ATATACTCTTTTATTTTCTGGGCTGGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGTGTGCGGGCCGGAGCCGGAGCAGGACC</u> <u>GGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGG</u> <u>GCAGAGCGGGCGCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGCGAGGAAGAGGGAGCTCTGGTGCTCT</u> <u>TTCTAGAGGAATTGCA</u>
LAP2.4 (248 bp) 서열번호 16	<u>TCAGCCATCAGCGAGATATACTCTTTTATTTTCTGGGCTGGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGTGTGCGGGCCGGGA</u> <u>GCCGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGCGGGAGCAGGAGCAGGAGCAGGAGCGG</u> <u>GAGCCGAAGTGGGGCAGGAGCGCGCGCCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGCGAGGAAGAGGGAGCTC</u>
LAP2.5 (246 bp) 서열번호 NO: 17	<u>CCGCGAGGAGCGAGATATACTCTTTTATTTTCTGGGCTGGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGTGTGCGGGCCGGAG</u> <u>CCGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGCGGGAGCAGGAGCAGGAGCAGGAGCGGG</u> <u>AGCCGAAGTGGGGCAGGAGCGCGCGCCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGCGAGGAAGAGGGAGCTC</u>
LAP2.6 (266 bp) 서열번호 18	<u>TGGTGCCCTCTGGTGCTCTTAGAGGAATTGCAATATACTCTTTTATTTTCTGGGCTGGAGACCCGACAGGAGCGGAGG</u> <u>TGGGTGCGGGGCCGGAGCCGGAGCCGGAGCAGGACC'GGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGG</u> <u>AGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGCAGGAGCGCGCGCCAGCAGCAACAGGGTCTGCCCCAGTCCCGGGCA</u> <u>GGAGAGGGAGCTC</u>
LAP2.7 (248 bp) 서열번호 19	<u>ATATACTCTTTTATTTTCTGGGCTGGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGTGTGCGGGCCGGAGCCGGAGCAGGACC</u> <u>GGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGG</u> <u>GCAGAGCGGGCGCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCCGCGCGAGGAAGAGGGAGCTCTAGCCATCAGCGAG</u>
LAP2.8 (236 bp) 서열번호 20	<u>AAAAATATACTCTTTTATTTTCTGGGCTGGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGTGTGCGGGCCGGAGCCGGAGCAG</u> <u>GACCGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGT</u> <u>GGGGCAGGAGCGCGCGCGCAGCAGCAACAGGGTCTGCCCCAGTCCGCGCGAGGAAGAGGGAGCTC</u>
LAP2.9 (250 bp) 서열번호 21	<u>AAAAATATACTCTTTTATTTTCTGGGCTGGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGTGTGCGGGCCGGAGCCGGAGCAG</u> <u>GACCGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGCGCGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGT</u> <u>GGGGCAGGAGCGCGCGCGCAGCAGCAACAGGGTCTGCCCCAGTCCGCGCGAGGAAGAGGGAGCTCCCGCGAGGAGCA</u> <u>G</u>
LAP2.10 (270 bp) 서열번호 22	<u>AAAAATATACTCTTTTATTTTCTGGGCTGGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGTGTGCGGGCCGGAGCCGGAGCAG</u> <u>GACCGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGCGCGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGT</u> <u>GGGGCAGGAGCGCGCGCGCAGCAGCAACAGGGTCTGCCCCAGTCCGCGCGAGGAAGAGGGAGCTCTGGTGCTCTGGT</u> <u>GGTCTCTTAGAGGAATTGCA</u>

LAP2.11 (252 bp) 서열번호 23	<u>TCAGCCATCAGCGAGAAAAATATATCTTTTATTTTCTGGCCTGGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGTGGGGCC</u> <u>GGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGA</u> <u>GCGGAGCCGAAGTGGGGGAGGAGCGCGGCGCCGACAGCAACAGGGTCCGCCAGAGAAAGAGGGAGCT</u> <u>C</u>
LAP2.12 (250 bp) 서열번호 NO: 24	<u>CCGCGAGGAGGACAGAAAAATATATCTTTTATTTGTCTGGCCTGGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGTGGGGCCG</u> <u>GGAGCCGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGACAGGAG</u> <u>CGGAGCCGAAGTGGGGGACAGGAGCGCGCGCCGACAGCAACAGGGTCCGCCAGGAAAGAGGGAGCTC</u>
LAP2.13 (270 bp) 서열번호 25	<u>TCGTGCCCTCTGGTGGTCTTAGAGGAATTGCAAAAAATATATCTTTTATTTGTCTGGCCTGGAGACCCGACAGGAGCG</u> <u>GAGTGGGTGCGGGCCGGAGCGGAGCAGGAAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGTGGGGC</u> <u>CGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGACAGGCGCGCGCCGACAGCAACAGGGTCCGCCAGTCCCG</u> <u>GCGAGGAAGAGGGAGCTC</u>
LAP2.14 (252 bp) 서열번호 26	<u>AAAAATATATCTTTTATTTGTCTGGCCTGGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGTGGGGCCGGGAGCGGAGCAG</u> <u>GACCGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCGGGAGCAGGAGTGGGGAGT</u> <u>GGGGCAGGAGCGCGCGCGCCGACAGCAACAGGGTCCGCCAGTCCCGCGCGAGGAAGAGGGAGCTCTCAGCCATCAGCG</u> <u>AG</u>
LAP2.15 (329 bp) 서열번호 27	<u>CAGCCAAACCAGCCGAGCCGACCCGAGAGCCCGAGAGCTCCCTCAGCCATAGAAGACACCCGGGCGGGAGA</u> <u>GACGACTGAAAAAATATATCTTTTATTTGTCTGGCCTGGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGTGGGGCCGGGA</u> <u>GCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGG</u> <u>GAGCCGAAGTGGGGGACAGGAGCGCGCGCCGACAGCAACAGGGTCCGCCAGTCCCGCGCGAGGAAGAGGGAGCTC</u>
LAP2.16 (383 bp) 서열번호 28	<u>CACCCATCACAGCAGCCGGACGCTGCGCGCCGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAGCCGAGCCGACCCGAGCC</u> <u>CGAGAGCCCGGAGAGCCAGCTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAAATATATCTTTTATTT</u> <u>TTGTCTGGGCTGGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGTGGTGGGGCCGGGAGCGGAGCCGGAACAGGAACAGGA</u> <u>ACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGAGGAGCGCGCGCGG</u> <u>CCGACAGCAACAGGGTCCGCCAGTCCCGCGCGAGGAAGAGGGAGCTC</u>
LAP2.17 (397 bp) 서열번호 29	<u>CACCCATCACAGCAGCCGGACGCTGCGCGCCGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAGCCGAGCCGCGCCAGCCGACC</u> <u>CGAGAGCCCGGAGAGCCAGCTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAAATATATCTTTTATTT</u> <u>TTGTCTGGGCTGGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGTGGTGGGGCCGGGAGCGGAGCCGGAACAGGAACAGGA</u> <u>ACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGAGGAGCGCGCGCGCGG</u> <u>CCGACAGCAACAGGGTCCGCCAGTCCCGCGCGAGGAAGAGGGAGCTCCCGGAGAGGAG</u>

[0047]

LAP2.18 (417 bp) 서열번호 30	CACCCATCACAGCAGCCGCGACGCTGCGCGCCGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAAACCAGCCGAGCGCCAGCGGACC CGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAAATATATCTTTTATT TTGTCTGGGCTTGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGTGGGGCCGGAGCCGAGGACCGGGAACAGGAACACAGGA ACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGCGCCGAGAGGACAGGAGCGGAGCCGAAAGTGGGGCAGGAGCGGCGCG CCGAGCAGCAACAGGGTCCCGCCAGTCCCGCGCGAGGAAGAGGGAGCTCTGGTGCTCTTCTGAGGGAATGGCA
LAP2.19 (399 bp) 서열번호 NO: 31	TCAGCCATCAGCGACCCATCACAGCAGCCGCGGAGCTGCGCCCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAAACCAGCCGA GCCGCCAGCCGACCGAGAGCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGCGGGAGAGACCGACTGAAAAA TATATCTTTTATTGTCTGGGCTTGAGACCCGACGAGCGGAGCGGAGGTGGTGGGGCCGGAGCCGAGCAAGGACCG GGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGCCCGGAGCAGGACAGGAGCGGGAGCCGAAAGTGGGGG CAGGAGCGGCGCGCCGACGACAAACAGGGTCCCGCCAGTCCGCGGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.20 (397 bp) 서열번호 NO: 32	CCGCGAGGAGGACGACCCATCACAGCAGCCGCGGAGCTGCGCCCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAAACCAGCCGAG CCGCCAGCCGACCGAGAGCCCGAGAGCCAGCTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGCGGGAGAGACCGACTGAAAAAAT ATATCTTTTATTGTCTGGGCTTGAGACCCGACGAGCGGAGGTGGTGGGGCCGGAGCCGAGGACCGGAGCAAGGACCG GAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGCCCGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAAGTGGGGG AGGAGCGGCGCGCCGACGACAAACAGGGTCCCGCCAGTCCGCGGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.21 (417 bp) 서열번호 33	TGCTGCCCTCTGGTGGTCTCTAGAGGAATGGCAACCCATCACAGCAGCCGCGGAGCTGCGCGCGGAGCGGTCCATCTCGCCAG CCAGCCAAACCAGCCGAGCCCGCCAGCCGAGAGCCCGAGAGCTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGCGGGAG AGACGGACTGAAAAAATATATCTTTTATTGTCTGGGCTTGAGACCCGAGGAGGTGGTGGGGCCGGAGCCGAGGAGGTGGTGGGGCCGGG AGCCGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGAGCAGGAGTGGGGCCGGAGCAGGAGCG GGAACCGGAAGTGGGGGAGGAGCGGCGCGCCGACGACAAACAGGGTCCCGCCAGTCCGCGGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.22 (399 bp) 서열번호 34	CACCCATCACAGCAGCCGCGACGCTGCGCGCCGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAAACCAGCCGAGCCGAGCCGACCC CGAGAGCCCGGAGAGCCAGCTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGCGGGAGAGCGGACTGAAAAAATATATCTTTTATT TTGTCTGGGCTTGAGACCCGACGAGCGGAGGTGGTGGGGCCGGAGCCGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGA ACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAAGTGGGGGAGGAGCGGCGCG CCGACGACGCAACAGGGTCCCGCCAGTCCGCGGCGGAGGAAGAGGGAGCTCTGAGCCATCTGAG
LAP2.23 (386 bp) 서열번호 35	GCCCACCCATCACAGCAGCCGCGGAGCTGCGCGCCGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAAACCAGCCGAGCCGCGCCAGCCG ACCCGAGAGCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGCGGGAGAGCGGACTGAAAAAATATATCTTTT ATTGTCTGGGCTTGAGACCCGACGAGCGGAGGTGGTGGGGCCGGAGCCGAGCAGGACCGGGAACAGGAACA GGAAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAAGTGGGGGAGGAGCGGCGG CGCGCGCAGCAGCAACAGGGTCCCGCCAGTCCGCGGCGGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.24 (387 bp) 서열번호 36	CGCCCACCCATCACAGCAGCCGCGGAGCTGCGCGCCGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAAACCAGCCGAGCCGCGCCAGCC GACCCGAGAGCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGCGGGAGAGCGGACTGAAAAAATATATCTTTT TATTTGTCTGGGCTTGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGTGGGGCCGGAGCCGAGCAGGACCGGGAACAGGAAC AGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAAGTGGGGGAGGAGCGGCG GCGCGCGCAGCAGCAACAGGGTCCCGCCAGTCCGCGGCGGAGGAAGAGGGAGCTC

[0048]

LAP2.32 (392 bp) 서열번호 44	<u>TGGTGGCCCTCTGTGGTCTTCTATAGGAATTGCA</u> <u>TGCGCGCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAAACAGCCAGCCGCGCCAG</u> <u>CCGACCCGAGAGCCCGGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGGGGAGAGACGGACTGAAATAATATATCTTTT</u> <u>TTTATTTTGTCTGGGCTTGAGACCCGACAGGAGCGGAGTGGTGTGGGGCCGGGAGCCGAGCAGGACCGGAAACAGGA</u> <u>ACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAAGTGGGGGCAGGAGCGG</u> <u>CGCGCGCCGACAGCAACAGGCTGCCCCAGTCCGCGCGGAGGAAGAGGGAGCTC</u>
LAP2.33 (374 bp) 서열번호 45	<u>TGCGCGCCGAGCGGTCTCATCTCGCCAGCCAGCCAAACAGCCAGCCGCGCCAGCCGAGAGCCCGGAGAGCCAGACTCCC</u> <u>TCAGCCATAGAAGACACCGCGCGGAGAGACGGACTGAAATAATATATCTTTTATTTGTCTGGGCTGGAGACCCGACAGCA</u> <u>GGAGCGAGTGGTGTGGGGCCGGGAGCCGAGCAGGAGCAGGAAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAAC</u> <u>TGGGGCCGGAGCAGGAGCAGGAGCGGAGCGGAGCCGAAAGTGGGGGAGGAGCGCGCGGCGCCGACAGCAACAGGGTCTGCCCA</u> <u>CTCCGCGCGAGGAAGAGGAGCTCTCAGCCAATCAGCGAG</u>
LAP2.34 (255 bp) 서열번호 46	<u>GGCGGAGAGACGGACTGAAATAATATATCTTTTATTTGTCTGGGCTGGAGACCCGACAGCCGAGCAGGAGGTGGTGGTGG</u> <u>GGCGCGGAGCCGAGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAAC</u> <u>CAGGAGCGGAGCCGAAAGTGGGGGAGGAGCGCGCGGCGCCGACAGCAACAGGGTCCGCCCCAGTCCGCGCGGAGGAAAGAG</u> <u>GGAGCTC</u>
LAP2.35 (257 bp) 서열번호 47	<u>CGGGCGGAGAGACGGACTGAAAAAATATATCTTTTATTTGTCTGGGCTTGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGGTG</u> <u>CGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAAC</u> <u>AGCAGGAGCGGAGCCGAAAGTGGGGGAGGAGCGCGCGGCGCCGACAGCAACAGGGTCCGCCCCAGTCCGCGCGGAGGAAAG</u> <u>AGGGAGCTC</u>
LAP2.36 (268 bp) 서열번호 48	<u>ATAGAAAGACACCGGGCGGAGAGACGGACTGAAAAAATATATCTTTTATTTGTCTGGGCTTGAGACCCGACAGGAGC</u> <u>GGAGGTGGTGTGGGGCCGGAGCGCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAAC</u> <u>CCGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAAGTGGGGGAGGAGCGCGCGCCGACAGCAACAGGGTCCGCCCCAGTCCGCG</u> <u>GGCAGGAAGAGGGAGCTC</u>
LAP2.37 (313 bp) 서열번호 49	<u>CCGCCAGCCGACCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGAGAGACGGACTGAAAAAAT</u> <u>ATATCTTTTATTTTGTCTGGGCTTGAGACCCGACAGGAGCGGAGGTGGTCCGGGCGGGAGCCGGAGCAGGACCGG</u> <u>GAAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAAGTGGGGGC</u> <u>AGGAGCGCGCGCGCCGACAGCAACAGGGTCCGCCCCAGTCCGCGCGGAGGAAAGGGAGCTC</u>
LAP2.38 (339 bp) 서열번호 50	<u>TCTCGCCAGCCAGCCAAACAGCCGAGCCGCCAGCCGAGAGCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCCG</u> <u>GGCGGAGAGACGGACTGAAAAAATATATCTTTTATTTGTCTGGGCTTGAGACCCGACAGCCGAGCAGGAGGTGGGTGG</u> <u>GGCCCGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAAC</u> <u>CAGGAGCGGAGCCGAAAGTGGGGGAGGAGCGCGCGCCGACAGCAACAGGGTCCGCCCCAGTCCGCGCGGAGGAAAGAG</u> <u>GGAGCTC</u>

[0050]

LAP2.39 (359 bp) 서열번호 51	CTGCGGCGGAGCGGTCTCATCTCGCCAGCCAGCCAACACGCCGAGCCGCCAGCCGAGAGCCCGAGAGCCAGACTCC CTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGAGAGACGGACTGAAAAATATATCTTTTATTTGTCTGGCTTGGAGACCCGAGC AGGAGCGGAGGTGGTTCGGGCGCGGAGCCGGAGACCGGAAACAGGAAACAGGAAACAGGAAACAGGAAACAGGAAACAGGA GTGGGCGGAGCAGGAGCAGGAGGAGGCCGAGCCGAGTGGGGGAGGAGCGGGCGGCGGCGGAGCAACAGGGTCCGCCCC AGTCCGGCGGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.40 (364 bp) 서열번호 52	GGACGCTGCGCGCGGAGCGGTCTCATCTCGCCAGCCAGCCAACACGCCGAGCCGCCAGCCGAGAGCCCGAGAGCCAG ACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGAGAGACGGACTGAAAAATATATCTTTTATTTGTCTGGGCTTGGAGACCC GCAGCAGGAGCGGAGGTGGTTCGGGCGCGGAGCCGGAGCAGGACCGGAAACAGGAAACAGGAAACAGGAAACAGGAA CAGGAGTGGGCGCGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAAGTGGGGGAGGAGCGGGCGGCGGAGCAAGCAACAGGGTTC GCCCCAGTCCGCGGCGGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.41 (368 bp) 서열번호 53	CCGCGGACGCTGCGCGCGGAGCGGTCTCATCTCGCCAGCCAGCCAACACGCCGAGCCGCCAGCCGAGAGCCCGGAGAG CCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGAGAGACGGACTGAAAAATATATCTTTTATTTGTCTGGGCTTGGAG ACCCGAGCAGGAGCGGAGGTGGTTCGGGCGCGGAGCCGGAGCAGGACCGGAAACAGGAAACAGGAAACAGGAAACAGGAA GGAACAGGAGTGGGCGCGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAAGTGGGGGAGGAGCGGGCGGCGGAGCAAGCAACAG GGTCCGCCAGTCCGCGCGGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.42 (376 bp) 서열번호 54	CACAGCAGCGCGGAGCGTTCGCGCGGAGCGGTCTCATCTCGCCAGCCAGCCAACACGCCGAGCCGCCAGCCGAGAGAGC CCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGAGAGACGGACTGAAAAATATATCTTTTATTTGTCTGG GCCTGGAGACCCGAGCAGGAGCGGAGGTGGTTCGGGCGCGGAGCCGGAGCAGGACCGGAAACAGGAAACAGGAAACAGGAA CAGGAAACAGGAAACAGGAGTGGGCGCGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAAGTGGGGGAGGAGCGGGCGGCGGAGC AGCAACAGGGTTCGCCAGTCCGCGCGGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.43 (384 bp) 서열번호 55	CCACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCGGAGCGGTCTCATCTCGCCAGCCAGCCAACACGCCGAGCCGCCAGCCGAC CCGAGAGCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGAGAGACGGACTGAAAAATATATCTTTTAT TTTGTCTGGGCTTGGAGACCCGAGCAGGAGCGGAGGTGGTTCGGGCGCGGAGCCGGAGCAGGACCGGAAACAGGAAACAGG AACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGCGCGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAAGTGGGGGAGGAGCGGGCGGCG GCCGAGCAGCAACAGGGTTCGCCAGTCCGCGCGGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.44 (385 bp) 서열번호 56	CCACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCGGAGCGGTCTCATCTCGCCAGCCAGCCAACACGCCGAGCCGCCAGCCGAG CCGAGAGCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGAGAGACGGACTGAAAAATATATCTTTTAT TTTGTCTGGGCTTGGAGACCCGAGCAGGAGCGGAGGTGGTTCGGGCGCGGAGCCGGAGCAGGACCGGAAACAGGAAACAG GAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGCGCGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAAGTGGGGGAGGAGCGGGCGGCG GGCCGAGCAGCAACAGGGTTCGCCAGTCCGCGCGGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.45 (390 bp) 서열번호 57	CTCCGCCCACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCGGAGCGGTCTCATCTCGCCAGCCAGCCAACACGCCGAGCCGCCA GCCGAGCCGAGAGCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGAGAGACGGACTGAAAAATATATCTTT TTTATTTGTCTGGGCTTGGAGACCCGAGCAGGAGCGGAGGTGGTTCGGGCGCGGAGCCGGAGCAGGACCGGAAACAGGAA ACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGCGCGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAAGTGGGGGAGGAGCGGGCGGAGCGG CGCGGCCGAGCAGCAACAGGGTTCGCCAGTCCGCGCGGAGGAAGAGGGAGCTC

[0051]

bp, 약 240-400 bp, 약 240-380 bp, 약 260-380 bp, 약 260-360 bp, 약 280-360 bp, 약 280-340 bp, 약 300-340 bp, 또는 약 320-340 bp 길이이다.

- [0057] 특별한 실시양태에서, 본 발명의 프로모터 서열은 트랜스유전자의 강한 장기 발현이 배양액 내, 동물 내 또는 인간 내의 세포에서 요구될 때 사용될 수 있다. 프로모터는 게놈 공간 제약이 있지만, 장기-지속 프로모터 전사 활성이 필요한 상황에서 유용하다. AAV는 인간 유전자 요법을 위해 특히 유용하며; 예컨대, 본 발명의 LAP 서열은 AAV와 이용될 때 유전자 요법 적용을 제공한다.
- [0058] 일부 실시양태에서, 관심 유전자는 *시험관내*에서 적어도 약 30 일, 약 60 일, 약 90 일, 약 120 일, 약 150, 약 180 일, 또는 약 190 일 동안 본원에 제공된 LAP 서열의 제어 하에 발현된다. 일부 실시양태에서, 관심 유전자는 *생체내*에서(예를 들어, 뇌와 같은 조직에서) 적어도 약 30 일, 약 60 일, 약 90 일, 약 120 일, 약 150, 약 180 일, 또는 약 190 일 동안 본원에 제공된 LAP 서열의 제어 하에 발현된다. 일부 실시양태에서, 관심 유전자는 *생체외*에서(*ex vivo*)(예를 들어, 뉴런과 같은 배양된 세포에서) 적어도 약 적어도 약 30 일, 약 60 일, 약 90 일, 약 120 일, 약 150, 약 180 일, 또는 약 190 일 동안 본원에 제공된 LAP 서열의 제어 하에 발현된다.
- [0059] 일 양태에서, 본 발명은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터; 표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위; 및 숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위해 요구되는 적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소를 포함하는, 숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위한 제조함 벡터를 제공한다.
- [0060] 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0061] 본원에 기재된 LAP 서열은 다양한 유전자 발현 벡터, 예컨대 플라스미드, 박테리아 인공 염색체(BAC), 코스미드 또는 다른 비-바이러스 또는 바이러스 시스템에서 사용되어, 트랜스유전자(들)를 발현할 수 있다.
- [0062] 일부 실시양태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터이다. 본 발명에 의해 이용될 수 있는 바이러스 벡터의 비-제한적인 예는, 비제한적으로, 레트로바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 광견병 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, VSV 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 레오바이러스 벡터, 샘리키삼염 바이러스, 황열병 바이러스, 및 신드비스 바이러스 벡터를 포함한 DNA 또는 RNA 바이러스 벡터를 포함한다.
- [0063] 일부 실시양태에서, 벡터는 비-바이러스 벡터이다. 비-바이러스 벡터는 플라스미드 DNA, 리포솜-DNA 복합체(리포플렉스(lipoplex)), 및 중합체-DNA 복합체(폴리플렉스(polyplex))일 수 있다. 비-바이러스 벡터는 플라스미드 RNA, 리포솜-RNA 복합체(리포플렉스), 및 중합체-RNA 복합체(폴리플렉스)일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 및 이의 유사체는 단독으로 또는 복합체로, 비-바이러스 벡터-매개된 유전자 전달 구축물일 수 있다.
- [0064] 본원에 제공된 벡터(예를 들어, 바이러스 벡터)는 예를 들어, (예를 들어, 신경계의) 후천성 또는 유전성 질환을 치료하기 위한 유전자 요법에서 동물 모델 및 인간의 기관 또는 조직에서 치료 트랜스유전자를 발현하기 위해 사용될 수 있다.
- [0065] 본원에 개시된 LAP 서열은 가성광견병 바이러스(PRV)의 게놈으로부터 유래되었다. PRV는 다양한 동물을 감염시킬 수 있는 알파헤르페스바이러스이다. 천연 숙주는 성체 돼지이지만, PRV는 소, 양, 개, 새, 고양이, 염소, 라쿤, 닭, 스컹크, 포섬, 기니피그, 말, 토끼, 래트, 마우스 및 비인간 영장류를 포함한 광범위한 척추동물을 감염시킬 수 있다(Pomeranz et al., 2005). 배양된 인간 세포는 또한 PRV 감염에 민감하고 인간에서 인수공통감염 PRV 감염이 보고되었다(Wong et al., 2019).
- [0066] PRV는 몇몇 상이한 동물 종을 감염시킬 수 있는 것 이외에, 범친화성 바이러스이기도 하다. 이는 감염된 숙주의 대부분의 조직 및 기관이 PRV 감염에 민감하고 허용성일 수 있다는 것을 의미한다(Blanchard et al., 2006; Boldogkoi et al., 2000; Fan et al., 2019; Gasparini et al., 2019; Pomeranz et al., 2005). 따라서, LAP 서열은 다양한 세포 및 조직 유형에서 유전자 요법을 위해 잠재적으로 사용될 수 있다.
- [0067] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 제조함 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 포유동물 세포(예를 들어, 뉴런 세포)이다. 다른 실시양태에서, 숙주 세포는 조류 세포,

어류 세포, 양서류 세포, 및 파충류 세포로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 *시험관내* 뉴런 세포, *생체외* 뉴런 세포, 또는 둘 다를 포함한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 대상체의 뉴런 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴런 세포는 대상체의 일차 운동 영역, 이차 운동 영역, 일차 체성감각 영역, 보조 체성감각 영역, 시각 영역, 해마체, 선조체, 담창구, 시상, 시상하부, 중뇌 영역, 후뇌, 후각 영역 또는 이의 조합 내에 상주한다. 일부 실시양태에서, 중뇌 영역은 운동-관련 영역, 감각-관련 영역, 또는 둘 다를 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴런 세포는 대상체의 피질, 치상회, 선조체, 소뇌, 후구 또는 이의 조합 내에 상주한다. 일부 실시양태에서, 뉴런 세포는 뉴런, 미세아교 세포, 별아교세포, 또는 이의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴런 세포는 뉴런을 포함한다.

[0068] 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 방광 세포, 혈액 세포, 골세포, 내피 세포, 상피 세포, 지방 세포, 심장 세포, 장 세포, 위 세포, 신장 세포, 간 세포, 폐 세포, 근육 세포, 췌장 세포, 망막 세포, 성세포, 피부 세포, 비장 세포, 줄기 세포, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 암 세포이다.

[0069] 다른 양태에서, 본 발명은 표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고, 핵산이 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 유전자를 코딩하는 핵산은 약 4 kb 초과를 포함한다.

[0070] 추가 양태에서, 본 발명은 표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위를 포함하고, 클로닝 부위가 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 및 서열번호 4로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.

[0071] 다른 양태에서, 본 발명은 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터; 표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위; 및 숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위해 요구되는 적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소를 포함하는, 숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위한 재조합 벡터를 제공한다. 서열번호 5는 에킨 헤르페스 바이러스의 LAP 서열을 포함하고; 서열번호 6은 소 헤르페스 바이러스의 LAP 서열을 포함하고; 서열번호 7은 수두 대상포진 바이러스의 LAP 서열을 포함하고; 서열번호 8은 마카신 헤르페스바이러스 1의 LAP 서열을 포함한다(표 1). 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.

[0072] 다른 양태에서, 본 발명은 표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고, 핵산이 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 및 서열번호 8로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 유전자를 코딩하는 핵산은 약 4 kb 초과를 포함한다.

[0073] 추가 양태에서, 본 발명은 표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위를 포함하고, 클로닝 부위가 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 및 서열번호 8로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 재조합 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열

동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.

[0074] 다른 양태에서, 본 발명은 서열번호 9와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터; 표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위; 및 숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위해 요구되는 적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소를 포함하는, 숙주 세포에서 표적 유전자의 발현을 위한 재조합 벡터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 9와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 9를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 또는 이의 조합의 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 13-58로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 13-58로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.

[0075] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소는 인핸서 요소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비-프로모터 조절 요소는 유도인자 요소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 재조합 벡터는 선택가능한 마커 요소를 추가로 포함한다.

[0076] 다른 양태에서, 본 발명은 표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고, 핵산이 서열번호 9와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 재조합 폴리뉴클레오타이드 분자를 제공한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 9와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 9를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 또는 이의 조합의 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 13-58로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 13-58로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 유전자를 코딩하는 핵산은 약 4 kb 초과를 포함한다.

[0077] 추가 양태에서, 본 발명은 표적 유전자를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 클로닝 부위를 포함하고, 클로닝 부위가 서열번호 9와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 재조합 폴리뉴클레오타이드 분자를 제공한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 9와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 9를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 또는 이의 조합의 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 13-58로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 13-58로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.

[0078] 다른 양태에서, 본 발명은 숙주 세포를 재조합 폴리뉴클레오타이드 분자와 접촉시켜 재조합 폴리뉴클레오타이드 분자가 숙주 세포 내로 도입되는 단계를 포함하고, 이에 의해 표적 유전자의 발현이 숙주 세포에서 발생하며, 이때, 재조합 폴리뉴클레오타이드 분자가 표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고, 핵산이 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인, 숙주 세포에서 표적 유전자를 발현하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.

[0079] 다른 양태에서, 본 발명은 숙주 세포를 재조합 폴리뉴클레오타이드 분자와 접촉시켜 재조합 폴리뉴클레오타이드 분자가 숙주 세포 내로 도입되는 단계를 포함하고, 이에 의해 표적 유전자의 발현이 숙주 세포에서 발생하며, 이때, 재조합 폴리뉴클레오타이드 분자가 표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고, 핵산이 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로부터 선택되는 서열과 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인, 숙주 세포에서 표적 유전자를 발현하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태

에서, 프로모터는 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.

[0080] 다른 양태에서, 본 발명은 숙주 세포를 재조합 폴리뉴클레오티드 분자와 접촉시켜 재조합 폴리뉴클레오티드 분자가 숙주 세포 내로 도입되는 단계를 포함하고, 이에 의해 표적 유전자의 발현이 숙주 세포에서 발생하며, 이때, 재조합 폴리뉴클레오티드 분자가 표적 유전자를 코딩하는 핵산을 포함하고, 핵산이 서열번호 9와 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인, 숙주 세포에서 표적 유전자를 발현하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 9와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 9를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 또는 이의 조합의 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 13-58로부터 선택되는 핵산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 13-58로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.

[0081] 일부 실시양태에서, 뉴런 세포는 대상체의 척수 내에 상주한다. 일부 실시양태에서, 뉴런 세포는 척수의 후각 내에 상주한다. 일부 실시양태에서, 뉴런 세포는 요추 척수, 흉곽 척수, 경부 척수 또는 이의 조합 내에 상주한다.

[0082] 일부 실시양태에서, 재조합 폴리뉴클레오티드 분자는 숙주 세포를 재조합 폴리뉴클레오티드와 접촉시 형질도입 (예를 들어, 바이러스 벡터에 의한 감염)에 의해 숙주 세포 내로 도입된다. 다른 양태에서, 재조합 폴리뉴클레오티드 분자는 숙주 세포를 재조합 폴리뉴클레오티드와 접촉시 형질주입에 의해 숙주 세포 내로 도입된다. 다른 양태에서, 재조합 폴리뉴클레오티드 분자는 숙주 세포를 재조합 폴리뉴클레오티드와 접촉시 전기천공에 의해 숙주 세포 내로 도입된다.

[0083] 재조합 아데노-연관 바이러스 벡터(AAV)는 중추 신경계(CNS)의 연결성 및 기능을 정의하기 위한 필수적인 신경과학 도구이다. 또한, AAV는 유전성 및 후천성 CNS 질환을 치료하기 위해 유전자 요법 벡터로서 사용된다. 이의 안전성 및 광범위한 향성에도 불구하고, 제한된 페이로드 용량 및 CNS에서 장기 범-뉴런 트랜스유전자 발현을 제공하는 소형 유전자 프로모터의 결여와 같은 중요한 이슈가 교정될 필요가 있다. 보통 사용되는 유전자 프로모터는 비교적 크고 바이러스 CNS 형질도입 후 수개월 억제될 수 있어, 단일-용량 유전자 요법 적용의 장기 성능을 위협하게 할 수 있다.

[0084] 트랜스유전자 발현을 최적화하기 위한 캡시드 조작 및 새로운 유전자 프로모터를 포함한 재조합 AAV에 대한 최근의 개선은 유전자 요법 적용을 상당히 개선시켰다(Mak, Rajapaksha et al. 2017; Hudry and Vandenberghe 2019; Ogden, Kelsic et al. 2019). AAV 벡터는 이의 안전성, 혈청형-의존적인 광범위한 향성 및 형질도입 효율성을 고려하여 신경과학 및 임상 적용에서 광범위하게 사용된다(Aschauer, Kreuz et al. 2013; Samulski and Muzyczka 2014; Mak, Rajapaksha et al. 2017). 말초 혈관 투여 후 마우스 혈액-뇌 장벽(BBB)을 침투하고 뇌 및 척수 둘 다에서 뉴런을 광범위하게 형질도입하는 향상된 능력을 갖는 AAV-9 변이체 PHP.eB(Chan, Jang et al. 2017)는 최근 캡시드 개선의 하나의 예이다(Dayton, Grames et al. 2018). 재조합 AAV의 주요 제한은 단지 ~ 4.9 kb의 제한된 페이로드 용량을 갖는 이의 작은 캡시드이다(Russell and Hirata 1998). 따라서, 강하고 오래가는 전사를 지속하는 짧은 프로모터 서열의 발견은 하나의 바이러스 용량으로 트랜스유전자 페이로드를 확장하고 만성 치료 효과를 달성하기 위해 중요하다.

[0085] 몇몇 강한 프로모터, 예컨대 뉴런-특이적 엔올라아제(NSE, 1800 bp)(Peel, Zolotukhin et al. 1997; Delzor, Dufour et al. 2012), 칼슘/칼모둘린-의존성 단백질 키나아제 II 알파(CaMKIIa, 1300 bp)(Sohal, Zhang et al. 2009) 및 인간 연장 인자 1 알파(EF1a, 1264 bp)(Sohal, Zhang et al. 2009; Qin, Zhang et al. 2010)가 전신 AAV 전달에 사용되어 왔다(Bedbrook, Deverman et al. 2018). 그러나, 상당한 크기의 이들 프로모터 서열(Bedbrook, Deverman et al. 2018)은 대형 치료 트랜스유전자 또는 다수의 소형 트랜스유전자의 사용을 제한한다. 또한, 짧은 프로모터, 예컨대 인간 거대세포바이러스 즉시-초기 인핸서 및 프로모터(CMV, 600 bp)(Gray, Foti et al. 2011) 또는 절단된 버전의 인간 시냅신 프로모터(hSyn, 468 bp)(Jackson, Dayton et al. 2016)는 유전자 전사 및 발현을 구동하기에 상당히 약하였고, 일부 경우에 전달 후 수주만에 완전히 억제되거나 비활성화된다(Brooks, Harkins et al. 2004; Nathanson, Jappelli et al. 2009; Qin, Zhang et al. 2010; Back,

Dossat et al. 2019). 유사하게는, 소형 유비쿼터스 프로모터 유사 베타 글루쿠로니다아제(GUSB, 378 bp)(Husain, Passini et al. 2009) 또는 유비쿼터 C(UBC, 403 bp)(Qin, Zhang et al. 2010; Powell, Rivera-Soto et al. 2015)는 약한 전사 수준을 나타냈다.

[0086] 헤르페스바이러스 가성광견병 바이러스(PRV)의 게놈으로부터 얻어진 소위 LAP1(498 bp), LAP2(404 bp) 및 LAP1_2(880 bp)인 3 개의 알파헤르페스바이러스 잠복-연관 프로모터(LAP)가 본원에 기재되고 입증된다. 패밀리에 *헤르페스비리데(Herpesviridae)*의 *알파헤르페스비리데(Alphaherpesvirinae)* 서브패밀리는 소 헤르페스 바이러스-1(BHV-1), 수두-대상포진 바이러스(VZV), 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 및 PRV를 포함한다. 이들 바이러스는 상이한 포유동물 숙주의 감각 신경절에서 게놈 조직을 공유하고 잠복 감염을 수립한다(Koyuncu, Hogue et al. 2013).

[0087] PRV의 LAP 영역은 2 개의 독립 프로모터인 LAP1 및 LAP2를 포함한다(Cheung 1989; Cheung and Smith 1999; Jin and Scherba 1999; Jin, Schnitzlein et al. 2000)(도 1a). PRV LAP1은 제1 TATA 박스의 업스트림에 2 개의 GC 박스 및 3 개의 CAAT 박스를 함유한다. PRV LAP2는 제2 TATA 박스 전에 2 개의 GC 박스를 함유한다(Cheung 1989; Jin and Scherba 1999; Taharaguchi, Kobayashi et al. 2002). LAP에 존재하는 컨센서스 프로모터 요소에 대한 상이한 전사 인자(TF)의 결합은 잠복 감염 동안 뉴클레오솜 침묵으로부터의 회피를 용이하게 할 수 있다는 것이 제안되어 왔다(Deshmane and Fraser 1989; Leib, Bogard et al. 1989; Devi-Rao, Goodart et al. 1991; Jin, Schnitzlein et al. 2000; Ono, Tomioka et al. 2007). 트랜스유전자 마우스주에서, PRV LAP 촉진된 전사는 PRV 감염의 부재 하에서 뉴런-특이적이다(Taharaguchi, Yoshino et al. 2003). 그러나, 일시적 발현 분석에서, PRV LAP1 및 LAP2는 배양된 뉴런 세포뿐 아니라, 비-뉴런 세포 둘 다에서 전사를 촉진한다(Cheung and Smith 1999; Taharaguchi, Kobayashi et al. 2002). 또한, 탄뎀 LAP1 및 LAP2 서열의 활성은 LAP1 또는 LAP2 단독과 비교하여 상당히 증가된다(Cheung and Smith 1999).

[0088] 본원에서, AAV-PHP.eB의 안구주 전신 전달, iDisco+ 조직-세척 및 광-시트 현미경을 기초로 한 전체-CNS 스크리닝 접근법을 사용하여, 헤르페스바이러스 가성광견병 바이러스(PRV)로부터의 3 개의 소형 잠복-연관 프로모터(LAP)를 확인하였다. 이들 프로모터는 LAP1(404bp), LAP2(498bp) 및 LAP1_2(880bp)이다. 이들은 PRV 감염 사이클의 생산 및 잠복 단계 동안 바이러스 코딩된 잠복-연관 전사물(LAT)의 만성 전사를 구동한다. 안정적인 범-뉴런 트랜스유전자 전사 및 번역이 AAV 형질도입 후 6 개월 동안 뇌 및 척수에서 AAV-LAP로부터 관찰되었다. 데이터는 LAP가 1-회 바이러스-벡터 투여 후 만성 트랜스유전자 발현을 요구하는 바이러스 벡터-기반 CNS 유전자 요법을 위한 적합한 후보이며, PRV LAP1, LAP2 및 탄뎀 LAP1_2 프로모터가 단일 투여 후 안정적인 만성 트랜스유전자 발현을 요구할 수 있는 전신의 덜 침습적인 범-뉴런 유전자 전달 적용을 위해 적합할 수 있다는 것을 제시한다.

[0089] 실시예 1. 재료 및 방법

[0090] PRV LAP 서열의 구축

[0091] PRV 잠복-연관 전사물 프로모터(LAP)를 PRV Becker 균주 게놈(GenBank: JF797219.1)의 좌표 95106-96007로부터 PCR 증폭시켰다. LAP1 영역(498bp)을 프라이머 쌍 LAP1F(5'- GCA CGC GTA TCT CCG GAA AGA GGA AAT TGA -3')(서열번호 59) 및 LAP1R(5'- GCG GAT CCT ATA TAC ACG ATG TGC ATC CAT AAT -3')(서열번호 60)을 사용하여 증폭시켰다. LAP2 영역(404bp)을 프라이머 쌍 LAP2F(5'- GCA CGC GTA TCC CCG GTC CGC GCT CCG CCC ACC CA -3')(서열번호 61) 및 LAP2R(5'- GCG GAT CCG AGC TCC CTC TTC CTC GCC GCG GAC TGG -3')(서열번호 62)을 사용하여 증폭시켰다. 전체 LAP 영역에 걸친 LAP1_2(902bp)를 LAP1F 및 LAP2R을 사용하여 증폭시켰다(Cheung and Smith 1999). 이들 PCR 서열의 5' 및 3' 영역은 각각 벡터 pAAV-Ef1 α -mCherry 내로의 지향성 클로닝을 위해 사용되는 MluI 및 BamHI 제한 부위를 함유하였다. pAAV-Ef1 α -mCherry는 Karl Deisseroth(Addgene 플라스미드 # 114470)로부터 주어졌다. 3 개의 AAV-LAP 플라스미드를 MluI 및 BamHI를 이용한 벡터 pAAV-Ef1 α -mCherry의 이중 분해 후, AAV2 역위 말단 반복부(ITR)에 인접하고 SV40 폴리A 신호로 종결되는 mCherry 리포터 유전자의 업스트림의 적절한 LAP 단편의 서브클로닝에 의해 구축하였다.

[0092] AAV 벡터의 구축

[0093] 모든 발현 카세트는 프린스턴 신경과학 연구소 바이러스 코어 시설(Princeton Neuroscience Institute Viral Core Facility)에서 AAV-PhP.eB 캡시드(Daniela Gradinaru, Addgene 플라스미드 #103005로부터 주어짐) 내로 패키징하고 이전에 기재된 바와 같이(Zolotukhin, Byrne et al. 1999; Chan, Jang et al. 2017) 아이오딧사놀 단계 구매 및 칼럼 한외여과에 의해 정제하였다. 캡시드-보호된 바이러스 게놈을 TaqMan qPCR에 의해 측정하고

밀리리터 당 게놈 복제물(GC/mL)로서 보고하였다.

[0094]

동물

[0095]

동물 연구를 프린스턴 대학 동물실험 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee of Princeton University)에 의해 승인된 가이드라인 및 프로토콜에 따라 수행하였다(프로토콜 # 1943-16 및 1047). 예정-임신한 스프라그-다울리(Sprague-Dawley) 래트를 Hilltop Labs Inc.(Scottsdale, PA)로부터 얻었다. E17 래트 배아를 교감 SCG 뉴런의 단리를 위해 수집하였다. 성체(4 내지 6-주령) 야생형 C57BL/6J 수컷 마우스를 Jackson Laboratory(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)로부터 얻었다. 마우스는 실험 절차가 수행되기 전에 프린스턴 신경과학 위원회 사육장의 수용 시설에 대해 적어도 48 시간의 순화를 가졌다.

[0096]

일차 상부 경추 신경절 세포 배양

[0097]

래트 배아(E17)로부터의 SCG 뉴런을 이전에 기재된 바와 같이(Curanovic, Ch'ng et al. 2009) 3중 챔버에서 배양하였다. 간단하게는, SCG를 트립신(2.5 mg/mL, Sigma-Aldrich, The Woodlands, TX)으로 분리하고 2% B-27, 100 ng/mL 신경 성장 인자(NGF), 및 1% 페니실린-스트렙토마이신-글루타민이 보충된 뉴로바살(neurobasal) 배지(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)를 함유한 배지가 있는 폴리-O-오르니틴 및 라미닌-코팅된 접시 상에 플레이팅하였다. 단일 신경절의 대략 3분의 2를 3중 챔버의 S(체세포) 구획으로 위치시켰다. 시딩 후 3일에, 배양 배지를 0.1 mM 시토신-D-아라비노푸라노시드, Ara C(Sigma-Aldrich, The Woodlands, TX)로 적어도 2 일 동안 처리하여, 분할, 비뉴런 세포를 제거하였다. 배양 배지를 5 일마다 교체하고, 뉴런을 37°C에서 5% CO₂와 항온처리하였다.

[0098]

안구 뒤 부비강 주사

[0099]

AAV 벡터의 정맥내 주사를 안구 뒤 정맥동 내로의 편측 주사에 의해 마우스에서 수행하였다(Yardeni, Eckhaus et al. 2011). 동물을 절차 전에 케타민(80 mg/kg)/자일라진(10 mg/kg) 각테일을 사용하여 마취시켰다. 무반응이 되면, 동물을 내안각 내로의 주사를 위해 황와위로 위치시켰다. 주사 체적은 29G1/2 인슐린 시린지로 투여되는 총 4×10^{11} 바이러스 게놈을 함유한 100 μ L였다. 동물을 조절된 가열 패드 상에 위치시키고 움직임 때까지 모니터링하였다.

[0100]

조직 처리 및 조직학적 절차

[0101]

마우스를 30 및 190 감염 후 일(dpi)에 과용량의 케타민(400 mg/kg)/자일라진(i.p.)으로 마취시키고 4% 파라포름알데하이드(PFA)로 관류시켰다. 뇌 및 척수를 4°C에서 4% PFA에서 밤새 사후-고정시켰다. 인산염 완충 생리식염수(PBS)로 세정 후, 뇌를 0.1% 소듐 아지드가 있는 PBS에서 4°C에서 저장하였다. 좌반구를 Leica VT1200 비브라토(vibratome)를 사용하여 50 μ m 및 Leica CM3050 S 크라이오스탯을 사용하여 20 μ m로 시상으로 절단하여 뇌를 2 개 부분으로 분할하였다. 우반구를 iDISCO+ 조직 세척 프로토콜(하기)을 위해 사용하였다. 고정된 뇌 및 척수를 한랭보호를 위해 4°C에서 10% 수크로오스, 20% 수크로오스 및 30% 수크로오스에서 연속으로 항온처리하였다. 조직을 OCT(tissue-Tek, Torrance, CA)에 임베딩하고, 드라이아이스에서 냉동시키고 절단까지 -80°C에서 저장하였다. 동결절단을 위해, 척수를 임베딩 몰드(Sigma-Aldrich, The Woodlands, TX)에 위치시키고 37°C에서 초고순도 저융점 아가로오스(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)를 채웠다. 반-고체 아가로오스 큐브를 제거하고 크라이오스탯을 사용하여 20 μ m로 횡단면으로 슬라이싱하기 위해 수평 방향으로 접촉시켰다(Loctite, Rocky Hill, CT).

[0102]

면역염색

[0103]

면역조직화학을 위해, 자유-유동 뇌 섹션을 PBS로 세척하고 3% 소 혈청 알부민(BSA), 2% 당나귀 혈청 및 0.5% Triton X-100(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)으로 1 시간 동안 차단하였다. 샘플을 4°C에서 밤새 일차 항체 및 1% BSA, 1% 당나귀 혈청 및 0.5% Triton X-100를 함유한 PBS에 희석된 RT(실온)에서 1 시간 동안 이차 항체와 항온처리하였다. 세포 핵을 5 분 동안 0.5 μ g/mL DAPI(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)로 대비염색하였다. 다음 일차 항체를 사용하였다: 토끼 항-RFP Rockland(1:1000; Limerick, PA), 닭 항-mCherry Abcam(1:500; Cambridge, MA), 마우스 항-NeuN(1:500; Millipore Bioscience Research Reagents, Temecula, CA), 토끼 항-Olig2(1:500, EMD Millipore, Temecula, CA), 토끼 항-Iba1(1:1000, Wako Chemical, Richmond, VA) 및 토끼 항-S100(1:5000, Dako, Glostrup, Denmark). 다음 이차 항체를 사용하였다: Alexa Fluor 488 당나귀 항-토끼 IgG, Alexa Fluor 488 당나귀 항-마우스 IgG, Alexa Fluor 647 당나귀 항-토끼 IgG, Alexa Fluor 647 당나귀 항-닭 IgG(1:1000, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). 척수 자유-유동 섹션을 1 시간 동안

NeuroTrace 500/525 녹색 형광 니슬(Nissl) 염색(Molecular Probes, Eugene, OR)의 1:300 희석으로 염색하였다. 섹션을 10 분에 PBS 중 0.1% Triton X-100로 투과성부여시키고 PBS로 1 차 후, 0.1% Triton X-100 가 있는 PBS로 10 분 동안 세척하였다. 샘플을 5 분 동안 0.5 $\mu\text{g/mL}$ DAPI와 항온처리한 다음에, 실온에서 2 시간 동안 PBS로 세척하였다. Fluoromount-G 장착 배지(Southern Biotech, Birmingham, AL)를 장착 전에 뇌 및 척수 섹션에 적용하였다.

[0104] 현미경

[0105] 뉴런 SCG 배양액을 Cool Snap ES2 카메라(Photometrics, Tucson, AZ) 및 4X 대물렌즈를 포함한 Nikon Ti-E 도립 동일형광 현미경(Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japan)으로 영상화하였다. 전체 S 구획의 타일화된 이미지를 Nikon NIS Elements 소프트웨어로 조립하였다. 다양한 뇌 영역에서 AAV 형질도입 효율을 정량화하기 위해, 뇌 슬라이스를 NanoZoomer S60 형광 현미경 스캐너(Hamamatsu, Hamamatsu, Japan)로 영상화하였다. 뇌 슬라이스를 세심한 검출을 위해 20X 및 63X 대물렌즈, 하이브리드(HyD) 검출기를 사용하여, 1024 x 1024 픽셀 영역에 걸쳐 Leica STP8000 공초점 레이저-스캐닝 현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 영상화하였다. ImageJ 소프트웨어를 사용하여, 이전에 보고된 바와 같이(Maturana, Aguirre et al. 2017) 수집된 총 세포 형광을 계산하였다. 관심 영역(ROI)을 그리는 세포를 선택하고 비-형광 세포로부터의 백그라운드 강도에 대해 정규화하였다. 고정된 총 세포 형광의 계산을 각각의 세포의 통합된 영역, 밀도 및 평균 회색 값(mean gray value)을 고려하여 상대 형광 강도(RFI)로서 측정하였다.

[0106] iDISCO+ 조직 세척

[0107] 투과성부여

[0108] 우뇌 반구를 iDISCO+ 조직 세척을 위해 사용하였다. 뇌 샘플을 이전에 기재된 바와 같이(Renier, Wu et al. 2014) 조직 세척 전에 4% PFA에서 밤새 고정시켰다. 고정된 샘플을 20, 40, 60, 80, 100% 메탄올/물 용액에서 각각 1 시간 동안 세척/탈수시킨 후, 5% 과산화수소/메탄올로 밤새 세척하고(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 메탄올/물 100, 80, 60, 40, 20%의 역구배로 각각 1 시간 동안 재수화시켰다. 최종적으로, 뇌를 0.2% Triton X-100 /PBS 후, 20% DMSO(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)/0.3M 클리신(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)/0.2% Triton X-100/PBS로 37°C에서 2 일 동안 세척하였다.

[0109] 면역표지

[0110] 샘플을 2-3 일 동안 37°C에서 10% DMSO/6% 당나귀 혈청(EMD Millipore, Temecula, CA)/0.2% Triton X-100/PBS의 차단액에서 항온처리 후, 10 $\mu\text{g/mL}$ 헤파린이 있는 PBS/0.2% Tween-20(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)(이하에서는 PTwH로서 지칭되는 용액, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)에서 2 회 1 시간/세척이 이어졌다. 뇌를 7 일 동안 37°C에서 5% DMSO/3% 당나귀 혈청/PTwH 중 일차 토끼 항-RFP 항체(1:1000; Rockland, Limerick, PA)와 항온처리하였다. 그 다음에, 뇌를 PTwH로 5 회 세척하고(세척 간격: 10 분, 15 분, 30 분, 1 시간, 2 시간) 37°C에서 7 일 동안 3% 당나귀 혈청/PTwH 중 이차 Alexa Fluor 647 당나귀 항-토끼 IgG(1:450, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)와 항온처리한 다음에 PTwH에서 5 회 세척하였다.

[0111] 조직 세척

[0112] 뇌를 각각의 단계에서 1 시간 동안 20, 40, 60, 80, 100% 메탄올/물에서 순차적으로 탈수시킨 후, 2:1 디클로로 메탄(DCM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)/메탄올, 및 100% DCM 세척이 이어졌다. 최종적으로, 샘플을 DBE(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)로 세척하고 영상화할 때까지 실온에서 암중에서 저장하였다.

[0113] 세척된 조직의 광-시트 현미경 및 분석

[0114] 면역표지 및 세척 후, 뇌 체적을 광-시트 한외현미경 II(LaVision Biotec, Bielefeld, Germany)를 사용하여 획득하였다. 뇌 반쪽들을 주문-설계된 3D-인쇄된 홀더(Renier, Wu et al. 2014; Renier, Adams et al. 2016) 상에 수평 방향으로 접착시키고 DBE에 침지시켰다. 뇌를 자가형광 채널에서 등록 목적을 위해 488-nm 레이저 다이오드 여기 및 525-nm 최대 방출 필터(FF01-525/39-25, Semrock, Rochester, NY)로, 및 AAV 감염된 세포(항-RFP)의 세포 영상화를 위해 680-nm 최대 방출 필터(FF01-680/42-25, Semrock)로 640-nm 여기에서 영상화하였다. 별도의 좌측 및 우측 조명 자가형광 이미지를 0.017 여기-시트 NA 및 1.3x 배율을 사용하여 10 마이크로초(z-단계 크기) 마다 획득하였다. 좌측 및 우측 이미지를 정중선에서 S자 형으로 혼합하였다. 자가형광 체적을 Renier 및 연구원들(Renier, Wu et al. 2014; Renier, Adams et al. 2016)에 의해 기재된 바와 같이, 아핀 및 b-스플라인 변환을 사용하여 체적 앨런(Allen) 뇌 지도(2015)에 등록하였다. 획득 동안의 이동

및 채널 사이의 상이한 영상화 파라미터를 계수하기 위해, 세포 신호 체적을 아핀 변환으로 자가형광 체적에 등록하였다. 뇌 체적을 본 발명자들의 변형된 ClearMap 소프트웨어인 고성능 컴퓨팅 클러스터와 양립가능한 "ClearMap_cluster" (github.com/PrincetonUniversity/clearmap_cluster)로 분석하였다. 모든 분석된 샘플에 대해, 뇌 가장자리 및 뇌실 상의 검출된 물체를 구조의 가장자리로부터 75 μm 침식시켜, 가양성을 최소화하였다.

[0115] RNAscope 제자리(in situ) 하이브리드화

[0116] 뇌 동결색전을 superfrost 플러스 접착 슬라이드(Thermo Fisher, Waltham, MA) 상에 정착하고 -80°C 에서 저장하였다. RNA 염색을 RNAscope 멀티플렉스 형광 시약 키트(Advanced Cell Diagnostics (ACD), Newark, CA)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다. mCherry 프로브 ACD# 431201-C2를 사용하였다. 슬라이드를 40°C 에서 30 분 동안 프로테아제 IV로 사전처리한 후, 40°C 에서 2 시간 동안의 프로브 항온처리가 이어졌다. 그 다음에, 상이한 증폭 용액을 40°C 에서 30 분, 30 분, 및 15 분 동안 수행하였다. 신호를 TSA 플러스 플루오레세인 시스템(Perkin Elmer, Waltham, MA)으로 검출하였다. 항온처리 단계를 ACD HybEZ 하이브리드화 시스템에서 수행하였다. 슬라이드를 실온에서 30 초 동안 DAPI로 대비염색한 다음에, PBS로 2 회 세척하였다. 최종적으로, 슬라이드를 VECTASHIELD Vibrance 안티페이드 장착 배지(Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 장착하였다.

[0117] 통계

[0118] 통계 데이터 분석을 GraphPad Prism 7 소프트웨어(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA)를 사용하여 수행하였다. 양방 스튜던트 검정을 사용하여, 2 개 그룹 사이를 비교하고, 비-파라미터 일원 ANOVA 시험 후 본페로니 다중 비교 사후-검정을 사용하여, 다수 그룹 사이를 비교하였다. < 0.05 의 p 값은 통계적으로 유의미하였다. 데이터는 SEM으로 평균으로서 나타낸다.

[0119] 실시예 2. 소형 PRV LAP 서열은 헤르페스바이러스 감염의 뉴런에서 독립적으로 트랜스유전자 발현을 구동할 수 있다.

[0120] PRV LAP 영역은 LAP1 및 LAP2로서 본원에 정의된 적어도 2 개의 프로모터 영역을 포함한다(도 1a). PRV 게놈에서, LAP1 및 LAP2는 PRV LAP1_2로서 탄뎀으로 존재한다. 이들 서열은 단독으로 또는 조합되어 PRV 감염 없는 AAV 벡터에서 사용될 때, 일차 교감 뉴런에서 리포터 트랜스유전자를 효율적으로 발현할 수 있다(도 1c 및 1d). LAP 서열을 Jasper(Sandelin, Alkema et al. 2004; Wasserman and Sandelin 2004), RSAT(Nguyen, Contreras-Moreira et al. 2018) 및 CTCFBSDB 2.0(Ziebarth, Bhattacharya et al. 2013) 소프트웨어를 사용하여 추정 조절 요소를 확인하기 위해 분석하였다. 3 개의 순환 AMP 반응 요소-결합 단백질(CREB) 결합 모티프를 LAP1 TATA 박스의 업스트림에서 검출하였고, 하나를 LAP2 TATA 박스의 업스트림에서 검출하였다. 또한, 2 개의 CCCTC-결합 인자(CTCF) 결합 모티프를 LAP1 TATA 박스의 업스트림에서 검출하였고 하나를 LAP2 TATA 박스의 다운스트림에서 검출하였다. 3 개의 CG 박스 및 4 개의 전사의 신호 변환인자 및 활성인자 1(STAT1) 결합 모티프를 포함한 다운스트림 프로모터 요소(DPE)를 LAP2에서 확인하였다. 또한, LAP1 TATA 박스 및 LAP2 TATA 박스의 상류에는 각각 계통-결정 TF(Wang, Pol et al. 2014), 예컨대 SRY-Box 10(SOX10) 및 희소돌기신경교 전사 인자 2(Olig2)가 있었다(도 1a).

[0121] 4 개의 AAV 재조합체를 표준 방법에 의해 혈청형 PHP.eB 캡시드 내로 패키징하였다. 3 개의 프로모터 구축물인 LAP1(498 bp, 서열번호 1에 상응함), LAP2(404 bp, 서열번호 2에 상응함) 및 LAP1_2(880 bp, 서열번호 3에 상응함)를 제조하였다. 유비쿼터스 EF-1 α 프로모터(1264 bp)를 트랜스유전자 발현에 대한 양성 대조군으로서 사용하였다. 4 개의 AAV 재조합체 전부는 형광 리포터 mCherry를 발현하였다(도 1b). 각각의 프로모터의 시험관내 성능을 확인하기 위해, 래트 일차 상부 경추 신경절(SCG) 뉴런 배양액에 각각의 AAV의 3×10^{11} 게놈을 형질도입 하였으며, 상대 mCherry 형광 강도(RFI)를 90-일 기간에 걸쳐 정량화하였다.

[0122] AAV-LAP1이 형질도입된 뉴런에 대해, mCherry 발현은 11 dpi에 갑자기 증가하였으나(64220 RFI), AAV-LAP2, AAV-LAP1_2 및 AAV-EF1 α 와 비교하였을 때, 낮은 수준이었다. AAV-EF1 α 발현은 17 dpi에 ~120-배를 초과하여 증가하였다(각각 8.70×10^6 ; 2.39×10^6 ; 8.01×10^6 RFI)(도 1c). 4 개의 재조합체 전부에 의한 발현의 최고 수준은 28 dpi에 LAP1($291,242$ RFI); LAP2(1.36×10^7 RFI); LAP1_2(4.36×10^6 RFI) 및 EF1 α (1.40×10^7 RFI)이었다(도 1c 및 1d). LAP2 및 EF1 α 는 최고 mCherry RFI를 가졌다(LAP2 = EF1 α > LAP1_2 > LAP1). 38 dpi 내지 90 dpi에서, 4 개의 AAV 재조합체 전부는 대부분 배양액에서 100 일 초과 후 일차 SCG 뉴런의 노화로 인한 것과 같이, 미묘하지만 지속되는 RFI 감소를 나타내었다(도 1c). 중요하게는, 3 개의 AAV-LAP 재조합체 전

부는 AAV 형질도입의 맥락에서 PRV 감염의 부재 하에 90 일 동안 일차 뉴런에서 mCherry 전사를 나타내었다.

[0123] 실시예 3. 전체-CNS 스크리닝은 6 개월 후 범-뉴런 AAV-LAP 트랜스유전자 발현을 드러냈다.

[0124] 전신 혈관내 전달 후 BBB를 가로지르고 C57/BL6 마우스 CNS를 형질도입하는 향상된 용량을 고려하여, AAV 혈청형 PHP.eB를 프로모터 스크리닝 분석을 위해 사용하였다(Chan, Jang et al. 2017). AAV-LAP1-mCherry, AAV-LAP2-mCherry, AAV-LAP1_2-mCherry 및 AAV-EF1 α -mCherry를 4×10^{11} 바이러스 게놈/마우스(vg/마우스)의 편측 안구 뒤 정맥동 주사에 의해 전달하였다. 도 2a에 나타낸 바와 같이, 뇌 및 척수를 AAV 형질도입 후 30 일 및 190 일에 수집하여, mCherry 전사 및 번역을 정량화하였다. 조직을 세척하고, iDISCO+로 면역염색하고(용매-세척된 기관의 면역표지-가능한 3-차원 영상화), 광-시트 현미경 및 체적 등록(Renier, Wu et al. 2014; Renier, Adams et al. 2016)에 의해 분석한 후, 전체 온전한 뇌에서 LAP-mCherry 발현을 결정하였다.

[0125] 도 2b-2p에 나타낸 바와 같이, 4 개의 프로모터 전부는 30 dpi 및 190 dpi 둘 다에서 안정적인 mCherry 발현을 나타내었다. LAP2의 밀도(뇌 조직의 mm³ 당 mCherry 양성 세포의 수)는 LAP1 및 LAP1_2의 것에 비해 높았고, 뇌의 상이한 영역인 피질: 일차 운동, 이차 운동, 일차 체성감각 및 보조 체성감각(도 2b-2e); 해마체(도 2g), 담창구(도 2i), 시상하부(도 2k) 및 후각 영역(도 2p)에서 EF1 α 의 것과 상당히 상이하지 않았다. 소뇌에서, LAP2는 LAP1, LAP1_2 및 EF1 α 에 비해 높은 mCherry 밀도를 나타내었다(도 2o). 또한, 선조체(도 2h); 시상(도 2j); 중뇌, 운동 및 감각 영역(도 2l 및 2m), 및 후뇌(도 2n)에서, LAP2 및 LAP1_2는 EF1 α 에 비해 상당히 높은 밀도를 나타내었다($p < 0.05$). LAP2 뉴클레오타이드 서열은 EF1 α 의 것에 비해 68% 짧지만, 몇몇 뇌 영역에서 EF1 α 를 능가한다는 것을 주의한다.

[0126] CNS에서 LAP 트랜스유전자 발현을 추가로 입증하기 위해, mCherry 단백질 발현을 30 dpi 및 190 dpi에 시상 뇌 섹션에서 면역조직화학(IHC)에 의해 평가하였다(도 3a-3h). 공초점 현미경 분석은 30 dpi에 피질 체성감각 영역(도 3e), 해마체 내의 치상회(도 3f), 선조체 내의 기저핵(도 3g), 및 소뇌 피질(도 3h)에 걸쳐 풍부한 mCherry 염색을 나타내었다. 중요하게는, mCherry 발현은 190 dpi에 3 개의 LAP 서열 전부에 대해 안정적이었고 더 큰 AAV-EF1 α -mCherry 프로모터의 것과 유사하였다(도 3e-3h, 패널 5-8). 그 다음에, mCherry 발현을 30 dpi 및 190 dpi에 정량화하였다. mCherry RFI는 상당한 차이 없이 모든 AAV 프로모터에 대해 유사하였다(도 3ia-3id). 그 후에, 190 일 후 픽셀² 당 mCherry 양성 세포의 수를 정량화하였다. 피질에서, LAP2 mCherry 발현 세포의 수는 LAP1-mCherry 및 LAP1_2-mCherry에 대해 관찰된 것에 비해 높았다[LAP2: 297 ± 19.82 대 LAP1: 149 ± 5.61 대 LAP1_2: 168 ± 9.22 ($n = 6$, $p < 0.001$)(도 3ja). 치상회, 선조체 및 소뇌에서, mCherry 양성 세포의 수는 모든 LAP 변이체 및 EF1 α 에 대해 유사하였다(도 3jb-3jd). 따라서, 모든 AAV-LAP 변이체는 뇌에서 mCherry 발현을 촉진하며, 이는 AAV-LAP 재조합체의 단일 투여가 마우스 CNS에서 장기 범-뉴런 트랜스유전자 발현을 구동하기에 충분할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0127] 실시예 4. 소형 LAP2 프로모터 변이체는 전신 AAV 투여 후 강하고 안정적인 범-뉴런 트랜스유전자 발현을 구동한다.

[0128] 상이한 PRV LAP 서열의 제어 하의 mCherry 발현의 효율성을 비교하였다. 30 dpi 및 190 dpi에 피질(도 4a 및 4ea), 치상회(도 4b 및 4eb), 선조체(도 4c 및 4ec) 및 소뇌(도 4d 및 4ed)에서 풍부한 신호가 관찰되었다. 또한, AAV-LAP2 RFI는 30 dpi 및 190 dpi 둘 다에서 안정적이고 AAV-EF1 α 와 유사하였다($p < 0.05$)(도 4ea-4ed; 표 2). AAV-LAP1 및 AAV-LAP1_2 mCherry RFI 수준은 피질, 치상회, 선조체 및 소뇌에서 30 dpi 및 190 dpi에 안정적이고 이들 사이에서 상당히 상이하지 않았으나(도 4ea-4ed; 표 2), 양측 프로모터는 LAP2 및 EF1 α 와 비교하여 상당히 적은 트랜스유전자 발현을 나타내었다.

표 2. 상이한 AAV-PHP.eB-프로모터를 이용한 마우스 뇌에서의 mCherry 발현

프로모터	뇌 영역	직접 mCherry 발현		간접 IHC mCherry 발현	
		30 dpi ^a	190 dpi	30 dpi	190 dpi
		평균 (RFI) ^b ± SEM	평균 (RFI) ± SEM	평균 (RFI) ± SEM	평균 (RFI) ± SEM
LAP1	피질	1.05 ± 0.12	1.35 ± 0.14	8.51 ± 0.47	8.46 ± 0.49
	치상회	1.36 ± 0.11	0.99 ± 0.04	9.87 ± 0.72	9.00 ± 0.44
	선조체	1.18 ± 0.13	1.41 ± 0.18	9.14 ± 0.97	9.17 ± 1.41
	소뇌	1.31 ± 0.17	1.48 ± 0.15	9.38 ± 0.92	9.75 ± 1.16
LAP2	피질	9.66 ± 0.41	9.39 ± 0.69	9.30 ± 0.70	10.18 ± 0.51
	치상회	8.61 ± 0.63	9.32 ± 0.63	10.26 ± 0.52	10.01 ± 0.59
	선조체	9.91 ± 0.51	10.61 ± 0.65	9.92 ± 0.57	11.06 ± 0.66
	소뇌	10.66 ± 0.67	10.34 ± 0.84	9.59 ± 0.50	10.26 ± 0.65
LAP1_2	피질	5.18 ± 0.43	5.36 ± 0.39	8.01 ± 0.61	8.70 ± 0.36
	치상회	3.92 ± 0.70	4.17 ± 0.62	9.20 ± 0.64	10.02 ± 0.72
	선조체	4.36 ± 0.84	4.67 ± 0.75	10.45 ± 0.48	10.17 ± 0.75
	소뇌	4.76 ± 0.54	5.42 ± 0.27	9.48 ± 0.56	9.86 ± 0.54
EF1α	피질	8.99 ± 0.62	9.05 ± 0.73	9.87 ± 0.77	10.16 ± 0.62
	치상회	9.16 ± 0.57	9.16 ± 0.81	9.40 ± 0.72	9.45 ± 0.64
	선조체	9.96 ± 0.59	10.93 ± 0.67	11.26 ± 0.61	10.29 ± 0.85
	소뇌	10.72 ± 0.49	11.06 ± 0.84	10.92 ± 0.66	10.65 ± 0.89

^adpi: AAV 주사 후 일

^bRFI: 상대 형광 강도

[0129]

[0130]

mRNA 반감기는 통상적으로 번역된 단백질의 것에 비해 짧기 때문에(Chan, Mugler et al. 2018), AAV-LAP 형질 도입된 뇌우스 뇌 슬라이스에서의 mCherry 전사물을 측정하였다. 30 dpi(데이터를 나타내지 않음) 및 190 dpi에 AAV-LAP2-mCherry mRNA를 mCherry-특이적 리보탐침을 사용하여 측정하였다. 형광 제자리 하이브리드화(FISH)는 피질, 치상회, 선조체, 소뇌 및 후구에서 풍부한 AAV-LAP2 mCherry RNA를 나타내었고(도 5a-5e), 추가로 PRV LAP2는 CNS에서 만성적이고 강한 트랜스유전자 전사를 구동할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0131]

실시예 5. 뇌에서 AAV-LAP 트랜스유전자 발현은 뉴런에서 우세하지만, 교세포에서는 그렇지 않다.

[0132]

AAV 형질도입 및 후속 트랜스유전자 발현의 향성 및 특이성은 AAV 혈청형(Aschauer, Kreuz et al. 2013, Bedbrook; Deverman et al. 2018) 및 프로모터(von Jonquieres, Frohlich et al. 2016; Hammond, Leek et al. 2017; Dayton, Grames et al. 2018)에 의존한다. 전신 AAV-PHP.eB 전달 후 AAV-LAP-mCherry 발현을 나타낸 세포-유형을 특징짓기 위해, 뉴런(NeuN), 희소돌기아교세포(Olig2), 미세아교세포(Iba1) 및 별아교세포(S100)에 대한 마커를 이용한 mCherry 단백질의 공동-면역염색을 피질 및 치상회에서 수행하였다. NeuN 및 mCherry를 이용한 공동-염색은 영상화된 90% 초과 뉴런이 피질 및 치상회 둘 다에서 상이한 AAV-LAP 변이체에 의해 구동되는 mCherry를 발현하였다는 것을 드러냈다(도 6a, 6b, 및 6e). 반대로, 4% 미만의 mCherry-양성 희소돌기신경교가 모든 LAP 변이체에 대해 검출되었다(도 6c, 6d 및 6f). 또한, 임의의 LAP 조합체에 대한 미세아교세포 및 별아교세포 마커를 이용한 mCherry의 공동-표지는 관찰되지 않았다(도 7a-7d). 종합적으로, 이들 결과는 AAV-PHP.eB를 이용한 전신 뇌 형질도입의 맥락에서, LAP-mCherry 발현은 뉴런에서 풍부하지만, 교세포에서는 그렇지 않다는 것을 나타낸다.

[0133]

실시예 6. AAV-LAP 구축물은 척수에 걸쳐 광범위하고, 안정적인 장기 트랜스유전자 발현을 나타낸다.

[0134]

뇌와 함께, 혈청형 PHP.eB가 회백질의 광범위한 형질도입을 나타낸 척수에서의 AAV-LAP 성능(Chan, Jang et al. 2017; Dayton, Grames et al. 2018)을 평가하였다.

[0135]

190 dpi에 경부, 흉부(데이터를 나타내지 않음) 및 요추 수준에서 척수의 후각 및 전각 둘 다에서 풍부한 천연 mCherry 발현이 관찰되었다(도 8a-8d). 모든 프로모터에 대한 천연 mCherry 형광(RFI)의 정량화는 유사하고, 통

계학적으로 유의미한 차이가 없었다(도 8e). 그러나, LAP2 및 LAP1_2 재조합체는 픽셀² 당 mCherry-양성 세포의 최고 밀도를 나타내었고, EF1 α 및 LAP1이 이어졌다; LAP2 = LAP1_2 > EF1 α > LAP1(도 8f). 따라서, 3 개의 PRV LAP 서열 전부는 척수에서 범-뉴런, 장기 트랜스유전자 발현을 효과적으로 매개한다.

[0136] 유전자 요법을 사용하여 신경학적 및 신경퇴행성 장애에서 특정 표적 세포에서 유전자 기능을 회복시켰다(Deverman, Ravina et al. 2018). 말초 혈관 형질도입을 통한 전신 벡터 전달에 의한 유전자 전달은 CNS에서 뉴런-특이적 또는 범-뉴런 방식으로 효율적인 발현이 어려울 수 있다(Ingusci, Verlengia et al. 2019). 재조합체 AAV 벡터는 CNS에서 유전자 발현을 달성하기 위한 가장 효율적인 비히클 중 하나이다(Hudry and Vandenbergh 2019, Wang, Tai et al. 2019). 또한, 조작된 AAV 캡시드는 천연-발생 혈청형에 비해 개선된 CNS 형질도입 및 높은 효율성으로 BBB를 가로지르는 향상된 용량을 나타내었다(Chan, Jang et al. 2017; Bedbrook, Deverman et al. 2018; Hordeaux, Yuan et al. 2019; Qin Huang and Alejandro B. Balazs 2019). 이들 진전에도 불구하고, AAV 유전자 요법은 AAV 캡시드에 대해 4.9 Kb의 작은 페이로드 크기 제한에 의해 저해된다(Chamberlain, Riyad et al. 2016). 예를 들어, 폼페병(Pompe disease)(Colella, Sellier et al. 2019) 및 파킨슨병(Parkinson's disease)(Wang, Muramatsu et al. 2002)에 대한 CNS 요법은 GAA(2.9 Kb) 및 GDNF(2.5 Kb)와 같은 비교적 큰 유전자의 전달을 기초로 한다. 이들 및 다른 유사한 경우에 대해, 큰 프로모터 또는 더 작은 CMV 및 hSyn 프로모터의 사용은 전달 후 신속히 억제된다는 것을 나타내었다(Gray, Foti et al. 2011, Jackson, Dayton et al. 2016).

[0137] 본원에 기재된 바와 같이, 알파헤르페스바이러스 PRV의 계놈으로부터 단리된 3 개의 소형 범-뉴런 프로모터를 확인하였으며, 이는 전신 AAV PHP.eB 전달 후 마우스 CNS에서 효율적인 장기 트랜스유전자 발현을 나타내었다. 본원에 제시된 결과는 이들 소형 PRV LAP 서열이 뇌 및 척수에서 리포트 트랜스유전자의 장기 발현(> 6 개월)을 구동할 수 있다는 것을 나타낸다. PRV LAP는 피질, 선조체, 치상회 및 소뇌에서 뉴런을 균일하게 형질도입하였다. mCherry-양성 세포의 분포는 치상회, 선조체 및 소뇌에서 LAP 서열 사이에 상당히 상이하지 않았다. 그러나, LAP2 트랜스유전자 발현은 LAP1 및 LAP1_2와 비교하여 피질에서 상당히 높았다. 전체-뇌 스크리닝 분석은 단지 402 bp의 LAP2 변이체가 큰 LAP1 및 LAP1_2 서열에 비해 강한 mCherry 발현을 구동할 수 있다는 것을 나타내었다. 또한, LAP2로부터 전사된 풍부한 mCherry mRNA는 190 dpi에 모든 스크리닝된 뇌 영역에서 검출되었다. 이들 결과는 PRV 감염의 부재 하에 전신 AAV-LAP2 전달 후 CNS에서 소형 PRV LAP2로부터 구동되는 효율적인 전사 및 번역 둘 다를 나타낸다.

[0138] LAP1-mCherry 세포 밀도는 LAP2에 대한 것에 비해 상당히 낮았으나, mCherry 발현은 안정적인 장기-지속을 유지하였다. 따라서, LAP1은 적은 양의 치료 단백질이 필요한 경우에(예를 들어, 효소 결핍) 또는 비-형질도입된 세포에 대한 교차-교정을 위해 유용할 수 있다. 예를 들어, 리소좀 효소 결핍(Husain, Passini et al. 2009) 및 뮤코다당증 VII 질환(Cearley and Wolfe 2007)에 대해, AAV 요법에 의해 회복된 효소가 형질도입된 세포로부터 분비될 수 있고 인접한 질환에 걸린 세포를 개선할 수 있다.

[0139] AAV 형성은 우선적으로 민감하고 허용성인 세포에서 캡시드와 특정 수용체 사이의 상호작용에 의해 결정된다(Aschauer, Kreuz et al. 2013; Bedbrook, Deverman et al. 2018). 상이한 AAV 혈청형은 상이한 조직 향성을 갖는다. 그러나, 벡터에 포함된 프로모터 서열 및 다른 서열, 예컨대 역위 말단 반복부 서열(ITR)은 향성에 대해 상당한 영향을 가질 수 있다(Haberman and McCown 2002). 또한, 트랜스유전자를 전사하는 프로모터 영역은 AAV 벡터 성능을 최적화하기 위해 매우 중요하다. 광범위하거나 세포-유형 특이적 방식의 효율적인 트랜스유전자 발현은 프로모터 영역에 대한 세포-유래된 TF의 결합 및 활동을 요구한다(Dayton, Grames et al. 2018; Andersson and Sandelin 2019). 노화 또는 분화와 같은 뉴런 환경에서의 변화는 또한 세포-특이적 조절 단백질의 모집 및 이에 따라 CNS에서의 유전자 발현을 변경할 수 있다(Herdegen and Leah 1998). 본원에 제시된 PRV LAP 서열의 분석은 LAP2에서 DPE를 확인하였으며, 이는 트랜스유전자 발현 개시, 기간 및 세포-유형 특이성을 조절할 수 있다. 또한, HSV-1 LAP에서 잠복으로부터 바이러스 재활성화를 조절하는 것으로 보이는 4 개의 STAT1 모티프(Kriesel, Jones et al. 2004)를 확인하였다. 두드러지게는, PRV LAP2에서 이들 STAT1 모티프 중 하나는 TATA 박스 및 Olig2 모티프, 뉴런 및 회소돌기신경교 운명을 촉진하는 알려진 다중감염된 TF로 공동-국소화되는 것으로 밝혀졌다(Emery and Lu 2015). 이들 모티프 및 전사 개시 부위와 연관된 근접 효과는 LAP2, LAP1 및 LAP1_2 사이의 상이한 수준의 CNS 트랜스유전자 발현을 설명할 수 있다. 또한, HSV-1에 대해 나타난 것과 같이(Lang, Li et al. 2017; Lee, Raja et al. 2018), 잠복 동안 후성적 침묵에 대한 저항성에서의 역할을 가질 수 있는 하나의 CTCF 모티프를 LAP2 TATA 박스의 다운스트림에서 발견하였다. 정말로, Zimmerman 및 연구원들(Zimmerman, Patel et al. 2018)은 EF1 α 프로모터의 다운스트림의 CTCF 모티프의 삽입이 천연 EF1 α 및 CMV 프로모터와 비교하여 트랜스유전자 발현을 상당히 증가시켰다는 것을 발견하였다. 흥미롭게도, CMV TATA 박스의

다운스트림의 이차 CTCF 모티프의 삽입은 아마도 천연 CTCF 모티프의 불필요한 존재로 인해, 루시페라아제 리포터 발현에 영향을 갖지 않았다(Zimmerman, Patel et al. 2018). 따라서, 유전자 발현은 유전자 맥락 및 서열-특이적 DNA 결합 단백질에 따른 변화에 민감하다. 상이한 숙주 세포로부터 특정 TF의 모집은 잠복 동안 비활성화에 대한 저항성을 조절하는 동일한 메커니즘에 의해 트랜스유전자 전사를 조절할 수 있다. CTCF-결합 인자와 같은 절연체 요소는 독립적으로 조절되고(Washington, Musarrat et al. 2018) 이질염색질에 의한 억제로부터 프로모터 영역을 보호하여, 장기-지속 전사를 유지할 수 있다(Lang, Li et al. 2017).

[0140] LAP-mCherry, 교세포 및 뉴런 마커의 공동국소화(colocalization)에 의한 세포-특이적 형질도입의 조직학적 평가는 LAP 서열이 피질 및 치상회에서 교세포에 비해 뉴런에서 더욱 효율적으로 발현한다는 것을 드러냈다. LAP-mCherry 양성 세포는 뉴런-특이적 마커로 주로 공동국소화되었고, 회소돌기신경교로는 덜 한 정도이지만, 미세아교세포 또는 별아교세포는 그렇지 않다. 이들 발견은 PRV LAP 서열이 PHP.eB 전신 전달 후 CNS에서 범-뉴런 프로모터 프로파일을 갖는다는 것을 제시한다. 이 활성은 또한 TATA 박스의 업스트림에서 CRE 모티프의 존재로 인해 HSV LAP 서열에 대해 발견되었다(Leib, Nadeau et al. 1991; Kenny, Krebs et al. 1994; Bloom, Stevens et al. 1997). PRV LAP1 및 LAP2는 다른 바이러스 단백질의 부재 하의 뉴런-특이적 프로모터이고 트랜스유전자 발현 수준은 상이한 뉴런 유형에 걸쳐 달라진다(Taharaguchi, Yoshino et al. 2003). 중요하게는, AAV-PHP.eB는 뉴런을 주로 형질도입하고(Chan, Jang et al. 2017), 이 캡시드 변이체와 PRV LAP 서열의 조합은 CNS에서 강하고, 장기-지속되는, 범-뉴런 발현 프로파일을 나타낸다. 따라서, PRV LAP 서열은 재조합체 바이러스 벡터(AAV, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스바이러스)의 맥락에서뿐 아니라, 비-바이러스 유전자 전달 플랫폼과 함께 사용될 수 있다. PRV의 천연 숙주는 성체 돼지이지만, 바이러스는 극도로 광범위한 항성을 갖고 일부 조류, 어류 및 일부 영장류를 포함한 많은 유형의 포유동물을 감염시킬 수 있다(Baskerville and Lloyd 1977). 또한, 배양액에서 인간 세포는 PRV 감염에 대해 민감하며 인수공통 감염의 일부 보고가 있었다(Wong, Lu et al. 2019). 따라서, PRV LAP 서열은 인간을 포함한 몇몇 상이한 포유동물에서 효율적인 장기 트랜스유전자 발현을 요구하는 유전자-요법 적용을 위해 최적화될 수 있다.

[0141] 요약하면, 본원에 제시된 데이터는 PRV LAP 프로모터 활성이 PRV 감염과 독립적이고 소형 AAV-PHP.eB-LAP 서열이 뇌 및 척수(CNS)에서 안정적인 범-뉴런 방식으로 트랜스유전자를 발현한다는 것을 나타내었다. 장기 트랜스유전자 전사 및 번역은 효과적인 장기-지속 단일-용량 유전자 요법 적용을 위해 중요하다. 따라서, PRV LAP 서열은 유전적 CNS 질환의 치료를 위해 유용할 수 있다.

[0142] 실시예 7. LAP 서열은 비-뉴런 세포 및 조직에서 트랜스유전자 발현을 효율적으로 구동한다.

[0143] 다음 실시예에서, LAP 서열은 신장, 간 및 망막을 포함한 몇몇 세포 및 조직 유형에서 형광 리포터 단백질(mCherry)의 트랜스유전자 발현을 효율적으로 구동하는 것으로 나타났다. 또한, LAP는 바이러스 벡터(예컨대, AAV)뿐 아니라, 비-바이러스 벡터(예컨대, 플라스미드 DNA의 직접 형질주입)와 양립가능하다는 것이 밝혀졌다.

[0144] 도 9a-9c에 나타난 바와 같이, LAP 서열은 돼지 신장 세포에서 효율적인 트랜스유전자 발현을 구동한다. PK15 세포(돼지 신장 상피 세포, ATCC CCL-33)의 대표적인 이미지를 LAP1(도 9a), LAP2(도 9b), 또는 LAP1_2(도 9c)에 의해 구동되는 mCherry를 포함하는 리포터 플라스미드의 형질주입 후 48 시간에 얻었다.

[0145] 도 10a 및 10b에 나타난 바와 같이, LAP2는 인간 신장 세포에서 효율적인 트랜스유전자 발현을 구동한다. HEK-293 세포(인간 배아 신장 상피 세포, ATCC CRL-1573)의 대표적인 이미지를 LAP2(도 10a) 또는 EF1 α 프로모터(도 10b)에 의해 구동되는 mCherry를 포함하는 리포터 플라스미드의 형질주입 후 48 시간에 얻었다.

[0146] 도 11a 및 11b에 나타난 바와 같이, LAP2는 인간 간 세포에서 효율적인 트랜스유전자 발현을 구동한다. HepG2 세포(인간 간 상피 세포, ATCC HB-8065)의 대표적인 이미지를 LAP2(도 11a) 또는 EF1 α 프로모터(도 11b)에 의해 구동되는 mCherry를 포함하는 리포터 플라스미드의 형질주입 후 48 시간에 얻었다.

[0147] 도 12aa-12bd에 나타난 바와 같이, LAP2는 간에 걸쳐 장기 트랜스유전자 발현을 구동한다. AAV-LAP2(도 12aa-12ad) 또는 AAV-EF1 α -벡터(도 12ba-12bd)의 정맥내 투여를 마우스 안구 뒤 부비강 내로의 편측 주사(4×10^{11} vg/마우스)에 의해 수행하였다. 간을 190 dpi에 수집하고 후속 IHC 및 공초점 현미경 분석을 위해 20 μ m로 종단면으로 절단하였다. 대표적인 공초점 이미지는 천연 mCherry 형광(도 12aa 및 12ba: 적색), 항-mCherry 면역염색(도 12ab 및 12bb: 녹색), DAPI 핵 대비염색(도 12ac 및 12bc: blue) 및 병합된 면역형광 및 DAPI 이미지(도 12ad 및 12bd)를 나타낸다.

[0148] 도 13aa-13bd에 나타난 바와 같이, LAP2는 마우스 신장에서 장기 트랜스유전자 발현을 구동한다. AAV-LAP2(도 13aa-13ad) 또는 AAV-EF1 α -벡터(도 13ba-13bd)의 정맥내 투여를 마우스 안구 뒤 부비강 내로의 편측 주사($4 \times$

10^{11} vg/마우스)에 의해 수행하였다. 신장을 190 dpi에 수집하고 후속 IHC 및 공초점-현미경 분석을 위해 20 μ m로 종단면으로 절단하였다. 대표적인 공초점 이미지는 천연 mCherry 형광(도 13aa 및 13ba: 적색), 항-mCherry 면역염색(도 13ab 및 13bb: 녹색), DAPI 핵 대비염색(도 13ac 및 13bc: 청색) 및 병합된 면역형광 및 DAPI 이미지(도 13ad 및 13bd)를 나타낸다.

[0149]

도 14aa-14bd에 나타난 바와 같이, LAP2는 마우스 망막에서 장기 트랜스유전자 발현을 구동한다. AAV-LAP2(도 14aa-14ad) 또는 AAV-EF1 α -벡터(도 14ba-14bd)의 정맥내 투여를 마우스 안구 뒤 부비강 내로의 편측 주사(4×10^{11} vg/마우스)에 의해 수행하였다. 망막을 190 dpi에 수집하고 후속 IHC 및 공초점-현미경 분석을 위해 20 μ m로 횡단면으로 동결절단하였다. 대표적인 공초점 이미지는 천연 mCherry 형광(도 14aa 및 14ba: 적색), 항-mCherry 면역염색(도 14ab 및 14bb: 녹색), DAPI 핵 대비염색(도 14ac 및 14bc: 청색) 및 병합된 면역형광 및 DAPI 이미지(도 14ad 및 14bd)를 나타낸다.

참고문헌

- Andersson, R. and A. Sandelin (2019). Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements. Nat Rev Genet.
- Aschauer, D. F., S. Kreuz and S. Rumpel (2013). Analysis of transduction efficiency, tropism and axonal transport of AAV serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the mouse brain. PLoS One 8(9): e76310.
- Back, S., A. Dossat, I. Parkkinen, P. Koivula, M. Airavaara, C. T. Richie, Y. H. Chen, Y. Wang and B. K. Harvey (2019). Neuronal Activation Stimulates Cytomegalovirus Promoter-Driven Transgene Expression. Mol Ther Methods Clin Dev 14: 180-188.
- Baskerville, A. and G. Lloyd (1977). Experimental infection of monkeys with Herpesvirus suis (Aujeszky's-disease virus). J Med Microbiol 10(1): 139-144.
- Bedbrook, C. N., B. E. Deverman and V. Gradinaru (2018). Viral Strategies for Targeting the Central and Peripheral Nervous Systems. Annu Rev Neurosci 41: 323-348.
- Berges, B. K., J. H. Wolfe and N. W. Fraser (2007). Transduction of brain by herpes simplex virus vectors. Mol Ther 15(1): 20-29.

[0150]

- Berthomme, H., J. Lokensgard, L. Yang, T. Margolis and L. T. Feldman (2000). Evidence for a bidirectional element located downstream from the herpes simplex virus type 1 latency-associated promoter that increases its activity during latency. *J Virol* 74(8): 3613-3622.
- Blanchard, Le Meur, Le Cunff, Blanchard, Leger, and Jestin (2006). Cellular gene expression survey of PseudoRabies Virus (PRV) infected Human Embryonic Kidney cells (HEK-293). *Vet Res*, 705-723.
- Bloom, D. C., J. G. Stevens, J. M. Hill and R. K. Tran (1997). Mutagenesis of a cAMP response element within the latency-associated transcript promoter of HSV-1 reduces adrenergic reactivation. *Virology* 236(1): 202-207.
- Boldogkoi, Erdelyi, and Fodor (2000). A putative latency promoter/enhancer (P(LAT2)) region of pseudorabies virus contains a virulence determinant. *J Gen Virol*, 415-420.
- Brooks, A. R., R. N. Harkins, P. Wang, H. S. Qian, P. Liu and G. M. Rubanyi (2004). Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* 6(4): 395-404.
- Cearley, C. N. and J. H. Wolfe (2007). A single injection of an adeno-associated virus vector into nuclei with divergent connections results in widespread vector distribution in the brain and global correction of a neurogenetic disease. *J Neurosci* 27(37): 9928-9940.
- Chamberlain, K., J. M. Riyad and T. Weber (2016). Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids. *Hum Gene Ther Methods* 27(1): 1-12.
- Chan, K. Y., M. J. Jang, B. B. Yoo, A. Greenbaum, N. Ravi, W. L. Wu, L. Sanchez-Guardado, C. Lois, S. K. Mazmanian, B. E. Deverman and V. Gradinaru (2017). Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat Neurosci* 20(8): 1172-1179.
- Chan, L. Y., C. F. Mugler, S. Heinrich, P. Vallotton and K. Weis (2018). Non-invasive measurement of mRNA decay reveals translation initiation as the major determinant of mRNA stability. *Elife* 7.
- Cheung, A. K. (1989). Detection of pseudorabies virus transcripts in trigeminal ganglia of latently infected swine. *J Virol* 63(7): 2908-2913.

[0151]

Cheung, A. K. (1991). Cloning of the latency gene and the early protein 0 gene of pseudorabies virus. J Virol 65(10): 5260-5271.

Cheung, A. K. and T. A. Smith (1999). Analysis of the latency-associated transcript/UL1-3.5 gene cluster promoter complex of pseudorabies virus. Arch Virol 144(2): 381-391.

Chikhirzhina, Al'-Shekhatat, and Chikhirzhina (2008). Transcription factors of the nuclear factor 1 (NF1) family. Role in chromatin remodeling. Mol Biol (Mosk), 388-404.

Colella, P., P. Sellier, H. Costa Verdera, F. Puzzo, L. van Wittenberghe, N. Guerchet, N. Daniele, B. Gjata, S. Marmier, S. Charles, M. Simon Sola, I. Ragone, C. Leborgne, F. Collaud and F. Mingozzi (2019). AAV Gene Transfer with Tandem Promoter Design Prevents Anti-transgene Immunity and Provides Persistent Efficacy in Neonate Pompe Mice. Mol Ther Methods Clin Dev 12: 85-101.

Curanovic, D., T. H. Ch'ng, M. Szpara and L. Enquist (2009). Compartmented neuron cultures for directional infection by alpha herpesviruses. Curr Protoc Cell Biol Chapter 26: Unit 26 24.

Dayton, R. D., M. S. Grames and R. L. Klein (2018). More expansive gene transfer to the rat CNS: AAV PHP.EB vector dose-response and comparison to AAV PHP.B. Gene Ther 25(5): 392-400.

Delzor, A., N. Dufour, F. Petit, M. Guillermier, D. Houitte, G. Auregan, E. Brouillet, P. Hantraye and N. Deglon (2012). Restricted transgene expression in the brain with cell-type specific neuronal promoters. Hum Gene Ther Methods 23(4): 242-254.

Deshmane, S. L. and N. W. Fraser (1989). During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. J Virol 63(2): 943-947.

Deverman, B. E., B. M. Ravina, K. S. Bankiewicz, S. M. Paul and D. W. Y. Sah (2018). Gene therapy for neurological disorders: progress and prospects. Nat Rev Drug Discov 17(10): 767.

Devi-Rao, G. B., S. A. Goodart, L. M. Hecht, R. Rochford, M. K. Rice and E. K. Wagner (1991). Relationship between polyadenylated and nonpolyadenylated herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts. J Virol 65(5): 2179-2190.

[0152]

- Emery, B. and Q. R. Lu (2015). Transcriptional and Epigenetic Regulation of Oligodendrocyte Development and Myelination in the Central Nervous System. Cold Spring Harb Perspect Biol 7(9): a020461.
- Fan, Zhu, Sun, et al. (2019). Exploring the tissue tropism of pseudorabies virus based on miRNA level analysis. BMC Microbiol, 125.
- Fleming, Pavesi, Benatti, Imbriano, Mantovani, and Struhl (2013). NF-Y coassociates with FOS at promoters, enhancers, repetitive elements, and inactive chromatin regions, and is stereo-positioned with growth-controlling transcription factors. Genome Res, 1195-1209.
- Gasparini, Llonch, Borsch, and Ader (2019). Transplantation of photoreceptors into the degenerative retina: Current state and future perspectives. Prog Retin Eye Res, 1-37.
- Gray, S. J., S. B. Foti, J. W. Schwartz, L. Bachaboina, B. Taylor-Blake, J. Coleman, M. D. Ehlers, M. J. Zylka, T. J. McCown and R. J. Samulski (2011). Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. Hum Gene Ther 22(9): 1143-1153.
- Haberman, R. P. and T. J. McCown (2002). Regulation of gene expression in adeno-associated virus vectors in the brain. Methods 28(2): 219-226.
- Hammond, S. L., A. N. Leek, E. H. Richman and R. B. Tjalkens (2017). Cellular selectivity of AAV serotypes for gene delivery in neurons and astrocytes by neonatal intracerebroventricular injection. PLoS One 12(12): e0188830.
- Herdegen, T. and J. D. Leah (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. Brain Res Brain Res Rev 28(3): 370-490.
- Hordeaux, J., Y. Yuan, P. M. Clark, Q. Wang, R. A. Martino, J. J. Sims, P. Bell, A. Raymond, W. L. Stanford and J. M. Wilson (2019). The GPI-Linked Protein LY6A Drives AAV-PHP.B Transport across the Blood-Brain Barrier. Mol Ther 27(5): 912-921.
- Hudry, E. and L. H. Vandenberghe (2019). Therapeutic AAV Gene Transfer to the Nervous System: A Clinical Reality. Neuron 102(1): 263.
- Husain, T., M. A. Passini, M. K. Parente, N. W. Fraser and J. H. Wolfe (2009). Long-term AAV vector gene and protein expression in mouse brain from a small pan-cellular promoter is similar to neural cell promoters. Gene Ther 16(7): 927-932.

[0153]

Ingusci, S., G. Verlengia, M. Soukupova, S. Zucchini and M. Simonato (2019). Gene Therapy Tools for Brain Diseases. Front Pharmacol 10: 724.

Jackson, K. L., R. D. Dayton, B. E. Deverman and R. L. Klein (2016). Better Targeting, Better Efficiency for Wide-Scale Neuronal Transduction with the Synapsin Promoter and AAV-PHP.B. Front Mol Neurosci 9: 116.

Jin, L. and G. Scherba (1999). Expression of the pseudorabies virus latency-associated transcript gene during productive infection of cultured cells. J Virol 73(12): 9781-9788.

Jin, L., W. M. Schnitzlein and G. Scherba (2000). Identification of the pseudorabies virus promoter required for latency-associated transcript gene expression in the natural host. J Virol 74(14): 6333-6338.

Kenny, J. J., F. C. Krebs, H. T. Hartle, A. E. Gartner, B. Chatton, J. M. Leiden, J. P. Hoeffler, P. C. Weber and B. Wigdahl (1994). Identification of a second ATF/CREB-like element in the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) latency-associated transcript (LAT) promoter. Virology 200(1): 220-235.

Koyuncu, O. O., I. B. Hogue and L. W. Enquist (2013). Virus infections in the nervous system. Cell Host Microbe 13(4): 379-393.

Kriesel, J. D., B. B. Jones, K. M. Dahms and S. L. Spruance (2004). STAT1 binds to the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript promoter. J Neurovirol 10(1): 12-20.

Lang, F., X. Li, O. Vladimirova, B. Hu, G. Chen, Y. Xiao, V. Singh, D. Lu, L. Li, H. Han, J. M. Wickramasinghe, S. T. Smith, C. Zheng, Q. Li, P. M. Lieberman, N. W. Fraser and J. Zhou (2017). CTCF interacts with the lytic HSV-1 genome to promote viral transcription. Sci Rep 7: 39861.

Lee, J. S., P. Raja, D. Pan, J. M. Pesola, D. M. Coen and D. M. Knipe (2018). CCCTC-Binding Factor Acts as a Heterochromatin Barrier on Herpes Simplex Viral Latent Chromatin and Contributes to Poised Latent Infection. MBio 9(1).

Leib, D. A., C. L. Bogard, M. Kosz-Vnenchak, K. A. Hicks, D. M. Coen, D. M. Knipe and P. A. Schaffer (1989). A deletion mutant of the latency-associated transcript of herpes simplex virus type 1 reactivates from the latent state with reduced frequency. J Virol 63(7): 2893-2900.

[0154]

Leib, D. A., K. C. Nadeau, S. A. Rundle and P. A. Schaffer (1991). The promoter of the latency-associated transcripts of herpes simplex virus type 1 contains a functional cAMP-response element: role of the latency-associated transcripts and cAMP in reactivation of viral latency. Proc Natl Acad Sci U S A 88(1): 48-52.

Lokensgard, J. R., H. Berthomme and L. T. Feldman (1997). The latency-associated promoter of herpes simplex virus type 1 requires a region downstream of the transcription start site for long-term expression during latency. J Virol 71(9): 6714-6719.

Mahjoub, N., S. Dhorne-Pollet, W. Fuchs, M. L. Endale Ahanda, E. Lange, B. Klupp, A. Arya, J. E. Loveland, F. Lefevre, T. C. Mettenleiter and E. Giuffra (2015). A 2.5-kilobase deletion containing a cluster of nine microRNAs in the latency-associated-transcript locus of the pseudorabies virus affects the host response of porcine trigeminal ganglia during established latency. J Virol 89(1): 428-442.

Mak, K. Y., I. G. Rajapaksha, P. W. Angus and C. B. Herath (2017). The Adeno-associated Virus - A Safe and Promising Vehicle for Liverspecific Gene Therapy of Inherited and Non-inherited Disorders. Curr Gene Ther 17(1): 4-16.

Maturana, C. J., A. Aguirre and J. C. Saez (2017). High glucocorticoid levels during gestation activate the inflammasome in hippocampal oligodendrocytes of the offspring. Dev Neurobiol 77(5): 625-642.

Nathanson, J. L., R. Jappelli, E. D. Scheeff, G. Manning, K. Obata, S. Brenner and E. M. Callaway (2009). Short Promoters in Viral Vectors Drive Selective Expression in Mammalian Inhibitory Neurons, but do not Restrict Activity to Specific Inhibitory Cell-Types. Front Neural Circuits 3: 19.

Nguyen, N. T. T., B. Contreras-Moreira, J. A. Castro-Mondragon, W. Santana-Garcia, R. Ossio, C. D. Robles-Espinoza, M. Bahin, S. Collombet, P. Vincens, D. Thieffry, J. van Helden, A. Medina-Rivera and M. Thomas-Chollier (2018). RSAT 2018: regulatory sequence analysis tools 20th anniversary. Nucleic Acids Res 46(W1): W209-W214.

[0155]

Ogden, P. J., E. D. Kelsic, S. Sinai and G. M. Church (2019). Comprehensive AAV capsid fitness landscape reveals a viral gene and enables machine-guided design. Science 366(6469): 1139-1143.

Ono, E., Y. Tomioka and S. Taharaguchi (2007). Possible roles of transcription factors of pseudorabies virus in neuropathogenicity. Fukuoka Igaku Zasshi 98(10): 364-372.

Peel, A. L., S. Zolotukhin, G. W. Schrimsher, N. Muzyczka and P. J. Reier (1997). Efficient transduction of green fluorescent protein in spinal cord neurons using adeno-associated virus vectors containing cell type-specific promoters. Gene Ther 4(1): 16-24.

Pomeranz, Reynolds, and Hengartner (2005). Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. Microbiol Mol Biol Rev, 462-500.

Powell, S. K., R. Rivera-Soto and S. J. Gray (2015). Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. Discov Med 19(102): 49-57.

Priola, S. A. and J. G. Stevens (1991). The 5' and 3' limits of transcription in the pseudorabies virus latency associated transcription unit. Virology 182(2): 852-856.

Qin Huang, K. Y. C., Isabelle G. Tobey, Yujia Alina Chan, Tim Poterba, Christine L. Boutros, and R. D. Alejandro B. Balazs, Jonathan M. Bloom, Cotton Seed, Benjamin E. Deverman (2019). Delivering genes across the blood-brain barrier: LY6A, a novel cellular receptor for AAV-PHP.B capsids. Biorxiv.

Qin, J. Y., L. Zhang, K. L. Clift, I. Hular, A. P. Xiang, B. Z. Ren and B. T. Lahn (2010). Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. PLoS One 5(5): e10611.

Renier, N., E. L. Adams, C. Kirst, Z. Wu, R. Azevedo, J. Kohl, A. E. Autry, L. Kadiri, K. Umadevi Venkataraju, Y. Zhou, V. X. Wang, C. Y. Tang, O. Olsen, C. Dulac, P. Osten and M. Tessier-Lavigne (2016). Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. Cell 165(7): 1789-1802.

Renier, N., Z. Wu, D. J. Simon, J. Yang, P. Ariel and M. Tessier-Lavigne (2014). iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. Cell 159(4): 896-910.

[0156]

Russell, D. W. and R. K. Hirata (1998). Human gene targeting by viral vectors. Nat Genet 18(4): 325-330.

Samulski, R. J. and N. Muzyczka (2014). AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. Annu Rev Virol 1(1): 427-451.

Sandelin, A., W. Alkema, P. Engstrom, W. W. Wasserman and B. Lenhard (2004). JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. Nucleic Acids Res 32(Database issue): D91-94.

Sohal, V. S., F. Zhang, O. Yizhar and K. Deisseroth (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. Nature 459(7247): 698-702.

Taharaguchi, S., T. Kobayashi, S. Yoshino and E. Ono (2002). Analysis of regulatory functions for the region located upstream from the latency-associated transcript (LAT) promoter of pseudorabies virus in cultured cells. Vet Microbiol 85(3): 197-208.

Taharaguchi, S., S. Yoshino, K. Amagai and E. Ono (2003). The latency-associated transcript promoter of pseudorabies virus directs neuron-specific expression in trigeminal ganglia of transgenic mice. J Gen Virol 84 (Pt 8): 2015-2022.

von Jonquieres, G., D. Frohlich, C. B. Klugmann, X. Wen, A. E. Harasta, R. Ramkumar, Z. H. Spencer, G. D. Housley and M. Klugmann (2016). Recombinant Human Myelin-Associated Glycoprotein Promoter Drives Selective AAV-Mediated Transgene Expression in Oligodendrocytes. Front Mol Neurosci 9: 13.

Wang, D., P. W. L. Tai and G. Gao (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. Nat Rev Drug Discov 18(5): 358-378.

Wang, J., S. U. Pol, A. K. Haberman, C. Wang, M. A. O'Bara and F. J. Sim (2014). Transcription factor induction of human oligodendrocyte progenitor fate and differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 111(28): E2885-2894.

Wang, L., S. Muramatsu, Y. Lu, K. Ikeguchi, K. Fujimoto, T. Okada, H. Mizukami, Y. Hanazono, A. Kume, F. Urano, H. Ichinose, T. Nagatsu, I. Nakano and K. Ozawa (2002). Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. Gene Ther 9(6): 381-389.

Washington, S. D., F. Musarrat, M. K. Ertel, G. L. Backes and D. M. Neumann (2018). CTCF Binding Sites in the Herpes Simplex Virus 1 Genome Display Site-Specific CTCF Occupation, Protein Recruitment, and Insulator Function. J Virol 92(8).

Wasserman, W. W. and A. Sandelin (2004). Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. Nat Rev Genet 5(4): 276-287.

Wong, G., J. Lu, W. Zhang and G. F. Gao (2019). Pseudorabies virus: a neglected zoonotic pathogen in humans? Emerg Microbes Infect 8(1): 150-154.

Yardeni, T., M. Eckhaus, H. D. Morris, M. Huizing and S. Hoogstraten-Miller (2011). Retro-orbital injections in mice. Lab Anim (NY) 40(5): 155-160.

Ziebarth, J. D., A. Bhattacharya and Y. Cui (2013). CTCFBSDB 2.0: a database for CTCF-binding sites and genome organization. Nucleic Acids Res 41(Database issue): D188-194.

Zimmerman, D., K. Patel, M. Hall and J. Elmer (2018). Enhancement of transgene expression by nuclear transcription factor Y and CCCTC-binding factor. Biotechnol Prog 34(6): 1581-1588.

Zolotukhin, S., B. J. Byrne, E. Mason, I. Zolotukhin, M. Potter, K. Chesnut, C. Summerford, R. J. Samulski and N. Muzyczka (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. Gene Therapy 6(6): 973-985.

[0159] 본원에 원용된 모든 특허, 공개된 출원 및 참고문헌의 교시는 그 전체가 참고로 포함된다.

[0160] 예시적 실시양태가 구체적으로 나타나고 기재된 한편, 형태 및 세부내용에서의 다양한 변화가 첨부된 청구범위에 의해 포함되는 실시양태의 범위를 벗어나지 않으면서 그 내부에서 이루어질 수 있다는 것이 통상의 기술자에 의해 이해될 것이다.

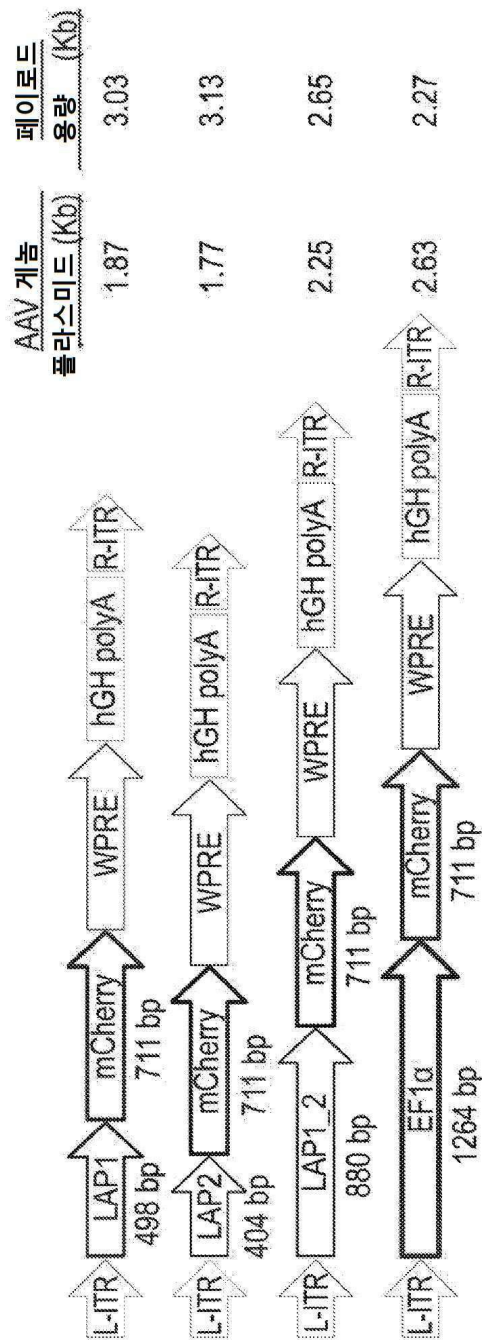
도면

도면1a

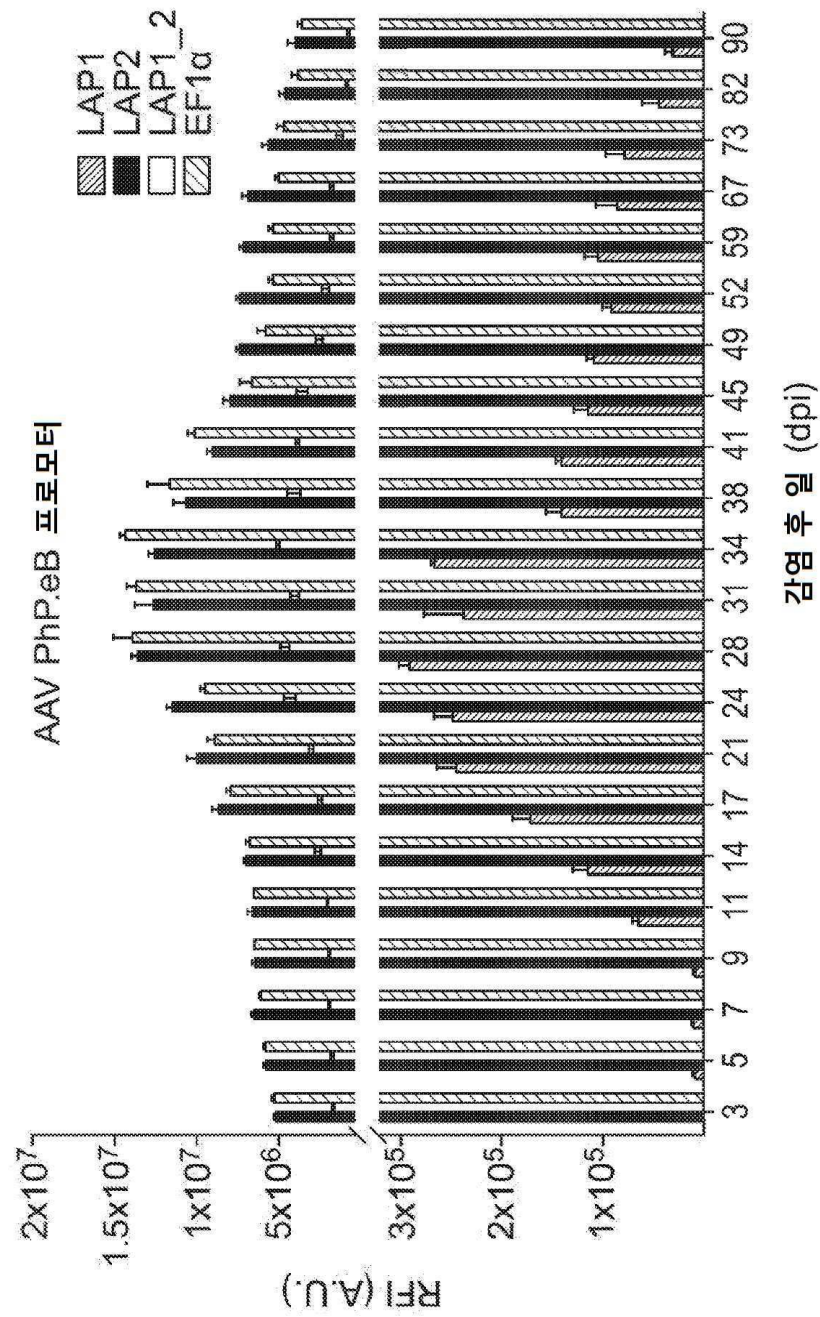
```

1   GGGGGAGTCGGGGGGGAGTCGGGGGGGAGTCGGGGGGTCCCAGTTCGGCG
51  CCGTCTCCACAGCGCACAAAGTCCGGCTGCAGTAAATTTACTGCGGGTGC
    1
    GC 박스
101 AGTTACCCTGGCGGCACACCGGCCCGATGGCGCTGCAGTAACTCTACTG
    2
    GC 박스
151 CAGCTACAGTTTACTACAGTTGCAGTACCGCGCGCCGCGCCAAATACTA
    GC 박스
201 CAGTAGATTTCTGTGGCCGCCGCTACTGCAGTTTACCGCGGCTGCAGT
251 AAAGTGCAGTATCGCGCGGTAAATTGCAGTCTGGCAGCCGCGCGTTACTG
    CAAT 박스
301 CAATAGCGGTGGCTCCCGACACTCTGGCAATGGTGCTAATGGCCGT
    CAAT 박스 3
351 GATGGTCCATGTGGGGGTGATGTAAACCGCCGGGCCCGGTTGGGCACTCAG
    2
401 ATGGTGGCCGGGCGCCAGGCCAAAGTGCTGTCTGAGTGGCACTTTATGAC
    3 2
    CAAT 박스
451 TTTGTTTTTCTCAAACAACATCAATATATGGATGCACATCGTGTATATAAT
    TAT 박스
501 CCCCCGTCCGCGCTCCGCCACCCATCAGCAGCGCGGACGCTGGCG
    2 GC 박스
551 CCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCAGCCG
    GC 박스
601 ACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGC
    4 TAT 박스 5
651 GGGAGAGACGGACTGAAAAATATACTTTTATTTTGTCTGGGCCTG
    GC 박스
701 GAGACCCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAG
    5 5 5
751 GACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGG
    3 GC 박스
801 CCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCCAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGC
    GC 박스
851 GGCCGCAGCAGCAACAGGCTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGC
    GC 박스
901 TC
  
```

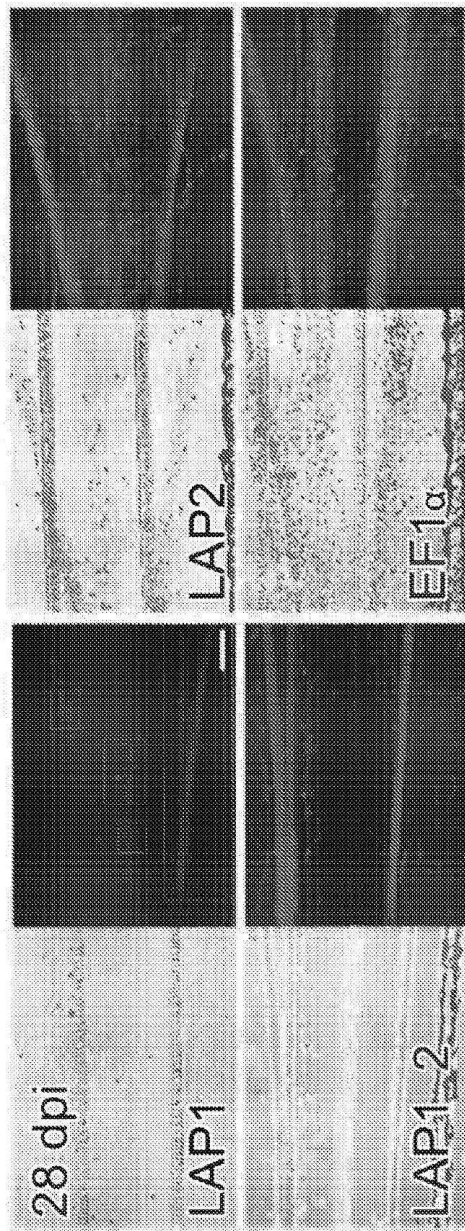

도면1b



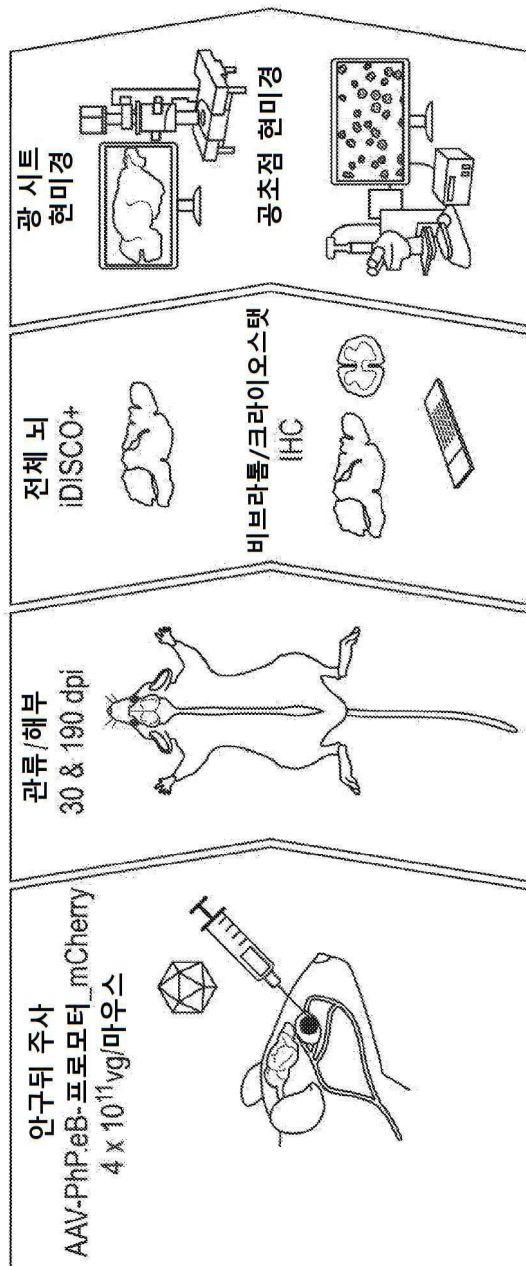
도면1c



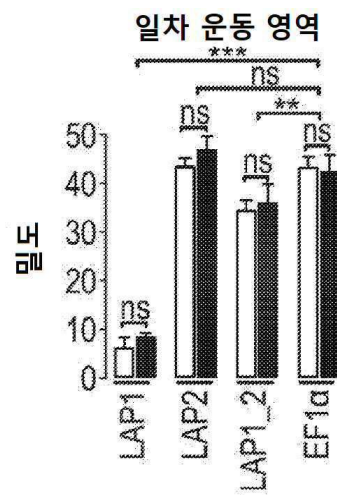
도면1d



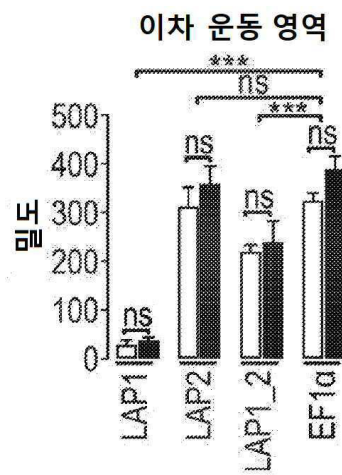
도면2a



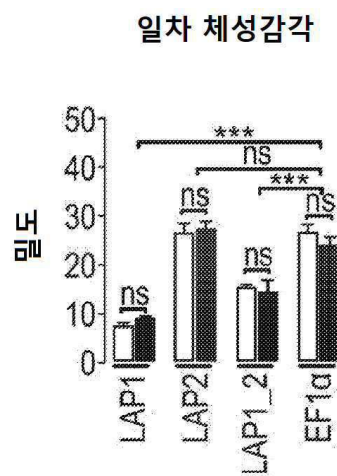
도면2b



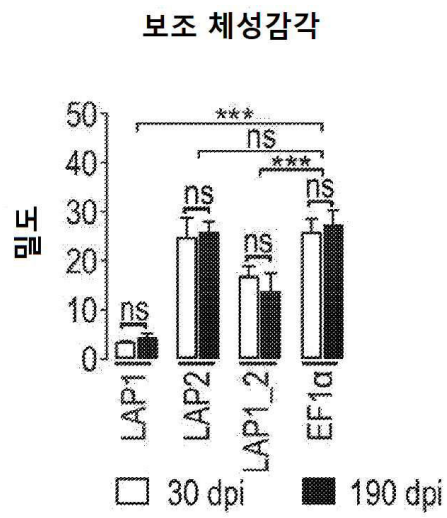
도면2c



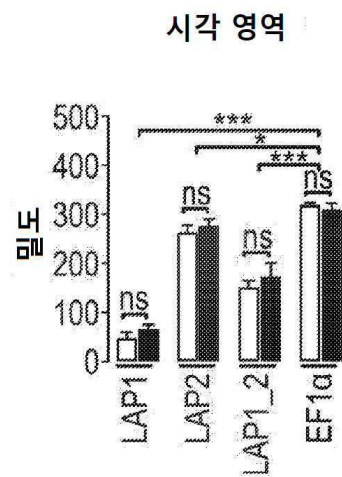
도면2d



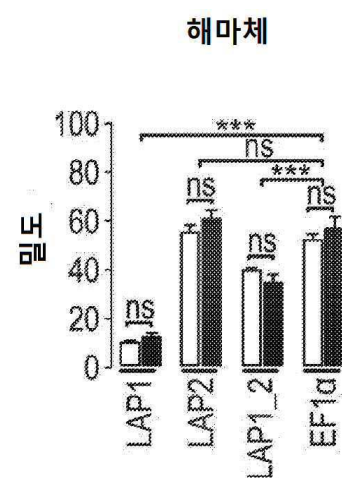
도면2e



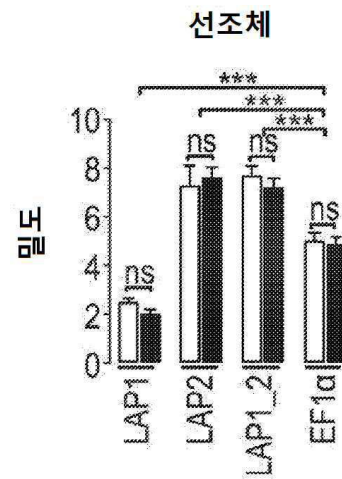
도면2f



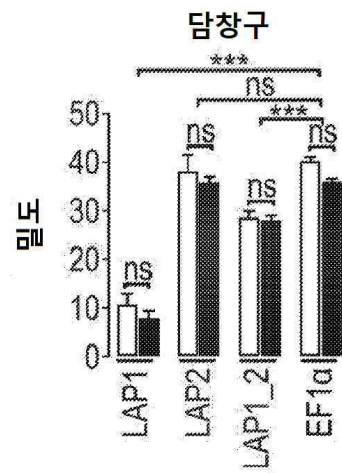
도면2g



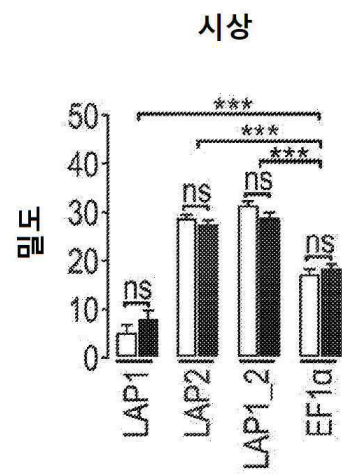
도면2h



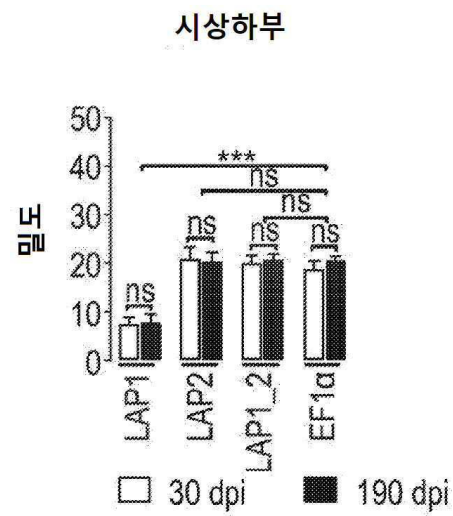
도면2i



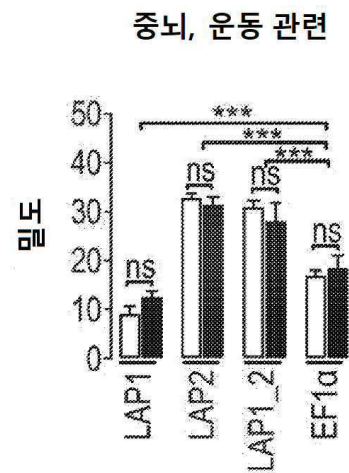
도면2j



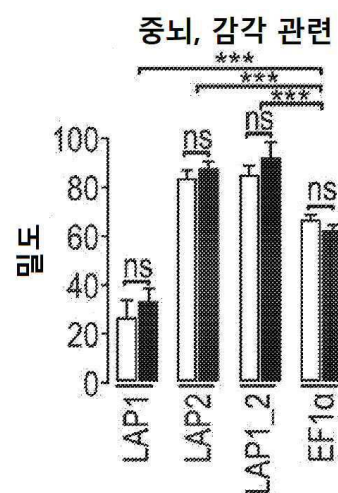
도면2k



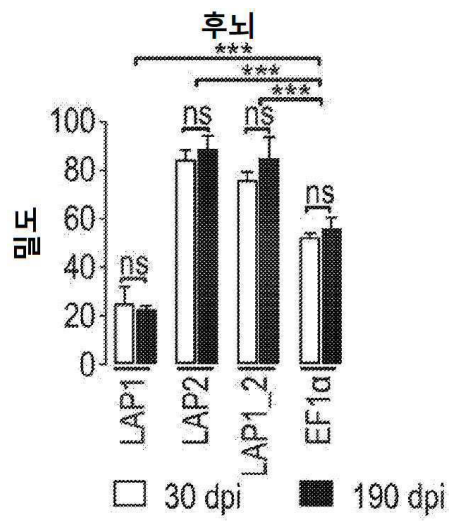
도면2l



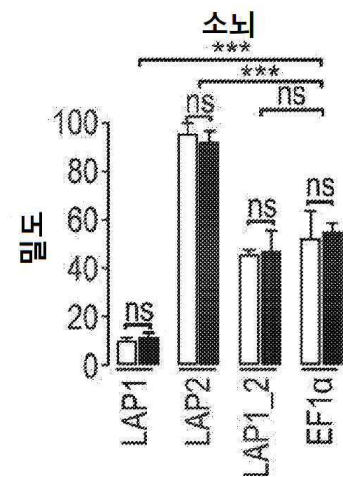
도면2m



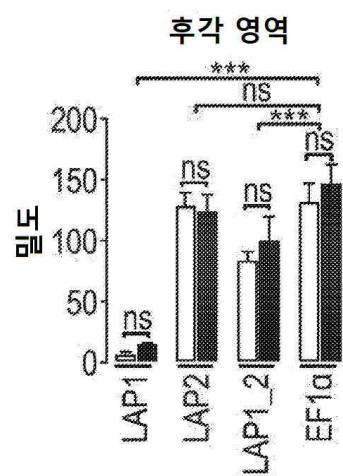
도면2n



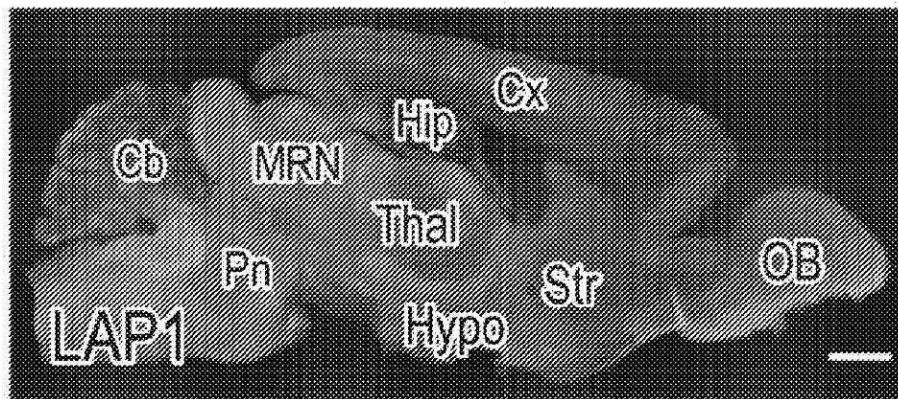
도면2o



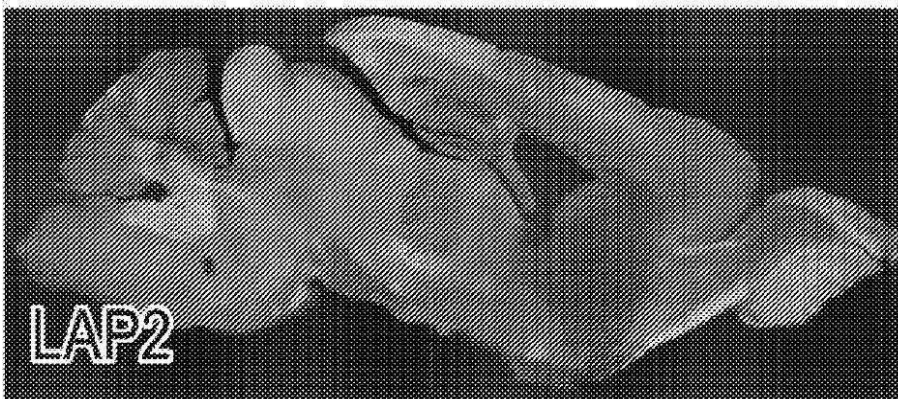
도면2p



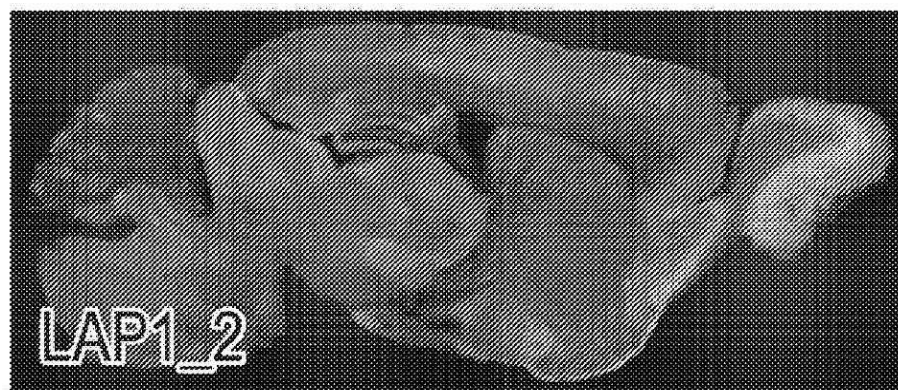
도면3a



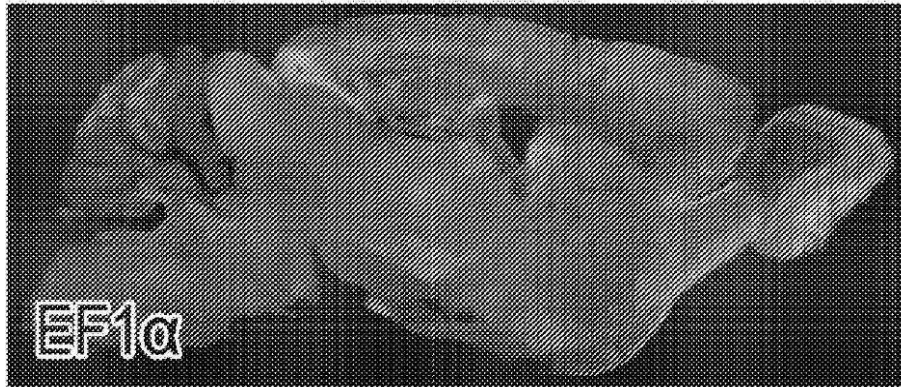
도면3b



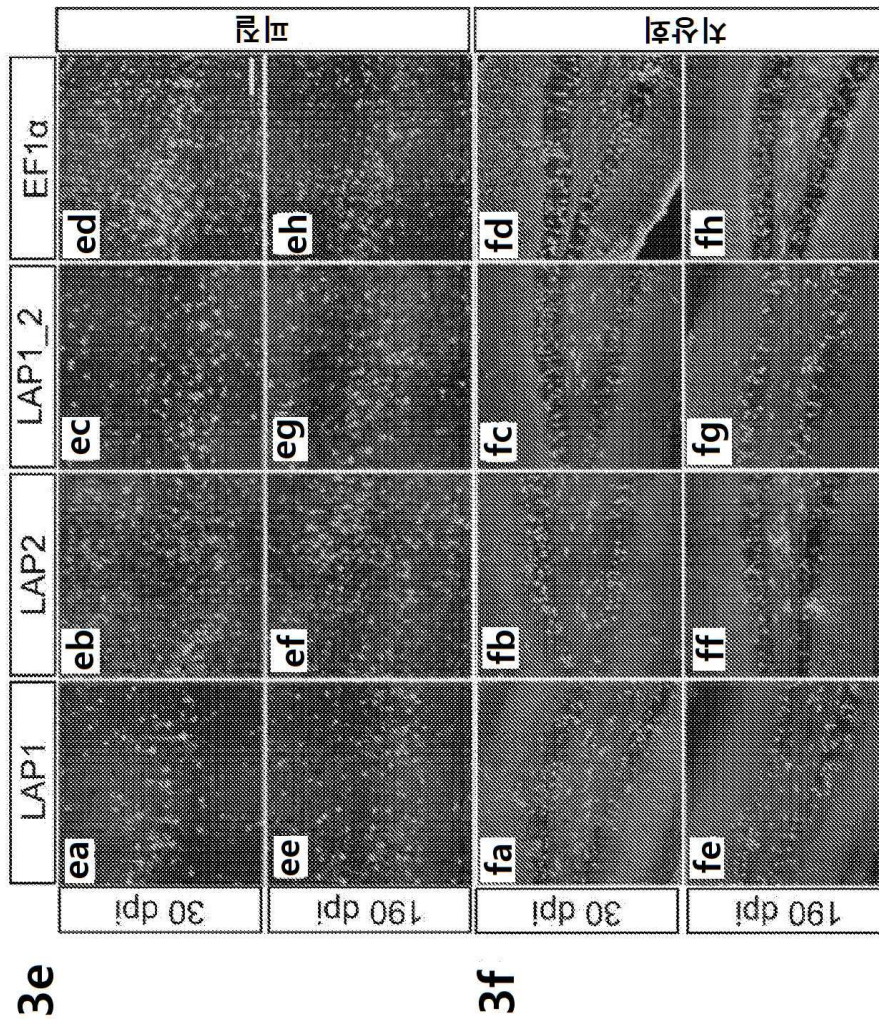
도면3c



도면3d



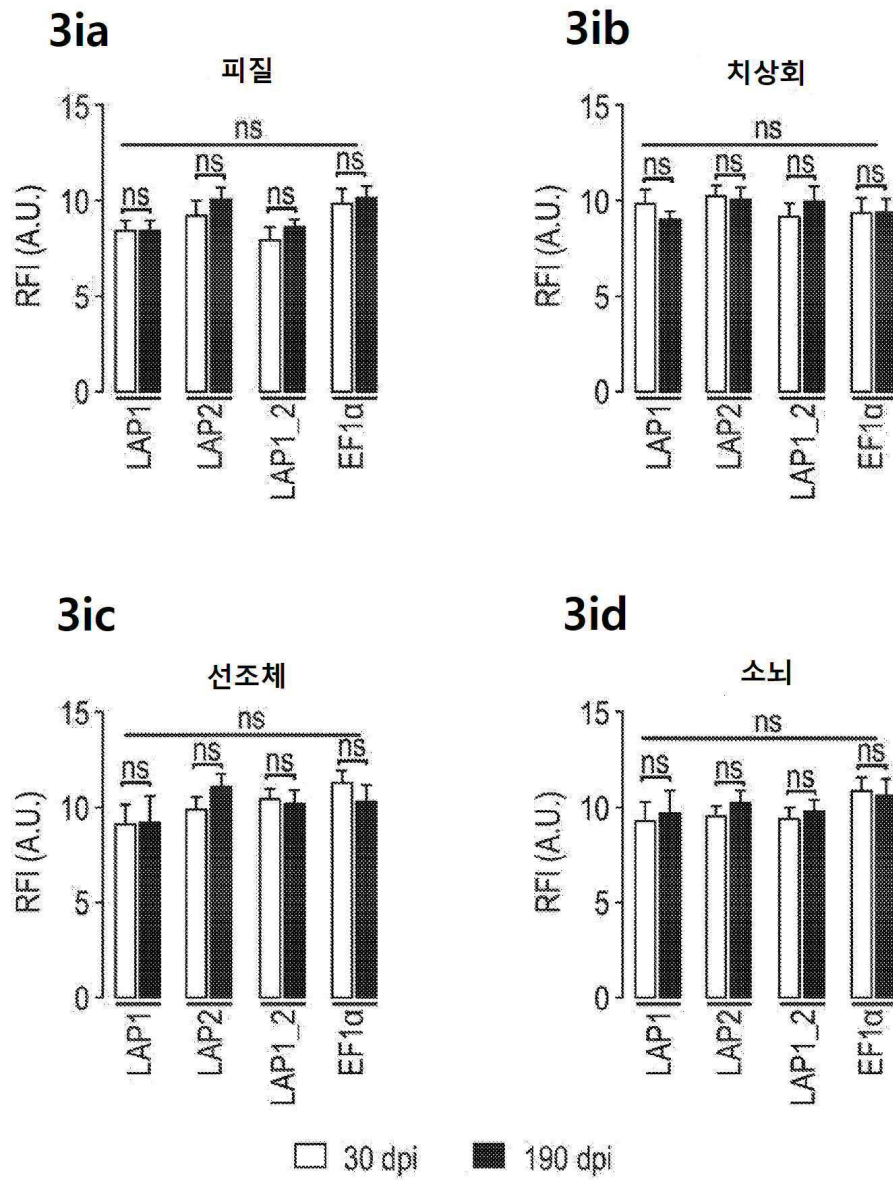
도면3ef



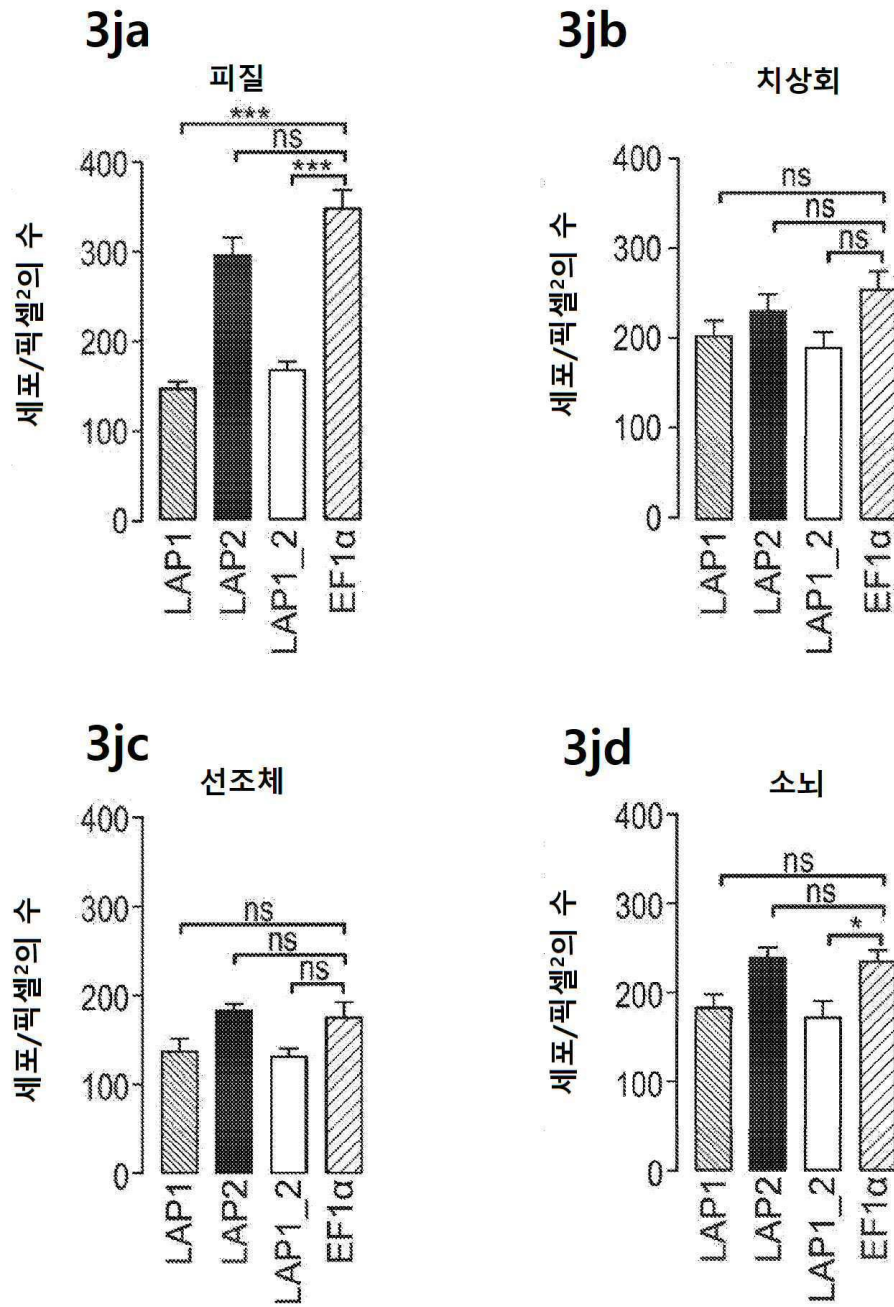
도면 3gh

					소노		선조체	
					190 dpi		30 dpi	
					he	ha	gf	gb
					hf	hb	gc	gd
					hg	hc	gh	gh
					30 dpi		190 dpi	
					EF1α		LAP1_2	
					LAP2		LAP1	
					3g		3h	

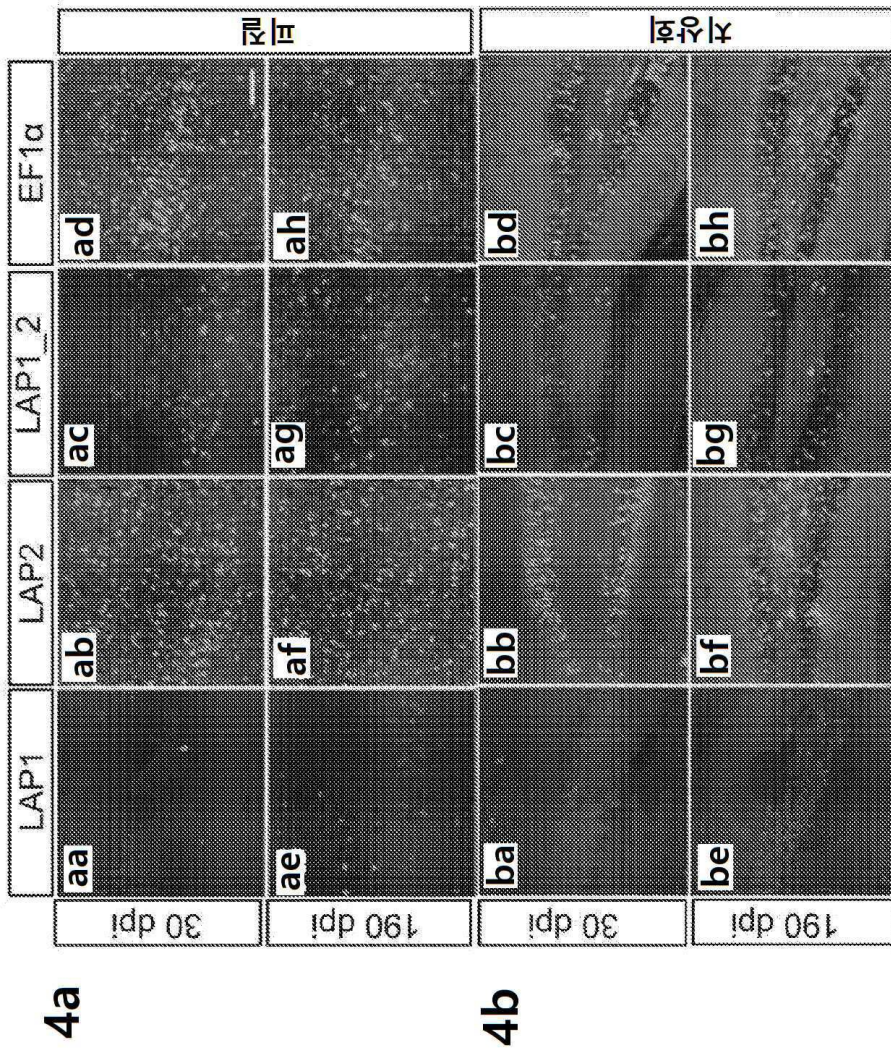
도면3i



도면3j



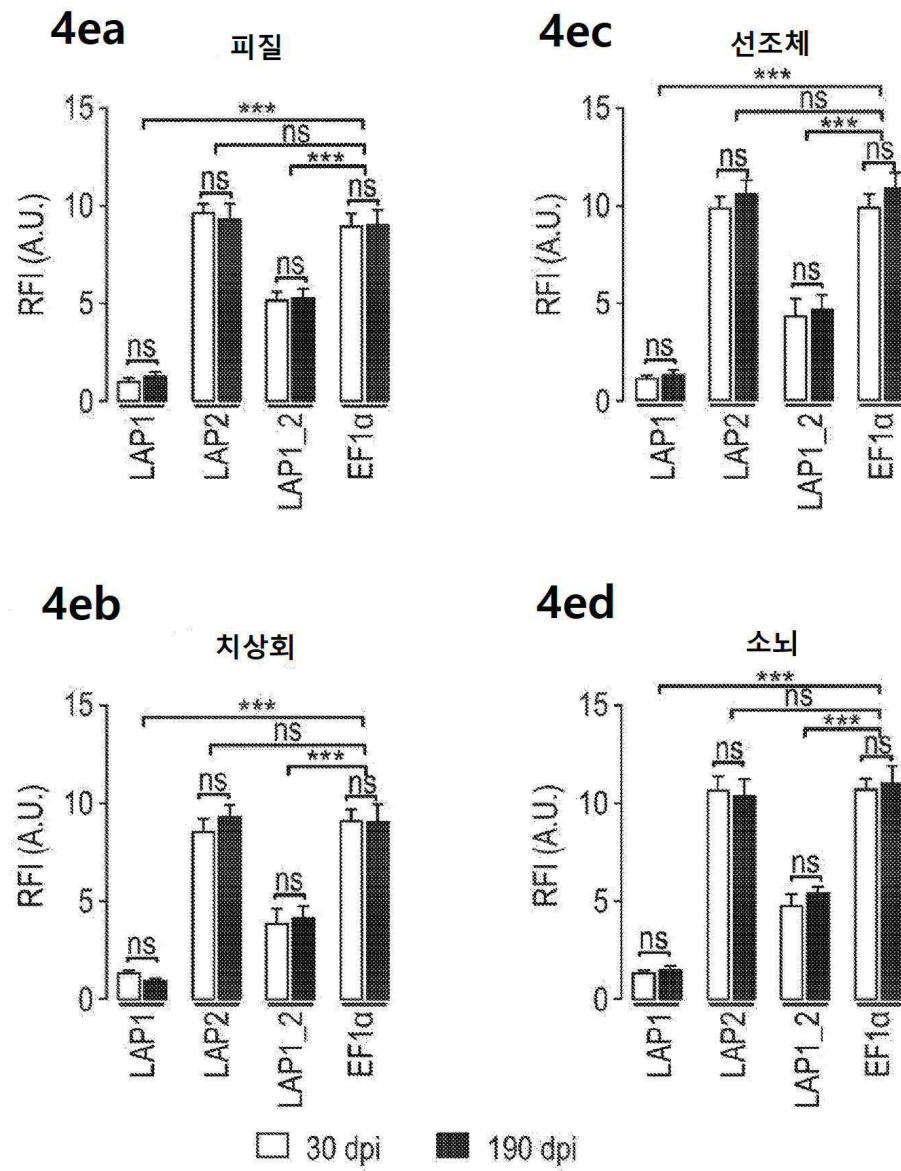
도면4ab



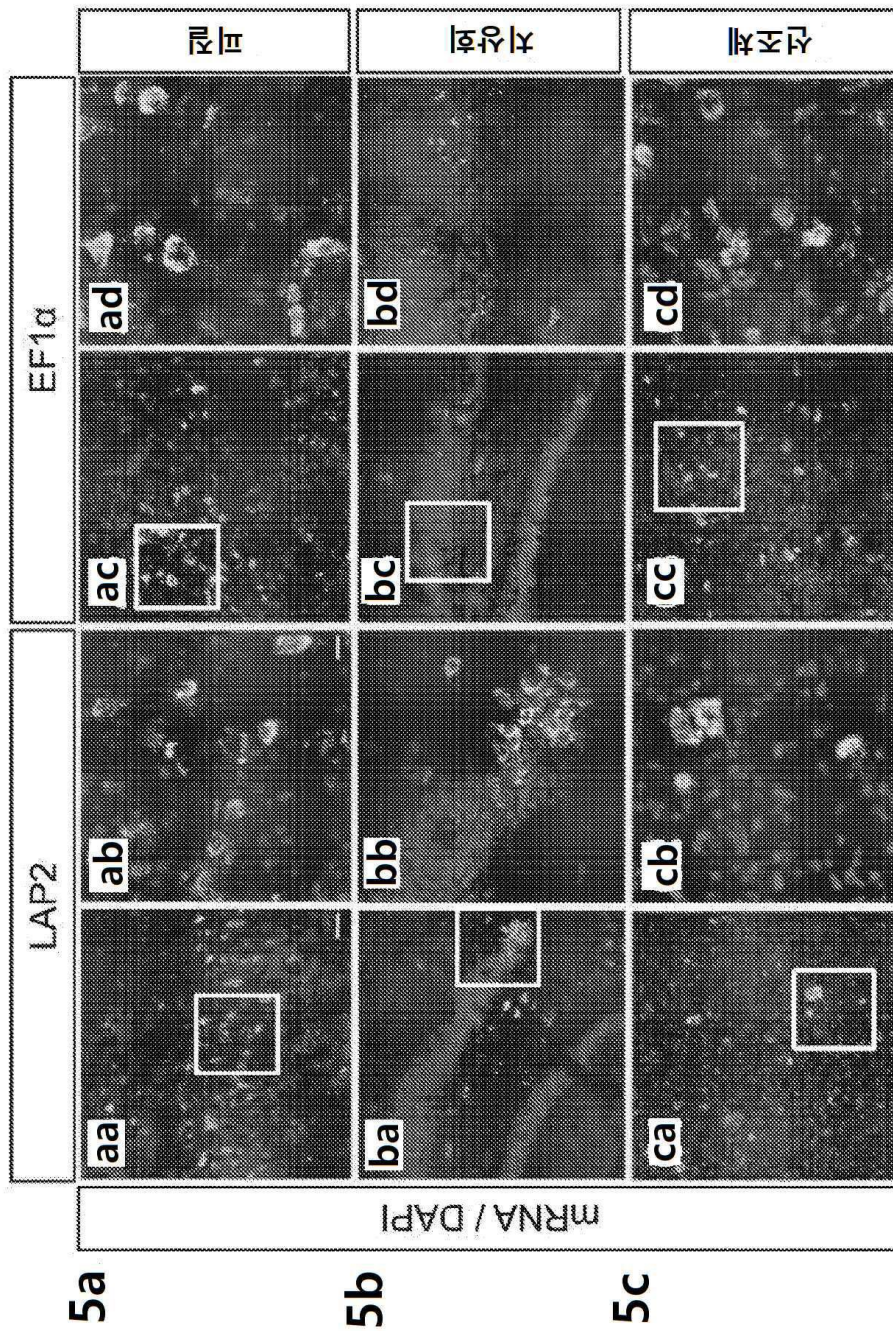
도면4cd

		LAP1	LAP2	LAP1_2	EF1 α	선조체	
4c	30 dpi	ca	cb	cc	cd	ch	cd
	190 dpi	ce	cf	cg	ch	ch	ch
4d	30 dpi	da	db	dc	dd	dh	dd
	190 dpi	de	df	dg	dh	dh	dh

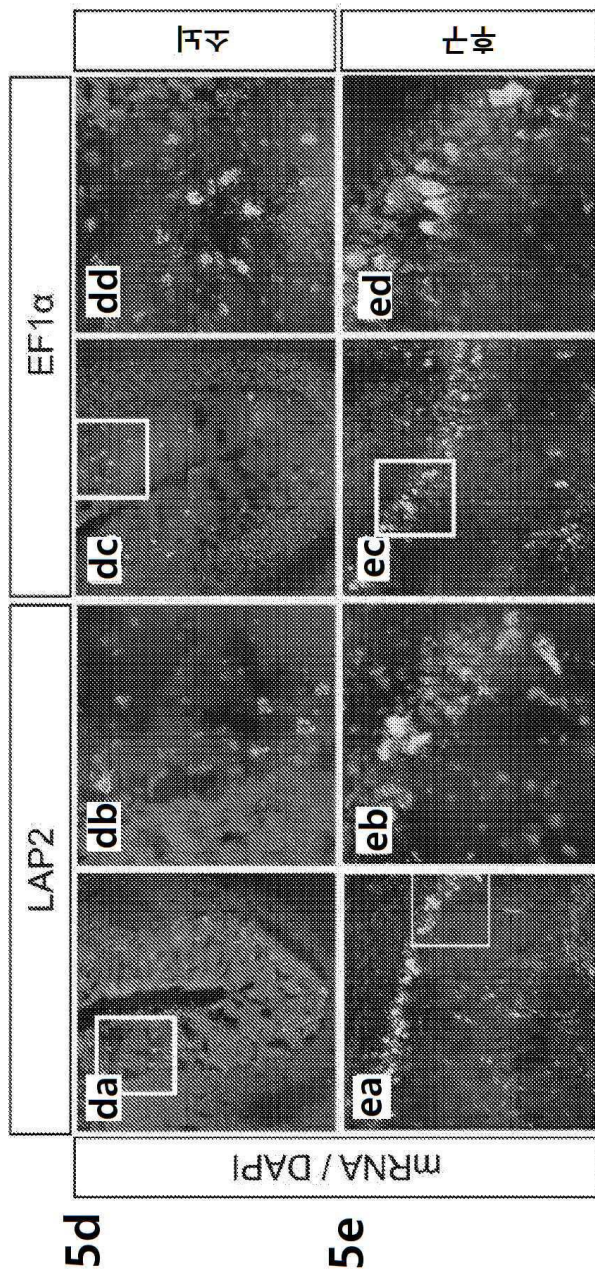
도면4e



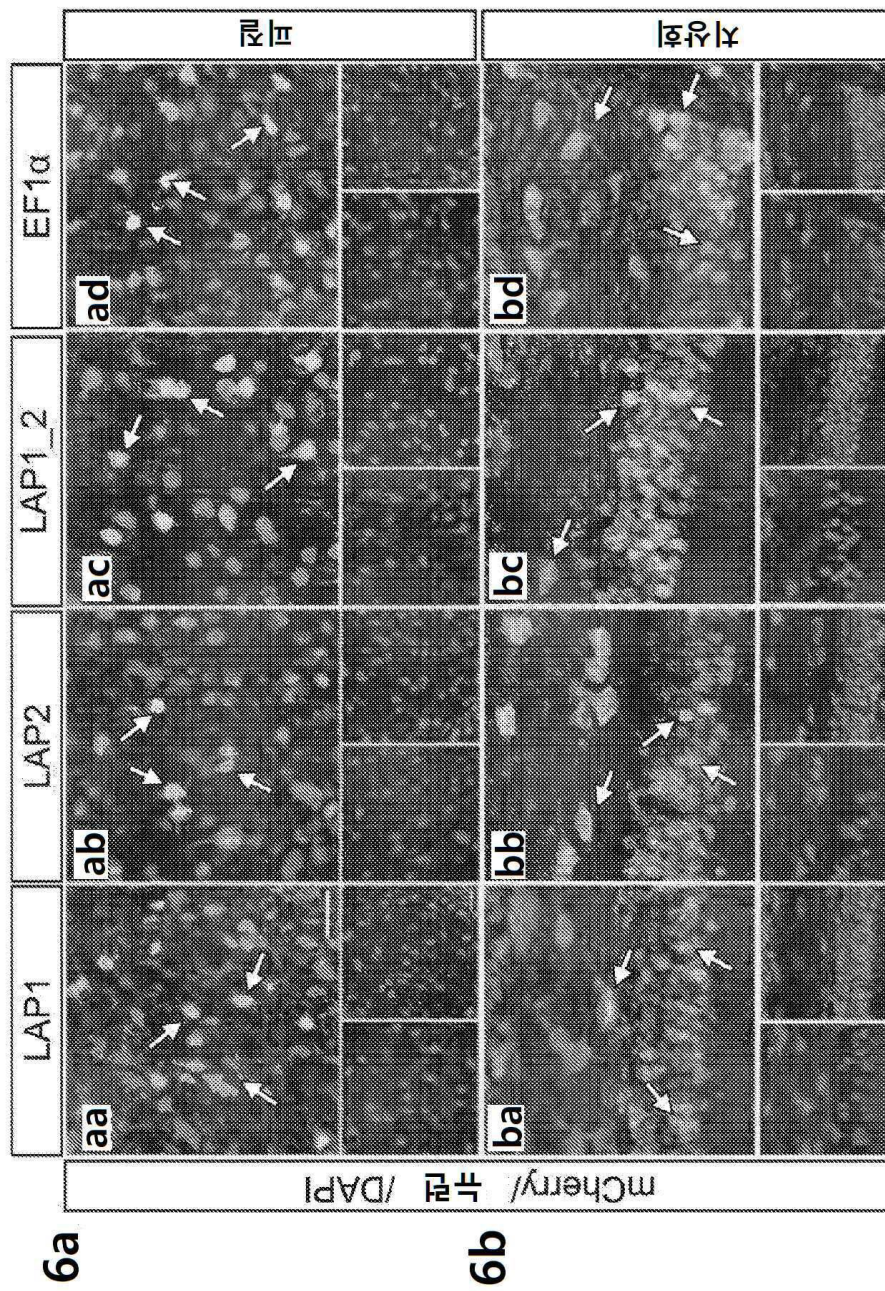
도면5abc



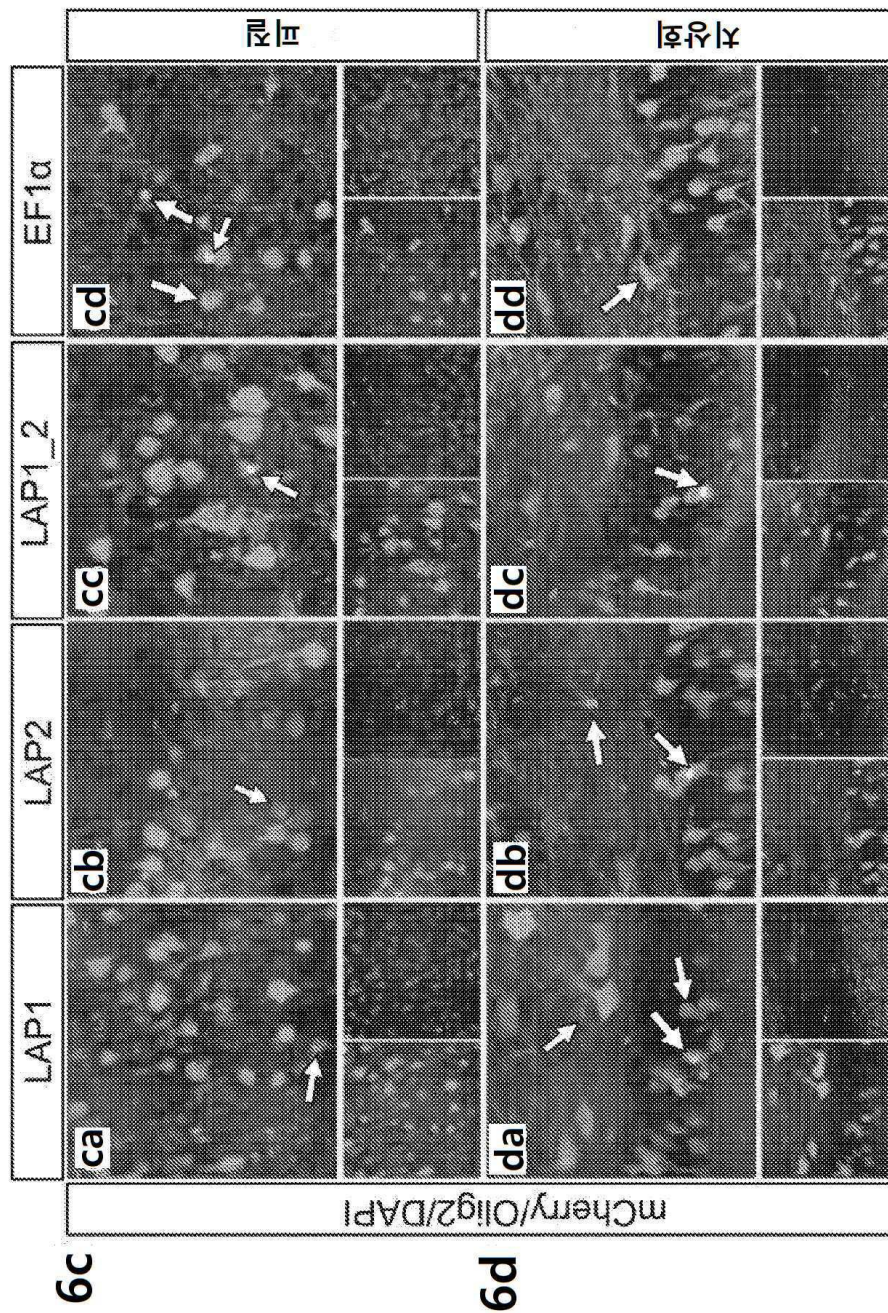
도면5de



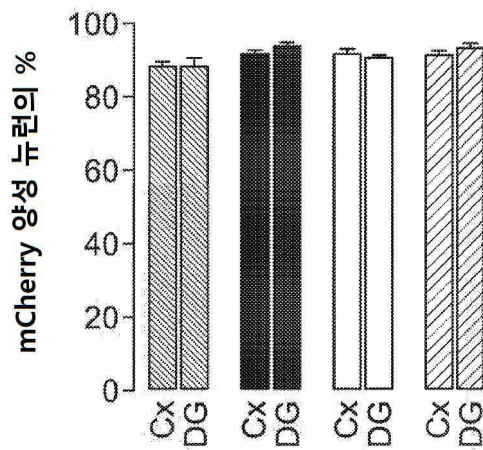
도면6ab



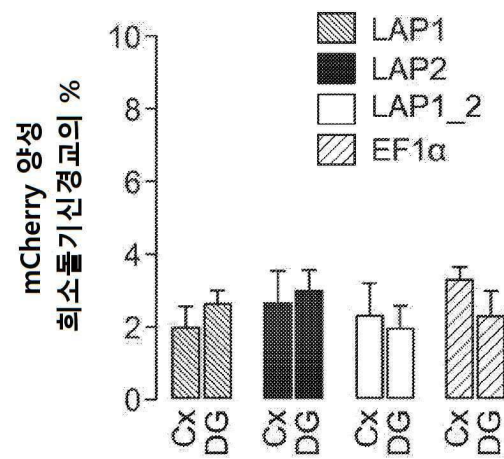
도면6cd



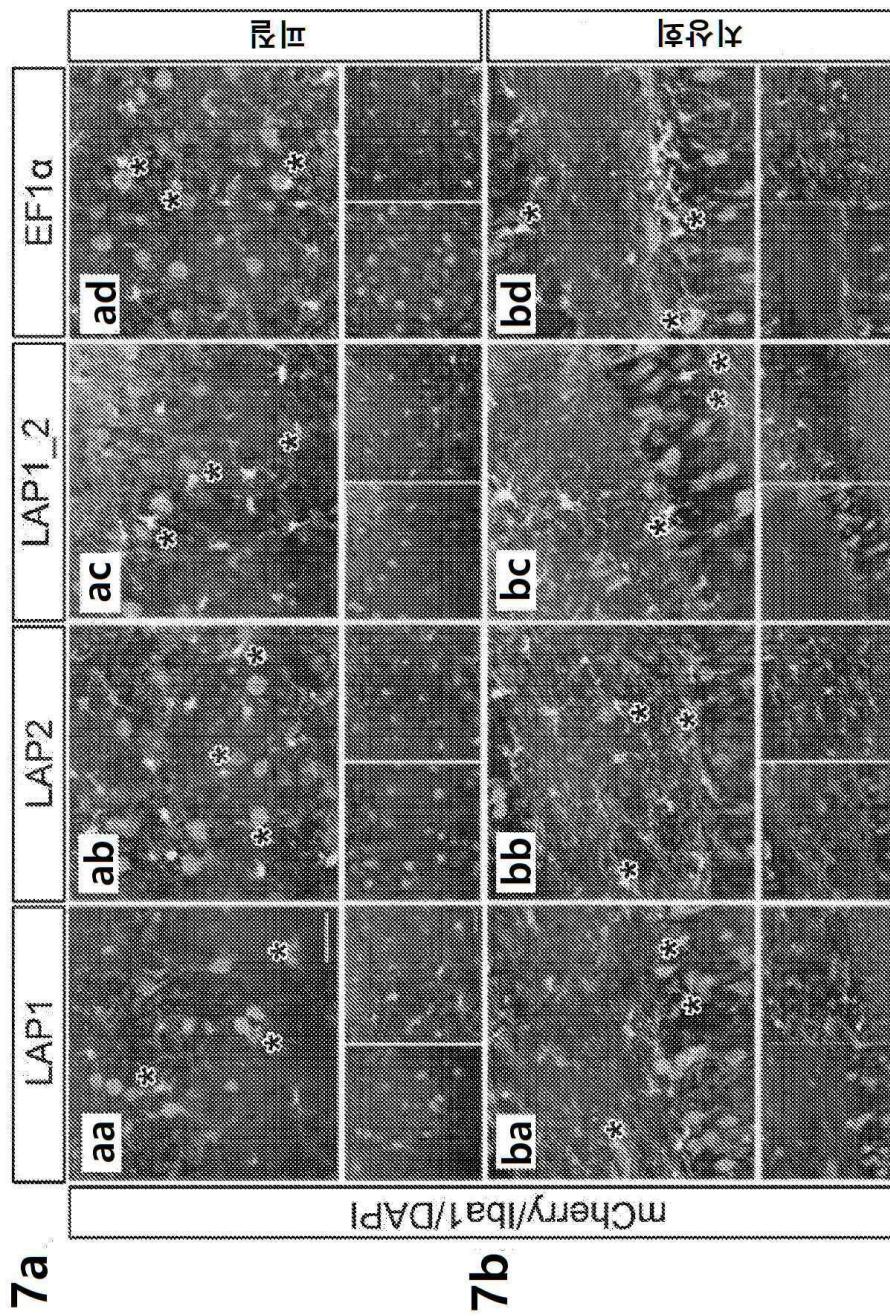
도면6e



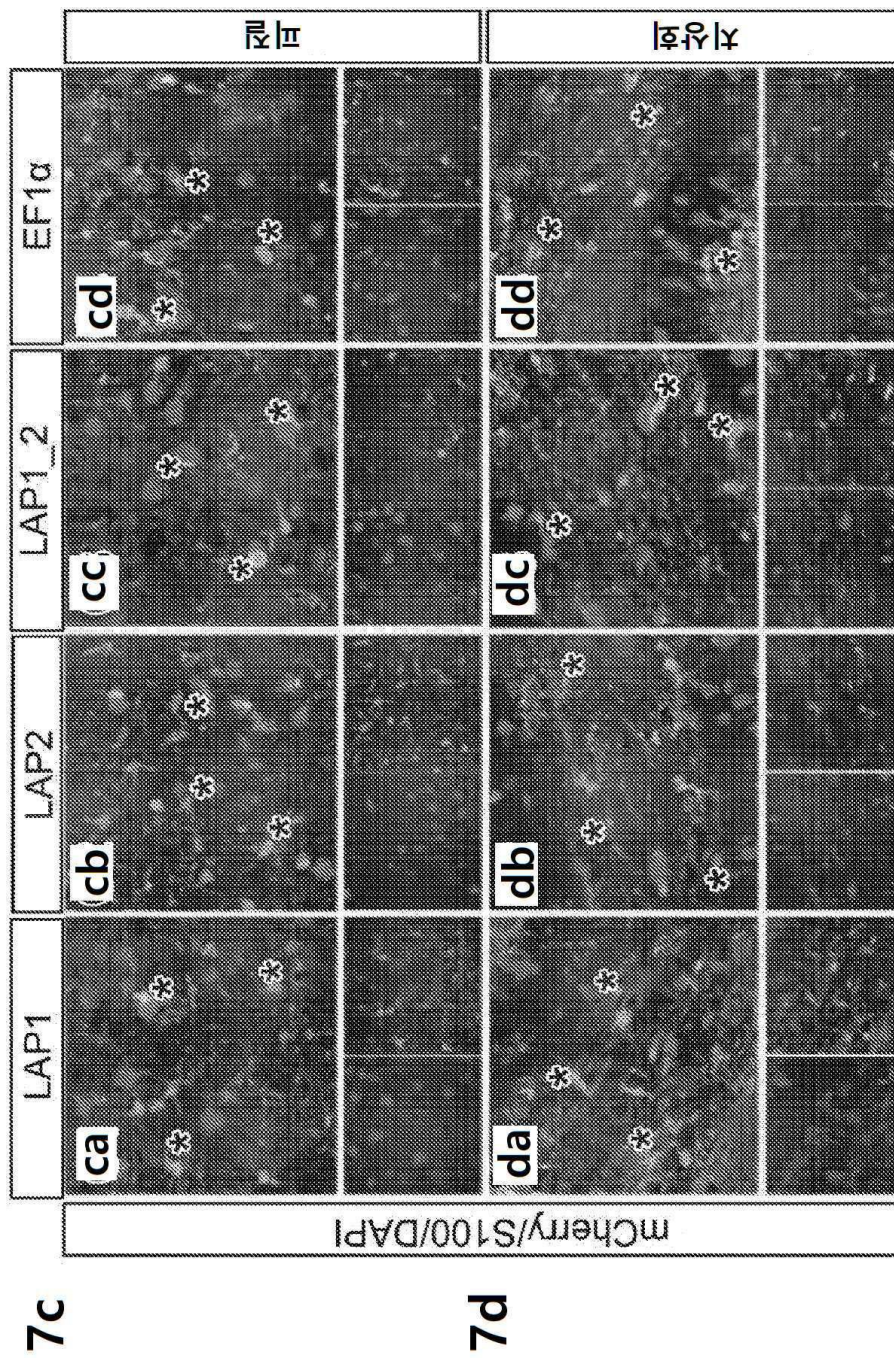
도면6f



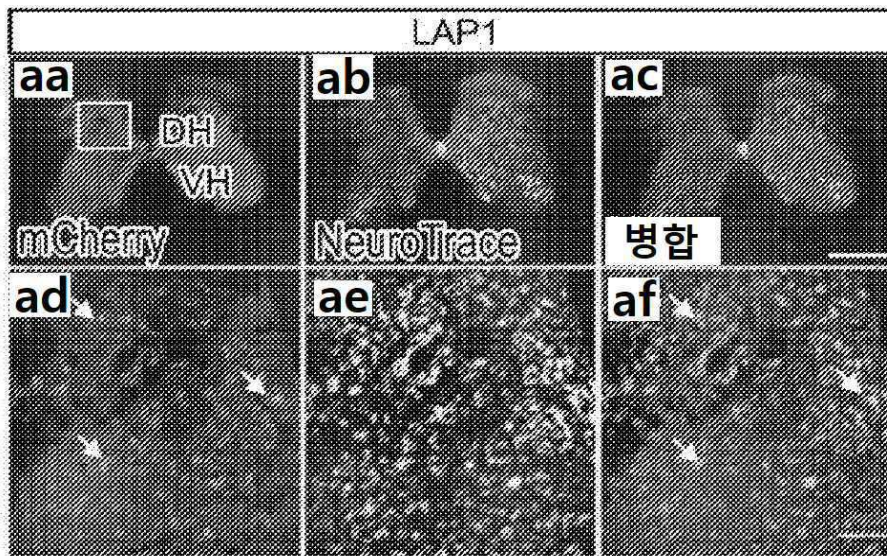
도면7ab



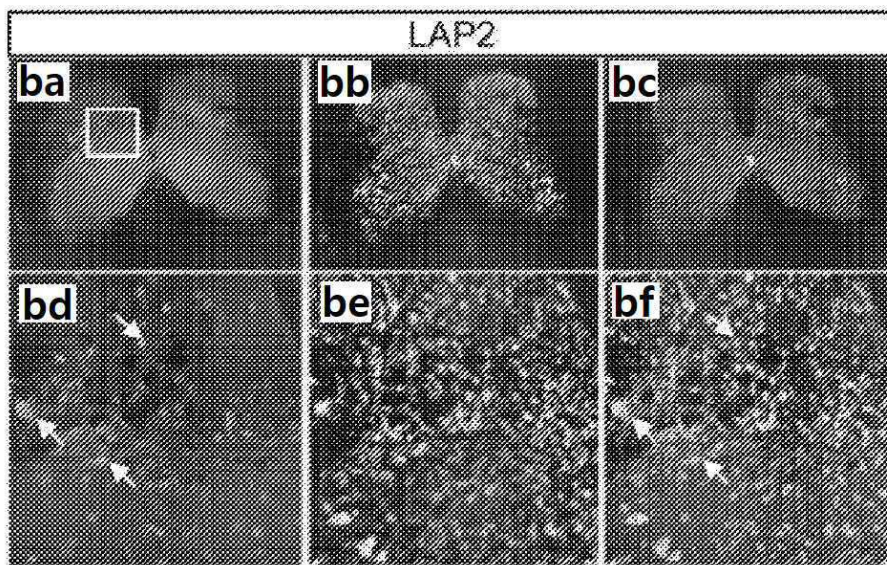
도면7cd



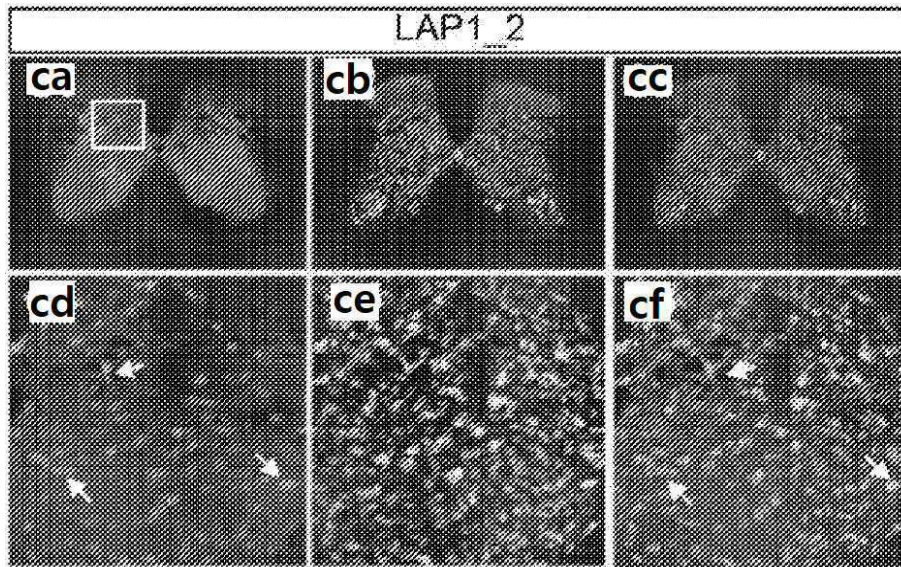
도면8a



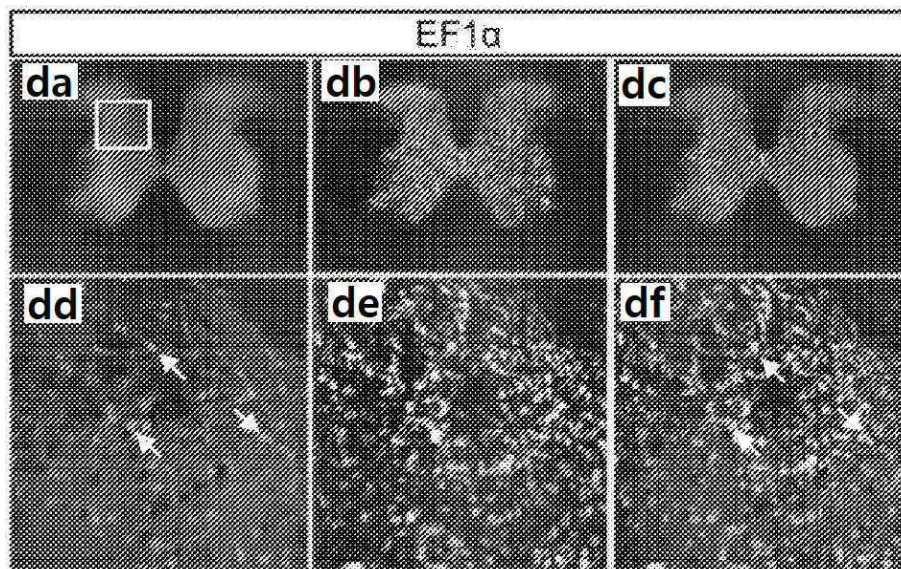
도면8b



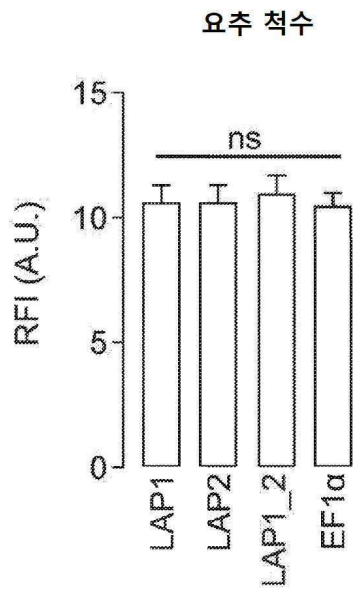
도면8c



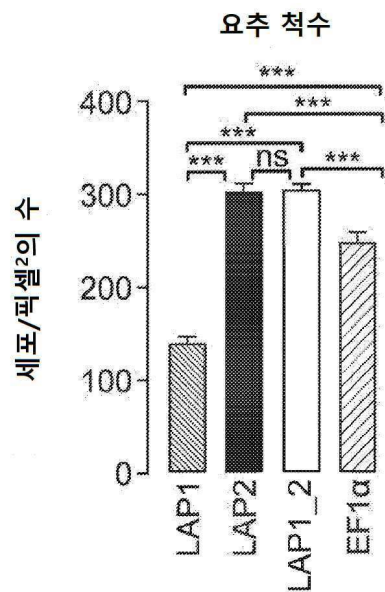
도면8d



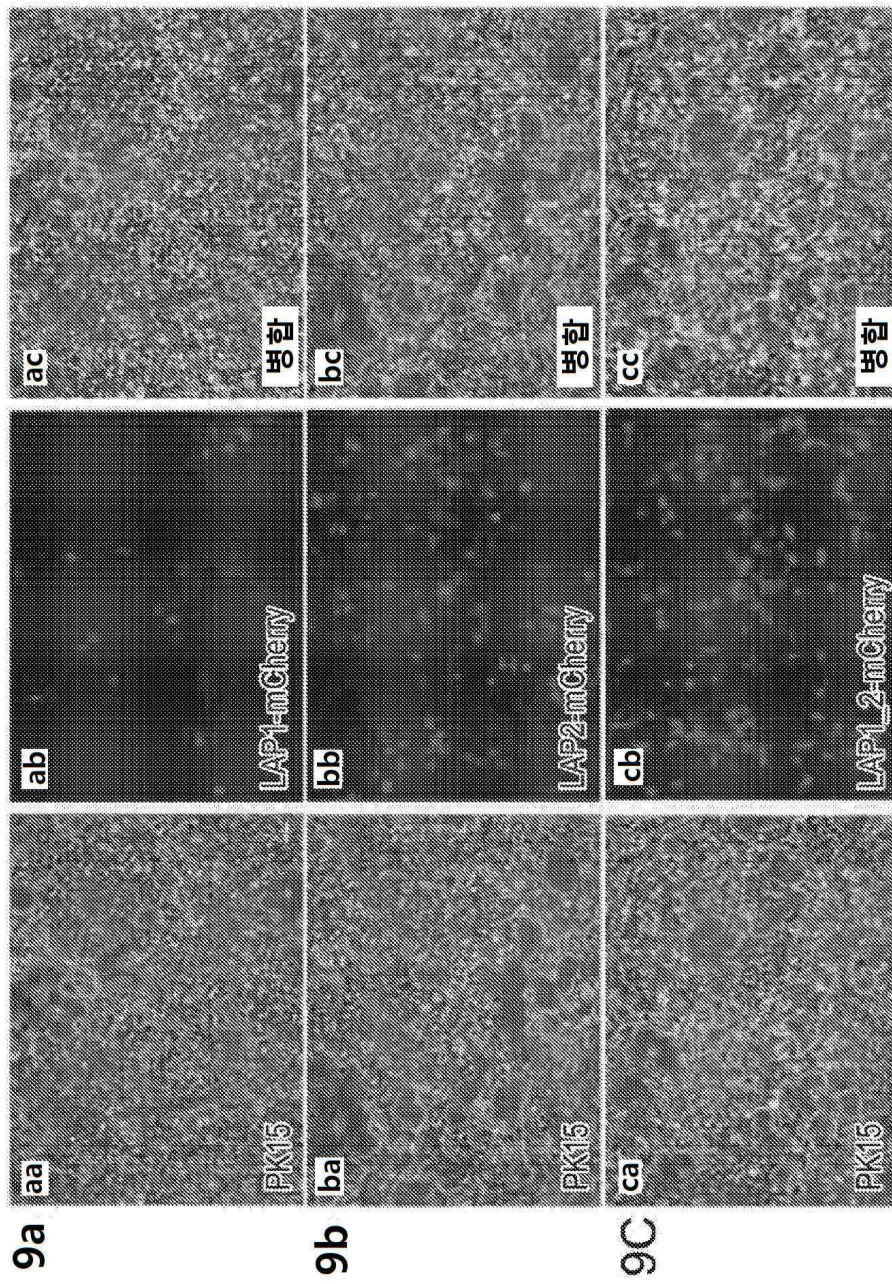
도면8e



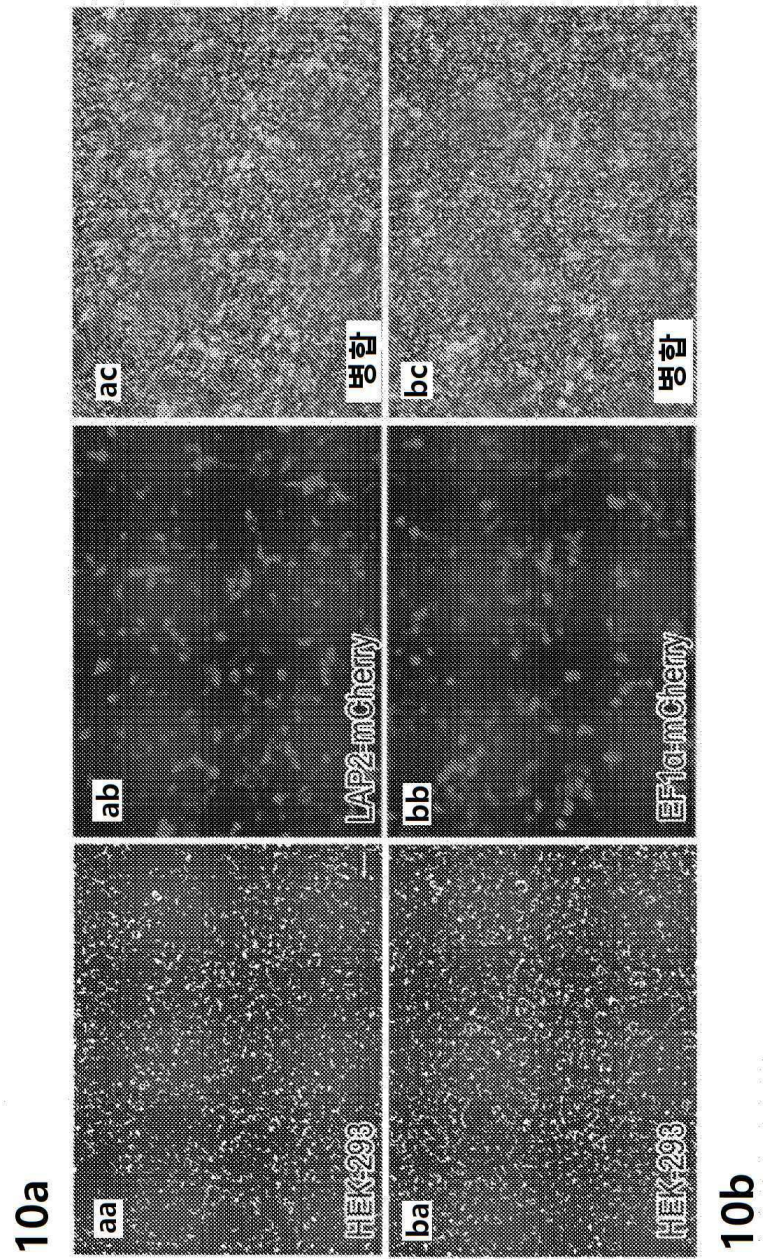
도면8f



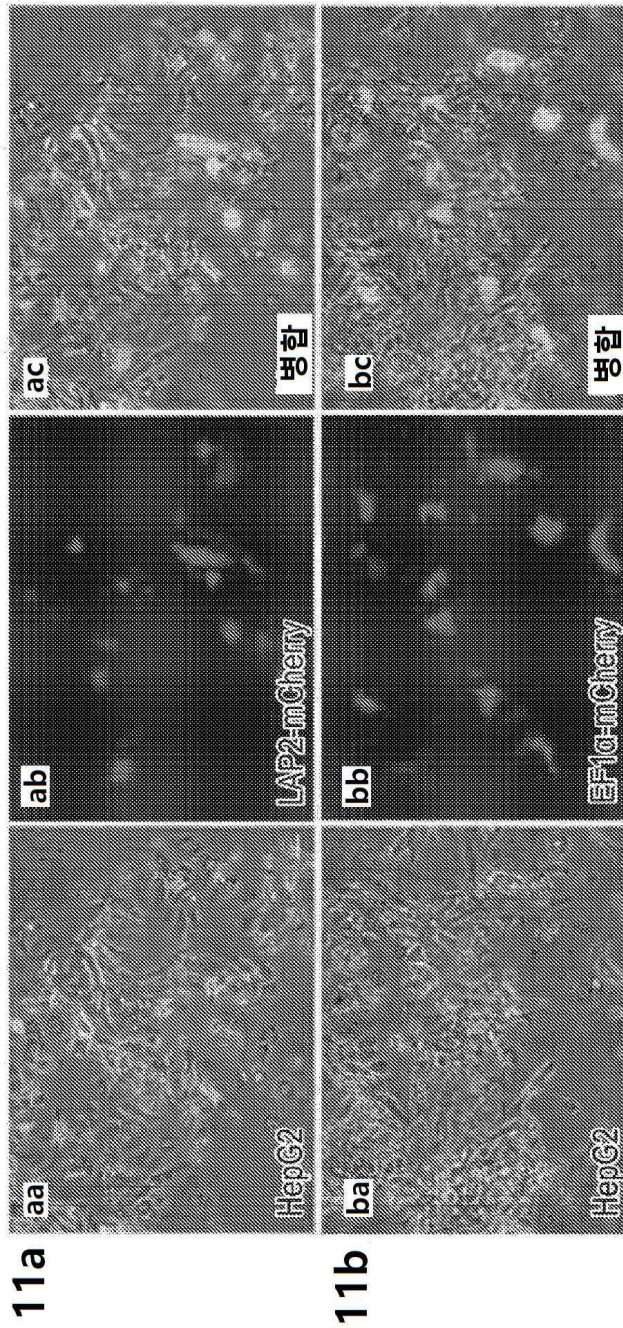
도면9



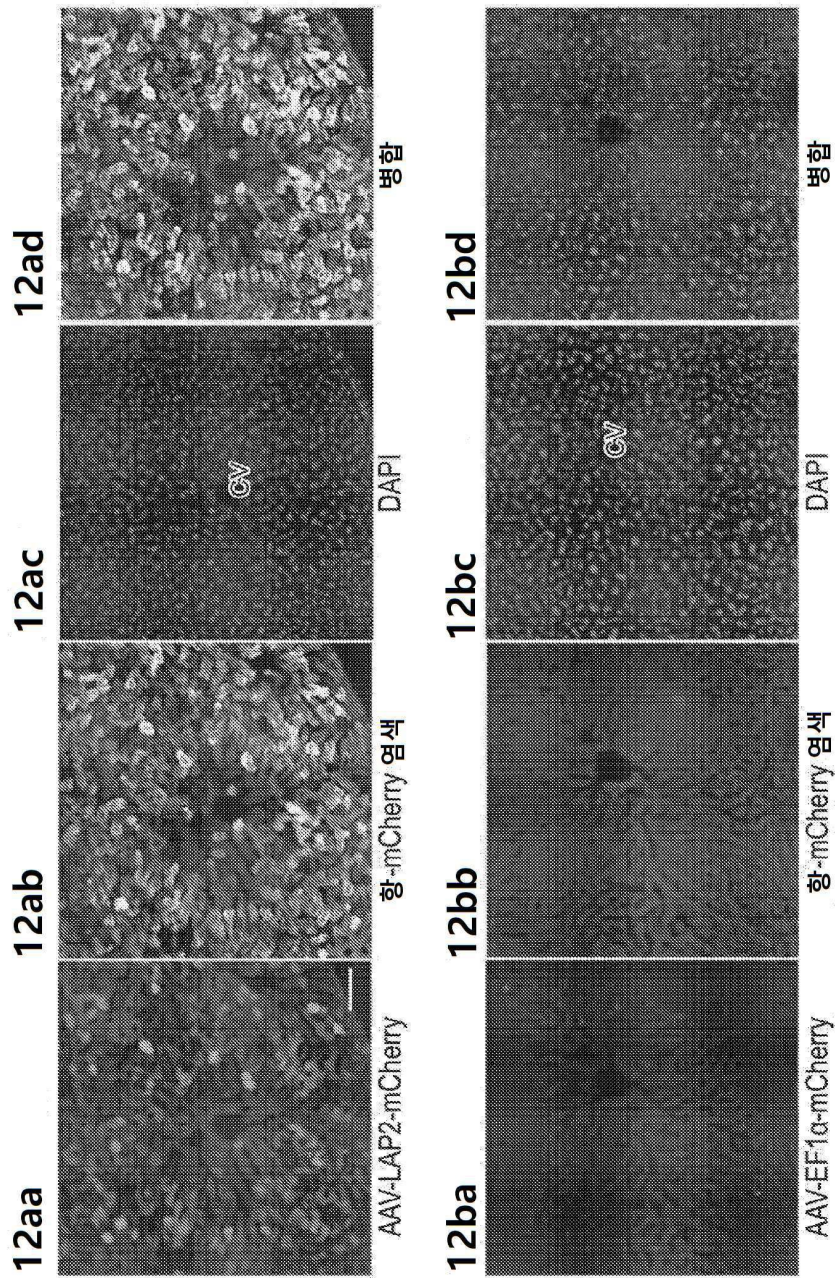
도면10



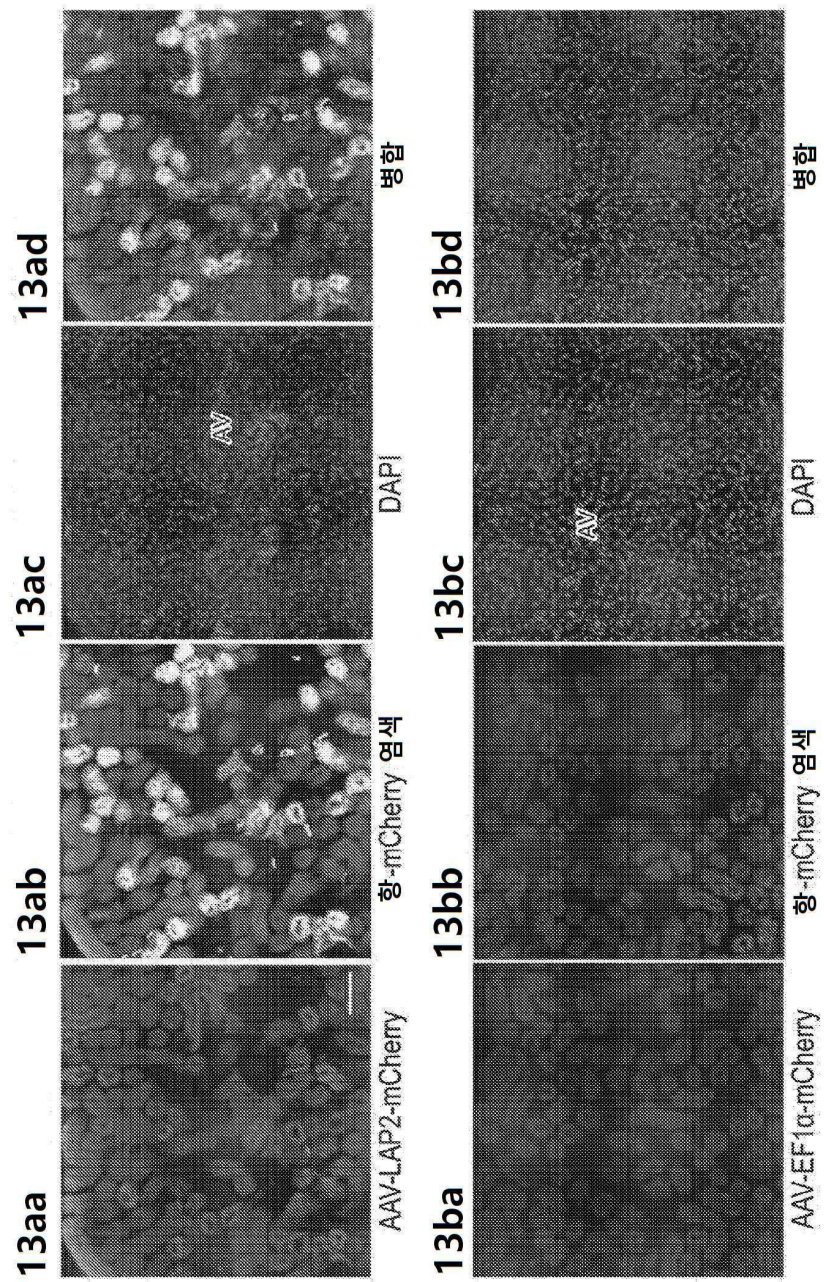
도면11



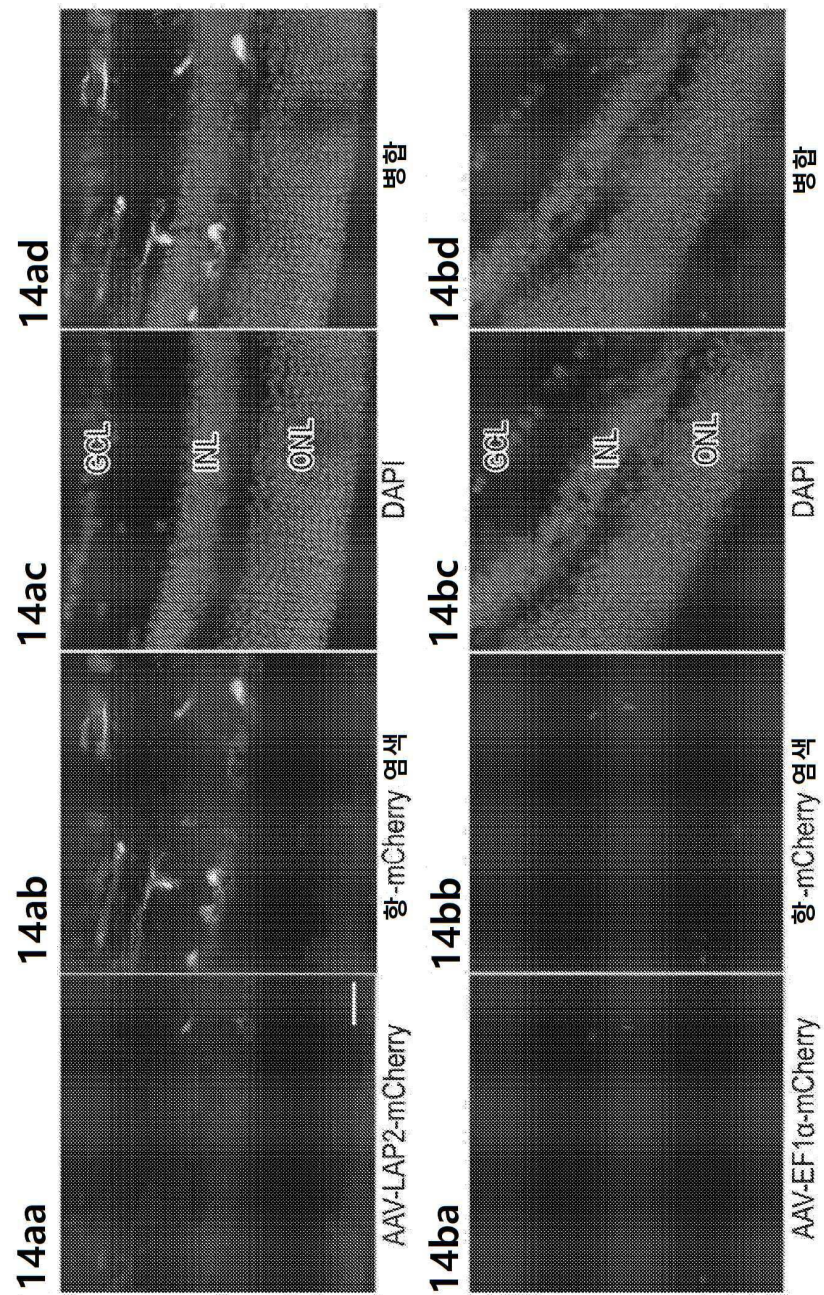
도면12



도면13



도면14



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY

<120> RECOMBINANT NUCLEIC ACIDS CONTAINING ALPHAHERPESVIRUS PROMOTER
SEQUENCES

<130> 5391.1018-002

<140> PCT/US2020/016787

<141> 2020-02-05

<150> 62/950,848

<151> 2019-12-19

<150> 62/801,524

<151> 2019-02-05

<160> 62

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 498

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 1

gggggagtcg ggggggagtc gggggggagt cgggggggtcc cagttcggcg cgggtctccac 60

agcgcacaaa gtccggctgc agtaaattha ctgcgggtgc agttaccctg gcggccacac 120

cggcccgatg gcgtgcagt aactctactg cagctacagt ttactacagt tgcagtaccg 180

cgcgcccgcc ccaaatacta cagtagattt cctgtggccg ccgcgtactg cagtttaccg 240

cggctgcagt aaactgcagt atcgcgcggt aaattgcagt ctggcagccg cgcgttactg 300

caattagcgg tggctccga cactctggcc aattgggtgct aatgggccgt gatgggccat 360

gtgggggtga tgtaaccgcc gggcccggtt gggcactcag atggtggccg ggcgccaggc 420

caaagtgtct tctgagtgc actttatgac ttgtttttc tcaaacaaca tcaattatgg 480

atgcacatcg tgtatata 498

<210> 2

<211> 404

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 2

atccccggtc cgcgtccgc ccacccatca cagcagccgc ggacgtgctg cgcgggagcg 60

gtccatctcg ccagccagcc aaccagccga gccgccccagc cgacccgaga gccccgagag 120

ccagactccc tcagccatag aagacaccgg gcgggagaga cggactgaaa aaatatatct 180

ttttttatct tttctgggcc tggagaccgc cagcaggagc ggaggtgggt gcggggcccg 240

gagccggagc aggaccggga acaggaacag gaacaggaac aggaacagga acaggagtgg 300

ggccgggagc aggagcagga gcgggagccg aagtgggggc aggagcggcg gcggccgcag 360

cagcaacagg gtcgccccag tccgcggcga ggaagaggga gctc 404

<210> 3

<211> 880

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 3

```

gggggagtcg ggggggtccca gttcggcgcg gtctccacag cgcacaaagt ccggctgcag      60
taaatttact gcgggtgcag ttacctggc ggccacaccg gcccgatggc gctgcagtaa      120
ctctactgca gctacagttt actacagttg cagtaccgcg cgccgccgcc aaatactaca      180
gtagatttcc tgtggccgcc gcgtactgca gtttaccgcg gctgcagtaa actgcagtat      240
cgcgcggtaa attgcagtcg ggcagccgcg cgttactgca attagcgggtg gctcccgaca      300

ctctggccaa ttggtgctaa tgggccgtga tgggtccatgt gggggtgatg taaccgccgg      360
gccccgttgg gcactcagat ggtggccggg cgccaggcca aagtgcgtgc tgagtccac      420
tttatgactt tgtttttctc aaacaacatc aattatggat gcacatcgtg tatataatcc      480
ccggtccgcg ctccgccac ccatcacagc agccgcggac gctgcgcgcc ggagcggtec      540
atctcgcag ccagccaacc agccgagccg cccagccgac ccgagagccc cgagagccag      600
actccctcag ccatagaaga caccgggcgg gagagacgga ctgaaaaaat atatcttttt      660
ttattttgtc tgggcctgga gaccgcgagc aggagcggag gtgggtgcgg ggccgggagc      720

cggagcagga ccgggaacag gaacaggaac aggaacagga acaggaacag gagtggggcc      780
gggagcagga gcaggagcgg gagccgaagt gggggcagga gcggcggcgg ccgcagcagc      840
aacagggtcg cccagtcg cggcgaggaa gagggagctc      880

```

<210> 4

<211> 902

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 4

```

gggggagtcg ggggggagtc gggggggagt cggggggtcc cagttcgcg cggctccac      60
agcgcacaaa gtccggtcgc agtaaattha ctgcgggtgc agttaccctg gcggccacac      120
cgccccgatg gcgtgcagt aactctactg cagctacagt ttactacagt tgcagtaccg      180

cgcgccgccg ccaatacta cagtagattt cctgtggccg ccgctactg cagtttaccg      240
cggctgcagt aaactgcagt atcgcgcggt aaattgcagt ctggcagccg cgcgttactg      300
caattagcgg tggctccga cactctggcc aattggtgct aatgggccgt gatggccat      360
gtgggggtga tgtaaccgcc gggcccggtt gggcactcag atggtggccg ggcgccaggc      420

```

caaagtgtctg tctgagtgcc actttatgac ttgttttttc tcaaacaaca tcaattatgg 480

atgcacatcg tgtatataat ccccggtccg cgctccgccc acccatcaca gcagccgcgg 540

acgctgcgcg ccggagcggg ccatctcgcc agccagccaa ccagccgagc cgcccagccg 600

acccgagagc cccgagagcc agactccctc agccatagaa gacaccgggc gggagagacg 660

gactgaaaaa atatatcttt ttttattttg tctgggcctg gagaccgca gcaggagcgg 720

aggtgggtgc ggggcccggg gccggagcag gaccgggaac aggaacagga acaggaacag 780

gaacaggaac aggagtgggg ccgggagcag gacgaggagc gggagccgaa gtgggggcag 840

gagcggcggc ggccgcagca gcaacagggt cgccccagtc cgcggcgagg aagagggagc 900

tc 902

<210> 5

<211> 1054

<212> DNA

<213> EQUINE HERPES VIRUS

<400> 5

gggctcggcg gcggggagcc tcggtgatgg gcagcaccag gggctcggcc tcggcgtcgg 60

gtccagcag cccacccgg cagaactcg tcagcagctc ggggatcaga agtccgagg 120

gtccacggc cccagcgccg cgccggccgc aggcgaggta cacggggcgc agccaggccc 180

cgagtcccca tcggttgccc gcgcggtggc tctgcgcggc gccctcctca aagtccgggt 240

cgtggaacc gaggcctcg gcctgggccc gcatgtcctt gcagccgtcg tagtcgggca 300

ggacgcgctg gcggtactcc ctccggagcca ggggaacgcg ggtgcgctcg ccggcgcgag 360

tgtccaccgt gtaggccacg ttggaggagc ggacacgcct caggggcgca gagtccgggt 420

acaggcgcgc gaacgcggcc tcggccctcg cgaacagtcc gggcccgaag aggtgtctgg 480

aggtgaggac gcgcggctg aggtggcgct cccggggcca gcgcacggcg caggcgaccc 540

gcggagttag ggccggccc atgtagatgt ggtactggct gatcgcgga ccgtcctggg 600

gccaatcctc ggtggagacc gcgtccagca ccaggagctt gcgcctggcg gagcccaggc 660

gcaggcagag gtactcgacg cagccggtga agccaggtc cccggtcgac agcagcagga 720

ccccctggg gttgaggcc gagacgtccg gggccccggg ccagttgccg gccaggcgt 780

gggaccgctt ggtgaggatg cggttcccca gggccgccag cagcgccgag agtccccct 840

tgaggtcggg ccagaggggc tcgcgccgag agccgccggg gcgggaggcc gggagtccgc 900

ccagcaggtc ctgctctgg agcggggagt agaggaccac caccttcacg tctcgggggt 960

cggggatctg gtgcatccag gcggccctcc gtctcagcgg gccgtggcc gccagctccc 1020

cgaagcgcg gccgtcccg gccgggggc cgct 1054

<210> 6

<211> 966

<212> DNA

<213> BOVINE HERPES VIRUS

<400> 6

gtccagtcg acgccgccc ggccgtgctg ctccaggaac gcgttggcct cggcaaagtg 60

cgtgcagtga acgaaggcg ctcgtgacag cggcgagggg tggctgtacg tcagcacgag 120

gtgccgttc ccggccgccc caaaggccc ctggcgctgc gcgcccaga gcatgaacac 180

cagcgggccc ctctccgcg tcaggcgggc cagtaccgag tgcaccagcc gccccagcc 240

caggctagag tgcgagccc gcgccccgt ccgcacggtg agcgaggtgt taagcagcag 300

cacgcgcgg cgccccagt cctctaggca gccgtgacac ggccgcggag ctccgggaaa 360

gttcttctgc acggcagcgt agatgttctg gaggtgggt gggaccgaa cgcgcggtt 420

cacgctaaaa gccaaagcgt gggcttgccc gcggctgtga taggggtcct ggcccagaat 480

gacaaccttg atgtcctcgg gtgccgcgta acgcgtccac gcgaagatgt ccgctttcgg 540

aggcagcact tgctcgacgc ggctccggcg ctcgtattcg cgcagcgcgt gtcgctgtga 600

gggcatggcc agctcgggtt ccagcacgcg ccgccaggct tcgtggacgc caaatcagc 660

ggcgaatgcc cccaagtaa tggcacgctg gtcttctagc gctgttacgc acgcgggaag 720

tccattgggg cgcggcgct tgggcggcg gcgacccgc aagcggggac aaagactttc 780

ggcgcgttt ggccgaagcc ggggcccgaag ccggggccga agccggggcc gaagccgggg 840

ccgaagccgg ggccgaagcc ggggcccgaag ccggggccgg ggccggggcc ggggcatcgc 900

tagcggtaga tgccgtcgcc agggccgcag ggaccagtgc tgtggtatcg gggcggcagg 960

acgcac 966

<210> 7

<211> 979

<212> DNA

<213> VARICELLA ZOSTER VIRUS

<400> 7

cggggagggtg gggtcgcttt tttttttctc tctcgagggg gccgcgagag ggctggcctc 60

ctctcccggtg gtccgccggg gcgccagaaa ccgggggggg gttattttcg ggggggggtc 120

cgaccagccc gccgtcgcc cgccgcaca gacagacaga cacttttttc ataaaaaccg 180

ttccgctttt attaacaaca aacagtccgc gcgccagtgg cgctcacgag aaaaggaggg 240

gactccgtca cccccgactc tgcggggggc tcctccccc gcgcctccc cacacatcgt 300

cctcgtcctc ggaggacgag gacgaggaca acagctccac cttagaccgc gggcgcaaac 360

ccaccggcg gtctcgagc acaccgggg ccaccgacac gatgtcacc ccaaaggatg 420

accccggtgc gtccccgtc tcccccccc cctcctcgt gtccacgcg tcttcacacc 480

ccacctccca atcgtccagc tccaaagcgt gttctctgtc gtctcggtg cgccgtgtc 540

gccccgcctg ggtttctgac ggccgttccg agccccctg gtgtccgaac acgaaccgtg 600

ttccgtcgt cccctccaac accgtctccg cgccccaaa accggggcgc cacattactc 660

tgggaatcgg ggggagggca ttccgagcct cgtccgccga cgcatacagc gccaccgacc 720

gaccggccac ggggtggaagc acgagtgggt ctgcggcagg gtcgggttcc agcagggcgt 780

ggcgcgaaaa caccctcgcc cagggtgggt cgtcgccggc ctccggcccg gcggcccccg 840

gtctcgtcc ctcggaagc aagacgggtc gaagcgccgc acccaggccc catcggtttg 900

ctgcgcggtg gctatgtgcc gcctcgtcca caaagtcggc tgccccgagc cccagacccc 960

gagactgtcg cgcgaggtc 979

<210> 8

<211> 1021

<212> DNA

<213> MACACINE HERPES-VIRUS 1

<400> 8

gagcgcggcg cgccaggcct cggggaagag cgggtggtcg gtcagctcgg cgacgacgcg 60

cgggcgcgag taggcctcga gggcggcggc ggaggcgcc ggcgtgtggc tgggccccgg 120

cggcacgcgg cgccagcccg cgcgggggtc gggcccgcg ggcgtcgcg ccgtcagcgc 180

ggcgggccgc gggcgcgggc ccggggccgg cggccccggg ggcggggcgg cgccgcgggg 240

ccggctcttc ttgcgcgccc gcgggcaggc ggcggcgcg gcggcgggc gcgccggcga 300

ggagctcttg cgttgcgcg ccggcgggcg cgcggcgccc cccgcgtctg cgtcgccag 360

cagggggcgc aggtcttggt tctggaagag caggtcggcg gcggcggcgc cggcgagcgc 420

cacctggcgc gggccgcgcg ccagcagcgg cgcggcgggc ccggcgacga ggctgacggc 480

gcgcacggcg gcgacggcgg cctcggcgcc gccggcgacg cggaggctcc cgcgcaggcg 540

catgagcacc agcgcgtcgc gcgtcgggcg cagctcgcgc agccagaggc gcggcgcgcg 600

cggcgcgcg gcggggccgc gcggcgggcg cacggcgcg gcggcccca gcccgggcac 660

ggcgccagg tcgccccgt agccctcggc cagcgcctcc agcacggcgc ggcaggccgt 720

gaggcactcg gcggcgcgcg cggcccggc gtcgtcgtcg tcgtcgtcct cgtcctcccc 780

cgcgccccg gcggggccgt cctccccggc gccggcgggg ccctcgtcgg agagggcggc 840

cgccaggcgg cgctgcgcgg cgatgacgcc cgcggcgccg taccgcgcgg gaacggcggg 900

gaccgcggcg gcgtcgggct cggggggcggc ggcgggcggcg gcggcggcgc ccgccgcggc 960

ggcgttctcg cgcgccagca ggggcgcgta cgcgcgccgc aggctggtga tgaggaagcc 1020

c 1021

<210> 9

<211> 232

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 9

atatactttt ttttatcttg tctgggcctg gagaccgca gcaggagcgg aggtgggtgc 60

ggggccggga gccggagcag gaccgggaac aggaacagga acaggaacag gaacaggaac 120

aggagtgggg ccgggagcag gaggaggagc gggagccgaa gtgggggcag gagcggcggc 180

ggccgcagca gcaacagggt cgccccagtc cgcggcgagg aagaggagc tc 232

<210> 10

<211> 14

<212> DNA

<213> UNKNOWN

<220><223> CTCF MOTIF

<400> 10

ccgcgaggag gcag 14

<210> 11

<211> 34

<212> DNA

<213> UNKNOWN

<220><223> ALTERNATIVE CTCF WITH UPSTREAM STABILIZER MOTIF

<400> 11

tggtgccctc tggtggtctt ctagaggaat tgca 34

<210> 12

<211> 16

<212> DNA

<213> UNKNOWN

<220><223>

> NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTOR Y (NF-Y) MOTIF

<400> 12

tcagccaatc agcgag 16

<210> 13

<211> 232

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 13

atatactttt ttttattttg tctgggcctg gagaccgca gcaggagcgg aggtgggtgc 60

ggggccggga gccggagcag gaccgggaac aggaacagga acaggaacag gaacaggaac 120

aggagtgggg ccgggagcag gacgaggagc gggagccgaa gtgggggcag gagcggcggc 180

ggccgcagca gcaacagggt cgccccagtc cgcggcgagg aagagggagc tc 232

<210> 14

<211> 246

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 14

atatactttt ttttattttg tctgggcctg gagaccgca gcaggagcgg aggtgggtgc 60

ggggccggga gccggagcag gaccgggaac aggaacagga acaggaacag gaacaggaac 120

aggagtgggg ccgggagcag gacgaggagc gggagccgaa gtgggggcag gagcggcggc 180

ggccgcagca gcaacagggt cgccccagtc cgcggcgagg aagagggagc tcccgcgagg 240

aggcag 246

<210> 15

<211> 266

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 15

atatactttt ttttattttg tctgggcctg gagaccgca gcaggagcgg aggtgggtgc 60

ggggccggga gccggagcag gaccgggaac aggaacagga acaggaacag gaacaggaac 120

aggagtgggg ccgggagcag gacgaggagc gggagccgaa gtgggggcag gagcggcggc 180

ggccgcagca gcaacagggt cgccccagtc cgcggcgagg aagagggagc tctggtgccc 240

tctggtggtc ttctagagga attgca 266

<210> 16

<211> 248
 <212> DNA
 <213> PSEUDORABIES VIRUS
 <400> 16
 tcagccaatc agcgagatat atcttttttt attttgtctg ggcttggaga cccgcagcag 60

 gagcggaggt ggggtgcgggg ccgggagccg gagcaggacc gggaacagga acaggaacag 120
 gaacaggaac aggaacagga gtggggcccg gagcaggagc aggagcggga gccgaagtgg 180
 gggcaggagc ggcgccggcc gcagcagcaa cagggtcgcc ccagtccgcg gcgaggaaga 240
 gggagctc 248
 <210> 17
 <211> 246
 <212> DNA
 <213> PSEUDORABIES VIRUS
 <400> 17
 ccgcgaggag gcagatatat ctttttttat ttgtctggg cctggagacc cgcagcagga 60
 gcggaggtgg gtgcggggcc gggagccgga gcaggaccgg gaacaggaac aggaacagga 120

 acaggaacag gaacaggagt ggggcccggga gcaggagcag gagcgggagc cgaagtgggg 180
 gcaggagcgg cgccggccgc agcagcaaca gggtcgcccc agtccgcggc gaggaagagg 240
 gagctc 246
 <210> 18
 <211> 266
 <212> DNA
 <213> PSEUDORABIES VIRUS
 <400> 18
 tggtgccctc tggtggtctt ctagaggaat tgcaatatat ctttttttat ttgtctggg 60
 cctggagacc cgcagcagga gcggaggtgg gtgcggggcc gggagccgga gcaggaccgg 120
 gaacaggaac aggaacagga acaggaacag gaacaggagt ggggcccggga gcaggagcag 180

 gagcgggagc cgaagtgggg gcaggagcgg cgccggccgc agcagcaaca gggtcgcccc 240
 agtccgcggc gaggaagagg gagctc 266
 <210> 19
 <211> 248
 <212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 19

atatactttt ttttattttg tctgggcctg gagaccgcga gcaggagcgg aggtgggtgc 60

ggggccggga gccggagcag gaccgggaac aggaacagga acaggaacag gaacaggaac 120

aggagtgggg ccgggagcag gagcaggagc gggagccgaa gtgggggcag gagcggcggc 180

ggccgcagca gcaacagggt cgccccagtc cgcggcgagg aagaggagc tctcagccaa 240

tcagcgag 248

<210> 20

<211> 236

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 20

aaaaatatat ctttttttat tttgtctggg cctggagacc cgcagcagga gcggaggtgg 60

gtgcggggcc gggagccgga gcaggaccgg gaacaggaac aggaacagga acaggaacag 120

gaacaggagt ggggccggga gcaggagcag gagcgggagc cgaagtgggg gcaggagcgg 180

cggcgccgc agcagcaaca gggtcgcccc agtcgcggc gaggaagagg gagctc 236

<210> 21

<211> 250

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 21

aaaaatatat ctttttttat tttgtctggg cctggagacc cgcagcagga gcggaggtgg 60

gtgcggggcc gggagccgga gcaggaccgg gaacaggaac aggaacagga acaggaacag 120

gaacaggagt ggggccggga gcaggagcag gagcgggagc cgaagtgggg gcaggagcgg 180

cggcgccgc agcagcaaca gggtcgcccc agtcgcggc gaggaagagg gagtccccgc 240

gaggaggcag 250

<210> 22

<211> 270

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 22

aaaaatatat ctttttttat tttgtctggg cctggagacc cgcagcagga gcggaggtgg 60

gtgcggggcc gggagccgga gcaggaccgg gaacaggaac aggaacagga acaggaacag 120

gaacaggagt ggggccggga gcaggagcag gagcgggagc cgaagtgggg gcaggagcgg 180

cggcgccgc agcagcaaca gggtcgcccc agtcgcggc gaggaagagg gagctctggt 240

gccctctggt ggctttctag aggaattgca 270

<210> 23

<211> 252

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 23

tcagccaatc agcgagaaaa atatctttt ttttatttg tctgggcctg gagaccgca 60

gcaggagcgg aggtgggtgc ggggccggga gccggagcag gaccgggaac aggaacagga 120

acaggaacag gaacaggaac aggagtgggg ccgggagcag gagcaggagc gggagccgaa 180

gtgggggcag gagcggcggc ggccgcagca gcaacagggt cgtccagtc cgcggcgagg 240

aagagggagc tc 252

<210> 24

<211> 250

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 24

ccgcgaggag gcagaaaaat atatctttt ttattttgtc tgggcctgga gacccgcagc 60

aggagcggag gtgggtgcgg ggccgggagc cggagcagga ccgggaacag gaacaggaac 120

aggaacagga acaggaacag gagtggggcc gggagcagga gcaggagcgg gagccgaagt 180

gggggcagga gcggcgcgcg ccgcagcagc aacagggtcg cccagtcg cggcgaggaa 240

gaggagctc 250

<210> 25

<211> 270

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 25

tgggtgccctc tgggtgtctt ctagaggaat tgcaaaaaat atatctttt ttattttgtc 60

tgggcctgga gacccgcagc aggagcggag gtgggtgcgg ggccgggagc cggagcagga 120

ccgggaacag gaacaggaac aggaacagga acaggaacag gagtggggcc gggagcagga 180

gcaggagcgg gagccgaagt gggggcagga gcggcggcgg ccgcagcagc aacagggtcg	240
ccccagtccg cggcgaggaa gagggagctc	270
<210> 26	
<211> 252	
<212> DNA	
<213> PSEUDORABIES VIRUS	
<400> 26	
aaaaatatat ctttttttat tttgtctggg cctggagacc cgcagcagga gcggaggtgg	60
gtgcggggcc gggagccgga gcaggaccgg gaacaggaac aggaacagga acaggaacag	120
gaacaggagt ggggccggga gcaggagcag gagcgggagc cgaagtgggg gcaggagcgg	180
cggcgccgc agcagcaaca gggtcgcccc agtccgcggc gaggaagagg gagctctcag	240
ccaatcagcg ag	252
<210> 27	
<211> 329	
<212> DNA	
<213> PSEUDORABIES VIRUS	
<400> 27	
cagccaacca gccgagccgc ccagccgacc cgagagcccc gagagccaga ctccctcagc	60
catagaagac accgggcggg agagacggac tgaaaaata tatctttttt tattttgtct	120
gggcctggag accgcagca ggagcggagg tgggtgcggg gccgggagcc ggagcaggac	180
cgggaacagg aacaggaaca ggaacaggaa caggaacagg agtggggccg ggagcaggag	240
caggagcggg agccgaagtg ggggcaggag cggcggcggc cgcagcagca acagggtcgc	300
cccagtccgc ggcgaggaag agggagctc	329
<210> 28	
<211> 383	
<212> DNA	
<213> PSEUDORABIES VIRUS	
<400> 28	
cacccatcac agcagccgcg gacgtgcgc gccggagcgg tccatctcgc cagccagcca	60
accagccgag ccgccagcc gaccgagag ccccagagc cagactccct cagccataga	120
agacaccggg cgggagagac ggactgaaaa aatatactt tttttatctt gtctggcct	180
ggagaccgc agcaggagcg gaggtgggtg cggggccggg agccggagca ggaccgggaa	240

caggaacagg aacaggaaca ggaacaggaa caggagtggg gccgggagca ggagcaggag	300
cgggagccga agtgggggca ggagcggcgg cggccgcagc agcaacaggg tcgccccagt	360
ccgcggcgag gaagaggag ctc	383
<210> 29	
<211> 397	
<212> DNA	
<213> PSEUDORABIES VIRUS	
<400> 29	
cacccatcac agcagcccg gacgtgctgc gccggagcgg tccatctcgc cagccagcca	60
accagccgag ccgcccagcc gaccgagag ccccgagagc cagactccct cagccataga	120
agacaccggg cgggagagac ggactgaaaa aatatactt tttttatctt gtctgggcct	180
ggagaccgc agcaggagcg gaggtgggtg cggggccggg agccggagca ggaccgggaa	240
caggaacagg aacaggaaca ggaacaggaa caggagtggg gccgggagca ggagcaggag	300
cgggagccga agtgggggca ggagcggcgg cggccgcagc agcaacaggg tcgccccagt	360
ccgcggcgag gaagaggag ctcccgcgag gaggcag	397
<210> 30	
<211> 417	
<212> DNA	
<213> PSEUDORABIES VIRUS	
<400> 30	
cacccatcac agcagcccg gacgtgctgc gccggagcgg tccatctcgc cagccagcca	60
accagccgag ccgcccagcc gaccgagag ccccgagagc cagactccct cagccataga	120
agacaccggg cgggagagac ggactgaaaa aatatactt tttttatctt gtctgggcct	180
ggagaccgc agcaggagcg gaggtgggtg cggggccggg agccggagca ggaccgggaa	240
caggaacagg aacaggaaca ggaacaggaa caggagtggg gccgggagca ggagcaggag	300
cgggagccga agtgggggca ggagcggcgg cggccgcagc agcaacaggg tcgccccagt	360
ccgcggcgag gaagaggag ctctggtgcc ctctggtggt cttctagagg aattgca	417
<210> 31	
<211> 399	
<212> DNA	
<213> PSEUDORABIES VIRUS	
<400> 31	

tcagccaatc agcgagcacc catcacagca gccgcggacg ctgcgcgccg gagcgggtcca 60

tctcgccagc cagccaacca gccgagccgc ccagccgacc cgagagcccc gagagccaga 120

ctccctcagc catagaagac accgggcggg agagacggac tgaaaaaata tatctttttt 180

tattttgtct gggcctggag acccgagca ggagcggagg tgggtgcggg gccgggagcc 240

ggagcaggac cggaacagg aacaggaaca ggaacaggaa caggaacagg agtggggccg 300

ggagcaggag caggagcggg agccaagtg ggggcaggag cggcggcgcc cgcagcagca 360

acagggtcgc ccagtcgcg ggcgaggaag agggagctc 399

<210> 32

<211> 397

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 32

ccgcgaggag gcagcaccca tcacagcagc cgcggacgct gcgcgccgga gcggtccatc 60

tcgccagcca gcccaaccagc cgagccgccc agccgacccg agagccccga gagccagact 120

ccctcagcca tagaagacac cgggcgggag agacggactg aaaaaatata tcttttttta 180

ttttgtctgg gcctggagac ccgcagcagg agcggaggtg ggtgcggggc cgggagccgg 240

agcaggaccg ggaacaggaa caggaacagg aacaggaaca ggaacaggag tggggccggg 300

agcaggagca ggagcgggag ccgaagtggg ggcaggagcg gcggcggccg cagcagcaac 360

agggtcgccc cagtcgcgcg cgaggaagag ggagctc 397

<210> 33

<211> 417

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 33

tggtgccctc tggtggtctt ctagaggaat tgcacacca tcacagcagc cgcggacgct 60

gcgcgccgga gcggtccatc tcgccagcca gcccaaccagc cgagccgccc agccgacccg 120

agagccccga gagccagact ccctcagcca tagaagacac cgggcgggag agacggactg 180

aaaaaatata tcttttttta ttttgtctgg gcctggagac ccgcagcagg agcggaggtg 240

ggtgcggggc cgggagccgg agcaggaccg ggaacaggaa caggaacagg aacaggaaca 300

ggaacaggag tggggccggg agcaggagca ggagcgggag ccgaagtggg ggcaggagcg 360

gcggcggccg cagcagcaac agggtcgccc cagtcgcgcg cgaggaagag ggagctc 417

<210> 34

<211> 399

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 34

cacccatcac agcagccgcg gacgtgctgc gccggagcgg tccatctcgc cagccagcca	60
accagccgag ccgcccagcc gaccgagag ccccgagagc cagactccct cagccataga	120
agacaccggg cgggagagac ggactgaaaa aatatacttt tttttatttt gtctgggcct	180
ggagaccgcg agcaggagcg gaggtgggtg cggggccggg agccggagca ggaccgggaa	240
caggaacagg aacaggaaca ggaacaggaa caggagtggg gccgggagca ggagcaggag	300
cgggagccga agtgggggca ggagcggcgg cggccgcagc agcaacaggg tcgccccagt	360
ccgcggcgag gaagaggag ctctcagcca atcagcgag	399

<210> 35

<211> 386

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 35

gcccacccat cacagcagcc gcggacgtg cgcgccggag cgggccatct cgccagccag	60
ccaaccagcc gagccgcccc gccgaccga gagccccgag agccagactc cctcagccat	120
agaagacacc gggcgggaga gacggactga aaaaatatat ctttttttat tttgtctggg	180
cctggagacc cgcagcagga gcggaggttg gtgcggggcc gggagccgga gcaggaccgg	240
gaacaggaac aggaacagga acaggaacag gaacaggagt ggggccggga gcaggagcag	300
gagcgggagc cgaagtgggg gcaggagcgg cggcggccgc agcagcaaca gggtcgcccc	360

agtccgcggc gaggaagagg gagctc	386
------------------------------	-----

<210> 36

<211> 387

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 36

cgcacacca tcacagcagc cgcggacgtt gcgcgccgga gcggtccatc tcgccagcca	60
gccaaccagc cgagccgccc agccgaccgg agagccccga gagccagact ccctcagcca	120
tagaagacac cgggcgggag agacggactg aaaaaatata tcttttttta ttttgtctgg	180
gcctggagac ccgcagcagg agcggagggtg ggtgcggggc cgggagccgg agcaggaccg	240

ggaacaggaa caggaacagg aacaggaaca ggaacaggag tggggccggg agcaggagca 300

ggagcgggag ccgaagtggg ggcaggagcg gcggcgcccg cagcagcaac agggtcgccc 360

cagtccgagg cgaggaagag ggagctc 387

<210> 37

<211> 388

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 37

ccgcccaccc atcacagcag ccgcgagcgc tgcgcgccgg agcgggccat ctgccagcc 60

agccaaccag ccgagccgcc cagccgaccc gagagcccg agagccagac tccctcagcc 120

atagaagaca ccgggcggga gagacggact gaaaaaatat atcttttttt attttgtctg 180

ggcctggaga cccgcagcag gagcggaggt ggggtgcggg ccgggagccg gagcaggacc 240

gggaacagga acaggaacag gaacaggaac aggaacagga gtggggccgg gagcaggagc 300

aggagcggga gccgaagtgg ggcaggagc ggcgccggcc gcagcagcaa cagggtcgcc 360

ccagtccgcg gcgaggaaga gggagctc 388

<210> 38

<211> 391

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 38

gctccgccc cccatcacag cagcccgga cgtgcgcgc cggagcggtc catctcgcca 60

gccagccaac cagccgagcc gccagccga cccgagagcc ccgagagcca gactccctca 120

gccatagaag acaccgggag ggagagacgg actgaaaaaa tatacttttt tttatattgt 180

ctgggcctgg agaccgcag caggagcgga ggtgggtgcg gggccgggag ccggagcagg 240

accgggaaca ggaacaggaa caggaacagg aacaggaaca ggagtgggag cgggagcagg 300

agcaggagcg ggagccgaag tgggggcagg agcggcgccg gccgcagcag caacagggtc 360

gccccagtcc gcggcgagga agaggagct c 391

<210> 39

<211> 358

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 39

tgcgcgccgg agcgggtccat ctgccagcc agccaaccag ccgagccgcc cagccgaccc	60
gagagccccc agagccagac tccctcagcc atagaagaca ccgggcggga gagacggact	120
gaaaaaatat atcttttttt attttgtctg ggcttgaga cccgcagcag gagcggaggt	180
gggtgcgggg ccgggagccg gagcaggacc gggaacagga acaggaacag gaacaggaac	240
aggaacagga gtggggccgg gagcaggagc aggagcggga gccgaagtgg gggcaggagc	300
ggcggcgccc gcagcagcaa cagggtcgcc ccagtccgcg gcgaggaaga gggagctc	358
<210> 40	
<211> 372	
<212> DNA	
<213> PSEUDORABIES VIRUS	
<400> 40	
tgcgcgccgg agcgggtccat ctgccagcc agccaaccag ccgagccgcc cagccgaccc	60
gagagccccc agagccagac tccctcagcc atagaagaca ccgggcggga gagacggact	120
gaaaaaatat atcttttttt attttgtctg ggcttgaga cccgcagcag gagcggaggt	180
gggtgcgggg ccgggagccg gagcaggacc gggaacagga acaggaacag gaacaggaac	240
aggaacagga gtggggccgg gagcaggagc aggagcggga gccgaagtgg gggcaggagc	300
ggcggcgccc gcagcagcaa cagggtcgcc ccagtccgcg gcgaggaaga gggagctccc	360
gcgaggaggc ag	372
<210> 41	
<211> 392	
<212> DNA	
<213> PSEUDORABIES VIRUS	
<400> 41	
tgcgcgccgg agcgggtccat ctgccagcc agccaaccag ccgagccgcc cagccgaccc	60
gagagccccc agagccagac tccctcagcc atagaagaca ccgggcggga gagacggact	120
gaaaaaatat atcttttttt attttgtctg ggcttgaga cccgcagcag gagcggaggt	180
gggtgcgggg ccgggagccg gagcaggacc gggaacagga acaggaacag gaacaggaac	240
aggaacagga gtggggccgg gagcaggagc aggagcggga gccgaagtgg gggcaggagc	300
ggcggcgccc gcagcagcaa cagggtcgcc ccagtccgcg gcgaggaaga gggagctctg	360
gtgccctctg gtgtcttct agaggaattg ca	392
<210> 42	
<211> 374	

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 42

tcagccaatc agcgagtgcg cgccggagcg gtccatctcg ccagccagcc aaccagccga	60
gccgcccagc cgacccgaga gccccgagag ccagactccc tcagccatag aagacaccgg	120
gcgggagaga cggactgaaa aaatatatct tttttatitt tgtctgggcc tggagaccgc	180
cagcaggagc ggaggtgggt gcggggccgg gagccggagc aggaccggga acaggaacag	240
gaacaggaac aggaacagga acaggagtgg ggccgggagc aggagcagga gcgggagccg	300
aagtgggggc aggagcggcg gcggccgcag cagcaacagg gtcgccccag tccgcggcga	360
ggaagaggga gctc	374

<210> 43

<211> 372

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 43

ccgcgaggag gcagtgcgcg ccggagcggc ccatctcgcc agccagccaa ccagccgagc	60
cgcccagccg acccgagagc cccgagagcc agactccctc agccatagaa gacaccgggc	120
gggagagacg gactgaaaaa atatatcttt ttttattttg tctgggcctg gagaccgca	180
gcaggagcgg aggtgggtgc ggggccggga gccggagcag gaccgggaac aggaacagga	240
acaggaacag gaacaggaac aggagtgggg ccgggagcag gagcaggagc gggagccgaa	300
gtgggggcag gagcggcgcc gcccgagca gcaacagggt cgccccagtc cgcggcgagg	360
aagagggagc tc	372

<210> 44

<211> 392

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 44

tggtgccctc tggtggtctt ctagaggaat tgcattgcgc cgaggcggc ccatctcgcc	60
agccagccaa ccagccgagc cgcccagccg acccgagagc cccgagagcc agactccctc	120
agccatagaa gacaccgggc gggagagacg gactgaaaaa atatatcttt ttttattttg	180
tctgggcctg gagaccgca gcaggagcgg aggtgggtgc ggggccggga gccggagcag	240

gaccgggaac aggaacagga acaggaacag gaacaggaac aggagtgggg cggggagcag 300

gagcaggagc gggagccgaa gtgggggcag gagcggcggc ggccgcagca gcaacagggt 360

cgccccagtc cgcggcgagg aagaggagc tc 392

<210> 45

<211> 374

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 45

tgcgcccg agcggtccat ctgccagcc agccaaccag ccgagccgc cagccgaccc 60

gagagcccc agagccagac tccctcagcc atagaagaca ccgggcggga gagacggact 120

gaaaaatat atctttttt atttgtctg ggcttgaga ccgcagcag gagcggaggt 180

gggtgcggg ccgggagccg gagcaggacc gggaacagga acaggaacag gaacaggaac 240

aggaacagga gtggggccgg gagcaggagc aggagcggga gccgaagtgg gggcaggagc 300

ggcgccggcc gcagcagca cagggtcgcc ccagtcgcg gcgaggaaga gggagctctc 360

agccaatcag cgag 374

<210> 46

<211> 255

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 46

ggcgggagag acggactgaa aaaatatatc tttttttatt ttgtctgggc ctggagaccc 60

gcagcaggag cggaggtggg tgcggggccg ggagccggag caggaccggg aacaggaaca 120

ggaacaggaa caggaacagg aacaggagtg gggccgggag caggagcagg agcgggagcc 180

gaagtggggg caggagcggc ggcggccgca gcagcaacag ggtcgcccca gtccgcggcg 240

aggaagaggg agctc 255

<210> 47

<211> 257

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 47

cgggcgggag agacggactg aaaaaatata tcttttttta tttgtctgg gcctggagac 60

ccgcagcagg agcggaggtg ggtgcggggc cgggagccgg agcaggaccg ggaacaggaa 120

caggaacagg aacaggaaca ggaacaggag tggggccggg agcaggagca ggagcgggag	180
ccgaagtggg ggcaggagcg gcggcggccg cagcagcaac agggtcgccc cagtccgcgg	240
cgaggaagag ggagctc	257
<210> 48	
<211> 268	
<212> DNA	
<213> PSEUDORABIES VIRUS	
<400> 48	
atagaagaca cgggcccggg gagacggact gaaaaatat atcttttttt attttgtctg	60
ggcctggaga cccgcagcag ggcggagggt ggggtgcgggg ccgggagccg gagcaggacc	120
gggaacagga acaggaacag gaacaggaac aggaacagga gtggggcccg gagcaggagc	180
aggagcggga gccgaagtgg gggcaggagc gcgggcggcc gcagcagcaa cagggtcgcc	240
ccagtccgcg gcgaggaaga gggagctc	268
<210> 49	
<211> 313	
<212> DNA	
<213> PSEUDORABIES VIRUS	
<400> 49	
ccgccagcc gacccgagag ccccgagagc cagactccct cagccataga agacaccggg	60
cgggagagac ggactgaaaa aatatatctt tttttatctt gtctgggcct ggagaccgc	120
agcaggagcg gaggtgggtg cggggccggg agccggagca ggaccgggaa caggaacagg	180
aacaggaaca ggaacaggaa caggagtggg gccgggagca ggagcaggag cgggagccga	240
agtgggggca ggagcggcg gcggccgagc agcaacaggg tcgccccagt ccgcggcgag	300
gaagagggag ctc	313
<210> 50	
<211> 339	
<212> DNA	
<213> PSEUDORABIES VIRUS	
<400> 50	
tctcgccagc cagccaacca gccgagccgc ccagccgacc cgagagcccc gagagccaga	60
ctccctcagc catagaagac accggcggg agagacggac tgaaaaata tatctttttt	120
tatctgtct gggcctggag accgcagca ggagcggagg tgggtgcggg gccgggagcc	180

ggagcaggac cgggaacagg aacaggaaca ggaacaggaa caggaacagg agtggggccg 240
 ggagcaggag caggagcggg agccgaagtg ggggcaggag cggcggcggc cgcagcagca 300
 acagggtcgc cccagtccgc ggcgaggaag agggagctc 339

<210> 51

<211> 359

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 51

ctgcgcgccg gagcgggtcca tctcggcagc cagccaacca gccgagccgc ccagccgacc 60
 cgagagcccc gagagccaga ctccctcagc catagaagac accgggcggg agagacggac 120
 tgaaaaaata tatctttttt tattttgtct gggcctggag accccgagca ggagcggagg 180
 tgggtgcggg gccgggagcc ggagcaggac cgggaacagg aacaggaaca ggaacaggaa 240
 caggaacagg agtggggccg ggagcaggag caggagcggg agccgaagtg ggggcaggag 300
 cggcggcggc cgcagcagca acagggtcgc cccagtccgc ggcgaggaag agggagctc 359

<210> 52

<211> 364

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 52

ggacgtcgc gcgcggagcg gtccatctcg ccagccagcc aaccagccga gccgcccagc 60
 cgaccgaga gccccgagag ccagactccc tcagccatag aagacaccgg gcgggagaga 120
 cggactgaaa aaatatactt ttttttattt tgtctgggcc tggagaccg cagcaggagc 180
 ggaggtgggt gcggggcccg gagccggagc aggaccggga acaggaacag gaacaggaac 240
 aggaacagga acaggagtgg ggccgggagc aggagcagga gcgggagccg aagtgggggc 300
 aggagcggcg gcggccgcag cagcaacagg gtgcgccag tccgcggcga ggaagaggga 360

gctc 364

<210> 53

<211> 368

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 53

ccgcggagcg tgcgcgccg agcgtccat ctcgcagcc agccaaccag ccgagccgcc 60

cagccgaccc gagagccccg agagccagac tccctcagcc atagaagaca ccgggcggga 120

gagacggact gaaaaaatat atcttttttt attttgtctg ggccctggaga cccgagcag 180

gagcggaggt ggggtgcgggg ccgggagccg gagcaggacc gggaacagga acaggaacag 240

gaacaggaac aggaacagga gtggggcccg gagcaggagc aggagcggga gccgaagtgg 300

gggcaggagc ggcgccggcc gcagcagcaa cagggtcgcc ccagtcccg gcgaggaaga 360

gggagctc 368

<210> 54

<211> 376

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 54

cacagcagcc gcggacgctg cgcccgagc cgggtccatct cgccagccag ccaaccagcc 60

gagccgcccc gccgaccga gagccccgag agccagactc cctcagccat agaagacacc 120

gggcggggaga gacggactga aaaaatataat ctttttttat tttgtctggg cctggagacc 180

cgagcagga gcggaggtgg gtgcggggcc ggagccgga gcaggaccgg gaacaggaac 240

aggaacagga acaggaacag gaacaggagt ggggcccggga gcaggagcag gagcgggagc 300

cgaagtgggg gcaggagcgg cgccggccgc agcagcaaca gggtcgcccc agtcgcggc 360

gaggaagagg gagctc 376

<210> 55

<211> 384

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 55

ccaccatca cagcagccgc ggacgtgctg cgccggagcg gtccatctcg ccagccagcc 60

aaccagccga gccgcccagc cgaccgaga gccccgagag ccagactccc tcagccatag 120

aagacaccgg gcgggagaga cgactgaaa aaatataatct ttttttatit tgtctgggcc 180

tggagacccg cagcaggagc ggaggtgggt gcggggccgg gagccggagc aggaccggga 240

acaggaacag gaacaggaac aggaacagga acaggagtgg ggccgggagc aggagcagga 300

gcgggagccg aagtgggggc aggagcggcg gcggccgcag cagcaacagg gtcgccccag 360

tccgcggcga ggaagaggga gctc 384

<210> 56

<211> 385

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 56

cccacccatc acagcagccg cggacgctgc gcgccggagc ggtccatctc gccagccagc	60
caaccagccg agccgcccag ccgacccgag agccccgaga gccagactcc ctcagccata	120
gaagacaccg ggcgggagag acggactgaa aaaatatatc tttttttatt ttgtctgggc	180
ctggagaccc gcagcaggag cggaggtggg tgcggggccg ggagccggag caggaccggg	240
aacaggaaca ggaacaggaa caggaaacagg aacaggagtg gggccgggag caggagcagg	300
agcgggagcc gaagtggggg caggagcggc ggcggccgca gcagcaacag ggtcgcccca	360
gtccgcggcg aggaagaggg agctc	385

<210> 57

<211> 390

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 57

ctccgccac ccatcacagc agccgcggac gctgcgcgcc ggagcgggcc atctcgccag	60
ccagccaacc agccgagccg cccagccgac ccgagagccc cgagagccag actccctcag	120
ccatagaaga caccgggcgg gagagacgga ctgaaaaaat atatcttttt ttattttgtc	180
tgggcctgga gaccgcagc aggagcggag gtgggtgcgg ggccgggagc cggagcagga	240
ccgggaacag gaacaggaa acaggaaacag acaggaaacag gaggggggcc gggagcagga	300
gcaggagcgg gaggccgaagt gggggcagga gcggcgccgg ccgcagcagc aacagggtcg	360
ccccagtcg cgccgaggaa gagggagctc	390

<210> 58

<211> 396

<212> DNA

<213> PSEUDORABIES VIRUS

<400> 58

tccgcgctcc gccacccat cacagcagcc gcggacgctg cgcgccggag cgggtccatct	60
cgccagccag ccaaccagcc gagccgcca gccgaccga gagccccgag agccagactc	120
cctcagccat agaagacacc gggcgggaga gacggactga aaaaatatat ctttttttat	180
tttgtctggg cctggagacc cgcagcagga gcggaggtgg gtgcggggcc gggagccgga	240
gcaggaccgg gaacaggaa acaggaaacag acaggaaacag gaacaggagt ggggcccggga	300

gcaggagcag gagcgggagc cgaagtgggg gcaggagcgg cggcggccgc agcagcaaca 360
gggtcgcccc agtccgcggc gaggaagagg gagctc 396

<210> 59
<211> 30
<212> DNA
<213> ARTIFICIAL SEQUENCE
<220><223> LAP1 FORWARD PRIMER
<400> 59
gcacgcgtat ctccggaag aggaaattga 30
<210> 60
<211> 33
<212> DNA
<213> ARTIFICIAL SEQUENCE
<220><223> LAP1 REVERSE PRIMER
<400> 60
gcggatccta tatacacgat gtgcatccat aat 33
<210> 61
<211> 35
<212> DNA
<213> ARTIFICIAL SEQUENCE
<220><223> LAP2 FORWARD PRIMER
<400> 61
gcacgcgtat ccccggtccg cgctccgcc accca 35
<210> 62
<211> 36
<212> DNA
<213> ARTIFICIAL SEQUENCE
<220><223> LAP2 REVERSE PRIMER
<400> 62
gcggatccga gctccctctt cctcgccgcg gactgg 36