(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년10월10일
(11) 등록번호 10-1449587
(24) 등록일자 2014년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) *A61P 13/12* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7004763(분할)
(22) 출원일자(국제) 2007년09월12일
심사청구일자 2014년02월24일
(85) 번역문제출일자 2014년02월24일
(65) 공개번호 10-2014-0029559
(43) 공개일자 2014년03월10일
(62) 원출원 특허 10-2009-7007654
원출원일자(국제) 2007년09월12일
심사청구일자 2011년09월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2007/019774
(87) 국제공개번호 WO 2008/033375
국제공개일자 2008년03월20일
(30) 우선권주장
60/844,351 2006년09월14일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2004099363 A1*
US20050188431 A1*
JP2002506647 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
메드제닉스 메디칼 이스라엘 리미티드
이스라엘 20179 미스가브 피오 박스 14 테라디온 비즈니스 파크
(72) 발명자
펠만 앤드류 엘.
이스라엘 20194 디.엔. 미스가브 모스하브 소라심
(74) 대리인
유미특허법인

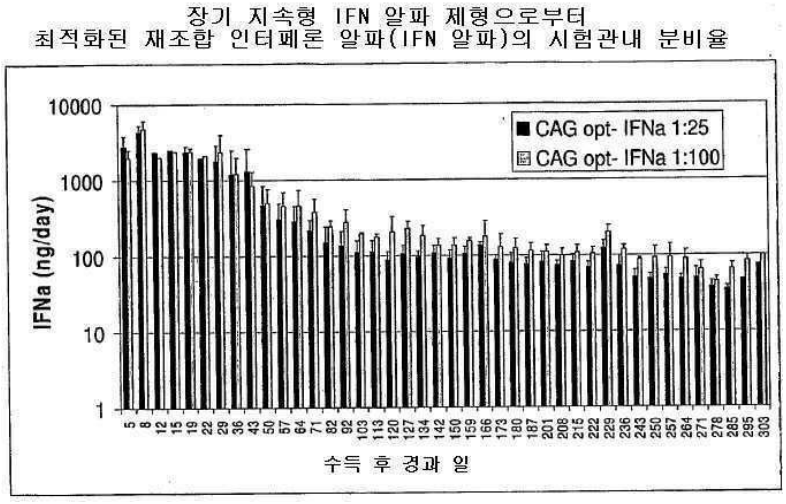
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 **장기 지속형 약물 제형**

(57) 요 약

본 발명은, 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 에리트로포이에틴이나 인터페론 α와 같은 치료성 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는, 유전자 변형된 미세-장기(micro-organ)를 포함하는 장기 지속형 체료 제형 및 이의 이용 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

하나 이상의 유전자 변형된 미세-장기들(micro-organs)을 포함하는 장기 지속형 치료 제형으로서,

상기 미세-장기는 CAG 프로모터 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 치료적 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 포함하며,

상기 CAG 프로모터 핵산 서열이 서열번호 4 또는 6에서 위치 575-1752의 DNA 서열로 이루어지고,

상기 치료적 폴리펩타이드는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 7, 또는 서열번호 8에 기재된 핵산 서열에 의해 코딩되고,

상기 미세-장기는 1-7일간, 1-8주간 또는 1-4개월간의 기간 동안 생체외 배지에서 유지되고,

상기 장기 지속형 치료 제형이 이식되면,

a. 혈청에서 상기 치료적 폴리펩타이드의 발현 수준이 이식 전의 기저 수준(basal level)보다 증가하며,

b. 개체에서 질병 또는 장애의 증상의 완화는 1달 이상 유지되는 것을 특징으로 하는, 장기 지속형 치료 제형.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유전자 변형된 미세-장기가 유전자 변형된 진피 미세-장기인, 장기 지속형 치료 제형.

청구항 3

하나 이상의 유전자 변형된 미세-장기들을 포함하는 장기간에 걸쳐 빈혈을 치료하기 위한 약제학적 조성물로서,

상기 미세-장기는 CAG 프로모터 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 치료적 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 포함하며,

상기 CAG 프로모터 핵산 서열이 서열번호 4 또는 6에서 위치 575-1752의 DNA 서열로 이루어지고,

상기 치료적 폴리펩타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 7에 기재된 핵산 서열에 의해 코딩되고,

상기 미세-장기는 1-7일간, 1-8주간 또는 1-4개월간의 기간 동안 생체외 배지에서 유지되고,

상기 약제학적 조성물이 개체에 이식되면, 적혈구 용적률의 수준이 기저 수준 대비 5% 이상으로 증가하며, 이러한 적혈구 용적률의 수준 증가는 1달 이상 유지되는 것을 특징으로 하는, 약제학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 유전자 변형된 미세-장기가 유전자 변형된 진피 미세-장기인, 약제학적 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 적혈구 용적률의 수준은 시험관 내에서 결정되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 개체가 당뇨병을 앓고 있는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 개체가 말기 신장 질환을 앓고 있는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된, 에리트로포이에틴이나 인터페론 α와 같은 치료성 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는, 유전자 변형된 미세-장기(micro-organ)를 포함하는 장기 지속형 치료 제형 및 이의 이용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 치료제는 경구, 경피, 흡입에 의해, 주입에 의해 또는 서방형 저장체(depot)에 의해 전달될 수 있다. 그러나, 전달 방법은 제제가 수여자에 전달되는 방법, 또는 필요한 투여 빈도 및 이용될 수 있는 분자 크기의 제한에 따라, 한정된다. 일부 방법들에서는, 치료제의 양은 투여시마다 달라진다.

[0003] 원하는 핵산 서열/단편을 벡터에 서브-클로닝한 다음 특정 숙주 세포를 변형시키는 단계를 포함하는, 추가적인 정제 단계에서 원하는 단백질을 생산하고자 하는 단백질의 생산 기법에서는, 단백질 발현량, 분비량, 번역 후 변형된 단백질의 양(당화 및 단백질의 정확한 접힘(folding)) 등이 제한된다. 또한, 단백질을 높은 수준으로 생산할 수 있더라도, 다량의 재조합 단백질을 생산하여 오염원이 없게 정제하여야 한다. 정제 방법을 개발하는 것은 매우 오랜기간이 소요되는 과정이다. 정제된 재조합 단백질이 수득되면, 동물 또는 사람에게 도입하기에 안정적이며 허용가능하도록 제형화하여야 한다. 또한, 제형화하더라도, 정제된 재조합 단백질은 유지 및 보관상의 한계로 인해 유효 기간이 제한되며; 종종 반복적인 정제와 더 많은 단백질의 제형화가 필요할 수도 있다. 적정 제형을 개발하는 과정은 시간이 소요되고, 어렵고 비용이 많이 드는 과정이다.

[0004] 따라서, 필수적인 번역후 변형을 가져 그 생물학적 활성을 유지하며, 높은 수준의 재조합 단백질의 수득과 통상적으로 연관된 어렵고 비용이 많이 드는 방법을 수행하지 않고도, 저렴하고 신속하게 제조되는, 장기 지속형의 단백질-기반의 치료 분자의 필요성이 널리 인식되어 있다.

[0005] 몇몇의 연구자들은 유전자 치료를 통해 재조합 유전자 산물의 생체내 발현을 달성하고자 시도하여 왔다. 통상적으로, 생체내에서 세포를 형질전이시켜 재조합 유전자 산물을 발현시키는데에는 바이러스 벡터가 사용된다. 이러한 바이러스 기반의 벡터는 타겟 조직에 감염하는 자연 능력 등과 같은, 이로운 특징들을 가지고 있다. 그러나, 레트로바이러스 기반의 벡터는 재조합 산물 발현이 가능하도록 타겟 조직의 게놈내에 삽입되어야 하며(존재하는 온코진을 활성화시킬 가능성이 있으며), 능동적으로 분열하는 조직을 형질전이하는데에만 사용할 수 있다. 또한, 바이러스 벡터는 트랜스유전자의 발현을 장기간 지속시킬 수 없는데, 이는 부분적으로는 이차적인

숙주 면역 반응으로 인한 이들의 제거로 인한 것일 수 있다.

[0006] 따라서, 수주간 또는 그 이상으로 지속적으로 일정한 고발현 수준을 보이는 재조합 유전자 산물 제형과 이러한 제형을 사용하여 질병을 치료하는 방법이 당업계에 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은, 일 예로, 유전자 변형된 미세-장기를 포함하는 장기 지속형 치료 제형을 제공하며, 상기 미세-장기는 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하며, 상기 핵산 서열은 치료적 폴리펩타이드를 코딩하며, 그로 인해 상기 제형은 상기 치료적 폴리펩타이드의 발현 수준을 기저 수준 대비 5% 이상으로 증가시키며, 이러한 증가는 1달 이상 유지된다. 일 예에서, 벡터는 헬퍼-의존성 아데노바이러스 벡터이다. 일 예에서, 상기 치료적 폴리펩타이드는 에리트로포이에틴이며, 다른 예에서, 상기 치료적 폴리펩타이드는 인터페론 α이고, 일 예로 인터페론 α 2b이다.

[0008] 다른 예에서, 본 발명은 하나 이상의 유전자 변형된 미세-장기를 제공하는 단계; 및 상기 유전자 변형된 미세-장기를 개체에 이식하는 단계를 포함하는, 장기간 동안 필요한 개체에게 치료적 폴리펩타이드를 제공하는 방법을 제공하며, 상기 미세-장기는 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함하며, 상기 핵산 서열은 치료적 폴리펩타이드를 코딩하며, 그로 인해 상기 제형은 상기 치료적 폴리펩타이드의 발현 수준을 기저 수준 대비 5% 이상으로 증가시키며, 이러한 증가는 1달 이상 유지된다. 일 예에서, 벡터는 헬퍼-의존성 아데노바이러스 벡터이다. 일 예에서, 상기 치료적 폴리펩타이드는 에리트로포이에틴이며, 다른 예에서, 상기 치료적 폴리펩타이드는 인터페론 α이고, 일 예로 인터페론 α 2b이다. 다른 예에서, 상기 개체는 빈혈 환자이다. 다른 예에서, 상기 개체는 감염 환자이다. 다른 예에서, 상기 개체는 암 환자이다.

[0009] 다른 예에서, 본 발명은 서열번호 1과 85% 이상의 상동성을 갖는 핵산 서열, 상기 핵산 서열을 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

[0010] 다른 예에서, 본 발명은 서열번호 2와 85% 이상의 상동성을 갖는 핵산 서열, 상기 핵산 서열을 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 일부 예에서, 본 발명은, 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된, 에리트로포이에틴이나 인터페론 α와 같은 치료적 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는, 유전자 변형된, 조직 기반의 미세-장기(tissue-based micro-organ)를 포함하는 장기 지속형 치료 제형 및 이의 이용 방법에 관한 것이다.

[0012] 본 발명은, 일 예로, 유전자 변형된 미세-장기를 포함하는 장기 지속형 치료 제형을 제공하며, 상기 미세-장기는 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하며, 상기 핵산 서열은 치료적 폴리펩타이드를 코딩하며, 이로써 상기 치료적 폴리펩타이드의 발현 수준을 기저 수준 대비 5% 이상으로 증가시키며, 이러한 증가는 1달 이상 유지된다. 다른 예에서, 상기 치료적 폴리펩타이드의 발현율은 기저 수준 대비 5% 이상으로 증가하며, 이러한 증가는 6달 이상 유지된다.

[0013] 다른 예에서, 본 발명은 유전자 변형된 미세-장기를 포함하는 장기 지속형 치료 제형을 제공하며, 상기 미세-장기는 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하며, 상기 핵산 서열은 치료적 폴리펩타이드를 코딩하며, 이로써 상기 치료적 폴리펩타이드의 발현 수준은 기저 수준 대비 5% 이상으로 증가되며, 이러한 증가는 1달 이상 유지되고, 상기 벡터는 헬퍼-의존성 아데노바이러스 벡터이다.

[0014] 다른 예에서, 본 발명은 유전자 변형된 미세-장기를 포함하는 장기 지속형 치료 제형을 제공하며, 상기 미세-장기는 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하며, 상기 핵산 서열은 치료적 폴리펩타이드를 코딩하며, 이로써 상기 치료적 폴리펩타이드의 발현 수준은 기저 수준 대비 5% 이상으로 증가되며, 이러한 증가는 면역부합(immunocompetent) 숙주에서 1달 이상 유지된다.

[0015] 다른 예에서, 본 발명은 유전자 변형된 미세-장기를 포함하는 장기 지속형 치료 제형을 제공하며, 상기 미세-장기는 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하며, 이로써 상기 치료적 핵산의 발현 수준은 기저 수준 대비 5% 이상으로 증가된다. 일 예에서, 상기 치료적 핵산의 발현 수준은 면역부합(immuno-competant) 숙주에서 기저 수준 대비 5% 이상으로 증가되며, 다른 예로, 상기 벡터는 헬퍼-의존

성 아데노바이러스 벡터이다.

[0016] 일 예로, 본 발명은 유전자 변형된 미세-장기를 포함하는, 장기 지속형 치료 제형과 이의 이용 방법을 제공한다. 일 예에서, "미세-장기"라는 용어는 본원에서, 일 예로, 세포 생존과 기능에 도움이 되는 방식으로 제조되어진, 이식편으로부터 유래되거나 또는 이와 상동한, 분리된 조직 또는 장기 구조물을 의미한다. 일 예에서, 미세-장기는 적어도 일부 생체내 구조물에서 유지되며, 또는 다른 예로 이를 수득한 조직이나 장기와 유사하게 상호작용한다. 다른 예에서, 미세-장기는 유래된 조직이나 장기의 미세-구조(micro-architecture)와 3차 구조를 유지하고 있으며, 영양분 부족 및/또는 폐기물의 축적으로 인한 세포 독성과 수반되는 세포 사멸을 최소화하기 위해, 미세-장기내에서 적절한 영양분과 가스의 세포로의 확산이 가능하고 미세-장기의 세포 외부로 세포 폐기물을 확산시킬 수 있도록 선택된 구조를 가지고 있다. 일 예에서, 미세-장기는 진피 조직 조각(sliver)이다.

[0017] 일 예에서, 미세-장기는 1-2 mm 직경에 30-40 mm 길이이다. 다른 예에서, 미세-장기의 직경은, 예컨대 1-3 mm, 1-4 mm, 2-4 mm, 0.5-3.5 mm, 또는 1.5-10 mm일 수 있다. 다른 예에서, 미세-장기의 직경은, 예컨대 약 2 mm 또는 약 1.5 mm일 수 있다. 다른 예에서, 미세-장기의 길이는 5-100 mm, 10-60 mm, 20-60 mm, 20-50 mm, 20-40 mm, 20-100 mm, 30-100 mm, 40-100 mm, 50-100 mm, 60-100 mm, 70-100 mm, 80-100 mm, 또는 90-100 mm일 수 있다. 다른 예에서, 미세-장기의 길이는 약20 mm, 약 30 mm, 약 40 mm 또는 약 50 mm일 수 있다. 일 예에서, 미세-장기는 1.5 cm^2 보다 작고, 다른 예로, 1 cm^2 보다 작다. 다른 예에서, 직경은 1.5 cm 미만이고, 다른 예로, 길이는 1.5 cm 미만이다.

[0018] 일 예에서, 미세-장기는 이식편(explant)이다. 일 예에서, 미세-장기는 조직 유래의 것이다. 다른 예에서, 미세-장기는 조직의 단편, 일부 또는 한 부분이다. 다른 예에서, 미세-장기는 장기의 단편, 일부 또는 한 부분이다. 미세-장기는, 일 예로, 생체내 및 시험관내에서 장기간 생존하도록 특수 고안되었다는 점에서, 다른 예로, 이의 구조는 미세-장기내에서 적절한 영양분과 가스가 세포로 확산가능하고 미세-장기의 세포 외부로 세포 폐기물을 확산시킬 수 있도록 특수하게 선택되어, 일 예로, 영양분 부족 및/또는 폐기물의 축적으로 인한 세포 독성과 수반되는 세포 사멸을 최소화한다는 점에서, 피부 그래프트(graft)와는 구분될 수 있다. 따라서, 일 예에서, 미세-장기는 피부 그래프트가 아니다. 다른 예에서, 미세-장기는, 일 예로, 천연 또는 인공 스캐폴드에서 생장시킨 분리된 세포 수집물과는, 이들이 유래된 조직이나 장기의 미세-구조 및 3차 구조를 유지하고 있다는 점에서, 구분될 수 있다. 따라서, 일 예에서, 미세-장기는 스캐폴드에서 성장한 1종 이상의 세포 타입이 아니다.

[0019] 미세-장기에 대한 상세한 내용은 US-2003-0152562에서 볼 수 있으며, 이 문헌은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0020] 이전 특허들(WO 03/006669, WO 03/03585, WO 04/0993631, 이들은 원용에 의해 본 명세서에 포함됨)에는 미세-장기가 기술되어 있는데, 이는 대상 유전자 산물을 발현하도록 변형될 수 있으며, 장기간 자율 기능 상태로 체외에서 유지될 수 있으며, 이후 질병 또는 장애를 치료할 목적으로 체내에 피하 또는 다른 위치로 이식될 수 있다. 그러나, 본 발명의 미세-장기는 예상치도 못하게도 시험관내 및 생체내에서 대상 유전자 산물을 훨씬 오랫동안 발현하는 프로파일을 보였다.

[0021] 본원에서, "이식편(explant)"이라는 용어는 유기체의 본래의 증식하는 부위에서 적출되어, 일정 기간 동안 배양 배지에 있게 된, 조직, 장기 또는 일부분을 의미한다. 일 예에서, 조직 또는 장기는 살아있는 것이며, 다른 예로, 대사 활성형이거나, 이러한 두가지의 조합 형태이다.

[0022] 본원에서, "미세구조"라는 용어는 일 예에서 조직 이식편의 세포의 일부나 세포 전체가 생체내에서 물리적 및/또는 기능적으로 접촉하고 있는 한가지 이상의 세포 또는 비세포성 물질과 시험관내에서 물리적 및/또는 기능적으로 접촉을 유지하고 있는 이식편의 특징을 나타낸다.

[0023] 다른 예에서, 미세-장기 이식편은 이들이 유래된 조직이나 장기의 3차 구조를 유지한다. 일 예에서, 미세-장기 이식편은 공간적 상호작용, 예컨대, 세포-세포, 세포-매트릭스(matrix) 및 세포-기질(cell-stromal) 상호작용과, 이들이 유래된 조직의 방향성(orientation)을 보유하고 있다. 일 예에서, 전술한 바와 같은 공간적 상호작용의 보존은 자가분비 인자(autocrine factor)와 측분비 인자(paracrine factor)의 분비와 그외 세포 외 자극 등의 이식편의 생물학적 기능을 유지시켜주며, 일 예로, 이식편에 장기간의 생존성을 부여한다. 일 예에서, 미세-장기 이식편의 세포들 중 일부 세포들은 생체내에서 물리적 및/또는 기능적으로 접촉하고 있는 하나 이상의 세포 또는 비세포성 물질과 시험관내에서 물리적 및/또는 기능적 접촉을 유지하고 있다. 일 예에서, 일

부 세포는 세포 집단의 적어도 약 50%, 다른 예로, 약 60% 이상, 다른 예로, 약 70% 이상, 다른 예로, 약 80% 이상, 및 다른 예로, 약 90% 이상이다. 다른 예에서, 이식편의 세포는 이들이 분리된 장기나 조직의 한가지 이상의 생물학적 활성을 유지한다.

[0024] 일부 예에서, 본 발명의 제형들 중 어떤 제형도 유전자 변형된 미세-장기를 다른 형태나 전술한 바와 같은 예로 포함할 것이다. 일부 예에서, 본 발명의 제형들 중 어떤 제형도 다른 형태나 전술한 바와 같은 예로 유전자 변형된 미세-장기로 구성될 것이다. 일부 예에서, 본 발명의 조성물 중 어떤 조성물도 다른 형태나 전술한 바와 같은 예로 유전자 변형된 미세-장기로 필수적으로 구성될 것이다. 일부 예에서, "포함한다"라는 용어는 유전자 변형된 미세-장기 등의 지칭된 활성 물질 뿐만 아니라 그외 활성 물질과 약학 산업 분야에 공지된 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 에몰리언트, 안정화제 등의 함유를 의미한다. 일부 예에서, "필수적으로 구성되는"이라는 표현은 조성물의 유일한 활성 성분이 표시되어 있는 활성 성분인 조성물에 대해 지칭되며, 그러나 제형에는 안정화, 보존하는 등의 그외 화합물이 포함될 수 있지만 표시되어 있는 활성 성분의 치료 효과에 직접 관여하진 않는다. 일부 예에서, "필수적으로 구성되는"이라는 표현은 활성 성분의 분비를 촉진시키는 성분에 대해 사용될 수 있다. 일부 예에서, "구성되는"이라는 표현은 활성 성분과 약제학적으로 허용가능한 담체나 부형제를 포함하는 조성물에 대해 사용된다.

[0025] 유사하게, 일부 예에서, 본 발명의 방법에 사용하는 벡터 및 사용하기 위한 벡터는 한가지 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함하며, 상기 핵산 서열은 치료적 폴리펩타이드를 코딩한다. 다른 예에서, 벡터는 이러한 핵산 서열로 필수적으로 구성되며, 다른 예에서, 벡터는 이러한 핵산 서열로 구성된다.

[0026] 미세-장기를 분리할 수 있는 포유류의 예로는 인간과 그외 영장류들, 전체적 또는 부분적 근교계(wholly or partially inbred) 돼지,(예, 미니어쳐 돼지 및 형질전환 돼지) 등의 돼지, 설치류 등을 포함한다. 미세-장기는 다양한 장기로부터 유래된 조직으로부터 가공될 수 있으며, 일 예로, 피부, 진피, 림프계, 췌장, 간, 담낭, 신장, 소화관, 호흡기, 생식계, 배뇨관, 혈액, 방광, 각막, 전립선, 골수, 흉선, 비강 또는 이들의 조합을 들 수 있다. 이들 장기로부터 유래된 이식편은 이식편이 수득되는 장기의 미세구조와 동일한 미세구조로 정렬된, 랑게르한스 섬 세포, 모낭, 선(gland), 상피 및 연결 조직 세포, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일 예에서, 이식편이 수득되는 장기의 미세구조는 당업계에 공지된 물질, 장치 및/또는 방법을 이용하여 미세-장기 이식편으로부터 확인하거나 또는 식별할 수 있다.

[0027] 일 예에서, 본 발명은 유전자 변형된 미세-장기를 포함하는 제형 및 이의 이용 방법을 제공한다. 일 예에서, 용어 "유전자 변형된 미세-장기" 또는 "GMMO"는 한가지 이상의 재조합 유전자 산물을 발현하는 미세-장기를 의미한다. 다른 예에서, 미세-장기에 대한 언급이 반드시 유전자 변형되지 않은 미세-장기를 의미하는 것은 아니지만, 당업계에서 자명한 바와 같이 일부 예로 유전자 변형된 미세-장기를 의미할 수도 있다. 일 예에서, "유전자 산물"이라는 표현은 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드 및 기능성 RNA 분자를 의미한다. 일 예에서, 핵산 분자에 의해 코딩되는 유전자 산물은 개체에게 적용하기 원하는 유전자 산물이다. 이러한 유전자 산물의 예로는, 수여 개체의 세포에서 정상적으로 생산되는, 단백질, 펩타이드, 당단백질 및 지단백질이다. 일 예에서, 유전자 산물은 미세-장기를 회수한 유기체 및/또는 GMMO가 이식되는 유기체에서 자연적으로 형성되지 않으며, 다른 예로, 유전자 산물은 자연적으로 형성된다. 일 예에서, GMMO의 유전자 산물은 미세-장기의 하나 이상의 세포에 의해 내인적으로 발현되는 유전자 산물과 비슷하거나 상동하다. 일 예에서, 유전자 변형은 유전자 변형되지 않은 미세-장기에서 생산되는 유전자 산물의 양(level)을 증가시킨다. 다른 예에서, GMMO에 의해 발현되는 유전자 산물은 미세-장기의 하나 이상의 세포에 의해 내인적으로 발현되는 유전자 산물과 비슷하지 않거나 상동하지 않다. 다른 예에서, 핵산 분자에 의해 코딩되는 유전자 산물은 대상 유전자의 발현을 직접 또는 간접적으로 조절하는 분자를 코딩한다. 다른 예에서, 핵산 분자에 의해 코딩되는 유전자 산물은 개체에 적용되는 원하는 유전자 산물의 발현 수준을 상향 또는 하향 조절한다.

[0028] 다른 예에서, 미세-장기의 유전자 변형은 내인성 유전자의 발현 프로파일을 변형시킬 수 있다. 이는, 예컨대 내인성 유전자의 발현을 조절하기 위한 인핸서나 또는 억제성 또는 유도성 조절 인자의 도입에 의해 달성될 수 있다.

[0029] 미세-장기 이식편을 유전자 변형하는데 당업계에 공지된 모든 방법을 이용할 수 있다. 다양한 여러가지 벡터들 중 어떤 한가지, 예컨대 당업계에 공지된 바와 같이 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 선형 DNA 등을 이용하여, 치료 물질을 코딩하는 외인성 핵산 단편을 타겟 세포 및/또는 조직에 도입할 수 있다. 이러한 벡터는, 예컨대 감염, 형질전이, 형질감염, 칼슘-인산 매개 형질감염, DEAE-덱스트란 매개 형질감염, 전기천공, 리포좀-매개 형질감염, 바이올리스틱 유전자 전달(biolistic gene delivery), 융합성 리포좀(fusogenic liposome) 및 음이온

성 리포좀(다른 방법으로 양이온성 리포좀을 이용함)을 이용한 리포좀에 의한 유전자 전달, 직접 주입, 리포터-매개 흡수(receptor-mediated uptake), 마그네토포레이션(magnetoporation), 초음파 또는 이의 임의 조합, 뿐만 아니라 당업계에 공지된 다른 기법(자세한 내용은, 예컨대 "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989) and in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Sambrook et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), 또는 그외 표준 실험 매뉴얼 참조)으로 삽입될 수 있다. 대상 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 세그먼트는 포유류 세포에 형질전이하고 형질전이된 세포내에서 재조합 산물을 발현시키기에 적합한 발현 벡터 시스템에 삽입될 수 있다. 외인성 핵산 단편의 도입은, 미세-장기 주변으로 벡터를 도입함으로써 달성된다. 외인성 핵산 단편이 전술한 기법이나 당업계에 공지된 기법들 중 임의 기법을 이용하여 세포에 통합되면, 상기 핵산 단편에 코딩된 치료 물질의 생산율 및/또는 분비율을 정량화할 수 있다. 일 예에서, "외인성"은 외부로부터 기원하는 기질, 예컨대 세포나 조직 외부로부터 기원된 핵산을 지칭한다.

[0030] 일 예에서, 본 발명의 미세-장기 제형 및 방법은 일 예로 재조합 유전자 발현을 용이하게 하는 벡터를 포함한다. 일 예에서, 벡터는 비바이러스 벡터(예, DNA 플라스미드나 미니서클 DNA), "gutless(내재 유전자가 거의 제거된 것)", 즉 내인성 유전자가 없는 바이러스 벡터(일 예로, 삭제로 인한 것이거나, 다른 예로 유전자 발현을 방해하는 유전자에 삽입, 치환 또는 삭제로 인한 것임), 헬퍼-의존성 아데노바이러스(HDAd) 벡터, 또는 아데노 부속 바이러스 AAV(일 예로, 단일 가닥이거나, 다른 예로 이중 가닥임) 등의 비면역원성 유전자 전달 물질(non-immunogenic gene transfer agent)이다. 다른 예에서, 상기 제형은 재조합 유전자 발현으로 미세-장기에 의한 유전자 산물의 면역-매개 거부 반응이나 독성이 형성되지 않도록 선택된다. 일 예에서, 벡터는 바이러스로부터 유래되며, 다른 예로, 벡터는 플라스미드이다. 일 예에서, 바이러스 유래 벡터는 아데노바이러스 유래이며, 일 예로, 헬퍼-의존성 아데노바이러스 유래이며, 다른 예로 바이러스 유래 벡터는 후술되는 바와 같이 아데노바이러스 부속 벡터로부터 유래된다.

[0031] 일 예에서, "벡터" 또는 "발현 벡터"라는 용어는 핵산 서열을 복제될 수 있는 세포에 도입하기 위해 삽입될 수 있는 운반체 분자이다. 일 예에서, 핵산 분자는 RNA로 전사되며, 일부 경우에는, 그런 후 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드로 번역된다. 그외 경우, RNA 서열은 예컨대 안티센스 분자나 리보자임으로 생산되도록 번역되지 않는다. 일 예에서, 발현 벡터는 특정 숙주 세포에서 작동가능하게 연결되어 있는 코딩 서열의 전사와 가능하다면 번역에 필요한 핵산 서열을 의미하는 다양한 "조절 서열"을 포함할 수 있다. 다른 예에서, 벡터는 복제 오리진(origin)을 더 포함한다. 일 예에서, 벡터는 원핵 세포와 진핵 세포 둘다에서 증식될 수 있는 셔틀 벡터일 수 있으며, 또는 다른 예로, 벡터는 선택한 유기체의 게놈내로 이의 통합을 용이하게 하도록 구축될 수 있다. 벡터는, 다른 예로, 예컨대 플라스미드, 벡스미드, 파지미드, 코스미드, 파지, 바이러스 또는 인공 크로모좀일 수 있다. 일 예에서, 벡터는 일 예로 박테리오파지, 포유류 바이러스 또는 식물 바이러스일 수 있는 바이러스 벡터이다.

[0032] 일 예에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터이다. 다른 예에서, 아데노바이러스는 모든 공지된 혈청형 또는 서브그룹의 바이러스일 수 있다.

[0033] 일 예에서, 유전자 전달 벡터로서 아데노바이러스 벡터를 이용할 경우 몇가지 이점은, 이의 적당한 크기의 게놈, 용이한 조작성, 고역가, 광범위한 타겟 세포 범위 및 높은 감염성이다. 아데노바이러스 게놈의 양 말단은 100-200개의 염기쌍으로 이루어진 인버티드 반복(ITR)을 포함하며, 이것은 바이러스 DNA 복제 및 패키징에 필요한 cis 요소들이다. 게놈의 초기(E) 및 후기(L) 영역은 바이러스 DNA 복제 개시에 의해 분할되는 여러가지 전사 유닛들을 포함하고 있다. E1 영역(E1A 및 E1B)은 바이러스 게놈과 수개의 세포 유전자의 전사 조절을 담당하는 단백질을 코딩하고 있다. E2 영역(E2A 및 E2B)의 발현시 바이러스 DNA 복제용 단백질이 합성된다. 이들 단백질들은 DNA 복제, 후기 유전자 발현 및 숙주 세포 셧-오프(shut-off)에 참여한다. 대부분의 바이러스 캡시드 단백질 등의 후기 유전자의 산물은, 주 후기 프로모터(MLP)에 의해 형성된 단일 1차 전사체의 유의한 가공이 이루어진 후에만, 발현된다. MLP(16.8 m.u.에 위치함)는 특히 감염 후기에 효과를 발휘하며, 이 프로모터로부터 형성된 모든 mRNA는 이를 번역에 선호적인 mRNA로 만드는 5'-삼중 리더(TPL: tripartite leader) 서열을 가지고 있다.

[0034] 다른 예에서, 아데노바이러스 벡터는 헬퍼-의존성 아데노바이러스 벡터이고, 다른 예로, gutless 아데노바이러스, 파괴된(gutted) 아데노바이러스, 미니 아데노바이러스, 완전히 제거된 아데노바이러스, 고효능의 아데노바이러스, Δ, 또는 슈도(pseudo) 아데노바이러스와 동의어이며, 다른 예로 DNA 복제를 뒷바침하는, 일 예로 아데노바이러스의 인버티드 말단 반복과 패키징 서열(ψ)을 포함하는 서열을 제외한 모든 바이러스 코딩 서열이 제거된 것이다. 다른 예에서, 헬퍼-의존성 아데노바이러스는 바이러스 단백질을 발현하지 않는다. 일 예에서,

헬퍼-의존성 아데노바이러스 벡터는 벡터 DNA를 복제하고 패키징하는데 필요한 아데노바이러스의 cis-작용 요소들만을 포함하고 있다. 일 예에서, 헬퍼-의존성 아데노바이러스 벡터는 야생형 아데노바이러스 서열 중 약 500 bp를 포함한다. 다른 예에서, 아데노바이러스 벡터는 게놈 크기 27.2 kb에 대한 최소 요건을 만족시키기 위해 stuffer DNA를 부가적으로 포함하는데, 이는 일 예로 아데노바이러스 캡시드로의 효율적인 패키징에 필요하다. 일 예에서, 최소 반복 서열과 함께 비코딩 포유류 DNA가 stuffer DNA로 사용된다. 다른 예로, stuffer DNA는 포유류를 제외한 유기체의 DNA를 포함하며, 일 예로 HPRT 및/또는 C346 코스미드 서열이 있다.

[0035] 일 예에서, 헬퍼-의존성 아데노바이러스는 생체내 고효율의 형질전이, 일 예로 잔류 바이러스 단백질의 발현으로 인한 장기적인 독성을 회피함으로써 장기적으로 트랜스유전자 발현을 유지시킬 수 있는 높은 수준의 트랜스유전자 발현, 또는 이의 조합을 보인다. 다른 예에서, 헬퍼-의존성 아데노바이러스는 고역가 생산, 다양한 범위의 세포 타입의 효과적인 감염, 분열성 및 비분열성 세포에 대한 감염력, 또는 이들의 조합 능력을 가지고 있다. 다른 예에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 헬퍼-의존성 아데노바이러스는 이식된 미세-장기에 대해 강력한 후천적 면역 반응을 유도하지 않으며, 일 예로, 상기 후천적 면역 반응은 면역부합 숙주에서 아데노-특이적인 MHC 클래스 I 제한성 CD8 세포독성 T 림프구(CTL)의 생성이 특징적이며, 일 예로 이는 트랜스유전자 발현의 지속 기간을 제한하게 되며, 다른 예로, 수주내에 아데노바이러스 벡터는 소거될 것이다. 다른 예에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 헬퍼-의존성 아데노바이러스는 세포독성 T 세포를 높은 수준으로 유도하지 않으며(이는 당업계에 공지된 바와 같이 양성 CD8 염색에 의해 일예로 측정될 수 있음), 다른 예로 헬퍼 T 세포 수준을 높은 수준으로 유도하지 않는다(이는 당업계에 공지된 바와 같이 양성 CD4 염색에 의해 일예로 측정될 수 있음)

[0036] 다른 예에서, 헬퍼-의존성 아데노바이러스는 벡터의 게놈이 숙주 세포의 염색체로 삽입되지 않기 때문에 생식세포 전달 및 온코진 형질전환을 초래할 수 있는 삽입성 돌연변이 유발 위험성이 보다 낮다. 일 예에서, 헬퍼-의존성 아데노바이러스의 클로닝 능력은 매우 커(약 37 kb, 일 예로 약 36 kb), 전체 게놈 위치, 다수 트랜스유전자 및 큰 cis-작용성 요소들의 전달이 가능하여, 트랜스유전자의 발현을 강화, 연장 및 조절할 수 있다.

[0037] 일 예에서, 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기 위한 헬퍼-의존성 아데노바이러스 시스템은 Palmer 및 Ng, 2003 (Mol Ther 8:846)과 Palmer 및 Ng, 2004 (Mol Ther 10:792)에 언급된 사항과 비슷하며, 상기 문헌들은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 일 예에서, 헬퍼 아데노바이러스와 헬퍼-의존성 아데노바이러스 사이의 재조합을 최소화하여 복제 컴피턴트 아데노바이러스를 제조하기 위해, 헬퍼-의존성 아데노바이러스 시스템의 헬퍼 바이러스 구성 성분 중 E3 영역에 stuffer 서열이 삽입된다.

[0038] 일 예에서, 헬퍼-의존성 아데노바이러스 벡터를 포함하는 본 발명의 제형은 EP 및 IFN-α의 장기간, 시험관내(도 1,2 및 6B) 및 생체내(도 6A)에서 높은 발현 수준을 보인다. 다른 예에서, 헬퍼-의존성 아데노바이러스 벡터를 포함하는 본 발명의 제형은 형질전이 후 적어도 100일 동안 아데노바이러스-5를 포함하는 미세-장기에 비해 증가된 EPO 피크 발현율을 보인다. 이론에 결부되지 않으며, 본 발명의 미세-장기로부터의 장기간 지속적인 고수준의 유전자 산물에 기여할 수 있는 한가지 인자는, 본 발명의 제형내에서 비면역원성이며 조직에 무독성인, 헬퍼-의존성 아데노바이러스 벡터를 사용하는 것이다.

[0039] 다른 예에서, 아데노바이러스 벡터는 E1이 삭제된 것으며, 다른 예로, 아데노바이러스 벡터는 추가적으로 E2, E3, E4, 또는 이의 조합이 삭제된 것이다.

[0040] 다른 예에서, 바이러스 벡터는 아데노 부속 바이러스 벡터(AAV)이다. 일 예에서, AAV는 아데노바이러스 스톡의 오염원으로 발견된 파르보바이러스이다. 이는 어떠한 질병과와 관련이 없는 도처에 존재하는 바이러스(미국 인구의 85%에 항체가 있음)이다. 또한, 이는 이의 복제가 아데노바이러스 등의 헬퍼 바이러스의 존재에 의존되기 때문에 의존형 바이러스(dependovirus)로 분류된다. 적어도 9가지의 혈청형이 분리되었고, 이중 AAV-2가 가장 잘 특정화되어 있다. AAV는 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3에 단일가닥의 선형 DNA가 캡슐화된 직경 20 - 24 nm의 정이십면체 비리온을 형성하고 있다.

[0041] 일 예에서, AAV DNA는 약 4.7 kb 길이이다. 일 예에서, AAV DNA에는 2개의 오픈 리딩 프레임이 있으며, 측면에 2개의 ITR이 있다. AAV 게놈에서 중요한 2개의 유전자, rep 및 cap이 있다. rep 유전자는 바이러스 복제를 담당하는 단백질들을 코딩하며, cap는 캡시드 단백질 VP1-3을 코딩하고 있다. 각 ITR은 T형의 헤어핀 구조를 형성하고 있다. 이들 말단 반복부는 염색체 삽입에 있어 유일하게 필요한 cis 성분이다. 따라서, 일 예로, AAV는 바이러스의 모든 코딩 서열이 제거된 것으로, 전달용 유전자 카세트로 치환된 벡터로서 사용할 수 있다.

[0042] 일 예에서, 발현 벡터로서 재조합 AAV(rAAV)를 이용하는 경우, 벡터는 AAV 게놈의 6%에 불과한 145 bp의 ITR을

포함하며, 일 예로, 4.5 kb DNA 삽입을 조립하기 위한 공간이 벡터에 남아 있다.

[0043] 일 예에서, AAV는 병원성이 아니며 어떠한 질병과도 관련없는 안전한 것이다. 바이러스 코딩 서열의 제거로 바이러스 유전자 발현에 대한 면역 반응을 최소화하므로, 따라서, rAAV는 만약에 있다하더라도 최소한의 염역 반응만을 불러일으킬 뿐이다. 다른 예에서, AAV 벡터는 이중가닥이며, 다른 예로, AAV 벡터는 자가-상보적(self-complementary)이며, 일 예로 바이러스의 제2 DNA 가닥 합성 필요성이 없으며, 일 예로 초기 트랜스유전자를 발현시킨다.

[0044] 다른 예에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터이다. 레트로바이러스는 감염된 세포에서 역전사 과정에 의해 자신의 RNA를 이중가닥 DNA로 변환시킬 수 있는 능력이 특징인 단일가닥 RNA 바이러스의 일종이다. 만들어진 DNA는 프로바이러스로서 세포 염색체에 안정적으로 삽입되어 바이러스 단백질 합성을 지시한다. 삽입으로 인해 수여체 세포와 이의 자손에서 바이러스 유전자 서열이 유지되게 된다. 레트로바이러스 게놈에는 캡시드 단백질, 중합효소 및 엔벨로프 성분 각각을 코딩하는 3개의 유전자, gag, pol, 및 env가 있다. gag 유전자의 상류에서 발견된 서열에는 게놈이 비리온으로 패키징하는 신호가 포함되어 있다. 2개의 긴 말단 반복(LTR) 서열은 바이러스 게놈의 5' 및 3' 끝에 존재한다. 이들은 강력한 프로모터 및 인핸서 서열을 포함하고 있으며, 또는 숙주 세포 게놈에 삽입하는데 필요하다.

[0045] 일 예서 레트로바이러스 벡터를 구축하기 위해, 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 대상 서열을 코딩하는 핵산을 특정 바이러스 서열 대신 바이러스 게놈에 삽입하여, 복제-불능 바이러스를 제조한다. 비리온을 형성하기 위해, gag, pol 및 env 유전자를 포함하지만 LTR과 패키징 성분은 없는 패키징 세포주를 구축한다. cDNA를 레트로바이러스의 LTR와 패키징 서열과 함께 포함하고 있는 재조합 플라스미드가 이 세포주에 (예, 칼슘 포스페이트 침전에 의해) 도입되었을 때, 패키징 서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체가 바이러스 입자로 패키징되게 하고, 그런 후 배양 배지로 분비된다. 재조합 레트로바이러스를 포함하는 배지를 수집하고, 선택적으로 농축하여, 유전자 전달에 사용한다. 레트로바이러스 벡ㅌ는 다양한 세포 타입에 감염될 수 있다. 그러나, 삽입 및 안정적인 발현을 위해서는 숙주 세포의 분열이 요구된다.

[0046] 일 예에서, 바이러스 벡터는 백시니아 바이러스, 렌티바이러스, 폴리오바이러스, 헵파티티스 바이러스, 파필로마 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 시미안 바이러스 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스 등의 바이러스로부터 유래된다.

[0047] 본 발명의 특정 예에서, 핵산 서열을 포함하는 벡터는 네이키드 재조합 DNA나 플라스미드를 포함할 수 있다. 구조체의 전달은 세포막을 물리적 또는 화학적으로 투과시키는 임의 방법에 의해 수행될 수 있다. 일 예에서, 벡터는 미니-서클 DNA이고, 일 예로 박테리아의 복제 오리진과 항생제 내성 마커를 포함하지 않는 비-바이러스 유전자 전달을 위한 슈퍼코일형 DNA 분자이다. 다른 예에서, 미니-서클 DNA는 플라스미드 제조 공정 동안에 유전자 전달 벡터로부터 유래되는 박테리아 조절 영역은 포함하지 않는다. 따라서, 이는 유전자 치료에 사용되는 다른 플라스미드에 비해 더 작고 잠재적으로 더 안전하다. 일 예에서, 미니-서클 DNA는 고수율로 제조되며, 정제하기 간단하며, 강건하고 지속적인 트랜스유전자 발현을 제공한다.

[0048] 표준 재조합 기법을 이용하여 벡터를 구축하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예로, Maniatis, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, 1990) 및 Ausubel, et al., 1994, Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, 1996)을 참조하며, 이들 모두 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0049] 다른 예에서, 벡터는 마커 폴리펩타이드를 코딩하는 이종의 핵산 서열의 삽입을 추가적으로 포함한다. 마커 폴리펩타이드는 예컨대 yECitrine, 그린 형광 단백질(GFP), DS-Red (red fluorescent protein), 분비형 알카리 포스파타제(SEAP), β-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 루시퍼라제, GFP/EGFP, 인간 성장 호르몬 또는 당업계에 공지된 그외 다수의 리포터 단백질을 포함할 수 있다.

[0050] 다른 예에서, 벡터는 하나 이상의 대상 유전자를 포함할 수 있다. 따라서, 일 예로, 본 발명의 벡터는 일 예로 에리트로포이에틴 또는 인터페론 α 2b인 대상 유전자를 포함할 수 있으며, 일 예로 마커를 발현하며, 다른 예로 프레임(frame)내에 마커와 연결되어 있으며, 일 예로, 대상 유전자 산물의 동정이 가능하며, 다른 예로, 미세-장기(들)의 외부 숙주 세포에 의해 내인적으로 제조되는 유사한 유전자 산물과 미세-장기에 의해 제조되는 대상 유전자 산물을 구분가능하게 한다.

[0051] 일 예에서, 본 발명의 치료적 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터는 미세-장기로 도입된다. 본 발명의 방법에 사용되는, 카세트 및/또는 벡터를 세포에 도입하는 당업계에 공지된 다수의 기법들이 있으며, 예컨

대 직접 DNA 수득 기법(direct DNA uptake technique) 및 바이러스, 플라스미드, 선형 DNA 또는 리포좀 매개 형질전이, 수용체 매개 흡수 및 칼슘 포스페이트 매개 및 DEAE-덱스트란 매개 도입 방법을 채용하는 마그네토포레이션 방법, 전기천공 또는 리포좀 매개 형질감염 등이 있지만, 이들로 한정되는 것은 아니다(보다 상세한 사항은, 예컨대 "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F.M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989) and in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Sambrook et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), 또는 다른 표준 실험 매뉴얼을 참조함).

[0052] 일 예에서, 핵산으로 코팅된 입자 충격(bombardment)이 네이키드 DNA 발현 구조체를 세포에 전달하기 위한 방법일 수 있다. 이러한 방법은 DNA-코팅된 미세-추진체가 세포막을 관통하여 세포를 사멸시키지 않으면서 세포에 들어가는 것을 가능하게 하는 높은 속도(velocity)로 가속화하는 능력에 달려있다. 작은 입자를 가속화시키는 장치 몇개가 개발되어 있다. 이러한 장치는 전기 전류를 발생시켜 동력을 제공하는 고전압 방전을 기초로 한다. 사용되는 미세-추진체는 텅스텐이나 금 비드 등의 생물학적으로 무활성이거나 생체적합성 물질로 구성된다. 이러한 임의 방법들을 원하는 서열을 세포에 도입하는데 이용할 수 있는 것으로 이해되어야 하며, 이에 따라 제조되는 세포는은 본 발명의 방법을 실행하는데 있어 이의 용도와 같이 본 발명의 일부로서 간주된다.

[0053] 일 예에서, 본 발명의 제형 및 방법의 벡터는 핵산 서열을 포함한다. 본원에서, "핵산"이라는 용어는 데옥시리보뉴클레산(DNA)와 때에 따라서는 리보뉴클레산(RNA) 또는 이들의 모방체 등과 같은, 올리고뉴클레오타이드나 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 용어는 또한, 등가체로서 RNA 유사체 또는 뉴클레오타이드 유사체로부터 제조된 DNA를 포함하는 것으로 이해되어야 하며, 예로 단일(센스 또는 안티센스) 폴리뉴클레오타이드 및 이중가닥 폴리뉴클레오타이드를 나타내는 것으로 이해된다. 상기 용어는 자연적으로 생성되는 뉴클레오베이스, 당 및 공유 인터뉴클레오사이드(벡본) 결합과 유사하게 기능하는 자연적으로 생성되지 않는 부분을 가지고 있는 올리고뉴클레오타이드로 구성된다. 이러한 변형 또는 치환된 올리뉴클레오타이드는 예컨대 세포 흡수 강화, 핵산 타겟에 대한 친화성 강화 및 뉴클레아제 존재 하에서의 안정성 증가 등의 바람직한 특성으로 인해, 종종 천연 형태 보다 선호되기도 한다.

[0054] 일 예에서, 용어 "핵산" 또는 "올리고뉴클레오타이드"는 원핵 서열, 진핵 생물의 mRNA, 진핵 생물의 mRNA로부터 유래된 cDNA, 진핵(예, 포유류) DNA 유래의 게놈 DNA 서열 및 합성 DNA 서열 등을 비제한적으로 포함할 수 있는 분자를 의미한다.

[0055] 핵산은 당업계에 잘 알려져 있는 재조합 공정이나 합성 공정에 의해 제조할 수 있다. 핵산은 당업계에 공지된 기법에 의해 생물리적 또는 생물학적 특정을 변화시키기 위해 추가적으로 변형될 수 있다. 예로, 핵산은 뉴클레아제에 대한 안정성을 증가시키기 위해(예, "말단-캡핑"), 용해성을 변형시키기 위해, 상보 서열에 대한 결합 친화성을 변형시키기 위해, 변형될 수 있다. 이러한 핵산은 벡터, 발현 카세트, 프로모터 서열, 대상 유전자 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 다른 예에서, 친지성(lipophilicity)이 변형될 수 있으며, 그로 인해 이의 전달에 사용되는 시스템에 변화가 반영될 것이며, 일 예로 이러한 서열이 피부나 또는 이의 임의 층내에 유지되거나 또는 이를 통과하는 것이 바람직하지에 따라 좌우될 것이다. 이러한 고려사항은 기술된 방법 및 시스템에서 본 발명에 사용되는 임의 화합물에 영향을 미칠 수 있다.

[0056] 일 예에서, DNA는 당업계에 공지된 방법에 의해 전체 또는 부분적으로 4개의 뉴클레오타이드로부터 화학 합성할 수 있다. 이러한 방법으로는 Caruthers(1985; Science 230:281-285)에 기술된 방법을 포함한다. 또한, DNA는 중첩성 이중가닥 올리고뉴클레오타이드를 만들고, 갭을 메운 다음 말단들을 연결하여 합성할 수 있다(일반적으로, Sambrook et al. (1989; Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Habour Laboratory Press, New York) 참조). 다른 예에서, 부위 특이적 돌연변이화에 의해 천연형 DNA로부터 불활성 돌연변이를 제조할 수 있다(예, Toiler et al. (1982; DNA. 1984 Dec;3(6):479-88); Zoller (1983); and Zoller (1984; DNA. 1984 Dec;3(6):479-88); McPherson (1991; Directed Mutagenesis: A Practical Approach. Oxford University Press, NY) 참조). 수득되는 DNA는 당업계에 공지된 방법에 의해 증폭시킬 수 있다. 적합한 한가지 방법은 Saiki et al. (1988; Science. 1988 Jan 29;239(4839):487-491), Mullis et al., 미국 특허 4,683,195, and Sambrook et al. (1989)에 기술된 중합효소 연쇄 반응(PCR) 방법이다.

[0057] 구체적인 목적으로 달성하기 위한, 핵산을 변형시키는 방법은, 당업계, 예컨대 Sambrook et al. (1989)에 설명되어 있다. 또한, 본 발명은 핵산 서열은 대상 단백질을 코딩하지 않는 뉴클레오타이드 서열의 한 부분 이상을 포함할 수 있다. 활성, 반감기 또는 이로부터 코딩된 폴리펩타이드의 생산을 강화하기 위해 점 돌연변이나 유도성 변형(삽입, 삭제 및 치환을 포함함)에 의해 초래되는 DNA 서열 변이도, 본 발명에 포함된다.

[0058] 본 발명의 제형은 일 예로 핵산을 포함할 수 있으며, 또는 다른 예로 본 발명의 방법은 핵산이 벡터의 일부분인 상기 핵산의 전달을 포함할 수 있다.

[0059] 특정 발현 벡터 시스템과 세포에 핵산을 도입하는 방법의 효율은 후술된 바와 같이 당업계에서 일반적으로 사용되는 표준 방법에 의해 평가할 수 있다.

[0060] 당업자에게 자명한 바와 같이, 단백질 또는 펩타이드를 코딩하는 핵산 서열이나 유전자의 단편 또는 유도체도 여전히 천연형 전체 유전자 또는 서열과 동일한 방식으로 기능할 수 있다. 이처럼, 핵산 서열의 형태는, 대상 단백질이나 펩타이드를 또는 이의 단편을 코딩하고 있음에도 불구하고, 천연형 서열과 비교하여 변이를 가질 수 있으며, 이러한 변이에도 불구하고 동일한 생물학적 효능을 보이는 천연형 기능을 유지할 수 있다. 이들 각각은 본 발명의 개별적인 구현예이다.

[0061] 일 예에서, 본 발명의 제형 및 방법은 유전자 침묵 적용(gene silencing application)에 사용될 수 있다. 일 예에서, 특정 유전자의 활성이나 기능은 적어도 하나 이상의 뉴클레오타이드로 각각 이루어진 화학적으로 구분되는 2개 이상의 영역을 포함하고 있는, 키메라 분자인, 안티-센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하여, 억제 또는 소실된다.

[0062] 일 예에서, 키메라 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 영역을 포함하며, 상기 올리고뉴클레오타이트는 뉴클레아제 분해에 대한 내성 증가, 세포로의 흡수 증가 및/또는 타겟 폴리뉴클레오타이드에 대한 결합 친화성 증가를 올리고뉴클레오타이드에 부여하기 위해 변형된다. 올리고뉴클레오타이드의 부가적인 영역은 RNA:DNA 또는 RNA:RNA 하이브리드를 절단할 수 있는 효소에 대한 기질로서 제공될 수 있으며, 본 발명의 이러한 측면에서, 특정 서열의 분해를 통한 유전자의 침묵화의 수단으로서 제공될 수 있다. RNA 타겟의 절단은 겔 전기영동이나, 필요하다면 당업계에 공지된 조합된 핵산 혼성화 기법에 의해 통상적으로 검출할 수 있다.

[0063] 키메라 안티센스 올리고뉴클레오타이드는, 당업계에 알려진 바와 같이, 일 예로 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드 및/또는 변형된 올리고뉴클레오타이드의 혼성 구조로서 만들어질 수 있으며(예, 미국 특허 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; and 5,700,922 참조), 다른 예로 리보자임 서열을 포함할 수 있다.

[0064] 다른 예로 유전자 발현의 서열-특이적 저해를 제공하는 소형 간섭 RNA를 이용함으로써, 유전자 발현, 활성 또는 기능의 저해가 수행된다. 유기체에 하나의 유전자에 대응되는 이중가닥/이중 RNA(dsRNA)의 투여는, 영향을 받은 세포에서의 mRNA의 신속한 분해에 의해 특정 유전자의 발현을 침묵화시킬 수 있다. 이러한 과정을 유전자 침묵화라고 하며, dsRNA는 특이적인 RNA 저해자(RNAi)로서 작용한다. RNAi는 내인성 바이러스 및 트랜스포존 활성 등의 천연 소스로부터 유래될 수 있으며, 또는 세포에 미세주입(Fire et al. (1998) Nature 391 : 806-11) 또는 상보적인 RNA나 폴드-벡(fold-back) RNA를 만드는 유전자 구조체나 다른 벡터로 형질전환하여(Waterhouse, P.M., et al. (1998). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13959-13964 and Wang, Z., et al. (2000). J. Biol. Chem. 275, 40174-40179), 인공적으로 도입될 수 있다(Elbashir SM, et al (2001). Nature 411 :494-498). mRNA 분해를 매개하는 RNAi는, 일 예로, 두겹 또는 이중 가닥 RNA를 포함하며, 또는 다른 예로 단일가닥 RNA, 분리된 RNA(부분적으로 정제된 RNA, 본질적으로 순수한 RNA, 합성 RNA, 재조합으로 제조된 RNA) 뿐만 아니라 하나 이상의 뉴클레오타이드의 부가, 삭제 및/또는 변형에 의해 천연적으로 생성되는 RNA와는 상이한 변형된 RNA를 포함한다.

[0065] 일 예에서, 본 발명의 제형 및 방법의 핵산은 치료적 폴리펩타이드를 코딩한다. 일 예에서, 용어 "폴리펩타이드"는 펩타이드(즉, 아미드) 결합에 의해 연결된 아미노산 잔사들로 이루어진 분자를 의미하며, 펩타이드, 폴리펩타이드 및 단백질을 포함한다. 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드는 공유결합으로 연결된 아미노산의 단일 체인 또는 다수개의 체인을 가질 수 있으며, 추가적으로 이황화 결합으로 이루어진 체인간 또는 체인내 연결을 포함할 수 있다. 일 예에서, 또한 어떤 폴리펩타이드는 멀티유닛의 마크로분자 복합체의 서브유닛을 형성할 수 있다. 일 예로, 폴리펩타이드가 구조적 선호성(conformational preference)을 가지고 있으며 3차 구조를 취할 것임을 예상할 수 있다. 구조적 선호성 및 3차 구조 둘다 폴리펩타이드의 1차(즉, 아미노산) 서열 및/또는 이황화 결합이나 또는 공유 또는 비공유성 체인내 또는 체인간 상호작용의 존재로 통상 설명될 것이다.

[0066] 일 예에서, 용어 "펩타이드"는 천연 펩타이드(분해 산물, 합성으로 합성한 펩타이드 또는 재조합 펩타이드 중 어느 하나) 및/또는 펩티드모방체(전형적으로, 합성으로 합성한 펩타이드), 예컨대 체내에서 펩타이드를 더욱 안정적이게 하거나 세포로의 보다 나은 침투력을 부여하는 변형을 가지고 있을 수 있는, 펩타이드의 유사체인 펩토이드와 세미펩토이드를 지칭한다. 이러한 변형으로는, N 말단 변형, C 말단 변형, CH_2-NH, CH_2-S, CH_2-S=O,

O=C-NH, CH_2-O, CH_2-CH_2, S=C-NH, CH=CH 또는 CF=CH, 벡본 변형 및 잔사 변형을 비제한적으로 포함하는 펩타이드 결합 변형을 포함하나, 이로 한정되지 않는다. 펩타이드모방성 화합물의 제조 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예컨대 Quantitative Drug Design, CA. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992)에 구체적으로 기재되어 있으며, 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0067] 펩타이드내 펩타이드 결합(-CO-NH-)은 예컨대 N-메틸화 결합(-N(CH_3)-CO-), 에스테르 결합(-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-), 케토메틸렌 결합(-CO-CH_2-), 아자 결합(-NH-N(R)-CO-)에 의해 치환될 수 있으며, 상기 R은 모든 알킬, 예컨데 메틸, 카르바 결합(-CH_2-NH-), 하이드록시에틸렌 결합(-CH(OH)-CH_2-), 티오아미드 결합(-CS-NH-), 올레핀 이중 결합(-CH=CH-), 레트로 아미드 결합(-NH-CO-), 펩타이드 유도체(-N(R)-CH_2-CO-)이며, 여기에서 R은 탄소 원자에 본래 존제하는 "정상" 측쇄이다. 이러한 변형은 펩타이드 체인에서 어떤 결합에서도 심지어 동시에 여러 곳(2-3)에서 이루어질 수 있다.

[0068] 천연 방향족 아미노산인 Trp, Tyr 및 Phe는 TIC, 나프틸알라닌(Nol), Phe의 고리-메틸화된렌 유도체, Phe의 할로겐화된 유도체 또는 o-메틸-Tyr 등의 합성한 1비천연 산으로 치환될 수 있다. 이외에도, 본 발명의 펩타이드는 하나 이상의 변형된 아미노산이나 하나 이상의 아미노산이 아닌 단량체(예, 지방산, 컴플렉스 탄수화물 등)을 포함할 수 있다.

[0069] 일 예에서, 용어 "아미노산" 또는 "아미노산들"은 20개의 자연적으로 생성되는 아미노산; 예컨대 하이드록시프롤린, 포스포세린 및 포스포트레오닌 등의 생체내에서 종종 번역후 변형된 아미노산; 및 비제한적으로 2-아미노아디프산, 하이드록시라이신, 이소데스모신, 노르발린, 모르-루신 및 오르니틴 등의 그외 특이적인 아미노산을 포함하는 것으로 이해된다. 또한, 용어 "아미노산"은 D- 및 L-아미노산 모두를 포함할 수 있다.

[0070] 본원에서, 용어 "아미노산"은 별도로 특정하게 지정되어 있지 않다면 아미노산의 D 또는 L 스테레오이성체 둘다를 지칭한다. 또한, 예컨대 정제된 천연형 종양 억제자 단백질의 생물학적 활성을 가지고 있는, 등가의 단백질 또는 등가의 펩아티드는 본 발명에 포함되는 것으로 생각된다. "등가의 단백질" 및 "등가의 폴리펩타이드"는 자연적으로 생성되는 단백질이나 폴리펩타이드의 선형 서열로부터 나온 것이지만 생물학적 활성을 변경시키지 않는 아미노산 치환을 가지고 있는 화합물을 의미한다. 이들 등가는 하나 이상의 아미노산을 친계(related) 아미노산, 예컨대 단순히 유사하게 하전된 아미노산으로의 치환에 의해, 또는 측쇄나 기능성 그룹의 치환이나 변형에 의해, 천연 서열과 달라질 수 있다.

[0071] 펩타이드 또는 폴리펩타이드, 또는 이를 코딩하는 DNA 서열은 원핵 또는 진행 생물의 세포 등의 다양한 천연 또는 비천연 자원으로부터 수득할 수 있다. 일 예에서, 자원 세포는 천연형, 재조합 또는 돌연변이일 수 있다. 다른 예에서, 복수의 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 박테리아, 효모 또는 진균 등의 미생물, 바이러스, 동물(포유류, 척추동물, 파충류, 조류 및 곤충이 포함됨), 또는 식물 세포에 내인성일 수 있다.

[0072] 다른 예에서, 펩타이드나 폴리펩타이드는 비리온 입자의 표면 코트, 특정 세포 용해물(lysat), 조직 추출물 등의 보다 특이적인 자원으로부터 수득할 수 있으며, 또는 세포막의 표면에서 발현되는 폴리펩타이드로 제한될 수 있다.

[0073] 다른 예에서, 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 특정 세포나 조직 타입, 발생 단계, 질병 병태나 단계로부터 유래된다. 일 예에서, 질병 상태나 단계는 암이고, 다른 예로, 질병 상태는 감염이고, 다른 예로 HIV 감염이다. 다른 예에서, 질병 상태는 발달 장애이며, 다른 예로 질병 상태는 대사성 장애이다.

[0074] 본 발명의 폴리펩타이드는 어떠한 크기의 것일 수 있다. 예상할 수 있는 바와 같이, 폴리펩타이드는 매우 다양한 분자량을 보일 수 있으며, 일부는 150 - 200 킬로달톤(kD)을 초과할 수 있다. 통상, 폴리펩타이드는 약 5,000 내지 약 100,000 달톤의 분자량 범위를 가질 수 있다. 다르게는 예컨대 약 10,000 - 약 75,000 달톤, 또는 약 20,000 - 약 50,000 달톤의 작은 범위에 포함될 수 있다. 다른 예로, 본 발명의 폴리펩타이드는 1-250 아미노산 잔기 길이일 수 있다. 다른 예로, 본 발명의 폴리펩타이드는 10-200 아미노산 잔기 길이일 수 있다. 다른 예로, 본 발명의 폴리펩타이드는 50-100 아미노산 잔기 길이일 수 있다. 다른 예로, 본 발명의 폴리펩타이드는 1-250 아미노산 잔기 길이일 수 있다. 다른 예로, 본 발명의 폴리펩타이드는 1-250 아미노산 잔기 길이일 수 있다. 일 예로, 펩타이드나 폴리펩타이드의 최대 크기는 발현되는 벡터에 따라 결정되며, 일 예로, 대략 20 - 37 kD, 20 - 25 kD, 25 - 30 kD, 30 - 37 kD, 또는 35 - 37 kD이다. 다른 예로, 폴리펩타이드는 34 kD의 당단백질이다.

[0075] 다른 예에서, 펩타이드나 폴리펩타이드는 작용자이다. 다른 예에서, 펩타이드나 폴리펩타이드는 길항자이다.

다른 예에서, 펩타이드나 폴리펩타이드는 항원이다. 다른 예에서, 펩타이드나 폴리펩타이드는 효소이다. 다른 예에서, 펩타이드나 폴리펩타이드는 효소의 활성자 또는 다른 기질이다. 다른 예에서, 펩타이드나 폴리펩타이드는 효소의 저해자 또는 다른 기질이다. 다른 예에서, 펩타이드나 폴리펩타이드는 호르몬이다. 다른 예에서, 펩타이드나 폴리펩타이드는 조절 단백질이다. 조절 단백질은 유전자의 발현과 복제, 효소의 수행, 세포와 이의 환경 간에 상호 작용, 및 그외 많은 현상을 관리하는, 수많은 상호작용을 지휘한다. 다른 예에서, 펩타이드나 폴리펩타이드는 세포골격 단백질이다. 세포골격 단백질은 세포에 대한 가요성 프래임워크를 형성하며, 기관과 형성된 바디(body)에 대한 접촉 지점을 제공하며, 가능성 있는 세포 부분들 간에 교류를 형성한다. 다른 예에서, 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 톡신이다. 다른 예에서, 본 발명의 치료적 핵산은 하나 이상의 자살 유전자를 코딩한다.

[0076] 다른 예에서, 펩타이드나 폴리펩타이드는 작용자, 길항자, 항원, 효소, 효소 활성자, 효소 저해자, 효소 기질, 호르몬, 조절 단백질, 세포골격 단백질 또는 톡신의 기능성 단편이다. "기능성 단편"은 펩타이드나 폴리펩타이드의 나머지 부분이 심지어 없는 상태에서도 펩타이드나 폴리펩타이드의 한가지 이상의 기능을 수행할 수 있는, 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 한 부분을 나타내는 것이다. 일 예로, 기능성 단편은 대상 타겟과의 분자간 상호작용을 매개하는데 충분하다.

[0077] 다른 예에서, 펩타이드는 DNA, RNA 또는 이의 단편에 결합한다. 일 예로, DNA, RNA 결합성 펩타이드는 당업계에 공지된 수많은 것들 중 어느 하나일 수 있으며, 그 예로는 β-β-α 징크 핑거 단백질, 핵 수용체 단백질, 루프-시트-나선 형의 단백질 및 GAL4 타입의 단백질 등의 징크 핑거 단백질; Cro 및 억제자 단백질, LacI 퓨린 억제자 단백질(PurR), FokI 제한 엔도뉴클레아제(DNA-인지 영역), 감마-델타 재조합효소 단백질(C-말단 도메인), Hin 재조합효소 단백질, Trp 억제자 단백질, 디프테리아 tox 억제자, 이화 분해 산물 유전자 활성자 단백질(CAP: catabolite gene activator protein), 호메오도메인 단백질, RAP1 단백질, Prd 쌍을 이룬 단백질, Tc3 트랜스포자제(transposase) 단백질, TFIIB 패밀리, 인터페론 조절 인자, 전사 인자 패밀리 및 ETS 도메인 패밀리 박테리오파지 등의 나선-턴-나선 단백질; 및 베이직 지퍼 단백질과 지퍼-타입의 단백질(helix-loop-helix) 등의 루신 지퍼 단백질이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 다른 예로, DNA 또는 RNA 결합성 펩타이드는 Cre 재조합효소 패밀리, 파필로마바이러스-1 E2 단백질, 히스톤 패밀리, Ebna1 핵 단백질 패밀리, Skn-1 전사 인자, 고이동성 그룹 패밀리(high mobility group family) 및 MADS 박스 패밀리 등의 다른 α-나선 단백질; TATA 박스-결합 단백질 등의 β-시트 단백질; Met 억제자 단백질, Tus 복제 종결자 단백질, 삽입 숙주 인자 단백질(integration host factor protein), 고온 DNA 결합 단백질, Arc 억제자, 전사인자 T 도메인 등의 β-헤어핀/리본 단백질; 및 Rel 상동성 영역 단백질과 Stat 패밀리 등의 그외 단백질 패밀리일 수 있다. 다른 예에서, DNA 또는 RNA 결합성 펩타이드는 메틸 트랜스퍼라제 단백질, PvuII 엔도뉴클레아제 단백질, 엔도뉴클레아제 V 단백질, EcoRV 엔도뉴클레아제 패밀리, BamHI 엔도뉴클레아제 패밀리, EcoRI 엔도뉴클레아제 패밀리, DNA 미스매치 엔도뉴클레아제, DNA 중합효소I 단백질, DNA 중합효소 T7, Dnase I 단백질, DNA 중합효소 β 단백질, Uraci-DNA 글리코실라제, 메틸아데닌-DNA 글리코실라제, Homing 엔도뉴클레아제, 및 토포이소머라제 I 등의 효소; 또는 HIV 역전사 등의 바이러스 단백질일 수 있다.

[0078] 다른 예에서, 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 전사 또는 번역 활성자이거나 이의 단편이다. 다른 예에서, 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 전사 또는 번역 억제자이거나 또는 이의 단편이다. 다른 예에서, 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 수용체이거나 이의 단편이다.

[0079] 일 예에서, 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 동족(cognate) 펩타이드나, 또는 전술한 펩타이드나 폴리펩타이드 중 어느 것을 의미할 수 있다. "동족" 펩타이드는 다른 분자와 상호작용 및/또는 결합하는 임의의 펩타이드이다.

[0080] 본 발명의 다른 예에서, 재조합 유전자 산물은 대응되는 천연 폴리뉴클레오타이드와 비교하여, 변형된 뉴클레오타이드 서열을 가지고 있는 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩될 수 있다.

[0081] 단백질 외에도, 재조합 유전자 산물은 또한 기능성 RNA 분자를 포함할 수도 있다.

[0082] 본 발명의 다른 예로, 본 발명의 제형 및 방법은 기능성 RNA 분자를 만드는 미세-장기를 제공할 수 있다. 기능성 RNA 분자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열, 본원에 기술된 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 리보자임 및 이에 융합된 리보자임 서열을 포함할 수 있다. 이러한 리보자임은 고상 올리고뉴클레오타이드 합성을 이용하여 쉽게 합성가능하다.

[0083] 리보자임은 대상 단백질을 코딩하는 niRNA의 절단에 의한 유전자 발현의 서열-특이적 저해에 있어 그 사용이 점점 증가하고 있다[Welch et al, "Expression of ribozymes in gene transfer systems to modulate target RNA

levels." Curr Opin Biotechnol. 1998 October; 9(5):486-96]. 어떤 특이적인 타겟 RNA를 자르도록 리보자임을 설계할 수 있는 가능성은, 기초적인 연구와 치료 적용 둘다에서 이를 가치있는 도구가 되게 한다. 치료 영역에서, 리보자임은 감염성 질환, 암에서 우성의 온코진과 유전적 장애에서의 특이적인 상염색체 돌연변이들에서 타겟 바이러스 RNA로 활용되고 있다[Welch et al., "Ribozyme gene therapy for hepatitis C virus infection." Clin Diagn Virol. JuI. 15, 1998; 10(2- 3): 163-71]. 특히, HIV 환자에 대한 몇가지 리보자임 유전자 요법 프로토콜들이 벌써 1상 임상 시험 중에 있다. 최근 들어, 리보자임은 형질전환 동물 연구, 유전자 타겟 검증(validation) 및 경로 파악에 사용되고 있다. 몇가지 리보자임은 다양한 임상 시험 단계에 있다. ANGIOZYME은 인간 임상 시험을 통해 연구되고 있는 화학 합성된 최초의 리보자임이다. ANGIOZYME은 혈관신생 경로에 중요한 성분인 VEGF-r (Vascular Endothelial Growth Factor receptor)의 형성을 특이적으로 저해한다. Ribozyme Pharmaceuticals, Inc. 사와 다른 회사에서, 동물 모델을 통해 항-혈관신생 치료제의 중요성을 입증하였다. HEPTAZYME은 선택적으로 C형 간염 바이러스(HCV) RNA를 파괴하도록 고안된 리보자임으로, 세포 배양 분석에서 C형 간염 바이러스 RNA를 줄이는데 효과적으로 것으로 확인되었다.

[0084] 전술한 바와 같이, 일 예로, 본 발명의 제형 및 방법은 치료적 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 치료 제형을 제공한다. 일 예에서, 용어 "치료"는 필요로하는 개체에게 제공되었을 때 유익한 효과를 제공하는 분자에 대해 사용된다. 일부 경우들에서, 분자는 개체에서 이러한 분자의 부재 또는 감소된 존재를 대체하도록 작용하는, 치료적 분자이다. 일 예에서, 치료 단백질은 필요한 단백질의 내인성 null 또는 미스-센스 돌연변이가 있는 경우와 같이, 개체에 없는 단백질의 치료 단백질이다. 다른 예로, 내인성 단백질은 돌연변이되며, 기능성 단백질의 제시에 의해 상쇄되는 비-기능성 단백질을 생산한다. 다른 예에서, 이종 단백질의 발현은 낮은 내인성 수준에 부가되어, 해당 단백질의 발현이 누적 증가된다. 다른 예로, 분자는 숙주나 세포의 기능 발휘에 중요한 요소의 발현, 분비 또는 그외의 것을 제공하는 시그널링 케스케이드를 자극한다.

[0085] 일 예에서, 용어 "치료 제형"은 질병, 장애, 병태 또는 감염의 진단, 또는 다른 예로 치유, 또는 다른 예로 완화, 또는 다른 예로 치료, 또는 다른 예로 예방 용도로 이용가능한 물질을 의미한다. 일 예로, 본 발명의 "치료 제형"은 적용된 타겟의 구조나 기능에 영향을 주는 임의 물질을 나타낸다.

[0086] 다른 예로, 본 발명의 "치료 제형"은 질병이나 장애를 앓고 있는 개체에 투여하였을 때 증상을 완화시키는 분자이다. 일 예로, 본 발명의 "치료 제형"은 합성 분자, 또는 다른 예로 자연에서 발견되는 소스로부터 분리된 천연 생성 화합물이다.

[0087] 일 예에서, 치료적 폴리펩타이드는 에리트로포이에틴이고, 다른 예로, 치료적 폴리펩타이드는 인터페론 α이고, 일 예로 인터페론 α2b이다. 일 예로, 상기 치료 폴리펩타이드는 다른 임의의 치료적 폴리펩타이드이다.

[0088] 일 예에서, "치료(treatment)"는 치료학적 처리(therapeutic treatment) 및 예방적 처지 둘다를 의미하며, 목적은 전술한 바와 같이 표적화된 병리학적 병태나 장애를 예방하거나 약화시키는 것이다. 따라서, 일 예에서, 치료는 질병, 장애, 병태 또는 이의 조합과 관련있는 증상에 대한 직접적인 영향, 또는 치유, 억제, 저해, 예방, 중증도 감소, 개시 지연, 경감을 포함할 수 있다. 따라서, 일 예로, "치료(treating)"는 특히 진행 지연, 감퇴 촉진, 감퇴 유도, 감퇴 증대, 회복 가속화, 효능 증가 또는 또다른 치료제에 대한 내성 감소, 또는 이의 조합을 지칭한다. 일 예에서, "예방"은 특히 증상의 개시 지연, 질병의 재방 예방, 재발 빈도 감소, 증상 발병 간에 잠복기 증가, 또는 이의 조합을 지칭한다. 일 예에서, "억제" 또는 "저해"는 특히 증강의 중증도 감소, 갑작스러운 발병의 중증도 감소, 증상의 수적 감소, 질병-관련 증상의 발병 감소, 증상의 잠복성 감소, 증상의 완화, 이차 증상의 감소, 이차 감염의 감소, 환자 생존성 연장 또는 이의 조합을 지칭한다.

[0089] 일 예에서, 증상은 일차 증상이며, 다른 예로 이차 증상이다. 일 예에서, "일차"는 특정 질환으로 인한 직접적인 결과인 증상을 의미하고, 또는 일 예로 "이차"는 일차 원인으로부터 유래되거나 그 결과로서 발생되는 증상을 의미한다. 일 예에서, 본 발명에 사용하기 위한 화합물은 상기 질환과 관련있는 일차 또는 이차 증상이나 또는 이차적인 합병증을 치료한다. 다른 예에서, "증상"은 질병이나 병리학적 병태의 어떠한 발현일 수 있다.

[0090] 일 예에서, 치료적 핵산은 일 예로 효소, 효소 조인자, 세포독성 단백질, 항체, 채널 단백질, 트랜스포터 단백질, 성장 인자, 호르몬, 사이토카인, 수용체, 뮤신, 계면활성제, 앱타머 또는 호르몬을 포함할 수 있는, 치료적 폴리펩타이드를 코딩할 수 있다. 다른 예에서, 치료적 폴리펩타이드는 전술한 바와 같이 한가지 이상의 카테고리에 속하는 것일 수 있다. 다른 예에서, 치료적 핵산은 후술되는 바와 같이 기능성 RNA를 코딩할 수 있다.

[0091] 일 예에서, 용어 "항체 또는 항체 단편"은 온전한 항체 분자 뿐만 아니라 에피토프에 결합할 수 있는 Fab, F(ab')2, 및 Fv 등의 이의 기능성 단편을 지칭한다. 일 예에서, Fab 단편은 항체 분자의 일가 항원 결합성 단

편을 포함하고 있는 단편이며, 이는 효소 파파인으로 전 효소를 분해하여 온전한 경쇄와 하나의 중쇄의 일부분을 수득함으로써 제조할 수 있다. 일 예에서, Fab' 단편은 전 효소를 펩신 처리한 다음 환원시켜, 온전한 경쇄와 일부 중쇄를 수득함으로써 제조할 수 있는, 항체 분자의 일부분을 의미한다. 하나의 항체 분자 당 2개의 Fab' 단편을 수득할 수 있다. 일 예에서, (Fab')2는 전 효소를 효소 펩신으로 처리한 다음 이후의 환원 공정 없이 수득할 수 있는 항체 단편을 의미한다. 다른 예에서, F(ab')2는 2개의 이황화 결합에 의해 연결된 2개의 Fab 단편으로 이루어진 이량체이다. 일 예에서, Fv는 경쇄의 가변부와 2개의 체인으로 나타나는 중쇄의 가변부를 포함하고 있는 유전자 조작된 단편을 지칭한다. 일 예에서, 항체 단편은 단쇄 항체("SCA"), 즉 경쇄의 가변부와 중쇄의 가변부를 포함하고 있으며 유전자 융합된 단일쇄 분자로서 적합한 폴리펩타이드 링커에 의해 연결된, 유전자 조작된 분자일 수 있다.

[0092] 이들 단편의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다(예, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988, 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0093] 일 예에서, 항체는 다른 예로 항체의 파라토프(paratope)에 결합하는 항원에 대한 항원성 결정기(antigenic determinant)라고 하는, 에피토프를 인지할 것이다. 에피토프 결정기는, 다른 예로 아미노산이나 탄수화물 측쇄 등의 분자의 화학 활성 표면 그룹핑들로 이루어질 수 있으며, 다른 예로 특이적인 3차 구조 특징을 가질 수 있으며, 및/또는 다른 예로 특이적인 전하 특징을 가질 수 있다.

[0094] 일 예에서, 인지되는 에피토프는 병원체 또는 다른 예로 병원성 세포, 또는 다른 예로 비정상적으로 발현된 단백질로부터 유래되며, 다른 예로, 상기 비정상적으로 발현된 단백질은 발현의 위치, 양 또는 이의 조합을 지칭할 수 있다.

[0095] 항체 단편의 다른 형태는 단일 상보성 결정부(CDR)를 코딩하는 펩타이드이다. CDR 펩타이드("최소 인지 단위")는 대상 항체의 CDR을 코딩하는 유전자를 구축함으로써 수득할 수 있다. 이러한 유전자는, 예컨대 중합효소 연쇄 반응을 이용하여 항체 생산 세포의 RNA로부터 가변부를 합성함으로써 제조된다. 예로, Larrick and Fry, Methods, 2: 106-10, 1991 참조.

[0096] 일 예에서, 항체는 종양치사제(tumoricidal)이며, 즉 특정 암에 대한 치료제이다. 종양치사 활성을 가진 항체는 당업계에 공지되어 있으며, 본 발명의 구현예를 나타낼 수 있는 임의의 사용으로는 IMC-C225, EMD 72000, OvaRex Mab B43.13, 항-강글리오사이드 G(D2) 항체 ch14.18, CO17-1A, trastuzumab, rhuMAb VEGF, sc-321, AF349, BAF349, AF743, BAF743, MAB743, AB1875, Anti-Flt-4AB3127, FLT41-A, rituximab, 2C3, CAMPATH 1H, 2G7, Alpha IR-3, ABX-EGF, MDX-447, anti-p75 IL-2R, anti-p64 IL-2R, 및 2A11을 포함한다.

[0097] 일 예에서, 본 발명의 "치료적 핵산"은 항고혈압제(antihypertensives), 항우울제(antidepressants), 항불안제(antianxiety agent), 항응고제(anticlotting agent), 항경련제(anticonvulsants), 혈중 당강하제(blood glucose-lowering agent), 소염제(decongestants), 항히스타민제(antihistamines), 진해제(antitussive), 항염증제(anti-inflammatory), 항정신제(antipsychotic agent), 인지 강화제(cognitive enhancer), 콜레스테롤 저하제(cholesterol-reducing agent), 항비만제(antiobesity agent), 자가면역 장애제(autoimmune disorder agent), 항-발기부전제(anti-impotence agent), 항세균제, 항진균제, 최면제(hypnotic agent), 항파킨슨제(anti-Parkinsonism agent), 항생제, 항바이러스제, 항종양제(anti-neoplasty), 바르비투레이트(barbituate), 진정제, 영양제, β 차단제, 구토제, 항-구토제, 이뇨제, 항응고제(anticoagulant), 강심제(cardiotonic), 안드로겐, 코르티코이드, 동화제(anabolic agent), 성장 호르몬 분비 촉진제(growth hormone secretagogue), 항감염제, 관상 혈관확장제(coronary vasodilator), 탄산탈수효소 억제제(carbonic anhydrase inhibitor), 항원충제(antiprotozoal), 위장제(gastrointestinal agent), 세로토닌 길항제, 마취제, 혈당강하제(hypoglycemic agent), 도파민제(dopaminergic agent), 항-알츠하이머제(anti-Alzheimer's Disease agent), 항궤양제(anti-ulcer agent), 혈소판 저해제 및 글리코젠 포스포릴라제 저해제를 코딩할 수 있으며, 또는 "치료적 폴리펩타이드"는 전술한 것으로 제공되는 분자일 수 있다.

[0098] 일 예에서, 본 발명의 "치료적 제형"은 항세균, 항바이러스, 항진균 또는 항원충제이다. 다른 예에서, 치료 제형은 세포독성이나 항암 활성을 가진다. 다른 예에서, 치료 제형은 면역자극성이다. 다른 예에서, 치료 제형은 염증이나 면역 반응을 저해한다.

[0099] 일 예에서, 치료적 핵산은 인터페론 또는 인터루킨 등의 사이토카인과 이의 수용체를 코딩하며, 또는 치료적 폴리펩타이드는 인터페론 또는 인터루킨 등의 사이토카인과 이의 수용체일 수 있다. 사이토카인이나 또는 적정한 물질의 발현 결핍은 질병의 감수성과 관련있으며, 발현 강화로 다수의 감염에 대해 내성을 유도할 수 있다. 사

이토카인의 발현 패턴은 예컨대 감염 또는 자가면역 질환에서 Th1 타입 발현 패턴이나 Th2 패턴쪽으로 면역 반응을 편향되게 하는 등과 같은 유익한 효과를 형성하도록 변형될 수 있으며, 변형된 발현 패턴은 숙주에게 유익한 것으로 입증될 수 있다.

[0100] 다른 예에서, 치료적 핵산은 글리코젠의 저장 또는 분해에 관여하는 효소 등의 효소를 코딩하며, 또는 치료적 폴리펩타이드는 상기 효소일 수 있다. 다른 예에서, 치료적 단백질은 이온 트랜스포터, 예컨대 CJK JL1K 또는 글루코스 트랜스포터 또는 이의 결핍이나 부적절한 발현으로 다양한 질환이 발생되는 그외 트랜스포터 등의, 트랜스포터를 포함한다.

[0101] 다른 예에서, 치료적 핵산은 암 관련 현상의 진행을 변경시키는, 종양 억제자 또는 프로-세포자살 화합물을 코딩하며, 또는 치료적 폴리펩타이드는 상기한 종양 억제자 또는 프로-세포자살 화합물이다.

[0102] 다른 예에서, 본 발명의 치료적 핵산은 면역조절성 단백질을 코딩할 수 있으며, 또는 치료적 폴리펩타이드는 상기 면역조절성 단백질일 수 있다. 일 예에서, 면역조절성 단백질은 사이토카인, 케모카인, 보체 또는 구성 성분, 예컨대, 인터루킨 1에서 15, 인터페론 α, β 또는 감마, 종양 괴사 인자, 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 대식세포 콜로니 자극 인자(M-CSF), 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), 호중구 활성화 단백질(NAP) 등의 케모카인, 대식세포 화학유인 및 활성화 인자(MCAF), RANTES, 대식세포 염증 펩타이드 MIP-1a 및 MIP-1b 또는 보체 성분을 포함한다.

[0103] 다른 예에서, 본 발명의 치료적 핵산은 성장 인자 또는 조직-촉진성 인자를 코딩하며, 또는 치료적 폴리펩타이드는 상기 성장 인자 또는 조직-촉진성 인자일 수 있다. 일 예에서, 치료 화합물은 골 구조형성 단백질(bone morphogenetic protein), 또는 OP-1, OP-2, BMP-5, BMP-6, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-9, DPP, Vg-1, 60A, 또는 Vgr-1이다. 다른 예로, 치료적 핵산은 신경 재생 또는 회복을 촉진시키는 RNA나 펩타이드를 코딩하며, NGF 또는 그외 성장 인자를 코딩할 수 있다. 다른 예로, 치료적 폴리펩타이드는 신경 재생 또는 회복을 촉진시키는 RNA나 펩타이드이며, NGF 또는 그외 성장 인자를 포함할 수 있다.

[0104] 다른 예에서, 치료적 핵산은 천연 또는 비천연 인슐린, 아밀라제, 프로테아제, 키나제, 포스파타제, 글리코실트랜스퍼라제, 트립시노겐, 키모트립시노겐, 카르복시펩티다제, 호르몬, 리보뉴클레아제, 데옥시리보뉴클레아제, 트리아실글리세롤 리파제, 포스포리파제 A2, 엘라스타제, 아밀라제, 혈액 응고 인자, UDP 글루쿠로닐 트랜스퍼라제, 오르니틴 트랜스카르바모일라제, 시토크롬 p4502 효소, 아데노신 탈아민효소, 혈청 흉선 인자, 흉전 체액성 인자(thymic humoral factor), 티모포이에틴(thymopoietin), 성장 호르몬, 소마토메딘(somatomedin), 공동자극 인자(costimulatory factor), 항체, 콜로니 자극 인자, 에리트로포이에틴, 상피 성장 인자, 간의 에리트로포이에틴 인자(헤파토포이에틴), 간세포 성장 인자, 인터루킨, 인터페론, 네거티즈 성장 인자, 섬유모세포 성장 인자, α 패밀리의 형질전환성 성장 인자(transforming growth factor), β 패밀리의 형질전환성 성장 인자(transforming growth factor), 게스트린, 세크리틴, 콜레시스토키닌(cholecystokinin), 소마토스타틴, 세로토닌, 물질 P, 전사 인자 또는 이의 조합을 코딩하며, 또는 치료적 폴리펩타이드는 상기한 것일 수 있다.

[0105] 다른 예에서, 유전자는 리포터 유전자이다. 일 예에서, 리포터 유전자는 플루오레센트 단백질을 코딩한다. 일 예에서, 상기 플루오레센트 단백질은 yECitrine 또는 옐로우 플루오레센트 단백질이다. 일 예로, 플루오레센트 단백질은 해파리 그린 플루오레센트 단백질이거나 또는 이의 돌연변이 또는 변이체이다. 다른 예에서, GMMO는 리포터 유전자 또는 리포터 단백질을 코딩하는 유전자 이외의 임의의 유전자를 특이적으로 포함할 수 있다.

[0106] 다른 예에서, 리포터 유전자는 약물 내성을 부여한다. 일 예에서, 리포터 유전자는 당업자에게 자명한 바와 같이, 예컨대 암피실린, 카나마이신, 테트라사이클린 등의 항생제에 대한 내성을 부여한다. 다른 예로, 항생제 내성 유전자는 네오마이신(neo), 블라스티시딘, 스펙티노마이신, 에리트로마이신, 플레오마이신, Tn917, 겐타마이신 및 블레오마이신에 대한 내성을 부여하는 것을 포함할 수 있다. 네오마이신 내성 유전자의 예로는, G418 및 카나마이신을 포함하여, 다양한 항생제에 대한 내성을 부여하는, 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 11을 코딩하는, 트랜스포존 Tn5의 네오마이신 내성 유전자가 있다. 다른 예에서, 리포터는 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제 유전자(cat)이고, 이는 클로람페니콜에 대해 내성을 부여한다.

[0107] 일 예에서, 본 발명의 제형 및 방법은 바이러스 감염, 또는 다른 예로 박테리아, 원충 또는 진균 감염이나 이의 조합의 예방 또는 치료적 개입(therapeutic intervention)이다.

[0108] 본 발명의 이러한 측면에서, 본 발명의 제형 및 방법은 질병의 예방 또는 치료적 개입이다. 일 예에서, 개체에서 치료하고자 하는 질환으로는, 근 위축증, 암, 심혈관 질환, 고혈압, 감염, 신장방, 신경퇴행성 질환, 예컨대

알츠하이머, 파킨슨, 헌팅턴 무도병, 크레츠펠트-야콥병, 자가면역 질환, 예컨대 루푸스 류마티스 관절염, 심내막염, 그레이브 질환 또는 ALD, 호흡기 질환, 예컨대 천식 또는 낭성 섬유증, 골 질환, 예컨대 골다공증, 관절 질환, 간 질환, 피부병, 예컨대 건선 또는 습진, 안 질환, 이비인후과 질환, 그외 신경성 질환, 예컨대 튜렛 증후군, 정신분열증, 우울증, 자폐증 또는 뇌졸증, 또는 대사성 질환, 예컨대 글리코겐 저장 질병 또는 당뇨병이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 제형을 통해 그리고 본 발명의 방법에 따라 달성될 수 있는, 특정 단백질의 발현, 치료 단백질의 제시, 약물의 제시, 특정 단백질의 발현 저해 등에 의한, 모든 질환들은 본 발명의 일부분으로 간주되는 것으로 이해되어야 한다.

[0109] 일 예에서, 본 발명의 제형 및 방법은 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함한다. 일 예에서, 미세-장기의 세포에 도입된 핵산 분자는 핵산에 의해 코딩된 유전자 산물의 세포내 발현에 적합한 형태로 있다. 따라서, 일 예로, 핵산 분자는 유전자의 전사에 필요한 조절 서열(또는 이의 일부)과 코딩 서열을 포함한다. 유전자 산물이 단백질 또는 펩타이드인 경우, 핵산 분자의 번역에 필요한 조절 서열과 코딩 서열을 포함하는 핵산 분자는, 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 코딩된 단백질 또는 펩타이드의 전달에 필요한 서열, 예컨대 단백질 또는 펩타이드를 세포 표면으로 수송 또는 일 예로 분비하기 위한 N-말단 신호 서열을 포함한다.

[0110] 유전자 산물의 발현을 조절하는 뉴클레오타이드 서열(예, 프로모터 및 인핸서 서열)은 유전자 산물이 발현되는 세포 타입과 유전자 산물의 원하는 발현 수준에 따라 선택된다. 예컨대, 프로모터에 연결된 유전자의 세포 타입 특이적인 발현을 부여하는 것으로 공지된 프로모터를 사용할 수 있다. 근원 유전자 발현에 특이적인 프로모터를 대상 유전자에 연결하여, 유전자 산물의 근육 특이적 발현을 부여할 수 있다. 당업계에 공지된 근육 특이적인 조절 요소로는, 디스트로핀(dystrophin) 유전자(Klamut et al., (1989) Mol. Cell Biol.9:2396), 크레아틴 키나제 유전자(Buskin and Hauschka, (1989) Mol. Cell Biol. 9:2627) 및 트로포닌 유전자(Mar and Ordahl, (1988) Proc. Natl. Acad. ScL USA. 85:6404)의 상류 영역을 포함한다. 케라틴 유전자에서 네거티브 반응 요소들은 전사 억제를 매개한다(Jho Sh et al, (2001). J. Biol Chem). 다른 세포 타입에 특이적인 조절 요소들은 당업계에 알려져 있다(예, 간 특이적 발현용 알부민 인핸서; 췌장 섬세포 특이 발현을 위한 인슐린 조절 요소; 신경 디스트로핀, 신경 에놀라제 및 A4 아밀로이드 프로모터 등의 다양한 신경 세포 특이적인 조절 요소). 또는, 다양한 세포 타입들에서 유전자의 구성적인 발현(constitutive expression)을 지시할 수 있는, 바이러스 조절 요소 등의 조절 요소를 사용할 수 있다. 유전자 발현을 추진하기 위해 일반적으로 사용되는 바이러스 프로모터의 예로는, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스 2, 사이토메갈로바이러스(CMV) 및 시미안 바이러스 40으로부터 유래된 프로모터와 레트로바이러스 LTR이 있다. 또는, 이에 연결되어 있는 유전자의 유도성 발현을 제공하는 조절 요소를 사용할 수 있다. 유도성 조절 요소(예, 유도성 프로모터)의 이용은 세포에서 유전자 산물의 생산 조절을 가능하게 한다. 진핵 세포에 이용함에 있어 이용가능성이 있는 유도성 조절 시스템의 예로는 호르모-조절성 요소(예, Mader, S. and White, J. H. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci, USA 90:5603-5607), 합성 리간드-조절성 요소(예, Spencer, D. M. et al 1993) Science 262:1019-1024) 및 이온 방사선(ionizing radiation)-조절성 요소(예, Manome, Y. Et al. (1993) *Biochemistry* 32:10607-10613; Datta, R. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*89:1014-10153)를 포함한다. 개발될 수 있는 부가적인 조직 특이적 또는 유도성 조절 시스템을 본 발명에 따라 사용할 수도 있다.

[0111] 일 예에서, 본 발명의 조절 서열은 CMV 프로모터를 포함하며, 다른 예에서, 조절 서열은 CAG 프로모터를 포함할 수 있다. 일 예에서, CAG 프로모터는 인간 사이토메갈로바이러스 최초기 인핸서와 변형된 닭 β-액틴 프로모터 및 첫번째 인트론이 조합된 복합 프로모터이다. 일 예에서, 조절 서열은 진핵 생물에서 메신저 RNA 대부분의 3' 말단에서 종결되는 기작의, 시미안 바이러스(SV)-40 폴리아데닐화 서열을 포함할 수 있다. 일 예에서, 폴리아데노신(poly-A) 꼬리는 mRNA를 엑소뉴클레아제로부터 보호하며, 전사 종결, 핵에서 mRNA의 방출 및 번역에 중요하다. 다른 예에서, 본 발명의 제형은 하나 이상의 조절 서열을 포함할 수 있다.

[0112] 일 예에서, SV40가 함께 연결된 CMV 또는 CAG 프로모터를 포함하는 본 발명의 제형은 EPO 및 IFN-α를 장기간 시험관내(도 1, 5 및 7B) 및 생체내(도 6A)에서 높은 수준으로 발현하는 것으로 확인되었다. 이론에 결부되지 않고, 본 발명의 미세-장기로부터 유전자 산물의 장기 지속적인 고수준의 발현에 기여할 수 있는 한가지 인자는 CMV의 사용이며, 또는 다른 예로 프로모터로서 CAG를 사용하는 것이며, 이는 구성적인 유전자 발현을 촉진시키는데 미세-장기 이식편에 특히 효과적일 수 있다.

[0113] 일 예에서, 용어 "프로모터"는 DNA 서열을 지칭하며, 일 예로, 코딩 서열의 바로 상류이며, 유전자의 기본 및/또는 조절된 전사에 중요하다. 일 예로, 본 발명의 프로모터는 내인성 프로모터의 돌연변이이며, 이는 적절한

조건하에서 대상 유전자의 발현과 정상적으로 조합되어 있다.

[0114] 일 예에서, 본 발명의 조성물의 프로모터 및 방법에 사용하기 위한 프로모터는 조절가능한 프로모터이다. 다른 예에서, 조절가능한 프로모터는 유전자 하류의 발현이 특정 프로모터로부터 발현을 자극하는 특이적인 조건 형성 또는 제시에 대한 함수로서 이루어지게 하는 프로모터를 지칭한다. 일부 예에서, 이러한 조건은 발현을 직접 작동시키는 결과를 발생시키고, 다른 예로 발현에 대한 장해를 제거한다. 일부 예로, 이러한 조건은 발현의 작동 중지 또는 발현을 감소시킨다.

[0115] 일 예에서, 이러한 조건은 당업자에게 공지된 바와 같이, 특정 온도, 영양, 영양분의 부재, 금속의 존재 또는 그외 자극이나 환경 인자를 포함할 수 있다. 일 예에서, 조절가능한 프로모터는 갈락토스(예, UDP-갈락토스 에피머라제(GAL10), 갈락토키나제(GAL1)), 글루코스(예, 알코올 디하이드로게나제 II(ADH2)), 또는 포스페이트(예, 산 포스파타제(PHO5))에 의해 조절될 수 있다. 다른 예에서, 조절가능한 프로모터는 열 충격(열 충격 프로모터)이나 또는 IPTG 또는 테트라사이클린 등의 당업계에 공지된 바와 같은 화합물에 의해 활성화될 수 있다. 모든 조절가능한 프로모터와 이러한 조절을 위한 조건은 본 발명의 벡터, 핵산 및 방법에 포함되는 것으로 이해되어야 하며, 본 발명의 구현예에 해당된다.

[0116] 일 예에서, 본 발명의 제형 및 방법은 치료적 폴리펩타이드나 핵산의 수준을 기저 수준 보다 적어도 5% 증가시킨다. 다른 예에서, 치료적 폴리펩타이드나 핵산의 수준은 적어도 7% 이상 증가되며, 다른 예로 적어도 10% 이상, 다른 예로 적어도 15% 이상, 다른 예로 적어도 20% 이상, 다른 예로 적어도 25% 이상, 다른 예로 적어도 30% 이상, 다른 예로 적어도 40% 이상, 다른 예로 적어도 50% 이상, 다른 예로 적어도 60% 이상, 다른 예로 적어도 75% 이상, 다른 예로 적어도 100% 이상, 다른 예로 적어도 125% 이상, 다른 예로 적어도 150% 이상, 다른 예로 적어도 200% 이상으로 증가된다.

[0117] 일 예에서, 치료적 폴리펩타이드 또는 핵산의 본 발명의 제형을 통한 발현은 "기저 수준"에 비해 증가되며, 일 예로 상기 기저 수준은 본 발명의 치료 제형과 접촉하지 않거나 또는 투여받지 않은 세포 배양물이나 숙주에서 발현되는 유전자의 수준이다.

[0118] 다른 예에서, 본 발명의 제형 및 방법은 치료적 폴리펩타이드 또는 핵산의 수준을 대략 2000 ng/day으로, 또는 다른 예로, 1500 ng/day으로, 또는 다른 예로, 1000 ng/day으로, 또는 다른 예로, 750 ng/day으로, 또는 다른 예로, 500 ng/day으로, 또는 다른 예로, 250 ng/day으로, 또는 다른 예로, 150 ng/day으로, 또는 다른 예로, 100 ng/day으로, 또는 다른 예로, 75 ng/day으로, 또는 다른 예로, 50 ng/day으로, 또는 다른 예로, 25 ng/day으로 증가시킨다. 다른 예로, 본 발명의 제형 및 방법은 치료적 폴리펩타이드의 수준을 20-70 mU/mL로, 또는 다른 예로 50-100 mU/mL로, 또는 다른 예로 5-20 mU/mL로, 또는 다른 예로 100-200 mU/mL로, 또는 다른 예로 10-70 mU/mL로, 또는 다른 예로 5-80 mU/mL로 증가시킨다. 다른 예로, 본 발명의 제형 및 방법은 치료적 폴리펩타이드의 수준을 500-1000 mU/mL로, 또는 다른 예로 50-750 mU/mL로, 또는 다른 예로 500-5000 mU/mL로 증가시킨다.

[0119] 일 예로, 본 발명의 제형 및 방법은 기능성 마커의 수준, 일 예로, 적혈구 용적률 수준을 기저 수준에 적어도 5%까지 증가시킨다. 다른 예로, 기능성 마커의 수준은 적어도 7% 이상, 다른 예로 적어도 10% 이상, 다른 예로 적어도 15% 이상, 다른 예로 적어도 20% 이상, 다른 예로 적어도 25% 이상, 다른 예로 적어도 30% 이상, 다른 예로 적어도 40% 이상, 다른 예로 적어도 50% 이상, 다른 예로 적어도 60% 이상, 다른 예로 적어도 75% 이상, 다른 예로 적어도 100% 이상, 다른 예로 적어도 125% 이상, 다른 예로 적어도 150% 이상, 다른 예로 적어도 200% 이상으로 증가된다.

[0120] 일 예에서, 본 발명의 치료 제형은 일 예로 치료적 폴리펩타이드나 핵산의 분비, 발현, 생산, 순화성 또는 지속성을 증가시킬 수 있는 제형에 대해 사용되는, "장기 지속형"이다. 일 예에서, 치료적 폴리펩타이드 또는 핵산의 발현 수준은 적어도 1달, 또는 다른 예로 적어도 6달 동안 기저 수준 이상으로 증가된다. 다른 예로, 적혈구 용적률의 수준은 최소 2주, 다른 예로 최소 3주, 다른 예로 최소 4주, 다른 예로 최소 5주, 다른 예로 최소 6주, 다른 예로 최소 8주, 다른 예로 최소 2달, 다른 예로 최소 3달, 다른 예로 최소 4달, 다른 예로 최소 5달, 다른 예로 최소 7달, 다른 예로 최소 8달, 다른 예로 최소 9달, 다른 예로 최소 10달, 다른 예로 최소 11달, 다른 예로 최소 1년 동안, 증가된다. 다른 예로, 치료적 폴리펩타이드 또는 핵산의 발현 수준은 적어도 4-6달 동안 증가된다.

[0121] 일 예로, 치료적 폴리펩타이드 또는 핵산을 코딩하는 핵산 서열은 치료적 폴리펩타이드 또는 핵산의 발현 수준 증가나, 또는 다른 예로 치료적 폴리펩타이드 또는 핵산의 지속 기간 증가, 또는 다른 예로 이의 조합을 위해

최적화된다.

[0122] 일 예로, 용어 "최적화"는 원하는 변화, 일 예로 유전자 발현의 변화, 다른 예로 단백질 발현의 변화를 의미한다. 일 예에서, 최적화된 유전자 발현은 유전자의 최적화된 조절이며, 다른 예로 최적화된 유전자 발현은 유전자 발현 증가이다. 이러한 측면과 일 예에 있어서, 유전자 발현의 2배 내지 1000배 증가가 예상된다. 다른 예로, 유전자 발현의 2배 내지 500배 증가, 다른 예로 유전자 발현의 2배 내지 100배 증가, 다른 예로 유전자 발현의 2배 내지 50배 증가, 다른 예로 유전자 발현의 2배 내지 10배 증가, 다른 예로 유전자 발현의 3배 내지 5배 증가가 예상된다.

[0123] 다른 예에서, 최적화된 유전자 발현은 특정 환경 조건하에서의 유전자 발현 증가일 수 있다. 다른 예로, 최적화된 유전자 발현은 유전자 발현의 감소를 포함할 수 있으며, 일 예로 특정 환경 조건하에서만 일 수 있다.

[0124] 다른 예로, 최적화된 유전자 발현은 유전자 발현의 기간 증가이다. 상기한 측면과 일 예에 있어서, 유전자 발현 지속 기간은 천연형과 비교하여 2배 내지 1000배 증가가 예상된다. 다른 예로, 유전자 발현의 지속기간의 2배 내지 500배 증가, 다른 예로 유전자 발현의 지속기간의 2배 내지 100배 증가, 다른 예로 유전자 발현의 지속기간의 2배 내지 50배 증가, 다른 예로 유전자 발현의 지속기간의 2배 내지 10배 증가, 다른 예로 유전자 발현의 지속기간의 3배 내지 5배 증가가 예상된다. 다른 예로, 유전자 발현의 지속기간 증가는 비-벡터-발현성 대조군에서의 유전자 발현과 비교되거나, 또는 천연형 벡터 발현성 대조군에서의 유전자 발현과 비교된다.

[0125] 포유류 세포에서의 발현은, 일 예로 전사 침묵, mRNA의 짧은 반감기, 다른 스플라이싱 현상, 미성숙 폴리아데닐화, 불충분한 핵 전이 및 희귀한 rRNA 풀의 이용가능성에 의해 간섭된다. 포유류 발현에서의 수많은 문제점의 원인은 많은 중요한 포유류 유전자의 자가 발현에 포함되는 트랜스유전자를 코딩하는 메세지에서 확인된다. 포유류 RNA의 최적화는 cis 작용 요소의 변경, 그것의 GC 함량의 순응(adaptation), 포유류 세포의 비제한적인 tRNA 풀과 관련있는 코돈 편향성 변경, 서로간 상동적인 영역의 회피 및 RNAi의 배제를 포함할 수 있다.

[0126] 따라서, 일 예로, 세심하게 고안된 합성 유전자인 경우, 반감기가 길어진 안정적인 메세지, 구성적인 핵 배출 및 포유류 숙주내에서의 단백질의 높은 발현을 예상할 수 있다.

[0127] 따라서, 일 예로, 유전자의 최적화는, 숙주 유전자, 일 예로 호모사피엔스의 유전자의 코돈 편향성에 코돈 사용(codon usage)을 적응시키고; GC 함량이 매우 높거(> 80%)나 낮은 부분(< 30%)을 조절하고; 하기 cis-작용성 서열 모티프 1종 이상의 회피 설계하는 것을 수반한다: 내부 TATA 박스, chi-부위와 리보좀 도입 부위; AT-rich 또는 GC-rich 서열 스트레치(sequence stretch); ARE, BMS, CRS 서열 요쇠 반복 서열 및 RNA 2차 구조; (숨겨진(cryptic)) 스플라이스 도너 및 어셉터 부위, 분지 부위(branch point); 또는 이의 조합. 일 예에서, 유전자는 호모 사피엔 세포에서의 발현에 대해 최적화된다. 다른 예에서, 유전자는 미세-장기에서의 발현에 대해 최적화된다. 다른 예에서, 유전자는 진피 세포에서의 발현에 대해 최적화된다.

[0128] 일 예에서, 본원에 기술된 바와 같이, EPO와 같은 최적화된 유전자는 gutless 아데노바이러스 벡터로부터 발현되는 비-최적화된 EPO 또는 아데노바이러스 5 벡터로부터 발현된 비-최적화된 EPO 둘다와 비교하여 긴 시간 동안 피크 발현율 증가를 유지하고 있다(도 3 및 4).

[0129] 일 예에서, 용어 "유전자"는 코딩 서열 앞에 있는 조절 서열(5' 비코딩 서열)과 뒤에 있는 서열(3' 비코딩 서열)을 포함하여, 특이적인 단백질로서 발현될 수 있는, 핵산 단편을 지칭한다. "천연 유전자"는 자신의 조절 서열과 함께 자연에서 발현되는 유전자를 지칭한다. "키메라 유전자"는 자연에서 함께 발견되지 않는, 조절 서열과 코딩 서열을 포함하는, 천연 유전자가 아닌, 모든 유전자를 지칭한다. 따라서, 키메라 유전자는 상이한 소스로부터 유래된 조절 서열과 코딩 서열, 또는 동일한 서열로부터 유래되었지만 자연에서 발견되는 것과는 다른 방식으로 정렬된 조절 서열과 코딩 서열을 포함할 수 있다. "내인성 유전자"는 유기체의 게놈에서 본래 위치에 있는 천연 유전자를 지칭한다. "외래" 유전자는 숙주 유기체에서는 정상적으로 발견되지 않지만 유전자 전달에 의해 숙주 유기체에 도입된 유전자를 지칭한다. 외래 유전자는 비-천연 유기체, 또는 키메라 유전자에 삽입된 천연 유전자를 포함할 수 있다. "트랜스유전자"는 형질전환 공정에 의해 게놈에 도입되어진 유전자이다.

[0130] 일 예에서, 치료적 핵산은 RNA 분자(센스 또는 안티센스), 펩타이드, 폴리펩타이드, 당단백질, 지단백질 또는 이의 조합, 또는 임의의 다른 후변형된 폴리펩타이드를 코딩하는 모든 유전자일 수 있다. 본 발명의 일 예에서, 대상 유전자는 조직 샘플에서 자연적으로 발현될 수 있다. 본 발명의 다른 예에서, 조직 샘플은 유전자 조작되어, 하나 이상의 세포가 자연적으로는 세포에서 발현되지 않거나 또는 세포내에서 발현 프로파일이 변경된 대상 유전자를 발현하게 될 수 있다. 일 예에서, 본 발명의 치료적 핵산은 미국 특허 출원번호

10/376,506에 기재된 단백질들 중 어느 하나를 코딩하거나, 치료적 폴리펩타이드는 상기 단백질일 수 있으며, 상기 미국 특허는 원용에 의해 그 전체가 본 명세서에 포함된다.

[0131] 일 예에서, 유전자 변형된 미세-장기는 유전자 변형된 진피 미세-장기이다. "진피" 미세-장기는 복수의 진피 성분을 포함할 수 있으며, 진피는 일 예로 상피 아래에 위치한 피부의 일부분이다. 이들 성분들은 피부 섬유모세포, 상피 세포, 그외 세포 타입, 모낭의 베이스, 신경 말단, 땀샘, 피지샘, 혈관 및 림프관을 포함할 수 있다. 일 예로, 진피 미세-장기는 지방 조직을 포함할 수 있으며, 다른 예로, 진피 미세-장기는 지방 조직을 포함하지 않을 수 있다. 진피 미세-장기의 수득 방법, 배양상태로 유지하는 방법과 이식하는 방법을 포함하여, 진피 미세-장기에 대한 보다 구체적인 사항은 PCT 특허 출원 WO2004/099363에 기술되어 있으며, 원용에 의해 그 전체가 본 명세서에 포함된다.

[0132] 다른 예에서, 본 발명은 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 유전자 변형된 미세-장기를 필요로하는 개채에게 장기간에 걸쳐 제공하는 단계; 및 상기 유전자 변형된 미세-장기를 상기 개체에 이식하는 단계를 포함하는. 장기간 필요로하는 개체에 치료적 폴리펩타이드를 제공하는 방법을 제공하며, 상기 핵산 서열은 치료적 폴리펩타이드를 코딩하며, 그에 따라 치료적 핵산 또는 폴리펩타이드의 발현 수준은 기저 수준 보다 5% 이상으로 증가되며, 상기한 증가는 1달 이상 유지된다. 다른 예에서, 본 발명은 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 하나 이상의 유전자 변형된 미세-장기를 필요로하는 개채에게 장기간에 걸쳐 제공하는 단계; 및 상기 유전자 변형된 미세-장기를 상기 개체에 이식하는 단계를 포함하는. 장기간 필요로하는 개체에 치료적 폴리펩타이드를 제공하는 방법을 제공하며, 상기 핵산 서열은 치료적 폴리펩타이드를 코딩하며, 상기 벡터는 헬퍼-의존성 아데노바이러스 벡터이다. 다른 예에서, 본 발명은 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 하나 이상의 유전자 변형된 미세-장기를 필요로하는 개채에게 장기간에 걸쳐 제공하는 단계; 및 상기 유전자 변형된 미세-장기를 상기 개체에 이식하는 단계를 포함하는, 장기간 필요로하는 개체에 치료적 폴리펩타이드를 제공하는 방법을 제공하며, 상기 핵산 서열은 치료적 폴리펩타이드를 코딩하며, 상기 벡터는 헬퍼-의존성 아데노바이러스 벡터이다.

[0133] 다른 예에서, 전술한 방법은 치료적 핵산을 필요로하는 개체에 제공하며, 상기 치료적 핵산 또는 폴리펩타이드의 발현 수준은 기분 수준의 5% 이상으로 증가하며, 상기 증가는 1시간 이상, 3시간 이상, 6시간 이상, 9시간 이상, 12시간 이상, 18시간 이상, 1일 이상 또는 2일 이상 유지되며, 상기 벡터는 헬퍼-의존성 아데노바이러스 벡터이거나, 또는 이의 조합이다.

[0134] 일 예에서, 본 발명은 치료적 폴리펩타이드가 에리트로포이에틴이거나, 치료적 핵산이 에리트로포이에틴을 코딩하는, 전술한 치료 제형을 제공한다. 다른 예에서, 본 발명은 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는, 유전자 변형된 미세-장기를 포함하는 장기 지속형 에리트로포이에틴 제형을 제공하며, 여기서, 상기 핵산 서열은 에리트로포이에틴을 코딩하며, 그에 따라 상기 제형은 에리트로포이에틴을 기저 수준 보다 5% 이상으로 증가시키며, 이러한 에리트로포이에틴의 증가는 1달 이상 지속된다. 다른 예에서, 본 발명은 치료적 폴리펩타이드가 에리트로포이에틴이거나, 치료적 핵산이 에리트로포이에틴을 코딩하는, 치료 제형을 필요로하는 개체에게 제공하는 방법을 제공한다. 다른 예에서, 본 발명은 에리트로포이에틴을 필요로하는 개체에 제공하는 방법을 제공한다.

[0135] 다른 예에서, 본 발명은 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는, 하나 이상의 유전자 변형된 미세-장기를 제공하는 단계; 및 상기 유전자 변형된 미세-장기를 개체에 이식하는 단계를 포함하는, 에리트로포이에틴을 필요로하는 개채에게 장기간에 걸쳐 전달하는 방법을 제공하며, 여기에서 상기 핵산 서열은 에리트로포이에틴을 코딩하고, 그에 따라 에리트로포이에틴 수준이 기저 수준 대비 5% 이상으로 증가되며, 이러한 에리트로포이에틴의 증가는 1달 동안 지속된다.

[0136] 다른 예에서, 본 발명은 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는, 하나 이상의 유전자 변형된 미세-장기를 제공하는 단계; 및 상기 유전자 변형된 미세-장기를 개체에 이식하는 단계를 포함하는, 필요로하는 개채에게 장기간에 걸쳐 새로운 혈관 세포의 형성을 유도하는 방법을 제공하며, 여기에서 상기 핵산 서열은 에리트로포이에틴을 코딩하고, 그에 따라 에리트로포이에틴 수준이 기저 수준 대비 5% 이상으로 증가되며, 이러한 에리트로포이에틴의 증가는 1달 동안 지속된다.

[0137] 일 예에서, 에리트로포이에틴(EPO)은 적구성 선조 세포를 적혈구로 성숙시키는데 관여하는 당단백질 호르몬이다. 일 예에서, 에리트로포이에틴은 적혈구 세포의 순환하는 수준을 조절하는데 필수적이다. 자연적으로 생성되는 에리트로포이에틴은 신장과 간에서 생산되어 혈액에서 순환하며, 골수에서 일 예로 저산소증에

반응하여 절혈구 세포의 생산을 자극한다.

[0138] 일 예로, 본 발명의 조성물 및 방법의 에리트로포이에틴은 인간 또는 동물의 뇨, 또는 다른 예로 혈장에서 추출된 EPO와 유사한 당화 패턴을 포함한다.

[0139] 에리트로포이에틴을 코딩하는 유전자의 동정, 클로닝 및 발현은 미국 특허 5,756,349; 5,955,422; 5,618,698; 5,547,933; 5,621,080; 5,441,868; 및 4,703,008에 기술되어 있으며, 이들 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 재조합 에리트로포이에틴 플라스미드를 포함하고 있는 포유류 세포의 생장을 지지하는 세포 배지로부터 재조합 에리트로포이에틴을 정제하는 것에 대한 설명은 Lai 등의 미국 특허 4,667,016에 기술되어 있으며, 이는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 에리트로포이에틴을 코딩하는 유전자에 의한 형질전환된 숙주 세포로부터 시험관내 단백질 산물의 발현에 관여하는 유전자 조작 기법에 의해 제조한 재조합 에리트로포이에틴은, 만성 신부전으로 인해 생기는 빈혈 치료에 사용되고 있다. 현재, EPO는 신부전의 ㅂ빈혈, 지도부딘(AZT) 처방받은 환자에서 HIV 감염과 관련된 빈혈, 및 암 화학요법과 관련있는 빈혈에 대한 치료제로 사용된다. rhu-EPO는 신 기능부정(renal insufficiency)에 부수적인 빈혈 치료제로 통상화되기 시작하고 있으며, 주 당 3번 50-75 u/kg의 투여량을 사용하여 적혈구 용적률을 서서히 회복시키고 수혈 교환(transfusion dependency)할 필요가 없게 한다.

[0140] 진핵 세포에 의해 생산되는 많은 세포 표면 및 분비성 단백질들은 당화라고 하는 하나 이상의 올리고사카라이드기로 변형되는데, 이는 단백질의 안정성, 분비 및 세포에서의 위치 뿐만 아니라 생물학적 활성에 극적인 영향을 미칠 수 있다. 일 예에서, 인간 뇨 유래의 에리트로포이에틴과 인간 에리트로포이에틴의 1-165 아미노산 서열을 갖고 있는 재조합 에리트로포이에틴(포유류 세포에서 발현됨) 둘다당단백질의 총 분자량의 약 40%를 구성하는 N-연결 및 O-연결된 올리고사카라이드 체인 3개를 포함한다. 일 예에서, 비당화된 에리트로포이에틴은 당화된 형태에 비해 생체내 활성이 크게 감소되었지만, 시험관내 활성은 일부 유지하고 있었다. 일 예에서, 본 발명의 조성물의 에리트로포이에틴 및 본 발명의 방법에 사용하기 위한 에리트로포이에틴은 완전히 당화된 것이며, 다른 예로 이는 일부 당화된 잔기를 포함하며, 다른 예로 이는 당화되지 않은 것이다.

[0141] 일 예에서, EPO 유전자는 천연형 EPO 유전자일 수 있으며, 다른 예로, EPO 유전자는 변형된 것일 수 있다. 일 예로, 변형된 EPO 유전자는 최적화될 수 있다.

[0142] 일 예에서, EPO 유전자는 유전자은행 등재 번호 X02158; AF202312; AF202311; AF202309; AF202310; AF053356; AF202306; AF202307;또는 AF202308에 기재된 것에 해당되는 핵산 서열, 또는 유전자은행 등재 번호 CAA26095; AAF23134; AAF17572; AAF23133; AAC78791; 또는 AAF23132에 기재된 것에 해당하는 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열을 가진다. 다른 예로, EPO 전구체 유전자는 유전자은행 등재 번호 NM_000799; M11319; BC093628; 또는 BC111937에 기재된 것에 해당하는 핵산 서열 또는 유전자은행 등재 번호 NP_000790; AAA52400; AAH93628; 또는 AAI11938에 기재된 것에 해당하는 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열을 가진다. 다른 예에서, EPO 유전자는 서열번호 7로 제시된 핵산 서열을 가지며, 다른 예로, EPO 유전자는 서열번호 8로 제시된 핵산 서열을 가진다. 다른 예로, EPO 유전자는 서열번호 7로 제시된 서열과 상동인 핵산을 가지며, 다른 예로, EPO 유전자는 서열번호 8로 제시된 서열과 상동인 핵산을 가진다.

[0143] 일 예에서, 본 발명의 제형은 빈혈인 개체를 치료하기 위해 사용할 수 있다. 일 예에서, 빈혈은 "적혈구 세포 내 산소를 운반하는 헤모들로빈의 양의 병인성 결핍"으로 정의된다. 빈혈 증상으로는, 피곤, 일상 기능을 수행할 능력의 소실, 인지 기능 손상, 두통, 현기증, 흉통 및 숨가쁨, 구역질, 우울증, 통증 또는 이의 조합을 포함한다. 일 예로, 빈혈은 나쁜 예후와 사망율 증가와 관련있다.

[0144] 빈혈은 신장으로부터 에리트로포이에틴의 생산 저하로 인한 신부전의 결과인 경우가 많다. 다른 예에서, 빈혈은 암 침윤, 림프종 또는 백혈병으로 인해 골수에서의 적혈구 세포(적구성 세포: erythroid)의 생산 저하나, 또는 골수 치환에 의해 초래된다. 그외 빈혈의 원인으로는, 출혈 또는 비정상적인 월경으로 인한 출혈 등의 과다 출혈; 암 치료, 예컨대 수술, 방사선치료, 화학치료, 면역 치료 또는 이의 조합; 암성 골수의 침윤이나 치환; 일 예로, 적혈구 세포의 분해 또는 파괴인 용혈 증가, 에리트로포이에틴의 낮은 수준, 또는 이의 조합으로 인한 혈액 감소를 포함한다. 일 예로, 빈혈은 판코니 빈혈을 지칭하며, 이것은 골수 부전을 유도하고(재생불량성 빈혈) 종종 급성 AML(acute myelogenous leukemia)로 이어지는, 유전성 빈혈이다. 다른 예에서, 빈혈은 다이아몬드 블랙판 빈혈(Diamond Blackfan anemia), 정적혈구성 빈혈(normocytic anemia), 재생불량성 빈혈, 철 결핍성 빈혈, 비타민 결핍성 빈혈, 철적모구성 빈혈(Sideroblastic Anemia), 발작성 야간혈색소뇨증(Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria), 만성 질병의 빈혈, 신장 질환과 투석에서의 빈혈, 또는 이의 조합을 지칭한다. 다른 예에서, 본 발명의 장기 지속형 EPO 제형은 당뇨병 개체를 치료하는데 사용된다. 상기 측면과

일 예에 있어서, 본 발명의 EPO 제형은 특히 인슐린 투여, 경구용 저혈당제, 예컨대 설폰유레아 약물, 일 예로 특히 글루코트롤, 글리부리드, 글리네이즈 및 아마릴; 글루코파지, 특히 레줄린, 엑토스 및 아반디아 등의 티아졸리딘디온; 또는 이들의 조합 등의, 당업계에 공지된 기타 당뇨병 치료제와 함께 사용될 수 있다. 다른 예로, 본 발명의 장기 지속형 EPO 제형은 일 예로 만성적인 신장병을 앓고 있는 개체를 치료하는데, 다른 예로, 말기 신장병을 앓고 있는 개체를 치료하는데, 사용된다. 다른 예에서, 본 발명의 제형은 전술한 질환이나 병태에 걸리기 쉬운 개체에 사용된다.

[0145] 본 발명의 제형 및 방법을 이용하여 빈혈의 원인과는 상관없이, 그리고 빈혈의 원인이 규명되었는지 여부와 상관없이, 빈혈을 치료할 수 있는 것으로 이해된다.

[0146] 일 예에서, 본 발명의 제형 및 방법은 빈혈 치료에 효과적인 다른 치료제와 함께 투여될 수 있다. 일 예로, 다른 치료제는, 철 보청제, 비타민 B12 보충제, 에리트로포이에틴의 부가적인 소스, 안드로겐, G-CSF 등의 성장 안자, 또는 이의 조합이 있다. 다른 예로, 본 발명의 제형 및 방법은 혈액과 골수 줄기 세포 이식 등의 다른 치료와 병용 투여될 수 있다.

[0147] 일 예에서, 본 발명은 치료적 폴리펩타이드가 인터페론이거나, 또는 치료적 핵산이 인터페론, 일 예로 인터페론 α, 일 예로 인터페론 α 2a를 코딩하는, 전술한 치료 제형을 제공한다. 다른 예에서, 본 발명은, 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는, 유전자 변형된 미세-장기를 포함하는 장기 지속형 인터페론 α 제형을 제공하며, 상기 핵산 서열은 인터페론 α를 코딩하며, 그에 따라 상기 제형은 인터페론 α 수준을 기저 수준 대비 5% 이상으로 증가시키며, 이러한 인터페론 α의 증가는 1달 이상간 지속된다. 다른 예에서, 본 발명은 치료적 폴리펩타이드가 인터페론이거나, 또는 치료적 핵산이 인터페론, 일 예로 인터페론 α, 일 예로 인터페론 α 2a를 코딩하는, 필요한 개체에게 치료 제형을 제공하는 방법을 제공한다. 다른 예에서, 본 발명은 인터페론, 일 예로 인터페론 α, 일 예로 인터페론 α 2a인, 치료적 폴리펩타이드를 필요한 개체에 제공하는 방법을 제공한다.

[0148] 일 예에서, 인터페론은 세포에서, 항-바이러스, 항-증식성 및 항-염증성 효과 등의 다양한 효과(pleitrophic effect)를 발휘할 수 있는 다기능 사이토카인이다. 인터페론에 대한 이러한 세포 반응으로 인해, 인터페론 α 및 인터페론 β는 다발성 경화증, B형 간염, C형 간염, 및 여러가지 암 등의 바이러스성 질환, 증식성 질환 및 염증성 질환 치료에 임상적으로 유용한 것으로 확인되고 있다. 인터페론 요법은 또한 그외 염증성 질환, 바이러스성 질환 및 증식성 질환의 치료에 이용 가능성을 가질 수 있다. 따라서, 인터페론이 필요한 개체는 전술한 질환이나 병태 중 어느 하나 또는 모두를 가진 개체일 수 있다.

[0149] 인터페론의 3가지 주된 클래스로 α(α), β(β) 및 감마(γ)가 있다. 이들 인터페론은 항-바이러스 및 항-종양형성 특성 외에도, 대식세포와 천연 킬러 림프구를 활성화시키고, 주조직적합성 복합체 당단백질 클래스 I 및 II를 강화한다. 인터페론-α는 백혈구(B 세포와 T 세포)에 의해 분비된다. 인터페론-β는 섬유모세포에 의해 분비되며, 인터페론-γ는 T 세포와 천연 킬러 림프구에 의해 분비된다.

[0150] 일 예에서, 치료적 폴리펩타이드는 일터페론 α, 다른 예로 인터페론 β, 또는 다른 예로 인터페론 감마이다. 다른 예에서, 치료적 폴리펩타이드는 임의 서브타입의 인터페론 α이며, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 17 또는 21이 있으나, 이것으로 한정되는 것은 아니다. 다른 예에서, 치료적 폴리펩타이드는 인터페론 ω, ε, κ 또는 이의 상동체이다. 다른 예에서, 치료적 폴리펩타이드는 인터페론 람다 또는 이의 상동체이다. 다른 예에서, 치료적 폴리펩타이드는 임의 서브타입의 인터페론 λ이며, 인터페론(IL) 28A, EL28B, 또는 IL29가 있으나, 이것으로 한정되는 것은 아니다. 다른 예에서, 치료적 폴리펩타이드는 인터페론 ζ, ν, τ, δ 또는 이의 상동체이다.

[0151] 일 예에서, IFN은 특이적인 세포 표면 수용체 컴플렉스, 일 예로 IFNAR1 및 IFNAR2 체인을 포함하는 인터페론 α 수용체(IFNAR), 다른 예로 두개의 IFNGR1 및 두개의 IFNGR2 서브유닛를 포함하는 인터페론 감마 수용체(IFNGR), 다른 예로 IL10R2 및 IFNLR1을 포함하는 수용체 컴플렉스에 결합한다. 일 예에서, 인터페론은 JAK-STAT 시그널링 경로를 통해 신호전달한다.

[0152] 일 예에서, 본 발명의 제형 및 방법의 인터페론은 일터페론 α이다. 다른 예에서, 본 발명의 제형 및 방법의 인터페론은 일터페론 α2b이다. 일 예에서, IFN α2b는 인간 백혈구 유래의 IFN α2b에 대한 유전자를 포함하는, 재조합, 비당화 165-아미노산 α 인터페론 단백질이다. IFN α2b는 타입 I이고 수용성 인터페론으로, 분자량은 19,271 달톤(19.271 kDa)이다. 일 예에서, IFN α2b는 HPLC 분석으로 측정시 약 2.6 x 10^8(260 million) International Units/mg의 비활성(specific activity)을 가진다.

[0153] 일 예에서, IFN α2b는, 성장 호르몬, 인터루킨, 수종의 콜로니 자극 인자와 수종의 그외 조절 분자가 포함된, 큰 나선형 사이토카인 슈퍼패밀리에 속하는 타입 I의 인터페론들 중 하나이다. 모두 IFNAR1 및 IFNAR2로 알려진 세포 표면 수용체 컴플렉스와의 상호작용과 다양한 시그널링 경로 활성화에 의한 세포 활성의 조절자로서 기능한다. 인터페론은 세포에서 항-바이러스 및 항-증식성 반응을 형성한다.

[0154] 일 예에서, 본 발명의 장기 지속형 IFN α 제형은 유모세포 백혈병(hairy cell leukemi), 성병성 사마귀(venereal wart), 카포시 육종, 만성 비-A, 비-B형 감염, B형 간염 또는 이의 조합의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 다른 예에서, 본 발명의 장기 지속형 IFN α 제형은 전술한 질병이나 병태 들 중 하나에 걸리기 쉬운 개체나 또는 본원에 기술된 바와 같이 감염성 물질에 노출된 적이 있거나 노출될 개체에서 투여될 수 있다. 다른 예에서, 본 발명의 장기 지속형 IFN α 제형C형 간염의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 이러한 측면과 일 예에 있어서, 본 발명의 제형은 특히 리바마린, 인터페론, 페길화된 인터페론 또는 이의 조합 등의 다른 C형 감염 치료제와 동시에 또는 교대로 투여될 수 있다.

[0155] 다른 예에서, 장기 지속형 IFN α 제형은, 만성 골수성 백혈명, 다발성 골수종, 표재성 방광암, 피부암(특히 기저 세포암과 악성 흑색종이 포함됨), 신장 세포암, 난소암, 저등급 림프성 및 피부성 T 세포 림프종 및 신경교종 등의, 그외 다양한 세포 증식성 장애에서 단독으로 또는 화학치료제와 병용하여 사용 또는 평가될 수 있다. 다른 예에서, 장기 지속형 IFN α 제형은 폐암, 결장직장암 및 유방암으로부터 생기는 고형암의 예방 또는 치료에 단독으로 또는 다른 화학치료제와 함께 사용될 수 있다. 다른 예에서, 장기 지속형 IFN α 제형은 다발성 경화증의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 다른 예에서, 장기 지속형 IFN α 제형은 조직구성 질환(histiocytic disease), 일 예로 에드하임-체스터병(ECD), 일 예로 신체의 결합 조직을 공격하며, 일 예로 조직구의 과다 생산에 의해 초래되며, 일 예로 조성 결합 조직(loose connective tissue)에 축적되어 비후화 및 치밀화가 초래되는, 잠재적인 태아 장애의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 다른 예에서, 장기 지속형 IFN α 제형은 중증 눈 베체트 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[0156] 일 예에서, IFN α 유전자는 유전자은행 등재 번호 K01900; M11003; 또는 M71246에 제시된 서열에 해당하는 핵산 서열을 가지거나, 또는 유전자은행 등재 번호 AAA52716; AAA52724; 또는 AAA52713에 제시된 서열에 해당하는 단백질 서열을 코딩한다. 일 예에서, IFN β 유전자는 유전자은행 등재 번호 M25460; AL390882; 또는 CH236948에 제시된 서열에 해당하는 핵산 서열을 가지거나, 또는 유전자은행 등재 번호 AAC41702; CAH70160; 또는 EAL24265에 제시된 서열에 해당하는 단백질 서열을 코딩한다. 일 예에서, IFN v 유전자는 유전자은행 등재 번호 J00219; AF506749; NM_000619; 또는 X62468에 제시된 서열에 해당하는 핵산 서열을 가지거나, 또는 유전자은행 등재 번호 AAB59534; AAM28885; NP_000610; 또는 CAA44325에 제시된 서열에 해당하는 단백질 서열을 코딩한다. 다른 예에서, 인터페론 α 유전자는 서열번호 9로 제시된 핵산 서열을 가지며, 다른 예로 인터페론 α 유전자는 서열번호 10으로 제시된 아미노산 서열을 가진다. 다른 예에서, 인터페론 α 유전자는 서열번호 9로 제시된 서열과 상동한 핵산을 포함하며, 다른 예로 인터페론 α 유전자는 서열번호 10으로 제시된 서열과 상동한 아미노산 서열을 가진다.

[0157] 다른 예에서, 본 발명은 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 유전자 변형된 미세-장기를 제공하는 단계; 및 상기 유전자 변형된 미세-장기를 개체에 이식하는 단계를 포함하는. 장기간 필요로하는 개체에게 인터페론 α를 전달하는 방법을 제공하며, 상기 핵산 서열은 인터페론 α를 코딩하며, 그에 따라 인터페론 α의 수준은 기저 수준 보다 5% 이상으로 증가되며, 상기한 인터페론 α의 수준 증가는 1달 이상 유지된다.

[0158] 일 예에서, 본 발명의 제형 및 방법은 핵산에 의해 코딩된 치료적 폴리펩타이드의 발현 수준 증가, 지속기간 증가 또는 이의 조합에 대해 최적화된 핵산을 제공한다. 다른 예에서, 본 발명은 서열번호 1과 85% 이상의 상동성을 갖는 핵산, 상기 핵산 서열을 포함하는 벡터 및 상기 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

[0159] 다른 예에서, 본 발명은 서열번호 2와 85% 이상의 상동성을 갖는 핵산, 상기 핵산 서열을 포함하는 벡터 및 상기 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

[0160] 용어 "상동성"은 본원에서 핵산 서열에 대해 사용될 경우 대응되는 천연 핵산 서열의 뉴클레오타이드와 동일한, 후보 서열의 뉴클레오타이드의 %를 나타낸다.

[0161] 일 예에서, 용어 "상동성", "상동체" 또는 "상동체들"은 일 예로, 서열이 지정된 서열과 적어도 70% 이상의 일치성을 보이는 것을 의미한다. 다른 예에서, 핵산 서열은 지정된 서열과 적어도 72%의 일치성을 나타낸다. 다른 예에서, 핵산 서열은 지정된 서열과 적어도 75%의 일치성을 나타낸다. 다른 예에서, 핵산 서열은 지정된 서

열과 적어도 77%의 일치성을 나타낸다. 다른 예에서, 핵산 서열은 지정된 서열과 적어도 80%의 일치성을 나타낸다. 다른 예에서, 핵산 서열은 지정된 서열과 적어도 82%의 일치성을 나타낸다. 다른 예에서, 핵산 서열은 지정된 서열과 적어도 85%의 일치성을 나타낸다. 다른 예에서, 핵산 서열은 지정된 서열과 적어도 87%의 일치성을 나타낸다. 다른 예에서, 핵산 서열은 지정된 서열과 적어도 90%의 일치성을 나타낸다. 다른 예에서, 핵산 서열은 지정된 서열과 적어도 92%의 일치성을 나타낸다. 다른 예에서, 핵산 서열은 지정된 서열과 적어도 95% 또는 그 이상의 일치성을 나타낸다. 다른 예에서, 핵산 서열은 지정된 서열과 95 % - 100%의 일치성을 나타낸다. 유사하게, 특정 서열에 대한 일치성은 직접적인 일치 뿐만 아니라 본원에 기술된 바와 같이 서열에 대한 상동성 둘다를 포함한다.

[0162] 상동성은 당업계에 잘 설명되어 있는 방법에 의해, 서열 정렬을 위한 컴퓨터 알고리즘으로 결정될 수 있다. 예컨대, 핵산 서열 상동성의 컴퓨터 알고리즘 분석은 예컨대 BLAST, DOMAIN, BEAUTY (BLAST Enhanced Alignment Utility), GENPEPT 및 TREMBL 패키지 등의 이용가능한 많은 소프트웨어 패키지의 이용을 포함할 수 있다.

[0163] 상동성을 결정하는 다른 방법은 핵산 서열 혼성화 결정을 통한 것으로, 이러한 방법은 당업계에 잘 설명되어 있다(예, "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1985); Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (Volumes 1-3) Cold Spring Harbor Press, N.Y.; and Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y). 일 예에서, 혼성화 방법은 온건한 조건 내지 엄격한 조건하에서 수행될 수 있다. 예컨대, 10-20% 포름아미드, 5 X SSC (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate), 50 mM 소듐 포스페이트(pH 7.6), 5 X 덴하트 용액, 10% 덱스트란 설페이트 및 20 ㎍/ml의 변성된 셰어드 연어 정자 DNA를 포함하는 용액 중에서 42℃에서 하룻밤 인큐베이션하는, 혼성화 조건이 있다.

[0164] 일 예에서, 본 발명은 미세-장기를 포함하는 치료 제형과 이의 이용 방법을 제공한다. 일 예에서, 치료적 미세-장기의 제조는, (a) 공여 개체로부터, 각각의 미세-장기 이식편가 세포 집단을 포함하며, 각각의 미세-장기 이식편이 이것이 유래된 장기의 미세-구조(micro-architecture)를 유지하면서 동시에 영양분 부족 및/또는 미세-장기 이식편내 폐기물의 축적으로 인한 세포 독성과 수반되는 세포 사멸을 최소화하기 위해, 미세-장기 이식편내에서 적절한 영양분과 가스가 세포로 확산가능하고 미세-장기 이식편의 외부로 세포 폐기물을 확산시킬 수 있도록 선택된 구조를 가지고 있는, 복수개의 미세-장기 이식편을 수득하는 단계; (b) 하나 이상의 아미노산에 의해 달라지는 단백질을 포함하며, 이를 분비하는, 유전자 변형된 복수의 미세-장기 이식편을 수득하기 위해, 복수의 미세-장기 이식편을 유전자를 변형시키는 단계; 및 (c) 상기 복수의 유전자 변형된 미세-장기 이식편은 복수의 수여 개체내에 이식하는 단계를 포함한다.

[0165] 일 예에서, 치료적 미세-장기의 제조는 PCT 특허 WO 03/006669, WO 03/03585, 및 WO 04/0993631에 기술된 바와 같이 수행되며, 상기 문헌들은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0166] 미세-장기를 유전자 변형된 미세-장기로 제조 및 가공하는 방법은 WO2004/099363에 기술되어 있으며, 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 미세-장기는, 3차 구조의 미세-장기에서 각 세포로의 영영분과 가스의 확산, 및 이식편의 외부로의 세포 폐기물의 충분한 확산이 확보되도록, 정해진 조직 구조를 포함한다. 미세-장기의 생체외, 일 예로 최소 배지에서의 유지는, 오랫동안 지속할 수 있으며, 그래서 바이러스나 비-바이러스성 벡터를 이용하여 미세-장기의 세포내에 원하는 후보 유전자를 도입하는 생체외 조절성 형질전이을 수행하여 유전자 변형된 미세-장기를 만든다.

[0167] 일 예에서, 미세-장기는 후술되는 바와 같이 드릴 및 코링바늘(coring needle)을 이용하여 회수한다. 다른 예로, 미세-장기는 코링 드릴을 삽입하는 동안 진공으로 피부 긴장을 유지하고 슬릿(slit)을 여는, 회수 시스템을 이용하여 회수한다. 다른 예에서, 진피 조직의 회수에 사용될 수 있는 모든 툴을 이용하여 적합한 크기의 미세-장기를 회수할 수 있으며, PCT 출원 WO 04/099363에 기술되어 있는 툴과 방법이 있으나, 이것으로 한정되는 것은 아니다.

[0168] 유전자 변형된 미세-장기를 제조하기 위한 미세-장기내 재조합 핵산 또는 바이오펌프의 도입은 당업계에 공지된 여러가지 방법들을 통해 달성할 수 있다. 핵산 구조체를 이용하여 미세-장기 세포를 안정적으로 또는 일시적으로 형질전이시킬 수 있다. 안정적인 형질전이에서, 핵산 분자는 미세-장기 세포의 게놈에 삽입되고, 이로써 안정적이고 유전되는 형질을 표현하게 된다. 일시적인 형질전이의 경우, 핵산 분자는 에피좀으로서 형질전이된 세포에서 유지되며, 세포에 의해 발현되지만 게놈내로 삽입되진 않는다. 상기 에피좀은 형질전이된 세포가 빠르게 분열하는 세포인 경우, 에피좀의 소실로 인해, 또는 형질전이된 세포가 비-분열성 세포인 경우에는 오랜 발현으로 인해, 일시적으로 발현될 수 있다.

[0169] 전형적으로, 핵산 서열은 전술한 바와 같이 미세-장기내 서열을 도입하는 바람직한 방법에 따라, 특정 벡터내로 서브클로닝된다. 일단 원하는 핵산 세그먼트가 특정 벡터로 서브클로닝되면, 재조합 벡터가 된다.

[0170] 일 예에서, 미세-장기는 유전자 변형 전 및 후에 32℃에서 인큐베이션하며, 다른 예로 37℃에서 인큐베이션한다. 다른 예로, 미세-장기는 33℃, 34℃, 35℃, 36℃, 38℃, 39℃, 40℃, 28℃, 30℃, 31℃, 25℃, 42℃, 또는 45℃에서 인큐베이션한다.

[0171] 일 예에서, 미세-장기는 유전자 변형 전 및 후에 10% CO_2에서 인큐베이션하며, 다른 예로, 5% CO_2에서 인큐베이션한다. 다른 예에서, 미세-장기는 12% CO_2, 15% CO_2, 17% CO_2, 또는 25% CO_2에서 인큐베이션한다. 다른 예로, 미세-장기는 2% CO_2, 6% CO_2, 7% CO_2, 8% CO_2, 또는 9% CO_2에서 인큐베이션한다.

[0172] 다른 예에서, 인큐베이션 온도, CO_2 농도 또는 이의 조합은 유전자 변형, 전, 동안에 및 후에 단일 온도나 농도로 유지될 수 있으며, 다른 예로, 인큐베이션 온도, CO_2 농도 또는 이의 조합은 유전자 변형, 전, 동안에 및 후에 다르게 조정될 수 있다.

[0173] 다른 예에서, 미세-장기는 85-100% 습도, 일 예에서 95% 습도, 다른 예에서 90% 습도, 다른 예에서 98% 습도에서 인큐베이션한다.

[0174] 일 예에서, 치료적 핵산 또는 폴리펩타이드의 수준은 당업계에 공지된 임의 방법을 이용하여 검출될 수 있다. 핵산을 세포에 도입하는 특정 발현 벡터 시스템과 방법의 효율은 당업계에 통상적으로 사용되는 표준 방법으로 분석될 수 있다. 예컨대, 세포에 도입된 DNA는 필터 혼성화 기법(예, 서든 블롯팅)으로 검출될 수 있으며, 도입된 DNA의 전사에 의해 만들어진 RNA는 예컨대 노던 블롯팅, RNase 보호 또는 역전사효소-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)에 의해 검출될 수 있다. 유전자 산물은 예컨대 특이적인 항체를 이용하는 것과 같은 제조된 단백질의 면역학적 검출에 의해, 또는 효소적 분석과 같은 유전자 산무의 기능적 활성을 검출하기 위한 기능성 분석에 의해 검출될 수 있다. 일 예로, ELISA, 웨스턴 블롯 또는 방사면역분석으로 단백질을 검출할 수 있다. 세포에 의해 발현되는 대상 유전자 산물을 쉽게 분석하기 어렵다면, 사용되는 조절 요소와 벡터에 연결된 리포터 유전자를 이용하여 발현 시스템을 먼저 최적화시킬 수 있다. 리포터 유전자는 쉽게 검출가능한 유전자 산물을 코딩하므로, 시스쳄의 효율을 평가하는데 사용할 수 있다. 당업계에서 사용되는 표준 리포터 유전자로는, β-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 루시퍼라제 및 인간 성장 호르몬을 코딩하는 유전자가 있다.

[0175] 따라서, 일 예로, 치료적 폴리펩타이드 또는 핵산의 발현 수준은 시험관내에서 측정되며, 다른 예로, 치료적 폴리펩타이드 또는 핵산의 발현 수준은 생체내에서 측정된다. 일 예에서, 폴리펩타이드 또는 핵산의 발현 수준, 일 예로 EPO 수준, 다른 예로 IFNα 수준의 시험관내 측정으로, 미세-장기에 의한 치료 물질의 시험관내 분비 수준을 측정하는 단계; 시험관내 생산 및 분비 수준과 치료 물질의 생체내 혈청 수준 사이의 연관성을 추정하는 단계; 및 상기 측정된 분비 수준과 추정된 연관성을 기반으로 이식할 치료 제형의 양을 결정하는 단계를 통해, 환자에게 이식할 미세-장기의 수를 결정할 수 있게 된다.

[0176] 본 발명의 바람직한 다른 예에서, 폴리뉴클레오타이드(들)는 또한 미세-장기의 세포내에서 발현되는 내인성 유전자나 또는 미세-장기로 도입된 부가적인 재조합 유전자의 전사 또는 번역 중 어느 하나를 조절하는, 트랜스- 또는 시스-작용성 인핸서 또는 억제자 요소를 포함할 수 있다. 포유류 세포에서 이용될 수 있는 적합한 전사 또는 번역 조절 서열의 다수 예는 당업계에 공지되어 있다.

[0177] 예컨대, 전사 조절 요소는, 특이적인 프로모터로부터 전사 활성화에 필요한 시스- 또는 트랜스-작용성 요소를 포함한다[(Carey et al., (1989), J. Mol. Biol. 209:423-432; Cress et al., (1991), Science 251 :87-90; and Sadowski et al., (1988), Nature 335:5631-564)].

[0178] 번역 활성자는 콜리플로워 모자이크 바이러스 번역 활성자(TAV)에 의해 예시되어 있다[예, Futterer and Hohn, (1991), EMBO J. 10:3887-3896 참조]. 이 시스템에서, 이중-시스트론 mRNA가 생산된다. 즉, 2가지 코딩 영역들은 동일한 프로모터로부터 동일한 mRNA로 전사된다. TAV가 없는 경우, 첫번째 시스트론만 리보좀에 의해 번역되며, TAV를 발현하는 세포에서는 2가지 시스트론 모두 번역된다.

[0179] 시스-작용성 조절 요소의 폴리뉴클레오타이드 서열은 통상적으로 사용되는 유전자 낫-인(knock-in) 기법을 통해 미세-장기의 세포로 도입될 수 있다. 유전자의 낫-인/아웃 방법에 대한 개괄적인 사항은, 예로 미국 특허 5,487,992, 5,464,764, 5,387,742, 5,360,735, 5,347,075, 5,298,422, 5,288,846, 5,221,778, 5,175,385, 5,175,384, 5,175,383, 4,736,866을 참조하며, Burke and Olson, Methods in Enzymology, 194:251-270, 1991;

Capecchi, Science 244:1288-1292, 1989; Davies et al., Nucleic Acids Research, 20 (11) 2693-2698, 1992; Dickinson et al., Human Molecular Genetics, 2(8): 1299- 1302, 1993; Duff and Lincoln, "Insertion of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human APP gene and expression in ES cells", Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders, 1995; Huxley et al., Genomics, 9:742-750 1991; Jakobovits et al., Nature, 362:255-261 1993; Lamb et al., Nature Genetics, 5: 22-29, 1993; Pearson and Choi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90:10578-82; Rothstein, Methods in Enzymology, 194:281-301, 1991; Schedl et al., Nature, 362: 258-261, 1993; Strauss et al., Science, 259:1904-1907, 1993, WO 94/23049, WO 93/14200, WO 93/06908 및 WO 94/28123에서도 정보를 얻을 수 있다.

[0180] 재조합 산물의 내인성 서열만 하향-조절하길 원할 수 있다. 이를 위해, 안티센스 RNA를 내인성 서열 불활성화의 수단으로 채택할 수 있다. 내인성 nRNA 서열에 상보적인 서열을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드(들)는 미세-장기의 세포내에서 전사된다. 또한, 하향 조절은 당업계에 잘 알려져 있는 실무인 유전자 낫-아웃 기법에 의해 수행될 수 있다("Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988)).

[0181] 재조합 산물의 과다 발현을 원할 수도 있다. 과다발현은 해당 벡터에서 하나 이상의 코딩 서열을 고카피 수로 제공함으로써 달성할 수 있다. 이들 외인성 폴리뉴클레오티드 서열은 이의 발현을 조절하기 위해 포유류 발현 벡터의 적합한 프로모터의 전사 통제하에 위치될 수 있다. 다른 예에서, 수종의 관련 유전자나 동일 유전자의 다수 카피를 폴리펩타이드 또는 핵산 발현을 증가시키기 위한 수단으로서 사용할 수 있다. 일 예에서, 발현은 DNA 요소, 일 예로 기질-조합 영역(MAR) 또는 스캐폴드-조합 영역(SAR)에 의해 안정화된다.

[0182] 일 예에서, 아데노바이러스 벡터는 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하는 벡터이다. 아데노바이러스 벡터가 벡터로 사용되는 일 예에서, 헬퍼-의존성 아데노바이러스 시스템을 일 예로 미세-장기를 형질전환시키기 위한 치료적 폴리펩타이드 또는 핵산을 발현하는 헬퍼-의존성 아데노바이러스 벡터를 제조하는데 이용할 수 있다. 일 예에서, 그러한 헬퍼-의존성 아데노바이러스 시스템은 헬퍼-의존성 아데노바이러스, 헬퍼 바이러스를 포함하며, 생산자 세포주는 본 발명의 제형 제조에 사용되며, 이러한 내용은 Palmer and Ng, 2003 Mol Ther 8:846 및 Palmer and Ng, 2004 Mol Ther 10:792에 기술되어 있으며, 이들 문헌은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0183] 일 예에서, 293으로 명기된 헬퍼 세포주는 Ad5 DNA 단편에 의해 인간 배아성 신장 세포로부터 형질전환된 것으로 계속적으로 E1 단백질을 발현하는데, 이를 사용하여 복제 불능 아데노바이러스 벡터를 제조 및 증폭시킨다. 다른 예에서, 헬퍼 세포주는 인간 근세포, 조혈세포 또는 그외 인간 배아성 간엽 또는 상피 세포로부터 유래될 수 있다. 또한, 헬퍼 세포는 인간 아데노바이러스를 용인하는 다른 포유류 종의 세포로부터 유래될 수 있다. 이러한 세포로는, 예컨대 Vero 세포, 또는 그외 원숭이 배아성 간엽 또는 상피 세포가 있다.

[0184] 일 예에서, 미세-장기는 수시간 내지 수개월의 범위일 수 있는 기간 동안 생체외에서 유지된다. 일 예에서, 이는 이식 전 수일간, 다른 예로 수주간 유지된다. 이론에 결부되지 않으면서, 일 예로, 상기 인큐베이션은 세포가 바이러스 벡터 형질전이의 결과로서 존재되는 바이러스 단백질, 일 예로 바이러스 캡시드를 처리 및 분해하도록 허용한다. 일 예에서, 이러한 캡시드 단백질의 반감기는 2-3일이고, 일 예로, 가능하더라도 생체외에서는 바이러스 캡시드 단백질을 10일째까지 잔류함ㄴ다. 일 예에서, 바이러스 캡시드의 분해는 본 발명의 제형의 면역원성을 더 감소시키고, 대상 유전자나 유전자들의 발현 수준과 지속 기간을 더 증가시킨다. 다른 예에서, 상기 배양은 일 예로 아데노 유전자 전사체의 부재에서는 24시간 이상으로는 지속되지 않게 될 초기 HD-Ad 벡터-유도성 선천 면역 반응이 시험관내에서 발생하도록 한다. 다른 예에서, 일 예에서 림프구 침투, 다른 예로 Ad-특이적인 CTL의 유도가 지배적으로 특징적인, 전사-컴피턴트 제1-제조-Ad 벡터를 투여한 후 정상적으로 뒷따르는 후기 후천적인 반응은 HD-Ad 벡터에 의해서는 발생되지 않는다.

[0185] 일 예에서, 생체외에서 미세-장기는 바이러스 벡터에 $1.6\text{-}3x10^{9}$ 감염성 입자(ip)/ml, 3-4 $x10^{12}$ 바이러스 입자 수/ml, 또는 $2x10^{11}$ 바이러스 입자 수/ml의 농도로 노출된다. 다른 예에서, 생체외에서 미세-장기는 바이러스 벡터에 $1x10^{3}$ 내지 $1x10^{12}$ 바이러스 입자 수/ml, 다른 예로 $1x10^{3}$ 내지 $1x10^{9}$, 및 다른 예로, $1x10^{6}$ 내지 $1x10^{9}$, 다른 예로 $1x10^{6}$ 내지 $1x10^{12}$ 바이러스 입자 수/ml로 노출된다. 일 예에서, 미세-장기내 개체에 투여되는 바이

러스 입자 수/ 개체의 체중의 용량은 $1x10^{3}$ (바이러스 입자 수/ 개체의 체중) 미만, 다른 예로 $1x10^{2}$ 미만, 다른 예로 $1x10^{1}$ 미만이다.

[0186] 일 예에서, 성장 인자는 미세-장기내 세포 수를 증가시키기 위해 사용된다.

[0187] 일 예에서, 시험관내 발현은 이식하기 전에 분석하여, 발현된 재조합 단백질의 시험관내 또는 생체내 상관 작용 가능성을 가능하게 할 수 있다.

[0188] 본 발명의 일부 예에서, 이식할 유전자 변형된 세포를 포함하여 조직 샘플의 양은, 규제 가이드라인, 구체적인 임상 프로토콜 또는 유사한 개체들에 대한 집단 통계를 기초로 개체에 통상적으로 투여되는 대상 치료제에 해당되는 양, 주입이나 또는 다른 경로를 통해 이전에 투여받은 사례에서 동일한 개체에 대해 특히 관심있는 단백질 등의 치료제에 해당되는 양, 체중, 나이, 신체 상태, 임상 상태, 다른 유사한 개체에 유전자 변형된 세포 투여를 포함한 이전 조직 샘플로부터 수득한 약동학 데이타, 개체에 유전자 변형된 세포 투여를 포함하는 이전 조직 샘플에 대한 반응, 또는 이의 조합 들 중 하나 이상으로부터 결정된다. 따라서, 일 예에서, 하나 이상의 미세-장기에 의한 유전자 산물의 발현 수준은 시험관내에서 결정되며, 시험관내 및 생체내 치료적 폴리펩타이드 또는 핵산의 발현 수준 사이의 관련성이 결정 또는 추정되며, 특정 환자에게 이식할 미세-장기의 수는 계산 또는 추정된 관련성을 기초로 결정된다. 치료제의 용량은 기존에 공지된 바와 같이 조정될 수 있다(WO2004/099363).

[0189] 일 예에서, 미세-장기 또는 유전자 변형된 미세-장기는 이것이 숙주로 이식할 필요가 있을 때까지, 금지된 시간 동안 시험관내에서 유지될 수 있다. 일 예에서, 미세-장기 또는 유전자 변형된 미세-장기는 1-7일, 18일 또는 1-4달 동안 배양 상태로 유지 또는 보관될 수 있다. 다른 예에서, 조직 샘플을 둘러싸고 있는 상층 배지에 둔, 치료제는 분리하여, 동일하거나 또는 상이한 개체에 주입 또는 적용할 수 있다.

[0190] 다르게는 또는 덧붙여, 유전자 변형된 미세-장기는 당업계에 공지된 방법으로 동결 보존될 수 있으며, 그 예로는 조직 샘플로부터 생성된 후 즉시 또는 유전자 변이 후 즉시, 10% DMSO가 포함된 DMEM 중에서의 단계적 동결(0℃, -20℃, -80℃, -196℃)이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0191] 일 예에서, 본 발명의 제형은 미세-장기의 원하는 부위로의 위치화를 발생시키는 방법 또는 경로에 의해 치료 또는 예방되는 질환이나 장애에 걸린 장기나 시스템에 이식될 수 있다. 다른 예에서, 이식된 제형의 위치는 질병이나 장애에 걸린 장기 또는 시스템으로부터 말단(distal)일 수 있다. 따라서, 일 예에서, 재조합 단백질은 국소적으로 방출되며, 다른 예에서, 재조합 단백질은 림프계로 확산되며, 일 예에서 궁극적으로 재조합 단백질의 전신 공급을 유도할 수 있다. 따라서, 본 발명은 필요한 개체의 어떤 부위에 질병 또는 장애의 표현을 치료하기 위한 다양한 농도의 치료 제형의 사용을 제공한다.

[0192] 이러한 측면과 일 예에 있어서, 본 발명의 제형은 종양내에 이식될 수 있다. 다른 예에서, 제형은 종양으로부터 일 예에서 특정 타입의 종양의 전이와 관련있는, 말단 부위에 이식될 수 있다. 다른 예에서, 본 발명의 제형은 개체의 신장에 이식될 수 있으며, 일 예로 피막하(subcapsular) 이식될 수 있다. 다른 예로, 본 발명의 제형은 복강경으로 이식된다.

[0193] 일 예에서, 본 발명의 제형은 일시적인 증상의 신속한 치료를 위한 한번 이식될 수 있거나, 또는 특히 진행성, 재방성 또는 퇴행성 질환의 경우에 2회 이상 이식될 수 있다. 일 예에서, 본 발명의 한가지 이상의 제형을 동시에 투여할 수 있으며, 또는 다른 예로 갈짓자 방식(staggered fashion)으로 투여할 수 있다. 일 예에서, 갈짓자 방식은 질병의 단계(stage) 또는 상(phase)에 의해 결정된다.

[0194] 일 예에서, 미세-장기는 미세-장기의 세포 중 적어도 일부분이 살아있는 상태로 남아있는 방식으로 원하는 위치에 이식된다. 본 발명의 일 예에서, 적어도 약 5% 이상, 본 발명의 다른 예에서 적어도 약 10% 이상, 본 발명의 다른 예에서 적어도 약 20% 이상, 본 발명의 다른 예에서 적어도 약 30% 이상, 본 발명의 다른 예에서 적어도 약 40% 이상, 본 발명의 다른 예에서 적어도 약 50% 또는 그 이상의 세포들이 개체에 투여한 후 살아있는 상태를 유지한다. 개체에 투여한 후 세포의 생존 기간은 짧게는 수시간, 예컨대 24시간 내지 수일에서 길게는 수준 내지 수개월 또는 수년일 수 있다.

[0195] 수여 개체내 미세-장기의 이식은 재조합 산물의 지속적인 투약을 제공한다. 미세-장기는 숙주내 효과적인 삽입을 위해 이식 전에 제조되어, 예컨대 이식된 조직내에서의 혈액 형성을 용이하게 할 수 있다. 따라서, 재조한 산물은 생성된 후 말초 수여 순환에 즉각적으로 전달된다. 또는, 미세-장기는 숙주내 효과적인 삽입과 세포 부착을 예방하기 위해, 이식하게 전에 제조될 수 있다. 혈관 형성을 방지하는 방법의 예로는, 실크나 나일론 또는 예컨대 GORE-TEX 백(Terrill P J, Kedwards S JVI, ana Lawrence J C. (1991) The use of GORE-TEX bags

for hand bums. Burns 17(2): 161-5) 등의 기타 물질로 제조된 상업적으로 이용가능한 세포-투과 직경이 제한된 생물학적 메쉬 백이나, 예컨대 테플론 등의 세포 부착을 방지하는 물질로 코팅된 다른 다공성 막내에 미세-장기가 들어가 있는 것을 포함한다.

[0196] 미세-장기에 의해 생산된 유전자 산물은 이후 예컨대 단백질성 바이오약제 등의 조절성 전달 화합물들, 예컨대 약물에 대해 고안된 폴리머성 장치를 통해 전달될 수 있다. 생분해성 및 비-분해성 폴리머 둘다를 포함하는 다양한 생체적합성 폴리머(하이드로겔 포함)를 이용하여 특정 타겟 부위에 본 발명에 따른 미세-장기의 유전자 산물의 지속적인 방출을 위해 이식을 형성할 수 있다. 이러한 이식 형성은 일반적으로 당업계에 공지되어 있다(예, Concise Encyclopedia of Medical & Dental Materials, ed. By David Williams (MIT Press: Cambridge, Mass., 1990); Sabel et al. 미국 특허 4,883,666; Aebischer et al. 미국 특허 4,892,538; Aebischer et al. 미국 특허 5,106,627; Lim 미국 특허 4,391,909; and Sefton 미국 특허 4,353,888 참조).

[0197] 본 발명에 따른 유전자 변형된 미세-장기의 이식은 표준 외과 기법이나 또는 미세-장기의 투여에 적합한 게이지의 바늘을 이용한 특수 제작된 시린지로 포유류의 의도한 조직 영역에 미세-장기 조제물을 주입함으로써 실시될 수 있다. 다른 예로, 카테터가 미세-장기 이식에 사용된다. 일 예에서, PCT 공개 WO2 04/099363에 기술된 이식 방법이 이용될 수 있으며, 이는 본 발명의 일 예로 간주된다.

[0198] 일 예에서, 미세-장기는 피하, 진피내, 근육내, 복막내 또는 위내에 이식된다. 일 예에서, 용어 이식은 부분층(split-thickness) 피부 이식 또는 전층 피부 이식으로 이식되는 것을 포함한다. 본 발명의 일 예에서, 이식 전 또는 이식하는 동안에 조치를 취하여, 유전적으로 동족이나 이종인 조직(allogeneic and xenogeneic tissue)을 미세-장기의 제조에 이용할 수도 있지만, 이식 거부 반응 및/또는 이식 편대 숙주 질환(GVHD)을 피하기 위해, 이식에 이용되는 공여 미세-장기는 바람직하기로는 수여 포유류의 장기 조직으로부터 제조되거나(즉, 자가), 또는 동계(syngeneic) 포유류의 장기 조직으로부터 제조된다. 본원에서, GYHD는 수여 숙주에 대한 이식 면역 반응에 의해 초래되는 조직 이식(이식(graft))의 결과로 이식 편대 숙주 질환을 의미한다. 보다 구체적으로는, 이식 편대 숙주 질환은 수여체를 외래로 인식하여 숙여체 세포를 공격하는 공여체 T 림프구(T 세포)에 의해 초래된다. 이식 거부 반응이나 GVHD를 예방 또는 완화하기 위한 여러가지 방법들이 당업계에 공지되어 있으며, 본 발명의 방법에 이용될 수 있다. 일 예에서, 숙주에 의해 면역학적 공격을 받을 수 있는, 예컨대 돼지-인간 이식 등의 이조 이식이 사용된, 조직내에서 세포 집단의 이식을 용이하게 하기 위해, 미세-장기는, 재충전 가능하며, 비-생분해성 또는 생분해성의 장치 등의 생체적합성 면역-보호된 물질에 삽입 또는 캡슐화된 후 수여체 개체로 이식될 수 있다.

[0199] 다른 예에서, 이식에 이용되는 공여체 미세-장기는 바람직하기로는 수여체와 인간 변혈구 항원(HLA)가 일치되는 공여체로부터 제조되며, 일 예에서 HLA는 인간에서의 주조직친화성 복합체(major histocompatibility complex)이다. 일 예에서, 공여체와 수요체는 클래스 I 주조직 친화성 복합체(MHC) 유전자, 클래스 II MHC 유전자 또는 이의 조합이 부합된다. 일 예로, 클래스 I MHC 유전자는 HLA-A, HLA-B, 및HLA-C를 포함하며, 일 예로, 클래스 I MHC 유전자의 미스매치는 이식 거부 반응의 위험성을 증가시키며, 일 예로, 클래스 II MHC 유전자는 HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, HLA-DRB1을 포함하여, 일 예로 클래스 II MHC 유전자의 미스매치는 GVHD의 위험성을 증가시킨다. 다른 예에서, 공여체와 수여체는 HLA-DM 및 HLA-DO 유전자가 부합된다.

[0200] 일 예에서, 세포로부터 생체외 바이러스의 턴오버(viral turnover) 또는 소거는 당업계에 공지된 기법, 예컨대 물리적 방법, 일 예로 가열, 항바이러스제의 사용을 통해 강화되는데, 상기 물질은 세포에 의해 바이러스 턴오버 등을 자극한다.

[0201] 일 예에서, 본 발명의 장기 지속형 제형은 핵산이나 폴리펩타이드의 발현 수준과 지속 기간을 증가시키지만, 핵산이나 폴리펩타이드의 발현 수준은 무한정 증가되는 상태는 아니다. 이론에 결부되지 않으며, 일 예로, 본 발명의 장기 지속형 제형에 의해 발현되는 핵산이나 폴리펩타이드의 수준은 재조합 핵산이나 폴리펩타이드를 발현하는 분화된 진피 섬유모세포의 사멸의 결과로서 시간 함수에 따라 감소될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0202] 도 1은 본 발명의 제형에 의해 시험관내에서 생산한 최적화된 재조합 인간 인터페론-α(IFNα)의 생산 수준을 나타낸다.

도 2는 본 발명의 제형에 의해 시험관내에서 생산한 재조합 인간 에리트로포이에틴(hEPO)의 생산 수준을 나타낸다. HD-Ad-CAG-wt-hEPO GMMO 역가(A). 미세-장기에 HD-Ad-CAG-wt-hEPO 바이러스를 1 :25; 1 :100; 및 1:1000 희석으로 희석 수준을 증가시켜 형질전이시켰다. Ad5/CMV/wt-hEPO는 작업 농도 1 :10 및 1:50로 희석하였다.

2개의 상이한 피부 H-I 및 H-2에서 생성된 GMMO 비교(B). 미세-장기에 HD-Ad-CAG-wt-hEPO를 1:25로 형질전이하였다. 막대는 수집하고 3-4일마다 교체한 배양 배지에 대한 ELISA로 측정한 hEPO 농도이다.

도 3은 EPO를 발현하는 gutless 아데노바이러스를 포함하는 최적화된 제형과 EPO-발현성 아데노바이러스-5를 포함하는 미세-장기로부터, 시험관내 에리트로포이에틴(EPO) 피크 발현율은 나타낸다. 미세-장기에 HD-Ad-CAG-hEPO를 1 :25로, 또는 Ad5/CM V/hEPO를 1 : 10으로 형질전이하였다.

도 4는 최적화된 EPO를 발현하는 gutless 아데노바이러스와 최적화되지 않은 EPO를 발현하는 gutless 아데노바이러스를 포함하는 제형으로부터 시험관내 에리트로포이에틴(EPO) 발현율을 나타낸 것이다. 미세-장기에 바이러스 입자를 1:100 희석으로 형질전이하였다. 막대는 막대는 수집하고 3-4일마다 교체한 배양 배지에 대한 ELISA로 측정한 hEPO 농도이다.

도 5는 CAG 또는 CMV 프로모터 하류의 EPO를 발현하는 gutless 아데노바이러스를 포함하는 제형으로부터 시험관내 에리트로포이에틴(EPO) 발현율을 나타낸 것이다.

도 6은 SCID 마우스에서 생체내에서 생산한 재조합 인간 에리트로포이에틴의 생산율(A)과 본 발명의 제형에 의한 시험관내 재조합 인간 에리트로포이에틴의 생산율(B)을 나타낸 것으로, 적혈구 용적률 변화도 함께 나타내었다(A). 그룹 당 10마리의 마우스에 GMMO를 피하 이식하였다. 아데노바이러스-hEPO, 헬퍼-의존성 아데노바이러스-hEPO, 및 헬퍼-의존성 아데노바이러스-최적화된 hEPO로 형질전이된 GMMO와 형질전이되지 않은 GMMO를 이식한 마우스의 혈청에서 측정한 hEPO 수치 (mU/ml)와 대응 적혈구 용적률%를 나타내었다. 혈액은 10일마다 채혈하였다(A). 적혈구 용적률은 원심분리 방법에 의해 측정하고, 혈중 혈청 hEPO 수준은 hEPO ELISA 키트로 측정하였다. 이식하지 않은 GMMO를 배양 상태로 유지시켜, EPO 수준을 측정하였다(B).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0203] 실험 재료 및 방법

[0204] **재료 및 장치 리스트**

[0205] 생산 배지를 사용하여 미세-장기를 생장시켰으며, 생산 배지는 1% 글루타민이 포함되어 있으며 50 μg/ml 젠타마이신(RAFA labs, 주입용)과 0.1% 암포테리신 B(BMS, Fungizone LV.)(배지내 최종 농도 2.5 ㎍/ml 암포테리신 B)이 보충된 DMEM-HEPES 배지(높은 글루코스 4,500 mg/L 및 25 mM HEPES; Hi-Clone Cat# SH3A1448.02)이다. 일부 예에서, 10% 혈청 대체 보충제(SSS, Irvine Scientific, Cat # 99193), 10% 자가 인간 혈청(autologous human serum) 또는 10% 소 태아 혈청(FBS 또는 FCS)을 생산 배지에 첨가하였다.

[0206] **진피 미세-장기의 수득 - 동심의 니들법(concentric needle method)**

[0207] 공여체의 하부 복부 영역으로부터 일정 피부 면적으로부터 인간 진피 미세-장기를 수득하였다. 상피 회수를 방지하지 하기 위해, 얕은 슬릿(1-2 mm 폭)을 과립층 각막(stratum cornea)을 통해 진피로 통과시켜, 미세-장기를 수득하는 피부 영역의 한쪽에서 직선으로 절개하고, 동일한 슬릿으로 첫번째 슬릿과 30 mm 거리로 평행하게 절개하였다. 2개의 슬릿 사이의 거리는 미세-장기의 길이를 결정하며, 실험 전체에서 일관되게 유지되었다.

[0208] 게이지가 가는(전형적으로 22GA) 피하 바늘을 식염수가 든 1 ml 시린지에 꽂고, 첫번째 슬릿에 노출된 진피에 삽입하고, 주사 바늘의 각도를 반대쪽 슬릿에서 진피를 관통하여 존재하도록 하여 반대쪽 슬릿쪽으로 회수 부위의 진피를 따라 이동시켰다.

[0209] 다음으로, 가이드 바늘의 길이방향으로 있는 바깥쪽 피부에 외과 클램프를 끼워넣었다. 진피에 끼워둔 바늘을 약간 들어올려, 이를 둘러싼 주변 피부 부분을 들어올리고, 때로는 삽입한 피하 바늘 지점 아래에 후크형의 장치를 사용하여 끼워넣기 전에 피부를 들어올리는 것을 보조하였다. 이것이 나온 지점으로부터 튀어나오는 가이드 바늘의 끝을 코링 바늘(직경 1-3 mm, Point Technologies, CO USA)의 날카로운 앞쪽 끝 부분쪽으로 삽입하고, 상업적으로 이용가능한 드릴(예, Aesculap Micro Speed GD 650, GD 657)로 고정하였다. 소량의 식염수를 주사기를 통해 코링 바늘로 주사하였다. 드릴을 움직여 코링 바늘을 고속으로 회전(전형적으로 3000-7000 RPM)시키고, 회전시키는 동안에 드릴과 코링 바늘을 수동으로 가이드 바늘의 축에 따라 가압하여, 코링 바늘의 내부 직경과 거의 유사한 외부 직경을 갖는 30-40 mm 길이의 실린더형 진피 코어(진피 미세-장기)를 절개한다. 진피 미세-장기는 통상 가이드 바늘에 접촉된 상태로 유지되며, 코링 바늘 내부로부터 배출되어 (전술한)생산 배지로 이동되며, 코링 바늘은 피부에서 빼낸다.

[0210] 핀셋을 이용하여, 각 미세-장기를 1000 ㎕의 생산 배지가 있는 24 웰 플레이트의 각 표시한 하나의 웰로 이동시

킨다. 찌꺼기를 제거하기 위해, 각 미세-장기에 대해 2번의 배지 1000 ㎕ 교체를 수행한다. 생산 배지 1000 ㎕ 중에 있는 미세-장기가 든 플레이트는 인큐베이터로 이동시키고, 24시간의 회복 기간동안 32℃, 10% CO_2, 및 ~95% 습도에서 평형화한다.

[0211] **바이러스 형질전이**

[0212] 각 미세-장기는 바이러스를 유지하는데 필요한 유액의 총 부피가 보다 적게드는 48웰 플레이트의 웰로, 형질전이하기 위해 이동시켰다. 미세-장기 내부에 교란을 일으키지 않으면서 각 웰에서 배지를 조심스럽게 제거하였다. 전임상 실험을 수행하는 동안, 각각 재조합 인간 EPO 유전자, 최적화된 재조합 인간 EPO 유전자 또는 최적화된 IFN-α 유전자를 포함하고 있는, 3가지의 상이한 벡터: 1.6-3 x 10^9 감염성 입자(ip)/ml 제1 세대 아데노바이러스(Molecular Medicine), 약 3-4 x 10^{12} 바이러스 입자/ml 헬퍼-의존성 아데노바이러스 (Baylor), 또는 약 2 x 10^{11} 바이러스 입자/ml 아데노 부속 바이러스(University of Pennsylvania)를 시험하였고, 각각 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:500, 또는 1:1000으로 FCS 첨가 또는 무첨가된 DMEM-HEPES (Gibco Cat# 42430-025)로 희석하였다. 48웰 플레이트의 각 웰에 바이러스 희석 역가들 중 하나의 100 ㎕를 넣었다. 플레이트는 CO_2 인큐베이터에 넣고, 2시간 동안 300 rpm으로 디지탈 마이크로타이터 교반기에서 교반한 다음 교반하지 않고 16-22시간 인큐베이션하여, 형질전이를 조장하였다.

[0213] 형질전이된 미세-장기는 형질전이 후 24-웰 플레이트에 이동시키고, 1 mL의 생산 배지(FCS 무첨가)로 3번 세정하여 형질전이되지 않은 바이러스 입자들은 제거하였다. 세정 후, 바이오펌프를 1 mL 생산 배지에서 표준 고습도 CO_2 인큐베이터에서 95% 습도, 10% CO_2, 및 32℃의 조건하에서 유지시켰다. 바이러스 벡터 제거 후 72 시간 후, 생산 배지를 신선한 배지로 교환하고, 사용한 배지의 분획으로 분비된 재조한 단백질 수준을 평가하였다.

[0214] **생체외 미세-장기 유지**

[0215] 3-4일 마다 사용한 생산 배지를 취하여, 분비된 재조합 단백질과 글루코스 수준을 바이어펌프의 생존과 함께 분석하였다. 신선한 생산 배지를 24웰 플레이트에 첨가하였다.

[0216] **분비된 단백질 측정**

[0217] 인간 EPO(hEPO)와 IFNα 농도 및 분비율을 효소-연결된 면역흡착 분석(ELISA) 키트(Quantikine human erythropoietin; R&D Systems; Human interferon alpha ELISA kit, PBL Biomedical Laboratories)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 분석하였다.

[0218] **글루코스 측정**

[0219] 조직의 글루코스 소비는 시그마-알드리치사의 GAGO20 Glucose (GO) 분석 키트를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 분석하였다.

[0220] **적혈구 용적률 측정**

[0221] 조직의 글루코스 소비는 시그마-알드리치사의 GAGO20 Glucose (GO) 분석 키트를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 분석하였다.

[0222] 적혈구 용적률 수준은 당업계에 공지된 바와 같이 국립 임상 실험 표준 위원회(NCCLS) 로부터 추천된 기준 방법으로 원심분리를 이용하여 분석하였다. 적혈구 용적률을 측정하기 위해, 시험관내 전체 혈액을 10-15,000 xg로 5분간 원심분리하여 적색 세포를 펠렛화하고(팩킹된 적혈구라 함), 모세관에서의 샘플의 총 길이에 대한 팩킹된 적혈구의 컬럼의 비를 원심분리한 후 10분 이내에 그래픽 리딩 장치로 측정하였다.

[0223] **미세-장기 이식**

[0224] 일부 실험들에서, 유전자 변형된 미세-장기나 또는 대조군 미세-장기를, 미세-장기의 생존성을 확인하기 위해 조직 글루코스 소비를 분석한 후 SCID(Severe Combined ImmunoDeficiency) 마우스에 피하 이식하였다. 체중 25g의 수컷 및 암컷 SCID 마우스를 140 ㎕의 희석한 Ketaset(ketamine HCl)(400 ㎕ Ketaset 및 600 ㎕ 식염수)로 마취하고, 대조군 또는 EPO를 발현하는 미세-장기를 미세-장기 형질전이 후 10일째에 피하 이식하였다.

[0225] **실시예 1**

[0226] **GMMO에 의한 시험관내 EPO 및 IFNα 생산 수준**

[0227] 미세-장기를 전술한 바와 같이 준비하고, 전술한 바와 같이 CAG 프로모터에 연결된 최적화된 IFNα 유전자를 발현하는 헬퍼-의존성 아데노바이러스 벡터로 형질전이하였다. 그 후, GMMO는 배양으로 유지시키고, 생산된 IFNα 수준을 ELISA로 평가하였다. 최적화된 IFNα를 발현하는 미세-장기는 수득 후 적어도 40일 동안 IFNα를 시험관내에서 1000 ng/day 이상으로 생산하였고(도 1), 재조합 hEPO를 발현하는 미세-장기는 수득 후 적어도 142일 동안 hEPO를 시험관내에서 1000 ng/day 이상으로 생산하였다(도 2A-B).

[0228] 최적화된 hEPO를 코딩하는 gutless 아데노바이러스 벡터를 포함하는 GMMO는 hEPO를 코딩하는 아데노바이러스-5 벡터를 포함하는 미세-장기에 비해, 200일 이상 동안 보다 높은 피크 발현율을 유지하였다(도 3). 또한, 최적화된 hEPO를 코딩하는 gutless 아데노바이러스 벡터를 포함하는 미세-장기는 최적화되지 않은 hEPO를 코딩하는 gutless 아데노바이러스 벡트를 포함하는 미세-장기 보다 오랫동안 보다 높은 피트 발현율을 유지하였다(도 4). 마지막으로, CAG 프로모터의 하류에 hEPO를 코딩하고 있는 gutless 아데노바이러스 벡터를 포함하는 미세-장기는, CMV 프로모터 하류에 hEPO를 코딩하고 있는 gutless 아데노바이러스 벡터를 포함하는 미세-장기와 비교하여, hEPO를 보다 높은 수준으로 발현하였으며, 형질전이 후 경과 시간에 대한 함수로서 점점 현저하게 증가하였다(도 5).

[0229] **실시예 2**

[0230] **이식된 SCID 마우스의 혈청 및 시험관내에서 유지시킨 인간 EPO를 발현하는 GMMO에** 의한 EPO 생산 수준

[0231] EPO를 발현하는 미세-장기를 전술한 바와 같이 준비하였다. 총 9일간 배양한 후, 미세-장기 당 EPO 생산량을 측정하고, 이 수치로 각 마우스가 EPO를 등가 수준으로 발현하는 미세-장기로 이식되었는지를 결정하였다. 10일째에, 2개의 미세-장기를 각 SCID 마우스에 피하 이식하였고, 10일 후 1차 측정시, SCID 마우스의 혈청에서 측정한 hEPO 수치는 기저 수준 보다 훨씬 높은 것으로 나타났다. 이식후 적어도 216일동안 이러한 수준은 높게 유지되었고, 적어도 157일 간 SCID 마우스에서 헤마토크랫 수치도 현저하게 증가되었다 (도 6A). 이식한 EPO-발현성 미세-장기와 동시에 동일한 공여체로부터 제조하였지만 시험관내에서 유지시킨, 이식되지 않은 EPO를 발현하는 미세-장기에서는 EPO 생산이 높은 수준으로 유지되었다(도 6B). 최적화된 hEPO 유전자를 포함하는 벡터로 형질전이된 미세-장기는 재조합 hEPO 유전자로 형질전이한 미세-장기 보다 생체내(도 6A) 및 시험관내(도 6B) 모두에서 EPO를 보다 높은 수준으로 생산하였다. 비-EPO-생산성 미세-장기가 이식된 대조군 SCID 마우스에서는 이식 전과 비교하여 미세-장기 이식후 혈청 EPO 수준 증가와 헤마토크랫 수준의 현저한 변화는 관찰되지 않았다(도 6A). 양성 대조군으로 사용한 EPO-발현성 아데노바이러스-5를 포함하는 미세-장기는, EPO-발현성 최적화된 아데노바이러스 또는 비-최적화된 gutless 아데노바이러스를 포함하는 미세-장기가 1:100 역가인데 비하여, 1:10 역가로 사용하였다.

[0232] **실시예 3**

[0233] **임상 실험에서 유전자 변형된 미세-장기-이식를 이식한 인간에서의 EPO 생산율**

[0234] 기존 방법에 따라 임상 실험을 수행하였으나, 미세-장기는 전술한 바와 같이 수득 및 유전자 변형시켰다(Lippin et al., 2005, Blood 106(7):2280-6, 문헌은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함됨).

[0235] 1상 임상 실험은 15명의 만성 신장 질환을 앓고 있는 투석을 시행하지 않고 있는 빈혈 환자에게 본 발명의 지속형 타입의 자가 hEPO-GMMO를 이식하여, 이스라엘에서 수행된다. 1회 GMMO-hEPO 이식 시술로, 4-6개월간의 효과적인 EPO 치료를 제공할 것으로 예상된다. I/II 상 GMMO hEPO 실험에 대한 승인은 이스라엘의 보건부로부터 승인받아, 하다사흐 의학부에서 수행된다. 필요한 규제 및 임상 표준과 관련된 모든 단계들은 US를 기반으로 한 임상 실험을 실시하기 위해 FDA에 따랐다.

[0236] 계획한 임상 실험의 준비로, SCID 마우스에서 필요한 전임상 독성 연구를 수행한다. 이러한 연구들은 종래에 기술된 바와 같이 수행하며(Brill- Almon et al. Molecular Therapy 12(2), 274-282), 20일 이상의 시간포인트를 추가하였다. 임상 실험용 HD-Ad-hEPO 벡터는 환자를 대상으로한 이의 사용에 필요한 FDA 가이드라인(GMP)에 순응되게 FDA GMP 준수 업체에서 준비한다. GMMO는 4 내지 6달 동안 이식되고, 실험 종료시 적출 또는 제거하거나, 또는 윤리 위원회로부터 승인된 PI까지 요청을 받는다면 연장될 수 있다.

[0237] 표 1에 나타낸 바와 같이, 독성 실험은 3 그룹의 SCID 마우스로 이루어지며, 각각 동수의 수컷 및 암컷 개체가 포함된다. SCID 마우스의 높은 사망율로 인해, 동물의 최대수가 각 그룹에 기재된다.

표 1

[0238] 실험 설계

GMMO 투여량	마우스의 총 수	마우스의 사망 수, 8주	마우스의 사망 수, 16주	마우스의 사망 수, 24주
100-150 IU Epo/day	30 (17M, 17F)	5M, 5F	5M, 5F	5M, 5F
300-450 IU Epo/day	30 (17M, 17F)	5M, 5F	5M, 5F	5M, 5F
대조군 - 비 형질전이	30 (17M, 17F)	5M, 5F	5M, 5F	5M, 5F

[0239] 제1 그룹에서, 각 동물에는 대부분 30mm hEPO GMMO 또는 100-150 IU EPO/day를 분비할 것으로 보이는 GMMO의 일부분을 제공한다. 각 마우스의 체중은 약 25 g이므로, 투여량은 마우스 체중 1 kg 당 4,000-6000 IU/day에 해당된다(인간 환자에게 이식할 것으로 예상되는 최고 투여량 보다 25배 이상임). 이식된 조직의 크기는 통상 GMMO의 작은 크기와 이의 취급시 충격으로 인해 전체 GMMO 크기의 1/4 이상에 상응한다.

[0240] 제2 그룹에서, 각 동물에는 대부분 30mm hEPO GMMO 또는 300-450 IU EPO/day를 분비할 것으로 보이는 GMMO의 일부분을 제공한다. 각 마우스의 체중은 약 25 g이므로, 투여량은 마우스 체중 1 kg 당 12,000-18,000 IU/day에 해당된다(인간 환자에게 이식할 것으로 예상되는 최고 투여량 대비 80- 120배 이상임).

[0241] 제3 그룹에서, 각 동물에는 30mm 진피 비-형질전이한 GMMO 중 1/3(10mm)을 제공한다.

[0242] ***투약 설명:*** 이식하기 전 GMMO-hEPO 투약은 시험관내 GMMO에 의해 생산된 단백질의 실제 1일 양을 측정한 후 GMMO의 수나 크기로 조정함으로써 조절된다. 상기에 개략적으로 나타낸 실험 프로토콜에서, 미세-장기는 임상 실험에 사용한 것과 유사한 바이러스 역가로 형질전이하고, 이로써 GMMO에서 세포는 유사한 다수 바이러스에 노출된다. 이들 GMMO에 의해 생산되는 hEPO의 전형적인 분비 수준은 1일 당 300 - 1000 lU/Biopump이다. 따라서, 1.0 cm에 해당되는 1/3 BP와 2.0 cm에 해당되는 2/3 BP로부터 분비될 것으로 예상되는 EPO의 최저량은 각각 약 100 및 200 IU이다. 투여량은 0.5 cm 보다 짧은 단편의 이식에 의해 마우스에서 낮출 수 있다.

[0243] 본 발명자들의 이전의 임상 실험의 결과를 토대로, 약 1500-3500 IU/70 kg 환자(또는 1-3 GMMO)가 레티큘로사이트의 지속적인 생산을 야기하는데 적절할 것으로 예상되며, 적혈구 용적률을 상승시킬 것이다. 따라서, 단회 GMMO 또는 25 gr 마으스로 이식된 GMMO의 단편에서 EPO의 100 IU 분비는, 인간 환자에서 이식시 예상되는 최대 예상 투여량에 적어도 25배 또는 그 이상이다. 따라서, 본 실험에서 GMMO를 1/4 이상으로 이용하여, 마우스에서 GMMO-EPO의 독성 효과를 테스트하기 위한 충분한 안전성 한계를 제공하며, 임상 투여량을 뒷받침한다.

[0244] 본 발명자들이 입증한 바와 같이, 다수의 인간 복막 피부 샘플 GMMO로부터 hEPO 분비 수준은 대략 300 - >1000 IU/day이었다. 동일한 피부 샘플 유래의 GMMO에서의 분비 수준은 비슷하지만, 상이한 피부 샘플들간의 가변성은 더 높았다. 본 발명자들이 기술한 바와 같이, 투약 가변성은 GMMO를 마우스에 이식하기 전에 이식 전 시험관내 분비 수준 측정에 의해 검토된다. 조직학적 연구를 제외한 전체 실험들은 GLP 하에서 행해질 것이다. 조직학적 연구는 공인된 전문 병리학자에 의해 맹검 검토될 것이다. 수행되는 테스트는 하기와 같다:

[0245] 임상 신호: 매일

[0246] 체중: 2일 마다

[0247] 장기 무게: 심장, 간, 신장, 비장, 뇌, 흉선(발견되는 경우)은 최종 치사시에 결정됨

[0248] 임상 화학: 최종 치사시

[0249] 전체 혈액학적 프로파일: 최종 치사시. 혈청 hEPO 수준과 적혈구 용적률 분석이 포함됨

[0250] 임상 병리: 최종 치사시

[0251] 조직 검사에 포함되는 항목: 이식한 부위, 간, 신장, 림프구, 심장, 비장, 골수 및 괴사과 골수에서 발견되는 모든 병변은 최종 치사시 수행됨

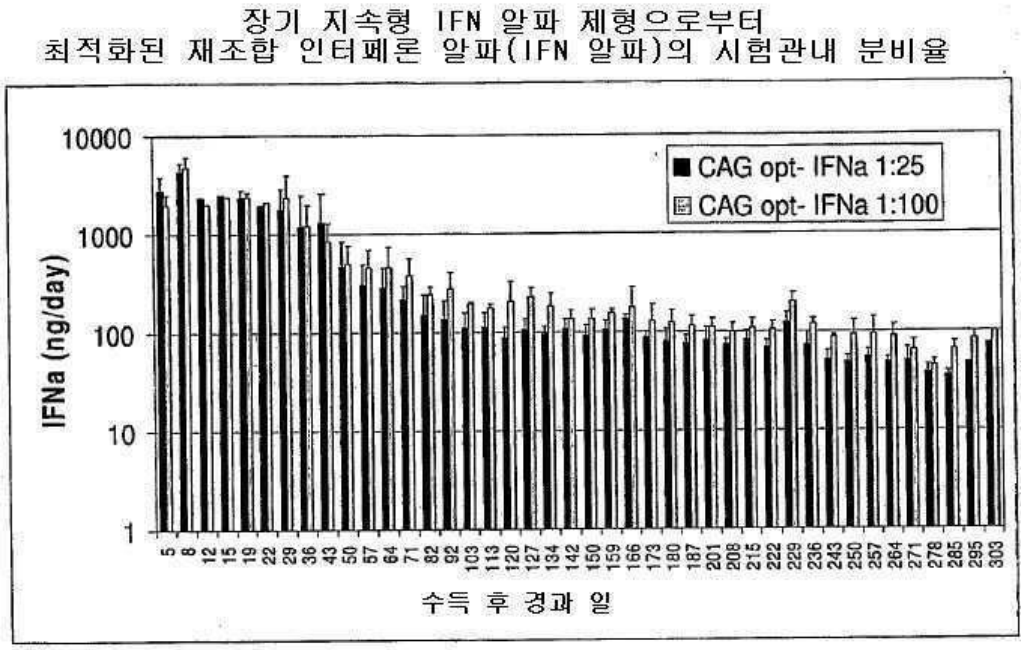
[0252] 그외 다른 모든 장기는 이후의 분석을 위해 보존될 것이다.

[0253] 신속하게 교체되는 세포 또는 세포의 일시적인 형질전이를 포함하는 다른 방법과는 대조적으로, 본 발명의 장기 지속형 EPO 제형은 더이상 복제하지 않는 세포를 포함한다. 따라서, EPO 제형은 안정적인 구조체로부터 안정적

인 단백질을 생산하며, 이미 특정화된 단백질을 계속적으로 생산할 것으로 예상된다.

도면

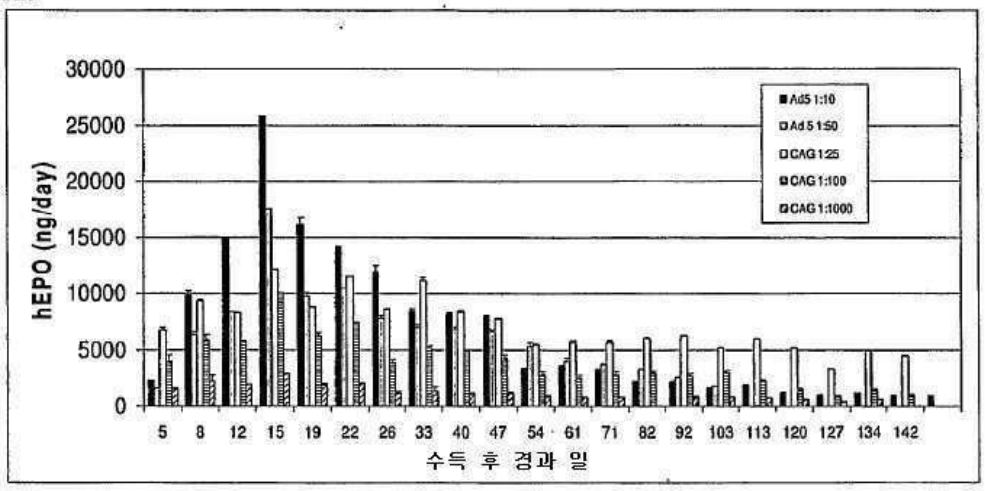
도면1



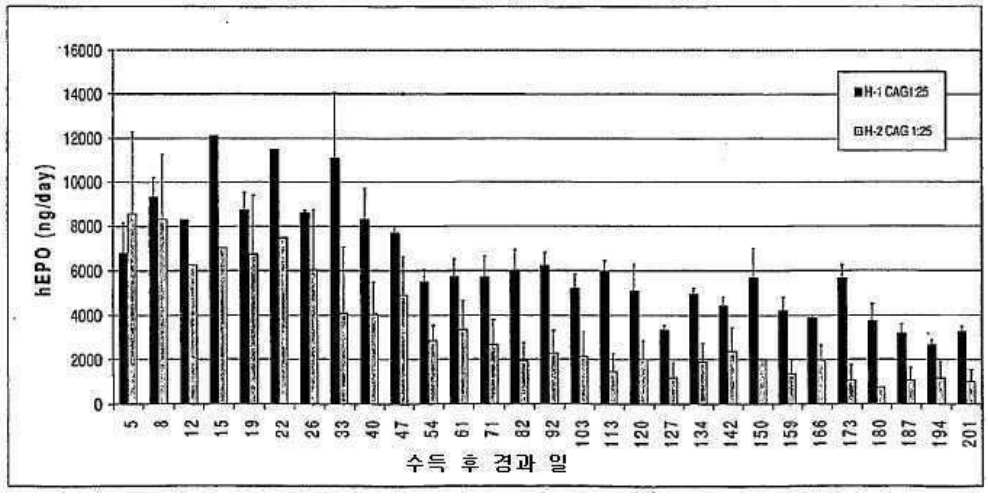
도면2

장기 지속형 EPO 제형으로부터
에리트로포이에틴(EPO)의 시험관내 분비율

A.

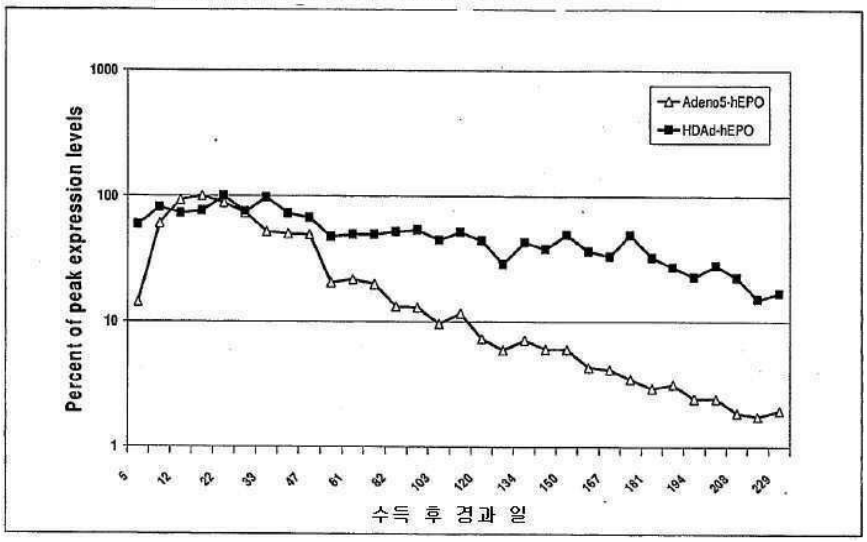


B.



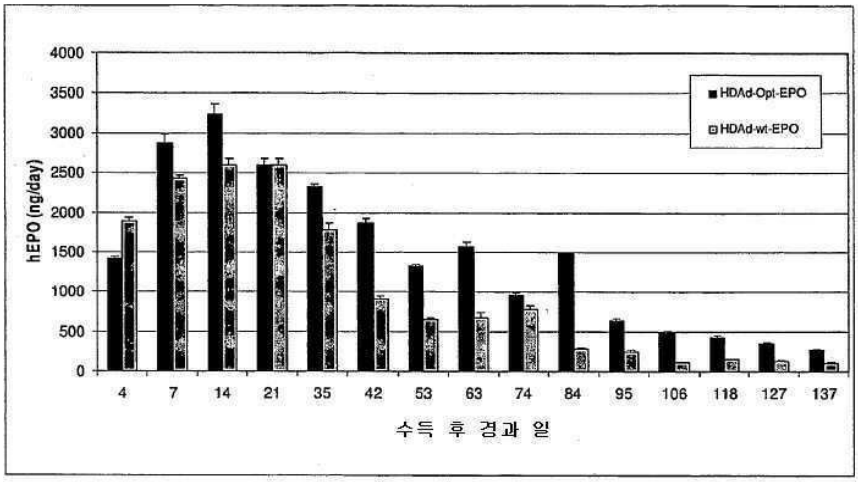
도면3

EPO-발현성 아데노바이러스-5를 포함하는 미세-장기와
EPO-발현성 gutless 아데노바이러스를 포함하는 최적화된 제형으로부터
시험관내 에리트로포이에틴(EPO)의 발현 수준



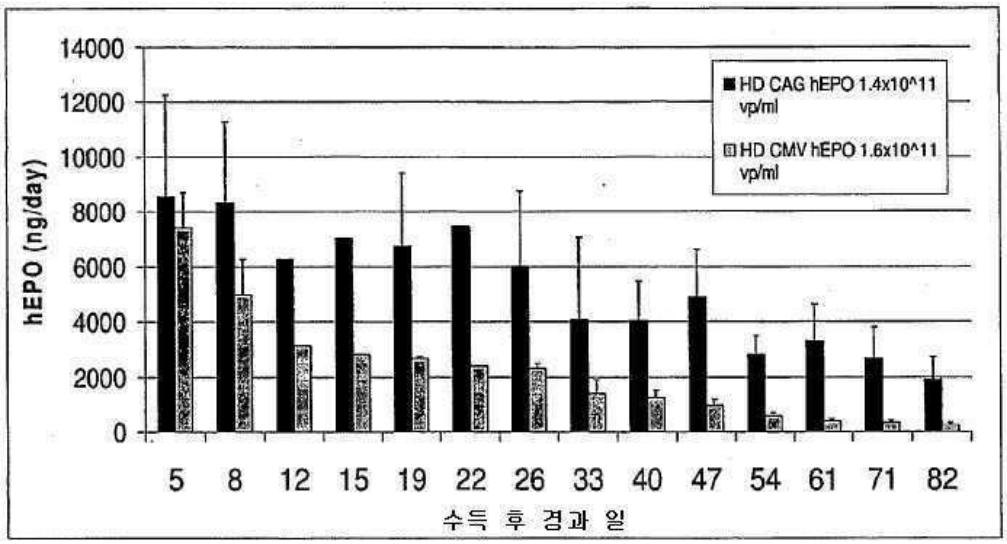
도면4

최적화된 EPO-발현성 gutless 아데노바이러스 및
최적화되지 않은 EPO-발현성 gutless 아데노바이러스를 포함하는 제형으로부터
시험관내 에리트로포이에틴(EPO)의 발현 수준 비교



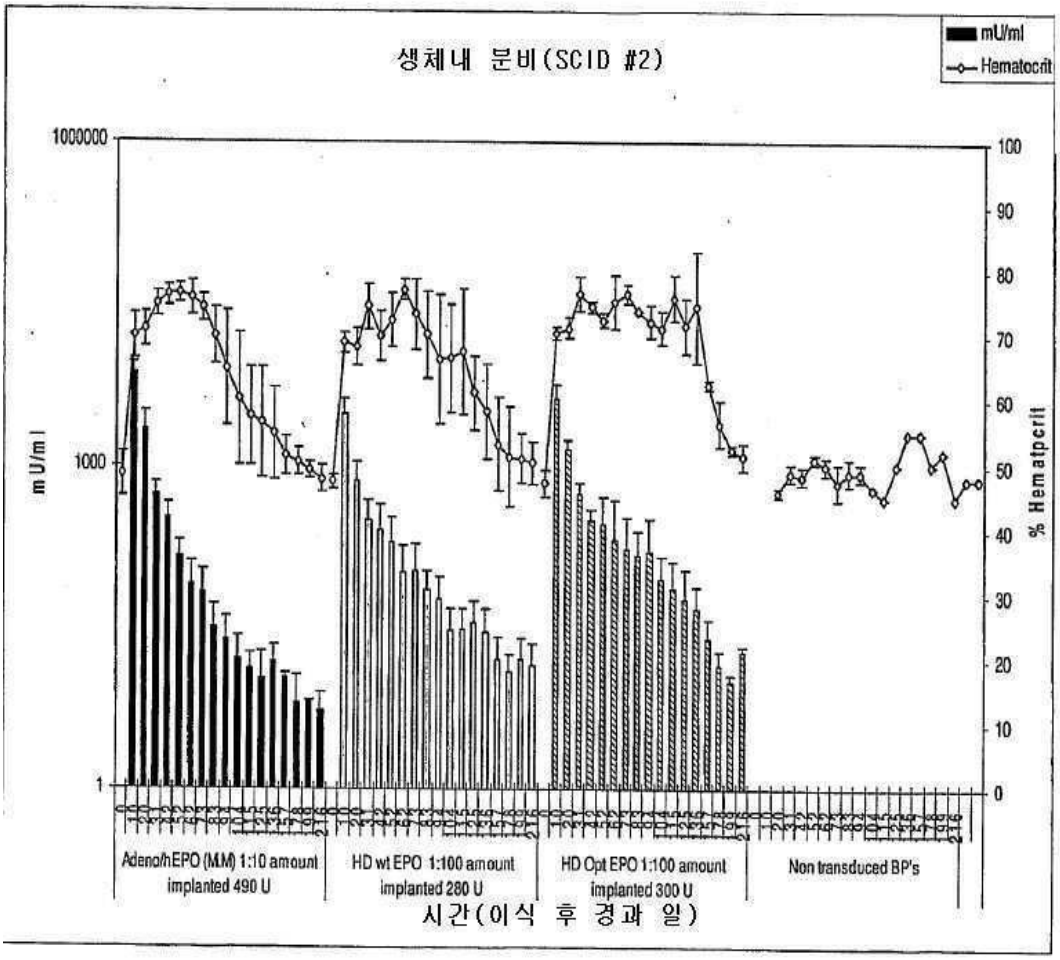
도면5

CAG 또는 CMV 프로모터의 하류에 EPO-발현성 gutless 아데노바이러스를 포함하는 제형으로부터 에리트로포이에틴(EPO)의 시험관내 발현 수준

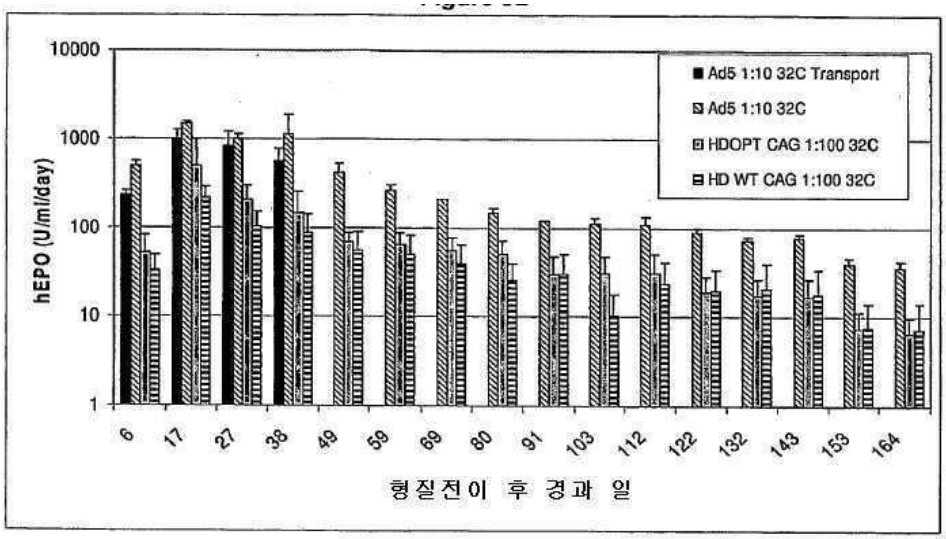


도면6a

미세-장기를 포함하는 제형으로 이식된 SCID 마우스(A)에 의해 생체내에서 생산되거나, 또는 이식되지 않은 제형에 의해 시험관내에서 생산되는(B) 에리트로포이에틴(EPO)의 수준과 적혈구 용적률(%)



도면6b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Pearlman, Andrew L.

<120> LONG LASTING DRUG FORMULATIONS

<130> P-8802-PC

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 582

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> optimized variation of human EPO

<400> 1

atgggcgtgc acgagtgccc cgcctggctg tggctgctgc tgtccctgct gtctctgccc 60

ctgggcctgc ctgtgctggg agcccctccc cggctgatct gcgacagccg ggtgctggaa 120

agatacctgc tggaagccaa agaggccgag aacatcacca ccggctgcgc cgagcactgc 180

agcctgaacg agaatatcac cgtgcccgac accaaggtga acttctacgc ctggaagcgg 240

atggaagtgg gccagcaggc cgtggaagtg tggcagggcc tggccctgct gtccgaggcc 300

gtgctgagag ggcaggccct gctggtgaac agcagccagc cctgggagcc tctgcagctg 360

cacgtggaca aggccgtgag cggcctgcgg agcctgacca ccctgctgag ggccctgggc 420

gcccagaaag aggccatcag ccccccctgat gccgcctctg ccgcccctct gcggaccatc 480

accgccgaca ccttccggaa gctgttccgg gtgtacagca acttcctgcg gggcaagctg 540

aagctgtaca ccggcgaggc ctgccggacc ggcgatcgct ga 582

<210> 2

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> optimized variation of human IFN alpha 2b

<400> 2

ggcgcgccaa gcttgcatgc ctgcaggtcg actctagact gccatggccc tgaccttcgc 60

cctgctggtg gccctgctgg tgctgtcctg caagagcagc tgcagcgtgg gctgcgacct 120

gccccagacc cacagcctgg gcagccggcg gaccctgatg ctgctggccc agatgcggcg 180

gatcagcctg ttcagctgcc tgaaggaccg gcacgacttc ggcttccccc aggaagagtt 240

cggcaaccag ttccagaagg ccgagaccat ccccgtgctg cacgagatga tccagcagat 300

cttcaacctg ttcagcacca aggacagcag cgccgcctgg gacgagaccc tgctggacaa 360

gttctacacc gagctgtacc agcagctgaa cgacctggaa gcctgcgtga tccagggcgt 420

gggcgtgacc gagaccccc tgatgaaaga ggacagcatc ctggccgtgc ggaagtactt 480

ccagcggatc accctgtacc tgaaagagaa gaagtacagc ccctgcgcct gggaagtggt 540

gcgggccgag atcatgcgga gcttcagcct gagcaccaac ctgcaggaaa gcctgcggag 600

caaagagtga ggatccccgg gtaccgagct cgaattctta attaa 645

<210> 3

<211> 4684

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Sequences from adenovirus, CMV, and variation of human EPO

<400> 3

catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt 60

ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt 120

gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg 180

gtgtgcgccg gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgcg gttttaggcg gatgttgtag 240

taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga 300

agtgaaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tatttgtcta gggccgcggg 360

gactttgacc gtttacgtgg agactcgccc aggtgttttt ctcaggtgtt ttccgcgttc 420

cgggtcaaag ttggcgtttt attattatag tcagctgacg tgtagtgtat ttatacccgg 480
tgagttcctc aagaggccac tcttgagtgc cagcgagtag agttttctcc tccgagccgc 540
tccgacaccg ggaggcgcgc cctcgagcta gctgttgaca ttgattattg actagttatt 600
aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat 660
aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca ttgacgtcaa 720
taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg 780
agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc 840

cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag tacatgacct 900
tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga 960
tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg ggatttccaa 1020
gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc 1080
caaaatgtcg taacaactcc gccccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacggtggg 1140
aggtctatat aagcagagct cgtttagtga accgtaagct tgcatgcctg caggtcgact 1200
ctagactgcc atgggcgtgc acgagtgccc cgcctggctg tggctgctgc tgtccctgct 1260

gtctctgccc ctgggcctgc ctgtgctggg agcccctccc cggctgatct gcgacagccg 1320
ggtgctggaa agatacctgc tggaagccaa agaggccgag aacatcacca ccggctgcgc 1380
cgagcactgc agcctgaacg agaatatcac cgtgcccgac accaaggtga acttctacgc 1440
ctggaagcgg atggaagtgg gccagcaggc cgtggaagtg tggcagggcc tggccctgct 1500
gtccgaggcc gtgctgagag ggcaggccct gctggtgaac agcagccagc cctgggagcc 1560
tctgcagctg cacgtggaca aggccgtgag cggcctgcgg agcctgacca ccctgctgag 1620
ggccctgggc gcccagaaag aggccatcag ccccccctgat gccgcctctg ccgcccctct 1680

gcggaccatc accgccgaca ccttccggaa gctgttccgg gtgtacagca acttcctgcg 1740
gggcaagctg aagctgtaca ccggcgaggc ctgccggacc ggcgatcgct gaggatcccc 1800
gggtaccgag ctcgaattct ttgtagaggt tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct 1860
ccccctgaac ctgaaacata aaatgaatgc aattgttgtt gttaacttgt ttattgcagc 1920
ttataatggt tacaaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaaataaag catttttttc 1980
actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcgatatcgg cgcgccgggc 2040
ccctacgtca cccgccccgt tcccacgccc cgcgccacgt cacaaactcc acccccctcat 2100

tatcatattg gcttcaatcc aaaataaggt atattattga tgatggccgc agcggcccct 2160

ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg 2220

gcgaatggga cgcgccctgt agcggcgcat taagcgcggc gggtgtggtg gttacgcgca 2280

gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccctag cgcccgctcc tttcgctttc ttcccttcct 2340

ttctcgccac gttcgccggc tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt 2400

tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggt gatggttcac 2460

gtagtgggcc atcgccctga tagacggttt ttcgcccttt gacgttggag tccacgttct 2520

ttaatagtgg actcttgttc caaactggaa caacactcaa ccctatctcg gtctattctt 2580

ttgatttata agggattttg ccgatttcgg cctattggtt aaaaaatgag ctgatttaac 2640

aaaaatttaa cgcgaatttt aacaaaatat taacgcttac aatttaggtg gcacttttcg 2700

gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc 2760

gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag 2820

tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc ctttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt 2880

tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt 2940

gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga 3000

acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat 3060

tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga 3120

gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag 3180

tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg 3240

accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg 3300

ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt 3360

agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg 3420

gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc 3480

ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg 3540

tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac 3600

ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact 3660

gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa 3720

acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa 3780

aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg 3840

atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc 3900

gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actcttttc cgaaggtaac 3960

tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca 4020

ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt 4080

ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc 4140

ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg 4200

aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc 4260

cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac 4320

gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct 4380

ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc 4440

cagcaacgcg gccttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt 4500

tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac 4560

cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg 4620

cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca ggggccgctg 4680

cggc 4684

<210> 4

<211> 5261

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Sequences from adenovirus, CAG, and variation of human EPO

<400> 4

catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt 60

ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt 120

gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg 180

gtgtgcgccg gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgcg gttttaggcg gatgttgtag 240

taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga 300

agtgaaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tatttgtcta gggccgcggg 360

gactttgacc gtttacgtgg agactcgccc aggtgttttt ctcaggtgtt ttccgcgttc 420

cgggtcaaag ttggcgtttt attattatag tcagctgacg tgtagtgtat ttatacccgg 480

tgagttcctc aagaggccac tcttgagtgc cagcgagtag agttttctcc tccgagccgc 540

tccgacaccg ggaggcgcgc cctcgagcta gcccctagtt attaatagta atcaattacg 600

gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc 660

ccgcctggct gaccgcccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc 720

atagtaacgc caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact 780

gcccacttgg cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgcccccctat tgacgtcaat 840

gacggtaaat ggcccgcctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact 900

tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tcgaggtgag ccccacgttc 960

tgcttcactc tccccatctc ccccccctcc ccacccccaa ttttgtattt atttatttt 1020

taattatttt gtgcagcgat gggggcgggg ggggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg 1080

gggcggggcg aggggcgggg cggggcgagg cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc 1140

ggcgcgctcc gaaagtttcc ttttatggcg aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag 1200

cgaagcgcgc ggcgggcggg agtcgctgcg cgctgccttc gccccgtgcc ccgctccgcc 1260

gccgcctcgc gccgcccgcc ccggctctga ctgaccgcgt tactcccaca ggtgagcggg 1320

cgggacggcc cttctcctcc gggctgtaat tagcgcttgg tttaatgacg gcttgtttct 1380

tttctgtggc tgcgtgaaag ccttgagggg ctccgggagc gccggcagga aggaaatggg 1440

cggggagggc cttcgtgcgt cgccgcgccg ccgtcccctt ctccctctcc agcctcgggg 1500

ctgtccgcgg ggggacggct gccttcgggg gggacggggc agggcggggt tcggcttctg 1560

gcgtgtgacc ggcggctcta gagcctctgc taaccatgtt catgccttct tctttttcct 1620

acagctcctg ggcaacgtgc tggttattgt gctgtctcat cattttggca aagaattgat 1680

taattcgagc gaacgcgtcg agtcgctcgg tacgatttaa attgaattgg gctcgagatc 1740

tgcgatctaa gtaagcttgc atgcctgcag gtcgactcta gactgccatg ggcgtgcacg 1800

agtgccccgc ctggctgtgg ctgctgctgt ccctgctgtc tctgcccctg ggcctgcctg 1860

tgctgggagc ccctccccgg ctgatctgcg acagccgggt gctggaaaga tacctgctgg 1920

aagccaaaga ggccgagaac atcaccaccg gctgcgccga gcactgcagc ctgaacgaga 1980

atatcaccgt gcccgacacc aaggtgaact tctacgcctg gaagcggatg gaagtgggcc 2040

agcaggccgt ggaagtgtgg cagggcctgg ccctgctgtc cgaggccgtg ctgagagggc 2100

aggccctgct ggtgaacagc agccagccct gggagcctct gcagctgcac gtggacaagg 2160

ccgtgagcgg cctgcggagc ctgaccaccc tgctgagggc cctgggcgcc cagaaagagg 2220

ccatcagccc ccctgatgcc gcctctgccg cccctctgcg gaccatcacc gccgacacct 2280

tccggaagct gttccgggtg tacagcaact tcctgcgggg caagctgaag ctgtacaccg 2340

gcgaggcctg ccggaccggc gatcgctgag gatccccggg taccgagctc gaattctttg 2400

tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa 2460

tgaatgcaat tgttgttgtt aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 2520

atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt 2580

ccaaactcat caatgtatcg atatcggcgc gccgggcccc tacgtcaccc gccccgttcc 2640

cacgccccgc gccacgtcac aaactccacc ccctcattat catattggct tcaatccaaa 2700

ataaggtata ttattgatga tggccgcagc ggcccctggc gtaatagcga agaggcccgc 2760

accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatgggacgc gccctgtagc 2820

ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc 2880

gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc tcgccacgtt cgccggcttt 2940

ccccgtcaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac 3000

ctcgacccca aaaaacttga ttagggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag 3060

acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa 3120

actggaacaa cactcaaccc tatctcggtc tattcttttg atttataagg gattttgccg 3180

atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac 3240

aaaatattaa cgcttacaat ttaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccctа 3300

tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat 3360

aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc 3420

ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcacccagaa acgctggtga 3480

aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca 3540

acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt 3600

ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg 3660

gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc 3720

atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata 3780

acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt 3840

tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag 3900

ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca 3960

aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg 4020

aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg 4080

ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag 4140

atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg 4200

aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag 4260

accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga 4320

tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaaat cccttaacgt gagttttcgt 4380

tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc 4440
tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc 4500
cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac 4560
caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac 4620
cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 4680
cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct 4740
gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 4800

acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt 4860
atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg 4920
cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt 4980
gatgctcgtc agggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt 5040
tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg 5100
tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg 5160
agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa ccgcctctcc 5220

ccgcgcgttg gccgattcat taatgcaggg gccgctgcgg c 5261

<210> 5
<211> 4669
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Sequences from adenovirus, CMV, and variation of human IFN alpha 2b
<400> 5

catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt 60
ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt 120
gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg 180
gtgtgcgccg gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgcg gttttaggcg gatgttgtag 240

taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga 300
agtgaaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tatttgtcta gggccgcggg 360
gactttgacc gtttacgtgg agactcgccc aggtgttttt ctcaggtgtt ttccgcgttc 420
cgggtcaaag ttggcgtttt attattatag tcagctgacg tgtagtgtat ttatacccgg 480

tgagttcctc aagaggccac tcttgagtgc cagcgagtag agttttctcc tccgagccgc 540

tccgacaccg ggaggcgcgc cctcgagcta gctgttgaca ttgattattg actagttatt 600

aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat 660

aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca ttgacgtcaa 720

taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg 780

agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc 840

cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag tacatgacct 900

tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga 960

tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg ggatttccaa 1020

gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc 1080

caaaatgtcg taacaactcc gccccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacggtggg 1140

aggtctatat aagcagagct cgtttagtga accgtaagct tgcatgcctg caggtcgact 1200

ctagactgcc atggccctga ccttcgccct gctggtggcc ctgctggtgc tgtcctgcaa 1260

gagcagctgc agcgtgggct gcgacctgcc ccagacccac agcctgggca gccggcggac 1320

cctgatgctg ctggcccaga tgcggcggat cagcctgttc agctgcctga aggaccggca 1380

cgacttcggc ttcccccagg aagagttcgg caaccagttc cagaaggccg agaccatccc 1440

cgtgctgcac gagatgatcc agcagatctt caacctgttc agcaccaagg acagcagcgc 1500

cgcctgggac gagaccctgc tggacaagtt ctacaccgag ctgtaccagc agctgaacga 1560

cctggaagcc tgcgtgatcc agggcgtggg cgtgaccgag acccccctga tgaaagagga 1620

cagcatcctg gccgtgcgga agtacttcca gcggatcacc ctgtacctga aagagaagaa 1680

gtacagcccc tgcgcctggg aagtggtgcg ggccgagatc atgcggagct tcagcctgag 1740

caccaacctg caggaaagcc tgcggagcaa agagtgagga tccccgggta ccgagctcga 1800

attctttgta gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca cacctccccc tgaacctgaa 1860

acataaaatg aatgcaattg ttgttgttaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa 1920

ataaagcaat agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttcactgc attctagttg 1980

tggtttgtcc aaactcatca atgtatcgat atcggcgcgc cgggccccta cgtcacccgc 2040

cccgttccca cgccccgcgc cacgtcacaa actccacccc ctcattatca tattggcttc 2100

aatccaaaat aaggtatatt attgatgatg gccgcagcgg cccctggcgt aatagcgaag 2160

aggcccgcac cgatcgccct tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tgggacgcgc 2220

cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tggtggttac gcgcagcgtg accgctacac 2280

ttgccagcgc cctagcgccc gctcctttcg ctttcttccc ttcctttctc gccacgttcg 2340

ccggctttcc ccgtcaagct ctaaatcggg ggctcccttt agggttccga tttagtgctt 2400
tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt agggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc 2460
cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct 2520
tgttccaaac tggaacaaca ctcaacccta tctcggtcta ttcttttgat ttataaggga 2580
ttttgccgat ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga 2640
attttaacaa aatattaacg cttacaattt aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg 2700
aacccctatt tgtttatttt tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata 2760

accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg 2820
tgtcgcccct attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac 2880
gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact 2940
ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat 3000
gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga 3060
gcaactcggt cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac 3120
agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat 3180

gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac 3240
cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct 3300
gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac 3360
gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga 3420
ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg 3480
gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact 3540
ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac 3600

tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta 3660
actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt 3720
taaaaggatc taggtgaaga tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga 3780
gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc 3840
ttttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt 3900
ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc 3960
gcagatacca aatactgtcc ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc 4020

tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg 4080

cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg 4140

gtcgggctga acgggggttt cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga 4200

actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc 4260

ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg 4320

gggaaacgcc tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg 4380

atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt 4440

tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc 4500

tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg 4560

aacgaccgag cgcagcgagt cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc 4620

gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcaggggc cgctgcggc 4669

<210> 6

<211> 5246

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Sequences from adenovirus, CAG, and variation of human IFN alpha 2b

<400> 6

catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt 60

ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt 120

gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg 180

gtgtgcgccg gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgcg gttttaggcg gatgttgtag 240

taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga 300

agtgaaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tatttgtcta gggccgcggg 360

gactttgacc gtttacgtgg agactcgccc aggtgttttt ctcaggtgtt ttccgcgttc 420

cgggtcaaag ttggcgtttt attattatag tcagctgacg tgtagtgtat ttatacccgg 480

tgagttcctc aagaggccac tcttgagtgc cagcgagtag agttttctcc tccgagccgc 540

tccgacaccg ggaggcgcgc cctcgagcta gcccctagtt attaatagta atcaattacg 600

gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc 660

ccgcctggct gaccgcccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc 720

atagtaacgc caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact 780

gcccacttgg cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgcccccctat tgacgtcaat 840

gacggtaaat ggcccgcctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact 900

tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tcgaggtgag ccccacgttc 960

tgcttcactc tccccatctc ccccccctcc ccacccccaa ttttgtattt atttattttt 1020

taattatttt gtgcagcgat gggggcgggg ggggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg 1080

gggcggggcg aggggcgggg cggggcgagg cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc 1140

ggcgcgctcc gaaagtttcc ttttatggcg aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag 1200

cgaagcgcgc ggcgggcggg agtcgctgcg cgctgccttc gccccgtgcc ccgctccgcc 1260

gccgcctcgc gccgcccgcc ccggctctga ctgaccgcgt tactcccaca ggtgagcggg 1320

cgggacggcc cttctcctcc gggctgtaat tagcgcttgg tttaatgacg gcttgtttct 1380

tttctgtggc tgcgtgaaag ccttgagggg ctccgggagc gccggcagga aggaaatggg 1440

cggggagggc cttcgtgcgt cgccgcgccg ccgtcccctt ctccctctcc agcctcgggg 1500

ctgtccgcgg ggggacggct gccttcgggg gggacggggc agggcggggt tcggcttctg 1560

gcgtgtgacc ggcggctcta gagcctctgc taaccatgtt catgccttct tctttttcct 1620

acagctcctg ggcaacgtgc tggttattgt gctgtctcat cattttggca aagaattgat 1680

taattcgagc gaacgcgtcg agtcgctcgg tacgatttaa attgaattgg gctcgagatc 1740

tgcgatctaa gtaagcttgc atgcctgcag gtcgactcta gactgccatg gccctgacct 1800

tcgccctgct ggtggccctg ctggtgctgt cctgcaagag cagctgcagc gtgggctgcg 1860

acctgcccca gacccacagc ctgggcagcc ggcggaccct gatgctgctg gcccagatgc 1920

ggcggatcag cctgttcagc tgcctgaagg accggcacga cttcggcttc ccccaggaag 1980

agttcggcaa ccagttccag aaggccgaga ccatccccgt gctgcacgag atgatccagc 2040

agatcttcaa cctgttcagc accaaggaca gcagcgccgc ctgggacgag accctgctgg 2100

acaagttcta caccgagctg taccagcagc tgaacgacct ggaagcctgc gtgatccagg 2160

gcgtgggcgt gaccgagacc cccctgatga aagaggacag catcctggcc gtgcggaagt 2220

acttccagcg gatcaccctg tacctgaaag agaagaagta cagcccctgc gcctgggaag 2280

tggtgcgggc cgagatcatg cggagcttca gcctgagcac caacctgcag gaaagcctgc 2340

ggagcaaaga gtgaggatcc ccgggtaccg agctcgaatt ctttgtagag gttttacttg 2400

ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg 2460

ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaaatt 2520

tcacaaataa agcatttttt tcactgcatt ctagttgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg 2580

tatcgatatc ggcgcgccgg gcccctacgt cacccgcccc gttcccacgc cccgcgccac 2640

gtcacaaact ccacccccctc attatcatat tggcttcaat ccaaaataag gtatattatt 2700

gatgatggcc gcagcggccc ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc 2760

caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg 2820

gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct 2880

cctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta 2940

aatcgggggc tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa 3000

cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct 3060

ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc 3120

aaccctatct cggtctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg 3180

ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt 3240

acaatttagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct 3300

aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 3360

attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg 3420

cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 3480

aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 3540

ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat 3600

gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact 3660

attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 3720

tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact 3780

tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg 3840

atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 3900

agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg 3960

aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg 4020

caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag 4080

ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 4140

gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 4200

tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat 4260

atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc 4320

tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 4380

accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 4440

gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac 4500

caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc 4560

tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 4620

ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 4680

tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 4740

gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 4800

tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca 4860

gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 4920

gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 4980

ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct 5040

ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta 5100

ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag 5160

tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga 5220

ttcattaatg caggggccgc tgcggc 5246

<210> 7

<211> 582

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggcttctcc tgtccctgct gtcgctccct 60

ctgggcctcc cagtcctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120

aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc 180

agcttgaatg agaatatcac tgtcccagac accaaagtta atttctatgc ctggaagagg 240

atggaggtcg ggcagcaggc cgtagaagtc tggcagggcc tggccctgct gtcggaagct 300

gtcctgcggg gccaggccct gttggtcaac tcttcccagc cgtgggagcc cctgcagctg 360

catgtggata aagccgtcag tggccttcgc agcctcacca ctctgcttcg ggctctggga 420

gcccagaagg aagccatctc ccctccagat gcggcctcag ctgctccact ccgaacaatc 480

actgctgaca ctttccgcaa actcttccga gtctactcca atttcctccg gggaaagctg 540

aagctgtaca caggggaggc ctgcaggaca ggggacagat ga 582

<210> 8

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ggcgcgccaa gcttgcatgc ctgcaggtcg actctagact gccatggcct tgacctttgc 60

tttactggtg gccctcctgg tgctcagctg caagtcaagc tgctctgtgg gctgtgatct 120

gcctcaaacc cacagcctgg gtagcaggag gaccttgatg ctcctggcac agatgaggag 180

aatctctctt ttctcctgct tgaaggacag acatgacttt ggatttcccc aggaggagtt 240

tggcaaccag ttccaaaagg ctgaaaccat ccctgtcctc catgagatga tccagcagat 300

cttcaatctc ttcagcacaa aggactcatc tgctgcttgg gatgagaccc tcctagacaa 360

attctacact gaactctacc agcagctgaa tgacctggaa gcctgtgtga tacaggggggt 420

gggggtgaca gagactcccc tgatgaagga ggactccatt ctggctgtga ggaaatactt 480

ccaaagaatc actctctatc tgaaagagaa gaaatacagc ccttgtgcct gggaggttgt 540

cagagcagaa atcatgagat ctttttcttt gtcaacaaac ttgcaagaaa gtttaagaag 600

taaggaatga ggatccccgg gtaccgagct cgaattctta attaa 645

<210> 9

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1 5 10 15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
20 25 30

Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser
35 40 45

Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
50 55 60

Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His
65 70 75 80

Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser
85 90 95

Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr

100 105 110

Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val

115 120 125

Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys

130 135 140

Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro

145 150 155 160

Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu

165 170 175

Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu

180 185

<210> 10

<211> 193

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu

1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu

20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu

35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu

50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg

65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu

85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser

100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly

115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190
Arg