(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[7]
C12N 15/09

(45) 공고일자 2002년11월23일
(11) 등록번호 10-0326136
(24) 등록일자 2002년02월15일

(21) 출원번호	10-1995-0704162	(65) 공개번호	특1996-0700752
(22) 출원일자	1995년09월25일	(43) 공개일자	1996년02월24일
번역문제출일자	1995년09월25일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1994/03211	(87) 국제공개번호	WO 1994/21115
(86) 국제출원일자	1994년03월24일	(87) 국제공개일자	1994년09월29일
(81) 지정국	국내특허 : 오스트레일리아 일본 대한민국 노르웨이 미국 EP 유럽특허 : 덴마크 핀랜드 모나코		

(30) 우선권주장 038760 1993년03월25일 미국(US)

(73) 특허권자 베이롤 칼리지 오브 메드신
미합중국, 텍사스 77030, 휴스톤, 원 베이롤 플라자
(72) 발명자 츄홍-지
미합중국,텍사스77381,더우드랜즈,문시드플레이스10
츄사이-슈
미합중국,텍사스77381,더우드랜즈,문시드플레이스10
베네딕트윌리암에프
미합중국,텍사스77381,더우드랜즈,이스트뉆熾理掠紡?1
(74) 대리인 강명구

심사관 : 안미정

(54) 광범위한종양억제유전자와유전자생성물그리고종양억제유전자요법의방법

명세서

발명의 상세한 설명

<1> 본 발명은 보건국 승인별로 EY06195 하에 지원받은 것이다. 연방정부는 본 발명에 권리가 있다.

<2> 1. 발명의 배경

<3> 1.1. 발명의 분야

<4> 본 발명은 종양 억제유전자(항-온코겐) 분야에서 일반적으로 다양한 사람암의 광범위한 종양 억제 유전자 요법의 실행을 위한 방법과 일반적으로 그 생성물에 관계한다. 특히 본 발명은 종양 세포 치료 방법에 관계하는 것으로, 1) 약 94kD 의 제 2 인프레임 AUG 코돈 개시된 망막아종 단백질을 코드하는 핵산서열로 구성된 벡터를 투여하고 또는 2) 핵산서열에 의해 코딩된 단백질 효과량을 투여하는 것이다.

<5> 1.2. 암

<6> 암과 종양은 매년 450,000명의 사망자를 내는 미합중국에 2번째로 많은 사망원인이다. 세명의 미국인중 한명에서 암이 발생하고 5명중 1명은 암으로 사망한다(Scientific American Medicine, part 12, I, 1, section dated 1987). 암의 유전적 원인과 환경적 원인의 확인에 실제 진전이 있었으나, 암사망율에 통계는 암의 치료와 관련 질병치료에 실제적인 개선이 필요하다.

<7> 1.3. 암유전자

<8> 상당수의 암유전자 즉, 암의 원인에 관련된 유전자가 암의 유전자형과 잘연구된 종양세포에서 확인되었다. 암유전자의 연구는 종양발생과정의 일부를 이해하는데 도움을 제공하고 있다. 암유전자에 대한 연구가 상당히 남아 있으나 현재 알려진 암유전자는 종양발생을 이해하는데 유용한 모델로 작용한다.

<9> 암유전자는 일반적으로 크게 두가지로 분류하는데 활성상태에서 종양발생을 촉진시키는 "온코겐"과 손상받았을때 종양발생의 억제시키는데 실패하는 "종양억제 유전자"이다. 이와 같은 분류는 종양형성의 개념화에 유용한 방법을 제공하고 유전자의 특정대립형, 이의 조절요소, 유전적 배경과 이것이 작용하는 조직환경에 따라 특정 유전자가 상당히 다른 역할을 할 수 있다.

<10> 1.3.1. 온코겐

<11> 온코겐은 이들의 야생형 대립유전자(이와 같은 야생형 대립 유전자는 프로토온코겐이라 한다)에서 특정 조건하에 종양발생을 유도할 수 있는 것으로 성숙되는 체세포 유전자이다. 이는 주로 공지의 그리고 상상의 온코겐과 이와 같은 온코겐에 대해 실제논순이다. 기본정보를 제공하고 본 발명의 영역을 더 잘 이해하기 위해 대표적인 온코겐의 간단한 논의가 제공되어야 한다.

<12> 가령, 온코겐 ras 와 myc 는 일반적으로 온코겐 과정을 이해하는 모델로 간주된다. ras 온코겐은 세포질 단백질을 인코드하고, myc 온코겐은 핵단백질을 인코드하는 것으로 여겨진다. ras 온코겐과 myc 온코겐 어느 하나만으로는 정상세포를 안전히 종양세포로 형질전환시키는 것을 유도할 수 없고 반드시 ras 와 myc 온코겐이 동시에 있고 동일세포에서 함께 발현되었을때 항상 완전한 종양형성이 이루어진다(Weinberg, R.A., 1989, Cancer Research 49:3713-3721, at page 3713). 이와 같은 공조효과는 다른 다수의 연구된 온코겐 사이에서도 나타난다.

<13> 온코겐 종양형성의 모델은 ras 온코겐을 발현하는 세포가 완전히 형질전환안된 정상세포에 의해 포외된 관찰에서 나타난다. 그러나, 대부분 주변세포와 ras-를 발현하는 경우, ras 온코겐 단독으로도 ras-발현세포에서 종양형성을 충분히 유도할 수 있다. 이와 같은 관찰은 온코겐의 숙주세포 주변조직에 변화가 두번째 히트로 간주되기 때문에 종양형성의 다양한 추측이론을 유효하게 한다.

<14> 또다른 동등한 유효가설은 ras 또는 myc 와 같은 온코겐의 활성과 공조작업은 음성 조절인자 즉 종양억제 단백질(Weinberg, R.A., 1989, Cancer Research 49:3713-3721, at 3717; Goodrich, D.W. and Lee, W-H., 1992, Nature 360:177-179)의 비활성을 포함하는 경우이다.

<15> 1.3.2. 종양억제유전자

<16> 종양억제유전자는 야생형 대립인자에서 비정상적 세포증식을 억제하는 단백질을 발현시키는 유전자이다. 종양억제단백질을 코드하는 유전자가 돌연변이되거나 결실될때 생성 돌연변이 단백질 또는 종양억제단백질 발현의 완전한 부족은 정확하게 세포증식 조직이 실패하게 되고, 비정상적인 세포증식이 일어나고, 세포조절기작에 이미 손상된 경우에 특히 많다. 잘연구된 사람종양과 종양세포주에는 비기능적 종양억제 유전자의 손실을 나타내고 있다. 종양 억제 유전자에는 망막아종 의심유전자 또는 RB 유전자, 결장 칼시노마(DCC) 유전자에 결실된 p53 유전자, 신경섬유종증 타입 I(NF-1) 종양억제유전자(Weinberg, R.A. Science, 1991, 254:1138-1146)를 포함하나 이에 한정하지 않는다. 종양억제유전자의 활성 또는 비활성의 상실은 상당수의 사람 암의 개시 또는 진전에 중요한 역할을 한다.

<17> 가상 종양억제유전자 목록은 많고 더 양이 많아지고 있다. 다음의 종양억제유전자의 논의는 잘 공지된 종양억제유전자의 완전한 재검토를 제공함이 아니라 비정상적인 증식세포 즉 종양 또는 암세포에 의해 특징화되는 질병과 질환의 성공적인 유전자 요법을 제공하기전에 본 기술에 문제점을 극복하기 위한 기초자료로 제공된다.

<18> 1.3.2.1. 망막아종 유전자

<19> RB 유전자는 가장 잘 연구된 종양억제유전자중의 하나이다. RB 유전자 상보 DNA(cDNA)의 크기는 약 4.7Kb 로 유전자 조작이 용이하여 RB 유전자를 다수의 세포주로 삽입할 수 있다. RB 유전자는 주요 망막아종과 연조직과 골의 육정, 약 20-40% 가슴, 폐, 전립선과 방광육종(Lee, W-H., et al., PCT Publ. No. W090/05180, at pages 38 and 39; see also, Bookstein, R. and lee, W-H., 1991, Crit. Rev. Oncog., 2:211-217; Benedict, W.F. et al., J. Clin. Invest., 1990, 85:988-993)에서 손실되거나 결손된 것으로 보인다.

<20> 분리된 RB-cDNA 단독의 연구에 기초하여 예측한 RB 유전자 생성물은 928 아미노산과 예상 분자량은 10kD(Lee et al., 1987, Nature, 329:642-645)이다. 예측된 RB 유전자 발현에 상응하는 자연인자는 실제 분자량 110-114kD(Lee et al., 1987, Nature, 329:642-645) 또는 110-116kD(Xu et al., 1989, Oncogene 4:807-812)을 가지는 핵인 단백질로 확인되었다. 일반적으로 문헌에는 $p110^{RB}$ 로써 RB 유전자에 의해 코드된 단백질을 말한다. 이와 관련하여 SDS-PAGE 의 실제 관련 분자량의 측정은 단백질 2차 구조때문에 부정확하다. 따라서, 928 아미노산의 전체길이 RB 단백질은 115KD(Yokota et al., 1988, Oncogene, 3:471-475) 또는 105KD(Whyte et al., 1988, Nature, 334:124-129) RB 단백질이라 칭한다. RB 유전자의 다양한 돌연변이가 공지되어 있다. 이들은 일반적으로 비활성이다. 그러나 $p56^{RB}$ 은 지적된 56KD 절단된 RB 단백질은 실제 $p110^{RB}$ 가 가지는 것과 마찬가지의 기능을 하는 것으로 간주된다(Goodrich et al., 1992, Nature 360:177-179).

<21> SDS-PAGE 정상 사람세포에서 RB 단백질은 Mr 이 110KD인 하부 예리한 띠와 이 위쪽으로 매우 다양한 부위 110KD 에서 116KD 의 넓은 띠를 가진다. 110KD 띠는 포스포릴화안된 RB 단백질이고 반면에 넓은 부분은 포스포릴화된 RB 단백질을 나타낸다. 다양한 정도의 포스포릴화에서 분자량이 다르게 된다(Xu et al., 1989, Oncogene, 4:807-812).

<22> RB 단백질은 포스포릴화 반응에서 주기적인 변화를 나타낸다. 대부분 RB 단백질은 G1 상에서 포스포릴화 되지 않으나 대부분 RB 분자는 S 와 S2 상에서 포스포릴화된다(Xu et al., 1989, Oncogene, 4:807-812; DeCaprio et al., 1989, Cell, 58:1085-1095; Buchkovich et al., 1989, Cell, 58:1097-1105; Chen et al., 1989, Cell, 58:1193-1198; Mihara et al., 1989, Science, 246:1300-1303). 또한 포스포릴화안된 RB 단백질만이 SV40 거대 T항원에 결합한다. 거대 T항원에 결합된 RB 단백질이 거대 T항원에 성장촉진효과에 중요하다면 이는 포스포릴화안된 RB 단백질이 RB 단백질의 활성형이고 S 와 G2 상에 포스포릴화된 RB 단백질이 비활성형임을 제시한다(Ludlow et al., 1989, Cell, 56:57-65).

<23> 제 1 인-프레임 AUG 개시 코드 RB 단백질을 발현하는 RB 유전자는 여기에서 고유 RB 유전자라 하고 RB^{110} 유전자 또는 $p110^{RB}$ 코드 유전자라 한다. 다양한 항-RB 항체에 면역반응성인 미지기원의 더 작은 분자량(<100 KD, 98KD, or 98-104KD) 밴드는 면역침전과 웨스턴 블랏에서 감지될 수 있다(Xu et al., 1989, Oncogene, 4:807-812; Furukawa et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:2770-2774; Stein et al., 1990, Science, 249:666-669).

<24> RB^{110} cDNA 오픈 리딩 프레임서열(McGee, T.L., et al., 1989, Gene, 80:119-128)이 엑손 3, 뉴클레오티드 355-357에 위치한 제 2 인-프레임 AUG 코든에 나타나는 것을 감안하면, 추정된 제 2 AUG 코든-개시된 RB 단백질은 $p110^{RB}$ 단백질보다 훨씬 적은 98KD 또는 12KD 이다. 더 적은 분자량 밴드는 포스포릴

화중인(98KD)것과 포스포릴화된(98-140KD) RB 단백질로 RB mRNA(Xu et al., 1989, Oncogene, 4:807-812)의 제 2 AUG 코드에서 해독된 것으로 보인다. 따라서 제 2 인-프레임 AUG 코돈에서 실제 RB 유전자의 발현을 확인할 수 있는 관찰은 없다. 또한, 4.2.1.과 도면 5 에서는 미지기원과 제 2 AUG 코돈-개시된 단백질 생성물의 98KD 단백질 띠의 미-확인을 나타내는 데이타를 제공한다.

<25> 기능적 RB^{RB} 유전자를 RB-종양세포로의 유입은 세포를 "정상화"시키는 것으로 제안된다. 물론 보통의 RB 유전자 발현("RB+")이 된 종양세포는 RB^{110} 유전자 치료법에 반응하게 되는 것으로 추측되지는 않는데 이는 추가의 RB 발현의 첨가가 비-RB 유전적 결합을 수정할 수는 없기 때문이다. 사실, 정상 $p110^{RB}$를 발현하는 골육종 세포주 U-2 OS 와 같은 RB+ 종양세포주의 경우에 추가의 $p110^{RB}$ 코드유전자의 유입이 이와 같은 종양주의 신조직형성 표현형을 변화시키지는 않는다(Huang, et al., 1988, Science, 242:1563-1566).

<26> 하나의 보고된 예외에서 공지의 RB를 가지지 않거나 또는 다른 유전적 결함없는 정상 사람 섬유아세포 WS1 내로 $p110^{RB}$ 코드 벡터의 유입이 세포성장을 유도하였다(WO91/15580, Research Development Foundation, by Fung et al., PCT application filed 10 April 1991, published 17 October 1991, at page 18). 그러나, 이와 같은 결합이 숙주세포에 잘공지된 성장-촉진효과가 있는 SO40 T 항원을 생산하는 플라스미드 ppVUO-Neo가 감염된 WS1 섬유아세포의 세포성장에 효과적인 RB^{110} 발현의 비교로 부적절하게 사용되었기 때문에 잘못 해석한 것이다(Fung, et al. Id. see Example 2 page 25). 이와 같은 관점은 야생형 RB 유전자로 처리하여 "치료할 수 없는" RB+ 종양세포를 특징으로 하는 실시예에 제공된 유사 확인 자료와 함께 광범위한 문헌에서 확인되었다. 또한, WS1 세포주는 일반적으로 배양시에 제한된 세포분열을 하는 비-종양성 사람 이매체를 일반적으로 인지한다. 따라서, 단순히 WO91/15580이 RB^{110} 유전자로 RB+ 종양을 효과적으로 치료하는 방법을 제공하는 것이 아니다. 따라서 어떠한 형태의 유전적 결함을 가지는 비정상적 증식세포의 치료용으로 광범위한 종양억제 유전자의 필요성이 남아있다.

<27> 1.3.2.2. 신경섬유종증 유전자

<28> 신경섬유종증 I 또는 von Recklinghausen 신경섬유종증은 새로운 생식세포 돌연변이를 통하여 발생된 돌연변이 대립인자의 유전으로 인한 것이다(C.J. Marshall, 1991, Cell, 64:313-326). NF1 유전자로 칭하는 신경섬유종증 타입 I 유전자는 상대적으로 큰 돌연변이율 10^{-4} 를 가진다. NF1 유전자에 결핍은 cafe-au-lait sports 에서 피부 신경섬유종까지의 임상증 증세와 Schwannomas와 신경섬유육종에 말초신경에서 나타난다.

<29> NF1 유전자는 ras 프로토온코겐의 생성물과 상호작용하는 세가지 단백질과 구조적으로 유사성을 가지는 약 2485 아미노산 단백질을 인코드한다(Weinberg et al., 1991, Science, 254:1138-1146 at page 1141). 가령, NF1 아미노산 서열은 ras GAP, p21 ras 의 GTPase-활성 단백질의 촉매 도메인에 유사한 서열을 나타낸다(C.J. Marshall, 1991, Cell, 64:313-326 at pages 320 and 321).

<30> 세포 사이클 조절에서 NF1의 역할은 실제 복잡한 것이어서 완전히 밝혀지지는 않는다. 가령, 이스트에서 온코겐 활성화된 p21 ras 의 억제물질이라는 가설이 있다(C.J. Marshall, (1991, Cell, 64:313-326, bringing pages 320 and 321, and citing to Ballester et al, 1990, Cell, 63:851-859)). 한편 NF1 상호 작용의 또 다른 가능성은 이용할 수 있는 자료에 의해 지지받는다(C.J. Marshall, 1991, Cell, 64:313-326 at page 321; Weinberg et al., 1991, Science, 254:1138-1146 at page 1141).

<31> 현재, 야생형 NF1 유전자로 NF1 세포의 치료하는 시도는 NF1 위치와 크기의 복합성 때문에 시도되지 않았다. 따라서, NF1 치료와 다른 종류의 종양 또는 암을 치료할 수 있는 광범위한 종양 억제 유전자를 가지는 것이 매우 바람직하다.

<32> 1.3.3.3. p53 유전자

<33> p53 유전자의 체세포 돌연변이는 사람암에 가장 빈번히 돌연변이된 유전자로 일컫는다(Weinberg et al., 1991, Science, 254:1138-1146 at page 1143). 정상 또는 야생형 p53 유전자는 손상받았을때 세포 형질변환을 선호하는 세포성장의 음성적 조절자이다. RB 단백질에서 기술한 바와 같이, p53 발현 생성물은 핵에서 발견되고 이는 $p110^{RB}$ 와 공조하여 또는 나란히 작용한다. 다양한 관찰에 의해 p53 와 $p110^{RB}$ 단백질은 SV40, 아데노바이러스와 사람 파필로마바이러스의 온코단백질에 의해 결합 또는 파괴되는 표적이 된다.

<34> p53 이 결실된 종양세포주는 종양발생을 감소시키기 위한 야생형 p53 벡터로 성공적으로 치료할 수 있다(Baker, S.J., et al., 1990, Science, 249:912-915). 그러나, 이들 위치에 병소를 만들지 않은 세포로 p53 또는 RB^{110} 의 도입은 세포증식에 영향을 주지 않는다(Marshall, C.J., 1991, Cell, 64:313-326 at page 321; Baker, S.J. et al., 1990, Science, 249:912-915; Huang, H.-J.S., et al., 1988 Science, 242:1563-1566). 이와 같은 실험에서 종양억제 유전자에 의해 이들의 성장억제에 대한 세포 민감성은 세포에서 일어나는 유전자 변화에 따라 달라진다. 이와 같은 의존성은 ras 온코겐의 돌연변이적 활성뒤에 p53 종양억제물질 또는 유전자위치에 변화가 나타나는 특정 암에서 관찰됨으로써 더 복잡해졌다(Marshall, C.J., 1991, Cell, 64:313-326; Fearon, E.R., and Vogelstein, B., 1990, Cell, 61:759-767).

<35> 따라서 이는 비정상적인 세포증식의 원인이 되는 각 돌연변이된 유전자의 특정 확인에 의존하지 않는 광범위한 종양억제 유전자의 필요성이 남아있게 된다.

<36> 1.3.3.4. 결장 육종 유전자(DCC)에 결실

<37> 결장암의 종양형성에 다단계를 결장경에 의해 발생동안에 모니터하였다. 관련조직의 생검과 결장경의 복합은 악성종양을 유도하는 퇴행성 유전적 과정을 밝혔다. 하나의 잘 연구된 과정은 돌연변이된 활

성화된 k-ras 대립인자를 가지는 세포의 60% 가 큰 폴립으로 시작된다. 이들 대부분 종양은 결장육종(DCC) 유전자 결실, p53 종양억제유전자의 비활성이 따르는 비활성-돌연변이 유전자로 진행된다.

<38> DCC 유전자는 수용체로 되는 190-KD 막통과 인단백질을 코드하는 1만 bp 유전자이고(Weinberg et al., 1991, Science, 254:1138-1146) 이의 손실은 세포성장에 영향을 주게 된다. 또한 DCC는 세포세포간의 상호작용조절에 있어 DCC 프로토진에 중요한 역할을 함이 틀림없는 중성세포 흡착분자(Marshall, C.J., 1991, Cell, 64:313-326)와 부분적으로 유사한 서열을 가지는 것을 나타낸다.

<39> K-ras, p53 의 복합성과 함께 DCC 유전자의 큰 크기와 복합성 그리고 결장암과 관련된 다른 유전자는 광범위한 종양억제 유전자의 필요성과 DCC 유전자의 조절에 의존하지 않고 또는 결장육종세포에 다른 특정 손상 유전자의 확인에 의존하지 않는 결장육종세포 치료방법이 필요하다.

<40> 1.4 유전적 요법: 유전자 전달방법

<41> 유전자 전달에 의한 사람질병치료는 이론영역에서 실제영역으로 옮겨지고 있다. 처음의 사람유전자 요법시도는 1990년 9월에 시작되었고 이는 아데노신 디아미나제(ADA) 유전자를 이 효소에 다른 치명적 결실을 가진 임파세포내로 전달하는 것과 관계한다. 이와 같은 처음시도의 결과는 매우 고무적이고 또다른 임상적 시도를 자극하는데 도움이 되었다(Culver, K.W., Anderson, W.F., Blaese, R.M., Hum. Gene. Ther., 1991, 2:107).

<42> 사람에 승인된 유전자 전달시도중 하나는 유전자 형질도입을 위해 레트로바이러스 벡터에 의존하는 것이다. 여기에서 레트로바이러스 벡터는 모든 바이러스 유전자가 제거되거나 또는 변경되어 비-바이러스 단백질이 벡터감염된 세포내에서 만들어지도록 한 레트로바이러스이다. 바이러스 복제기능은 감염성 바이러스를 생산하지는 않으나 모든 바이러스 단백질을 생산하는 레트로바이러스 "패키지" 세포를 이용하여 제공될 수 있다. 레트로바이러스 벡터 DNA 를 패키지 세포로 도입하는 것은 벡터 RNA 를 가지고 표적세포를 감염시킬 수 있으나, 감염후 추가의 바이러스 퍼짐은 없는 비리온 생산을 하게 된다. 바이러스가 지속적으로 복제되고 전파되는 자연적 바이러스 감염과 이 과정을 구별하기 위해서는 감염보다는 형질도입이란 용어가 더 자주 사용된다.

<43> 유전자 요법을 위한 레트로바이러스 벡터의 주요장점은 다량의 유전자 전달을 복제세포내로 하여 세포 DNA 내로 전달된 유전자를 정확하게 통합하고, 유전자 형질도입후에 연속한 퍼짐은 없는 것이다(Miller, A.D., Nature, 1992, 357:455-460).

<44> 실제 목적을 위한 이와 같은 문제점은 해결되었으나, 레트로바이러스 벡터의 생산동안에 복제-컴피턴스(헬퍼)바이러스의 생산능력은 여전히 남아있다. 모든 FDA-인증 레트로바이러스 벡터가 PA317 암포트로픽 레트라바이러스 패키지 세포를 이용하여 만든다(Miller, A.D., and Buttimore, C., Molec. Cell Biol., 1986, 6:2895-2902). PA317 세포에 바이러스 서열과 거의 겹쳐지지 않는 벡터의 사용은 이와 같은 경우 증식을 허용하는 검사의 경우에도 헬퍼 바이러스 생산은 제거된다(Lynch, C.M., and Miller, A.D., J. Viral., 1991, 65:3887-3890). 다른 패키지 세포주를 이용할 수도 있다. 가령, 상이한 플라스미드에 상이한 레트로바이러스 부위를 분리하기 위한 지정된 세포주는 복합에 의해 헬퍼 바이러스 생산 가능성을 감소시킨다. 이와 같은 패키지 세포주에 의해 생산된 벡터도 사람유전자 요법용 효과적인 시스템을 제공할 수 있다(Miller, A.D., 1992, Nature, 357:455-460).

<45> 비-레트로바이러스 벡터는 유전자 요법에 사용함을 고려할 수도 있다. 이와 같은 것으로 아데노바이러스가 있다(Rosenfeld, M.A., et al., 1992, Cell, 68:143-155; Jaffe, H.A. et al., 1992, Nature Genetics 1:372-378; Lemarchand, P. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6482-6486). 아데노바이러스의 주요장점은 다량의 DNA 단편(36kb 게놈)을 운반하고, 매우 높은 역가(10^{11} ml^{-1})로 비-복제세포를 감염시킬 수 있는 능력이 있다. 이 벡터의 가장 두드러진 용도는 목화공장쥐에 공기층 상피로 흡입기내 주입에 의해 사람 낭포성 섬유정 막통과 전도 조절물질(CFTR)을 수송하는 것이다. 유사하게 허피스 바이러스도 사람 유전자 요법을 위해 가치가 있음이 증명되었다(Wolfe, J.H., et al., 1992, Nature Genetics, 1:379-384). 물론, 어떠한 다른 적절한 바이러스 벡터가 본 발명의 유전자 요법에 이용될 수도 있다.

<46> 사람에게 사용할 수 있는 FDA 승인된 다른 유전자 전달방법은 사람 세포에 직접적으로 리포좀내에 플라스미드 DNA 를 전달하는 것이다(Nabel, E.G., et al., 1990, Science, 249:1285-1288). 플라스미드 DNA는 레트로바이러스 벡터와는 달리 균질성을 가지도록 정제될 수 있기 때문에 사람 유전자 요법에 사용할 수 있음이 용이하게 증명될 수 있다. 리포좀-중개된 DNA 전달에 추가하여 단백질에 플라스미드 DNA 를 복합함으로써 세포에 수용체에 DNA 를 표적시키는 것과 같은 물리적 DNA 전달방법이 사람 유전자 요법에 사용될 수 있다(Wu, G.Y., et al., 1991, J. Biol. Chem., 266:14338-14342; Curiel, D.T., et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8850-8854).

<47> 1.5 암 유전자요법의 제안된 전략

<48> 특정 종양세포는 정상세포와 융합되었을 때 정상기능으로 복귀되는 것으로 나타났는데 이는 야생형 종양억제 유전자 발현산물과 같은 손실인자의 치환이 종양세포를 정상상태로 복귀시키게 하는 것으로 제안된다(reviewed by Weinberg, R.A., 1989, Cancer Research 49:3713-3721, at 3717).

<49> 이와 같은 관찰은 결핍성 종양억제 유전자를 가지는 종양세포의 유전적 치료요법을 제공하는 목적이 있다. 치료에 제시된 방법은 손상된 종양억제 유전자의 확인, 이에 상응하는 손상 유전자를 영향을 받은 종양세포내로 유전자 생성물을 발현시킬 수 있는 레트로바이러스와 같은 벡터수단에 의해 유입시키는 것을 요구한다. 이는 결합된 기능적 유전자가 표적세포를 비-악성 상태로 전환시킬 것이다.

<50> 가령, The Regents of the University of California, in Patent Cooperation Treaty patent application (by Lee et al., number WO 90/05180, having and international filing date of 30 October 1989 and published 17 May 1990 에서는 비활성 또는 견손 종양 억제 유전자를 확인하고 기능적 등가체로 결손 유전자를 대체하는 과정을 상술하고 있다. 특히 WO 90/05180 에서는 이와 같은 세포에 비-악성을 제

공하기 위해 레트로바이러스 벡터에 의해 RB-종양세포내로 기능성 RB^{110} 유전자를 삽입하는 것에 기초한다.

<51> 또한, 국제출원 WO89/06703에서는 망막육종 유전자 발현 생성물의 투입에 의해 망막육종 결손 종양의 치료를 제시한다.

<52> 이와 연관하여, RB-망막아종, 골육종, 방광, 전립선 육종세포내로 RB^{110} 유전자의 도입은 쥐에서 종양형성을 감소시켰으나 이는 세포성장속도를 감소시키지는 않은 것으로 보인다. 결과는 특정 모세포에 따라 다양해진다(Goodrich et al., 1992, Cancer Research 52:1968-1973; Banerjee, A., et al., 1992, Cancer Research 52:6297-6304; Takahashi, R., et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:5257-5261; Xu, H-J., et al., 1991, Cancer Research 51:4481-4485; Bookstein et al., 1990, Science, 247:712-715; Huang, H-J.S., et al., 1988, Science 242, 1563-1566). 그러나, RB-종양세포내로 $p110^{RB}$ 코드유전자의 유입에 의한 종양형성억제는 불완전하다. $p110^{RB}$ 재구성된 종양세포는 쥐에서 공격적 종양을 형성한다(Xu, H-J., et al., 1991, Cancer Research, 51:4481-4485; Takahashi, R., et al., 1991, Proc. Natl. Acad, Sci., USA, 88:5257-5261; Banerjee, A., et al., 1992, Cancer Research, 51:6297-6304). 특히, 교정부위에(이 경우에는 눈) 접종된 $p110^{RB}$ 재규성된 망막아종 세포는 지속적으로 종양을 생성한다(Xu, H-J., et al., 1991, Cancer Research 51:4481-4485). 하기에서 상술하게 되는 이와 같은 발견은 종양 억제 유전자 치환요법이 단순히 "치료된" 세포로 나타나게 된다. 특히, Xu et al의 발견은 이와 같은 단점을 피하기 위해 종양에 대해 개선된 유전적 요법의 필요를 나타낸다.

<53> 유전자 요법에 의한 암치료의 또다른 제안된 방법은 온코겐과 비교하여 역순의 뉴클레오타이드 서열을 가지는 인공 유전자를 종양세포내로 넣음으로써 온코겐의 기능을 길항시킨다(미국특허 제4,740,463 호).

<54> 이와 같은 제시된 해결책은 모두 치료전에 확인될 종양의 특정 유전적 결손을 요구한다.

<55> $p110^{RB}$ 단백질 생성물이 포스포릴화되는 상태에서 활성화되기 때문에(discussed in detail supra) 인산아미노산 분석은 포스포세린과 포스포트레오닌과 포스포티로신을 설명하는데(Shew, J-Y., et al., 1989, Ocogene Research, 1:205-213), 알라닌 또는 발린 또는 다른 것의 유도에 의해 대치된 세린 또는 트레오닌 잔기와 돌연변이 RB 단백질을 만들고 표적 세포내로 포스포릴화안된 RB 단백질은 성장억제를 유도한다(International Application WO 91/15580, Research Development Foundation, by Fung et al., at page 20). 불행하게도, 분석된 모든 경우에서, 위치 돌연변이를 가지고, 포스포릴화안된 상태를 유지하는 사람 RB 단백질은 비활성 단백질이고 종양억제보다는 종양형성과 관련된다(Templeton et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:3033-3037).

<56> 1.6 종양억제 유전자 저항

<57> 종양세포에서 유전자 돌연변이 논의에서 지정된 것과 같이, 모든 암유전자는 유전자 크기 또는 복합성 때문에 적절한 추천 물질이 되는 것은 아니다. 망막아종 유전자는 연구에 용이하게 이용할 수 있는 종양 억제 유전자중 하나이고, 암유전자 치환요법에 다른 단점들의 일부를 이해하는 모델을 제공한다.

<58> RB-결손 종양세포내로 망막아종 종양억제 유전자의 재유입은 종양세포 성장을 억제하고 표적세포의 신조직형성 표현형을 억제하는 것으로 공지되어 있다(WO 90/05180, cited supra; Huang et al., 1988, Science, 242:1563-1566; Bookstein et al., 1990, Science, 247:712-715; Xu et al., 1991, Cancer Res., 51:4481-4485; Takahashi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:5257-5261; Goodrich et al., 1992, Cancer Res., 52:1968-1973; Banerjee et al., 1992, Cancer Res., 52:6297-6304).

<59> 그러나, 종양형성의 억제는 종종 불완전하다. RB-재구성된 종양세포의 상당 %는 누드 쥐종양 형성검사의 상당한 잠복기간 뒤에도 작은 종양을 형성한다. 보통의 RB 발현을 보유하고 있으나 이와 같은 종양은 조직적으로 악성이고 침투적이다(Xu et al., 1991, Cancer Res., 51:4481-4485; Takahashi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:5257-5261; Banerjee et al., 1992, Cancer Res., 52:6297-6304).

<60> 또한, RB-양성종양에서 유도된 몇가지 세포주는 매우 종양형성이 크기 때문에 실제로 쥐에 주입하였을때 상당히 큰 그리고 점진적으로 종양이 성장하게 된다(Zhou, Y.; Li, J.; Xu, K.; Hu, S-X.; Benedict, W.F., and Xu, H-J., Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 34:3214, 1993). 이와 같은 현상은 여기에서 종양억제 유전자 저항(TSGR)이라 하는데 사람암의 종양억제 유전자 요법의 성공적인 수행에 심각한 장애가 된다.

<61> TSGR 현상의 설명 또는 특정 가설에 결합되는 바람없이, RB 유전자 생성물은 TSGR 의 가능한 설명을 예시하는 것으로 보인다. RB 단백질은 활성형(포스포릴화안된 단백질)과 비활성형(포스포릴화된 단백질)을 가진다. 따라서, RB+ 종양세포는 유전되거나 또는 포스포릴화된 RB 단백질을 비활성 상태로 하는 능력과 종양세포 증식을 지속하게 한다. 따라서, p110 단백질을 코드하는 플라스미드 또는 바이러스 벡터로 RB-세포의 전환은 단지 불완전한 억제를 제공하거나 또는 악성세포 집단을 제공하는데 이는 $p110^{RB}$ 단백질이 일부 표적세포에서 포스포릴화되거나 비활성으로 남아 있기 때문이다.

<62> 또는 RB^{RB} 유전자를 발현하는 종양세포는 연속적인 세포분열에 의한 돌연변이에서 다시 RB^{RB} 유전자를 비활성화시킨다(Lee et al., 1990, Immunol. Ser. 51:169-200, at page 188). 따라서 추가의 돌연변이 가능성과 악성의 재발을 피하기 위해 유전자 요법에 의해 종양세포의 치료방법의 필요성이 여전히 남아있게 된다.

<63> 1.7 암 유전자 요법의 장애요인 요약

<64> 간략하면, 종양세포에 대한 실제적인 종양억제 유전자 요법을 얻기 위해 극복해야할 적어도 세가

지 주요 장애가 있는데;

<65> 1) 종양의 유전자요법을 시도하기전에 각 결손 종양 억제유전자 또는 온코겐의 확인과 서열 결정이 필요하다. 이는 특히 연구된 많은 종양세포에서 발견되는 다수의 유전적 결핍을 고려한 문제이다;

<66> 2) 특정 종양억제 유전자 또는 온코겐의 크기와 복합성은 이와 같은 유전자의 조작을 어렵게 하고;

<67> 3) RB[110] 모델 시스템에서 전술한 것과 같이 TSGR이 고유 비정상 세포에서 보다 기능장애가 훨씬 더 장양세포에 발생하는 가능성이 있다.

<68> 따라서, 이와 같은 문제점을 안전하게 극복하기 위한 암세포 또는 종양의 유전적 요법의 필요와 각 치료된 종양세포의 정확한 유전적 결손의 결정의 필요성없이 그리고 TSGR 재발 위험없이 그리고 악성의 제거필요없이 모든 종류의 종양세포에 효과적인 치료를 제공할 수 있다.

<69> 2. 발명의 요약

<70> 본 발명에 의해 암의 종양 억제 유전자 요법의 성공적 실행에 장애요인을 피할 수 있다. 완전히 기대하지 않은 그리고 놀라운 발견으로, 약 94KD(p94[RB])의 제 2 프레임 AUG 코돈 개시된 망막아종 억제 단백질이 광범위한 종양억제물이고 이 단백질을 발현할 수 잇는 유전자 또는 단백질 자체를 암 또는 종양세포와 같은 비정상적 증식세포내로의 삽입은 세포가 노쇠상태로 들어가 증식이 종료된다. 이와 같이 처리된 세포는 단순히 복제를 중단하거나 죽은 것이다. 세포는 공지된 또는 공지되지 않는 어떠한 형태로든 유전적 결함을 가질 수 있고 비정상적 증식과 연관된 유전자 결손의 정확한 특징을 결정해야할 필요는 없다. 또한 처리된 세포집단은 다른 종양 억제유전자로 처리된 세포보다 기대이상의 더 낮은 빈도의 TSGR 재발과 종양악화를 나타내었다. 이 방법은 필요에 따라 반복된다.

<71> 따라서, 종양 또는 암치료에 사용하기 위한 p94[RB] 인코드 벡터와 p94[RB] 단백질을 제공하고 치료방법에 사용하기 위해 적잘한 p94[RB] 단백질을 준비하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 사람과 같은 포유류의 치료법을 제공하고 또한 암 또는 종양세포와 같은 비정상적 증식세포의 치료방법도 제공한다. 광범위하게 본 발명은 증식억제를 얻기 위해 치료될 세포내로 숙주세포 적응성 p94[RB] 인코드 벡터 또는 p94[RB] 단백질이 들어가는 것을 허용하는 적정 방법을 사용하여 비정상적 증식세포를 특징으로 하는 질병을 가진 포유류 또는 비정상적 증식세포를 치료하는 것이다.

<72> 한 구체예에서 본 발명은 이들 세포의 증식을 억제하기 위한 효과량으로 p94[RB] 를 발현하는 발현벡터를 비정상적 증식세포내로 삽입함으로써 비정상적 증식세포를 특징으로 하는 포유류 질병에 p94[RB] 를 코드하는 발현벡터를 투여하여 질병치료하는 방법으로 구성된다. 발현벡터는 바이러스 감염, 형질도입, 리포좀-중개된 전이감염, 폴리브렌 중개된 전이감염, CaPO4 중개된 전이감염 그리고 일렉트로포레이션에 의해 비정상적 증식세포내로 삽입할 수 있다. 치료는 필요할 때까지 반복한다.

<73> 또다른 구체예에서 발명은 포유류의 비정상적 증식세포를 치료하는 방법으로 구성되는데 이는 p94[RB] 인코드하는 발현 벡터를 비정상적 증식세포로 삽입하여 이들 세포의 증식을 억제할 수 잇는 효과량으로 p94[RB] 를 발현시킨다. 치료는 필요할때까지 반복한다.

<74> 또 다른 구체예에서 본 발명은 비정상적 증식세포의 성장을 억제할 수 있는 DNA 분자를 제공하는 것이다. DNA 분자가 p110[RB] 단백질을 코드하지 않는다면 SEQ ID NO:3 에 따른 아미노산 서열을 가지는 p94[RB] 단백질을 인코드한다. 더 적절한 구체예에서 DNA 분자는 서열이 SEQ:ID:NO:1 을 가지고 발현벡터에 의해 발현된다. 발현벡터는 임의 숙주세포 적응벡터일 수 있다. 벡터는 적절하게는 레트로바이러스벡터, 아데노바이러스벡터와 허피스바이러스 벡터에서 선택될 수 있다.

<75> 또다른 구체예에서 본 발명은 SEQ ID NO:3에 따른 아미노산을 가지는 p94[RB] 단백질을 제공한다.

<76> 또다른 구체예에서 본 발명은 숙주세포내로 p94[RB] 인코딩 유전자로 구성된 발현벡터를 삽입하고 이는 숙주세포라 p94[RB] 단백질을 발현하게 하는 단계로된 p94[RB] 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

<77> 또다른 구체예에서, 본 발명은 포유류에 비정상적 증식세포의 치료방법을 제공하는데 포유류에서 치료가 필요한 조직샘플을 제거하고; 조직샘플은 비정상적 증식세포로 구성되고; 조직샘플과 p94[RB] 코딩 발현 벡터의 효과량과 접촉하고; 비정상적 증식세포의 증식을 억제시킬 수 있는 효과량으로 p94[RB] 를 발현시키는 단계로 구성된다. 이 치료는 필요할 때까지 반복한다. 치료된 조직샘플은 고유 또는 다른 포유류에 복귀시킨다. 적절하게는 치료된 조직은 혈액 또는 골수조직이다.

<78> 또다른 구체예에서 본 발명은 포유류에 비정상적 세포증식을 특징으로 하는 질병의 치료방법으로 구성되는데 이 과정은 비정상적 증식세포를 특징으로 하는 질병을 가지는 포유류에 p94[RB] 단백질을 투여하고 이와 같은 p94[RB] 단백질은 세포의 비정상적 증식을 억제할 수 있는 효과량으로 비정상적 증식세포에 삽입되는 과정으로 구성된다. 적절한 구체예에서 p94[RB] 단백질은 치료될 세포내로 삽입하기 위해 리포좀에 포획될 수 있다. 치료는 필요할 때까지 반복한다.

<79> 또다른 발명의 구체예에서, 본 발명은 포유류에 비정상적 증식세포를 치료하는 방법으로 구성되는데 이는 포유류에서 치료가 필요한 조직샘플을 떼어노, 이때 샘플은 p94[RB] 단백질 효과량으로 치료가 필요한 조직과 접촉하는 세포로 구성된다. 이와 같은 치료는 필요할 때까지 반복하고, 그다음 치료된 조직은 포유류 또는 다른 포유류로 복귀시킨다.

<80> 또다른 구체예에서 치료될 종양 또는 암세포는 RB, p53, c-myc, N-ras 와 c-yes-1 유전자로 구성된 집단에서 선택된 하나이상의 유전적 결손 종양억제 유전자와 온코겐을 가지는 세포이다.

<81> 또다른 구체예에서 종양 또는 암세포는 RB 유전자와 p53 유전자로 구성된 집단에서 선택된 종양억제 유전자의 감지가능한 유전적 결함이 없는 세포이다.

<82> 구체예에서 종양 또는 암세포는 폐육종세포이다.

<83> 구체예에서 $p94^{RB}$ 코딩 발현벡터 또는 $p94^{RB}$ 단백질은 이와 같은 치료가 필요한 폐로 리포좀-포획된 $p94^{RB}$ 코딩 발현벡터 또는 $p94^{RB}$ 단백질의 에어로졸 수송에 의해 투여될 수 있다.

<84> 3. 발명의 설명

<85> 3.1. 정의

<86> "암" 또는 "종양"은 조절안되는 비정상적 증식을 나타내는 세포를 특징으로 하는 수많은 질병을 포함하는 임상적 용어이다. "종양"이 조직에 응용될때 일반적으로 비정상적 조직성장 즉 과도한 비정상적 세포증식을 의미한다. 종양이 "양성"인 우 고유위치에서 번지지 않고 "악성"인 경우 숙주몸을 통하여 분석학적 위치에서 다른 부위로 퍼지게 된다. "암"은 악성종양 또는 여기에서 발생되는 질병상태를 설명할 때 사용되는 오래된 용어이다. 또는 본 기술에서는 비정상적 성장을 신조직 형성이라 칭하기도 하고 악성 비정상적 성장은 악성 신조직 형성이라하기도 한다.

<87> 성장이 악성이건 양성이건간에 종양 또는 암세포의 과도한 또는 비정상적 세포증식의 원인은 완전히 밝혀지지는 않았다. 그럼에도 불구하고 세포성장과 분할을 조절하는 하나이상의 기작의 실패로 인한 것으로 보고있다. 또한 세포성장과 분화의 조절기작에는 세포성장의 유전적 그리고 조직적 조절, 체세포 분열과 분화가 포함된다. 이와 같은 기작은 세포핵, 세포질, 세포막과 각세포의 조직 특이적 환경에서 작용하는 것으로 보인다. 정상상태에서 세포가 과도한 또는 비정상적인 세포증식의 형질전환 과정을 종양발생과정이다.

<88> 종양발생과정은 정상세포상태에서 완전한 악성상태로의 다단계 진행과정이 된다. 따라서, 세포조절기작에서 다양한 "적중"은 완전한 악성이 되는데 요구되는 것으로 보인다. 따라서, 대부분의 경우, 과도한 증식의 원인은 없으나 이와 같은 질병은 누적된 사건의 일련의 최종결과이다.

<89> 신체를 통하여 신속하게 퍼질 수 있는 악성종양 또는 암이 가장 두렵고, 비록 양성종양이라 하더라도 이들의 부적절한 성장에 의해 상당히 치사율을 제공하게 된다. 양성 종양은 화학적으로 민감한 부위에 부적절한 성장 또는 중추 또는 말초신경조직, 혈관과 다른 중요한 구조에 압력을 발휘함으로써 상당히 손상되게 한다.

<90> 광범위한 종양억제 유전자는 비정상적인 증식 숙주세포 가령 종양세포에 삽입되고 발현될 때 단백질은 비정상적 증식의 원인과는 관계없이 세포의 비정상적 증식을 억제하는 유전자 서열코딩이다. 여기에서 사용된 제 2 인프레임 AUG(ATG/DNA) 코돈 개시된 망막아종 유전자는 이와 같은 광범위한 종양 억제 유전자를 예시하고 이는 $p94^{RB}$ 를 위한 DNA 분자 또는 RB^{94} 유전자와 같이 언급한다. 망막아종 민감성 유전자의 뉴클레오티드 서열에 따라(McGee, T.L., et al., 1989, Gene, 80:119-128) $p94^{RB}$ 유전자는 엑손 3, 뉴클레오티드 355-엑손 27, 뉴클레오티드 264 로 구성된다. 따라서, 정의에 의해 $p94^{RB}$ 코딩 유전자는 제 2 인프레임 AUG 개시코드에서 상부 RB^{110} 유전자의 일부를 배제한다. 도면 1A-1F에서는 도면의 뉴클레오타이드 19 에서 ATG 코드가 개시되는 RB^{94} 유전자의 DNA 서열을 나타낸다(SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2).

<91> 광범위한 종양억제 단백질(인단백질, 지방단백질, 당단백질과 다른 단백질 유도체 포함)이 비정상적 증식세포에 발현될 수 있도록 주입되거나 흡수되어 비정상적 세포증식을 감소시키거나 또는 완전히 억제한다. 여기에서 상술된 제 2 인프레임 AUG 코돈 개시된 망막아종에 의해 발현된 단백질은 이와 같은 광범위한 종양억제 단백질의 예이다. 약 94KD 의 분자량을 가지는 인단백질로 여기에서는 $p94^{RB}$ (SEQ ID NO:3)로 칭한다.

<92> 본 기술에 숙지된 자는 종양억제 단백질의 다른 단편 즉, 약 90KD 와 83KD 의 3 또는 4번째 AUG 코돈 개선된 망막아종 단백질이 비정상적 세포증식을 억제하는 성질을 가지는지를 결정할 수도 있을 것이다.

<93> 3.3 발명

<94> 본 발명은 암 또는 종양세포와 같은 비정상적 증식표적세포에 발현벡터에 의해 발현된 $p94^{RB}$ 가 비정상적 증식을 억제한다는 예측하지 못한 발견에 기초한다. 놀라운 것은 치료가 모든 테스트한 종양세포주에 효과가 있었고 그리고 이는 RB-종양세포의 치료에 한정하는 것은 아니다.

<95> 특정가설 또는 작용기작에 의해 결합시킴없이 $p94^{RB}$ 단백질이 활성 포스포릴화된 형으로 남아 있고 $p110^{RB}$ 보다 2 내지 3배 긴 표적세포에서의 반감기를 가진다. 따라서 활성형의 포스포릴화된 상태로 남아있는 경향이 있는 $p94^{RB}$ 누적의 공조적 복합이 표적종양세포에 세포증식 과정을 종료하게 한다. 그러나, 어떠한 작용기작이건간에 유전적 결함에 무관하게 세포성장의 억제와 무기력 유도 또는 어떠한 비정상적 증식세포의 치사등의 성질은 완전히 예측할 수 없다.

<96> 광범위한 종양억제 단백질을 얻기 위해 제 2 인프레임 AUG 코돈-개시된 RB 단백질을 코딩하는 유전자 즉 $p94^{RB}$ 는 안전한 핵인 단백질로써 곤충 숙주세포에 베큘로바이러스 벡터에 의해 발현된다. $p94^{RB}$ 의 생성된 포스포릴화안된 형은 SV40 T 항원과 특이적 복합체를 형성할 수 있는데 이는 $p94^{RB}$ 단백질이 자

연발생된 $p110^{RB}$ 단백질의 많은 기능적 특징, 포스포릴화반응, 바이러스 온코단백질관련과 핵 터터링의 성질을 공유하는 것으로 보인다(Templeton et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:3033-3037).

<97> 제 1 또는 제 2 인프레임 AUG 코돈-개시된 RB 단백질 발현 플라스미드에 의한 감염효과는 잘 공지된 사람 종양 세포주와 비교한다. 테스트된 세포주에는: RB-결손된 사람 방광 육종세포주 15637(ATCC HTB9); RB-결손된 사람 가슴 육종 세포주, MDA-MB-468(ATCC HTB132); RB-결손된 사람 비소세포폐 육종 세포주, H2009(Kratzke, R.A., et al., 1992, The breast carcinoma cell line, MDA-MB-468(ATCC HTB132); RB-결손된 사람 가슴 전립선 육종 세포주, DU145(ATCC HTB81); RB-결손된 사람 골육종 세포주, Saos-2(ATCC HTB85); RB-결손된 사람 섬유 육종 세포주, Hs913T(ATCC HTB152); 사람 경부 아데노 육종 세포주 HeLa(ATCC CCL2)와 사람 섬유 육종 세포주 HT1080(ATCC CCL121)를 포함한다. HeLa와 HT1080 세포주는 정상의 $p110^{RB}$ 발현을 가진다. 이들 세포주 각각은 별도로 $p110^{RB}$ 코딩과 $p94^{RB}$ 코딩 발현 플라스미드로 전이감염된다. 결과는 제 2 인프레임 AUG 코돈 개시된 RB 단백질, $p94^{RB}$ 가 더 효과적인 세포성장 저해제이고 이는 종양세포를 분할하여 쇠약하게 하고 죽게 한다. 한편, 대부분 정상 사람세포는 장기간 잠복기후에도 분할되지 않거나 또는 세포 사이클로 들어가게 된다. 따라서 $p94^{RB}$ 는 세포 사이클 조절인자로써 치료요법제로써 정상세포에서 일시적으로 발현될때 거의 독성이 거의 없게 된다.

<98> 연구에서 제 2 인프레임 AUG 코돈 개시된 RB 단백질, $p94^{RB}$ 를 발현하는 RB-종양세포는 DNA 내로 3H-티미딘을 결합시키는데 실패한 것을 증명함으로써 세포 사이클을 통한 진전이 없다. 그러나, DNA 증식을 하는 세포 빈도는 RB-인 세포보다 고유 RB 단백질($p110^{RB}$)를 생산하는 세포에서 약간 낮다.

<99> 특히 흥미로운 것은 TB-결손 방광 육종세포주 5637 은 제 2 인프레임 AUG 코돈 개시된 RB 단백질을 포스포릴화 하는데 실패하였다(웨스턴 블랏분석에서 나타남). 대조적으로, 전이감염된 5637 세포에서 발현되는 고유 RB 단백질($p110^{RB}$)는 완전히 포스포릴화된다. 또한, 제 2 인프레임 AUG 코돈 개시된 RB 단백질, $p94^{RB}$ 의 반감기는 고유 RB 단백질($p110^{RB}$)보다 2 내지 3배 크다. 따라서, 단지 포스포릴화안된(활성) $p94^{RB}$ 단백질의 누적은 일시적 전이감염된 5637 종양세포가 S 상으로 들어가는 것이 실패되고 이는 다시 종양세포를 쇠약하게 하고 죽게된다.

<100> 또한, 100RB 와 비교하여 세포단백질을 가지는 것으로 보인다. 관련 단백질에서의 차이는 $p94^{RB}$ 단백질의 독특한 광범위 종양세포 성장억제기능에 공헌을 한다.

<101> 두개 섬유육종 세포주 HT1080과 경부 육종 세포주 HeLa 는 보통의 RB 유전자 발현을 가지는데 이는 제 2 인프레임 AUG 코돈 개시된 RB 단백질($p94^{RB}$) 발현 플라스미드와의 처리가 성공적이었음을 나타내는데 이는 RB+ 암 또는 종양세포에 $p94^{RB}$ 단백질의 발현이 종양세포 성장을 상당히 억제함을 설명한다. 따라서, 본 발명의 장점은 여기에서 상술된 방법과 생성물이 특이적 종양 억제물질 유전자 결손없이 종양을 치료할 수 있고 이는 사람 종양억제 유전자 요법에서 기존기술보다 상당한 장점을 제공한다.

<102> 표 1 에는 테스트된 종양 세포주, 이들 종양기원과 유전자 결손의 확인을 요약한 것이다.

표 1. $p94^{RB}$- 처리된 사람종양에서 정리온코겐(종양억제유전자)과 온코겐의 상태.

사용세포	종양 기원	정리 온코겐 RB	정리 온코겐 p53	온 코 겐
5637	방광 암육종, 1차 종양	-	돌연변이	
DU145	전립선 암육종, 뇌로 전이	위치돌연변이	돌연변이	
MDA-MB-468	유방 암육종	큰 결실	돌연변이	
H2009	폐 암육종	돌연변이	돌연변이	
Hs913T	섬유, 1육종, 폐로 전이	큰 결실	-	
Saos2	골육종, 1차 종양	큰 결실	-	
HeLa	경부 암육종, 1차 종양	정 상	-	c-myc activation[1]
HT1080	섬유 육종, 1차 종양	정 상	-	N-ras and c-yes-1 activation[2,3]

1 Durst, M., et al. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84(4):1070-1074, 1987.

2 Brown, R., et al. A mechanism of activation of an N-ras gene in the human fibrosarcoma cell line HT1080. EMBO J., 3:1321-1326, 1984.

3 Sugawara, K., et al. Distribution of c-yes-1 gene product in various cells and tissues. Br. J. Cancer, 63(4):508-513, 1991.

<104> 3.3.1. RB 벡터의 준비

<105> 3.3.1.1. 치료요법적 벡터

<106> Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J.(1989): Molecular Cloning (A Laboratory

Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; and Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K.(1992): Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 에 상술한 것과 같이 벡터내로 DNA 단편의 삽입을 위해 공지된 방법중 하나로 적절한 전사/해독 제어 시그날과 제1 프레임 AUG 코돈에서 하류로 소요 RB cDNA 서열 즉, $p110^{RB}$ 를 코드할 수 없는 소요 RB cDNA 서열로 구성된 $p94^{RB}$ 인코드 유전자 발현 벡터를 만드는데 사용된다. 이 방법들은 DNA 재조합과 합성기술 그리고 생체에서 유전자 재조합을 포함한다. $p94^{RB}$ 를 인코드하는 핵산 서열발현은 제 2 핵산서열에 의해 조절되고 $p94^{RB}$ 는 숙주 감염된 또는 재조합 DNA 분자로 감염된 숙주에서 발현된다. 가령, $p94^{RB}$ 발현은 본 기술에 공지된 임의 프로모터/인헨서 요소에 의해 제어받을 수 있다. 프로모터 활성은 대사 생성물 또는 투여된 물질에 의해 유도되거나 또는 조직 특이성이 될 수 있다.

<107> $p94^{RB}$ 유전자 발현을 조절하는데 사용될 수 있는 프로모터/인헨서에는 고유 RB 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터/인헨서(Karasuyama, H., et al., 1989, J. Exp. Med., 169:13), 사람 β-엑틴 프로모터(Gunning, P., et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:4831-4835), 쥐유선 종양 바이러스 LTR 에 있는 글루코코르티코이드-유도성 프로모터(MMTV LTR)(Klessig, D.F., et al., 1984, Mol. Cell Biol., 4:1354-1362), 말로니 쥐 백혈병 바이러스의 LTR(MuLV LTR)(Weiss, R., et al., 1985, RNA Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), SV40 초기 프로모터 부분(Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310), 라우스 육종 바이러스(RSV)의 3' LTR 에 포함된 프로모터(Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797), 허피스 심플렉스 바이러스(HSV) 티미딘 카이나제 프로모터/인헨서(Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445), 메탈로티오닌 유전자의 조절서열(Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42), 아데노바이러스 프로모터(Yamada et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82(11):3567-71)와 허피스 심플렉스 바이러스 LAT 프로모터(Wolfe, J.H., et al., 1992, Nature Genetics, 1:379-384) 등이 포함되나 이에 한정하지는 않는다.

<108> 종양 또는 암세포의 유전적 요법에 사용되는 포유류 숙주세포와 적응할 수 있는 발현벡터에는 플라스미드, 레트로바이러스성 벡터, 아데농바이러스 벡터, 허피스 바이러스성 벡터와 비-복제성 아비폭스 바이러스등 미국특허 5,174,993 에 상술된 것이 포함되나 이에 한정하지는 않는다.

<109> 특이적 구체예에서, pHβAPr-1-neo 에서 유도한 플라스미드 벡터는 사람 β-액틴 유전자 프로모터의 제어하에 $p94^{RB}$ 의 코딩서열을 위치시킴으로써 포유류 세포에서 $p94^{RB}$ 의 발현을 위해 만들어진다(Gunning, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1987, 84:4831-4835).

<110> 특이적 구체예에서, pCMV-Neo-Bam 에서 유도한 플라스미드 벡터(Baker, S.J., et al., Science, 1990, 249:912-915)는 사이토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터/인헨서 서열의 제어하에 $p94^{RB}$ 의 코딩서열을 배치시킴으로써 포유류 세포에 $p94^{RB}$ 의 발현을 위해 만든다.

<111> 또다른 구체예에서, 레트로바이러스 벡터 pLLRNL(Miller, A.D., et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 5:431)는 MuLV LTR 프로모터, CMV 프로모터, β-엑틴 프로모터 또는 다른 효과적인 프로모터의 제어하에 포유류 세포에 형질도입하고 $p94^{RB}$ 단백질을 발현시킬 수 있도록 벡터를 만드는데 이용된다.

<112> 또다른 구체예에서 아데노바이러스 타입 5(Ad 5) 결실 돌연변이, Ad-d 1324, 플라스미드 pTG5955(Rosenfeld, M.A., et al., Cell, 1992, 68:143-155)는 아데노바이러스 타입 2(Ad 2) 주요후 프로모터, CMV 프로모터, β-엑틴 프로모터 또는 다른 효과적인 프로모터의 제어하에 포유류 세포를 감염시키고 $p94^{RB}$ 단백질을 발현하는 아데노바이러스를 만드는데 사용된다.

<113> 3.3.1.2. $p94^{RB}$ 단백질의 생산과 정제를 위한 벡터

<114> 또는 $p94^{RB}$ 의 생산에 적합한 숙주세포와 상응하는 발현벡터는 이들 적용 가능한 숙주세포에 $p94^{RB}$ 단백질을 발현하기 위해 만들어진다. 여기에는 바이러스로 감염된 포유류 세포(가령, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 허피스 심플렉스 바이러스, 아비폭스 바이러스); 베큘로바이러스에 감염된 곤충세포; 이스트벡터 또는 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 로 형질전환된 박테리아를 포함하는 이스트와 같은 미생물등이 포함되나 이에 한정시키지는 않는다. 이용된 숙주-벡터 시스템에 따라 적절한 전사와 해독요소들이 이용될 수 있다. 생산된 $p94^{RB}$ 는 친화력 크로마토그래피, 전기영동, HPLC 또는 공지방법에서 정제될 수 있다.

<115> 특이적 구체예에서, Autographa california 다중 핵 다면성 비루스중 바이러스("AcMNPV")가 용혈 감염동안에 총 세포 단백질의 약 50% 이상의 폴리헤드를 유전자 생성물의 강력한 조절 프로모터와 배양된 곤충 Spondoptera frugiperda 세포(Sf9 세포)에서 $p94^{RB}$ 단백질을 생산하는데 사용된다. 베큘로 바이러스-발현된 $p94^{RB}$ 단백질은 면역친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다.

<116> 3.3.1.3. $p94^{RB}$ 코딩 발현벡터의 감지

<117> $p94^{RB}$ 코딩 삽입체를 포함하는 발현 벡터는 세가지 일반적인 방법에 의해 확인될 수 있다: (a) 핵산 하이브리드 (b) "표식" 유존자 기능의 유무와 (c) 삽입된 서열의 발현. 제 1 접근방식에서 발현벡터내에 삽입된 $p94^{RB}$ 코드 유전자의 존재는 삽입된 $p94^{RB}$ 코딩유전자에 유사하고/상보적인 서열로 구성된 프로브를 이용하여 핵산 하이브리드에 의해 감지할 수 있다. 이와 같은 하이브리드 반응은 선택된 프로브의 크기와 서열에 따라 견숙 조건하에 실행할 수 있다. 제 2 접근방식에서, 발현 벡터/숙주 시스템이 확인될 수 있고, 특정 "표식" 유전자 기능의 유무하에 선택될 수 있다(가령, 티미딘 카이나제 활성, 항세제에 저

항성, 베큘로바이러스 벡터 감염된 숙주세포에서 바이러스성 패색형성) 가령, $p94^{RB}$ 코딩 유전자가 SV40 초기 프로모터와 같은 적절한 프로모터 제어하에 네오마이신 포스포트란스퍼라제 유전자와 같은 주요 선택성 표식 유전자를 가지는 벡터내로 삽입된다면, $p94^{RB}$ 코딩서열을 포함하는 발현 벡터는 표식유전자 기능존재하에(젠네티신 저항성) 확인될 수 있다. 제 3 접근방식에서 $p94^{RB}$ 코딩 유전자를 포함하는 발현벡터는 벡터에 의해 발현되는 $p94^{RB}$ 코딩 유전자의 검사에 의해 확인될 수 있다. 가령 이 검사는 [35S]메티오닌, SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 특정 항체와의 결합, 단백질 카이나제에 의해 포스포릴화에 의해 대사적 방사능 라벨링을 포함하는 검사시스템에서 기초한다.

<118> 3.3.2. $p94^{RB}$ 의 발현

<119> $p94^{RB}$ 단백질 코드서열의 전사와 면역을 위한 필요요소를 포함하는 벡터와 같은 적절한 $p94^{RB}$ 코딩발현벡터는 숙주세포내로 도입된다. 숙주세포는 $p94^{RB}$ 를 발현 생산하는 벡터와 필적하는 세포일 수 있다. 적절한 구체예에서, 숙주세포는 치료될 포유류 종양세포이다. 적절한 구체예에서 숙주세포는 치료될 사람 종양세포이다. 숙주세포에 $p94^{RB}$ 발현은 일시적, 영구적 또는 유도성일 수 있다.

<120> 프로모터/인헨서 서열을 포함하는 필수 전사와 해독 시그날은 고유 RB 유전자와 이의 인접부분에 의해 공급될 수 있다. 다양한 벡터/숙주 시스템이 치료된 종양세포에 $p94^{RB}$ 단백질-코딩서열을 발현시키기 위해 이용될 수 있다. 여기에는 플라스미드 또는 바이러스(가령, 아데노 바이러스, 레트로바이러스, 허피스 심플렉스 바이러스, 아비폭스 바이러스)로 감염되거나, 전이감염되거나 도는 형질도입된 포유류 세포 시스템이 포함되나 이에 한정시키지 않는다. 벡터의 발현요소는 이들의 강도와 특징에 따라 다양하다. 치료될 숙주세포에 따라 하나이상의 적절한 전사와 해독요소가 사용된다.

<121> 3.3.3. 치료방법

<122> 본 발명의 $p94^{RB}$ 인코딩 유전자 구조는 플라스미드 또는 바이러스 발현 벡터와 같은 발현 벡터내로 공지의 방법에 의해 위치시킬 수 있다. 플라스미드 발현 벡터는 칼슘침전 전이감염, 리포좀(가령, LIPOFECTIN) 중개된 전이감염, DEAE 덱스트란-중개된 전이감염, 폴리브렌-중개된 전이감염, 일렉트로포레이션과 세포내로 DNA를 유입시키기 위한 다른 방법에 의해 종양세포내로 유입시킬 수 있다.

<123> 바이러스 발현 벡터는 감염 또는 형질유입에 의해 발현형으로 표적세포내로 유입시킬 수 있다. 이와 같은 바이러스 벡터에는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 허피스 바이러스와 아비폭스 바이러스등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. $p94^{RB}$ 가 비정상적 증식세포에서 발현될때 세포 복제 과정은 중단되고 따라서 세포는 쇠약해지고 세포가 궁극적으로 죽게되어 비정상적인 조직 즉, 종양과 암의 양이 감소한다. 표적세포내에 유전자 구성물을 유입시킬 수 있고 세포증식-억제양에서 여기에서 $p94^{RB}$ 발현을 시킬 수 있는 벡터는 효과적인 방법에 의해 투여될 수 있다.

<124> 가령, 효과농도의 활성 벡터를 포함하는 생리학적인 적정용액은 국소적으로, 비경구, 경구, 비강, 정맥, 근육내, 피하내 또는 다른 적절한 수단에 의해 투여될 수 있다. 특히, 벡터는 표적조직의 종양세포를 치료하기 위한 효과량으로 바늘을 사용하여 표적 암 또는 종양내로 직접 주사할 수 있다.

<125> 또는 눈, 위장관, 비뇨생식기관(예로 뇨방광), 폐와 기관지 시스템과 같은 체내강에 있는 암 또는 종양에는 암 또는 종양에 영향을 받은 공동기관내로 바늘 또는 카테테르 또는 다른 수송튜브로 직접 주입하여 활성 벡터 효과량을 포함하는 생리학적인 적정조성물(가령, 염 또는 인산완충액, 또는 현탁액 또는 유제와 같은 용액)을 수용할 수 있다. X-선, 소노그램, 또는 광섬유 시스템과 같은 효과적인 영상장치가 표적조직의 위치확인과 바늘 또는 카테테르 튜브의 안내에 사용될 수 있다.

<126> 또는 활성벡터의 효과농도를 포함하는 생리적 적정용액은 직접적으로 도달할 수 없거나 분석학적으로 분리해낼 수 없는 종양 또는 암을 치료하기 위해 혈액순환계내로 투여할 수 있다.

<127> 또는 표적 종양 또는 암세포는 공지의 방법에 의해 세포내로 $p94^{RB}$ 단백질을 유입하기 위해 치료될 수 있다. 가령, 리포좀은 생체 또는 시험관으로 약물, 단백질과 플라스미드 벡터를 수송하는데 이용할 수 있는 인공막 소포이다(Mannino, R.J. et al., 1988, Biotechnigues, 6:682-690) (Newton, A.C. and Huestis, W.H., bIOCHEMISTRY, 1988, 27:4655-4659; Tanswell, A.K. et al., 1990, Biochmica et Biophysica Acta, 1044:269-274; and Ceccoll, J. et al. Journal of Investigative Dermatology, 1989, 93:190-194). 따라서 $p94^{RB}$ 단백질은 리포좀에 고효율로 포획될 수도 있고 시험관 또는 생체에서 포유류 세포내로 수송될 수 있다.

<128> 리포좀-포획된 $p94^{RB}$ 단백질은 국소적으로, 눈, 비경구, 비강, 호흡기, 기관지, 근육내 피하 또는 다른 효과적인 경료를 통하여 표적조직의 비정상적 증식세포를 치료하기 위해 투여될 수 있다. 리포좀은 포획된 $p94^{RB}$ 단백질의 효과농도를 포함하는 생리적 적절한 조성물로 투여될 수 있다.

<129> 3.3.4. 치료하게될 종양

<130> 본 발명의 유전자 구조물과 벡터는 종양세포 또는 성장 또는 유사분열을 저해시키는데 효과적이다. 본 발명의 유전자 구조물은 육종과 카르시노마의 종양세포의 치료에 효과가 있는 것으로 설명된다. 특히, 본 발명의 유전자 구조는 다음과 같은 종양세포형, 방광 암육종, 폐암육종, 가슴 암육종, 전립선 암육종, 섬유육종, 골육종, 경부 암육종에서 복제를 억제하고 세포쇠약을 유도하고 세포죽음을 유도하는 것으로 설명한다.

<131> 또한 본 발명의 유전자 구조물은 복제를 억제하고 세포쇠약을 유도하고, 세포를 죽음에 이르게하는 효과를 설명하는데 이때 종양세포는 다음과 같은 확인된 유전자 결손을 가진다. 종양 억제유전자 RB

와 p53 돌연변이, 온코겐 myc 활성과 온코겐 N-ras 와 c-yes-1 활성을 가진다.

<132> 또한 본 발명의 유전자 구조물은 보통 내성 종양 억제제 RB^{110} 와 p53 유전자 발현을 가지는 종양 세포에서 복제를 억제하고 세포쇠약을 유도하여 암세포에서 세포죽음에 이르게하는 것을 효과적으로 설명하였다.

<133> 또한, 본 발명의 유전자 구조물은 임파종, 백혈병과 종양 억제 유전자 DCC와 NF1 유전자 결손을 가지는 종양 세포에 복제를 억제하고 다른형의 세포에서도 억제하나 이는 아직 확인되지 않았다.

<134> 3.3.5. 종양 또는 암조직의 생체의 치료

<135> 적절한 구체예에서 종양세포는 레트로바이러스 아데노바이러스, 종양세포에서 $p94^{RB}$ 단백질을 할 수 있는 다른 적절한 벡터에 의해 형질도입된다. 암세포는 백혈병 환자에서 수득한 혈액 또는 골수시료에 있을 수 있다. 레트로바이러스 벡터 또는 아데노바이러스 벡터 또는 플라스미드 벡터 또는 다른 적절한 벡터의 $p94^{RB}$ 단백질 양은 종양세포수의 감소를 생산하기 위해 샘플내에 충분한 세포를 유도하기 위한 효과량으로 혈액 또는 골수로 투여할 수 있다. 치료된 암세포의 세포증식은 보통의 세포분화 또는 세포쇠약에 유사한 공정에 의해 느려지거나 또는 종료된다. 혈액 또는 골수 또는 다른 조직은 리포좀-포획된 $p94^{RB}$ 단백질의 효과량을 이용하여 생체외에서 처리될 수 있다. 그후 샘플이 기증자로 복귀되거나 또다른 수용자에 복귀시킨다.

<136> 3.3.6. 생체내에서 종양 또는 암조직

<137> 바이러스 벡터를 투여하는 방법이 공지되어 있다. 일반적으로 기술자는 $p94^{RB}$ 단백질을 발현할 수 있는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 플라스미드 벡터 또는 다른 적절한 벡터는 다양한 조작에 의해 암에 투여할 수 있다. 이와 같은 조작은 종양세포를 전이감염시키거나 또는 형질유입시키기 위해 표적종양과 충분히 접촉할 수 있도록 벡터를 위치시킨다. 적절한 구체예에서 공동기관의 상피라이닝에 있는 암은 공동유체로 채워진 기관에 벡터 현탁액을 주입시키거나 또는 기관에 분무시켜 치료할 수 있다. 따라서 종양세포는 폐기관지의 라이닝에 상피조직 사이에 있을 수 있고 이는 위장관 기관의 라이닝, 여성 생식기관, 비뇨 생식기관, 방광, 담즙방광, 그리고 벡터가 용이하게 접근할 수 있는 다른 기관조직에 있을 수도 있다.

<138> 적절한 구체예에서 암은 척수, 척수근 또는 뇌와 같은 중추신경계 라이닝에 위치하고, 뇌유체에 융합된 벡터는 이 공간에 종양세포와 접촉하고 형질유입시킬 수 있다.

<139> 또다른 구체예에서 암은 고형종양이다. 본 기술분야 숙지된 자는 벡터가 종양내부의 종양세포와 접촉하고 형질유입 또는 감염시키기 위해 종양내로 벡터 현탁액의 직접 감염에 의해 종양내로 투여할 수 있다.

<140> 또다른 구체예에서 암은 혈액, 혈액 형성기관 또는 혈액에 의해 직접 관주되는 다른 기관의 암일 수 있고 혈류로 주사되는 벡터는 암세포와 직접 접촉하고 처리될 수 있다. 따라서, 암은 백혈병, 임파종 또는 다른 종양형태가 될수 있고, 암세포는 혈액, 골수, 지라, 흉부, 간, 다른 혈액 관주되는 기관에 있을 수 있다.

<141> 본 기술에 숙지된 자는 벡터는 선택된 벡터의 형질도입 또는 전이감염 효과를 유지하고 안전한 주입을 촉진시키기 위한 적절한 벡터 또는 담체와 벡터로 구성된 조성물로 투여될 수 있다. 이와 같은 담체는 pH 균형잡힌 생리적 완충액, 인산, 시트레이트 또는 중탄산 완충액, 염용액, 서방조성물과 치료될 비정상 증식세포와 접촉하는 벡터에 위치시키는데 유용한 물질이 될수 있다.

<142> 본 발명은 본 발명의 영역을 제한시키지 않는 방식으로 다음의 실시예를 제공한다.

<143> 4. 실시예

<144> 4.1. 곤충세포에 제2 인-프레임 AUG 코돈-개신된 RB 단백질의 발현을 위한 벡터준비

<145> Autographa California 다중핵 다면성비루스증("AcMNPV")는 정확하게 진행되고 생물학적 활성 단백질 다량을 생산하기 위해 광범위하게 이용된다. 배양된 Fall Army Worm Spondoptera frugiperda cells (Sf9 세포)에서 베큘로바이러스는 증식되고, 용혈성 감염동안에 총 세포단백질 50% 이상을 나타내는 폴리헤드로 유전자 생성물의 강력한 조절된 프로모터를 가진다.

<146> 생체내 재조합에 의해 외부유전자의 코딩서열은 폴리헤드론 프로모터의 전사조절하에 용이하게 위치하고 그 결과로 다량이 발현된다. 또한 이와 같은 단백질은 정확하게 폴드되고 고유 고등진핵생물에 이들 단백질과 유사한 적절한 후-해독수정이 포함된다.

<147> 부위-특이적 돌연변이에 의해 두개 BamHI 부위는 +7과 +3230 뉴클레오티드에서 RB cDNA 로 유입된다(제2 인프레임 AUG 코돈의 A 는 +19라 지정되어 있다). 생성된 DNA 분자는 도면1의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2)인데 여기에서 이것은 제2 인프레임 AUG 코돈 개시된 RB 단백질 유전자 또는 $p94^{RB}$ 인코드 유전자이다. 단백질 코드에는 도면2의 서열을 가지고(SEQ ID NO:3)이는 제2인프레임 AUG 코돈-개시된 RB 단백질 또는 $p94^{RB}$ 단백질을 언급한다.

<148> 베큘로바이러스 발현 시스템에 있는 제2인프레임 AUG 코돈-개시된 RB 단백질의 최대 생산을 얻기 위해 재조합 전달벡터는 $p94^{RB}$ 유전자가 폴리헤드론 유전자 프로모터의 제어하에 두기 위해 pVL1393 플라스미드내로 $p94^{RB}$ 유전자의 삽입으로 구성된다.

<149> 도면3에서 볼수 있는 것과 같이, 생성된 pVL-s-RB 플라스미드에는 +19 위치에서 $p94^{RB}$ 해독 개시 부위로부터 상류에 추가의 AUG 시작코돈이 없고 따라서 $p94^{RB}$ 단백질을 인코드한다. 평행한 연구에서 동일

한 전략이 pVL/1st AUG-RB 로 지정한 $p110^{RB}$ 발현벡터를 만드는데 이용한다.

<150> 재조합 벡터에서 바이러스 게놈으로 RB cDNA 의 전달은 pVL-s-RB 플라스미드 DNA 또는 pVL/1st AUG-RB 플라스미드 DNA 와 야생형 AcMNPV 바이러스 DNA 의 공전이 감염에 의해 실행될 수 있다. 재조합 바이러스는 AcMNPV-RB94 와 AcMNPV-RB110으로 지정된 RB-포함 베큘로바이러스의 순수원액을 얻기위해 플락정제를 하게 된다.

<151> 4.2. $p110^{RB}$ 와 $p94^{RB}$ 단백질 정제

<152> $p110^{RB}$ 와 $p94^{RB}$ 단백질은 면역친화적 크로마토그래피에 의해 베큘로 바이러스-감염된 곤충세포에서 정제할 수 있다. 간략하면, 감염세포는 바이러스 감염후 24시간뒤 수득하고 4℃ EBC 완충액(50mM Tris-HCl, pH8.0, 120mM NaCl, 0.5% NP-40, 50ug/ml 아프로티닌)으로 용혈시킨다. 용혈물질은 원심분리에 의해 깨끗하게 하고 $p110^{RB}$ -와 $p94^{RB}$ 포함 상층액은 바이오티닐화된 WL-1 다클론성 항-RB 항체로 4℃에서 24시간 배양한다(Xu, H-J., et al., 1989, Oncogene, 4:807-812), 숙신 아미드 에스테르와 Baylor, E.A. and Wilchek, M., 1980, Methods Biochem. Anal., 26:1-45)의 방법을 사용한 토끼 IgGS 의 바이오티닐화 과정은 상술하였다. RB 단백질-IgG-바이오틴-복합체는 스트렙타아비딘 아가로스 젤 컬럼에 수득한다. 정제된 $p110^{RB}$ 또는 $p94^{RB}$ 는 100mM 글리신(pH 2.2)를 사용하여 컬럼에서 분리하고, 1M 인산(pH 8.0)으로 중화시킨다.

<153> 4.2.1. $p94^{RB}$ 는 $p110^{RB}$ 와 주요 생화학적 그리고 생물학적 특징을 공유한다

<154> 망막아종 단백질의 비-가능성 돌연변이가 포스포릴화반응, 바이러스 온코단백질 연관과 핵위치에 결손이 있는 것을 특징으로 하기 때문에(Templeton et al., 1991, PNAS., USA, 88:3033-3037). 인공적 RB p94 단백질의 기능적면은 이들 특징에 대해 연구되었다.

<155> 우선, 베큘로바이러스와 곤충세포에 RB 단백질이 핵과 연관되는 지를 결정하기 위해 AcMNPV-RB110와 AcMNPV-RB94 감염된 Sf9 세포는 감염 24시간후에 MAb-1 항 RB 단클론항체로 면역염색한다. 도면4에서 볼수 있는 것과 같이 강력한 착색은 AcMNPV-RB110(B) 또는 AcMNPV-RB94(C)와 감염된 세포핵에서 찾아볼 수 있다.

<156> 면역친화력 크로마토그래피에 의해 베큘로바이러스-감염된 곤충세포에서 정제된 $p110^{RB}$ 와 $p94^{RB}$ 단백질은 SV40 T 항원과 특이적 복합체를 형성하기 위해 이들의 능력을 테스트하였다. 간략하면 동량의 $p94^{RB}$ 또는 $p110^{RB}$ 와 T 항원은 혼합하고 혼합물은 PAB419 항-T 항체로 면역침전시킨다. 도면5에서 볼 수 있는 것과 같이 시험관에서 T 항원과 $p94^{RB}$ (또는 $p110^{RB}$)의 혼합은 PAB419와 소포스포릴화된 $p94^{RB}$ (5아인) 또는 아포스포릴화된 $p110^{RB}$ (3라인)의 공동 면역침전하게 된다. 데이타에서 $p110^{RB}$ 또는 $p94^{RB}$ 단백질은 SV40 T 항원과 특이적 복합체를 형성한다. AcMNPV-RB94 바이러스 감염된 곤충세포는 SV40 T 항원과 복합체를 형성할 수 없는 과포스포릴화된 $p94^{RB}$ (라인4)를 만드는 것으로 보인다.

<157> 도면5에 나타낸 웨스턴 블랏은 제2인 프레임 AUG 코돈 개시된 RB 단백질의 상대적인 분자량이 94kD 임이 나타났다. SDS-PAGE에서 $p94^{RB}$ 단백질(도면 5, 라인 4와 5)는 미지 기원의 98kDa 단백질 보다 더 적다(Xu et al., 1989, Oncogene, 4:807-812)(도면5, 라인 1). 따라서 본 발명의 제2인 프레임 AUG 코돈 개시된 RB 단백질은 사람세포에서 자연발생되지 않는 것으로 보인다.

<158> 재조합된 바이러스-감염된 곤충세포에서 생산된 제2인 프레임 AUG 코돈 개시된 $p94^{RB}$ 단백질은 인위적이다. 자연발생 RB 단백질종인 $p110^{RB}$ 와 같이 SV40 T 항원과 특이적 복합체를 형성할 수 있도록 이의 포스포릴화 형과 안정한 핵 인단백질을 이룬다.

<159> 4.3. 포유류 세포에서의 발현벡터의 구성

<160> 4.3.1. 제1과 제2 인프레임 AUG 코돈-개시된 RB 단백질의 RB cDNA 단편 코딩의 서브클로닝

<161> 제1과 제2 인프레임 AUG 코돈개시된 RB 단백질을 코딩하는 RB cDNA의 서브클로닝은 본 기술의 표준방법에 의해 실행될 수 있다. DNA 조작방법은 Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J.(1989): Molecular Cloning (A Laboratory Manual), cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; and Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1992): Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York)에 기술되어 잇다.

<162> 4.3.2. 제2 인프레임 AUG 코돈 개시된 RB 단백질을 인코드하는 DNA 분자준비

<163> 전체 길이 망막아종(RB)유전자 cDNA 를 포함하는 플라스미드 p4.95BT(Friend et al., 1987, PNAS. USA, 84:9059-9063)는 제한효소(Hind II)로 뉴클레오티드 +7 에 그리고 제한효소(ScaI)로 뉴클레오타이드 3,230에서 절단한다(총길이 RB cDNA 오픈 리딩 프레임의 제2인프레임 AUG 코돈의 A는 뉴클레오타이드 +19로 지정되어 있다). 생성된 3,230 bp RB cDNA 단편은 두개 블런트단부를 가진다. 제한효소 BamHI 부위에 블런트 단부의 전환은 BamHI 효소의 절단후에 단편의 각 블런트단부에 합성 BamHI 올리고뉴클레오타이드 링커(GGGATCCC)의 연결에 의해 실시된다.

<164> 소요의 RB cDNA 단편은 플라스미드 벡터 pUC19 의 BamHI 클로닝 부위내로 삽입하고 대장균 균주 DH5 알파 박테리아 세포내에 증식시킨다. 재조합 플라스미드는 하나의 DH5 알파 형질전환체에서 정제하고 플라스미드 pUC-s-RB 라 칭한다. 이 플라스미드에는 816 아미노산의 제2인프레임 AUG 코돈-개시된 RB 단백질을 코드하는 소요의 RB cDNA 단편 3,230bp 를 포함한다.

<165> 4.3.3. 제1인프레임 AUG 코돈 개시된 RB 단백질을 인코드하는 DNA 분자의 준비

<166> 전체길이 RB cDNA 플라스미드는 뉴클레오타이드 -322 와 뉴클레오타이드 3,230에서 제한효소 AcyI 으로 절단한다. AcyI 단부(5'-CG)는 블런트단부를 만들기 위해 모든 4 dNTPs 존재하에 대장균 DNA 중합효소I의 클리노우 단편이 있는 단부를 "채우기" 위해 수선된다. 제한효소 BamHI 부위에 블런트단부의 전환은 전술한 것과 같이 실시한다. 생성된 RB cDNA 단편 3,552bp 는 플라스미드 pUC19 에 삽입하고 대장균 균주 DH5 알파에 넣고 연속하여 하나의 DH5 알파 형질전환체에서 정제하고 이를 플라스미드 pUC-f-RB 로 지정한다. 이 플라스미드에는 928 아미노산의 제1인프레임 AUG 코돈개시된 RB 단백질을 코드하는 3,552bp RB cDNA 단편을 포함한다.

<167> 4.3.4. 사람 β-악틴 유전자 프로모터를 사용하여 $p94^{RB}$ 발현 플라스미드의 구조

<168> 816 아미노산($p94^{RB}$)의 제2인프레임 AUG 코돈개시된 RB 단백질을 코드하는 3,230bp RB cDNA 단편은 플라스미드 pUC-s-RB 에서 제한효소 BamHI 절단에서 회수하고 발현 플라스미드 pHBAPr-1-neo(Gunning, P., et al., PNAS., USA, 1987, 84:4831-4835)에 β-악틴 유전자 프로모터의 직접적인 제어하에 $p94^{RB}$ 코딩서열이 있도록 유일한 BamHI 부위에 재삽입한다. 정확하게 삽입된 플라스미드 벡터는 DH5 알파 대장균 숙주세포에서 증식후 제한효소 지도에 의해 선택될 수 있고 이는 pβA-s-RB34로 지정한다(도면 7B). 플라스미드 pβA-s-RB34를 포함하는 이에 상응하는 DH5 알파균주는 DHB-s-RB34(ATCC 69241, patent depository, American Type culture Collection)로 지정한다.

<169> 플라스미드 벡터 pβA-s-RB34에는 β-악틴 유전자 프로모터와 RB 코딩서열의 제2인프레임 AUG 코돈사이에 추가의 AUG 코돈이 포함되어 있지 않고 이는 비-융합 $p94^{RB}$ 단백질을 인코드한다. 플라스미드 벡터 pβA-s-RB34 에는 SV40 초기 프로모터(도면7, sv-neo)의 별도 제어하에 네오마이신 포스포트란스퍼라제(neo)의 발현을 통한 진핵세포에서 선택성 표식(제네티신 저항성)에 우성을 제공한다.

<170> 4.3.5. 사람 β-악틴 유전자 프로모터를 사용하여 $p110^{RB}$ 발현 플라스미드의 구조

<171> 928 a.a.($p110^{RB}$)의 제1인프레임 AUG 코돈 개시된 RB 단백질을 코드하는 3,552bp의 RB cDNA 단편은 플라스미드 pUC-f-RB 에서 회수하고 β-악틴 유전자 프로모터에서 하방향으로 발현 플라스미드 pHβAPr-I-neo내에 재삽입한다. 생성 플라스미드 벡터는 pβA-f-RB33 이라 칭한다(도면7A). 플라스미드 벡터 pβA-f-RB33 에는 β-악틴 유전자 프로머터와 RB 코딩서열의 제1-인프레임 AUG 코돈 사이에 추가의 AUG 코돈은 없다. 따라서 이는 비-융합 $p110^{RB}$ 단백질을 인코드한다.

<172> 4.3.6. 사이토메갈로바이러스 프로모터(CMVp)를 이용한 $p94^{RB}$ 와 $p110^{RB}$ 발현 플라스미드의 제조

<173> 플라스미드 pHβAPr-Ineo 대신에 발현 플라스미드 pCMV-Neo-Bam(Baker, S.J., et al., Science, 1990, 249:912-915)를 사용할 수 있다. 벡터에는 CMV 프로모터/인헨서 서열이 포함되고 이는 BamHI 부위에서 삽입체의 발현을 유도하고, 토끼 β-글로빈 유전자에서 유도된 폴리아데닐 부위에서 스플라이싱하고 이는 세포에 전사된 삽입체의 적절한 과정을 받게 한다. pBR322 복제원점과 β 락타마제 유전자는 대장균의 플라스미드 증식을 실행한다. 플라스미드는 HSV 티미딘 키이나제 프로모터의 제어하에 네오마이신 포스포트란스퍼라제(neo)의 발현을 통하여 제네티신 저항성(진핵세포에서 선택성 표식)을 제공한다.

<174> 4.3.4 와 4.3.5 에서 제시한 동일한 전략을 사용하여 발현벡터 pCMV-Neo-Bam에 유일한 BamHI 부위로 플라스미드 pUC-s-RB 와 pUC-f-RB 에서 3,230bp 와 3,552bp 인 RB cDNA 단편을 전달하게 한다. 생성된 플라스미드 벡터는 $p94^{RB}$ 를 발현하는 pCMV-s-RB42 와 $p94^{RB}$ 를 발현하는 pCMV-f-RB35 라 칭한다(도면 6). 플라스미드 pCMV-s-RB42 를 포함하는 대장균 DH5 알파 균주는 DHC-s-RB42로 지정한다(ATCC 69240, patent depository, American Type Culture Collection).

<175> 4.3.7. $p94^{RB}$ 단백질 발현하는 레트로바이러스 벡터의 제조

<176> 이 과정을 위해 레트로바이러스 벡터 pLLRNL(Miller, A.D., Law, M.-F., Verma, I.M., Molec. Cell Biol., 1985, 5:431)와 암포트로픽 레트로바이러스 패키지 세포주 PA317(ATCC CRL9078)가 사용 되었다.

<177> 전체길이 RB 유전자 cDNA 를 포함하는 플라스미드 p4.95BT 또는 F7 는 뉴클레오티드 +7 에서 제한효소 HindII로 절단한다(전체길이 RB cDNA 오픈리딩 프레임의 제2인프레임 AUG 코돈 A 는 +19 뉴클레오티드로 지정한다). 제한효소 HindIII 부위에 HindII 부위의 전환은 합성 HindIII 올리고뉴클레오티드 링커를 직선 플라스미드 DNA 의 블런트 단부에 연결하고 HindIII 효소로 절단한다. 직선 플라스미드 DNA 는 3,230 에서 제한효소 ScaI 으로 추가 절단한다. 생성된 RB cDNA 단편 3,230bp 는 816 아미노산의 제2인프레임 AUG 코돈 개시된 RB 단백질을 코드한다($p94^{RB}$). 이 단편은 5-HindIII 부위(코헤시드 단부)와 3'-ScaI 부위(블런트단부)를 가지고 이는 레트로바이러스 벡터 pLLRAN 로 삽입을 실행한다.

<178> 벡터 pLLRNL 은 제한효소; HindIII/ClaI 와 SmaI/ClaI 으로 루시퍼라제 유전자를 떼내기 위해 절단한다. 적절한 단편은 전기영동에 의해 아가로스 겔에서 회수하고 새로운 벡터 pLRB94RNL을 형성하기 위해 RB cDNA 단편 3,230bp 로 연결하고, $p94^{RB}$ 발현을 모노레이 뮤린 백혈병 바이러스(MuLV LTRs)의 LTR 서열의 제어하에 있다.

<179> 레트로바이러스 pLRB94RNL 의 구조를 위한 기본적인 과정은 Huang, H. -J.S., et al., 1988, Science, 242:1563-1566에서 수정 한다.

<180> 또는 벡터 pLLRNL 은 루시퍼라제 유전자와 라우스 살코마바이러스 프로모터(RSV)를 결실하기 위해 단이 제한효소 HindIII로 절단한다. 적절한 DNA 단편은 $p94^{RB}$ 발현 플라스미드 pCMV-s-RB42(또는 pβA-s-RB34)에서 회수된다. 3,230bp RB cDNA 단편과 5'-플랭킹 CMV 프로모터(또는 β-악틴 프로모터)를 포함

하는 회수된 DNA 단편은 레트로바이러스 벡터의 ClaI 제한효소내로 삽입될 수 있다. 제한효소 부위 사이의 전환은 4.3.7 의 방법에 의해 실행한다.

<181> 생성된 $p94^{RB}$ 발현 레트로바이러스 벡터에서 $p94^{RB}$ 유전자는 내 프로모터(CMV 프로모터 또는 β-악틴 프로모터)의 제어하에 있고 Tn5 네오마이신-저항성 유전자(Neo)는 MuLV LTR의 제어하에 있다.

<182> 안전하고 효과적인 암포트로픽 패키지 세포주는 사람 암세포내로 레트로바이러스 벡터 유전자의 전달을 위해 필수적이다. 바이러스 패키지 방법은 Miyanohara et al., PNAS., USA, 1988, 85:6538-6542)의 방법에서 수정할 수 있다. 이 프로토콜에서 PA317 패키지 세포주는 사용할 수 없다. 이와 같은 패키지 세포주는 사람 유전자 요법 임상시도에 사용하기 위해 미리 승인받았다.

<183> 레트로바이러스 벡터(pLRB94RNL) DNA는 LIPOFECTIN reagent(GIBCO BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) 또는 4.4.1에서 전술한 방법에 의해 PA317 패키지 세포내로 전이감염시킬 수 있다. 단일 콜로니는 G418-포함 배지(400ug/ml)에서 선택에 의해 분리하고 대량 배양시킬 수 있다. 선택된 PA317 클론에 의해 생성된 바이러스 역가를 위해 각 PA317 클론에서 무세포 배양 배지 희석액을 POLYBRENE(Sigma, 4ug/ml) 존재하에 208F 쥐 섬유아세포(지시세포)에 제공하고 G418(400ug/ml) 선택은 감염후 24시간에 시작한다.

<184> 두주후에, G418-저항성 클로니는 Giemsa 착색과 역가에 의해 결정할 수 있다. 높은 바이러스 역가를 생산하는 PA317 클론은 이미 언급한 것과 같은(Xu, H. -J., et al., Oncogene, 1991, 6:1139-1146). 웨스턴 이뮤노블라팅에 의해 사람 $p94^{RB}$ 단백질 발현을 검사한다. 다량의 사람 $p94^{RB}$ 단백질을 발현하는 선택된 PA317 클론에서 무세포 배양배지는 생체내 또는 생체외에서 사람 암세포에 제공할 수 있다.

<185> 4.3.8. $p94^{RB}$ 단백질 발현 아데노바이러스 벡터의 제조

<186> 재조합 아데노바이러스 Ad-RB94는 아데노바이러스 타입 5(Ad 5)결실 돌연변이, Ad-d1324와 플라스미드 pTG5955에서 만들 수 있는데 사람 CFTR cDNA 는 $p94^{RB}$ 단백질의 사람 RB cDNA 단편 3,230bp 에 대체한다. RB cDNA 삽입체를 포함하는 플라스미드 pTG5955는 제한효소 ClaI 절단에 의해 직선화되는데 이는 감염성 비리온과 플락형성으로 재조합 아데노바이러스 DNA 의 복제와 외피씌우기를 발생하는 유사 재조합을 허용할 수 있도록 293 (ATCC CRL1573) 세포로 ClaI-절단된 Ad-d1324 DNA 거대단편으로 공감염시킨다. 개별플락은 293 세포내로 분리하고 증폭시킨 후 바이러스 DNA 는 분리하고 사람 RB cDNA(Ad-RB94)를 포함하는 재조합 아데노바이러스 플락은 제한효소 절단과 서던분석에 의해 확인할 수 있다. Ad-RB94 바이러스는 293 세포내에 증식하고 감염후 36시간에 회수한다. 바이러스 준비는 CsCl 밀도 원심분리에 의해 정제하고 즉시 사용하는 경우 4℃ 바이러스 투석 완충액(10mM Tris-HCl, pH7.4; 1mM MgCl2)에 저장하고, 또는 사용하기전에 -70℃에 저장한다. (10% 글리세롤 추가), 재조합 아데노바이러스 Ad-RB94의 제조를 위한 기본과정은 Rosenfeld, M.A., et al., Cell, 1992, 68:143-155 에 의해 수정될 수 있다.

<187> 4.3.9. 물리적 DNA 전달방법

<188> FDA 에 의해 사람에 사용할 수 있도록 승인된 또다른 유전자 절단방법은 그 부위에 종양세포로 직접 리포좀에 플라스미드 DNA 의 전달이다(Nabel, E.G., et al., 1990, Science, 249:1285-1288) 플라스미드 DNA 는 레트로바이러스와는 달리 균일하게 정제될 수 있기 때문에 사람에 사용하기에 용이하다.

<189> $p94^{RB}$ 발현 플라스미드 벡터 pCMV-s-RB42 또는 pβA-I-RB34는 리포좀과 복합체를 형성하는데 사용하고 이는 생체내에서 종양세포를 직접 처리하게 된다. 4.4.1에서 상술한 것과 같이 이 과정에서, 감염된 종양세포내로 DNA 의 안전한 삽입은 일시적인 발현으로 유전자 요법이 요구되지 않는다.

<190> 4.4. $p94^{RB}$ 플라스미드 벡터 pβA-s-RB34 또는 pCMV-s-RB42 로 시험관에서 사람 종양세포의 처리

<191> 4.4.1. 시험관에서 RB-결손 사람 종양세포의 치료

<192> 공지의 RB 유전자 결손을 가지는 사람종양세포는 $p94^{RB}$ 플라스미드 벡터 pβA-s-RB34(또는 pCMV-s-RB42)로 처리한다. 여기에는 1) 사람 방광 암육종 세포주 5637(ATCC HTB9); 2) 사람 유방 암육종 세포주, MDA-MB-468 (ATCC HTB132); 3) 사람 비-소세포 폐암육종 세포주 H2009 (Kratzke, R.A., et al., 1992, The Journal of Biological Chemistry, 267:25998-26003); 4) 사람 전립선 암육종 세포주, DU145 (ATCC HTB81); 5) 사람 골암육종 세포주, SaoS2 (ATCC HTB85); 6) 사람 섬유 육종 전이 폐세포주 Hs913T (ATCC HTB152)를 포함한다.

<193> 처리를 위해 종양세포는 LIPOFECTIN 시약(GIBCO BRL Life Technologies, Inc. Gaithersberg, MD)를 경유하여 플라스미드 DNA pβA-s-RB34(또는 pCMV-s-BR42)와의 일시적인 전이감염된다. 유사한 결과가 인산칼슘 또는 일렉트로포레이션 방법을 사용하여 전이감염에서 수득된다.

<194> LIPOFECTIN을 사용한 전이감염을 위한 다음의 과정은 제조업자의 지시에 따라 수정될 수 있다. 종양세포는 혈청이 보충된 적절한 성장배지의 100-mm 접시에 접종한다. 세포는 40-60% 정합이 이루어질때까지 5% CO2 환경에서 37℃ 배양한다. 이는 보통 18-24 시간 소요되나 세포형에 따라 시간은 매우 다양하다. 다음의 용액은 17×75mm 폴리스티렌 튜브에 준비한다: 각 배양접시에 전이감염시킬 용액 A는 5-10ug 플라스미 DNA 는 최종용적이 무혈청 배지로 100ul 이 되도록 희석하고; 각 배양접시에 전이감염시킬 용액 B 는 3-50ul LIPOFECTIN 시약으로 무혈청 배지로 최종용적이 100ul 되게 희석한다. 두 용액은 복합하고, 부드럽게 혼합하여 10-15분간 실온에서 배양시킨다. LIPOFECTIN 시약은 지질-DNA 복합체가 형성되는 동안에 세포는 6ml 무혈청 배지로 2회 세척한다. 각 감염을 위해 6ml 무혈청 배지를 지질-DNA 복합체 포함하는 각 폴리스티렌 튜브에 첨가한다. 용액은 부드럽게 혼합하고, 배지-복합체는 세포위에 깐다. 접시는 균일한 분포를 위해 부드럽게 젖는다. 접시는 5% CO2 배양기에서 37℃ 배양한다. 12 내지 24시간후에 배지-복합체는 10% 송아지 혈청을 포함하는 적절한 성장배지로 대체한다.

<195> 비슷한 연구로 종양세포는 $p110^{RB}$ 를 표현하는 플라스미드 DNA pβA-f-RB33 또는 pCMV-f-RB35 로

전이감염시킨다. 다음의 검사는 RB 결손 종양세포에서 $p94^{RB}$ 와 $p110^{RB}$ 발현의 유도의 성장 저해효과를 평가하기 위해 사용될 수 있다:

<196> 1) 플라스미드 벡터로 처리한 종양세포에서 DNA 합성

<197> 플라스미드 DNA 처리후에 종양세포는 3H 티미딘으로 2시간동안 라벨링하고 그다음 폴리리신 피복된 슬라이드에 옮기고, 고정시킨 후 단클론항체-RB 항체, MAb-1 로 면역착색시킨다(Triton Biosciences, Inc. Alameda, CA). RB-양성 전이감염된 세포는 현미경하에 수를 헤아린다. 슬라이드는 코닥 NTB2 오토라디오그라프 현탁액으로 피복하고 7-10일간 노출시킨다. 3H 티미딘 라벨링과 RB 단백질 면역 세포화학적 착색이 기존방법에 따라 실시한다(Xu et al., Oncogene, 1991, 6:1139-1146). 약 400 내지 1600 RB+ 와 600개 RB-종양세포는 3H-티미딘 흡수의 각 결정을 위해 검사하였다. 연구에서 $p94^{RB}$ 를 발현하는 RB 결손 종양세포는 DNA 로 3H-티미딘의 결합을 실패하기 때문에 세포 사이클동안 진행되지 않는다(표2). 그러나 DNA 복제를 하는 세포%는 RB-인 세포보다 $p110^{RB}$ 를 생산하는 세포가 약간 낮다.

표 2. $P94^{RB}$ 또는 $P110^{RB}$ 발현 플라스미드 감염후에 [3H] 티미딘의 RB-결손 종양세포내의 결합과 면역세포화학적 염색

수용세포	프로모터	발현된 단백질	RB+결합 세포	[3H] Thymidine RB-
5637	β-actin gene promoter	$p110^{RB}$	34%	45%
		$p94^{RB}$	2.3%	43%
	Cytomegalovirus promoter/enhancer	$p110^{RB}$	21%	—
		$p94^{RB}$	1.8%	—
MDA-MB-468	Cytomegalovirus promoter/enhancer	$p110^{RB}$	14%	40%
		$p94^{RB}$	0.5%	39%
H2009	β-actin gene promoter	$p110^{RB}$	19%	26%
		$p94^{RB}$	0.1%	27%
DU145	Cytomegalovirus Promoter/enhancer	$p110^{RB}$	23%	33%
		$p94^{RB}$	1.0%	33%
Hs913T	Cytomegalovirus promoter/enhancer	$p110^{RB}$	18%	34%
		$p94^{RB}$	0.9%	36%
Saos2	Cytomegalovirus promoter/enhancer	$p110^{RB}$	19%	32%
		$p94^{RB}$	0.9%	35%

<199> 2) 클로닝 형성 검사

<200> 전이감염후에 약 48시간에 종양세포는 100mm 접시당 10*5 세포 밀도로 도말하는데 이때 배지는 400-600ug/ml G418 을 포함하는 선택성 배지이다. 세포는 2 내지 3주간 배양하고 >100 세포 콜로니 이상이 나온다. 데이타는 표 3에 나타냈다. $p94^{RB}$ 를 발현하는 플라스미드 벡터로 처리된 세포는 $p110^{RB}$ 플라스미드 벡터로 처리된 것보다 약 4배 적은 콜로니를 형성한다. 차이는 통계학적으로 의미가 있다($p<0.05$ by t-test).

<201> 또한 $p94^{RB}$ 플라스미드 DNA 처리후 $p94^{RB}$ 단백질 발현의 형성은 더이상 관찰되지 않았다. 처리된 종양세포에서 $p94^{RB}$ 단백질은 발현하는 장기배양물의 분리실패는 $p94^{RB}$ 가 종양세포 성장을 억제하는 것을 보여준다. 대조적으로, $p110^{RB}$ 플라스미드 DNA로 전이감염후 종양세포에서 유도된 48세포주중 7개(약 15%)는 $p110^{RB}$ 단백질을 발현하는 것을 볼 수 있다. 이 %는 두개 독립적 전사유닛을 포함하는 벡터로 감염된 사람세포에서 기대되는 결과와 일치하고 따라서 $p110^{RB}$ 발현의 유도는 RB-결손 종양세포에 성장 저해효과를 발휘하지 못함을 알수 있다.

표3. RB-결손 방광 암육종 세포주 5637(HTB9)내로의 $p110^{RB}$ 와 $p94^{RB}$ 발현의 저해 효과. 각 수는 6 ~ 11개 접시로 나타낸다.

벡터 타입	형성된 G418 저항 콜로니의 수		
	Vector.	$p110^{RB}$	$p94^{RB}$
pCMV-Neo-Bam	280	24	6
pHßAPr-1-neo	—	33	8

<203> 3) 세포모양에서 $p94^{RB}$ 발현 효과

<204> HTB9 전이감염체는 전이감염후 24시간동안 MAb-1 항 RB-단클론항체로 또한 면역착색시킨다. 착색 결과는 도면8에 설명한 것이다.

<205> 도면8에서 설명한 것과 같이 대부분 RB+ $p94^{RB}$ -발현 HTB9 세포는 매우 크기가 크고 낮은 핵세포질 비율을 가지고 또는 다핵세포의 높은 빈도를 가지고(판넬 C), 외양적 변화는 세포 쇠약되어 변화한다. 그러나 이와 같은 외양적 변화는 A 집단 모크 전이감염된 HTB9 세포에서는 나타나지 않고, B 집단 $p110^{RB}$ 발현 RB+HTB9 세포(도면 8, 판넬 A alc B)에서도 나타나지 않는다.

<206> 4.4.2. 정상($p110^{RB}$)RB 발현(RB+)를 가지는 사람종양세포의 처리

<207> 사람 섬유육종 세포주 HT1080(ATCC CCL121), 사람 경부 암육종 세포주, HeLa(ATCC CCL2)를 포함하는 두개 RB+ 사람 세포주(즉 RB 유전자 결손이 없는)는 전술한 것과 같이 LIPOFECTIN 시약을 사용하여 $p94^{RB}$ 단백질 발현 플라스미드로 처리한다. 유사연구로 이들 세포주는 $p110^{RB}$ 단백질 발현 플라스미드, pCMV-s-RB35 로 전이감염시킨다. 콜로니 형성검사는 RB+ 종양세포에 외인성 $p94^{RB}$ 대 $p110^{RB}$ 발현을 유도하는 성장 저해효과를 평가하는데 사용된다. 표 4에서 볼 수 있는 것과 같이, $p94^{RB}$ 단백질의 발현은 급격히 HT1080과 HeLa 세포의 세포성장을 저해한다. 플라스미드 벡터 pCMV-f-RB42 발현 $p94^{RB}$ 로 처리된 후에 G418-저항 콜로니수에서 2 내지 9배 감소하게 되나 이와 같은 효과는 pCMV-f-RB35 플라스미드($p110^{RB}$ 단백질 발현)과 전이감염에서는 나타나지 않는다. 이 차이는 통계학적으로 중요하다(The two-tailed P values were less than 0.03 as calculated by the paired t-test).

표4. RB + 사람 섬유육종 세포주로 $p110^{RB}$ 와 $p94^{RB}$ 유입의 성장저해 효과. HT1080과 RB+ 사람경부 암육종 세포주, HeLa에서도 나타난다. RB 발현은 CMV 프로모터 제어하에 있다. 각실험에서 세개 5-Cm^2 접시는 전이감염되고 콜로니수는 G418 (1 mg/ml)에서 선택 10일후에 헤아린다.

수용 세포	실험	형성된 G418-저항 콜로니 수		
		벡터	$p110^{RB}$	$p94^{RB}$
HT1080	1	94	129	14
	2	88	122	16
	3	100	120	17
	4	99	110	15
HeLa	1	24	20	10
	2	25	24	9

<209> 4.5. 숙주세포에서 $p94^{RB}$ 단백질의 반감기와 포스포릴화 상태: $p94^{RB}$ 의 뚜렷한 성질

<210> 전이감염된 방광 암육종 세포주 5637 (ATCC HTB9)에서 일시적으로 발현된 $p94^{RB}$ 와 $p110^{RB}$ 단백질의 반감기는 35S-메티오닌으로 전이감염된 5637 세포의 펄스 라벨과 그 다음 과도의 라벨안된 메티오닌과의 추적하여 측정한다.

<211> 방광 종양세포는 $p110^{RB}$ (도면 9, 좌) 또는 $p94^{RB}$ (도면 9, 우) 발현 플라스미드가 있는 다중 접시에 전이감염시킨다. 전이감염후 24시간후 세포는 35S-메티오닌과 라벨하고 0, 6, 12 와 24시간동안 과

도의 라벨안된 메티오닌으로 추적한다. RB 단백질은 면역침전에 의해 결정한다.

<212> 전이감염된 5637 세포에서 $p94^{RB}$ 단백질의 반감기는 12시간으로 결정되었다. 대조적으로 $p110^{RB}$ 단백질의 반감기는 4-6시간이다. 따라서 숙주 종양세포에서 발현된 $p94^{RB}$ 단백질은 서서히 변화하고 이는 RB+ 와 RB-종양 세포 복제의 억제물질로써 공헌을 하는 것으로 보인다.

<213> 일시적으로 전이감염된 5637 세포에 $p110^{RB}$ 와 $p94^{RB}$ 의 비교적 인산화 상태는 웨스턴 블럿 분석에 의해 결정되고 세포용혈 물질은 전이감염후에 약 24시간에 모 5637와 pβA-f-RB33($p110^{RB}$ 발현, 4.3.5) 또는 pβA-s-RB34($p94^{RB}$ 발현, 4.3.4) 플라스미드 전이 감염된 5637 세포에서 만들어진다. 웨스턴 블랏 분석을 위한 기본 과정은 Xu, H-J., et al., 1989, Oncogene, 4:807-812 에 상술되어 있다. 각 라인은 4×10*5 배양된 세포에 상응하는 40ul 용혈물질로 적하한다. 단백질은 8% SDS-PAGE 로 분리하고 PVDF 막에 일렉트로 블랏시킨다. TBST(10mM 트리스-HCl, pH8.0, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 3% 비-지방 우유로 차단시킨 후 막은 0.1ug/cm2 에서 24시간 MAb-1 단클론 항 RB 항체로 배양한다. 그 다음 블랏은 Enhanced Chemiluminescence (ECL) (Amersham Corporation, Arlington Heights, Illinois) 면역방법에 의해 프로브시킨다. X레이 필름은 2초(도면10, 라인 1) 또는 30초(도면10, 라인 2-4)에 노출시킨다.

<214> 특히 흥미로운 것은 RB 결손 방광 암육종세포주, 5637 은 웨스턴 블랏분석에서 보면 $p94^{RB}$ 단백질에 포스포릴화가 실패함을 볼 수 있으나 전이감염된 5637 세포에 발현된 $p110^{RB}$ 단백질은 완전히 포스포릴화되었다(도면10, 라인 3). 따라서, 단지 포스포릴화안된 $p94^{RB}$ 단백질의 존재는 S상으로 들어가는 전이감염된 5637 종양세포의 실패때문인가 이는 다시 세포쇠약과 세포죽음의 원인이 된다.

<215> 4.6. 생체내에서 사람 방광암의 치료

<216> 사람 방광 암은 방광내로 $p94^{RB}$ 단백질 발현 레트로바이러스 벡터의 주입에 의해 고형종양의 종양 억제 유전자 요법을 실행하는 이상적인 모델을 나타낸다. 원래 사람 방광암의 실험모델은 Peter A. Jones 에 의해 정립되었다(Ahlering, T.E., et al., Cancer Res., 1987, 47:6660-6665). 표면상의 유두종양(통상적으로 전이되지 않음)에서 정립된 RT4 세포주의 사람 방광종양 세포는 암컷 누드쥐의 방광내로 22-가우지 카테테르의 주사한 경우에만 국소적으로 종양을 나타내는 것으로 보인다. 대조적으로 좀더 호전적인 사람 방광암에서 분리한 EJ 방광 암육종 세포는 자발적으로 폐로 전이된 누드쥐 방광에 공격적인 종양을 생성한다(Ahlering, T.E., et al., Cancer Res., 1987, 47:6660-6665). 따라서 이 모델은 생체내 레트로바이러스 벡터로 유전자 전달에 의해 실험적인 방광암의 치료에 사용될 수 있다.

<217> RB-사람 방광 암육종 세포주 5637(ATCC HTB9)와 RB+ 사람 방광 암육종세포주, ScaBER(ATCC HTB 3)에서 암세포는 Jones 와 그의 동료에 의해 처음 보고된 카테테르에 의해 암컷 아티믹(nu/nu) 누드쥐(6-8주)에 직접 주사한다(Ahlering, T.E., et al., Cancer Res., 1987, 47:6660-6665).

<218> 누드쥐 방광 종양의 발생과 진행은 TV 모니터가 부착된 광섬유 시스템을 사용하여 모니터할 수 있다. 실험 종양은 $p94^{RB}$ 를 발현하는 레트로바이러스 벡터로 처리한다.

<219> 고역가 바이러스 상층액은 사용하기전에 복제 컴피턴스가 없는 것을 확인하고 사람 $p94^{RB}$ 단백질 다량을 발현하는 선택된 PA317 클론의 조직 배양 배지에서 얻을 수 있다. 4×10*4 내지 1×10*7 cfu/ml 이상의 높은 역가의 레트로바이러스 벡터 현탁액과 적절하게는 1×10*6 cfu/ml 이상의 역가의 현탁액은 종양을 치료하기 위해 카테테르를 통하여 쥐방광내로 직접 주입한다. 본 기술에 숙지된 자는 이와 같은 치료를 방광내로 삽입된 카테테르를 경유하여 필요할 때까지 수회반복한다. $p94^{RB}$ 유전자 전달에 따른 종양억제는 전술한 광섬유 시스템을 경유하여 모니터한다.

<220> 상기 전술한 동일과정은 레트로바이러스 현탁액을 사람 암을 가진 방광내로 주입하는 것이외에는 사람 방광암을 치료하는데 사용된다.

<221> 4.7. 교정 폐암 모델을 사용한 생체내 연구

<222> 보통의 $p110^{RB}$ 발현을 가지는 사람 거대세포 폐암육종, NCI-H460(ATCC HTB177)는 아티믹(nu/nu) 누드쥐의 우측 기관지에 주입한다(쥐당 10*5 세포). 3일후에 쥐는 3일 연속동안 $p94^{RB}$ 또는 $p110^{RB}$ 레트로바이러스 생성세포에서 상층액으로 기관지내에 접종된다. 종양형성은 $p94^{RB}$ 레트로바이러스 상층액으로 처리한 쥐집단에서 억제된다. 대조적으로 $p110^{RB}$ 레트로바이러스 상층액으로 처리한 다른 집단에서는 대부분이 기관지내에 종양이 발생하였다. 이것은 $p94^{RB}$ 발현 레트로바이러스가 RB+ 비-소세포 폐 암육종(NSCLC) 세포의 성장을 저해하고 반면에 $p110^{RB}$ 발현 레트로바이러스는 저해하지 않는다.

<223> 4.8. 사람 비-소세포 폐암의 치료

<224> 기관지경으로 접근할 수 있는 기관지내 종양을 가지고 또는 기관지 폐색을 가지는 비-소세포 폐암 환자가 $p94^{RB}$ 유전자 요법을 위해 선택된다. 치료는 국소 또는 일반마취하에 기관지경에 의해 투여할 수 있다. 이 과정을 시작하기 위해 접근가능한 모든 종양은 내경으로 전달한다. 기관지경유 흡입바늘(21G)는 기관지경의 생검채널을 통하여 통과한다.

<225> 잔류 종양부위는 5ml 내지 10ml 양으로 적절한 레트로바이러스 벡터 상층액(4.3.7), 아데노바이러스 AD-RB94 현탁액(4.3.8) 또는 $p94^{RB}$ -발현 플라스미드 벡터-리포좀 복합체(4.3.4 와 4.3.6)으로 주사한다. 하나 이상의 벡터로 구성된 치료요법적 바이러스 또는 플라스미드 현탁액의 주사는 종양내로 또는 종양주변과 종양에 인접한 부점막에 투여된다. 주사는 5일 연속하여 실시하고 그다음 한달에 한번씩 실시한다. 처리는 종양 진전이 없을때까지 지속한다. 1년후 환자는 치료를 지속할 것인지를 결정하기 위해 평

가된다.

<226> 또한, 주의를 하기 위해 바이러스 상층액의 주입하는 동안 24시간동안은 외과적 마스크를 착용한다. 모든 의료인은 기관지경 사용동안과 바이러스 상층액 주사시에도 지속적으로 마스크를 착용한다.

<227> 4.9. 리포좀-포획된 정제 $p94^{RB}$ 단백질로 사람 폐 암육종의 치료 또는 예방

<228> 표적 종양 또는 암세포의 공지의 방법에 의해 이와 같은 치료가 필요한 세포내로 $p94^{RB}$ 단백질의 유입으로 치료받는다. 가령, 리포좀은 시험관 또는 생체에 약물, 단백질과 플라스미드 벡터의 수송담체로써 유용성이 광범위하게 연구된 막소포이다(Mannino, R.J. et al., 1988, Biotechnigues, 6:682-690). 적혈구 음이온 전달물질과 같은 단백질(Newton, A.C. and Huestics, W.H., Biochemistry, 1988, 27:4655-4659), 슈퍼옥시드 디스뮤타제와 카타라제(Tanswell, A.K. et al., 1990, Biochmica et Biophysica Acta, 1044:269-274)와 UV-DNA 수선효소(Ceccoll, J. et al., Journal of Investigative Dermatology, 1989, 93:190-194)는 시험관 또는 생체에서 포유류 세포내로 리포좀 소포에 고효율로 포획되고 전달된다.

<229> 또한, 작은 입자 에어로졸은 호흡기 질환의 치료용 약물수송을 위한 방법을 제공한다. 가령, 약물은 소포체로 리포좀을 사용하여 소-입자 에어로졸에서 투여할 수 있다. 에어로졸을 경유하여 투여하면 약물은 비인강 기관지, 폐에 표면에 균일하게 짐착된다(Knight, V. and Gilbert, B., 1988, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 7:721-731).

<230> 폐암을 치료 또는 예방하기 위해 요법적 $p94^{RB}$ 단백질을 면역친화성 크로마토그래피(4.1 와 4.2) 또는 다른 통상의 소스에 의해 재조합 베큘로 바이러스 AcMNPV-RB94 감염된 곤충세포에서 정제한다. $p94^{RB}$ 단백질은 리포좀과 혼합하고, 높은 효율로 리포좀 소포에 결합된다. 포획된 $p94^{RB}$ 는 활성이 있다. 에어로졸 수송방법에 부드러운 보통의 지원자와 환자에 잘 적응되기 때문에 $p94^{RB}$ 포함 리포좀은 매우 높은 비율의 암을 치료하거나 예방하기 위해 투여할 수 있다. $p94^{RB}$ 단백질 포함 리포좀은 비강흡입에 의해 투여될 수도 있고 또는 비정상적 세포증식을 억제하기 위한 충분한 양으로 소입자 에어로졸을 경유하여 투입될 수도 있다. 에어로졸화 치료는 30분간 환자에게 투여되고 필요할 경우 반복하여 2주에 3회씩 실시한다. $p94^{RB}$ 단백질은 따라서 기관지와 호흡기에 수송될 수 있다. 치료는 필요할 때까지 지속한다. 1년후 환자의 전반적인 상태를 평가하여 치료를 계속할지를 결정한다.

<231> 4.10. $p94^{RB}$ 치료는 시험관내에서 정상세포에 비독성이다.

<232> 4.3.7에서 상술한 레트로바이러스 pLRB94RNL 은 정상쥐 섬유아세포-유도된 레트로바이러스-패키지 세포주, PA317(ATCC CRL9078)내에 유입한다. 단일 세포 클로니는 G418 포함 배지에서 선별에 의해 선택하고 대량 배양한다. 이와 같은 클론세포는 1년간 거대배양하여 유지시키고 면역 세포화학적 착색(도면 11) 또는 웨스턴 면역블랏팅에 의해 $p94^{RB}$ 발현양을 감지한다. 이 클론은 이들의 모세포 PA317 세포 또는 사람 $p110^{RB}$ 단백질을 발현하는 PA317와는 구별할 수 없다. 결과는 $p94^{RB}$ 단백질 발현의 시험관내에서 정상세포에 이득성이다.

<233> 4.11. $p94^{RB}$ 치료는 생체에서 정상조직에 비-독성이다

<234> 4.3.7 에서 상술한 $p94^{RB}$ 단백질을 발현하는 pLRB94RNL 레트로바이러스 플라스미드 벡터는 DMRIE/DOPE 리포좀(VICAL, Inc., San Diego, CA)와 혼합되고 카테테르를 통하여 쥐뇨방향으로 직접 주입한다. 처리 48시간후에 쥐는 죽이고 방광은 절개한다. 쥐방광에서 파라민-침잠된 조직단부에 $p94^{RB}$ 단백질의 면역조직 화학적 착색에 의해 설명한 것과 같이 리포좀-포획된 $p94^{RB}$ 발현 레트로바이러스 플라스미드 벡터는 쥐의 방광점막을 침투하고 다량의 전이세포에서 $p94^{RB}$ 단백질을 발현한다. $p94^{RB}$ 발현하는 전이상피는 조직학적으로 정상이고(도면 12, D), 리포좀으로만 처리한 쥐방광 또는 처리안된 쥐방광의 점막과 구분하기가 어렵다(도면 12). 이와 같은 동물실험으로부터 나타난 결과에서 통상의 세포독성 암 치료요법과는 달리 $p94^{RB}$ 치료는 생체내에서 정상조직에 비-독성이다.

<235> 5. 미생물 기탁

<236> 다음은 1993. 2. 10일자 American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852에 기탁되었다:

<237>	대장균 DH5α	ATCC 기탁
<238>	DHC-S-RB42	69240
<239>	DHB-S-RB34	69241

<240> 본 발명은 여기에서 상술한 구체예에 한정하지 않는다. 또한 여기에서 상술한 것에 추가하여 본 발명의 다양한 수정이 가능하고 이는 본 발명의 영역에 속한다.

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: Xu, Hong-Ji
Hu, Shi-Xue
Benedict, William F.

(ii) TITLE OF INVENTION: BROAD SPECTRUM TUMOR SUPPRESSOR GENES, GENE PRODUCTS, AND METHODS FOR TUMOR SUPPRESSION GENE THERAPY

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 3

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
(A) ADDRESSEE: Pennie & Edmonds
(B) STREET: 1155 Avenue of the Americas
(C) CITY: New York
(D) STATE: New York
(E) COUNTRY: U.S.A.
(F) ZIP: 10036-2711

(v) COMPUTER READABLE FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER: To be assigned
(B) FILING DATE: On even date herewith
(C) CLASSIFICATION:

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
(A) NAME: Poissant, Brian M
(B) REGISTRATION NUMBER: 28,462
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 7409-025-228

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
(A) TELEPHONE: (212) 790-9090
(B) TELEFAX: (212) 869-9741/8864
(C) TELEX: 66141 PENNIE

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 3232 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: not relevant

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 19..2469

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

```
GATCCCGACC TAGATGAG ATG TCG TTC ACT TTT ACT GAG CTA CAG AAA AAC        51
                    Met Ser Phe Thr Phe Thr Glu Leu Gln Lys Asn
                      1               5                  10
```

```
ATA GAA ATC AGT GTC CAT AAA TTC TTT AAC TTA CTA AAA GAA ATT GAT        99
Ile Glu Ile Ser Val His Lys Phe Phe Asn Leu Leu Lys Glu Ile Asp
                15                  20                  25

ACC AGT ACC AAA GTT GAT AAT GCT ATG TCA AGA CTG TTG AAG AAG TAT       147
Thr Ser Thr Lys Val Asp Asn Ala Met Ser Arg Leu Leu Lys Lys Tyr
            30                  35                  40

GAT GTA TTG TTT GCA CTC TTC AGC AAA TTG GAA AGG ACA TGT GAA CTT       195
Asp Val Leu Phe Ala Leu Phe Ser Lys Leu Glu Arg Thr Cys Glu Leu
        45                  50                  55

ATA TAT TTG ACA CAA CCC AGC AGT TCG ATA TCT ACT GAA ATA AAT TCT       243
Ile Tyr Leu Thr Gln Pro Ser Ser Ser Ile Ser Thr Glu Ile Asn Ser
    60                  65                  70                  75

GCA TTG GTG CTA AAA GTT TCT TGG ATC ACA TTT TTA TTA GCT AAA GGG       291
Ala Leu Val Leu Lys Val Ser Trp Ile Thr Phe Leu Leu Ala Lys Gly
                80                  85                  90

GAA GTA TTA CAA ATG GAA GAT GAT CTG GTG ATT TCA TTT CAG TTA ATG       339
Glu Val Leu Gln Met Glu Asp Asp Leu Val Ile Ser Phe Gln Leu Met
            95                  100                 105

CTA TGT GTC CTT GAC TAT TTT ATT AAA CTC TCA CCT CCC ATG TTG CTC       387
Leu Cys Val Leu Asp Tyr Phe Ile Lys Leu Ser Pro Pro Met Leu Leu
        110                 115                 120

AAA GAA CCA TAT AAA ACA GCT GTT ATA CCC ATT AAT GGT TCA CCT CGA       435
Lys Glu Pro Tyr Lys Thr Ala Val Ile Pro Ile Asn Gly Ser Pro Arg
    125                 130                 135

ACA CCC AGG CGA GGT CAG AAC AGG AGT GCA CGG ATA GCA AAA CAA CTA       483
Thr Pro Arg Arg Gly Gln Asn Arg Ser Ala Arg Ile Ala Lys Gln Leu
140                 145                 150                 155

GAA AAT GAT ACA AGA ATT ATT GAA GTT CTC TGT AAA GAA CAT GAA TGT       531
Glu Asn Asp Thr Arg Ile Ile Glu Val Leu Cys Lys Glu His Glu Cys
                160                 165                 170

AAT ATA GAT GAG GTG AAA AAT GTT TAT TTC AAA AAT TTT ATA CCT TTT       579
Asn Ile Asp Glu Val Lys Asn Val Tyr Phe Lys Asn Phe Ile Pro Phe
            175                 180                 185

ATG AAT TCT CTT GGA CTT GTA ACA TCT AAT GGA CTT CCA GAC GTT GAA       627
Met Asn Ser Leu Gly Leu Val Thr Ser Asn Gly Leu Pro Glu Val Glu
        190                 195                 200

AAT CTT TCT AAA CGA TAC GAA GAA ATT TAT CTT AAA AAT AAA GAT CTA       675
Asn Leu Ser Lys Arg Tyr Glu Glu Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asp Leu
    205                 210                 215

GAT GCA AGA TTA TTT TTG GAT CAT GAT AAA ACT CTT CAG ACT GAT TCT       723
Asp Ala Arg Leu Phe Leu Asp His Asp Lys Thr Leu Gln Thr Asp Ser
220                 225                 230                 235

ATA GAC AGT TTT GAA ACA CAG AGA ACA CCA CGA AAA AGT AAC CTT GAT       771
Ile Asp Ser Phe Glu Thr Gln Arg Thr Pro Arg Lys Ser Asn Leu Asp
                240                 245                 250

GAA GAG GTG AAT GTA ATT CCT CCA CAC ACT CCA GTT AGG ACT GTT ATG       819
Glu Glu Val Asn Val Ile Pro Pro His Thr Pro Val Arg Thr Val Met
            255                 260                 265

AAC ACT ATC CAA CAA TTA ATG ATG ATT TTA AAT TCA GCA AGT GAT CAA       867
Asn Thr Ile Gln Gln Leu Met Met Ile Leu Asn Ser Ala Ser Asp Gln
        270                 275                 280
```

```
CCT TCA GAA AAT CTG ATT TCC TAT TTT AAC AAC TGC ACA GTG AAT CCA      915
Pro Ser Glu Asn Leu Ile Ser Tyr Phe Asn Asn Cys Thr Val Asn Pro
    285                 290                 295

AAA GAA AGT ATA CTG AAA AGA GTG AAG GAT ATA GGA TAC ATC TTT AAA      963
Lys Glu Ser Ile Leu Lys Arg Val Lys Asp Ile Gly Tyr Ile Phe Lys
300                 305                 310                 315

GAG AAA TTT GCT AAA GCT GTC GGA CAG GGT TGT GTC GAA ATT GGA TCA     1011
Glu Lys Phe Ala Lys Ala Val Gly Gln Gly Cys Val Glu Ile Gly Ser
                320                 325                 330

CAG CGA TAC AAA CTT GGA GTT CGC TTG TAT TAC CGA GTA ATG GAA TCC     1059
Gln Arg Tyr Lys Leu Gly Val Arg Leu Tyr Tyr Arg Val Met Glu Ser
            335                 340                 345

ATG CTT AAA TCA GAA GAA GAA CGA TTA TCC ATT CAA AAT TTT AGC AAA     1107
Met Leu Lys Ser Glu Glu Glu Arg Leu Ser Ile Gln Asn Phe Ser Lys
        350                 355                 360

CTT CTG AAT GAC AAC ATT TTT CAT ATG TCT TTA TTG GCG TGC GCT CTT     1155
Leu Leu Asn Asp Asn Ile Phe His Met Ser Leu Leu Ala Cys Ala Leu
    365                 370                 375

GAC CTT GTA ATG GCC AGA TAT AGC AGA AGT ACA TCT CAG AAT CTT GAT     1203
Glu Val Val Met Ala Thr Tyr Ser Arg Ser Thr Ser Gln Asn Leu Asp
380                 385                 390                 395

TCT GGA ACA GAT TTG TCT TTC CCA TGG ATT CTC AAT GTG CTT AAT TTA     1251
Ser Gly Thr Asp Leu Ser Phe Pro Trp Ile Leu Asn Val Leu Asn Leu
                400                 405                 410

AAA GCC TTT GAT TTT TAC AAA GTG ATC GAA AGT TTT ATC AAA GCA GAA     1299
Lys Ala Phe Asp Phe Tyr Lys Val Ile Glu Ser Phe Ile Lys Ala Glu
            415                 420                 425

GGC AAC TTG ACA AGA GAA ATG ATA AAA CAT TTA GAA CGA TGT GAA CAT     1347
Gly Asn Leu Thr Arg Glu Met Ile Lys His Leu Glu Arg Cys Glu His
        430                 435                 440

CGA ATC ATG GAA TCC CTT GCA TGG CTC TCA GAT TCA CCT TTA TTT GAT     1395
Arg Ile Met Glu Ser Leu Ala Trp Leu Ser Asp Ser Pro Leu Phe Asp
    445                 450                 455

CTT ATT AAA CAA TCA AAG GAC CGA GAA GGA CCA ACT GAT CAC CTT GAA     1443
Leu Ile Lys Gln Ser Lys Asp Arg Glu Gly Pro Thr Asp His Leu Glu
460                 465                 470                 475

TCT GCT TGT CCT CTT AAT CTT CCT CTC CAG AAT AAT CAC ACT GCA GCA     1491
Ser Ala Cys Pro Leu Asn Leu Pro Leu Gln Asn Asn His Thr Ala Ala
                480                 485                 490

GAT ATG TAT CTT TCT CCT GTA AGA TCT CCA AAG AAA AAA GGT TCA ACT     1539
Asp Met Tyr Leu Ser Pro Val Arg Ser Pro Lys Lys Lys Gly Ser Thr
            495                 500                 505

ACG CGT GTA AAT TCT ACT GCA AAT GCA GAG ACA CAA GCA ACC TCA GGC     1587
Thr Arg Val Asn Ser Thr Ala Asn Ala Glu Thr Gln Ala Thr Ser Ala
        510                 515                 520

TTC CAG ACC CAG AAG CCA TTG AAA TCT ACC TCT CTT TCA CTG TTT TAT     1635
Phe Gln Thr Gln Lys Pro Leu Lys Ser Thr Ser Leu Ser Leu Phe Tyr
    525                 530                 535

AAA AAA GTG TAT CGG CTA GCC TAT CTC CGG CTA AAT ACA CTT TGT GAA     1683
Lys Lys Val Tyr Arg Leu Ala Tyr Leu Arg Leu Asn Thr Leu Cys Glu
540                 545                 550                 555
```

```
CGC CTT CTC TCT GAG CAC CCA GAA TTA GAA CAT ATC ATC TGG ACC CTT      1731
Arg Leu Leu Ser Glu His Pro Glu Leu Glu His Ile Ile Trp Thr Leu
                560                 565                 570

TTC CAG CAC ACC CTG CAG AAT GAG TAT GAA CTC ATG AGA GAC AGG CAT      1779
Phe Gln His Thr Leu Gln Asn Glu Tyr Glu Leu Met Arg Asp Arg His
            575                 580                 585

TTG GAC CAA ATT ATG ATC TGT TCC ATG TAT GGC ATA TGC AAA GTG AAG      1827
Leu Asp Gln Ile Met Met Cys Ser Met Tyr Gly Ile Cys Lys Val Lys
        590                 595                 600

AAT ATA GAC CTT AAA TTC AAA ATC ATT GTA ACA GCA TAC AAG GAT CTT      1875
Asn Ile Asp Leu Lys Phe Lys Ile Ile Val Thr Ala Tyr Lys Asp Leu
    605                 610                 615

CCT CAT GCT GTT CAG GAG ACA TTC AAA CGT GTT TTG ATC AAA GAA GAG      1923
Pro His Ala Val Gln Glu Thr Phe Lys Arg Val Leu Ile Lys Glu Glu
620                 625                 630                 635

GAG TAT GAT TCT ATT ATA GTA TTC TAT AAC TCG GTC TTC ATG CAG AGA      1971
Glu Tyr Asp Ser Ile Ile Val Phe Tyr Asn Ser Val Phe Met Gln Arg
                640                 645                 650

CTG AAA ACA AAT ATT TTG CAG TAT GCT TCC ACC AGG CCC CCT ACC TTG      2019
Leu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Tyr Ala Ser Thr Arg Pro Pro Thr Leu
            655                 660                 665

TCA CCA ATA CCT CAC ATT CCT CGA AGC CCT TAC AAG TTT CCT AGT TCA      2067
Ser Pro Ile Pro His Ile Pro Arg Ser Pro Tyr Lys Phe Pro Ser Ser
        670                 675                 680

CCC TTA CGG ATT CCT GGA GGG AAC ATC TAT ATT TCA CCC CTG AAG AGT      2115
Pro Leu Arg Ile Pro Gly Gly Asn Ile Tyr Ile Ser Pro Leu Lys Ser
    685                 690                 695

CCA TAT AAA ATT TCA GAA GGT CTG CCA ACA CCA ACA AAA ATG ACT CCA      2163
Pro Tyr Lys Ile Ser Glu Gly Leu Pro Thr Pro Thr Lys Met Thr Pro
700                 705                 710                 715

AGA TCA AGA ATC TTA GTA TCA ATT GGT GAA TCA TTC GGG ACT TCT GAG      2211
Arg Ser Arg Ile Leu Val Ser Ile Gly Glu Ser Phe Gly Thr Ser Glu
                720                 725                 730

AAG TTC CAG AAA ATA AAT CAG ATG GTA TGT AAC AGC GAC CGT GTG CTC      2259
Lys Phe Gln Lys Ile Asn Gln Met Val Cys Asn Ser Asp Arg Val Leu
            735                 740                 745

AAA AGA AGT GCT GAA GGA AGC AAC CCT CCT AAA CCA CTG AAA AAA CTA      2307
Lys Arg Ser Ala Glu Gly Ser Asn Pro Pro Lys Pro Leu Lys Lys Leu
        750                 755                 760

CGC TTT GAT ATT GAA GGA TCA GAT GAA GCA GAT GGA AGT AAA CAT CTC      2355
Arg Phe Asp Ile Glu Gly Ser Asp Glu Ala Asp Gly Ser Lys His Leu
    765                 770                 775

CCA GGA GAG TCC AAA TTT CAG CAG AAA CTG GCA GAA ATG ACT TCT ACT      2403
Pro Gly Glu Ser Lys Phe Gln Gln Lys Leu Ala Glu Met Thr Ser Thr
780                 785                 790                 795

CGA ACA CGA ATG CAA AAG CAG AAA ATG AAT GAT AGC ATG GAT ACC TCA      2451
Arg Thr Arg Met Gln Lys Gln Lys Met Asn Asp Ser Met Asp Thr Ser
                800                 805                 810

AAC AAG GAA GAG AAA TGAGGATCTC AGGACCTTGG TGGACAGTGT GTACACCTCT      2506
Asn Lys Glu Glu Lys
            815
```

GGATTCATTG TGTCTCACAC ATGTGACTGT ATAACTTTCC CAGGTTCTGT TTATGGCCAC 2566

ATTTAATATC TTCAGCTCTT TTTGTGGATA TAAAATGTGC AGATGCAATT GTTTGGGTGA 2626

TTCCTAAGCC ACTTGAAATG TTAGTCATTG TTATTTATAC AAGATTGAAA ATCTTGTGTA 2686

AATCCTGCCA TTTAAAAAGT TGTAGCAGAT TGTTTCCTCT TCCAAAGTAA AATTGGTGTG 2746

GTTTATGGAT AGTAAGAATG GCCCTAGAGT GGGAGTCCTC ATAACCCAGG CCTGTCTGAC 2806

TACTTTGCCT TCTTTTGTAG CATATAGGTC ATGTTTGCTC TTGTTTTTAT TAATTTATAT 2866

GTATATTTTT TTAATTTAAC ATGAACACCC TTAGAAAATG TGTCCTATCT ATCATCCAAA 2926

TGCAATTTGA TTGACTGCCC ATTCACCAAA ATTATCCTGA ACTCTTCTGC AAAAATGGAT 2986

ATTATTAGAA ATTAGAAAAA AATTACTAAT TTTACACATT AGATTTTATT TTACTATTGC 3046

AATCTGATAT ACTGTGTGCT TGTTTTATAA AATTTTGCTT TTAATTAAAT AAAAGCTGGA 3106

AGCAAAGTAT AACCATATGA TACTATCATA CTACTGAAAC AGATTTCATA CCTCAGAATG 3166

TAAAAGAACT TACTGATTAT TTTCTTCATC CAACTTATGT TTTTAAATGA GGATTATTGA 3226

TAGTGG 3232

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 3232 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: not relevant

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

GATCCCAGTA TCAATAATCC TCATTTAAAA ACATAAGTTG GATGAAGAAA ATAATCAGTA 60

AGTTCTTTTA CATTCTGAGG TATGAAATCT GTTTCAGTAG TATGATAGTA TCATATGGTT 120

ATACTTTGCT TCCAGCTTTT ATTTAATTAA AAGCAAAATT TTATAAAACA AGCACACAGT 180

ATATCAGATT CCAATAGTAA AATAAAATCT AATGTGTAAA ATTAGTAATT TTTTTCTAAT 240

TTCTAATAAT ATCCATTTTT GCACAAGAGT TCAGGATAAT TTTGGTGAAT GGGCAGTCAA 300

TCAAATTGCA TTTCGATGAT AGATAGGAGA CATTTTCTAA GGGTGTTCAT GTTAAATTAA 360

AAAAATATAC ATATAAATTA ATAAAAACAA GAGCAAACAT CACCTATATG CTACAAAAGA 420

AGGCAAAGTA GTCAGACAGG CCTGGGTTAT CAGGACTCCC AGTCTAGGCC CATTGTTACT 480

ATCCATAAAG CACAGCAATT TTACTTTGCA AGAGGAAACA ATGTGCTACA ACTTTTTAAA 540

TGGCAGGATT TACACAAGAT TTTCAATCTT GTATAAATAA CAATGACTAA CATTTCAAGT 600

GGCTTAGGAA TCACCCAAAC AATTGCATCT GCACATTTTA TATCCACAAA AAGAGGTGAA 660

GATATTAAAT GTGGCCATAA ACAGAACCTG GGAAAGTTAT ACAGTCACAT CTGTGAGAGA 720

CAATGAATCC AGAGGTGTAC ACAGTGTCCA CCAAGGTCCT GAGATCCTCA TTTCTCTTCC 780

```
TTGTTTGAGG TATCCATGCT ATCATTCATT TTCTGCTTTT GCATTCGTGT TCGAGTAGAA    840
GTGATTTCTG CCAGTTTCTG CTGAAATTTG GACTCTCGTG GGAGATGTTT ACTTCCATCT    900
GCTTCATCTG ATCGTTCAAT ATCAAAGCGT AGTTTTTTCA GTGGTTTAGG AGGGTTGCTT    960
CCTTCAGCAC TTCTTTTGAG CACACGGTCG CTGTTACATA CCATCTGATT TATTTTCTGG   1020
AACTTCTCAG AAGTCCCGAA TGATTCAGCA ATTGATACTA AGATTCTTGA TCTTGGAGTC   1080
ATTTTTGTTG GTGTTGGCAG AGCTTCTGAA ATTTTATATG GACTCTTCAG GGGTGAAATA   1140
TAGATGTTCC CTCCAGGAAT CCGTAAGGGT GAACTAGGAA ACTTGTAAGG GCTTCGAGGA   1200
ATGTGAGGTA TTGGTGACAA GGTAGGCGGC CTGGTGGAAG CATACTGCAA AATATTTGTT   1260
TTCAGTCTCT GCATGAAGAC GGAGTTATAG AATACTATAA TAGAATCATA CTCCTCTTCT   1320
TTGATCAAAA CACGTTTGAA TGTGTCCTGA ACAGCATGAG GAAGATCCTT GTATGCTGTT   1380
ACAATGATTT TGAATTTAAG GTCTATATTC TTCACTTTGC ATATGCCATA CATGGAACAC   1440
ATCATAATTT GGTCCAAATG CCTGTCTCTC ATGAGTTCAT ACTCATTCTG CAGGGTGTGC   1500
TGGAAAAGGG TCCAGATGAT ATGTTCTAAT TCTGGGTGCT CAGACAGAAG GCGTTCACAA   1560
AGTGTATTTA GCCGGAGATA GGCTAGCGGA TACACTTTTT TATAAAACAG TGAAAGAGAG   1620
GTAGATTTCA ATGGCTTGTG GGTCTGGAAG GCTGAGGTTG CTTGTGTCTC TGCATTTGCA   1680
GTAGAATTTA CACGCGTAGT TGAACGTTTT TTCTTTGGAG ATCTTACAGG AGAAAGATAC   1740
ATATCTGGTG CAGTGTGATT ATTCTGGAGA GCAAGATTAA GAGGACAAGC AGATTCAAGG   1800
TGATCAGTTG GTCCTTCTCG GTCCTTTGAT TGTTTAATAA GATCAAATAA AGGTGAATCT   1860
GAGAGCCATG CAAGGGATTC CATGATTCGA TGTTCACATC GTTCTAAATG TTTTATCATT   1920
TCTCTTGTCA AGTTGCGTTC TGCTTTGATA AAACTTTCGA TCACTTTGTA AAAATCAAAG   1980
GCTTTTAAAT TAAGCACATT CAGAATCCAT GGGAAAGACA AATCTGTTCC AGAATCAAGA   2040
TTCTGAGATG TACTTCTGCT ATATGTGGCC ATTACAACGT CAAGAGCGCA CGCCAATAAA   2100
GACATATGAA AAATGTTGTC ATTCAGAAGT TTGCTAAAAT TTTGAATGGA TAATCGTTCT   2160
TCTTCTGATT TAAGCATGGA TTCCATTACT CGGTAATACA AGCGAACTCC AAGTTTGTAT   2220
CGCTGTGATC CAATTTCGAC ACAAGCCTGT GCCACAGCTT TAGCAAATTT CTCTTTAAAG   2280
ATGTATCCTA TATCGTTCAC TCTTTTCAGT ATACTTTCTT TTGGATTCAC TGTGCAGTTG   2340
TTAAAATAGG AAATCAGATT TTCTGAAGGT TGATCACTTG CTGAATTTAA AATCATCATT   2400
AATTGTTGGA TAGTGTTCAT AACAGTCCTA ACTGGAGTGT GTGGAGGAAT TACATTCACC   2460
TCTTCATCAA GGTTACTTTT TCGTGGTGTT CTCTGTGTTT CAAAACTGTC TATAGAATCA   2520
GTCTGAAGAG TTTTATGATG ATCGAAAAAT AATCTTGCAT CTAGATGTTT ATTTTTAAGA   2580
TAAATTTCTT CGTATCGTTT AGAAAGATTT TCAACCTCTG GAAGTCGATT AGATGTTACA   2640
AGTCCAAGAG AATTCATAAA AGGTATAAAA TTTTTGAAAT AAACATTTTT CACCTCATCT   2700
ATATTACATT CATGTTCTTT ACAGAGAACT TCAATAATTC TTGTATCATT TTCTAGTTGT   2760
TTTGCTATCC GTGCACTCCT GTTCTGACCT CGCCTGGGTG TTCGAGGTGA ACCATTAATG   2820
```

```
GGTATAACAG CTGTTTTATA TGGTTCTTTG AGCAACATGG GAGGTGAGAG TTTAATAAAA    2880

TAGTCAAGGA CACATAGCAT TAACTGAAAT GAAATCACCA GATCATCTTC CATTTGTAAT    2940

AGTTCCCCTT TAGCTAATAA AAATGTGATC CAAGAAACTT TTAGCACCAA TGCAGAATTT    3000

ATTTCAGTAG ATATCGAACT GCTGGGTTGT GTCAAATATA TAAGTTCACA TGTCCTTTCC    3060

AATTTGCTGA AGAGTGCAAA CAATACATCA TACTTCTTCA ACAGTCTTGA CATAGCATTA    3120

TCAACTTTGG TACTGGTATC AATTTCTTTT AGTAACTTAA AGAATTTATG GACACTGATT    3180

TCTATGTTTT TCTGTAGCTC AGTAAAAGTG AACGACATCT CATCTAGGTC GG            3232
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 816 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

```
Met Ser Phe Thr Phe Thr Glu Leu Gln Lys Asn Ile Glu Ile Ser Val
 1               5                  10                  15

His Lys Phe Phe Asn Leu Leu Lys Glu Ile Asp Thr Ser Thr Lys Val
            20                  25                  30

Asp Asn Ala Met Ser Arg Leu Leu Lys Lys Tyr Asp Val Leu Phe Ala
        35                  40                  45

Leu Phe Ser Lys Leu Glu Arg Thr Cys Glu Leu Ile Tyr Leu Thr Gln
    50                  55                  60

Pro Ser Ser Ser Ile Ser Thr Glu Ile Asn Ser Ala Leu Val Leu Lys
65                  70                  75                  80

Val Ser Trp Ile Thr Phe Leu Leu Ala Lys Gly Glu Val Leu Gln Met
                85                  90                  95

Glu Asp Asp Leu Val Ile Ser Phe Gln Leu Met Leu Cys Val Leu Asp
            100                 105                 110

Tyr Phe Ile Lys Leu Ser Pro Pro Met Leu Leu Lys Glu Pro Tyr Lys
        115                 120                 125

Thr Ala Val Ile Pro Ile Asn Gly Ser Pro Arg Thr Pro Arg Arg Gly
    130                 135                 140

Gln Asn Arg Ser Ala Arg Ile Ala Lys Gln Leu Glu Asn Asp Thr Arg
145                 150                 155                 160

Ile Ile Glu Val Leu Cys Lys Glu His Glu Cys Asn Ile Asp Glu Val
                165                 170                 175

Lys Asn Val Tyr Phe Lys Asn Phe Ile Pro Phe Met Asn Ser Leu Gly
            180                 185                 190

Leu Val Thr Ser Asn Gly Leu Pro Glu Val Glu Asn Leu Ser Lys Arg
        195                 200                 205

Tyr Glu Glu Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asp Leu Asp Ala Arg Leu Phe
    210                 215                 220
```

```
Leu Asp His Asp Lys Thr Leu Gln Thr Asp Ser Ile Asp Ser Phe Glu
225                 230                 235                 240

Thr Gln Arg Thr Pro Arg Lys Ser Asn Leu Asp Glu Glu Val Asn Val
                245                 250                 255

Ile Pro Pro His Thr Pro Val Arg Thr Val Met Asn Thr Ile Gln Gln
            260                 265                 270

Leu Met Met Ile Leu Asn Ser Ala Ser Asp Gln Pro Ser Glu Asn Leu
        275                 280                 285

Ile Ser Tyr Phe Asn Asn Cys Thr Val Asn Pro Lys Glu Ser Ile Leu
    290                 295                 300

Lys Arg Val Lys Asp Ile Gly Tyr Ile Phe Lys Glu Lys Phe Ala Lys
305                 310                 315                 320

Ala Val Gly Gln Gly Cys Val Glu Ile Gly Ser Gln Arg Tyr Lys Leu
                325                 330                 335

Gly Val Arg Leu Tyr Tyr Arg Val Met Glu Ser Met Leu Lys Ser Glu
            340                 345                 350

Glu Glu Arg Leu Ser Ile Gln Asn Phe Ser Lys Leu Leu Asn Asp Asn
        355                 360                 365

Ile Phe His Met Ser Leu Leu Ala Cys Ala Leu Glu Val Val Met Ala
    370                 375                 380

Thr Tyr Ser Arg Ser Thr Ser Gln Asn Leu Asp Ser Gly Thr Asp Leu
385                 390                 395                 400

Ser Phe Pro Trp Ile Leu Asn Val Leu Asn Leu Lys Ala Phe Asp Phe
                405                 410                 415

Tyr Lys Val Ile Glu Ser Phe Ile Lys Ala Glu Gly Asn Leu Thr Arg
            420                 425                 430

Glu Met Ile Lys His Leu Glu Arg Cys Glu His Arg Ile Met Glu Ser
        435                 440                 445

Leu Ala Trp Leu Ser Asp Ser Pro Leu Phe Asp Leu Ile Lys Gln Ser
    450                 455                 460

Lys Asp Arg Glu Gly Pro Thr Asp His Leu Glu Ser Ala Cys Pro Leu
465                 470                 475                 480

Asn Leu Pro Leu Gln Asn Asn His Thr Ala Ala Asp Met Tyr Leu Ser
                485                 490                 495

Pro Val Arg Ser Pro Lys Lys Lys Gly Ser Thr Thr Arg Val Asn Ser
            500                 505                 510

Thr Ala Asn Ala Glu Thr Gln Ala Thr Ser Ala Phe Gln Thr Gln Lys
        515                 520                 525

Pro Leu Lys Ser Thr Ser Leu Ser Leu Phe Tyr Lys Lys Val Tyr Arg
    530                 535                 540

Leu Ala Tyr Leu Arg Leu Asn Thr Leu Cys Glu Arg Leu Leu Ser Glu
545                 550                 555                 560

His Pro Glu Leu Glu His Ile Ile Trp Thr Leu Phe Gln His Thr Leu
                565                 570                 575

Gln Asn Glu Tyr Glu Leu Met Arg Asp Arg His Leu Asp Gln Ile Met
```

```
            580                 585                 590

Met Cys Ser Met Tyr Gly Ile Cys Lys Val Lys Asn Ile Asp Leu Lys
        595                 600                 605

Phe Lys Ile Ile Val Thr Ala Tyr Lys Asp Leu Pro His Ala Val Gln
    610                 615                 620

Glu Thr Phe Lys Arg Val Leu Ile Lys Glu Glu Glu Tyr Asp Ser Ile
625                 630                 635                 640

Ile Val Phe Tyr Asn Ser Val Phe Met Gln Arg Leu Lys Thr Asn Ile
                645                 650                 655

Leu Gln Tyr Ala Ser Thr Arg Pro Pro Thr Leu Ser Pro Ile Pro His
            660                 665                 670

Ile Pro Arg Ser Pro Tyr Lys Phe Pro Ser Ser Pro Leu Arg Ile Pro
        675                 680                 685

Gly Gly Asn Ile Tyr Ile Ser Pro Leu Lys Ser Pro Tyr Lys Ile Ser
    690                 695                 700

Glu Gly Leu Pro Thr Pro Thr Lys Met Thr Pro Arg Ser Arg Ile Leu
705                 710                 715                 720

Val Ser Ile Gly Glu Ser Phe Gly Thr Ser Glu Lys Phe Gln Lys Ile
                725                 730                 735

Asn Gln Met Val Cys Asn Ser Asp Arg Val Leu Lys Arg Ser Ala Glu
            740                 745                 750

Gly Ser Asn Pro Pro Lys Pro Leu Lys Lys Leu Arg Phe Asp Ile Glu
        755                 760                 765

Gly Ser Asp Glu Ala Asp Gly Ser Lys His Leu Pro Gly Glu Ser Lys
    770                 775                 780

Phe Gln Gln Lys Leu Ala Glu Met Thr Ser Thr Arg Thr Arg Met Gln
785                 790                 795                 800

Lys Gln Lys Met Asn Asp Ser Met Asp Thr Ser Asn Lys Glu Glu Lys
                805                 810                 815
```

International Application No: PCT/ /

MICROORGANISMS

Optional Sheet in connection with the microorganism referred to on page 67, lines 25-37 of the description '

A. IDENTIFICATION OF DEPOSIT '

Further deposits are identified on an additional sheet '

Name of depositary institution '

American Type Culture Collection

Address of depositary institution (including postal code and country) '

12301 Parklawn Drive
Rockville, MD 20852
US

Date of deposit ' February 10, 1993 Accession Number ' 69240

B. ADDITIONAL INDICATIONS ' (leave blank if not applicable). This information is continued on a separate attached sheet'

C. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE ' (if the indications are not for all designated States)

D. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS ' (leave blank if not applicable)

The indications listed below will be submitted to the International Bureau later ' (Specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")

E. ☑ This sheet was received with the international application when filed (to be checked by the receiving Office)

(Authorized Officer)

☐ The date of receipt (from the applicant) by the International Bureau "

was

(Authorized Officer)

Form PCT/RO/134 (January 1981)

International Application No: PCT/ /

Form PCT/RO/134 (cont.)

American Type Culture Collection

12301 Parklawn Drive
Rockville, MD 20852
US

Accession No.	Date of Deposit
69241	February 10, 1993

도면의 간단한 설명

<252> 제 1A-1F 도는 94kD 치료요법적 RB 단백질(+가닥은 SEQ ID NO:1 이고, -가닥은 SEQ ID NO:2) 인코드하는 cDNA 단편은 뉴클레오타이드서열이다.

<253> 제 2A-2F 도는 94kDa 치료요법적 RB 단백질의 아미노산서열이다(SEQ ID NO:3).

<254> 제 3 도는 94kDa 요법적 RB 단백질 합성을 위한 베큘로바이러스 발현벡터의 구조이다; *R.S.는 재조합서열이다.

<255> 제 4A 와 제 4B 도는 곤충세포에서 재조합 베큘로바이러스-생산한 $p110^{RB}$와 $p94^{RB}$의 세포내 위치를 나타내며; 4A 도는 목크 감염된 Sf9 세포를 나타내고; 4B 도는 $p110^{RB}$ 를 생산하는 세포를 나타내고; 4C 도는 $p94^{RB}$ 를 생산하는 세포를 나타내고; 단백질은 4B 와 4C 에 핵에 위치하고, 단백질 위치는 항-RB 면역화학적 염색을 한 것이다.

<256> 제 5 도는 SV40 T항원과 베큘로바이러스 발현 정제된 $p110^{RB}$ 와 $p94^{RB}$ 의 복잡한 형성의 다이아그램이다. 면역친화적 크로마토그래피 정제된 단백질은 동량의 T항원으로 혼합하고, 혼합물 한방울씩은 PAB419 항-T-항체와 면역침전시킨후 웨스턴 블랏팅한다. 블랏은 연속하여 MAb-1 항-RB 항체와 PAB419 항체의 배양한다. 라인 1은 T항원 고정된 W138 VA13 섬유아세포 분해물질로 콘트롤로 사용하고; 라인 2은 정제된 $p110^{RB}$; 라인 3은 T-Ag와 $p110^{RB}$ 의 공침전물; 라인 4는 정제된 $p94^{RB}$ 이고; 라인 5는 T-Ag 와 $p94^{RB}$ 의 공침전을 나타낸다.

<257> 제 6A 와 6B 도 에서는 사이토메갈로바이러스 프로모터/인헨서를 사용하여 사람세포에서 $p110^{RB}$ (pCMV-f-RB35)와 $p94^{RB}$ pCMV-s-RB42)의 다량 발현시킬 수 있는 재조합 플라스미드 구조이다. 도면 6A 는 $p110^{RB}$ 코드 cDNA의 예를 나타낸 것이고; 6B 는 $p110^{RB}$ 와 $p94^{RB}$ 발현 플라스미드의 유전자 지도를 나타내고 이때 pCMV-f-RB35는 $p110^{RB}$ 를 인코드하고, pCMV-s-RB42는 $p94^{RB}$ 를 인코드한다. pCMV-s-RB42 는 제 2 ATG 의 $p110^{RB}$ 코드부분 상류가 대부분 결실된 것이다.

<258> 제 7A 와 7B 도는 β-액틴프로모터를 사용하여 사람세포에서 $p110^{RB}$ (pβA-f-RB33)와 $p94^{RB}$ (pβA-s-RB34)의 발현을 위한 재조합 플라스미드의 구조로써 A 도는 $p110^{RB}$ 코딩 플라스미드인 pβA-f-RB33의 지도이고; B도는 $p94^{RB}$ 코딩 플라스미드인 pβA-s-RB34 지도이다. 이때 pβA-s-RB34 는 상류 제 2 ATG 의 $p110^{RB}$ 코딩부분이 대부분 결실된 것이다.

<259> 도면 8A, 8B 와 8C 는 RB-결손 방광 육종 세포주 5637(ATCC HTB9)에서 발현하는 $p110^{RB}$ 와 $p94^{RB}$ 의 형태학적 효과를 나타낸 것이다; 도면 8A 는 모크-감염된 HTB9 세포이고; 8B 도는 $p110^{RB}$ 발현 HTB9 전이감염체; 8C 도는 $p94^{RB}$ 발현 HTB9 전이감염체이다. 화살표는 RB-양성 면역 착색된 세포를 나타낸다. 이때 $p110^{RB}$ 발현세포(도면 8B)는 실제 정상이나 8C 의 $p94^{RB}$ 발현세포는 노쇠한다.

<260> 제 9 도는 RB-재구성된 방광육종 세포주 5637 에서 $p110^{RB}$ 와 $p94^{RB}$ 단백질의 반감기 분석이다. 방광종양세포는 $p110^{RB}$ (pβA-f-RB33) 또는 p94RB (pβA-f-B34) 발현 플라스미드와 다중접시에서 전이감염시킨다. 24시간 후에 세포는 35-S-메티오닌으로 라벨시키고, 0, 6, 12 와 24시간동안 라벨안된 메티오닌으로 추적한다. $p110^{RB}$ 와 $p94^{RB}$ 단백질은 면역침전에 의해 결정된다; 도면의 좌측(0-12시간)은 $p110^{RB}$ 의 반감기가 6시간보다 적음을 나타내고; 도면의 우측 (0-24시간)은 $p94^{RB}$ 의 반감기가 약 12시간임을 나타낸다.

<261> 제 10 도는 일시적으로 전이감염된 5637 세포에 외인성 $p110^{RB}$ 와 $p94^{RB}$ 단백질의 웨스턴 블랏분석을 한것으로 $p94^{RB}$ 단백질의 뚜렷한 포스포릴화 상태를 나타내는데 라인 1은 정상의 사람 섬유아세포주, WI-38; 라인 2는 모 RB-방광 육종세포주, 5637; 라인 3은 $p110^{RB}$ 발현 플라스미드로 전이감염된 5637 세포를 나타내고; 라인 4는 $p94^{RB}$ 발현 플라스미드로 전이감염된 5637 세포를 나타낸다.

<262> 제 11A-11C 도는 레트로바이러스 플라스미드 벡터를 경유하여 정상(비-종양성)쥐 섬유아세포에서 사람 전길이 RB 단백질, $p110^{RB}$ (도면 11B)와 광범위한 종양억제 단백질 $p94^{RB}$ (도면 11C)의 발현을 나타낸 것으로 $p110^{RB}$ -와 $p94^{RB}$ 발현세포(화살표)는 도면 11A의 모세포와 유사한 보통의 외형을 가진다.

<263> 도면 12A-12D 는 생체내에서 쥐뇨방광 점막에 사람 $p110^{RB}$ (도면 12C)와 $p94^{RB}$ (도면 12D) 단백질의 발현을 나타낸다. 리포좀은 각각 $p110^{RB}$ -와 $p94^{RB}$ 발현 플라스미드와 혼합하고 카테테르를 통하여 쥐 방광내로 직접 주입시킨다. 분명하게는 $p110^{RB}$ (도면 12C) 또는 $p94^{RB}$ 를 발현하는 상피는 처리안된 쥐방광 (도면 12A) 또는 리포좀으로만 처리한 쥐방광(도면 12B)와 비교하여 유사한 정상적인 외양을 가진다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

서열 3에 따른 아미노산 서열을 가지는 $p94^{RB}$ 를 인코드하는 DNA 분자에 있어서, DNA 분자는 $p110^{RB}$를 코드하지는 않는 것을 특징으로 하는 DNA 분자.

청구항 2

제 1 항에 있어서, DNA 분자는 서열 1 의 DNA 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 DNA 분자.

청구항 3

제 1 항에 따른 DNA 분자로 구성된 발현 벡터에 있어서, 이 벡터는 $p94^{RB}$ 코딩 DNA 분자를 포유류 숙주 세포에 삽입시켜, $p94^{RB}$를 숙주세포에서 발현시키는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 발현 벡터는 플라스미드와 바이러스성 벡터에서 선택되는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 바이러스성 벡터는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 허피스바이러스 벡터에서 선택되는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 6

제 3 항에 있어서, 발현 벡터는 플라스미드 pCMV-s-RB42인 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 7

제 3 항에 있어서, 발현 벡터는 플라스미드 pβA-s-RB34인 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 8

제 3 항에 있어서, 발현 벡터는 레트로바이러스이고, $p94^{RB}$ 코팅 유전자는 레트로바이러스 프로모터, CMV 프로모터, β-악틴 프로모터에서 선택된 프로모터의 제어하에 있는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 9

제 3 항에 있어서, 발현 벡터는 아데노바이러스이고, $p94^{RB}$ 코딩 유전자는 레트로바이러스 프로모터, CMV 프로모터, β-악틴 프로모터에서 선택된 프로모터의 제어하에 있는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 10

제 2 항에 따른 DNA 분자로 구성된 발현 벡터에 있어서, 이 벡터는 $p94^{RB}$ 코딩 DNA 분자를 포유류 숙주 세포에 삽입시켜, $p94^{RB}$를 숙주세포에서 발현시키는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 11

제 1 항에 있어서, DNA 분자는 실제 분리 정제된 것을 특징으로 하는 DNA 분자.

청구항 12

제 2 항에 있어서, DNA 분자는 실제 분리 정제된 것을 특징으로 하는 DNA 분자.

청구항 13

사람을 제외한 동물의 종양 세포 증식을 억제하는 방법에 있어서, 서열 3 에 나타낸 것과 같은 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 인코드하는 폴리뉴클레오티드로 구성된 발현 벡터를 종양세포로 도입을 시키는 것으로 구성되는데, 이때 폴리뉴클레오티드는 $p110^{RB}$를 인코드하지는 않으며, 종양 세포로 도입 후에, 폴리펩티드는 종양 세포에서 발현되어, 종양 세포 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 서열 1의 뉴클레오티드 #19부터 #2466의 뉴클레오티드 서열로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 13 항에 있어서, 종양 세포는 야생형 망막아종 $p110^{RB}$ 단백질을 발현시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 13 항에 있어서, 종양 세포는 야생형 망막아종 $p110^{RB}$ 단백질을 발현시키지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 13 항에 있어서, 종양 세포는 망막아종 세포, 유방 육종세포, 폐암육종 세포, 전립성 암육종 세포, 방광 암육종 세포, 뇌 암육종 세포, 섬유육종 세포 또는 골 육종 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 13 항에 있어서, 발현 벡터는 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 허피스 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 타입 5 결손 돌연변이에서 얻는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 13 항에 있어서, 발현 벡터는 플라스미드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 13 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 망막아종 유전자 프로모터, 레트로바이러스 긴-말단 반복부, 사이토메갈로바이러스 프로모터, β-악틴 프로모터, 글루코코르티코이드-유도성 프로모터, SV40 초기 부분 프로모터 또는 허피스 심플렉스 바이러스 티미딘 카이나제 프로모터에 작동할 수 있도록 연결된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 13 항에 있어서, 발현 벡터는 바이러스 감염, 리포좀 중개된 트렌스펙션, 폴리브렌-중개된 트랜스펙션 또는 $CaPO_4$-중개된 트랜스펙션에 의해 세포내로 도입되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 13 항에 있어서, 발현 벡터는 바이러스 감염 또는 리포좀 중개된 트렌스펙션에 의해 세포내로 도입되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제 13 항에 있어서, 발현 벡터는 개체내에 종양이 존재하는 부위에 벡터를 운반한 후에 종양 세포로 도입되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 발현 벡터는 직접 주입에 의해 세포내로 도입되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제 13 항에 있어서, 발현 벡터는 in vitro에서 세포내로 도입되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제 13 항에 있어서, 발현 벡터는 in vivo에서 세포내로 도입되는 것을 특징으로 하는 방법.

요약

본 발명은 적절한 숙주세포에서 유전자에 의해 발현된 광범위한 종양 억제유전자와 단백질에 관한다. 단백질은 약 94kD 의 분자량을 가지는 제2인프레임 AUG 코돈 개시된 망막아종 단백질이다. 본 발명은 암 또는 종양세포와 같은 비정상적 세포증식을 특징으로 하는 질환을 가지는 포유류 치료방법에 관한다. 치료는 치료가 필요한 세포내로 $p94^{RB}$ 발현벡터 또는 $p94^{RB}$ 단백질을 숙주세포내로 투여하는 것으로 이루어진다.

대표도

도1a

도면

도면1a

```
                                                                      60
                                                                CATAGAAATC
                                                      50        GTATCTTTAG
                                                      TACAGAAAAA
                                                      ATGTCTTTTT 120
                                                      110       AGTTGATAAT
                                                      CCAGTACCAA
                                                      GGTCATGGTT 180
                                                      170       TCAACTATTA
                                                      CACTCTTCAG
                                                      GTGAGAAGTC 240
                                                      230       GTTTAACCTT
                                                      CGATATCTAC
                                                      GCTATAGATG 300
                                                      290       ACTTTATTTA
                                                      TAGCTAAAGG
                                                      ATCGATTTCC 360
                                                      350       GGAAGTATTA
                                                      TATGTGTCCT
                                                      ATACACAGGA 420
                                                      410       CCTTCATAAT
                                                      AAACAGCTGT
                                                      TTTGTCGACA 480
                                                      470       ACTGATAAAA
                                                      GTGCACGGAT
                                                      GTCTTGTCCT 540
                                                      530       TATACCCATT
                                                      CAGAACAGGA
                                                      CACGTGCCTA 600
                                                      590       AGCAAAACAA
                                                      GTCTTGTCCT
                                                      CTCTGTAAAG 660
                                                      650       TCGTTTTGTT
                                                      AACATGAATG
                                                      GAGACATTTC 720
                                                      710       TAATATAGAT
                                                      TTGTACTTAC
                                                      ATTATATCTA
                                                      770
                                                      ATTATATCTA
                                                      760
                                                      GATCTTTTAC
                                                      750
                                                      CTAGAAAATG
                                                      740
                                                      GAATTTGAGA
                                                      730
                                                      TAATTTCAAC
                                                      720
                                                      ATTAAACTCT
                                                      710
                                                      GTTTACCTTC
                                                      700
                                                      CAAATGGAAG
                                                      690
                                                      TCCTGTACAC
                                                      680
                                                      AGACGTAACC
                                                      670
                                                      TCTGCATTGG
                                                      660
                                                      AGGACATGTG
                                                      650
                                                      CGATACAGTT
                                                      640
                                                      GCTATGTCAA
                                                      630
                                                      TCACAGGTAT
                                                      620
                                                      AGTGTCCATA
                                                      610
                                                      GGCTGG
                                                      600
                                                      GATCCCGACC
                                                      590
5'
3'
```

도면1b

```
                                                
```

도면1c

```
1090                1100                1110                1120                1130                1140
CGATTATCCA TTCAAAATTT TAGCAAACTT CTGAATGACA ACATTTTTCA TATGTCTTTA
GCTAATAGGT AAGTTTTAAA ATCGTTTGAA GACTTACTGT TGTAAAAAGT ATACAGAAAT
      1150                1160                1170                1180                1190                1200
TTGGCGTGCG CTCTTGAGGT TGTAATGGCC ACATATAGCA GAAGTACATC TCAGAATCTT
AACCGCACGC GAGAACTCCA ACATTACCGG TGTATATCGT CTTCATGTAG AGTCTTAGAA
      1210                1220                1230                1240                1250                1260
GATTCTGGAA CAGATTTGTC TTTCCCATGG ATTCTGAATG TGCTTAATTT AAAAGCCTTT
CTAAGACCTT GTCTAAACAG AAAGGGTACC TAAGACTTAC ACGAATTAAA TTTTCGGAAA
      1270                1280                1290                1300                1310                1320
GATTTTTACA AAGTGATCGA AAGTTTTATC AAAGCAGAAG GCAACTTGAC AAGAGAAATG
CTAAAAATGT TTCACTAGCT TTCAAAATAG TTTCGTCTTC CGTTGAACTG TTCTCTTTAC
      1330                1340                1350                1360                1370                1380
ATAAAACATT TAGAACGATG TGAACATCGA ATCATGGAAT CCCTTGCATG GCTCTCAGAT
TATTTTGTAA ATCTTGCTAC ACTTGTAGCT TAGTACCTTA GGGAACGTAC CGAGAGTCTA
      1390                1400                1410                1420                1430                1440
TCACCTTTAT TTGATCTTAT TAAACAATCA AAGGACCGAG AAGGACCAAC TGATCACCTT
AGTGGAAATA AACTAGAATA ATTTGTTAGT TTCCCTGGCTC TTCCTGGTTG ACTAGTGGAA
      1450                1460                1470                1480                1490                1500
GAATCTGCTT GTCCTCTTAA TCTTCCTCTC CAGAATAATC ACACTGCAGC AGATATGTAT
CTTAGACGAA CAGGAGAATT AGAAGGAGAG GTCTTATTAG TGTGACGTCG TCTATACATA
      1510                1520                1530                1540                1550                1560
CTTTCTCCTG TAAGATCTCC AAAGAAAAAA GGTTCAACTA CGCGTGTAAA TTCTACTGCA
GAAAGAGGAC ATTCTAGAGG TTTCTTTTTT CCAAGTTGAT GCGCACATTT AAGATGACGT
      1570                1580                1590                1600                1610                1620
AATGCAGAGA CACAAGCAAC CTCAGCCTTC CAGACCCAGA AGCCATTGAA ATCTACCTCT
TTACGTCTCT GTGTTCGTTG GAGTCGGAAG GTCTGGGTCT TCGGTAACTT TAGATGGAGA
```

도면1d

```
1630                1640                1650                1660                1670                1680
CTTTCACTGT  TTTATAAAAA  AGTGTATCGG  CTAGCCTATC  TCCGGCTAAA  TACACTTTGT
GAAAGTGACA  AAATATTTTT  TCACATAGCC  GATCGGATAG  AGGCCGATTT  ATGTGAAACA
1690                1700                1710                1720                1730                1740
GAACGCCTTC  TGTCTGAGCA  CCCAGAATTA  GAACATATCA  TCTGGACCCT  TTTCCAGCAC
CTTGCGGAAG  ACAGACTCGT  GGGTCTTAAT  CTTGTATAGT  AGACCTGGGA  AAAGGTCGTG
1750                1760                1770                1780                1790                1800
ACCCTGCAGA  ATGAGTATGA  ACTCATGAGA  GACAGGCATT  TGGACCAAAT  TATGATGTGT
TGGGACGTCT  TACTCATACT  TGAGTACTCT  CTGTCCGTAA  ACCTGGTTTA  ATACTACACA
1810                1820                1830                1840                1850                1860
TCCATGTATG  GCATATGCAA  AGTGAAGAAT  ATAGACCTTA  AATTCAAAAT  CATTGTAACA
AGGTACATAC  CGTATACGTT  TCACTTCTTA  TATCTGGAAT  TTAAGTTTTA  GTAACATTGT
1870                1880                1890                1900                1910                1920
GCATACAAGG  ATCTTCCTCA  TGCTGTTCAG  GAGACATTCA  AACGTGTTTT  GATCAAAGAA
CGTATGTTCC  TAGAAGGAGT  ACGACAAGTC  CTCTGTAAGT  TTGCACAAAA  CTAGTTTCTT
1930                1940                1950                1960                1970                1980
GAGGAGTATG  ATTCTATTAT  AGTATTCTAT  AACTCGGTCT  TCATGCAGAG  ACTGAAAACA
CTCCTCATAC  TAAGATAATA  TCATAAGATA  TTGAGCCAGA  AGTACGTCTC  TGACTTTTGT
1990                2000                2010                2020                2030                2040
AATATTTTGC  AGTATGCTTC  CACCAGGCCC  CCTACCTTGT  CACCAATACC  TCACATTCCT
TTATAAAACG  TCATACGAAG  GTGGTCCGGG  GGATGGAACA  GTGGTTATGG  AGTGTAAGGA
2050                2060                2070                2080                2090                2100
CGAAGCCCTT  ACAAGTTTCC  TAGTTCACCC  TTACGGATTC  CTGGAGGGAA  CATCTATATT
GCTTCGGGAA  TGTTCAAAGG  ATCAAGTGGG  AATGCCTAAG  GACCTCCCTT  GTAGATATAA
2110                2120                2130                2140                2150                2160
TCACCCCTGA  AGAGTCCATA  TAAAATTTCA  GAAGGTCTGC  CAACACCAAC  AAAAATGACT
AGTGGGGACT  TCTCAGGTAT  ATTTTAAAGT  CTTCCAGACG  GTTGTGGTTG  TTTTTACTGA
```

도면1e

```
                                                
```

도면1f

```
                                                
```

```
    GATCCCGA CCTAGATGAG ATG TCG TTC ACT TTT ACT GAG CTA CAG AAA   48
                        Met Ser Phe Thr Phe Thr Glu Leu Gln Lys   10

AAC ATA GAA ATC AGT GTC CAT AAA TTC TTT AAC TTA CTA AAA GAA ATT   96
Asn Ile Glu Ile Ser Val His Lys Phe Phe Asn Leu Leu Lys Glu Ile   26

GAT ACC AGT ACC AAA GTT GAT AAT GCT ATG TCA AGA CTG TTG AAG AAG  144
Asp Thr Ser Thr Lys Val Asp Asn Ala Met Ser Arg Leu Leu Lys Lys   42

TAT GAT GTA TTG TTT GCA CTC TTC AGC AAA TTG GAA AGG ACA TGT GAA  192
Tyr Asp Val Leu Phe Ala Leu Phe Ser Lys Leu Glu Arg Thr Cys Glu   58

CTT ATA TAT TTG ACA CAA CCC AGC AGT TCG ATA TCT ACT GAA ATA AAT  240
Leu Ile Tyr Leu Thr Gln Pro Ser Ser Ser Ile Ser Thr Glu Ile Asn   74

TCT GCA TTG GTG CTA AAA GTT TCT TGG ATC ACA TTT TTA TTA GCT AAA  288
Ser Ala Leu Val Leu Lys Val Ser Trp Ile Thr Phe Leu Leu Ala Lys   90

GGG GAA GTA TTA CAA ATG GAA GAT GAT CTG GTG ATT TCA TTT CAG TTA  336
Gly Glu Val Leu Gln Met Glu Asp Asp Leu Val Ile Ser Phe Gln Leu  106

ATG CTA TGT GTC CTT GAC TAT TTT ATT AAA CTC TCA CCT CCC ATG TTG  384
Met Leu Cys Val Leu Asp Tyr Phe Ile Lys Leu Ser Pro Pro Met Leu  122

CTC AAA GAA CCA TAT AAA ACA GCT GTT ATA CCC ATT AAT GGT TCA CCT  432
Leu Lys Glu Pro Tyr Lys Thr Ala Val Ile Pro Ile Asn Gly Ser Pro  138

CGA ACA CCC AGG CGA GGT CAG AAC AGG AGT GCA CGG ATA GCA AAA CAA  480
Arg Thr Pro Arg Arg Gly Gln Asn Arg Ser Ala Arg Ile Ala Lys Gln  154
```


1019950704162

```
CTA GAA AAT GAT ACA AGA ATT ATT GAA GTT CTC TGT AAA GAA CAT GAA  528
Leu Glu Asn Asp Thr Arg Ile Ile Glu Val Leu Cys Lys Glu His Glu  170

TGT AAT ATA GAT GAG GTG AAA AAT GTT TAT TTC AAA AAT TTT ATA CCT  576
Cys Asn Ile Asp Glu Val Lys Asn Val Tyr Phe Lys Asn Phe Ile Pro  186

TTT ATG AAT TCT CTT GGA CTT GTA ACA TCT AAT GGA CTT CCA GAG GTT  624
Phe Met Asn Ser Leu Gly Leu Val Thr Ser Asn Gly Leu Pro Glu Val  202

GAA AAT CTT TCT AAA CGA TAC GAA GAA ATT TAT CTT AAA AAT AAA GAT  672
Glu Asn Leu Ser Lys Arg Tyr Glu Glu Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asp  218

CTA GAT GCA AGA TTA TTT TTG GAT CAT GAT AAA ACT CTT CAG ACT GAT  720
Leu Asp Ala Arg Leu Phe Leu Asp His Asp Lys Thr Leu Gln Thr Asp  234

TCT ATA GAC AGT TTT GAA ACA CAG AGA ACA CCA CGA AAA AGT AAC CTT  768
Ser Ile Asp Ser Phe Glu Thr Gln Arg Thr Pro Arg Lys Ser Asn Leu  250

GAT GAA GAG GTG AAT GTA ATT CCT CCA CAC ACT CCA GTT AGG ACT GTT  816
Asp Glu Glu Val Asn Val Ile Pro Pro His Thr Pro Val Arg Thr Val  266

ATG AAC ACT ATC CAA CAA TTA ATG ATG ATT TTA AAT TCA GCA AGT GAT  864
Met Asn Thr Ile Gln Gln Leu Met Met Ile Leu Asn Ser Ala Ser Asp  282

CAA CCT TCA GAA AAT CTG ATT TCC TAT TTT AAC AAC TGC ACA GTG AAT  912
Gln Pro Ser Glu Asn Leu Ile Ser Tyr Phe Asn Asn Cys Thr Val Asn  298

CCA AAA GAA AGT ATA CTG AAA AGA GTG AAG GAT ATA GGA TAC ATC TTT  960
Pro Lys Glu Ser Ile Leu Lys Arg Val Lys Asp Ile Gly Tyr Ile Phe  314
```

```
AAA GAG AAA TTT GCT AAA GCT GTG GGA CAG GGT TGT GTC GAA ATT GGA 1008
Lys Glu Lys Phe Ala Lys Ala Val Gly Gln Gly Cys Val Glu Ile Gly  330

TCA CAG CGA TAC AAA CTT GGA GTT CGC TTG TAT TAC CGA GTA ATG GAA 1056
Ser Gln Arg Tyr Lys Leu Gly Val Arg Leu Tyr Tyr Arg Val Met Glu  346

TCC ATG CTT AAA TCA GAA GAA GAA CGA TTA TCC ATT CAA AAT TTT AGC 1104
Ser Met Leu Lys Ser Glu Glu Glu Arg Leu Ser Ile Gln Asn Phe Ser  362

AAA CTT CTG AAT GAC AAC ATT TTT CAT ATG TCT TTA TTG GCG TGC GCT 1152
Lys Leu Leu Asn Asp Asn Ile Phe His Met Ser Leu Leu Ala Cys Ala  378

CTT GAG GTT GTA ATG GCC ACA TAT AGC AGA AGT ACA TCT CAG AAT CTT 1200
Leu Glu Val Val Met Ala Thr Tyr Ser Arg Ser Thr Ser Gln Asn Leu  394

GAT TCT GGA ACA GAT TTG TCT TTC CCA TGG ATT CTG AAT GTG CTT AAT 1248
Asp Ser Gly Thr Asp Leu Ser Phe Pro Trp Ile Leu Asn Val Leu Asn  410

TTA AAA GCC TTT GAT TTT TAC AAA GTG ATC GAA AGT TTT ATC AAA GCA 1296
Leu Lys Ala Phe Asp Phe Tyr Lys Val Ile Glu Ser Phe Ile Lys Ala  426

GAA GGC AAC TTG ACA AGA GAA ATG ATA AAA CAT TTA GAA CGA TGT GAA 1344
Glu Gly Asn Leu Thr Arg Glu Met Ile Lys His Leu Glu Arg Cys Glu  442

CAT CGA ATC ATG GAA TCC CTT GCA TGG CTC TCA GAT TCA CCT TTA TTT 1392
His Arg Ile Met Glu Ser Leu Ala Trp Leu Ser Asp Ser Pro Leu Phe  458

GAT CTT ATT AAA CAA TCA AAG GAC CGA GAA GGA CCA ACT GAT CAC CTT 1440
Asp Leu Ile Lys Gln Ser Lys Asp Arg Glu Gly Pro Thr Asp His Leu  474
```


1019950704162

도면2d

```
GAA TCT GCT TGT CCT CTT AAT CTT CCT CTC CAG AAT AAT CAC ACT GCA 1488
Glu Ser Ala Cys Pro Leu Asn Leu Pro Leu Gln Asn Asn His Thr Ala  490

GCA GAT ATG TAT CTT TCT CCT GTA AGA TCT CCA AAG AAA AAA GGT TCA 1536
Ala Asp Met Tyr Leu Ser Pro Val Arg Ser Pro Lys Lys Lys Gly Ser  506

ACT ACG CGT GTA AAT TCT ACT GCA AAT GCA GAG ACA CAA GCA ACC TCA 1584
Thr Thr Arg Val Asn Ser Thr Ala Asn Ala Glu Thr Gln Ala Thr Ser  522

GCC TTC CAG ACC CAG AAG CCA TTG AAA TCT ACC TCT CTT TCA CTG TTT 1632
Ala Phe Gln Thr Gln Lys Pro Leu Lys Ser Thr Ser Leu Ser Leu Phe  538

TAT AAA AAA GTG TAT CGG CTA GCC TAT CTC CGG CTA AAT ACA CTT TGT 1680
Tyr Lys Lys Val Tyr Arg Leu Ala Tyr Leu Arg Leu Asn Thr Leu Cys  554

GAA CGC CTT CTG TCT GAG CAC CCA GAA TTA GAA CAT ATC ATC TGG ACC 1728
Glu Arg Leu Leu Ser Glu His Pro Glu Leu Glu His Ile Ile Trp Thr  570

CTT TTC CAG CAC ACC CTG CAG AAT GAG TAT GAA CTC ATG AGA GAC AGG 1776
Leu Phe Gln His Thr Leu Gln Asn Glu Tyr Glu Leu Met Arg Asp Arg  586

CAT TTG GAC CAA ATT ATG ATG TGT TCC ATG TAT GGC ATA TGC AAA GTG 1824
His Leu Asp Gln Ile Met Met Cys Ser Met Tyr Gly Ile Cys Lys Val  602

AAG AAT ATA GAC CTT AAA TTC AAA ATC ATT GTA ACA GCA TAC AAG GAT 1872
Lys Asn Ile Asp Leu Lys Phe Lys Ile Ile Val Thr Ala Tyr Lys Asp  618

CTT CCT CAT GCT GTT CAG GAG ACA TTC AAA CGT GTT TTG ATC AAA GAA 1920
Leu Pro His Ala Val Gln Glu Thr Phe Lys Arg Val Leu Ile Lys Glu  634
```

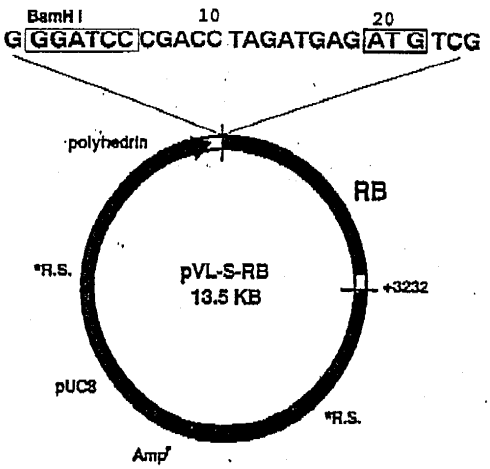
```
GAG GAG TAT GAT TCT ATT ATA GTA TTC TAT AAC TCG GTC TTC ATG CAG 1968
Glu Glu Tyr Asp Ser Ile Ile Val Phe Tyr Asn Ser Val Phe Met Gln  650

AGA CTG AAA ACA AAT ATT TTG CAG TAT GCT TCC ACC AGG CCC CCT ACC 2016
Arg Leu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Tyr Ala Ser Thr Arg Pro Pro Thr  666

TTG TCA CCA ATA CCT CAC ATT CCT CGA AGC CCT TAC AAG TTT CCT AGT 2064
Leu Ser Pro Ile Pro His Ile Pro Arg Ser Pro Tyr Lys Phe Pro Ser  682

TCA CCC TTA CGG ATT CCT GGA GGG AAC ATC TAT ATT TCA CCC CTG AAG 2112
Ser Pro Leu Arg Ile Pro Gly Gly Asn Ile Tyr Ile Ser Pro Leu Lys  698

AGT CCA TAT AAA ATT TCA GAA GGT CTG CCA ACA CCA ACA AAA ATG ACT 2160
Ser Pro Tyr Lys Ile Ser Glu Gly Leu Pro Thr Pro Thr Lys Met Thr  714

CCA AGA TCA AGA ATC TTA GTA TCA ATT GGT GAA TCA TTC GGG ACT TCT 2208
Pro Arg Ser Arg Ile Leu Val Ser Ile Gly Glu Ser Phe Gly Thr Ser  730

GAG AAG TTC CAG AAA ATA AAT CAG ATG GTA TGT AAC AGC GAC CGT GTG 2256
Glu Lys Phe Gln Lys Ile Asn Gln Met Val Cys Asn Ser Asp Arg Val  746

CTC AAA AGA AGT GCT GAA GGA AGC AAC CCT CCT AAA CCA CTG AAA AAA 2304
Leu Lys Arg Ser Ala Glu Gly Ser Asn Pro Pro Lys Pro Leu Lys Lys  762

CTA CGC TTT GAT ATT GAA GGA TCA GAT GAA GCA GAT GGA AGT AAA CAT 2352
Leu Arg Phe Asp Ile Glu Gly Ser Asp Glu Ala Asp Gly Ser Lys His  778

CTC CCA GGA GAG TCC AAA TTT CAG CAG AAA CTG GCA GAA ATG ACT TCT 2400
Leu Pro Gly Glu Ser Lys Phe Gln Gln Lys Leu Ala Glu Met Thr Ser  794
```


1019950704162

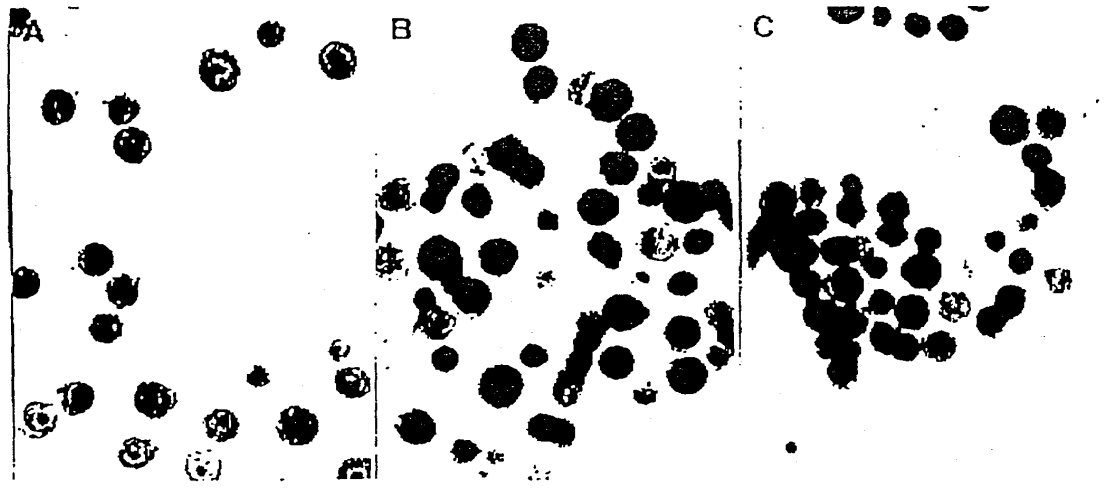
```
ACT CGA ACA CGA ATG CAA AAG CAG AAA ATG AAT GAT AGC ATG GAT ACC   2448
Thr Arg Thr Arg Met Gln Lys Gln Lys Met Asn Asp Ser Met Asp Thr    810

TCA AAC AAG GAA GAG AAA TGA GGATCTCAGG ACCTTGGTGG ACACTGTGTA      2499
Ser Asn Lys Glu Glu Lys ***

CACCTCTGGA TTCATTGTCT CTCACAGATG TGACTGTATA ACTTTCCCAG GTTCTGTTTA 2559

TGGCCACATT TAATATCTTC AGCTCTTTTT GTGGATATAA AATGTGCAGA TGCAATTGTT 2619

TGGGTGATTC CTAAGCCACT TGAAATGTTA GTCATTGTTA TTTATACAAG ATTGAAAATC 2679

TTGTGTAAAT CCTGCCATTT AAAAAGTTGT AGCAGATTGT TTCCTCTTCC AAAGTAAAAT 2739

TGCTGTGCTT TATGGATAGT AAGAATGGCC CTAGAGTGGG AGTCCTGATA ACCCAGGCCT 2799

GTCTGACTAC TTTGCCTTCT TTTGTAGCAT ATAGGTGATG TTTGCTCTTG TTTTTATTAA 2859

TTTATATGTA TATTTTTTTA ATTTAACATG AACACCCTTA GAAAATGTGT CCTATCTATC 2919

ATCCAAATGC AATTTGATTG ACTGCCCATT CACCAAAATT ATCCTGAACT CTTCTGCAAA 2979

AATGGATATT ATTAGAAATT AGAAAAAAAT TACTAATTTT ACACATTAGA TTTTATTTTA 3039

CTATTGGAAT CTGATATACT GTGTGCTTGT TTTATAAAAT TTTGCTTTTA ATTAAATAAA 3099

AGCTGGAAGC AAAGTATAAC CATATGATAC TATCATACTA CTGAAACAGA TTTCATACCT 3159

CAGAATGTAA AAGAACTTAC TGATTATTTT CTTCATCCAA CTTATGTTTT TAAATGAGGA 3219

TTATTGATAG TGG                                                    3232
```


1019950704162

도면3

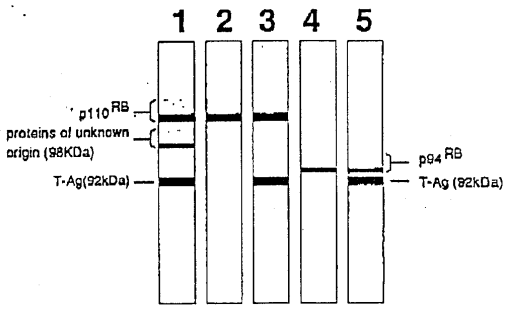


도면4

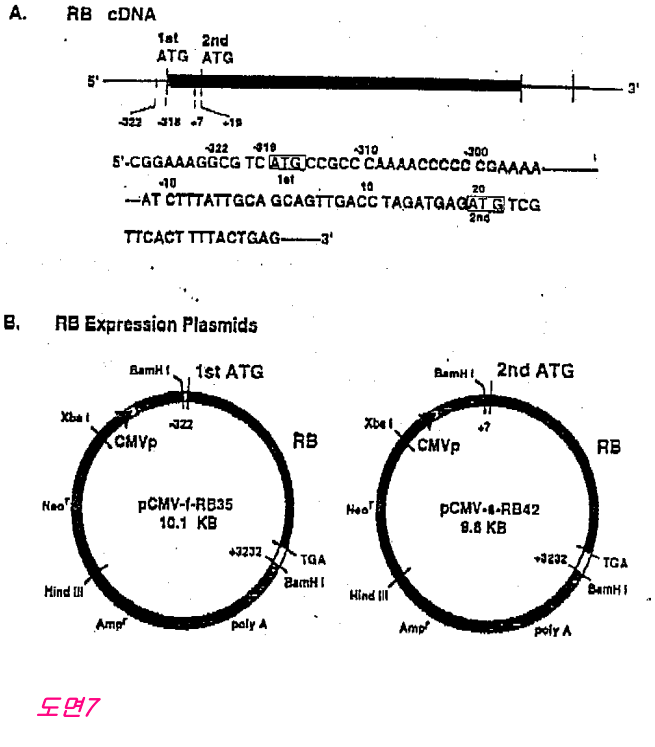


4A 4B 4C

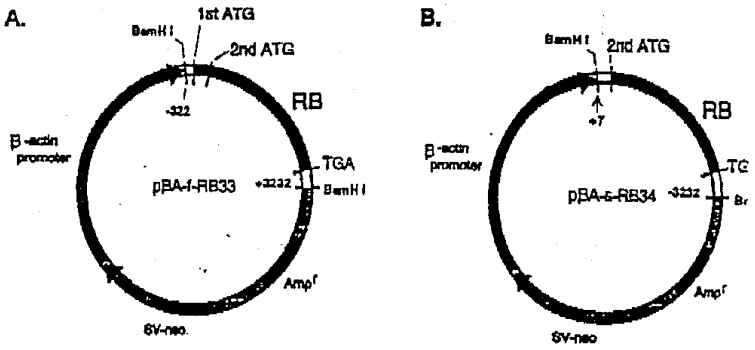
도면5



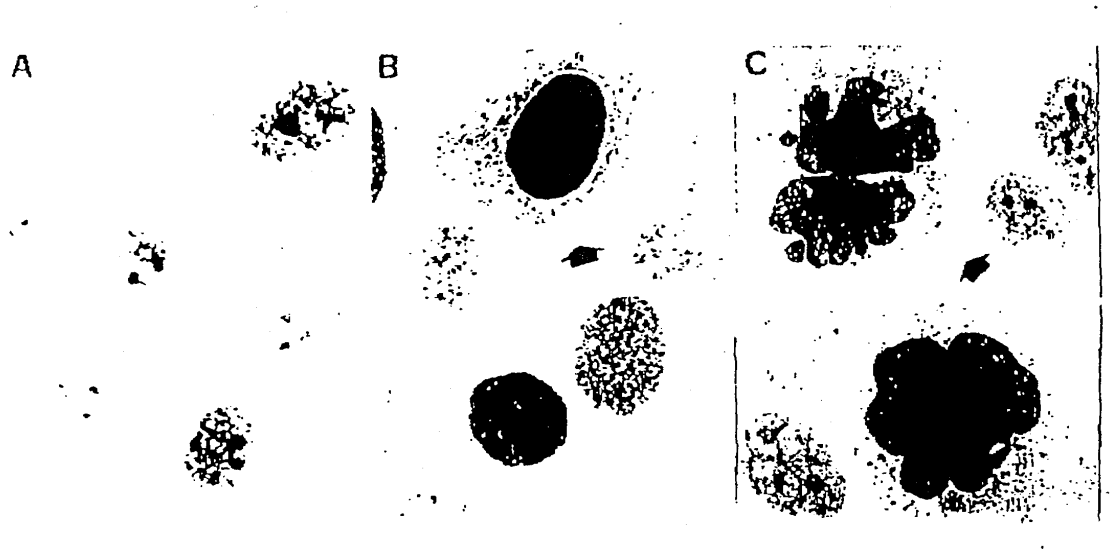
도면6


A. RB cDNA
1st ATG
2nd ATG
5'
3'
5'-CGGAAAGGCG TC ATG CCGCC CAAAACCCCC CGAAAA
—AT CTTTATTGCA GCAGTTGACC TAGATGAG ATG TCG
TTCACT TTTACTGAG—3'
B. RB Expression Plasmids
BamH I
1st ATG
Xba I
CMVp
-322
RB
Neo
pCMV-f-RB35
10.1 KB
+3232
TGA
BamH I
Hind III
Amp
poly A
2nd ATG
+7
pCMV-s-RB42
9.6 KB

도면7

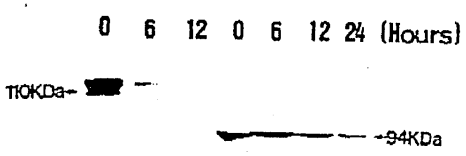

A.
1st ATG
BamH I
2nd ATG
-322
RB
β-actin promoter
pBA-f-RB33
+3232
TGA
BamH I
Amp
SV-neo
B.
BamH I
2nd ATG
+7
RB
β-actin promoter
pBA-s-RB34
-3232
Amp
SV-neo

도면8

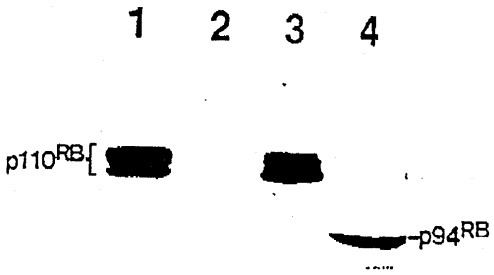


8A 8B 8C

도면9



도면10



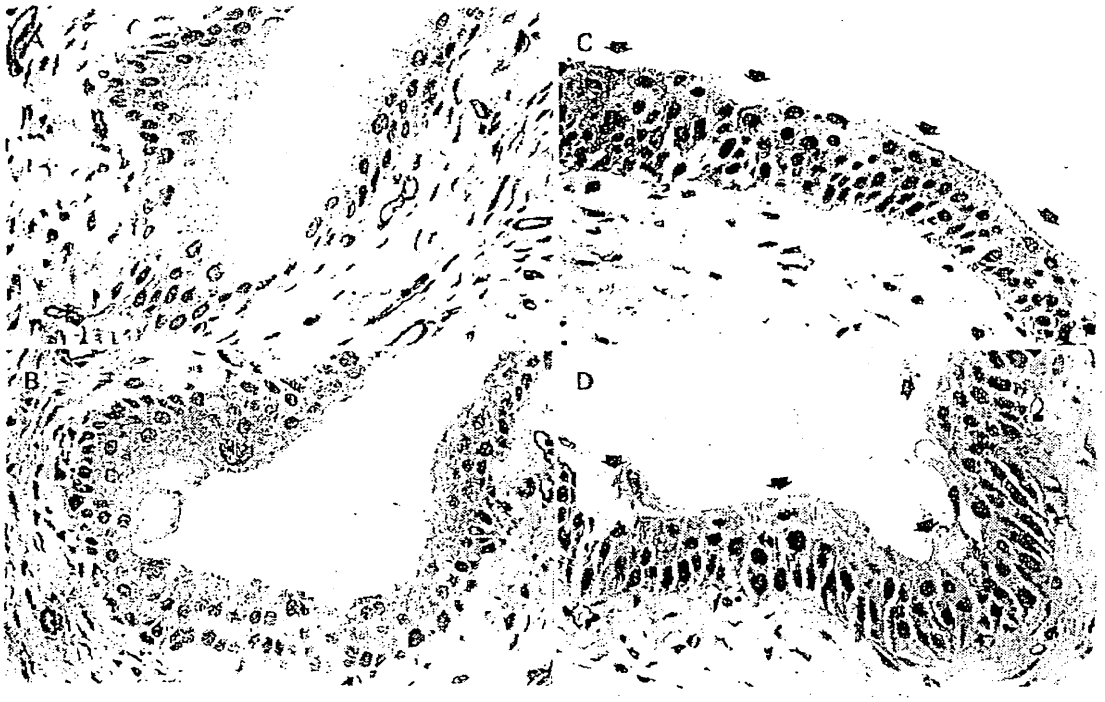
도면11



11A 11B 11C

도면12

12A 12C



12B 12D