(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
C12N 15/12
C12Q 1/68
A61K 48/00
C12N 15/63

(11) 공개번호 10-2005-0009724
(43) 공개일자 2005년01월25일

(21) 출원번호 10-2004-7019340
(22) 출원일자 2004년11월29일
번역문 제출일자 2004년11월29일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/016741
(87) 국제공개번호 WO 2003/102135
(86) 국제출원출원일자 2003년05월28일
(87) 국제공개일자 2003년12월11일

(30) 우선권주장 60/384,108 2002년05월31일 미국(US)

(71) 출원인 쉐링 악티엔게젤샤프트
독일 베를린 뮬레르스트라쎄 178 (우편번호 : 데-13353)

(72) 발명자 팬,준리앙
미국 94530 캘리포니아주 엘 세리토 브루스터 드라이브 1220

우,퀑유
미국 94549-2844 캘리포니아주 라파예트 카미노 발레시토 1153

(74) 대리인 장수길
김영

심사청구 : 없음

(54) 인간 코린 유전자의 조절 서열

요약

본 발명은 포유동물 코린 유전자에서 단리된 신규 발현조절 영역을 제공한다. 이 조절 영역은 심장 세포에서의 전사를 우선적으로 활성화한다. 코린 발현을 조절할 수 있는 작용제의 확인 및 심장 질환의 치료에 조절 영역을 사용하는 방법 및 조성물도 제공된다.

색인어

코린 유전자, 조절 서열, 조절 영역, 발현조절 영역, 심장 질환.

명세서

본 출원은 2002년 5월 31일에 출원된 미국 가출원 제60/384,108호의 이점을 청구하며, 이 출원은 언급함으로써 그 전체가 여기에 도입된다.

기술분야

본 발명은 포유동물 코린 유전자에서 단리된 신규 발현조절 영역을 제공한다. 이 조절 영역은 심장 세포에서의 전사를 우선적으로 활성화한다. 코린 발현을 조절할 수 있는 작용제의 확인 및 심장 질환의 치료에 조절 영역을 사용하는 방법 및 조성물도 제공된다.

배경기술

심장 막횡단 (transmembrane) 세린 프로테아제인 코린은 심방 나트륨이뇨 프로펩티드 (프로-ANP)를 심방 나트륨이뇨 펩티드 (ANP)로 전환하는 데에 중요한 역할을 한다 (Yan, W. et al. (2000) PNAS, 97:8525-8529, Wu et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:16900-16905). ANP는 염 배설을 촉진하고 오줌 양을 증가시키고 혈액량을 감소시키고 혈관 장력을 수용체 의존적 방식으로 이완시켜서, 고혈압을 낮추는 심장 호르몬이다. ANP는 고혈압 및 심부전증과 같은 주요 심장혈관 질병에 관련된다 (Burnett, J. C.et al. (1986) Science, 231:1145-1147). 녹아웃 마우스 에서 ANP 또는 그의 수용체가 결핍되면 자발 고혈압이 유발된다 (John, S. W. et al. (1995) Science 267:679-681, John, S. W. et al.(1996) Am. J. Physiol. 271, R109-R114, Lopez et al. (1995) Nature 378:65-68). 프로-ANP를 ANP로 전환하는 활성화 단계가 이 심장 호르몬의 조절에 있어 중요한 것으로 인식된다.

코린은 곱슬형 (frizzled-like) 시스테인 풍부 모티프 2 개, LDL 수용체 반복부 8 개, 대식세포 스캐벤저 수용체형 도메인, 및 세포외 영역에서 트립신형 프로테아제 도메인을 포함하는 II형 막횡단 단백질의 예상 구조를 갖는다 (Yan et al. (1999) J. Biol Chem. 274:14926-14935). 코린의 전체적인 형태 (topology)는 헵신, 엔테로키나제, MT-SP1/마트립타제, 인간 기도 트립신형 프로테아제, TMPRSS2, TMPRSS3/TADG-12, TMPRSS4, MSPL, 및 스투블-스투블로이드 (Stubble-stubbloid)를 포함하는 다른 II형 막횡단 세린 프로테아제의 형태와 유사하다. 이들 유사한 형태는 물론이고 독특한 모듈 구조는 이들 단백질이 조상의 엑손의 복제 및 재배열에 의해 진화된 하나의 유전자족을 구성함을 암시한다.

인간 유전자는 > 200 kb에 이르며, 22 개의 엑손을 포함한다. 인트론/엑손 경계는 종들간에 잘 보존되어, 대부분의 엑손이 구조 도메인을 코딩한다. 코린 단백질을 코딩하는 마우스 및 인간 cDNA의 클로닝은 이미 보고되어 있다 (Yan et al. 같은 문헌). 노던 분석은 코린 mRNA가 사람의 심장에서 고도로 발현됨을 보여주었다. 인간 코린 유전자는 형광 원위치(in situ) 혼성화 분석을 통해서, 선천성 심장병 유전자자리 (locus)인 전폐정맥환류이상 (total anomalous pulmonary venous return)이 먼저 위치해 있던 염색체 4의 쇼트 암 (short arm) (4p12-13)에 지도화 되었다.

발명의 요약

본 발명은 프로모터 및 그외 조절 요소를 포함하는 포유동물 코린 유전자의 발현조절 영역의 단리, 클로닝 및 확인, 및 코린 유전자 발현을 조절하는 새로운 작용제를 밝혀내고 심장병을 치료하는 데 있어서의 이 심장 특이적 발현조절 영역의 용도에 관한 것이다.

이런 결과를 위하여, 본 발명의 목적은 인간 코린 유전자를 포함하나 이에 한정되지 않는 모든 이종 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결(operably linked)되어 상기 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 조절하는 코린 발현조절 영역을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

코린 발현조절 영역은 이종 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결되어 이종 폴리뉴클레오티드의 심장-특이적 전사를 유도하며, GATA, Tbx-5, NKx2.5, 크뤼펠형 (Krueppel-like) 전사 요소, 또는 NF-AT 결합 부위로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 전사 조절 요소를 포함하며, GATA-4 등의 결합 전사 단백질과 결합할 수 있다.

본 발명의 다른 목적은 인간 코린 발현조절 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다. 본 발명의 바람직한 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 -4037 내지 -15 (서열 6), 더 바람직한 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 -1297 내지 -15 (서열 5), 더욱더 바람직한 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 -405 내지 -15 (서열 4)에 위치하며, 여기서 번호는 도 8a 내지 8b (서열 2)에 나타낸 바와 같이 인간 코린 유전자 또는 이의 상보적 가닥의 번역개시 부위 (ATG)를 기준으로 한 것이다.

본 발명의 이 측면에 따르면, 이들 폴리뉴클레오티드의 단편 및 변이체도 제공된다.

본 발명의 또다른 목적은, 코린 발현조절 영역 또는 이의 단편이나 변이체를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다. 또다른 구체예에서는 또한, 이 벡터가 코린 발현조절 영역에 작동가능하게 연결된 이종 폴리뉴클레오티드, 예를 들면 코린을 포함한다. 본 발명의 이 측면에 따르면, 그러한 벡터로 형질감염된 숙주세포 및 그러한 이종 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 생성물을 발현시키는 방법도 제공된다.

본 발명의 다른 목적은 이종 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 코린 발현조절 영역을 포함하는 벡터 또는 그

러한 벡터로 형질감염된 숙주세포를 제약상 허용되는 담체 중에 포함하는 제약 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은,

(a) 포유동물 코린 발현조절 영역을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드가 리포터 유전자에 작동가능하게 연결되어 있는 재조합 벡터를 제조하고,

(b) 이 재조합 벡터로 세포를 형질감염시키고,

(c) 이 세포를 세포내에서 인간 코린 유전자의 발현을 조절할 수 있는 작용제로 처리하고,

(d) 처리된 세포에서 리포터 서열의 전사 수준을 측정하고,

(e) 상기 작용제의 존재하에 리포터 서열의 발현 수준과 상기 작용제로 처리하지 않은 형질감염된 대조구 세포에서의 발현 수준을 비교하는 것을 포함하는,

세포내에서 인간 코린 유전자의 발현을 조절할 수 있는 작용제를 확인하는 방법을 제공한다.

바람직한 구체예에서는 심장근육세포가 사용된다.

본 발명의 또다른 목적은

(a) 포유동물 코린 발현조절 영역을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 이종 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결시킨 재조합 벡터를 제조하고,

(b) 이 벡터를 치료상 유효량으로 사람 환자에게 투여하는 것을 포함하는,

사람 환자에게서 유전자의 심장-특이적 발현을 조절하는 방법을 제공한다.

본 발명의 이 측면의 바람직한 구체예는 이종 폴리뉴클레오티드가 코린을 코딩하는 벡터이다. 또한, 코린 발현조절 영역이 서열 4, 서열 5 또는 서열 6의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드로부터 선택된 것인 구체예가 바람직하다.

본 발명의 또다른 목적은 코린, 심방 나트륨이뇨 펩티드 (ANP), B-타입 나트륨이뇨 펩티드, 포스포놀람반, 안지오텐신 전환효소 (ACE), 또는 이들 유전자의 우성 음성 형태로 이루어진 군에서 선택된 유전자에 작동가능하게 연결된 코린 발현조절 영역을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드의 치료상 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 사람 환자에게서 울혈심부전증, 고혈압 또는 심근경색증을 치료하는 방법을 제공하는 것이다. 이와 다르게는, 코린 발현조절 영역은 안티센스 RNA 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결될 수 있다.

본 발명의 이 측면의 바람직한 구체예에서는 선택된 유전자가 코린이다.

본 발명의 또다른 측면은

(a) 포유동물 코린 발현조절 영역을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 ANP, B-타입 나트륨이뇨 펩티드, 포스포놀람반, ACE, 또는 이들 유전자의 우성 음성 형태로 이루어진 군에서 선택된 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결시킨 재조합 벡터를 제조하고,

(b) 제약상 허용되는 담체 중의 이 재조합 벡터를 사람 환자에게 투여하는 것을 포함하는,

심부전증이 있는 사람 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

도 1. 포유동물 코린 유전자의 구성도. (A) 인간 코린 유전자 및 (B) 마우스 코린 유전자의 구성도를 나타낸다. 두 개의 BAC 클론을 샷-건 (shot-gun)법으로 서열분석하였고, 이들의 조립된 삽입부 서열의 크기를 나타낸다. 세로 막대는 엑손을 나타낸다. 인간 유전자에서 BAC 26540으로부터 서브클로닝하는 데에 사용되는 플라스미드 클론은 제한효소 부위 (H, *Hind III*, E, *EcoRI*)로 표시했다. 서브클론의 삽입부는 자동화 서열분석을 이용하여 프라이머 연장법 (primer extension method)을 통하여 서열분석하였다. BAC 클론, 콘티그, 및 코린 유전자를 아우르는 플라스미드

클론의 위치는 아래쪽에 표시한다.

도 2. 코린 단백질 도메인에 대한 인트론/엑손 경계 위치. 코린 유전자의 엑손 1 내지 22 (위쪽 판)를 이들의 상응하는 단백질 도메인과 함께 배열하였다. TM은 막횡단 도메인, 곱슬형은 곱슬형 시스테인 풍부 도메인, LDLR은 LDL 수용체 반복부, SRCR은 스캐벤저 수용체 시스테인-풍부 도메인, H, D 및 S는 이 프로테아제 도메인의 촉매 3개조 (triad)의 His, Asp 및 Ser 잔기를 나타낸다.

도 3a 및 3b. 인간 코린 유전자 (서열 1) 및 마우스 코린 유전자 (서열 3)의 5'-플랭킹 영역의 배열. 5'-플랭킹 영역, 엑손 1 및 인트론 1의 일부는 인간 코린 유전자와 마우스 코린 유전자 사이에 배열한다. 번호는 번역 개시인자 ATG (굵은 이탤릭체)를 기준으로 매긴 것이다. 표시한 번호는 제1 엑손에서의 분기 (divergence)로 인하여 인간과 마우스 간에 서로 다르다. 화살표는 인간 코린 유전자의 제1 엑손과 인트론 사이의 연결부를 가리키며, 인간 인트론 1의 공여 스플라이스 서열에 밑줄을 그었다. 추정 조절 서열을 표시하고 굵은 글씨체로 하였다 (Tbx5에 결합하는 Tbx5 부위는 T-박스 포함 전사 인자이고, NF-AT는 활성화된 T 세포의 핵 인자를 위한 결합 부위이고, GATA는 GATA 단백질을 위한 결합 요소이고, GT 박스는 크뤼펠형 인자에 결합하기 위한 것이고, TATA 박스는 기저 전사 인자 TFIID에 결합하기 위한 것이고, NKE는 Nxk2.5를 위한 결합 모티프임). NKE 서열은 인접한 GATA 서열과 겹치며, 밑줄을 그었다.

도 4. 배양된 심근세포에서의 코린 유전자 프로모터 활성의 기능적 분석. 루시퍼라제 유전자에 연결된 인간 및 쥐 코린 유전자의 5'-플랭킹 영역의 연속적으로 말단절단된 (serially truncated) 세그멘트들을 포함하는 리포터 제작물을 도시한다 (A). 추정 조절 요소의 위치를 표시했다. 이들 제작물을 SV40 바이러스 프로모터에 의해 구동되는 렐리나 (*Rellina*) 루시퍼라제-발현 플라스미드인 pRL-SV40 과 함께 마우스 HL-5 세포 내로 동시형질감염시켰다. 각 제작물에 의하여 발현되는 루시퍼라제 활성을 각 형질감염마다 pRL-SV40에 의하여 발현되는 렐리나 루시퍼라제 활성으로 정규화 (normalize)했다. 각 형질감염 실험은 각 제작물마다 3벌씩 수행하였다. 그 데이타는 3 개의 독립 실험의 평균 ± S.D.를 나타낸다 (B).

도 5. 인간 및 마우스 코린 유전자에서 유래한 5'-플랭킹 서열의 심장-특이적 발현. 심근세포 HL5 세포 및 표피모양 HeLa 세포를 각기 대조구 제작물 pRL-SV40과 함께 지정된 제작물을 써서 형질감염시켰다. 루시퍼라제 및 렐리나 활성은 형질감염된 세포로부터의 세포 추출물 20 uL 분액 당 광유닛으로서 표현된다. 각 형질감염 실험은 3벌씩 수행하였다. 데이타는 3 개의 독립 실험의 평균 ± S.D.를 나타낸다.

도 6. 인접 GATA 요소를 포괄하는 조절 서열로의 핵 단백질의 결합.

도 6a:프로브 및 경쟁물질로서 사용되는 상부 가닥 올리고뉴클레오티드의 서열. 각 서열 (인간 및 마우스에 대해 각기 서열 11 및 13)에서 GATA 모티프는 굵은 글씨로, 돌연변이된 뉴클레오티드 (인간 및 마우스에 대해 각기 서열 12 및 14)는 이탤릭체로 한다. 인간 및 마우스 인접 GATA 요소는 코린 5'-플랭킹 서열의 지정된 영역으로부터 유래한다. 두 GATA 모티프가 포함된 컨센서스 GATA 프로브 (서열 15)는 인간 T-세포 수용체 특이적 인핸서 영역으로부터 유래된다.

도 6b: 표지된 컨센서스 GATA 프로브 (서열 15) 또는 이의 돌연변이체 프로브 (서열 16)를 해당 비표지된 올리고뉴클레오티드의 100배 초과량이 존재 또는 부재하는 상태에서 HL-5 세포로부터의 핵 추출물과 함께 인큐베이션시켰다. 화살표 는 GATA-서열 의존적 DNA-단백질 복합체를 지시한다.

도 6c: 표지된 컨센서스 GATA 프로브를 GATA 단백질에 대한 항체의 존재하에 HL-세포로부터의 핵 추출물과 함께 인큐베이션시켰다. 화살표는 GATA-4에 대한 항체에 의하여 그 형성이 차단되나 GATA-1, -3 및 -6에 대한 항체에 의해서는 차단되지 않는 DNA-단백질 복합체를 지시한다.

도 6d: 표지된 인간 코린 GATA 요소를 GATA-4에 대한 항체가 존재 또는 부재하는 상태에서 HL-5로부터의 핵 추출물과 함께 인큐베이션시켰다. 화살표는 항-GATA-항체의 존재하에 그 형성이 완전히 차단되는 DNA-단백질 복합체를 지시한다.

도 7. 인접 보존된 GATA 요소의 돌연변이 분석. EMSA에서 GATA-4 단백질의 결합을 파괴하는 동일한 돌연변이들 (GATA를 CTTA로)을 마우스의 경우 -642 내지 -77, 인간의 경우 -405 내지 -15의 5'-플랭킹 영역에 의해 구동되는 루시퍼라제 리포터 제작물에 도입하였다. 돌연변이체 및 야생형 제작물을 각기 대조구 제작물 pRL-SV40과 함께 HL-5 세포내로 형질감염시켰다. 각 제작물이 발현한 루시퍼라제 활성은 각 형질감염마다 pRL-SV40에 의해 발현되는 레닐라 루시퍼라제 활성으로 정규화되었다. 각 돌연변이 제작물의 프로모터 활성은 상응하는 야생형 제작물의 백분율로서 표현되었다. 각 형질감염 실험은 3벌씩 수행하였다. 데이타는 3 개의 독립 실험의 평균 ± S.D.를 나타낸다.

도 8a 내지 8b. 인간 코린 유전자의 5'-플랭킹 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 2). 4165 염기쌍 서열은 5'-플랭킹

영역, 제1 엑손 및 인트론 1의 시작부분 (소문자로 표시)을 포함한다. 모든 번호는 번역 개시 부위 (ATG, 밑줄 그은 굵은 글씨)를 기준으로 매겼다. 추정 조절 요소는 굵은 글씨로 표시한다. 추정 조절 요소의 약자는 도 3의 설명에 기재되어 있다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 프로모터 및 그외 조절 요소를 포함하는 심장-특이적 코린 유전자의 발현조절 영역의 단리, 클로닝 및 확인에 관한 것이다. 이 단리된 코린 발현조절 영역 및 이의 단편 및 변이체는 코린 유전자 발현의 신규 조절인자를 확인하는 데 및 코린 유전자 발현의 조절을 연구하기 위한 시험관내 및 생체내 실험 모델을 제작하는 데에 유용성이 있다. 발현조절 영역은 또한 심부전증과 같은 심장병 상태를 목적으로 하는 유전자요법에 사용될 수도 있다.

정의

명세서, 실시예 및 첨부된 청구의 범위에 기재된 바와 같이, 반대의 언급이 없는한, 다음의 용어는 지시된 의미를 갖는다.

'핵산' 또는 '폴리뉴클레오티드'는 단일가닥 또는 이중가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 및 이의 중합체를 가리킨다. 이 용어는 공지된 뉴클레오티드 유사체 또는 변형된 골격 잔기나 결합 (linkage)을 포함하는 핵산들을 포괄하며, 이들은 합성, 자연발생 및 비자연발생의 것이며, 기준 핵산과 결합 (binding) 성질이 유사하며, 기준 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사된다. 이러한 유사체의 예로는 포스포로티오에이트, 포스포라미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2-O-메틸 리보뉴클레오티드, 펩티드-핵산 (PNA)이 있으나 이에 한정되지는 않는다.

다른 지시가 없다면, 특정한 핵산 서열은 암묵적으로 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예를 들면, 동의(同意, degenerate) 코돈 치환) 및 상보적 서열뿐만 아니라 명시적으로 지시된 서열도 포괄한다. 구체적으로는, 동의 코돈 치환은 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3 위치를 혼합된-염기 및(또는) 데옥시이노신 잔기로 치환한 서열을 생성함으로써 얻어질 수 있다 (Batzer etal. (1991) Nucl. Acids Res. 19:5081, Ohtsuka et al. (1985) J. Biol. Chem. 260: 2605-08, Rossolini et al. (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98). 핵산이란 용어는 유전자, cDNA, mRNA, 올리고뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드와 서로 바꾸어 사용된다.

특정한 핵산 서열은 또한 암묵적으로 '스플라이스 변이체'를 포괄한다. 이와 유사하게, 핵산에 의하여 코딩되는 특정한 단백질은 그 핵산의 스플라이스 변이체에 의하여 코딩되는 모든 단백질을 암묵적으로 포괄한다. '스플라이스 변이체'는 그 이름이 암시하는 바와 같이, 유전자의 다른 스플라이싱의 생성물들이다. 전사후에 초기 핵산 전사체는, 상이한 (다른) 핵산 스플라이스 생성물이 상이한 폴리펩티드를 코딩하게끔 스플라이싱될 수 있다. 스플라이스 변이체가 생성되는 메카니즘은 다양할 수 있으나, 엑손이 달리 스플라이싱되는 것이 포함된다. 연속판독 (read-through) 전사에 의하여 동일한 핵산으로부터 유래된 다른 폴리펩티드도 이 정의에 의하여 포괄된다. 스플라이스 생성물의 재조합 형태를 포함하여, 스플라이싱 반응의 모든 생성물은 이 정의에 포함된다.

'코린 유전자'는 문헌 (Yan et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:14926-14935)에 기재된 바와 같은 인간 코린 유전자 아미노산 서열과 약 60 % 이상 (바람직하 게는 75 %, 78 %, 90 % 이상, 더 바람직하게는 약 95 % 이상)의 동일성을 공유하는 연속 (contiguous) 아미노산 서열을 코딩하는 유전자이다.

'코린 발현조절 영역' 또는 '발현조절 영역'은 자연발생 포유동물 코린 유전자의 코딩 영역의 업스트림 (5') 유전체 서열 내에 위치하는 폴리뉴클레오티드이다. 인간 코린 유전자에서, 코린 발현조절 영역은 도 8a 내지 8b에 보인 바와 같이 코린 유전자 또는 그의 상보적 가닥의 번역 개시 부위 (ATG)를 기준으로 뉴클레오티드 -4165에서 시작하여 뉴클레오티드 -15에서 끝난다. 코린 발현조절 영역은 심장 조직 (근육세포)에서 코린 유전자의 전사를 활성화시킬 수 있다. 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드는 길이가 100 내지 5000 뉴클레오티드 범위일 수 있으며, 기능적 인간 코린 발현조절 영역의 특정한 구체예는 길이가 4023, 1283 또는 391 뉴클레오티드 (각각 서열 6, 5 및 4)이다. 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드는 일반적으로 이들 서열과 70 % 이상의 상동성이 있다. 일부 구체예에서는, 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드는 이들 서열에 상동성이 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 % 또는 100 % 이상이다. 용어 '조절 영역'은 문헌 (Yan et al., 같은 문헌)에 이미 기재된 개시 또는 종결 코돈 및 그외 서열을 포함하지 않는다. 코린 발현조절 영역은, 본래의 것과 실질적으로 동일한 방식 또는 인위적인 방식으로 연결될 수 있는. 다양한 전사 조절 단백질 (예를 들면 GATA-4)을 위한 결합 부위를 포함한다. 코린 발현조절 영역은 코린 유전자의 전사 또는 그것에 작동가능하게 연결된 그외의 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를, 특히 심장-특이적 방식으로 활성화시킨다.

'심장-특이적 발현'은 비심장 세포에서보다는 심장-유래 세포에서 더 큰 비율로 폴리뉴클레오티드가 전사됨을 의미한다. 따라서, 코린 발현조절 영역은, 연결된 폴리뉴클레오티드의 전사를 통상적으로 비심장 세포에서보다는 심근세

포에서 더 효과적으로 2 배 이상 활성화시킬 것이다. 여기서 각 경우마다 발현은 SV40 프로모터/인핸서 또는 그외 구성적 (constitutive) 프로모터에 연결된 다른 폴리뉴클레오티드의 전사로 정규화된다.

폴리뉴클레오티드의 '변이체(들)'은, 여기에 사용된 바와 같이, 기준 폴리뉴클레오티드의 폴리뉴클레오티드 서열과 상이한 폴리뉴클레오티드이다. 일반적으로, 기준 폴리뉴클레오티드 및 변이체의 폴리뉴클레오티드 서열은 전체적으로는 밀접히 유사하고 많은 영역에서 동일하도록 차이는 제한된다. 그 차이는 폴리뉴클레오티드의 기능이 변경되지 않게 하는 정도이며, 만일 폴리뉴클레오티드가 정상적으로 폴리펩티드를 코딩한다면, 생성된 폴리펩티드는 아미노산 서열에 변화가 없거나 또는 아미노산 서열에는 차이가 있지만 여전히 기능적으로 동일하다.

'단편(들)'은 여기에 사용된 바와 같이, 전체적으로, 상기한 코린 발현조절 영역 및 이의 변이체의 폴리뉴클레오티드 서열 중 일부와 같으나 전부와 같은 것은 아닌 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 가리킨다. 이러한 단편은 이들이 기능적으로 연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 심장-특이적 전사를 유도하는 코린 발현조절 영역의 능력을 유지한다.

'전사 개시 요소'는 RNA 중합효소 II의 출발 부위를 특정하는 프로모터 중의 서열을 가리킨다. 전사 개시 요소는 25-35 염기 다운스트림에서 전사의 개시를 유 도하는 TATA 박스, 또는 전사 출발 부위 그 자체의 가까이 위치한 서열인 개시인자 요소를 포함할 수 있다. 진핵생물 프로모터는 일반적으로 전사 개시 요소 및 프로모터-인접 요소나 먼 인핸서 요소 중 하나, 또는 둘다를 포함한다.

세포, 또는 핵산, 단백질 또는 벡터 등과 관련하여 사용될 경우 '재조합'은 그 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이종 핵산 또는 단백질을 도입하거나 천연 핵산 또는 단백질의 변경을 통하여 변형되었거나 그 세포가 그렇게 변형된 세포로부터 유래한 것임을 지시한다. 따라서, 예를 들면, 재조합 세포는 그 재조합 세포의 천연 (비재조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 달리 비정상적으로 발현되거나 불충분하게 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 천연 유전자를 발현한다.

'인핸서'는 전사를 향상시키는 DNA 조절 영역을 가리킨다. 인핸서는 늘 그런 것은 아니지만 일반적으로 인접 프로모터 영역 밖에 위치하며, 전사 출발 부위, 심지어 유전자의 코딩 서열의 3'에서부터 수 kb 또는 그 이상 떨어져 위치하거나 또는 유전자의 인트론 내에 위치할 수 있다. 프로모터 및 인핸서는 단독으로 또는 공동으로 조직 특이적 발현을 유발할 수 있다.

'침묵인자 (silencer)'는 코린 유전자의 천연 환경에서 존재할 때, 불연속적 DNA 세그먼트로서의 그 자신의 작용으로부터 또는 상기 요소에 결합하여 유전자의 발현에 부정적 조절을 수행하는 트랜스-작용 인자의 작용을 통하여 그 프로모터로부터 전사의 억압을 유발하는 DNA 조절 영역을 가리킨다. 이 요소는 코린 유전자의 경우 관찰되는 제한된 세포 타입 발현 패턴에 관여할 수 있는데, 예를 들면 침 묵인자가 불활성일 수 있는 심근세포에서 발현이 허용될 수 있느나 침묵인자가 활성인 다른 세포 타입에서는 발현이 제한된다. 이 요소는 이종 프로모터 제작물에서 또는 단리된 상태로 작용하거나 작용하지 않을 수 있다.

폴리뉴클레오티드 등과 관련하여 '단리된'이란 당해 물질이 그의 본래의 환경 (예를 들면, 그 물질이 자연발생되면 천연 환경)에서 제거되고 자연적으로는 수반되는 하나 이상의 다른 성분으로부터 단리되거나 분리됨을 의미한다. 예를 들면, 천연의 살아있는 숙주 내에 존재하는 자연발생 폴리뉴클레오티드는 단리되지 않은 것이나, 자연계에서 공존하는 물질 전부로부터 분리된 그와 동일한 폴리뉴클레오티드는 단리된 것이다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 조성물의 일부가 될 수 있으며 그러한 조성물이 천연 환경의 일부가 아니라는 의미에서 여전히 단리된 것이다.

서열과 관련하여 '동일성 백분율' 또는 동일한 백분율이란 어떤 서열을, 기재되거나 특허청구된 서열과 비교하기 위하여 당해 서열을 배열 (alignment) 후에 특허청구된 요소 또는 기재된 서열과 비교함을 의미한다. 서열의 비교 및 두 서열간의 동일성 백분율 및 유사성 백분율의 결정은 수학적 알고리즘을 써서 수행할 수 있다. 이러한 수학적 알고리즘의 바람직한 무제한적인 예는 문헌 (Karlin et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877)에 기재되어 있다. 이러한 알고리즘은 문헌 (Altschul et al. (1997) Nucleic Acid Res. 25:3389-3402)에 기재된 바와 같이 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 (버전 2.0)에 통합되어 있다.

여기에 사용된 '고엄격도'는, 예를 들어 블롯을 밤새 (예를 들면 12 시간 이 상) 5X SSC, 0.5 % SDS, 100 :g/ml 변성 연어알 DNA 및 50 % 포름아미드를 함유하는 혼성화 용액 중에서 긴 폴리뉴클레오티드 프로브와 함께 42 ℃에서 인큐베이션시키는 것을 의미한다. 5 % bp 미만의 미스매치 (예를 들어 65 ℃에서 30 분 동안 0.1X SSC 및 0.1 % SDS로 2회 세척) 등을 허용하는 고엄격도 조건에서 블롯을 세척함으로써 서열 동일성이 95 % 또는 그 이상의 서열을 선택할 수 있다.

폴리뉴클레오티드는 그 폴리뉴클레오티드의 DNA 복제본이 RNA로 전사될 때 '발현되는' 것이다.

폴리뉴클레오티드는 이 폴리뉴클레오티드와 코린 발현조절 영역이 하나의 분자로 융합되어 폴리뉴클레오티드의 전사, 가장 바람직하게는 심장-특이적 전사 (심근세포에서)를 유발할 때 코린 발현조절 영역에 '작동가능하게 연결된' 것이다.

'이종 폴리뉴클레오티드'는 코린 발현조절 영역에 작동가능하게 연결되어 심장-특이적 세포에서 우선적으로 발현되는, 코린 발현조절 영역 이외의 폴리뉴클레오티드를 가리킨다. 이 연결된 폴리뉴클레오티드는 폴리펩티드, 안티센스 RNA 등 치료상 유용한 분자를 코딩한다. 용어 '단리된', '정제된', 또는 '생물학적으로 순수한'이란 물질의 천연 상태에서 발견된 때에는 통상 그 물질에 수반되는 성분들이 실질적으로 또는 본질적으로 없는 물질을 가리킨다. 순도 및 균질도는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 분석적 화학 기법을 써서 결정하는 것이 전형적이다. 제제에 존재하는 두드러진 종류인 단백질은 실질적으로 정제된 것이다. 특히, 단리된 핵산은 그 유전자의 측면에 접하며 다른 단백질을 코딩하는 오픈리딩프레임과 분리된 것이다. 용어 '정제된'이란 핵산이나 단백질이 전기영동 겔에서 본질적으로 하나의 밴드를 발생시킴을 의미한다. 구체적으로는, 핵산이나 단백질이 85 % 이상 순수한, 더 바람직하게는 95 % 이상 순수한, 가장 바람직하게는 99 % 이상 순수한 것을 의미한다.

용어 '폴리펩티드', '펩티드' 및 '단백질'은 여기서는 서로 바꾸어 사용되어, 아미노산 잔기의 중합체를 가리킨다. 이 용어들은 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연발생 아미노산의 인공 모방 화합물인 아미노산 중합체뿐만 아니라 자연발생 아미노산 중합체 및 비자연발생 아미노산 중합체에 적용된다.

용어 '아미노산'은 자연발생 및 합성 아미노산뿐만 아니라 자연발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 가리킨다. 자연발생 아미노산은 유전자 코드에 의하여 코딩되는 것들뿐만 아니라 이후에 변형된 그러한 아미노산, 예를 들면, 히드록시프롤린, γ-카르복시글루타메이트 및 O-포스포세린이 있다. 아미노산 유사체는 자연발생 아미노산과 기본 화학 구조가 동일한 화합물, 예를 들면, 수소에 결합된 탄소, 카르복시기, 아미노기 및 R기, 예컨대 호모세린, 노르루이신, 메티오닌 술폭시드, 메티오닌 메틸 술포늄 등을 가리킨다. 이러한 유사체는 변형된 R기 (예를 들며 노르루이신) 또는 변형된 펩티드 골격을 가지지만 자연발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 보유한다. 아미노산 모방체란 아미노산의 일반적인 화학 구조와는 구조가 다르지만 자연발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 화합물을 가리킨다.

여기에서 아미노산은 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회에서 권고한 한 문자 기호 또는 일반적으로 알려진 아미노산의 3 문자 기호로 언급된다. 뉴클레오티드 도 마찬가지로 뉴클레오티드의 일반적으로 수용되는 한 문자 코드로 언급될 수 있다.

'보존적으로 변형된 변이체'란 아미노산과 핵산 서열 모두에 적용된다. 특정한 핵산 서열과 관련하여, 보존적으로 변형된 변이체는 동일한 또는 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 가리키거나 또는 그 핵산이 아미노산 서열을 코딩하지 않는 경우라면 본질적으로 동일한 서열을 가리킨다. 유전자 코드의 동의성 (degeneracy)으로 인하여 많은 기능상 동일한 핵산이 어떠한 소정의 단백질을 코딩한다. 예를 들면, GCA, GCC, GCG 및 GCU 코돈은 모두 아미노산 알라닌을 코딩한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의하여 특정되는 모든 위치에서 그 코돈은 코딩된 폴리펩티드를 변경하지 않고도 상기한 상응하는 코돈 중 하나로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이는 '침묵 변이'이며, 보존적으로 변형된 변이의 한 종류이다. 폴리펩티드를 코딩하는 여기의 모든 핵산 서열은 그 핵산 서열의 모든 가능한 침묵 변이도 설명하는 것이다. 숙련자라면, 핵산에서 각 코돈 (통상 메티오닌에 대한 코돈일 뿐인 AUG 및 통상 트립토판에 대한 코돈일 뿐인 TGG는 제외)은 기능적으로 동일한 분자를 얻게끔 변형될 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 각 침묵 변이는 각기 기재된 서열에서 내포되어 있다.

숙련자라면 아미노산 서열과 관련하여, 코딩된 서열에서 하나의 아미노산 또는 적은 비율(%)의 아미노산을 변경, 부가 또는 결실시키는, 핵산, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 서열에 대한 개별적인 치환, 결실, 또는 부가는 그 변형이 화학적으로 유사한 아미노산으로의 아미노산 치환을 초래하는 경우에는 '보존적으로 변형된 변이체'라는 점을 인식할 것이다. 기능상 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당분야에 잘 알려져 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체는 또한 다형 (polymorphic) 변이체, 종간 동족체 및 본 발명의 대립유전자에 추가되며, 이들을 배제하지 않는다.

다음 8 개 군은 각기 서로에 대한 보존적 치환인 아미노산을 포함한다.

1) 알라닌 (A), 글리신 (G),

2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E),

3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q),

4) 아르기닌 (R), 라이신 (K),

5) 이소루이신 (I), 루이신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V),

6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W),

7) 세린 (S), 트레오닌 (T), 및

8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M).

문헌 (Creighton, Proteins (1984)) 등을 참조한다.

'발현 벡터'란 숙주세포에서 특정한 핵산의 전사를 허용하는 일련의 특정의 핵산 요소들이 포함된, 재조합 생성 또는 합성 생성된 핵산 제작물을 가리킨다. 이 발현 벡터는 플라스미드, 바이러스 또는 핵산 단편의 일부일 수 있다. 전형적으로는 이 발현 벡터는 발현조절 영역 (예를 들면, 코린 발현조절 영역)에 작동가능하게 연결된, 전사될 핵산을 포함한다.

'제약상 허용되는 부형제'란 그 내에 현탁되거나 포함된 제약 조성물의 생체 활성에 부정적인 영향을 주지 않고 독성이 없는, 생리적 조건과 상용성이 있어야 하는 임의의 제약상 허용되는 보조 물질 및 허용되는 담체이다. 적합한 부형제는 만니톨, 숙시네이트, 글리신 또는 혈청 알부민과 같은 화합물일 것이다.

'치료상 유효량'이란 본 발명의 화합물의 양이 그 화합물을 필요로 하는 환자에게 투여하는 경우 심장병을 앓고 있는 환자 또는 심장병이 발병할 것 같은 환자에게 있어서, 상기 정의한 바와 같은 치료를 수행하기에 충분하다는 것을 의미한다. '치료상 유효량'을 구성하는 화합물의 양은 화합물에 따라서 달라질 것이지만, 당분야의 숙련자라면 그 자신의 지식과 이 공개 내용을 고려하여 용이하게 결정할 수 있을 것이다.

여기에 사용된 '치료하다' 또는 '치료'란 심장병의 치료를 아우르며,

(a) 사람에게서, 특히 이런 상태에 걸리기 쉬운 사람의 경우 심장병이 발생하는 것을 예방하거나,

(b) 심장병을 억제, 즉 그 발병을 저지하거나,

(c) 심장병을 완화, 즉 상태의 퇴행을 유발하는 것을 포함한다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 프로모터 및 그외 조절 요소를 포함하는, 포유동물 코린 유전자 (예를 들면, 마우스, 인간)의 발현조절 영역의 클로닝 및 확인과, 코린 유전자 발현을 조절하는 작용제의 확인 및 심장병 치료에 있어서의 이 발현조절 영역의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 신규 인간 코린 발현조절 영역을 포함하는 폴리뉴 클레오티드 및 발현조절 영역에 작동가능하게 연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 심장-특이적 발현을 유도하는 이 발현조절 영역의 능력에 관한 것이다.

코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드의 단리 및 특징분석

본 발명은 재조합 유전학 분야에서의 통상적인 기술에 의존한다. 본 발명에서 사용되는 일반적인 방법의 기본 교재로는 문헌 (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed. 1989), Kriegler, Gene Transfer and Expression:A Laboratory Manual (1990), 및 Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, New York, NY, 1994))을 들 수 있다.

<u>포유동물 코린 유전자의 구성도</u>

도 1은 인간 및 마우스 코린 유전자의 구성도 및 (세균 인공 염색체) BAC 클론, 콘티그, 및 코린 유전자와 이들의 5'-플랭킹 영역을 포함하는 플라스미드 클론의 위치를 도시한다. 인간 및 마우스 코린 유전자 둘다 200 kb 이상에 이르며, 22 개의 엑손과 21 개의 인트론으로 구성된다.

코린 cDNA 서열로부터는 많은 산개된 도메인으로 이루어진 단백질이 예상된다. 단백질 도메인 사이의 경계는 도 2에서 개략적으로 보인 바와 같이, 유전체 구조의 엑손/인트론 경계에 거의 정확하게 상응한다. N-말단에서 세포내 꼬리부는 엑손 2의 절반과 엑손 1에 의하여 코딩되며, 그 뒤의 막횡단 도메인은 엑손 2의 나머지 절반에 의하여 코딩된다. 막횡단 도메인과 제1 곱슬형 도메인 사이의 영역은 엑손 3에 의하여 코딩된다. 곱슬형 도메인들 각각은 2 개의 엑손에 의하여, 8 개 의 LDLR 각각이 하나의 엑손에 의하여, 스캐벤저 수용체 시스테인-풍부 도메인이 3 개의 엑손에

의하여 코딩된다. C-말단의 프로테아제 도메인은 엑손 19 내지 22에 의하여 코딩되는데, 엑손 19가 단백질분해 활성 부위 및 촉매성 히스티딘 잔기를 포함하는 서열을 코딩한다. 엑손 20 및 22는 각기 다른 두 촉매성 잔기인 아스파르트산 및 세린을 포함하는 잔기를 코딩한다.

코린 발현조절 영역의 클로닝

인간 및 마우스 코린 유전자 및 이들의 5'-플랭킹 영역을 클로닝하기 위하여, 이들 유전자의 공개된 코린 cDNA 서열 (Yan et.al. (1999) J. Biol. Chem. 274:14926-14935)에 상응하는 특이적 올리고뉴클레오티드를 합성했다. 인간 또는 마우스 유전체 DNA를 사용하여 PCR-기초 반응에서 이들 올리고뉴클레오티드 프라이머가 특이적 생성물을 증폭시키는가에 대해 시험하였다. 그 다음, 특이적 PCR 생성물을 성공적으로 증폭시키는 프라이머쌍을 PCR-기초 선별에 사용하여 인간 또는 마우스 코린 유전자 및(또는) 이들의 상응하는 5'-플랭킹 영역을 포함하는 BAC 클론을 확인하였다. 확인된 양성 BAC 클론을 샷-건법을 통해 직접 서열분석하거나 또는 서열분석을 위해 pUC18 (PanVera/Takara, 미국 위스콘신주 매디슨 소재) 내로 서브클로닝하였다. 샷-건 서열의 조립은 스타덴 팩키지 (Bonfield et al. (1995) Nucleic Acids Res. 23:4992-4999)를 사용하여 수행하였다.

PCR-기초 선별을 통하여 두 개는 인간 코린 유전자를, 두 개는 마우스 코린 유전자를 포함하는 4개의 BAC 클론을 얻었다. 3 개의 BAC 클론을 샷-건법으로 서열분석하였고, 이들 서열을 사용가능한 추적 파일 정보 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/Traces/trace.cgi , http://trace.ensembl.org)와 함께 사용하여 인간 코린 유전자를 포함하는 340 kb의 연속 서열을 조립하고 마우스 코린 유전자의 경우 5 개의 콘티그에 대한 서열을 결정하였다. 마우스 코린 유전자의 경우, 각기 이웃하는 콘티그에서 짝을 이루는 여러 판독 쌍의 존재를 통해 5 콘티그의 순서를 확인하였다. 이들의 거리로 인하여, 틈의 크기가 500 bp 미만인 것으로 결정할 수 있었는데, 이는 공공 샷-건 라이브러리의 삽입부 크기가 잘 정의되어 있기 때문이다. 그 다음 인간 및 마우스 코린 유전자의 구조를 분석하였다. 그러나, 340 kb 인간 유전체 서열은 5'-플랭킹 영역을 포함하지 않았다. 추가의 4165 bp Hind III-EcoRI 단편은 BAC 26540으로부터 단리하였는데, 이는 5'-플랭킹 영역의 처음 3919 bp, 엑손 1의 전부 및 인트론 1의 일부 (젠뱅크 (GenBank) Tm/EBI 데이타 뱅크에 수탁번호 AF521006로 제출됨)를 포함하였다.

여기에 기재된 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드는 모두 BAC26540에서 단리된 4165 bp Hind III-EcoR I 단편 (도 8a 내지 8b, 서열 2)에서 유래되었다. 이들 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드는 PCR-기초 방법, 또는 제한효소 소화, 또는 이 둘의 병용에 의하여 얻었다. 4023 bp 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드 (서열 6)는 프라이머 F1 (5'-AAGCTTCATGAGGGCAGGAG-3') (서열 7) 및 R1 (5'-GAGCTCGCTTATTCTTCTGTCCACTT-3') (서열 8)을 사용하여 4165 bp Hind III-EcoR I 단편 또는 인간 유전체 DNA로부터 증폭시켰다. 이와 유사하게, 1283 bp 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드 (서열 5)는 프라이머 F2 (5'-AAGCTTATAAAAATAATAGCTTCTTC-3') (서열 9) 및 R1을 써서 증폭시키고, 391 bp 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드 (서열 4)는 프라이머 F3 (5'-AAGCTTAGTAACTCTTTTGCTCCCAA-3') (서열 10) 및 R1를 써서 증폭시켰다.

DNA를 쉽게 추출해 낼 수 있는, 백혈구와 같은 임의의 포유동물 조직이 포유동물 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드의 단리를 위한 유전체 DNA의 적합한 공급원이다.

기능적 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드

소정의 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드를 리포터 유전자에 작동가능하게 연결하고 이 제작물을 심근세포로 형질감염시키고, 그 특정한 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드 서열이 리포터 유전자의 심장-특이적 전사를 유도하는 능력에 대해 분석함으로써 상기한 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드를 심장-특이적 전사 활성에 관하여 분석하였다. 리포터 유전자는 통상, 숙주세포에 자연적으로는 존재하지 않는 쉽게 분석되는 효소 활성을 갖는 단백질을 코딩한다. 진핵세포 프로모터에 전형적인 리포터 단백질로는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제 (CAT), 개똥벌레 또는 레닐라 루시퍼라제, 베타-갈락토시다제, 베타-글루쿠로니다제, 알칼리성 포스파타제, 및 녹색 형광 단백질 (GFP)이 있다. 바람직한 리포터 유전자는 개똥벌레 루시퍼라제이다.

코린 발현조절 영역 활성을 평가하기 위한 하나의 체계는 배양된 세포주로의 일시적이거나 안정적인 형질감염이다. 리포터 유전자에 작동가능하게 연결된 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드를 보유하는 분석 벡터는 프로모터 활성의 분석을 위한 임의의 포유동물 세포주 내로 형질감염될 수 있으며, 세포 배양법, 형질감염 법 및 리포터 유전자 분석법에 관하여는 문헌 (Ausubel et al. (2000), 앞의 문헌) 및 형질감염 가이드라인 (Transfection Guide, 미국 위스콘신주 매디슨 소재한 프로메가사 (Promega Corporation) (1998))을 참조한다. 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드는 상기 분석 벡터를 심장 유래 세포주 및 비심장 유래 세포주 내로 나란히 형질감염시켜서 심장-특이적 전사 활성에 관하여 분석할 수 있다. 전형적으로는, 공지된 프로모터에 의하여 구동되는 제2 리포터 유전자 (예를 들면, SV40 초기 프로모터/인핸서 (pRL-SV40, 미국 위스콘신주 매디슨 소재한 프로메가 제품)에 의하여 구동되는 레닐라 루시퍼라제)를 포함하는 대조구 벡터를 분석 벡터와 함께 동시형질감염시켜서 여러 세포주 사이에 형질감염 효율 또는 리포터 유전자 번역에 있어서의 변동을 비교하였다.

이와 다르게는, 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드에 의해 구동된 전사를 리포터 유전자로부터 전사된 RNA의 양을 직접 측정함으로써 검출할 수도 있다. 이런 구체예에서는, 리포터 유전자는 숙주세포에 의하여 달리 발현되지 않는 공지된 서열의 임의의 전사가능한 핵산일 수 있다. 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드 제작물로부터 발현된 RNA는 mRNA의 역전사 및 증폭, 전체 RNA 또는 폴리 A+ RNA의 단리, 노던 블롯팅, 도트 블롯팅, 원위치 (in situ) 혼성화, RNase 보호, 프라이머 연장, 고밀도 폴리뉴클레오티드 배열 기술 등과 같은 당분야에 공지된 기술을 통해 분석할 수 있다.

코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드 서열이 전사를 활성화시키는 능력은 대조구 제작물과 비교하여 평가되는 것이 보통이다. 한 구체예에서는, 코린 발현 조절 영역 폴리뉴클레오티드가 전사를 활성화시키는 능력을 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드에 연결된 리포터 유전자의 발현과 그러한 서열에 연결되지 않은 동일한 리포터 유전자의 발현을 비교하여 평가한다. 따라서, 바람직한 구체예에서는, pRL-SV40과 루시퍼라제 유전자의 5'에 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드 서열이 삽입된 pRL-SV40 간에 루시퍼라제의 발현을 비교한다 (실시예 2, 도 4 참조). 다른 구체예에서는, 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드의 활성을 공지된 프로모터의 활성과 비교할 수 있다. 따라서, 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드에 의하여 구동되는 리포터 유전자의 활성을 특징분석된 프로모터 (예를 들면, pGL3-대조구 내의 SV40 프로모터/인핸서, 미국 위스콘신주 매디슨 소재한 프로메가 제품)에 의하여 구동되는 리포터 유전자의 활성과 비교한다.

코린 발현조절 영역에 의하여 유도되는 전사의 심장 특이성은 심장 유래 세포에서와 비심장 유래 세포에서의 리포터 유전자의 전사를 비교하여 평가한다. 심장 특이적 전사를 평가하기에 적합한 심장 유래 세포주는 AT-1 (Claycomb et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95:2979-2984), HL-1 (Lanson et al. (1992) Circulation 85:1835-1841), 및 HL-5 (Wu et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:16900-16905)이다. 바람직한 세포주는 HL-5 세포주이다. 쉽게 형질감염될 수 있는 모든 포유동물 세포주를 비심장 세포에서의 코린 발현조절 영역 활성을 평가하는 데에 사용할 수 있다 (예를 들면, HeLa 세포 ATCC 기탁번호 CCL2). 실시예 3 (도 5)에서, 인간 (hCp405LUC) 및 마우스 (mCp642LUC) 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드의 심장-특이적 활성은 HL-5 및 HeLa 세포주에서 이들 발현조절 영역 단 편이 있는 벡터와 없는 벡터로부터의 개똥벌레 루시퍼라제 발현을 비교하여 입증한다. 각 분석마다 코린 발현조절 영역 활성은 동시형질감염된 SV40 프로모터 활성 (즉, pGL3-대조구)으로 정규화하여 세포주간의 다양성을 비교한다.

일단 심장-특이적 전사 활성이 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드에서 증명된 후에는, 결실, 돌연변이, 재배열 및 그외 서열 변형체를 제작하여 본 발명의 분석에서 심장-특이적 전사에 대해 분석할 수 있다. 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드의 이러한 유도체들은 더 소형의 프로모터를 생성하거나 비심장 세포에서의 배경 발현을 감소시키거나 억제적 서열을 제거하거나 신규 심장-특이적 전사 조절 단백질을 확인하는 데에 유용하다. 인간 및 설치류 코린 발현조절 영역 서열을 비교하면 심장-특이적 발현을 유발하는 것들을 포함하여, 보존된 전사 조절 요소를 확인할 수 있다.

코린 발현조절 영역 단편일부 (subfragment) 및 유도체는 당분야에 공지된 통상적인 재조합 DNA법에 의하여 제작할 수 있다. 이러한 한 방법은 코린 발현조절 영역 서열 내에서 일련의 결실 유도체를 생성하는 것이다 (실시예 2). 결실 시리즈의 전사 활성을 비교함으로써 심장-특이적 전사에 기여하거나 심장-특이적 전사를 감소시키는 요소의 위치를 확인할 수 있다. 이러한 분석에 기초하여 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드의 개선된 유도체를 설계할 수 있다. 예를 들면, 코린 발현조절 영역 요소를 이종 프로모터에서 유래한 심장-특이적 또는 보편적인 (ubiquitous) 조절 요소와 합하여, 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드의 심장 특이성 또는 활성을 증가시킬 수 있다.

벡터 및 숙주세포

본 발명은 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 본 발명의 벡터로 유전자조작된 숙주세포 및 재조합 기술에 의한 본 발명의 폴리펩티드의 제조에 관한 것이기도 하다. 이러한 기술은 문헌 (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989 및 Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley amp; Sons, New York, N.Y., 1989)에 기재된다.

숙주세포는 본 발명의 코린 발현조절 영역 뿐만 아니라 코린이나 그외 폴리펩티드를 코딩하는 유전자에 작동가능하게 연결된 코린 발현조절 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 도입하도록 유전자조작할 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 감염, 형질도입 (transduction), 형질감염, 트랜스벡션 (transvection) 및 형질전환의 잘 알려진 기술을 사용하여 숙주세포로 도입할 수 있다. 이 폴리뉴클레오티드는 단독으로 또는 다른 폴리뉴클레오티드와 함께 도입될 수 있다. 이러한 다른 폴리뉴클레오티드는 독립적으로 도입되거나 동시도입되거나 또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 결합되어 도입될 수 있다.

따라서, 예를 들어 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 포유동물 세포 등에서 동시형질감염 및 선택을 위한 표준적 기술을 사용하여, 선택가능한 마커를 코딩하는 다른 별개의 폴리뉴클레오티드와 함께 숙주세포 내로 형질감염될 수 있다. 이

경우에, 폴리뉴클레오티드는 일반적으로 숙주세포 유전체 내로 안정적으로 도입될 것이다.

이와 다르게는, 폴리뉴클레오티드를 숙주 내에서의 번식 (propagation)을 위한 선택가능한 마커를 포함하는 벡터에 결합될 수도 있다. 이 벡터 제작물은 상기한 기술을 써서 숙주세포 내로 도입될 수 있다. 플라스미드 벡터는 일반적으로 인산칼슘 침전물과 같은 침전물 중에서 또는 대전된 지질과의 복합체 중에 DNA로서 도입된다. 전기영동를 사용하여 숙주 내로 폴리뉴클레오티드를 도입할 수도 있다. 벡터가 바이러스라면, 그 벡터는 시험관내에서 포장되거나 포장 (packaging) 세포 내로 도입할 수 있고 포장된 바이러스는 세포 내로 형질도입될 수 있다. 본 발명의 이 측면에 따른 폴리뉴클레오티드의 제조 및 폴리뉴클레오티드의 세포 내로의 도입에 적합한 다양한 기술이 당분야의 숙련자에게 공지되어 있으며 통상적이다. 이러한 기술은 이들 기술을 상세히 설명하는 많은 실험실 매뉴얼을 예시한 앞에 인용된 샘브룩 등의 문헌에 상세히 정리되어 있다. 본 발명의 이 측면에 따르면, 벡터는 예를 들어, 플라스미드 벡터, 단일가닥 또는 이중가닥 파아지 벡터, 단일가닥 또는 이중가닥 RNA 또는 DNA 바이러스 벡터일 수 있다. 이러한 벡터는 DNA 및 RNA를 세포 내로 도입하는 잘 알려진 기술을 써서 폴리뉴클레오티드, 바람직하게는 DNA로서 세포 내로 도입할 수 있다. 파아지 및 바이러스 벡터의 경우에 벡터들은 또한 감염 및 형질도입의 잘 공지된 기술을 통하여 포장된 또는 단백질막으로 싸인 (encapsidated) 바이러스로서 세포 내에 도입된다. 바이러스 벡터는 복제능이 있거나 없는 것일 수 있다. 후자의 경우에는 바이러스 번식은 일반적으로 숙주세포를 보완하는 때에만 발생할 것이다.

특정한 측면에서 벡터들 가운데 바람직한 것은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 발현을 위한 것들이다. 통상적으로 이러한 벡터는 발현될 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된, 숙주에서의 발현에 효과적인 시스-작용 조절 영역을 포함한다. 또는, 적절한 트랜스-작용 인자가 숙주에 의하여 공급되거나 보완 벡터에 의하여 공급되거나 숙주에 도입시 벡터 그 자체에 의하여 공급된다.

본 발명의 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드는 다양한 공지된 통상적인 기술 중 어느 것에 의해서도 벡터 내로 도입될 수 있다. 일반적으로, 발현을 위한 DNA 서열은, 이 DNA 서열 및 발현 벡터를 하나 이상의 제한 엔도뉴클레아제로 절단한 후 이 제한 단편들을 T4 DNA 리가아제를 써서 함께 결합시킴으로써, 그 발현 벡터 내로 결합시킨다. 이 목적에 사용될 수 있는 제한 및 라이게이션 방법은 숙련자들에게 잘 알려진 통상적인 것이다. 이와 관련하여 그리고 다른 기술을 사용하여 발현 벡터를 제조하는 적합한 방법도 역시 숙련자들에게 잘 알려진 통상적인 것이며, 본 명세서의 다른 곳에서 인용된 샘브룩 등의 책에 상세히 잘 기재되어 있다.

코린 발현조절 영역의 사용

본 발명의 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드는 심장-유래 세포에서 치료용 분자를 특이적으로 발현시키는 데에 유용하다. 치료용 분자의 심장-특이적 발현은 울혈심부전증, 고혈압 및 심장 비대증을 치료하는 데 등에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 치료용 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제작하여 환자에게 투여함으로써 심장 질병을 치료하고 새로운 개선된 치료제를 개발할 수 있다.

코린을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하지만 이에 한정되지 않는 모든 치료용 폴리뉴클레오티드가 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결될 수 있다. 전형적으로는, 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드를 발현 카세트에 포함시켜서 발현될 치료용 폴리뉴클레오티드의 5'에 삽입한다. 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드는 치료용 폴리뉴클레오티드에 직접 인접하여 위치할 수 있으나, 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드 인핸서 요소가 치료용 폴리뉴클레오티드의 3' 말단 및 인트론 내부를 포함하여, 치료용 폴리뉴클레오티드의 수천 kb 내에 어디에나 위치할 수 있다. 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드가 심장-특이적 전사를 소정의 위치에서 유발하는 능력은 리포터 유전자를 기준으로 적절한 배치로 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드를 위치시키고 여기에 기재한 바와 같이 심장-특이적 리포터 유전자 활성을 분석하여 증명할 수 있다.

코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드는 추가의 서열없이 치료용 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 직접 연결될 수 있다. 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드가 코린 전사 개시 요소를 포함하지 않는 구체예에서는 TATA박스 및 전사 개시 부위와 같은 추가의 요소가 제공되어야 한다. 이들은 치료용 유전자에 천연적인 전사 개시 요소이거나 또는 이종 진핵세포 또는 바이러스 프로모터로부터 유래한 것일 수 있다. 또한, (본 발명의 분석에서 측정된) 발현의 심장-특이성이 유지되는 한, 치료용 유전자 발현의 수준은 치료용 유전자로부터의 또는 이종 유전자로부터의 인핸서 및 폴리아데닐화 서열을 포함시킴으로써 증가될 수 있다.

심장-유래 세포를 시험관내 및 생체내에서 형질감염하기 위한 벡터, 생체내 심장-유래 세포에서 지속적인 발현을 보장하는 방법, 치료용 폴리뉴클레오티드를 심장-특이적 프로모터에 작동가능하게 연결시키는 방법, 및 시험관내 또는 생체내 심장세포로 벡터를 표적화하는 방법 및 치료용 벡터로 심장병을 치료하기 위한 투여량은 문헌 (Tang et al. (2002) Methods 28:259-266, Philips et al. (2002) Hypertension 39:651-655, Prentice et al. (1997) Cardiovas. Res. 35:567-574, Beggah AT et al. (2002) PNAS 99:7160-7165, Monte et al. (2003) J. Physiol. 546:49-61)에서 발견될 수 있다.

따라서, 본 발명의 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드는 다양한 치료용 폴리뉴클레오티드의 심장-특이적 발현에 사용할 수 있다. 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드에 의하여 발현되는 치료용 폴리뉴클레오티드는 그 자체로 활성이거나 (예를 들면, 안티센스 및 촉매성 폴리뉴클레오티드) 또는 치료 이점이 있는 단백질을 코딩한다.

안티센스 및 촉매성 리보뉴클레오티드의 발현

코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드에 의하여 발현될 수 있는 치료용 폴리뉴클레오티드의 한 유형은 안티센스 RNA 또는 iRNA (Fire, A. (1999) Trends. Genet 15:358-363, Sharp, P. (2001) Genes Dev. 15:485-490)이다. 이러한 구체예에서는, 세포의 RNA 중합효소에 의하여 전사될 때 표적 mRNA에 결합할 수 있는 폴리뉴클레오티드에 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된다. 표적 단백질을 코딩하는 cDNA에 기초한 안티센스 서열의 유도체화는 문헌 (Stein amp; Cohen (1988) Cancer Res. 48:2659-68 및 van der Krol et al. (1988) BioTechniques 6:958-76) 등에 기재되어 있다. 표적 단백질은 일반적으로, 그의 존재가 심장병에 관여하거나 심장병의 가능성을 증가시키는 것으로 생각되는 단백질일 것이며, 예를 들면 안지오텐션 전환효소, 안지오텐신 II 수용체 또는 NF-ATC가 있다 (Stein et al. (1998) Amer. Heart J. 135:914-923, Levin et al. (1998) New Eng. J. Med. 339:321-328, Keating and Goa (2003) Drugs 63:47-70). 안티센스 분자의 심장-특이적 발현은 위험한 상태의 개인에게서 이들 단백질의 발현을 우선적으로 감소시킬 수 있다. 심장-특이적 안티센스 발현의 성공적 사용법은 설명되어 있다 (Beggah AT et al. (2002) PNAS 99:7160-7165). 이러한 접근법은 심장-특이적 발현을 써서 심장섬유증 및 심부전증을 치료하는 데에 성공적인 것으로 증명되었다 (Lee et al. (1966) Anticancer Res. 16:1805- 11).

안티센스 폴리뉴클레오티드 이외에, 리보자임은 표적 분자의 발현을 억제하도록 설계될 수 있다. 리보자임은 다른 RNA 분자를 촉매적으로 절단하는 RNA 분자이다. 따라서, 본 발명의 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드를 사용하여 리보자임을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드에 연결시킴으로써 심장-유래 세포에서 리보자임을 특이적으로 발현시킬 수 있다. I군 리보자임, 햄머헤드 리보자임, 헤어핀 리보자임, RNase P 및 액스헤드 리보자임을 비롯한 여러 종류의 리보자임이 규명되어 있다 (예를 들어 여러 리보자임의 성질의 개괄적 검토를 위하여는 문헌 (Castanotto et al. (1994) Adv. in Pharmacology 25:289-317)를 참조한다). 헤어핀 리보자임의 일반적 특징은 예를 들면 문헌 (Hampel et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18:299-304, Hampel et al., 유럽특허공 개 0 360 257 (1990), 미국특허 제5,254,678호)에 기재되어 있다. 리보자임의 제조 방법은 당분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다 (예를 들면 문헌 (Wong-Staal et al., WO 94/26877, Ojwang et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6340-44, Yamada et al. (1994) Hum. Gene Ther. 1:39-45, Leavitt et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 :699-703, Leavitt et al. (1994) Hum. Gene Ther. 5:1115-20, 및 Yamada et al. (1994) Virology 205:121-26)를 참조한다).

치료용 단백질의 발현 :

광범위하게 다양한 치료용 단백질을 심장병의 치료에 사용할 수 있다. 따라서 본 발명의 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드는 치료용 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 심장세포에서 특이적으로 발현시키는 데 사용할 수 있다. 치료용 단백질은 원핵생물, 진핵생물, 바이러스 또는 합성에 기원된 것일 수 있다. 치료용 단백질이 포유동물에서 기원한 것이 아니라면, 이 단백질의 코딩 서열은 당분야에 공지된 방법에 따라서 최대 포유동물 발현에 맞게 변형될 수 있다 (예를 들면, 포유동물 코돈 사용 및 컨센서스 번역 개시 부위).

치료용 단백질은 심장-특이적 발현이 가능하게끔 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결되어 허혈성 심장병, 고혈압 심장병, 판막심장병, 심근염, 샤가스 (Chagas) 심근병증 및 특발심근병증을 포함하나 이에 한정되지 않는, 병인이 어떠한 것이든 심장병의 치료에 성공적으로 사용될 수 있다. 이러한 치료용 단백질은 동맥 나트륨이뇨 프로펩티드 (프로-ANP)를 ANP로 전환하는 코린, 나트륨 분비 및 혈관확장을 촉진하여 혈액량 및 혈압을 낮추는 ANP, 및 B-타입 나 트륨이뇨 펩티드 (Stein et al. (1998) Amer. Heart J. 135:914-923, Levin et al. (1998) New Eng. J. Med. 339:321-328, Keating and Goa (2003) Drugs 63:47-70)와 같은 단백질 뿐만 아니라 그러한 유전자, 즉 코린의 음성 우성 형태 (Wu et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:16900-16905)가 포함되나 이에 한정되지는 않는다.

코린 발현의 조절인자의 확인

본 발명의 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드는 포유동물, 특히 인간에게서 심장혈관 고혈압, 울혈심부전증 또는 심근병증과 같은 심장 관련 질병의 조절에 유용한 신규 조절인자를 확인하는 데에 사용할 수 있다. 이러한 조절인자는 코린 유전자 발현 수준이 비정상적인 숙주를 치료하는 데에 유용하다. 코린 유전자 조절인자는 또한 기계적 신장 (mechanic stretch), 혈액량, 염 방출, 오줌양 및 혈관운동 상태와 같은 (이에 한정되는 것은 아님), 코린 유전자 발현의 수준에 의하여 영향을 받는 질병 및 상태를 치료하는 데에 유용하다. 이들 조절인자는 또한 선택된 폴리펩티드의 발현 수준과 관련하여 동물에게서 인간 질병 또는 상태를 모방하는 데에도 유용하다.

구체적으로는, 이러한 발현에 결합하여 조절하는 작용제는, 상기한 바와 같이, 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된, 루시퍼라제 등의 리포터 유전자의 전사 수준에서의 변화를 유발하는 그들의 능력에 의하여 확인될 수 있다 (실시예 2 참조).

상기 방법에서 분석된 작용제는 무작위로 선택하거나, 합리적으로 선택하거나 설계할 수 있다. 여기에 사용된 바와 같이, 작용제란 그 작용제가 어떤 특이적 서열을 고려하지 않고 무작위로 선택된 경우에 무작위로 선택되었다고 한다. 무작위로 선택된 작용제의 예는 화학 라이브러리 또는 식물 추출물 또는 유기체의 증식 브로쓰의 사용이다 (Bunin, et al. (1992) J. Am. Chem. Soc. 114:10997-10998 및 이 문헌에 결합된 참고문헌).

여기에 사용된 바와 같이, 작용제는 그 작용제의 작용과 관련하여 표적 부위의 서열 및(또는) 그 입체구조를 고려하는 비무작위적 근거에 의하여 작용제가 선택된 경우에 합리적으로 선택되거나 설계된 것이라고 한다.

유전자요법

본 발명은 시험관내 및 생체내에서 치료 목적으로 세포 내로 형질감염될 수 있는 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 이 핵산은 하기한 바와 같은 표적 세포 및 유기체의 형질감염용으로 잘 알려진 많은 벡터 중 어느 하나 내로 삽입될 수 있다. 이들 핵산은 벡터와 표적 세포의 상호작용을 통하여 생체외 또는 생체내에서 세포 내로 형질감염된다. 전형적으로, 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드와 제2의 치료상 유용한 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결하면 그 제2의 폴리뉴클레오티드의 심장-특이적 발현이 유발된다. 이 조성물을 환자에게서 치료적 반응을 유발하는 데에 충분한 양으로 환자에게 투여한다. 이를 수행하기에 적절한 양이 '치료상 유효 용량 또는 유효량'으로 정의된다.

이러한 유전자요법 절차는 여러 가지 상황에서 후천성, 선천성 유전 결함, 암 및 바이러스 감염을 바로잡는 데에 사용되어 왔다. 인간에게서 치료상 유용한 인공 유전자를 발현시킬 수 있다면 다른 요법에 의하여 치료하지 못한 많은 질병을 비롯한 많은 중요한 인간 질병의 예방 및(또는) 치유가 용이해 진다 (유전자요법 절차의 검토를 위하여는 문헌 (Anderson (1992) Science 256:808-13, Nabel amp; Felgner, TIBTECH (1993), Vol.11, pp. 211-17, Mitani amp; Caskey, TIBTECH (1993), Vol.11, pp. 162-66, Mulligan, Science (1993), Vol. 260, pp. 926-32, Dillon, TIBTECH (1993), Vol. 11, pp. 167-75, Miller, Nature (1992), Vol. 357, pp. 455-60, Van Brunt, Biotechnology (1998), Vol. 6, pp. 1149-54, Vigne, Restorative Neurol. Neurosci. (1995), Vol. 8, pp. 35-36, Kremer amp; Perricaudet, British Medical Bulletin (1995), Vol. 51, pp. 31-44, Haddada et al., in Current Topics in Microbiology and Immunology (Doerfler amp; Bohm eds., 1995), 및 Yu et al., Gene Therapy (1994), Vol. 1, pp. 13-26)을 참조한다).

유전자 또는 유전 물질을 세포 내로 운반하는 것이 유전자요법-기초 질병 치료에 있어서 제1 단계이다. 많은 운반 방법이 당분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다. 바람직하게는, 핵산을 생체내 또는 생체외 유전자요법 사용을 위하여 투여한다. 비바이러스성 벡터 운반계에는 DNA 플라스미드, 나(naked) 핵산, 및 리포솜과 같은 운반 비이클과 복합체를 형성한 핵산이 있다. 바이러스 벡터 운반계에는 DNA 및 RNA 바이러스가 있으며, 세포로의 운반 후에 에피솜 또는 통합된 유전체를 갖는다.

핵산의 비바이러스 운반법에는 리포펙션, 마이크로주입, 유전자총 (biolistics), 비로솜, 리포솜, 이뮤노리포솜, 다가양이온 또는 지질:핵산 융합체, 네이키드(naked) DNA, 인공 바이론 및 작용제에 의하여 향상된 DNA의 획득 등이 있다. 리포펙션은 예를 들면, 미국특허 제5,049,386호, 제4,946,787호 및 제4,897,355호에 기재되어 있으며, 리포펙션 시약은 시판된다 (예를 들면, Transfectam™ 및 Lipofectin™). 폴리뉴클레오티드의 효율적인 수용체-인식 리포펙션에 적합한 양이온 및 중성 지질에는 펠그너 (Felgner) WO 91/17424 및 WO 91/16024의 것들이 있다. 운반은 세포 (생체외 투여) 또는 표적 조직 (생체내 투여)로 이루어질 수 있다.

이뮤노지질 복합체와 같은 표적화된 리포솜을 비롯한 지질:핵산 복합체의 제조는 당분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다 (예를 들면, Crystal, Science (1995), Vol. 270, pp. 404-10, Blaese et al., Cancer Gene Ther. (1995), Vol. 2, pp. 291-97, Behr et al., Bioconjugate Chem. (1994), Vol. 5, pp. 382-89, Remy et al., Bioconjugate Chem. (1994), Vol. 5 pp. 647-54, Gao et al., Gene Therapy (1995), Vol. 2 pp. 710-22, Ahmad et al., Cancer Res. (1992), Vol. 52, pp. 4817-20, 미국 특허 제4,186,183호, 제4,217,344호, 제4,235,871호, 제4,261,975호, 제4,485,054호, 제4,501,728호, 제4,774,085호, 제4,837,028호 및 제4,946,787호를 참조한다).

RNA 또는 DNA 바이러스를 기초로한 핵산 운반계를 사용하면, 체내에서 바이러스를 특이적 세포로 표적화하고 바이러스 탄두 (payload)를 핵으로 보내는 매우 발달된 방법을 이용한다. 바이러스 벡터는 직접 환자에게 투여될 수 있거나 (생체내) 또는 이들을 사용하여 시험관내 세포를 처리하여 변형된 세포를 환자에게 투여할 수 있다 (생체외). 바이러스에 기초한 전통적인 핵산 운반계는 유전자 전달용 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노관련 및 단순포진바이러스벡터를 포함할 수 있다. 바이러스 벡터는 현재 표적 세포 및 조직에 유전자를 전달하는 가장 효

율적이고 훌륭한 방법이다. 숙주 유전체로의 통합은 레트로바이러스, 렌티바이러스, 및 아데노관련 바이러스 유전자 전달법을 사용하는 경우 가능하여, 종종 삽입된 형질도입 유전자의 장기간 발현을 가져온다. 또한, 높은 형질도입률이 많은 상이한 세포 유형 및 표적 조직에서 관찰되었다. 특히, 임상 시험에서 유전자 전달용으로 현재 사용할 수 있는 적어도 6 개의 바이러스 벡터 접근법이 있으며, 레트로바이러스 벡터가 월등히 가장 빈번히 사용되는 운반계이다. 이들 바이러스 벡터는 전부 헬퍼 세포주 내로 삽입된 유전자에 의한 결함 벡터의 보완하여 형질도입제를 생성하는 것을 포함하는 접근법을 이용한다.

레트로바이러스의 향성 (tropism)은 외래 엔벨로프 단백질을 도입하여 변경될 수 있는데, 이는 표적 세포의 잠재적인 표적 집단을 확장한다. 렌티바이러스 벡터는 미분열된 세포를 형질도입 또는 감염시킬 수 있고 전형적으로는 높은 바이러스 역가를 낳을 수 있는 레트로바이러스 벡터이다. 따라서, 레트로바이러스 유전자 전달계의 선택은 표적 조직에 따라서 달라질 것이다. 레트로바이러스 벡터는 최대 6 - 10 kbp의 외래 서열에 대한 포장능이 있는 시스-작용성 긴 말단 반복부로 구성된다. 최소 시스-작용성 LTR는 벡터의 복제 및 포장에 충분하며, 이는 다시 치료용 유전자를 표적 세포에 통합하는 데에 사용하여 영구적인 형질도입 발현을 제공할 수 있다. 널리 사용되는 레트로바이러스 벡터는 뮤린 백혈병 바이러스 (MuLV), 긴팔원숭이 백혈병 바이러스 (GaLV), 원숭이 (simian) 면역결핍 바이러스 (SIV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 및 이들의 조합이 있다 (예를 들어 문헌 (Buchscher et al., J. Virol. (1992), Vol. 66, pp. 2731-39, Johann et al., J. Virol. (1992), Vol. 66, pp. 1635-40, Sommerfelt et al., Virology (1990), Vol. 176, pp. 58-59, Wilson et al., J. Virol. (1989), Vol. 63, pp. 2374-78, Miller et al., J. Virol. (1991), Vol. 65, pp. 2220-24, PCT/US94/05700)를 참조한다).

pLASN 및 MFG-S는 임상시험에 사용된 레트로바이러스 벡터의 예이다 (Dunbar et al., Blood (1995), Vol. 85, pp. 3048-57, Kohn et al., Nat. Med. (1995), Vol. 1, pp. 1017-23, Malech et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997), Vol. 94, pp. 12133-38). PA317/pLASN은 유전자요법 시험에 사용된 첫번째 치료용 벡터이었다 (Blaese et al., Science (1995), Vol. 270, pp. 475-80). 50 % 또는 그 이상의 형질도입율이 MFG-S 포장된 벡터에 대해 관찰된 바 있다 (Ellem et al., Immunol. Immunother. (1997), Vol. 44, pp. 10-20, Dranoff et al., Hum. Gene Ther. (1997), Vol. 1, pp. 111-23).

핵산의 일시적 발현이 바람직한 분야에서는, 아데노바이러스에 기초한 계가 사용되는 것이 전형적이다. 아데노바이러스에 기초한 벡터는 많은 세포 종류에서 매우 높은 형질도입율을 달성할 수 있으며, 세포 분열을 필요로 하지 않는다. 이러한 벡터에 의하여 높은 역가 및 발현량이 얻어졌다. 이 벡터는 상대적으로 단순한 계에서 다량으로 생성될 수 있다. 아데노바이러스-관련 바이러스 ('AAV') 벡터는 또한 예를 들어 핵산 및 펩티드의 시험관내 제조에 있어서 및 생체내 및 생체외 유전자요법 절차에 있어서, 표적 핵산으로 세포를 형질도입하는 데에 사용된다 (예 를 들면 문헌 (West et al., Virology (1987), Vol. 160, pp. 38-47, 미국특허 제4,797,368호, WO 93/24641, Kotin, Hum. Gene Ther. (1994), Vol. 5, pp. 793-801, Muzyczka, J. Clin. Invest. (1994), Vol. 94, pp. 1351)를 참조한다). 재조합 AAV 벡터의 제작은 미국특허 제5,173,414호, 문헌 (Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. (1985), Vol. 5, pp. 3251-60, Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. (1984), Vol. 4,pp. 2072-81, Hermonat amp; Muzyczka, Proc.Natl. Acad. Sci. USA. (1984), Vol. 81, pp. 6466-70, 및 Samulski et al, J. Virol. (1989), Vol. 63, pp. 3822-28)을 비롯한 많은 문헌에 기재되어 있다.

재조합 아데노-관련 바이러스 벡터 (rAAV)는 결핍 비병원성 파르보바이러스 아데노-결합 2형 바이러스에 기초한 유망한 대안적인 유전자 전달계이다. 모든 벡터들이 형질도입유전자 발현 카세트를 플랭킹하는 AAV 145 bp 역전 (inverted) 말단 반복부만을 보유한 플라스미드로부터 유래된다. 형질도입되는 세포의 유전체 내로의 통합으로 인한 안정한 형질도입유전자 운반 및 효율적인 유전자 전달이 이 벡터계의 중요한 특징이다 (Wagner et al, Lancet (1998), Vol. 351, pp. 1702-03, Kearns et al., Gene Ther. (1996), Vol. 9, pp. 748-55).

복제-결핍 재조합 아데노바이러스 벡터 (Ad)는 일시적 발현 유전자요법에 주로 사용되는데, 왜냐하면 이들은 높은 역가로 제조될 수 있으며, 많은 다른 세포 종류를 쉽게 감염시키기 때문이다. 대부분의 아데노바이러스 벡터들은 Ad E1a, Elb 및 E3 유전자가 형질도입유전자로 대체되게끔 조작되며, 이어서, 이 복제 결핍 벡터는 결실된 유전자 기능을 트랜스로 공급하는 인간 293 세포에서 번식된다. Ad 벡터는 간, 신장 및 근육계 조직에서 발견되는 것들과 같은 미분할하는 분화된 세포를 비롯하여 생체내 다수 조직 형태에 형질도입할 수 있다. 전통적인 Ad 벡터는 운반 능력 (carrying capacity)이 크다. 임상시험에서 Ad 벡터의 사용례는 근육내 주사를 통한 폴리뉴클레오티드 항종양 면역요법을 수반하였다 (Sterman et al., Hum. Gene Ther. (1998), Vol. 9, pp. 1083-92). 임상시험에서 유전자 전달에 아데노바이러스 벡터를 사용한 다른 예로는 문헌 (Rosenecker et al., Infection (1996), Vol. 241, pp. 5-10, Welsh et al., Hum. Gene Ther. (1995), Vol. 2, pp. 205-18, Alvarez et al., Hum. Gene Ther. (1997), Vol. 5, pp. 597-613, Topf et al., Gene Ther. (1998), Vol. 5, pp. 507-13, Sterman et al., Hum. Gene Ther. (1998), Vol. 9, pp. 1083-89)이 있다.

많은 유전자요법 응용분야에서, 유전자요법 벡터는 특정한 조직 형태에 고도의 특이성을 갖고 운반되는 것이 바람직하다. 바이러스 벡터는 그 바이러스의 외부 표면 상에 바이러스 코트 단백질과의 융합단백질로서 리간드를 발현시켜서 소정의 세포 형태에 대한 특이성을 갖도록 변형되는 것이 일반적이다. 그 리간드는 관심있는 세포 형태 상에 존재

하는 것으로 알려진 수용체에 대한 친화성을 갖는 것이 선택된다. 예를 들면, 문헌 (Han et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995), Vol. 92, pp. 9747-51)은 몰로니 (Moloney) 뮤린 백혈병 바이러스를 gp70에 융합된 인간 헤레굴린을 발현하도록 변형할 수 있으며, 이 재조합 바이러스는 인간 상피 증식 인자 수용체를 발현하는 특정한 인간 유방암 세포를 감염시킨다는 것을 보고하였다. 이 원리는 리간드 융합단백질을 발현하는 바이러스와, 수용체를 발현하는 표적 세포의 다른 쌍에 확장될 수 있다. 예를 들면, 필라멘트형 파아지는 사실상 모든 선택된 세포 수용체에 대한 특이적 결합 친화성이 있는 항체 단편 (예를 들면, Fab 또는 Fv)을 드러내도록 조작될 수 있다. 위의 설명이 바이러스 벡터에 주로 적용되지만, 동일한 원리가 비바이러스 벡터에도 적용될 수 있다. 그러한 벡터로는 특이적 표적 세포에 의한 획득을 돕는 것으로 생각되는 특이적 획득 서열을 포함하도록 조작될 수 있다.

제약 조성물 및 투여

본 발명은 또한 코린 발현조절 영역, 또는 이 발현조절 영역을 포함하는 벡터를 제약상 허용되는 담체와 함께 포함할 수 있는 제약 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 한 구체예에서 제약상 허용되는 담체는 제약상 불활성이다.

유전자요법 벡터는 후술한 바와 같이, 개별적인 환자에게 투여, 전형적으로는 전신 투여 (예를 들면, 정맥내, 복막내, 근육내, 피하, 또는 두개내 주입) 또는 국소 투여에 의하여 생체내 전달될 수 있다. 다르게는, 벡터는 개별 환자로부터 체외이식된 세포 (예를 들면, 림프구, 골수 흡인물, 조직 생검) 또는 보편적 공여자 조혈간세포와 같은 생체외 세포로 운반한 후 이 세포를 환자에게로, 일반적으로는 벡터가 도입된 세포를 선택한 후에, 재이식할 수 있다.

진단, 연구 또는 유전자요법을 위한 생체외 형질감염 (예를 들면, 숙주 유기체 내로 형질감염된 세포를 재주입하는 것을 통하여)은 당분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다. 바람직한 구체예에서는 대상 유기체로부터 세포를 단리하여 핵산 (유전자 또는 cDNA)으로 형질감염시킨 후, 대상 유기체 (예를 들면, 환자)에로 도로 재주입한다. 생체외 형질감염에 적합한 여러 가지 세포 형태는 당분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다 (환자로부터 세포를 단리하여 배양하는 방법에 관한 설명에 관해서는 예를 들면, 문헌 (Freshney et al., Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, 3rd ed., 1994) 및 거기에 인용된 참고문헌을 참조한다).

치료용 핵산을 포함하는 벡터들 (예컨대, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 리포솜 등)은 생체내 세포의 형질도입을 위하여 유기체에 직접 투여될 수도 있다. 이와 다르게는, 네이키드 DNA가 투여될 수 있다. 투여는 분자를 혈액 또는 조직세포와 궁극적인 접촉을 하도록 도입하는 데에 통상 사용되는 임의의 경로에 의한다. 그러한 핵산을 투여하는 적합한 방법을 사용할 수 있으며 당분야의 숙련자에게 잘 알려져 있고, 하나 이상의 경로를 사용하여 특정한 조성물을 투여할 수 있지만, 특정한 경로가 종종 다른 경로보다 더 즉각적이고 더 효과적인 반응을 제공할 수 있다.

제약상 허용되는 담체는 부분적으로는 투여되는 특정 조성물 (예를 들면, 핵산, 단백질, 조절 화합물 또는 형질감염된 세포)뿐만 아니라 그 조성물을 투여하는데에 사용되는 특정한 방법에 의하여 결정된다. 따라서, 본 발명의 제약 조성물의 매우 다양한 적합한 제형이 있다 (예를 들면, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989 참조한다). 투여는 예를 들면, 주사, 경구 투여, 흡입 또는 경피 도포 등 임의의 통상적인 방식으로 할 수 있다.

경구 투여에 적합한 제형은 (a) 액체 용액제, 예컨대 물, 염수 또는 PGE400과 같은 희석제 중에 현탁된 포장된 핵산의 유효량, (b) 각기 소정량의 활성 성분 을 액체, 고체, 과립 또는 겔라틴으로서 함유하는, 캡슐제, 사세제 또는 정제, (c) 적합한 액체 중의 현탁액제, 및 (d) 적합한 에멀젼제로 이루어질 수 있다. 정제 형태는 락토오스, 수크로오스, 만니톨, 소르비톨, 인산칼슘, 옥수수 전분, 감자 전분, 미세결정 셀룰로오스, 겔라틴, 콜로이드성 이산화규소, 활석, 스테아르산마그네슘, 스테아르산 및 그외 부형제, 착색제, 충전제, 결합제, 희석제, 완충제, 보습제, 방부제, 풍미제, 염료, 붕해제, 및 제약상 허용되는 담체 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 로젠지 형태는 수크로오스 등의 향 (flavor)에 활성 성분을 포함할 수 있을 뿐만 아니라 겔라틴 및 글리세린 또는 수크로오스와 같은 불활성 기제 중에 활성 성분을 포함하는 파스틸제 및 활성 성분외에 당분야에 공지된 담체를 함유하는 아카시아 에멀젼제, 겔 등을 포함할 수 있다.

다른 적합한 성분과 함께 또는 단독으로 선택된 화합물을 흡입하여 투여될 수 있도록 에어로졸 제형 (즉, 이들은 분무될 수 있음 ('nebulized'))으로 만들 수 있다. 에어로졸 제형은 디클로로디플로로메탄, 프로판, 질소 등과 같은 가압된 허용되는 추진기 내에 넣을 수 있다.

관절내 (관절에), 정맥내, 근육내, 피내, 복막내 및 피하 경로 등과 같은 비경구 투여에 적합한 제형에는 수성 및 비수성 등장성 멸균 주사 용액제 (이는 산화방지제, 완충제, 멸균제, 및 염두에 둔 복용자의 혈액과 제형이 등장성이 되게 하는 용질을 포함할 수 있음) 및 수성 및 비수성 멸균 현탁제 (현탁화제, 용해화제, 증점제, 안정화제 및 방부제를 포함할 수 있음)가 있다. 본 발명의 실시에 있어서, 조성물은 정맥내 주입, 경구, 국소, 복막내, 방광내 또는 경막내 등을 통해 투 여할 수 있다. 비경구 투여 및 정맥내 투여가 바람직한 투여 방법이다. 조성물의 제형은 앰플 및 바이알과 같은 단위용량 또는 다용량 밀봉 용기 중에 제공될 수 있다.

주사 용액제 및 현탁액제는 멸균 산제, 과립제, 및 상기한 종류의 정제로부터 제조될 수 있다. 생체외 요법을 위하여

핵산에 의하여 형질도입된 세포는 상기한 바와 같이 정맥내 또는 비경구 투여될 수도 있다.

본 발명의 맥락에서 환자에게 투여되는 용량은 시간에 따라 환자에게서 유익한 치료 반응을 수행하기에 충분해야 한다. 이 용량은 사용된 특정한 벡터의 효능 및 환자의 상태 뿐만 아니라 치료할 환자의 체중 및 표면적에 의하여 결정될 것이다. 용량의 크기는 또한 특정한 환자에게 특정한 벡터 또는 형질도입된 세포를 투여하는 데에 수반되는 임의의 부작용의 존재, 성질 및 정도에 의하여 결정될 것이다.

투여될 벡터의 유효량을 결정하는 데 있어서, 의사는 순환하는 혈장 벡터량, 벡터 독성, 질병의 진행, 및 항-벡터 항체의 생성을 평가한다. 일반적으로, 벡터에서 유래한 나 핵산에 동등한 용량은 전형적인 70 kg 환자에게 있어서, 약 1 μg 내지 100 μg이며, 레트로바이러스 입자를 포함하는 벡터의 용량은 동등량의 치료용 핵산을 얻도록 계산된다.

투여를 위하여, 본 발명의 화합물 및 형질도입된 세포는 억제인자, 벡터 또는 형질도입된 세포 형태의 LD-50에 의하여, 그리고 환자의 체중과 전반적 건강상태에 적용되는, 여러 농도에서의, 억제인자, 벡터 또는 세포 형태의 부작용에 의하 여 결정되는 속도로 투여할 수 있다. 투여는 단일용량 또는 분할용량을 통해 수행될 수 있다.

키트

본 발명은 또한 본 발명의 상기한 조성물의 하나 이상의 성분들로 채워진 용기 하나 이상을 포함하는 제약 팩 및 키트에 관한 것이다. 정부기관에 의한 인간 투여용 제품의 제조, 사용 또는 판매 허가를 반영하는, 의약품이나 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부기관에 의해 규정된 형태의 지시서가 그러한 용기에 수반될 수 있다.

형질전환 마우스

본 발명의 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드는 형질전환 포유동물, 바람직하게는 마우스를 제조하는 데에도 사용될 수 있다. 이러한 형질전환 유기체는 예를 들면, 그러한 폴리뉴클레오티드의 발현 및(또는) 활성을 조절하는 작용제를 확인 및(또는) 특징분석하는 데 등에 유용하다. 형질전환 동물은 심장병 상태에 대한 모델로서도 유용하다. 여기에 공개된 본 발명은 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 복제본을 자신의 유전체 내에 포함하는 비인간 형질전환 동물에 관한 것이다. 본 발명의 형질전환 동물은 폴리뉴클레오티드의 여러 카피를 자신의 유전체 내에 포함할 수 있다.

바람직한 구체예에서는 그 형질전환 동물이 자신의 유전체 내에 인간 코린 유전자의 발현조절 영역을 포함한다. 다양한 비인간 형질전환 유기체가 본 발명에 의하여 포괄되는데, 예를 들면, 초파리, C. 엘레강스, 제브라피쉬 및 효모 등이 있 다. 본 발명의 형질전환 동물은 바람직하게는 포유동물, 예컨대, 소, 염소, 양, 토끼, 비인간 영장류, 또는 쥐, 가장 바람직하게는 마우스이다.

형질전환 동물을 생산하는 방법은 당분야의 숙련자에게 잘 알려져 있으며, 예컨대, 상동성 재조합, 돌연변이유발법 (예를 들어, ENU, Rathkolb et al. (2000) Exp. Physio., 85:635-644), 및 테트라시클린-조절 발현계 (예컨대, 미국특허 제6,242,667호)가 있으며, 여기에 상세히 기재하지는 않을 것이다 (예를 들어, Wu et al, Methods in Gene Biotechnology, CRC 1997, pp. 339-366, Jacenko, O., Strategies in Generating Transgenic Animals, in Recombinant Gene Expression Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 62, Humana Press, 1997, pp. 399-424를 참조한다).

본 발명은 또한 리포터 서열에 작동가능하게 연결된 인간 코린 유전자의 발현조절 영역을 그 유전체 내에 포함하며, 이 조절 영역이 그 리포터 서열의 전사를 개시, 종결 또는 조절하는 데에 효과적인 것인, 비인간 녹아웃 동물에 관한 것이다.

그 조절 서열과 작동가능하게 연결된 리포터 서열의 기능적 붕괴는 임의의 효과적인 방식, 예를 들어, 생성되는 폴리펩티드가 (예를 들면 촉매 도메인, 리간드 결합 도메인 등이 없기 때문에) 생물학적으로 불활성이 되게끔 코딩 서열의 임의의 부분 내로 종지 코돈을 도입하거나, 프로모터 또는 그외 조절 서열을 잠그는 데에 효과적인 돌연변이의 도입, 또는 외래 유전자인 리포터 서열을 그 전사를 불활성화하는 리포터 서열로의 전사를 감소시키는 것을 포함하는 방식으로 수행할 수 있다. 유전자를 기능적으로 붕괴시킨 형질전환 동물의 예는 예를 들어, 미국특허 제6,239,326호, 제6,225,525호, 제6,207,878호에 기재된 바와 같이, 잘 알려져 있다.

추가의 노력없이도 당분야의 숙련자라면 상기 설명을 이용하여 본 발명을 완전한 정도로 이용할 수 있을 것으로 생각된다. 모든 실시예는 달리 상세하게 설명된 것을 제외하면, 당분야에 잘 알려진 표준적인 기술을 사용하여 수행되었다. 다음의 실시예의 통상적인 분자생물학 기술들은 문헌 (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)와 같은 표준적인 실험실 매뉴얼에 기재된 바와 같이 수행할 수 있다.

따라서 다음의 바람직한 특정한 구체예는 나머지 공개내용을 어떤 방식으로든 조금이라도 제한하는 것이 아니라 단순히 예시하는 것으로서 고려되어야 한다. 상기 인용된 모든 출원, 특허 및 문헌의 전체 공개내용은 언급함으로써 여기에 도입한다.

<실시예 1: 5'-플랭킹 영역을 포함하는 인간 및 마우스 코린 유전자의 단리 및 특징분석>

인간 및 마우스 코린 유전자 및 이들의 5'-플랭킹 영역을 클로닝하기 위하여, 코린 cDNA 서열의 5'- 및 3'-단부에 상응하는 특이적 올리고뉴클레오티드를 합성하였다. 이들 올리고뉴클레오티드 프라이머를 인간 또는 마우스 유전체 DNA를 사용하는 PCR-기초 반응에서 특이적 생성물을 증폭시키는가에 대해 시험하였다. PCR 반응은 30 주기의 증폭 (94 ℃에서 1-분 변성, 50 ℃에서 1 분 냉각 (annealing) 및 72 ℃에서 1 분 연장 (extension)) 및 72 ℃에서 마지막 7분간 연장의 PCR 리에이전트 시스템 (Life Technologies Inc.)을 사용하여 수행하였다. 그 다음, 특이적 PCR 생성물을 성공적으로 증폭시킨 프라이머쌍을 PCR-기초 선별에 사용하여 인간 또는 마우스 코린 유전자 및(또는) 이들의 발현조절 영역을 포함하는 BAC 클론을 확인하였다. BAC 클론으로부터의 DNA 단리는 제조자의 지시 (Incyte Genomics, 미국 캘리포니아 팔로알토 소재)에 따라서 수행했다. 확인된 양성 세균 인공 염색체 (BAC) 클론을 ^{32}P-표지 인간 및 마우스 코린 cDNA 프로브를 사용하는 서던 분석에 의하여 추가로 확증하였다. BAC 클론은 샷-건법을 통해 직접 서열분석하거나 서열분석을 위하여 pUC118 (PanVera/Takara, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)로 서브클로닝하였다. 샷-건 서열의 조립은 스타덴 소프트웨어 팩키지를 사용하여 수행하였다 (MRC Laboratory of Molecular Biology, Bonfield et al. (1995) Nucleic Acid Res. 23:4992-4999).

PCR-기초 선별을 통하여 두 개는 인간 코린 유전자를, 두 개는 마우스 코린 유전자를 포함하는 4개의 BAC 클론을 얻었다. 3 개의 BAC 클론을 염료 터미네이터 화학을 사용하여 샷-건법으로 서열분석하였다. 샷-건 데이타를 공개적으로 사용가능한 추적 파일 정보 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/Traces/trace.cgi , http://trace.ensembl.org)와 함께 병용하여 인간 코린 유전자를 포함하는 340 kb의 연속 서열, 및 마우스 코린 유전자의 경우 5 개의 콘티그를 조립하였다. 5 콘 티그의 순서는 각기 이웃하는 콘티그에서 짝을 이루는 여러 판독 쌍의 존재를 통해 확증하였다. 이들의 거리로 인하여, 틈의 크기가 500 bp 미만인 것으로 결정할 수 있었는데, 이는 공공 샷-건 라이브러리의 삽입부 크기가 잘 정의되어 있기 때문이다. 그 다음 인간 및 마우스 코린 유전자의 구조를 분석하였다. 그러나, 340 kb 인간 유전체 서열은 5'-플랭킹 영역을 포함하지 않았다. 추가의 4165 bp Hind III-EcoRI 단편은 BAC 26540으로부터 단리하였는데, 이는 5'-플랭킹 영역의 처음 3919 bp, 엑손 1의 전부 및 인트론 1의 일부 (상표명 젠뱅크 (GenBank™)/EBI 데이타 뱅크에 수탁번호 AF521006로 제출됨)를 포함하였다.

코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드 (서열 4, 서열 5 및 서열 6)는 모두, PCR-기초 방법, 또는 제한효소 소화, 또는 이 둘의 병용에 의하여, BAC26540에서 단리된 4165 bp Hind III-EcoR I 단편 (도 8a 내지 8b, 서열 2)에서 유래되었다. 예를 들면, 여기에 기재된 4023 bp 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드 (서열 6는 프라이머 F1 (5'-AAGCTTCATGAGGGCAGGAG-3') (서열 7) 및 R1 (5'-GAGCTCGCTTATTCTTCTGTCCACTT-3') (서열 8)을 사용하여 4165 bp Hind III-EcoR I 단편 또는 인간 유전체 DNA로부터 증폭시켰다. 여기에 기재된 1283 bp 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드 (서열 5)는 프라이머 F2 (5'-AAGCTTATAAAAATAATAGCTTCTTC-3') (서열 9) 및 R1을 써서 4165 bp Hind III-EcoR I 단편 또는 인간 유전체 DNA로부터 증폭시켰다. 여기에 기재된 391 bp 코린 발현조절 영역 폴리뉴클레오티드 (서열 4)는 프라이머 F3 (5'-AAGCTTAGTAACTCTTTTGCTCCCAA-3') (서열 10) 및 R1를 써서 4165 bp Hind III-EcoR I 단편 또는 인간 유전체 DNA로부터 증폭시켰다. DNA를 쉽게 추출해 낼 수 있는, 백혈구와 같은 임의의 포유동물 조직이 포유동물 코린 폴리뉴클레오티드의 단리를 위한 유전체 DNA의 적합한 공급원이다.

<실시예 2: 5'-플랭킹 영역의 프로모터 활성>

코린 유전자의 5'-플랭킹 영역의 프로모터 활성은 인간 또는 마우스 코린 유전자의 5'-플랭킹 영역의 연속적으로 말단절단된 단편을 프로모터 없는 루시퍼라제 유전자에 연결한 리포터 제작물을 제조하여 시험하였다 (도 4a 참조). 인간 코린 프로모터 리포터 제작물인 hCp1297LUC (개똥벌레 루시퍼라제 유전자에 연결된 1283 bp 코린 발현조절 영역 (서열)) 및 hCp405LUC (개똥벌레 루시퍼라제 유전자에 연결된 391 bp 코린 발현조절 영역 (서열))을 두 단계, 즉 첫째, (번역개시 코돈 ATG를 기준으로) -1297 또는 -405 내지 -15의 인간 코린 유전자의 5'-플랭킹 영역을 Sac I 및 Hind III 제한 부위를 각기 포함하는 프라이머를 사용하여 PCR-기초 클로닝하고, 둘째, 각각의 PCR 생성물을 pGL3-기재 벡터 (Promega, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)의 Sac I 및 Hind III 부위 내로 삽입하여 생성하였다.

이와 유사하게, 마우스 코린 프로모터 제작물, mCp1183LUC, mCp809LUC 및 mCp646LUC도 상기한 PCR-기초 클로닝법에 의하여 만들어졌다. 이들 제작물을 위한 플라스미드는 엔도프리 플라스미드 맥시 키트 (EndoFree Plasmid Maxi kit, 미국 캘리포니아주 발렌시아 소재한 퀴아겐 (Qiagen) 제품)를 사용하여 제조하였다. HL-5 세포의 형질감염 (Claycomb et al. (1998) Proc. Nati. Acad. Sci., USA 95:2979-2984)은 제조자의 지시 (Life Technologies)에 따라서 리포펙틴-기초 방법 을 사용하여 수행했다. 간략하게 설명하면, 각각의 코린 리포터 제작물 10 ug DNA + pRL-SV40 (Promega, 미국 위스콘신주 매디슨 소재) 0.1 ug을 OPTI-MEM I 환원된-혈청 배지 1 ml 중에 리포펙틴 20 ug과 혼합하였다. 이 혼합물을 실온에서 30 분간 인큐베이션한 후 6-웰 플레이트의 한 웰에서 70 % 전면 (con

fluent) 배양된 HL-5에 첨가하였다. 6 시간 인큐베이션 후, 그 배지를 새 엑스-셀 (Ex-Cell) 320 배양 배지로 교체하고, 30 시간 후에 형질감염된 세포를 수확하여 개똥벌레 및 레닐라 루시퍼라제 활성에 대해 분석하였다. 제조자의 지시 (Promega)에 따라서 이중 루시퍼라제 활성 분석을 수행하였다. 간략하게 설명하면, 새로 희석된 수동 용균 완충액 250 ul을 써서 형질감염된 세포를 용균하여 세포 추출물을 제조하였다. 이 용균물을 한번씩 냉동 및 해동한 후 5 분 동안 13,000 rpm에서 원심분리하여 세포 파편을 펠렛화하였다. 상층물을 새로운 튜브로 옮기고, 이 상층물의 20 ul 분액을 이중-루시퍼라제 리포터 분석계를 써서 분석하였다. 이 샘플의 발광은 마이크로플레이트 발광계 LB96 V (E Gamp;G Berthold)로 관찰하고, 10 초의 존속기간 동안 광 생성 (상대적 광 단위)을 측정하였다. 각 세포 추출물을 3벌씩 분석하였다. 각 제작물마다 각각의 형질감염 실험을 3벌씩 수행하였다. 개똥벌레 루시퍼라제 활성을 레닐라 루시퍼라제 활성에 대해 정규화하였다.

도 4b에 나타낸 바와 같이, 인간 코린 리포터 제작물 hCP1297LUC 및 hCP405LUC는 pGL3-기재 형질감염된 세포에서의 배경보다 상당히 더 높은 루시퍼라제 활성을 촉진하였다. 이와 마찬가지로, 마우스 리포터 제작물인 mCp1183LUC, mCp809LUC, 및 mCp646LUC도 인간 제작물의 것에 필적하는 상당한 루시퍼라제 활성 을 촉진하였다. 이들 데이타는 프로모터 활성의 대부분을 책임지는 시스 서열이 인간과 마우스 코린 유전자에서 각기 뉴클레오티드 -405 내지 -15 또는 뉴클레오티드 -646 내지 -17 사이에 위치함을 암시한다.

<실시예 3: 심장-특이적 발현의 증명>

제작물이 심장-특이적 발현을 매개하는가를 결정하기 위하여, 코린 mRNA 및 단백질을 발현하지 않는 HeLa 세포 (ATCC 제CCL2호)를 상기한 제작물로 형질감염시켰다. 제작물 hCp405LUC 및 mCp646LUC은 HL-5 세포에서 활성이 높은 것과 대조적으로, HeLa 세포에서 최소한의 프로모터 활성만을 갖는다 (도 5). 대조구로서, 동시에 형질감염된 pRL-SV40은 HL-5 세포에서보다 HeLa에서 더 높은 수준의 레닐라 루시퍼라제 활성을 촉진하였는데, 이는 HeLa 세포가 이들 실험에서 HL-5 세포만큼 용이하게 형질감염되었음을 지시한다. 이들 결과는 인간 코린 유전자의 -405 내지 -15 또는 마우스 코린 유전자의 -646 내지 -77의 5'-플랭킹 영역이 배양된 심근세포에서의 특이적 발현에 충분한 요소를 포함함을 지시한다.

<실시예 4: GATA-4에 결합하는 인접 GATA 요소가 코린 프로모터의 최적 기능에 필요함>

인간 코린 유전자의 -405 내지 -15 또는 마우스 코린 유전자의 -646 내지 -77의 5'-플랭킹 영역은 배양된 심근세포에서는 유전자 발현의 높은 수준을 촉진하기에 충분하였으나 HeLa 세포에서는 그렇지 않았다. 이는 이들 영역이 심근세포-특이적 발현을 책임지는 조절 요소를 포함함을 암시한다. 이들 영역의 검사를 통해 보존된 GATA 컨센서스 서열 (인접 GATA 서열로 명명함)이 밝혀졌다.

인접 GATA 서열이 실제로 GATA 단백질에 결합하는가를 결정하기 위하여, 본 발명자들은 문헌 (Schreiber E. et al., (1989) Nucleic Acids Res. 17:6419)에 기재된 바와 같이, 지수적으로 증식하는 HL-5 세포로부터 핵 추출물을 제조하고 잘 특징분석된 컨센서스 GATA 올리고뉴클레오티드 프로브 (Redondo, J. M. et al. (1990) Science 247 (4947), 1225-9) 및 인접 GATA 서열 각각을 포괄하는 프로브를 써서 경쟁 전기영동 이동도 추이분석을 수행하였다 (도 6a). 두 개의 컨센서스 GATA 서열 또는 돌연변이된 GATA 서열 (GATA에서 CTTA로)을 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오티드 프로브를 산타쿠르즈 바이오테크놀로지 (Santa Cruz Biotechnology)사로부터 구입하였다. 인간 또는 마우스 코린 GATA (각각 서열 11 및 13), 또는 돌연변이된 인간 또는 마우스 코린 GATA (GATA에서 CTTA로)(각각 서열 12 및 14) 서열을 포괄하는 프로브 (도 6a 참조)를 합성하여 HPLC로 정제하였다. 이들 올리고뉴클레오티드 프로브를 [감마- ^{32}P]ATP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech)를 써서 T4 폴리뉴클레오티드 키나제 (Life Technologies)로 5'-단부를 표지하였다. 겔 이동도 추이분석은 상기한 바와 같이 수행하였다 (Pan, J. amp; McEver R. P. (1993) J. Biol. Chem. 268:22600-22608). 기대된 바와 같이, 표지된 컨센서스 GATA 프로브 (서열 15)는 HL-5 세포의 핵 추출물과 인큐베이션시에 서열-특이적 DNA-단백질 복합체를 형성했다. 이 복합체의 형성은 무관한 GAS요소가 아닌 100 배 과량의 비표지된 프로브의 첨가에 의하여 방지되었다. 복합체 형성은 무손상 GATA 서열에 좌우되었데, 왜냐하면 GATA 서열에서의 돌연변이가 이 복합체의 형성을 폐지하였기 때문이다. 또한, 이 복합체는 인간 또는 마우스 인접 GATA 서열을 포함하는 100 배 과량의 비표지 프로브의 존재하에서는 검출되지 않았다. 반대로, 돌연변이 인접 GATA 서열 (서열 12 및 14)를 포괄하는 100 배 과량의 비표지 프로브는 복합체 형성에 대해 극미한 영향만 주었다. 이들 데이타는 코린 인접 GATA 서열 및 컨센서스 GATA 프로브가 공통된 GATA 단백질(들)에 결합함을 지시한다.

어떤 GATA 단백질(들)이 복합체에 포함되었는지를 결정하기 위하여, 본 발명자들은 GATA족에 속하는 것들에 대한 항체의 존재하에 표지된 컨센서스 GATA 프로브를 써서 EMSA를 수행하였다. 마우스 GATA-1 (SC-1234x), GATA-3 (SC-268x), GATA-4 (SC-12237x) 및 GATA-6 (SC-7244x)에 대한 항체는 산타쿠르즈 바이오테크롤로지 (미국 캘리포니아주 산타쿠르즈 소재)에서 입수하였다. 도 6c에 나타낸 바와 같이, GATA-4에 대한 항체가 복합체 형성을 현저히 억제한 반면, GATA-1, -3 및 -6에 대한 항체는 거의 영향이 없었다. GATA-4의 인접 GATA 서열로의 결합을 직접적으로 입증하기 위하여, 본 발명자들은 GATA-4에 대한 동일한 항체의 존재 또는 부재하에 표지된 인간 인접 GATA 프로브를 사용하였다. 도 6d에 나타낸 바와 같이, GATA-4에 대한 항체는 컨센서스 GATA 프로브와 형

성된 복합체와 유사한 이동도를 갖는 DNA-단백질 복합체의 형성을 완전히 억제하였다. 이들 데이타는 GATA-4가 인접 GATA 서열에 결합하였음을 지시하는데, 이는 인접 GATA 서열로의 GATA-4의 결합이 심근세포에서 코린 유전자 발현에 기여할 수 있음을 암시한다.

인접 GATA 요소가 프로모터 활성에 있어서 사실상 요구되는가를 확실히 하기 위하여, 본 발명자들은 최고의 프로모터 활성을 촉진한 인간 또는 마우스 제작물에서 야생형 서열 AGATAA를 ACTTAA로 돌연변이시켰다 (도 7). 돌연변이 제작물인 hCp405mutGATA 및 mCp646mutGATA를 오버랩 PCR 프로토콜에 의하여 제작하였다 (Ho S.N. et al., (1989) Gene (Amst) 77:51-59). 간략하게 설명하면, 두 개의 별개의 PCR 생성물 (혼성화 생성물의 매 절반마다 하나씩)을 안티센스 또는 센스 돌연변이된 GATA 올리고뉴클레오티드 및 하나의 외부 프라이머를 사용하여 생성하였다. 두 개의 생성물을 정제하고 혼합하였다. 그 다음 두 개의 외부 프라이머를 사용하여 제2 PCR를 수행하였다. PCR 생성물을 Sac I 및 Hind III로 소화시키고, Sac I- 및 Hind III-소화된 pGL3-기재 벡터 내로 라이게이션하였다. 모든 제작물을 제한 지도화 및 DNA 서열분석을 통해 확증하였다. GATA 요소에서의 돌연변이는 EMSA에서 사용된 돌연변이 GATA 프로브에서 있었던 것과 같았다. HL-5내로의 형질도입시에, 인간 및 마우스 돌연변이 제작물은 이들 각각의 야생형 서열과 비교할 때 10 % 또는 42 %의 프로모터 활성을 가졌다. 이들 결과는 인접 GATA 요소가 배양된 심근세포에서 인간 또는 마우스 코린 유전자의 구성적 발현에 필요함을 보여준다.

상기 실시예는 상기 실시예에 사용된 것을 대신하여 본 발명의 일반적이거나 구체적으로 기재된 반응물 및(또는) 조작 조건으로 대체하여 유사하게 성공하면서 반복할 수 있다.

본 발명은 인간 또는 마우스 코린 유전자의 신규 발현조절 영역에 대해 설명되었지만, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고도 본 발명의 변이 및 변경이 이루어질 수 있다는 것이 명백하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
이종 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결되어 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 조절하는 포유동물 코린 발현조절 영역을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 2.
제1항에 있어서, 상기 조절 영역이 포유동물 코린 유전자의 전사를 조절하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 3.
제1항에 있어서, 상기 전사가 심장 조직에서 일어나는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 4.
제1항에 있어서, 상기 조절 영역이 GATA, Tbx-5, Nkx2.5 또는 NF-AT 결합 부위로 이루어진 군에서 선택된 전사 조절 요소를 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 5.
제1항에 있어서, 상기 조절 영역이 GATA-4, Tbx-5, Nkx2.5, 크뤼펠형 인자 또는 NF-AT 전사인자로 이루어진 군에서 선택된 전사 조절 단백질에 결합하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 6.
제1항에 있어서, 상기 포유동물이 인간인 폴리뉴클레오티드.

청구항 7.
제6항에 있어서, 서열 4에 기재된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드.

청구항 8.
제6항에 있어서, 서열 5에 기재된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드.

청구항 9.
제6항에 있어서, 서열 6에 기재된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드.

청구항 10.

이종 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결되어 있으며 이종 폴리뉴클레오티드를 전사시킬 수 있는 제1항의 폴리뉴클레오티드의 단편 또는 변이체.

청구항 11.
제10항에 있어서, 서열 4와 70 % 이상 동일한 서열을 갖는 단편 또는 변이체.

청구항 12.
제10항에 있어서, 서열 5와 70 % 이상 동일한 서열을 갖는 단편 또는 변이체.

청구항 13.
제10항에 있어서, 서열 6과 70 % 이상 동일한 서열을 갖는 단편 또는 변이체.

청구항 14.
제1항의 코린 발현조절 영역을 포함하는 벡터.

청구항 15.
제14항의 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 16.
코린 발현조절 영역에 작동가능하게 연결된 이종 폴리뉴클레오티드에 의하여 코딩되는 폴리펩티드를 제15항의 숙주세포로부터 발현시키는 것을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 17.
코린 발현조절 영역에 작동가능하게 연결된 이종 폴리뉴클레오티드에 의하여 코딩되는 안티센스 분자를 제15항의 숙주세포로부터 발현시키는 것을 포함하는 폴리뉴클레오티드의 제조 방법.

청구항 18.
제약상 허용되는 담체 중에 제14항의 벡터를 포함하는 제약 조성물.

청구항 19.
제약상 허용되는 담체 중에 제15항의 세포를 포함하는 제약 조성물.

청구항 20.
(a) 포유동물 코린 발현조절 영역을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드가 리포터 유전자에 작동가능하게 연결되어 있는 재조합 벡터를 제조하고,

(b) 이 재조합 벡터로 세포를 형질감염시키고,

(c) 이 세포를 세포 내에서 인간 코린 유전자의 발현을 조절하는 작용제로 처리하고,

(d) 처리된 세포에서 리포터 서열의 발현 수준을 측정하고,

(e) 상기 작용제의 존재하에 리포터 서열의 발현 수준과 상기 작용제로 처리하지 않은 형질감염된 대조구 세포에서의 발현 수준을 비교하는 것을 포함하는,

세포 내에서 인간 코린 유전자의 발현을 조절하는 작용제를 확인하는 방법.

청구항 21.
제20항에 있어서, 상기 세포가 심장 근육세포인 방법.

청구항 22.
(a) 포유동물 코린 발현조절 영역을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 이종 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결시킨 재조합 벡터를 제조하고,

(b) 이 벡터를 치료상 유효량으로 사람 환자에게 투여하는 것을 포함하는,

사람 환자에게서 유전자의 발현을 조절하는 방법.

청구항 23.
제22항에 있어서, 상기 이종 폴리뉴클레오티드가 코린, ANP, B-타입 나트륨이뇨 펩티드, 포스폴람반, ACE, 또는 이들 유전자의 음성 우성 형태와 같은 치료용 단백질을 코딩하는 것인 방법.

청구항 24.
제23항에 있어서, 상기 이종 폴리뉴클레오티드가 코린을 코딩하는 것인 방법.

청구항 25.
제22항에 있어서, 상기 이종 폴리뉴클레오티드가 안티센스 RNA 분자 또는 촉 매성 RNA 분자와 같은 치료용 폴리뉴클레오티드를 코딩하는 것인 방법.

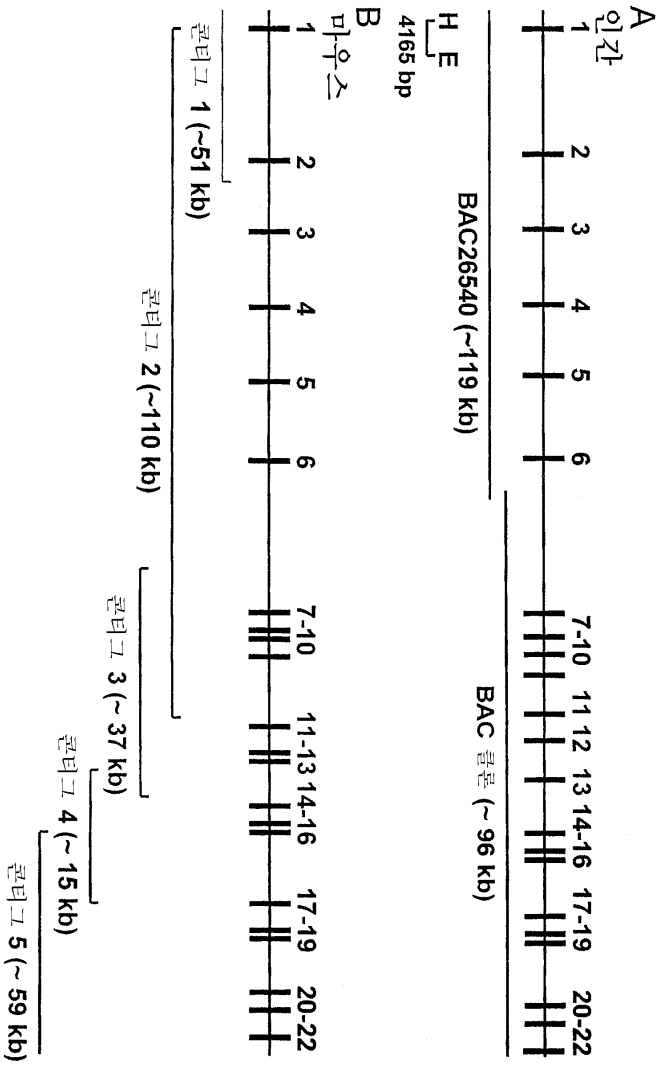
청구항 26.
제22항에 있어서, 상기 조절 영역이 서열 4, 서열 5 또는 서열 6으로 이루어진 군에서 선택된 것인 방법.

청구항 27.
코린, ANP, B-타입 나트륨이뇨 펩티드, 포스폴람반, ACE, 또는 이들 유전자의 음성 우성 형태로 이루어진 군에서 선택된 유전자에 작동가능하게 연결된 포유동물 코린 발현조절 영역을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드의 치료상 유효량을 사람 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 사람 환자에게서 울혈심부전증, 고혈압 또는 심근경색증을 치료하는 방법.

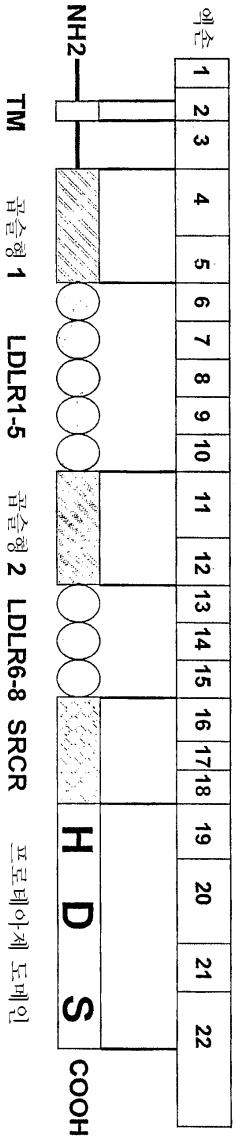
청구항 28.
제27항에 있어서, 상기 유전자가 코린인 방법.

도면

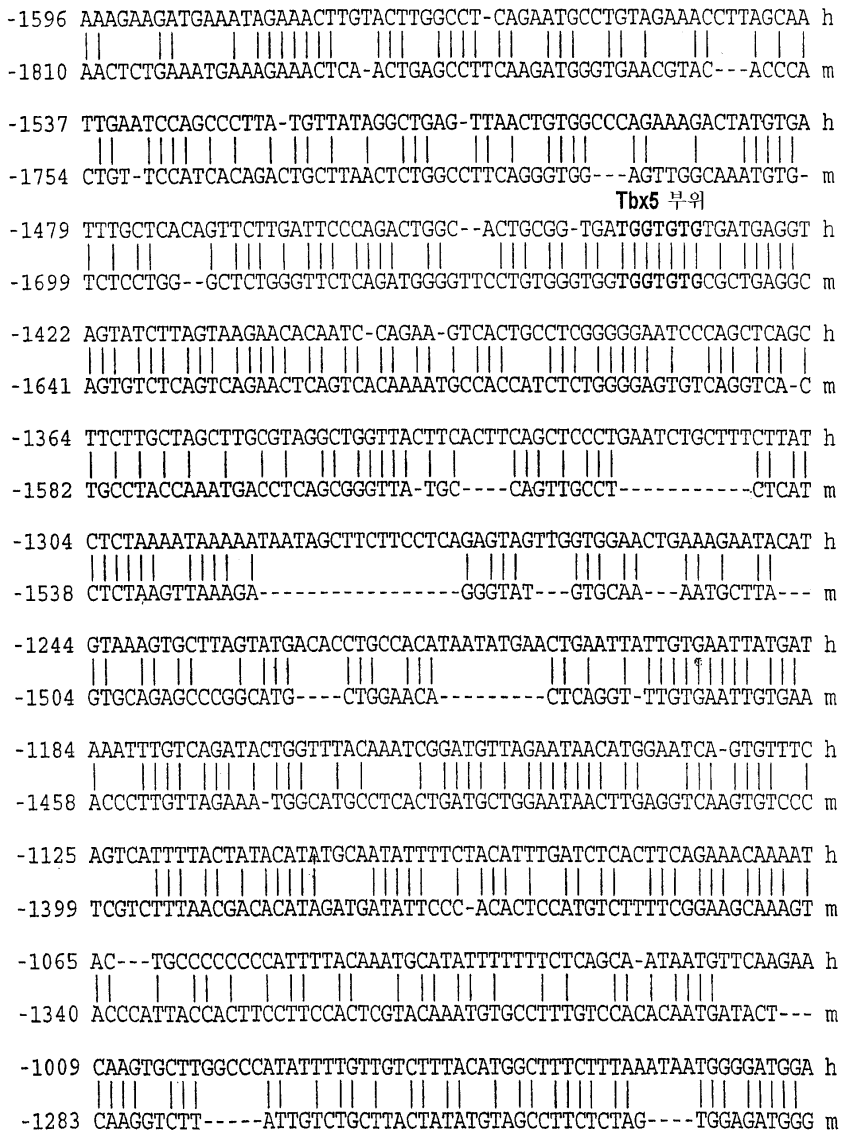
도면1


A
인간
1
2
3
4
5
6
7-10
11
12
13
14-16
17-19
20-22
H E
4165 bp
BAC26540 (~119 kb)
BAC 클론 (~ 96 kb)
B
마우스
1
2
3
4
5
6
7-10
11-13
14-16
17-19
20-22
콘티그 1 (~51 kb)
콘티그 2 (~110 kb)
콘티그 3 (~ 37 kb)
콘티그 4 (~ 15 kb)
콘티그 5 (~ 59 kb)

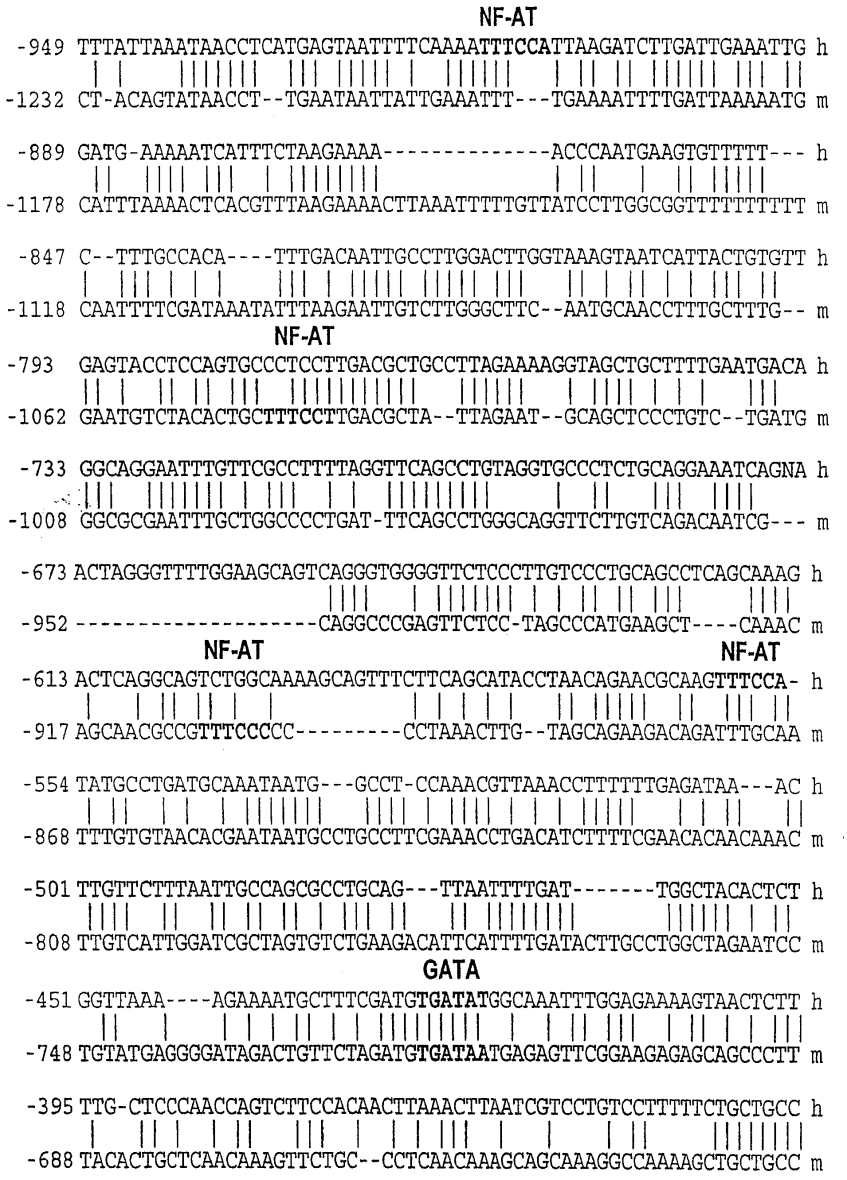
도면2


엑손
NH2
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
H
D
S
COOH
TM
LDLR1-5
LDLR6-8
SRCR
프로테아제 도메인

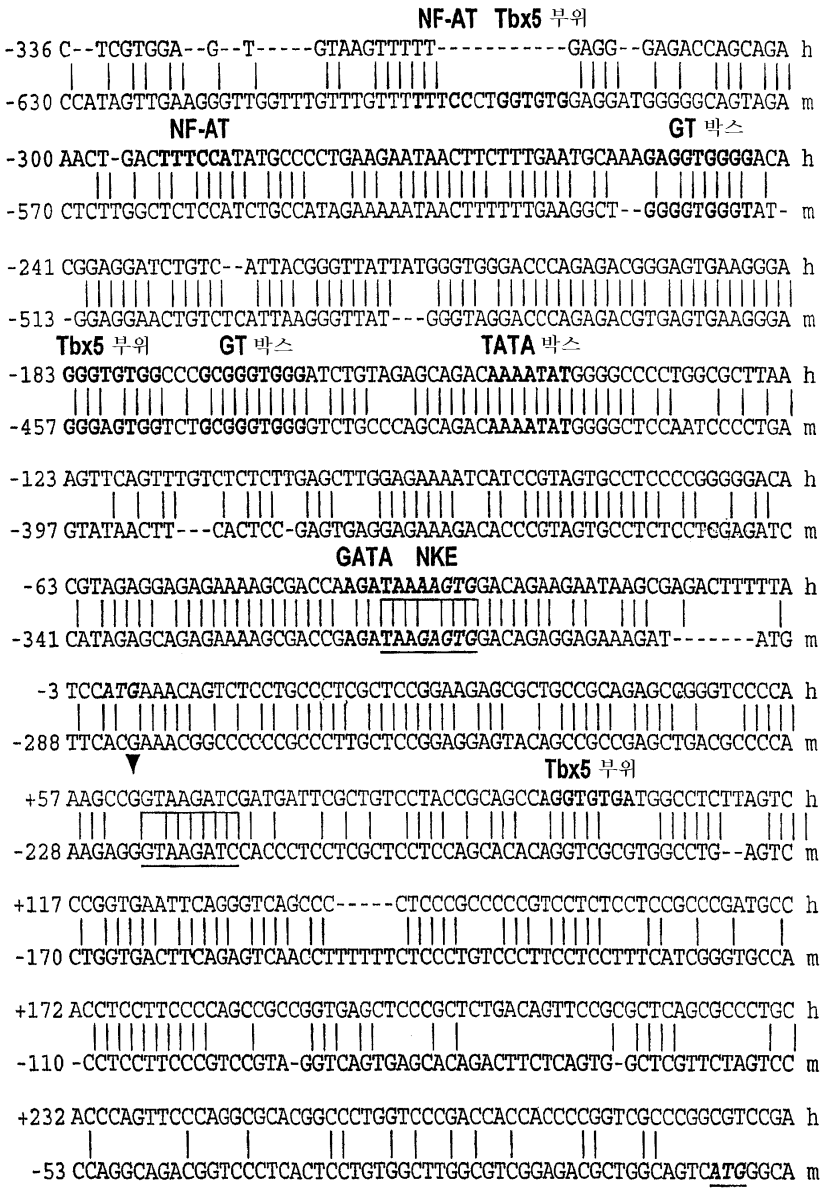
도면3a


-1596 AAAGAAGATGAAATAGAAACTTGTACTTGGCCT-CAGAATGCCTGTAGAAACCTTAGCAA h
-1810 AACTCTGAAATGAAAGAAACTCA-ACTGAGCCTTCAAGATGGGTGAACGTAC---ACCCA m
-1537 TTGAATCCAGCCCTTA-TGTTATAGGCTGAG-TTAACTGTGGCCCAGAAAGACTATGTGA h
-1754 CTGT-TCCATCACAGACTGCTTAACTCTGGCCTTCAGGGTGG---AGTTGGCAAATGTG- m
Tbx5 부위
-1479 TTTGCTCACAGTTCTTGATTCCCAGACTGGC--ACTGCGG-TGATGGTGTGTGATGAGGT h
-1699 TCTCCTGG--GCTCTGGGTTCTCAGATGGGGTTCCTGTGGGTGGTGGTGTGCGCTGAGGC m
-1422 AGTATCTTAGTAAGAACACAATC-CAGAA-GTCACTGCCTCGGGGGAATCCCAGCTCAGC h
-1641 AGTGTCTCAGTCAGAACTCAGTCACAAAATGCCACCATCTCTGGGGAGTGTCAGGTCA-C m
-1364 TTCTTGCTAGCTTGCGTAGGCTGGTTACTTCACTTCAGCTCCCTGAATCTGCTTTCTTAT h
-1582 TGCCTACCAAATGACCTCAGCGGGTTA-TGC----CAGTTGCCT----------CTCAT m
-1304 CTCTAAAATAAAAATAATAGCTTCTTCCTCAGAGTAGTTGGTGGAACTGAAAGAATACAT h
-1538 CTCTAAGTTAAAGA----------GGGTAT---GTGCAA---AATGCTTA--- m
-1244 GTAAAGTGCTTAGTATGACACCTGCCACATAATATGAACTGAATTATTGTGAATTATGAT h
-1504 GTGCAGAGCCCGGCATG----CTGGAACA---------CTCAGGT-TTGTGAATTGTGAA m
-1184 AAATTTGTCAGATACTGGTTTACAAATCGGATGTTAGAATAACATGGAATCA-GTGTTTC h
-1458 ACCCTTGTTAGAAA-TGGCATGCCTCACTGATGCTGGAATAACTTGAGGTCAAGTGTCCC m
-1125 AGTCATTTTACTATACATATGCAATATTTTCTACATTTGATCTCACTTCAGAAACAAAAT h
-1399 TCGTCTTTAACGACACATAGATGATATTCCC-ACACTCCATGTCTTTTCGGAAGCAAAGT m
-1065 AC---TGCCCCCCCCCATTTTACAAATGCATATTTTTTTCTCAGCA-ATAATGTTCAAGAA h
-1340 ACCCATTACCACTTCCTTCCACTCGTACAAATGTGCCTTTGTCCACACAATGATACT--- m
-1009 CAAGTGCTTGGCCCATATTTTGTTGTCTTTACATGGCTTTCTTTAAATAATGGGGATGGA h
-1283 CAAGGTCTT-----ATTGTCTGCTTACTATATGTAGCCTTCTCTAG----TGGAGATGGG m

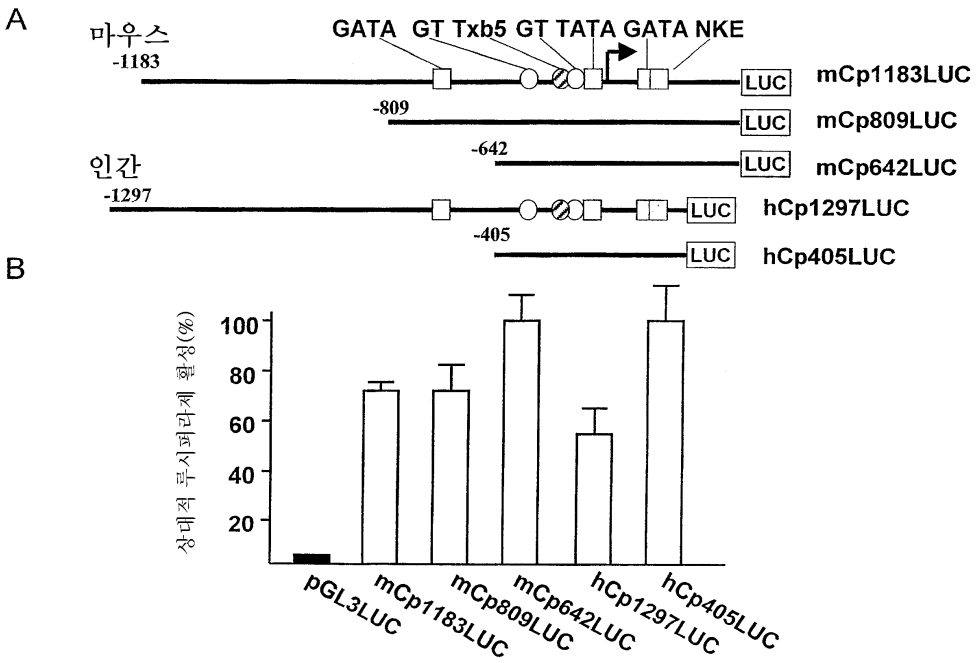
도면3b



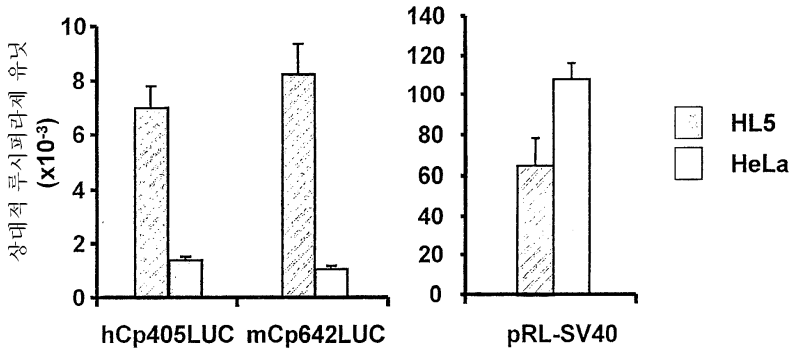
도면3b-1



도면4



도면5



도면6a

-63 -22

CGTAGAGGAGAGAAAAGCGACCA**AGATAA**AAGTGGACAGAAG 인간 코린 **GATA**

CGTAGAGGAGAGAAAAGCGACCA**A***CT***TAA**AAGTGGACAGAAG 돌연변이체

-341 -299

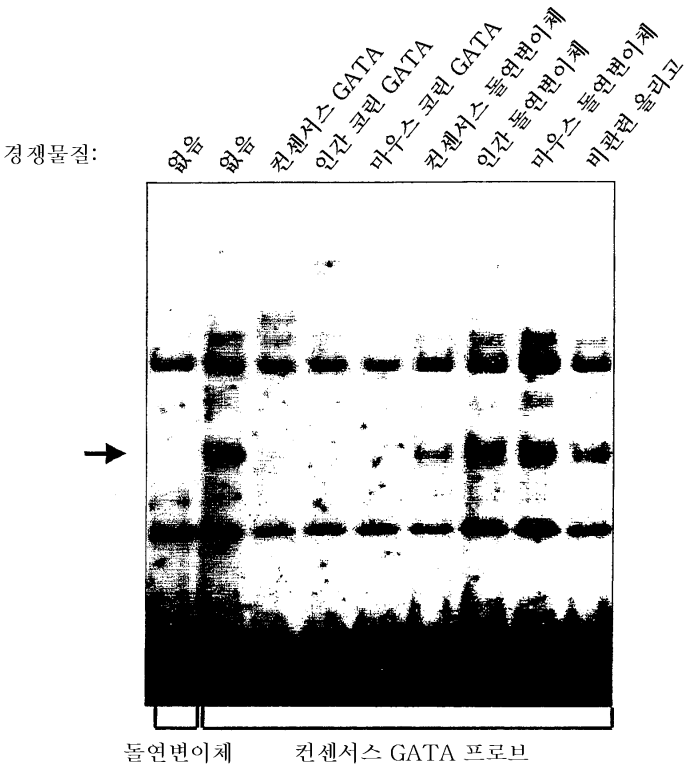
CATAGAGCAGAGAAAAGCGACCG**AGATAA**GAGTGGACAGAGG 마우스 코린 **GATA**

CATAGAGCAGAGAAAAGCGACCG**A***CT***TAA**GAGTGGACAGAGG 돌연변이체

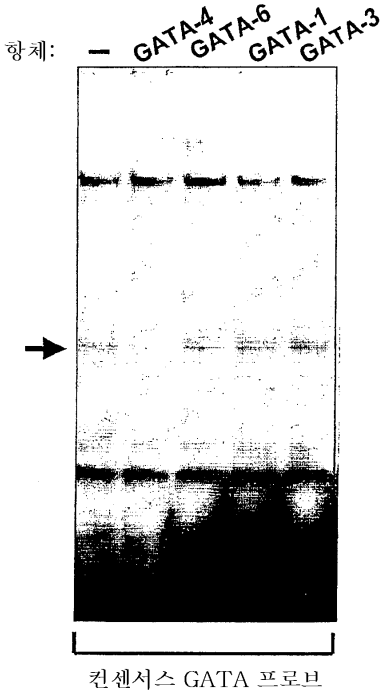
CACT**TGATAA**CAGAAAG**TGATAA**CTCT 컨센서스 **GATA**

CACT**T***CT***TAA**CAGAAAG**T***CT***TAA**CTCT 돌연변이체

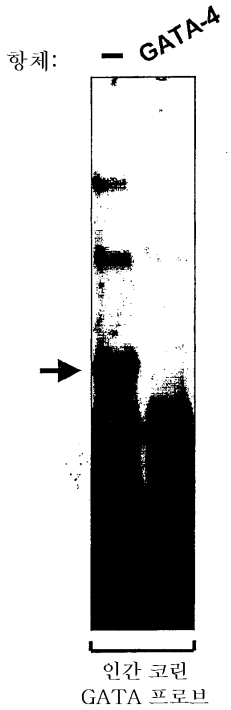
도면6b


경쟁물질:
없음
없음
컨센서스 GATA
인간 코린 GATA
마우스 코린 GATA
컨센서스 돌연변이체
인간 돌연변이체
마우스 돌연변이체
비관련 올리고
돌연변이체
컨센서스 GATA 프로브

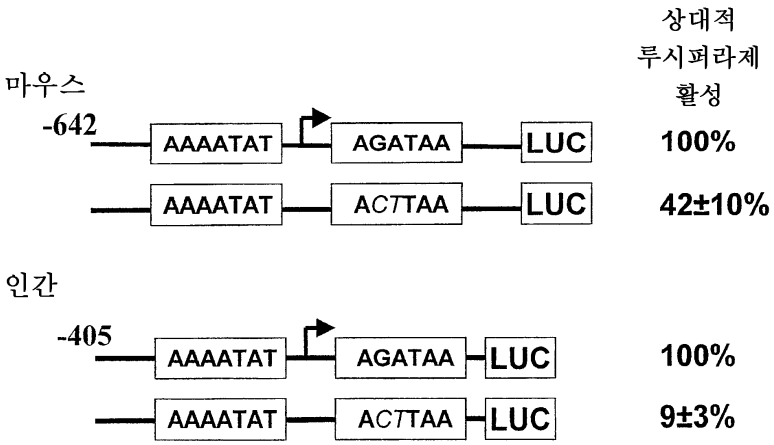
도면6c


항체:
—
GATA-4
GATA-6
GATA-1
GATA-3
컨센서스 GATA 프로브

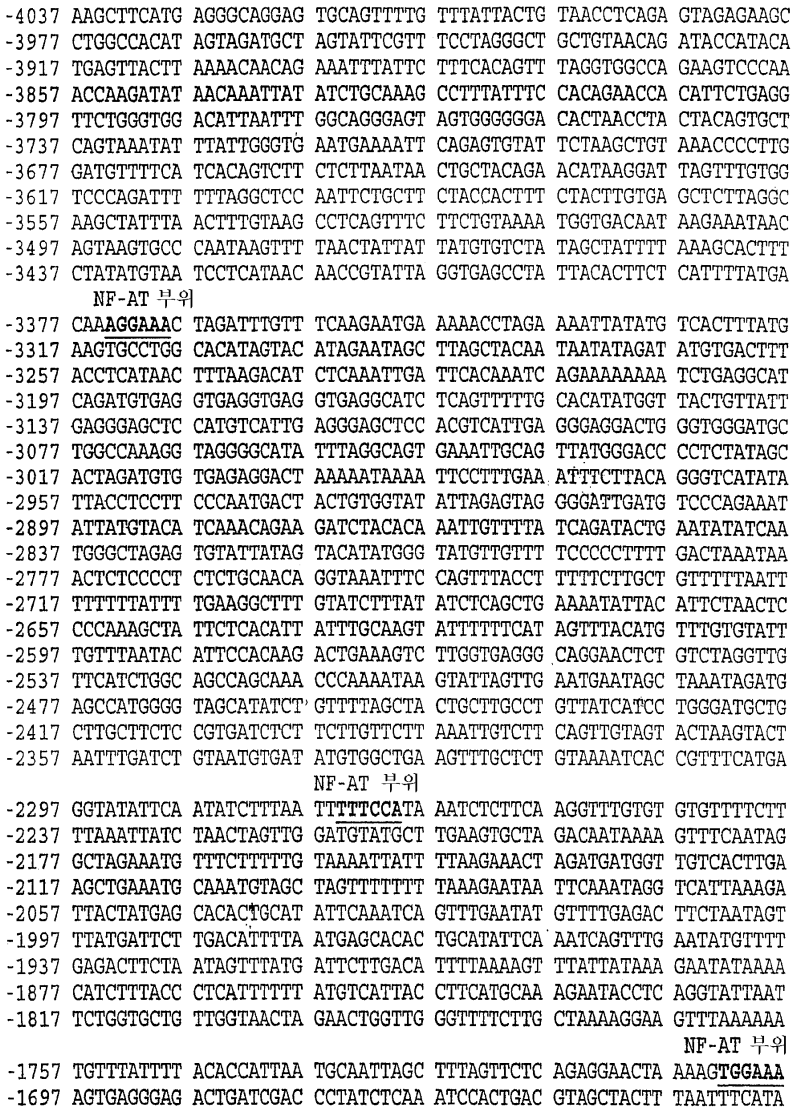
도면6d


항체:
-
GATA-4
인간 코린
GATA 프로브

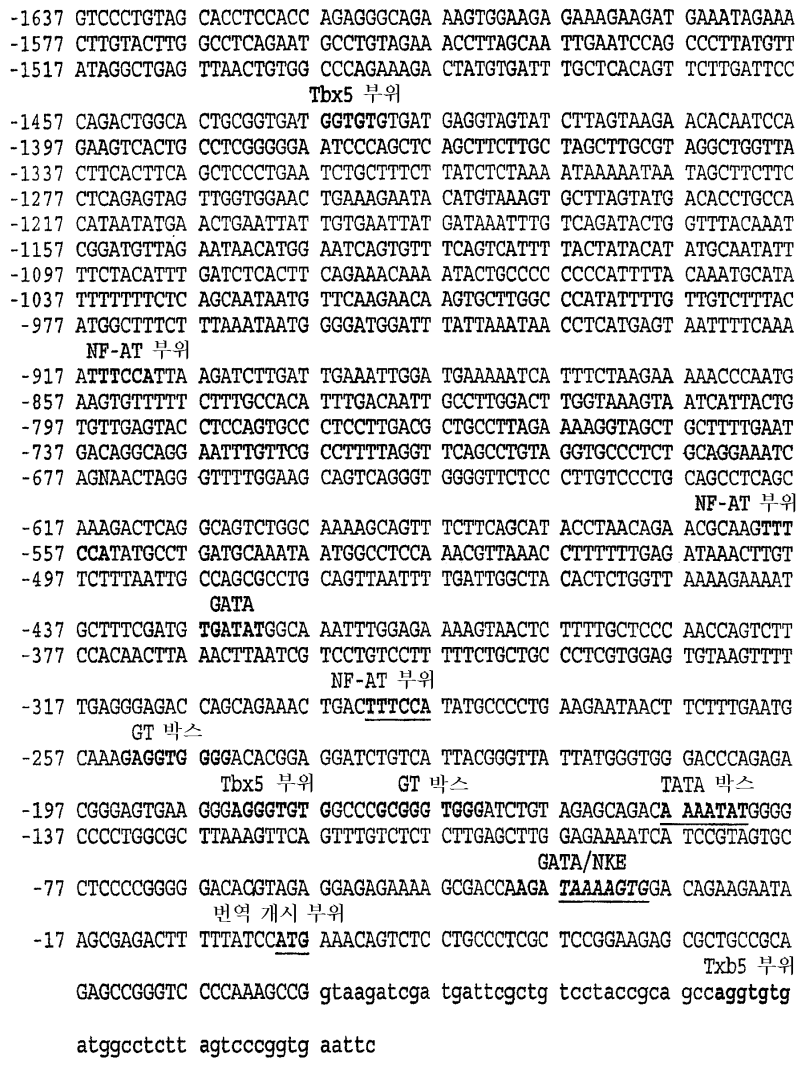
도면7


상대적
루시퍼라제
활성
마우스
-642
AAAATAT
AGATAA
LUC
100%
AAAATAT
ACTTAA
LUC
42±10%
인간
-405
AAAATAT
AGATAA
LUC
100%
AAAATAT
ACTTAA
LUC
9±3%

도면8a


-4037 AAGCTTCATG AGGGCAGGAG TGCAGTTTTG TTTATTACTG TAACCTCAGA GTAGAGAAGC
-3977 CTGGCCACAT AGTAGATGCT AGTATTCGTT TCCTAGGGCT GCTGTAACAG ATACCATACA
-3917 TGAGTTACTT AAAACAACAG AAATTTATTC TTTCACAGTT TAGGTGGCCA GAAGTCCCAA
-3857 ACCAAGATAT AACAAATTAT ATCTGCAAAG CCTTTATTTC CACAGAACCA CATTCTGAGG
-3797 TTCTGGGTGG ACATTAATTT GGCAGGGAGT AGTGGGGGGA CACTAACCTA CTACAGTGCT
-3737 CAGTAAATAT TTATTGGGTG AATGAAAATT CAGAGTGTAT TCTAAGCTGT AAACCCCTTG
-3677 GATGTTTTCA TCACAGTCTT CTCTTAATAA CTGCTACAGA ACATAAGGAT TAGTTTGTGG
-3617 TCCCAGATTT TTTAGGCTCC AATTCTGCTT CTACCACTTT CTACTTGTGA GCTCTTAGGC
-3557 AAGCTATTTA ACTTTGTAAG CCTCAGTTTC TTCTGTAAAA TGGTGACAAT AAGAAATAAC
-3497 AGTAAGTGCC CAATAAGTTT TAACTATTAT TATGTGTCTA TAGCTATTTT AAAGCACTTT
-3437 CTATATGTAA TCCTCATAAC AACCGTATTA GGTGAGCCTA TTACACTTCT CATTTTATGA
NF-AT 부위
-3377 CAAAGGAAAC TAGATTTGTT TCAAGAATGA AAAACCTAGA AAATTATATG TCACTTTATG
-3317 AAGTGCCTGG CACATAGTAC ATAGAATAGC TTAGCTACAA TAATATAGAT ATGTGACTTT
-3257 ACCTCATAAC TTTAAGACAT CTCAAATTGA TTCACAAATC AGAAAAAAAA TCTGAGGCAT
-3197 CAGATGTGAG GTGAGGTGAG GTGAGGCATC TCAGTTTTTG CACATATGGT TACTGTTATT
-3137 GAGGGAGCTC CATGTCATTG AGGGAGCTCC ACGTCATTGA GGGAGGACTG GGTGGGATGC
-3077 TGGCCAAAGG TAGGGGCATA TTTAGGCAGT GAAATTGCAG TTATGGGACC CCTCTATAGC
-3017 ACTAGATGTG TGAGAGGACT AAAAATAAAA TTCCTTTGAA ATTTCTTACA GGGTCATATA
-2957 TTACCTCCTT CCCAATGACT ACTGTGGTAT ATTAGAGTAG GGGATTGATG TCCCAGAAAT
-2897 ATTATGTACA TCAAACAGAA GATCTACACA AATTGTTTTA TCAGATACTG AATATATCAA
-2837 TGGGCTAGAG TGTATTATAG TACATATGGG TATGTTGTTT TCCCCCTTTT GACTAAATAA
-2777 ACTCTCCCCT CTCTGCAACA GGTAAATTTC CAGTTTACCT TTTTCTTGCT GTTTTTAATT
-2717 TTTTTTATTT TGAAGGCTTT GTATCTTTAT ATCTCAGCTG AAAATATTAC ATTCTAACTC
-2657 CCCAAAGCTA TTCTCACATT ATTTGCAAGT ATTTTTTCAT AGTTTACATG TTTGTGTATT
-2597 TGTTTAATAC ATTCCACAAG ACTGAAAGTC TTGGTGAGGG CAGGAACTCT GTCTAGGTTG
-2537 TTCATCTGGC AGCCAGCAAA CCCAAAATAA GTATTAGTTG AATGAATAGC TAAATAGATG
-2477 AGCCATGGGG TAGCATATCT GTTTTAGCTA CTGCTTGCCT GTTATCATCC TGGGATGCTG
-2417 CTTGCTTCTC CGTGATCTCT TCTTGTTCTT AAATTGTCTT CAGTTGTAGT ACTAAGTACT
-2357 AATTTGATCT GTAATGTGAT ATGTGGCTGA AGTTTGCTCT GTAAAATCAC CGTTTCATGA
NF-AT 부위
-2297 GGTATATTCA ATATCTTTAA TTTTTCCATA AATCTCTTCA AGGTTTGTGT GTGTTTTCTT
-2237 TTAAATTATC TAACTAGTTG GATGTATGCT TGAAGTGCTA GACAATAAAA GTTTCAATAG
-2177 GCTAGAAATG TTTCTTTTTG TAAAATTATT TTAAGAAACT AGATGATGGT TGTCACTTGA
-2117 AGCTGAAATG CAAATGTAGC TAGTTTTTTT TAAAGAATAA TTCAAATAGG TCATTAAAGA
-2057 TTACTATGAG CACACTGCAT ATTCAAATCA GTTTGAATAT GTTTTGAGAC TTCTAATAGT
-1997 TTATGATTCT TGACATTTTA ATGAGCACAC TGCATATTCA AATCAGTTTG AATATGTTTT
-1937 GAGACTTCTA ATAGTTTATG ATTCTTGACA TTTTAAAAGT TTATTATAAA GAATATAAAA
-1877 CATCTTTACC CTCATTTTTT ATGTCATTAC CTTCATGCAA AGAATACCTC AGGTATTAAT
-1817 TCTGGTGCTG TTGGTAACTA GAACTGGTTG GGTTTTCTTG CTAAAAGGAA GTTTAAAAAA
NF-AT 부위
-1757 TGTTTATTTT ACACCATTAA TGCAATTAGC TTTAGTTCTC AGAGGAACTA AAAGTGGAAA
-1697 AGTGAGGGAG ACTGATCGAC CCTATCTCAA ATCCACTGAC GTAGCTACTT TAATTTCATA

도면8b



<110> Pan, Junliang

Wu, Qingyu

<120> Control Sequence of the Human Corin Gene

<130> 52351AWOM1

<150> US 60/384,108

<151> 2002-05-31

<160> 16

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1888

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (922)..(922)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 1

aaagaagatg aaatagaaac ttgtacttgg cctcagaatg cctgtagaaa ccttagcaat 60

tgaatccagc ccttatgtta taggctgagt taactgtggc ccagaaagac tatgtgattt 120

gctcacagtt cttgattccc agactggcac tgcggtgatg gtgtgtgatg aggtagtatc 180

ttagtaagaa cacaatccag aagtcactgc ctcgggggaa tcccagctca gcttcttgct 240

agcttgcgta ggctggttac ttcacttcag ctccctgaat ctgctttctt atctctaaaa 300

taaaaataat agcttcttcc tcagagtagt tggtggaact gaaagaatac atgtaaagtg 360

cttagtatga cacctgccac ataatatgaa ctgaattatt gtgaattatg ataaatttgt 420

cagatactgg tttacaaatc ggatgttaga ataacatgga atcagtgttt cagtcatttt 480

actatacata tgcaatattt tctacatttg atctcacttc agaaacaaaa tactgccccc 540

cccattttac aaatgcatat ttttttctca gcaataatgt tcaagaacaa gtgcttggcc 600

catattttgt tgtctttaca tggctttctt taaataatgg ggatggattt attaaataac 660

ctcatgagta attttcaaaa tttccattaa gatcttgatt gaaattggat gaaaaatcat 720

ttctaagaaa aacccaatga agtgtttttc tttgccacat ttgacaattg ccttggactt 780

ggtaaagtaa tcattactgt gttgagtacc tccagtgccc tccttgacgc tgccttagaa 840

aaggtagctg cttttgaatg acaggcagga atttgttcgc cttttaggtt cagcctgtag 900

gtgccctctg caggaaatca gnaactaggg ttttggaagc agtcagggtg gggttctccc 960

ttgtccctgc agcctcagca aagactcagg cagtctggca aaagcagttt cttcagcata 1020

cctaacagaa cgcaagtttc catatgcctg atgcaaataa tggcctccaa acgttaaacc 1080

ttttttgaga taaacttgtt ctttaattgc cagcgcctgc agttaatttt gattggctac 1140

actctggtta aaagaaaatg ctttcgatgt gatatggcaa atttggagaa aagtaactct 1200

tttgctccca accagtcttc cacaacttaa acttaatcgt cctgtccttt ttctgctgcc 1260

ctcgtggagt gtaagttttt gagggagacc agcagaaact gactttccat atgcccctga 1320

agaataactt ctttgaatgc aaagaggtgg ggacacggag gatctgtcat tacgggttat 1380

tatgggtggg acccagagac gggagtgaag ggagggtgtg gcccgcgggt gggatctgta 1440

gagcagacaa aatatggggc ccctggcgct taaagttcag tttgtctctc ttgagcttgg 1500

agaaaatcat ccgtagtgcc tccccggggg acacgtagag gagagaaaag cgaccaagat 1560

aaaagtggac agaagaataa gcgagacttt ttatccatga aacagtctcc tgccctcgct 1620

ccggaagagc gctgccgcag agccgggtcc ccaaagccgg taagatcgat gattcgctgt 1680

cctaccgcag ccaggtgtga tggcctctta gtcccggtga attcagggtc agcccctccc 1740

gcccccgtcc tctcctccgc ccgatgccac ctccttcccc agccgccggt gagctcccgc 1800

tctgacagtt ccgcgctcag cgccctgcac ccagttccca ggcgcacggc cctggtcccg 1860

accaccaccc cggtcgcccg gcgtccga 1888

<210> 2

<211> 4165

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (3363)..(3363)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 2

aagcttcatg agggcaggag tgcagttttg tttattactg taacctcaga gtagagaagc 60

ctggccacat agtagatgct agtattcgtt tcctagggct gctgtaacag ataccataca 120

tgagttactt aaaacaacag aaatttattc tttcacagtt taggtggcca gaagtcccaa 180

accaagatat aacaaattat atctgcaaag cctttatttc cacagaacca cattctgagg 240

ttctgggtgg acattaattt ggcagggagt agtgggggga cactaaccta ctacagtgct 300

cagtaaatat ttattgggtg aatgaaaatt cagagtgtat tctaagctgt aaacccccttg 360

gatgttttca tcacagtctt ctcttaataa ctgctacaga acataaggat tagtttgtgg 420

tcccagattt tttaggctcc aattctgctt ctaccacttt ctacttgtga gctcttaggc 480

aagctattta actttgtaag cctcagtttc ttctgtaaaa tggtgacaat aagaaataac 540

agtaagtgcc caataagttt taactattat tatgtgtcta tagctatttt aaagcacttt 600

ctatatgtaa tcctcataac aaccgtatta ggtgagccta ttacacttct cattttatga 660

caaaggaaac tagatttgtt tcaagaatga aaaacctaga aaattatatg tcactttatg 720

aagtgcctgg cacatagtac atagaatagc ttagctacaa taatatagat atgtgacttt 780

acctcataac tttaagacat ctcaaattga ttcacaaatc agaaaaaaaa tctgaggcat 840

cagatgtgag gtgaggtgag gtgaggcatc tcagtttttg cacatatggt tactgttatt 900

gagggagctc catgtcattg agggagctcc acgtcattga gggaggactg ggtgggatgc 960

tggccaaagg taggggcata tttaggcagt gaaattgcag ttatgggacc cctctatagc 1020

actagatgtg tgagaggact aaaaataaaa ttcctttgaa atttcttaca gggtcatata 1080

ttacctcctt cccaatgact actgtggtat attagagtag gggattgatg tcccagaaat 1140

attatgtaca tcaaacagaa gatctacaca aattgtttta tcagatactg aatatatcaa 1200

tgggctagag tgtattatag tacatatggg tatgttgttt tccccctttt gactaaataa 1260

actctcccct ctctgcaaca ggtaaatttc cagtttacct ttttcttgct gtttttaatt 1320

ttttttattt tgaaggcttt gtatctttat atctcagctg aaaatattac attctaactc 1380

cccaaagcta ttctcacatt atttgcaagt atttttttcat agtttacatg tttgtgtatt 1440

tgtttaatac attccacaag actgaaagtc ttggtgaggg caggaactct gtctaggttg 1500

ttcatctggc agccagcaaa cccaaaataa gtattagttg aatgaatagc taaatagatg 1560

agccatgggg tagcatatct gttttagcta ctgcttgcct gttatcatcc tgggatgctg 1620

cttgcttctc cgtgatctct tcttgttctt aaattgtctt cagttgtagt actaagtact 1680

aatttgatct gtaatgtgat atgtggctga agtttgctct gtaaaatcac cgtttcatga 1740

ggtatattca atatctttaa tttttccata aatctcttca aggtttgtgt gtgttttctt 1800

ttaaattatc taactagttg gatgtatgct tgaagtgcta gacaataaaa gtttcaatag 1860

gctagaaatg tttctttttg taaaattatt ttaagaaact agatgatggt tgtcacttga 1920

agctgaaatg caaatgtagc tagttttttt taaagaataa ttcaaatagg tcattaaaga 1980

ttactatgag cacactgcat attcaaatca gtttgaatat gttttgagac ttctaatagt 2040

ttatgattct tgacatttta atgagcacac tgcatattca aatcagtttg aatatgtttt 2100

gagacttcta atagtttatg attcttgaca ttttaaaagt ttattataaa gaatataaaa 2160

catctttacc ctcatttttt atgtcattac cttcatgcaa agaatacctc aggtattaat 2220

tctggtgctg ttggtaacta gaactggttg ggttttcttg ctaaaaggaa gtttaaaaaa 2280

tgtttatttt acaccattaa tgcaattagc tttagttctc agaggaacta aaagtggaaa 2340

agtgagggag actgatcgac cctatctcaa atccactgac gtagctactt taatttcata 2400

gtccctgtag cacctccacc agagggcaga aagtggaaga gaaagaagat gaaatagaaa 2460

cttgtacttg gcctcagaat gcctgtagaa accttagcaa ttgaatccag cccttatgtt 2520

ataggctgag ttaactgtgg cccagaaaga ctatgtgatt tgctcacagt tcttgattcc 2580

cagactggca ctgcggtgat ggtgtgtgat gaggtagtat cttagtaaga acacaatcca 2640

gaagtcactg cctcgggggа atcccagctc agcttcttgc tagcttgcgt aggctggtta 2700

cttcacttca gctccctgaa tctgctttct tatctctaaa ataaaaataa tagcttcttc 2760

ctcagagtag ttggtggaac tgaaagaata catgtaaagt gcttagtatg acacctgcca 2820

cataatatga actgaattat tgtgaattat gataaatttg tcagatactg gtttacaaat 2880

cggatgttag aataacatgg aatcagtgtt tcagtcattt tactatacat atgcaatatt 2940

ttctacattt gatctcactt cagaaacaaa atactgcccc ccccatttta caaatgcata 3000

tttttttctc agcaataatg ttcaagaaca agtgcttggc ccatattttg ttgtctttac 3060

atggctttct ttaaataatg gggatggatt tattaaataa cctcatgagt aattttcaaa 3120

atttccatta agatcttgat tgaaattgga tgaaaaatca tttctaagaa aaacccaatg 3180

aagtgttttt ctttgccaca tttgacaatt gccttggact tggtaaagta atcattactg 3240

tgttgagtac ctccagtgcc ctccttgacg ctgccttaga aaaggtagct gcttttgaat 3300

gacaggcagg aatttgttcg ccttttaggt tcagcctgta ggtgccctct gcaggaaatc 3360

agnaactagg gttttggaag cagtcagggt ggggttctcc cttgtccctg cagcctcagc 3420

aaagactcag gcagtctggc aaaagcagtt tcttcagcat acctaacaga acgcaagttt 3480

ccatatgcct gatgcaaata atggcctcca aacgttaaac ctttttgag ataaacttgt 3540

tctttaattg ccagcgcctg cagttaattt tgattggcta cactctggtt aaaagaaaat 3600

gctttcgatg tgatatggca aatttggaga aaagtaactc ttttgctccc aaccagtctt 3660

ccacaactta aacttaatcg tcctgtcctt tttctgctgc cctcgtggag tgtaagtttt 3720

tgagggagac cagcagaaac tgactttcca tatgcccctg aagaataact tctttgaatg 3780

caaagaggtg gggacacgga ggatctgtca ttacgggtta ttatgggtgg gacccagaga 3840

cgggagtgaa gggagggtgt ggcccgcggg tgggatctgt agagcagaca aaatatgggg 3900

cccctggcgc ttaaagttca gtttgtctct cttgagcttg gagaaaatca tccgtagtgc 3960

ctccccgggg gacacgtaga ggagagaaaa gcgaccaaga taaaagtgga cagaagaata 4020

agcgagactt tttatccatg aaacagtctc ctgccctcgc tccggaagag cgctgccgca 4080

gagccgggtc cccaaagccg gtaagatcga tgattcgctg tcctaccgca gccaggtgtg 4140

atggcctctt agtcccggtg aattc 4165

<210> 3

<211> 1817

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

aactctgaaa tgaaagaaac tcaactgagc cttcaagatg ggtgaacgta cacccactgt 60

tccatcacag actgcttaac tctggccttc agggtggagt tggcaaatgt gtctcctggg 120

ctctgggttc tcagatgggg ttcctgtggg tggtggtgtg cgctgaggca gtgtctcagt 180

cagaactcag tcacaaaatg ccaccatctc tggggagtgt caggtcactg cctaccaaat 240

gacctcagcg ggttatgcca gttgcctctc atctctaagt taaagagggt atgtgcaaaa 300

tgcttagtgc agagcccggc atgctggaac actcaggttt gtgaattgtg aaacccttgt 360

tagaaatggc atgcctcact gatgctggaa taacttgagg tcaagtgtcc ctcgtcttta 420

acgacacata gatgatattc ccacactcca tgtcttttcg gaagcaaagt acccattacc 480

acttccttcc actcgtacaa atgtgccttt gtccacacaa tgatactcaa ggtcttattg 540

tctgcttact atatgtagcc ttctctagtg gagatgggct acagtataac cttgaataat 600

tattgaaatt ttgaaaattt tgattaaaaa tgcatttaaa actcacgttt aagaaaactt 660

aaatttttgt tatccttggc ggtttttttt ttcaattttc gataaatatt taagaattgt 720

cttgggcttc aatgcaacct ttgctttgga atgtctacac tgctttcctt gacgctatta 780

gaatgcagct ccctgtctga tgggcgcgaa tttgctggcc cctgatttca gcctgggcag 840

gttcttgtca gacaatcgca ggcccgagtt ctcctagccc atgaagctca aacagcaacg 900

ccgtttcccc ccctaaactt gtagcagaag acagatttgc aatttgtgta acacgaataa 960

tgcctgcctt cgaaacctga catcttttcg aacacaacaa acttgtcatt ggatcgctag 1020

tgtctgaaga cattcatttt gatacttgcc tggctagaat cctgtatgag gggatagact 1080

gttctagatg tgataatgag agttcggaag agagcagccc tttacactgc tcaacaaagt 1140

tctgccctca acaaagcagc aaaggccaaa agctgctgcc ccatagttga agggttggtt 1200

tgtttgtttt ttccctggtg tggaggatgg gggcagtaga ctcttggctc tccatctgcc 1260

atagaaaaat aacttttttg aaggctgggg tgggtatgga ggaactgtct cattaagggt 1320

tatgggtagg acccagagac gtgagtgaag ggagggagtg gtctgcgggt ggggtctgcc 1380

cagcagacaa aatatggggc tccaatcccc tgagtataac ttcactccga gtgaggagaa 1440

agacacccgt agtgcctctc ctcgagatcc atagagcaga gaaaagcgac cgagataaga 1500

gtggacagag gagaaagata tgttcacgaa acggcccccc gcccttgctc cggaggagta 1560

cagccgccga gctgacgccc caaagagggt aagatccacc ctcctcgctc ctccagcaca 1620

caggtcgcgt ggcctgagtc ctggtgactt cagagtcaac ctttttttctc cctgtccctt 1680

cctcctttca tcgggtgcca cctccttccc gtccgtaggt cagtgagcac agacttctca 1740

gtggctcgtt ctagtcccca ggcagacggt ccctcactcc tgtggcttgg cgtcggagac 1800

gctggcagtc atgggca 1817

<210> 4

<211> 391

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

agtaactctt ttgctcccaa ccagtcttcc acaacttaaa cttaatcgtc ctgtcctttt 60

tctgctgccc tcgtggagtg taagtttttg agggagacca gcagaaactg actttccata 120

tgcccctgaa gaataacttc tttgaatgca aagaggtggg gacacggagg atctgtcatt 180

acgggttatt atgggtggga cccagagacg ggagtgaagg gagggtgtgg cccgcgggtg 240

ggatctgtag agcagacaaa atatggggcc cctggcgctt aaagttcagt ttgtctctct 300

tgagcttgga gaaaatcatc cgtagtgcct ccccgggggа cacgtagagg agagaaaagc 360

gaccaagata aaagtggaca gaagaataag c 391

<210> 5

<211> 1283

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (623)..(623)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 5

ataaaaataa tagcttcttc ctcagagtag ttggtggaac tgaaagaata catgtaaagt 60

gcttagtatg acacctgcca cataatatga actgaattat tgtgaattat gataaatttg 120

tcagatactg gtttacaaat cggatgttag aataacatgg aatcagtgtt tcagtcattt 180

tactatacat atgcaatatt ttctacattt gatctcactt cagaaacaaa atactgcccc 240

ccccatttta caaatgcata ttttttttctc agcaataatg ttcaagaaca agtgcttggc 300

ccatattttg ttgtctttac atggctttct ttaaataatg gggatggatt tattaaataa 360

cctcatgagt aattttcaaa atttccatta agatcttgat tgaaattgga tgaaaaatca 420

tttctaagaa aaacccaatg aagtgttttt ctttgccaca tttgacaatt gccttggact 480

tggtaaagta atcattactg tgttgagtac ctccagtgcc ctccttgacg ctgccttaga 540

aaaggtagct gcttttgaat gacaggcagg aatttgttcg ccttttaggt tcagcctgta 600

ggtgccctct gcaggaaatc agnaactagg gttttggaag cagtcagggt ggggttctcc 660

cttgtccctg cagcctcagc aaagactcag gcagtctggc aaaagcagtt tcttcagcat 720

acctaacaga acgcaagttt ccatatgcct gatgcaaata atggcctcca aacgttaaac 780

ctttttgag ataaacttgt tctttaattg ccagcgcctg cagttaattt tgattggcta 840

cactctggtt aaaagaaaat gctttcgatg tgatatggca aatttggaga aaagtaactc 900

ttttgctccc aaccagtctt ccacaactta aacttaatcg tcctgtcctt tttctgctgc 960

cctcgtggag tgtaagtttt tgagggagac cagcagaaac tgactttcca tatgcccctg 1020

aagaataact tctttgaatg caaagaggtg gggacacgga ggatctgtca ttacgggtta 1080

ttatgggtgg gacccagaga cgggagtgaa gggagggtgt ggcccgcggg tgggatctgt 1140

agagcagaca aaatatgggg cccctggcgc ttaaagttca gtttgtctct cttgagcttg 1200

gagaaaatca tccgtagtgc ctccccgggg gacacgtaga ggagagaaaa gcgaccaaga 1260

taaaagtgga cagaagaata agc 1283

<210> 6

<211> 4023

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (3363)..(3363)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 6

aagcttcatg agggcaggag tgcagttttg tttattactg taacctcaga gtagagaagc 60

ctggccacat agtagatgct agtattcgtt tcctagggct gctgtaacag ataccataca 120

tgagttactt aaaacaacag aaatttattc tttcacagtt taggtggcca gaagtcccaa 180

accaagatat aacaaattat atctgcaaag cctttatttc cacagaacca cattctgagg 240

ttctgggtgg acattaattt ggcagggagt agtgggggga cactaaccta ctacagtgct 300

cagtaaatat ttattgggtg aatgaaaatt cagagtgtat tctaagctgt aaacccccttg 360

gatgttttca tcacagtctt ctcttaataa ctgctacaga acataaggat tagtttgtgg 420

tcccagattt tttaggctcc aattctgctt ctaccacttt ctacttgtga gctcttaggc 480

aagctattta actttgtaag cctcagtttc ttctgtaaaa tggtgacaat aagaaataac 540

agtaagtgcc caataagttt taactattat tatgtgtcta tagctatttt aaagcacttt 600

ctatatgtaa tcctcataac aaccgtatta ggtgagccta ttacacttct cattttatga 660

caaaggaaac tagatttgtt tcaagaatga aaaacctaga aaattatatg tcactttatg 720

aagtgcctgg cacatagtac atagaatagc ttagctacaa taatatagat atgtgacttt 780

acctcataac tttaagacat ctcaaattga ttcacaaatc agaaaaaaaa tctgaggcat 840

cagatgtgag gtgaggtgag gtgaggcatc tcagtttttg cacatatggt tactgttatt 900

gagggagctc catgtcattg agggagctcc acgtcattga gggaggactg ggtgggatgc 960

tggccaaagg taggggcata tttaggcagt gaaattgcag ttatgggacc cctctatagc 1020

actagatgtg tgagaggact aaaaataaaa ttcctttgaa atttcttaca gggtcatata 1080

ttacctcctt cccaatgact actgtggtat attagagtag gggattgatg tcccagaaat 1140

attatgtaca tcaaacagaa gatctacaca aattgtttta tcagatactg aatatatcaa 1200

tgggctagag tgtattatag tacatatggg tatgttgttt tccccctttt gactaaataa 1260

actctcccct ctctgcaaca ggtaaatttc cagtttacct ttttcttgct gtttttaatt 1320

ttttttattt tgaaggcttt gtatctttat atctcagctg aaaatattac attctaactc 1380

cccaaagcta ttctcacatt atttgcaagt atttttttcat agtttacatg tttgtgtatt 1440

tgtttaatac attccacaag actgaaagtc ttggtgaggg caggaactct gtctaggttg 1500

ttcatctggc agccagcaaa cccaaaataa gtattagttg aatgaatagc taaatagatg 1560

agccatgggg tagcatatct gttttagcta ctgcttgcct gttatcatcc tgggatgctg 1620

cttgcttctc cgtgatctct tcttgttctt aaattgtctt cagttgtagt actaagtact 1680

aatttgatct gtaatgtgat atgtggctga agtttgctct gtaaaatcac cgtttcatga 1740

ggtatattca atatctttaa tttttccata aatctcttca aggtttgtgt gtgttttctt 1800

ttaaattatc taactagttg gatgtatgct tgaagtgcta gacaataaaa gtttcaatag 1860

gctagaaatg tttctttttg taaaattatt ttaagaaact agatgatggt tgtcacttga 1920

agctgaaatg caaatgtagc tagttttttt taaagaataa ttcaaatagg tcattaaaga 1980

ttactatgag cacactgcat attcaaatca gtttgaatat gttttgagac ttctaatagt 2040

ttatgattct tgacatttta atgagcacac tgcatattca aatcagtttg aatatgtttt 2100

gagacttcta atagtttatg attcttgaca ttttaaaagt ttattataaa gaatataaaa 2160

catctttacc ctcatttttt atgtcattac cttcatgcaa agaatacctc aggtattaat 2220

tctggtgctg ttggtaacta gaactggttg ggttttcttg ctaaaaggaa gtttaaaaaa 2280

tgtttatttt acaccattaa tgcaattagc tttagttctc agaggaacta aaagtggaaa 2340

agtgagggag actgatcgac cctatctcaa atccactgac gtagctactt taatttcata 2400

gtccctgtag cacctccacc agagggcaga aagtggaaga gaaagaagat gaaatagaaa 2460

cttgtacttg gcctcagaat gcctgtagaa accttagcaa ttgaatccag cccttatgtt 2520

ataggctgag ttaactgtgg cccagaaaga ctatgtgatt tgctcacagt tcttgattcc 2580

cagactggca ctgcggtgat ggtgtgtgat gaggtagtat cttagtaaga acacaatcca 2640

gaagtcactg cctcgggggа atcccagctc agcttcttgc tagcttgcgt aggctggtta 2700

cttcacttca gctccctgaa tctgctttct tatctctaaa ataaaaataa tagcttcttc 2760

ctcagagtag ttggtggaac tgaaagaata catgtaaagt gcttagtatg acacctgcca 2820

cataatatga actgaattat tgtgaattat gataaatttg tcagatactg gtttacaaat 2880

cggatgttag aataacatgg aatcagtgtt tcagtcattt tactatacat atgcaatatt 2940

ttctacattt gatctcactt cagaaacaaa atactgcccc ccccatttta caaatgcata 3000

ttttttctc agcaataatg ttcaagaaca agtgcttggc ccatattttg ttgtctttac 3060

atggctttct ttaaataatg gggatggatt tattaaataa cctcatgagt aattttcaaa 3120

atttccatta agatcttgat tgaaattgga tgaaaaatca tttctaagaa aaacccaatg 3180

aagtgttttt ctttgccaca tttgacaatt gccttggact tggtaaagta atcattactg 3240

tgttgagtac ctccagtgcc ctccttgacg ctgccttaga aaaggtagct gcttttgaat 3300

gacaggcagg aatttgttcg ccttttaggt tcagcctgta ggtgccctct gcaggaaatc 3360

agnaactagg gttttggaag cagtcagggt ggggttctcc cttgtccctg cagcctcagc 3420

aaagactcag gcagtctggc aaaagcagtt tcttcagcat acctaacaga acgcaagttt 3480

ccatatgcct gatgcaaata atggcctcca aacgttaaac ctttttgag ataaacttgt 3540

tctttaattg ccagcgcctg cagttaattt tgattggcta cactctggtt aaaagaaaat 3600

gctttcgatg tgatatggca aatttggaga aaagtaactc ttttgctccc aaccagtctt 3660

ccacaactta aacttaatcg tcctgtcctt tttctgctgc cctcgtggag tgtaagtttt 3720

tgagggagac cagcagaaac tgactttcca tatgcccctg aagaataact tctttgaatg 3780

caaagaggtg gggacacgga ggatctgtca ttacgggtta ttatgggtgg gacccagaga 3840

cgggagtgaa gggagggtgt ggcccgcggg tgggatctgt agagcagaca aaatatgggg 3900

cccctggcgc ttaaagttca gtttgtctct cttgagcttg gagaaaatca tccgtagtgc 3960

ctccccgggg gacacgtaga ggagagaaaa gcgaccaaga taaaagtgga cagaagaata 4020

agc 4023

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 7

aagcttcatg agggcaggag 20

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 8

gagctcgctt attcttctgt ccactt 26

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 9

aagcttataa aaataatagc ttcttc 26

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 10

aagcttagta actcttttgc tcccaa 26

<210> 11

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> probe

<400> 11

cgtagaggag agaaaagcga ccaagataaa agtggacaga ag 42

<210> 12

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> probe

<400> 12

cgtagaggag agaaaagcga ccaacttaaa agtggacaga ag 42

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> probe

<400> 13

catagagcag agaaaagcga ccgagataag agtggacaga gg 42

<210> 14

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> probe

<400> 14

catagagcag agaaaagcga ccgacttaag agtggacaga gg 42

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> probe

<400> 15

cacttgataa cagaaagtga taactct 27

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> probe

<400> 16

cacttcttaa cagaaagtct taactct 27