

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C12N 15/11

(11) 공개번호 특 1998-071084
(43) 공개일자 1998년 10월 26일

(21) 출원번호	특 1998-003185
(22) 출원일자	1998년 02월 05일
(30) 우선권주장	197 04 301.1 1997년 02월 06일 독일(DE)
(71) 출원인	헥스트아크티엔게젤샤프트 추후보정 독일 데-65926 프랑크푸르트 암 마인
(72) 발명자	그라울리히볼프 독일 데-35091 콜베 골드베르크슈트라쎄 44 네텔베크디르크 독일 데-35037 마르부르크 슈타인베크 41 세들라첵한스-하랄트 독일 데-35041 마르부르크 손넨향 3 월러를프 독일 데-35037 마르부르크 포이티어스슈트라쎄 8 이병호, 최달용
(74) 대리인	

심사청구 : 없음

(54) 사람 엔도글린 유전자의 프로모터 및 이의 용도

요약

본 발명은 사람 엔도글린 유전자의 프로모터 또는 이의 작용성 잔기 및 약물 제조용으로서 이의/이들의 용도에 관한 것이다.

대표도

도 1a

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 사람 엔도글린 프로모터(human endoglin promoter)의 클로닝을 도시한 것이다. A : 벡터 pCR 2.1(Invitrogen 제조원)의 TA 클로닝 부위내로 연결된, PCR의 수단에 의해 제조한 사람 엔도글린 프로모터의 단편. B : 작제물 pCR 2.1 엔도(Endo)로부터 효소 *Mlu*I 및 *Xba*I로 절단되어 루시퍼라제 리포터 벡터(luciferase reporter vector pGL3(Promega 제조원)내로 클로닝된 사람 엔도글린 프로모터를 포함하는 단편.

도 2는 상이한 내피 세포-특이적인 프로모터의 루시퍼라제 활성을 도시한 것이다. 모든 프로모터는 pGL3 내로 클로닝되며 모든 값은 SV40 기본 프로모터상에서 표준화된다. SV40 : 인핸서가 없는 SV40 기본 프로모터. pGL3엔도 : 엔도글린 프로모터(참조: 도 1b). vWF + SV40 인핸서 : 상부 SV40 인핸서로 증강시킨 폰 빌레브란트 인자 프로모터. fIk-1 : VEGF 수용체 fIk-1에 대한 프로모터(-224번/ATG에서 개시). vWF : 추가의 인핸서가 없는 폰 빌레브란트 인자 프로모터(-487/+247).

도 3은 내피 세포와 비-내피 세포에 있어서 사람 엔도글린 프로모터의 루시퍼라제 활성을 도시한 것이다. 구조물은 도 2의 것과 동일하다. SV40 기본 프로모터상에서 표준화된, 내피 세포주 ECV304에 있어서 엔도글린 프로모터의 활성을 헬라 경부암 세포주(HeLa cervical carcinoma cell line)에서의 활성과 비교한다. 이 검정에서, ECV304 세포에 있어서의 활성은 헬라 세포에서보다 대략 29배 높다.

도 4는 엔도글린 프로모터상에서 전사 인자에 대한 추정적 결합 부위를 도시한 것이다. *Alu* 서열 및 cDNA의 개시 부위간의 영역만을 도시한다. 모든 결합 부위는 플러스(+) 쇄상에 위치한다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 사람 엔도글린 유전자의 프로모터 또는 이의 작용성 잔기 및 약물 제조용으로서 이의 용도에 관한 것이다.

유전자 치료요법에 있어서 중요한 문제점들중 하나는 세포내로 삽입되는 작동인자 유전자의 전사 및 해독을 조절하는데 있다. 전사 단계에서의 이러한 조절은 작동인자 유전자의 암호화 서열의 상부에 프로모터 또는 인핸서 서열을 가함에 의해 가능해진다.

프로모터 서열은 조절 단백질, 즉 이의 전체가 하부 작동인자 유전자의 전사를 활성화시키는 전사 인자가 결합할 수 있는 유전자 단편으로서 이해된다. 전사 방향으로 놓여있는 이러한 영역을 하부 서열로 정의하는 한편 반대 방향으로 배열하고 있는 서열을 상부 서열이라 정의한다. 작동인자 유전자는 일반적으로 이의 유전자 산물이 예를 들면, 유전자 치료요법 측면에서 바람직한 효과를 갖는 구조 유전자인 것으로 이해된다.

이러한 프로모터 또는 인핸서 서열은 비 세포-특이적, 세포-특이적, 바이러스-특이적, 대사-특이적 또는 세포 주기-특이적일 수 있다. 이러한 프로모터 서열 및 이의 용도, 즉 상이한 질병의 유전자 치료요법 용도의 예는 특허원 제W096/06940호, 제W096/06938호, 제W096/06941호 및 제W096/06939호에 나열되어 있다. 또한 이들 특허원들은 작동인자 유전자를 세포-특이적으로 및 세포 주기-특이적으로 조절할 목적을 위해 이러한 프로모터 서열을 합하는 기술 및 실시예를 나타낸다.

프로모터의 선택 및 조합에 따라서, 이를 프로모터는 더욱 제한되거나 덜 제한된 및/또는 더욱 강력하거나 덜 강력한, 이들 프로모터에 따른 작동인자 유전자의 전사를 유발한다.

내피 세포는 한편으로 순환계내로 주입된 유전자 작제물에 직접 수용되고, 다른 한편으로 종양 질환, 염증, 알레르기, 자가면역 질환, 기관 거부 반응 및 순환과 응고 질환과 같은 많은 질환의 악화 및 진행과 또한 치유 과정중에 직접 포함되고/되거나 이를 질환 부위에 매우 인접하여 존재하기 때문에 유전자 치료요법용으로 유리한 타겟 세포의 예이다.

일반적으로, 타겟 세포-특이적인 프로모터는 관련된 타겟 세포내에서 특히 격렬하게 또는 과도로 형성되는 단백질에 대한 유전자의 프로모터이다. 내피 세포의 경우에는 엔도글린이 이러한 단백질중의 하나의 예이다.

엔도글린은 TGF β 의 비-시그널-전달 수용체이다[참조: Gougos et al., J. Biol. Chem. 265, 8361(1990), Cheifetz, J. Biol. Chem. 267, 19027(1992), Moren et al., BBRC 189, 356(1992)]. 이것은 정상의 내피 중에 소량으로 존재하는 한편, 증식하는 내피상에 과도한 정도로 발현된다[참조: Westphal et al., J. Invest. Derm. 100, 27(1993), Burrows et al., Pharmac. Ther. 65, 155(1994)]. 프로모터 강도와 세포 특이성과 관련하여 유용한 추가의 정보는 없다. 엔도글린 유전자가 약 4년동안 공지되어 왔음에도 불구하고[참조: Bellon et al., (1993)], 지금까지 엔도글린 프로모터를 분리하는 것은 불가능하였다.

사람 엔도글린에 대한 cDNA 서열은 벨론(Bellon) 등에 의해 기술되었고[참조: Eur. J., Immunol. 23, 2340(1993)], 한편 뮤린 엔도글린에 대한 cDNA 서열은 게(Ge) 등에 의해 기술되어졌다[참조: Gene 138, 201 (1994)]. 서열 정보가 엔도글린 유전자의 5'-비-해독된 영역의 일부에 대해 유용한 반면, 이 영역의 기능 또는 프로모터 영역에 대해서는 전혀 공지되어 있지 않다.

VEGF 수용체는 다른 내피 세포-특이적인 단백질이다. 이 경우, 2개의 수용체가 구별되는데[참조: Plate et al., Int. J. Cancer 59, 520(1994)] : 한편으로는 세포질 부위에 fms형 타이로신 키나제를 함유하는 VEGF 수용체 1(flt-1)[참조: de Vries et al., Science 255, 989 (1992)]와 다른 한편으로는 세포질 부위에 타이로신 키나제를 함유하는 VEGF 수용체 2(flk-1, KDR)[참조: Terman et al., BBRC 187, 1579 (1992)]이다. 이들 수용체 모두는 내피 세포상에서 거의 절대적으로 발견된다[참조: Senger et al., Cancer Metast. Rev. 12, 303 (1993)].

다른 내피 세포-특이적인 수용체 타이로신 키나제는 tie-1 또는 tie-2[참조: Partanen et al., Mol. Cell. Biol. 12, 1698 (1992), Schnurch und Risau, Development 119, 957 (1993), Dumont et al., Oncogene 7, 1471 (1992)] 및 B61 수용체(Eck 수용체)[참조: Bartley et al., Nature 368, 558 (1994), Pandey et al., Science 268, 567 (1995), van der Geer et al., Ann. Rev. Cell. Biol. 10, 251 (1994)]이다.

다른 내피 세포-특이적인 단백질은 B61 수용체에 대한 리간드를 나타내는 B61 분자[참조: Holzman et al., J. Am. Soc. Nephrol. 4, 466 (1993), Bartley et al., Nature 368, 558 (1994)], 프로모터 서열이 문헌[참조: Benatti et al., J. Clin. Invest. 91, 1149 (1993)]에 기술되어 있는 엔도텔린, 특히 엔도텔린 B[참조: O'Reilly et al., J. Cardiovasc. Pharm. 22, 18 (1993), Benatti et al., J. Clin. Invest. 91, 1149(1993), O'Reilly et al., BBRC 193, 834 (1993)], 프로모터 서열이 문헌[참조: Wilson et al., Mol. Cell. Biol. 10, 4654 (1990)]에 기술되어 있는 엔도텔린 1[참조 : Yanasigawa et al., Nature 332, 411 (1988)], 엔도텔린 수용체, 특히 엔도텔린 B 수용체[참조: Webb et al., Mol. Pharmacol. 47, 730 (1995), Haendler et al. J. Cardiovasc. Pharm. 20, 1 (1992)], 프로모터 서열이 문헌[참조: Ludwig et al. Gene 142, 311 (1994), Oshima et al.,(J. Biol. Chem. 263, 2553 (1988)) 및 Pohlmann et al. (PNAS USA 84, 5575 (1987)]에 기술되어 있는 만노즈 6-포스페이트 수용체[참조: Perales et al., Eur. J. Biochem. 226, 225 (1994)] 및 프로모터 서열이 문헌[참조: Jahroudi and Lynch (Mol. Cell. Biol. 14, 999 (1994)), Ferreira et al. (Biochem. J. 293, 641 (1993)) 및 Aird et al., (PNAS USA 92, 4567 (1995)]에 기술되어 있는 폰 빌레브란트 인자(vWF)이다.

다른 내피 세포-특이적인 단백질은 활성화된 내피 세포에 의해 생산되고[참조: Warner et al., J. Immunol. 139, 1911(1987)] 이의 프로모터 서열이 문헌[참조: Hangen et al., Mol. Carcinog. 2, 68 (1986), Turner et al., J. Immunol. 143, 3556 (1989), Fenton et al., J. Immunol. 138, 3972 (1987), Bensi et al., Cell Growth Diff. 1, 491 (1990), Hiscott et al., Mol. Cell. Biol. 13, 6231 (1993) 및 Mori et al., Blood 84, 1688 (1994)]에 기술되어 있는 예를 들어, IL-1 α 및 IL-1 β 형의 IL-1, 프로모터 서열이 문헌[참조: Ye et al., PNAS USA 90, 2295 (1993)]에 기술되어 있는 IL-1 수용체 및 리포폴리사카

라이드에 의해 활성화된 내피 세포내에서 VCAM-1을 발현하는 근육 세포 부착 분자(VCAM-1), TNF- α [참조: Neish et al., Mol. Cell. Biol. 15, 2558/1995)], IL-4[참조: Iademarco et al., J. Clin. Invest. 95, 264 (1995)] 및 IL-5[참조: Marni et al., J. Clin. Invest. 92, 1866 (1993)]이다. VCAM-1의 프로모터 서열은 문헌[참조: Neish et al., Mol. Cell. Biol. 15, 2558 (1995), Ahmad et al., J. Biol. Chem. 270, 8976 (1995), Neish et al., J. Exp. Med. 176, 1583 (1992), Iademarco et al., J. Biol. Chem. 267, 16323 (1992) 및 Cybulsky et al., PNAS USA 88, 7859 (1991)]에 기술되어 있다.

다른 내피 세포-특이적인 프로모터는 합성 활성인자 서열{여기서, 합성 활성인자 서열은 내피 세포내에서 우선적으로 또는 선택적으로 활성인 전사 인자에 대한 올리고마화된 결합부위로 구성되는데, 예를 들어 엔도릴린 1 유전자내 결합 부위가 5'-TTATCT3'인 전사 인자 GATA-2[참조: Lee et al., Biol. Chem. 266, 16188 (1991), Dorfmann et al., J. Biol. Chem. 267, 1279 (1992) 및 Wilson et al., Mol. Cell. Biol. 10, 4854 (1990)]}는 천연 내피-특이적인 프로모터에 대한 대체물로서 사용될 수 있다}, 및 뇌-특이적인 내피 글루코즈-1-트랜스포터{여기서, 뇌 내피 세포는 이 트랜스포터를 매우 강력하게 특징적으로 발현함으로써 D-글루코즈의 뇌내로의 내피를 통한 수송이 이루어지도록 한다[참조: Gerhart et al., J. Neurosci. Res. 22, 464 (1989)]}이다. 이 프로모터 서열은 무라카미(Murakami) 등의 문헌[참조: J. Biol. Chem. 267, 9300 (1992)]에 기술되어 있다.

내피 세포에 대해 매우 특이적이지만, 이들 프로모터의 일부, 예를 들어 폰 빌레브란트 인자에 대한 유전자 또는 VEGF 수용체 1 (flk-1)에 대한 유전자의 프로모터는 단지 상대적으로 활성이 낮다. 이러한 약한 프로모터의 활성이 이들을 기본 프로모터(예: SV40) 또는 인핸서와 결합시킴에 의해 증가시킬 수 있다고 해도, 이들은 일반적으로 특이성에 있어서의 감소를 동반한다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 강력하고 내피-특이적인 프로모터를 발견하는 것이다.

놀랍게도, 본 발명에 이르러 엔도글린 유전자 프로모터가 특히 이를 특성을 지님이 밝혀졌다.

발명의 구성 및 작용

따라서, 본 발명은 사람 엔도글린 유전자의 프로모터, 또는 이의 작용성 잔기 및 이의 변이체에 관한 것이다. 이 프로모터는 최대 2415개 염기쌍이상 연장되어 있으며(참조: 서열 3) 바람직하게는 개시 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 서열 3 내지 2378번을 포함한다.

본 발명에 따른 프로모터를 특성화하기 위하여, 엔도글린 유전자의 프로모터 서열 또는 이의 일부를 플라스미드 pGL3(Promega 제조원)내 리포터 유전자(즉, 효소 루시페라제를 암호화하는 유전자)에 연결시키고, 내피 세포(ECV-304 세포주) 및 비교용으로서 경부암 세포(헬라 세포주)를 이 작제물로 형질감염시킨다. 놀랍게도, 엔도글린 프로모터는 vWF 프로모터보다 약 80배 강력한 것으로 밝혀졌다. 이것은 vWF가 상술한 바와 같이 내피-특이적인 방식으로 발현되며 결과적으로 엔도글린 프로모터의 강도가 vWF 프로모터의 것과 유사할 것으로 예견되기 때문에 놀라운 것이다. 또한 엔도글린 프로모터는 경부암 세포에서보다 내피 세포내에서 약 30배 더 강력한 것으로 밝혀졌다. 또한 내피-특이적인 vWF 프로모터가 경부암 세포와 내피 세포내에서 유사한 강도를 지니므로 놀라운 것이다. 그 결과, 본 발명의 엔도글린 프로모터는 강도 및 내피 특이성면 모두에서 vWF 유전자 프로모터를 명백히 능가한다.

또한, 본 발명에 따른 프로모터 서열의 일부는 강력한 내피 세포-특이적 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

즉, 표준물로서 SV40 프로모터의 활성에 기준한 하기 상대적 활성이 하기 표 1에 나열한 엔도글린 유전자 프로모터의 5'-말단적으로 결실된 작제물에 대해 내피 세포내에서 수득된다.

[표 1]

뉴클레오타이드 서열	상대 활성
SV40 프로모터	1
엔도글린 프로모터(서열 3)	
1-2415	11.5
부분 서열 :	
36-2415번	10.2
470-2415번	13.0
948-2415번	10.0
1310-2415번	2.0
1847-2415번	3.3
2339-2415번	0.2

따라서, 프로모터의 작용성 잔기는 프로모터 활성을 지닌 본 발명에 따른 프로모터의 모든 부분 서열, 특히 약 1 내지 약 2378번, 약 36 내지 약 2378번, 약 470 내지 약 2378번 및 약 948 내지 약 2378번의 부분 서열 및 또한 약 36 내지 약 2415번의 부분 서열 및 약 470 내지 약 2415번 및 약 948 내지 2415번의 부분 서열, 바람직하게는 약 470 내지 약 2415번 및 약 470 내지 약 2378번의 부분 서열을 의미하는 것으로 이해된다. 프로모터 활성을 지니는 부분 서열은 또한 예를 들면, 약 1310 내지 약 2415번 및 약 1310 내지 약 2378번 및 약 1847 내지 약 2415번 및 약 1847 내지 약 2378번까지 연장된다.

그러나, 본 발명은 서열 3에 나타낸 프로모터 및 이의 작용성 잔기에 한정되지 않으며 또한 프로모터 활성을 지닌 변이체를 포함한다. 이러한 천연물의 변이체는 예를 들면, 하나 이상의 염기, 바람직하게는 약 1 내지 약 50개, 특히 약 1 내지 약 25개, 특히 약 1 내지 5개 염기의 결실, 첨가, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 프로모터 활성을 예를 들면 기술된 루시퍼라제 검정을 사용하여 용이하게 측정할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한

a) 본 발명에 따른 하나 이상의 프로모터의 핵산 서열(성분 a)) 및 경우에 따라,

b) 성분 a)에 의해 활성화된 이 작동인자 유전자의 전사를 갖는 하나 이상의 작동인자 유전자(성분 b))를 포함하는 핵산 작제물에 관한 것이며, 성분 a)는 바람직하게는 성분 b)의 상부에 위치한다.

본 발명은 또한 본 발명에 따른 엔도글린 유전자의 프로모터 서열이 다른 타겟 세포-특이적인, 바이러스-특이적인, 대사적으로 특이적인 또는 세포 주기-특이적인 프로모터 서열 및 하나 이상의 작동인자 유전자와 결합되며, 여기서, 프로모터 서열의 이러한 결합은 하나 이상의 작동인자 유전자 전사의 활성화를 조절한다.

본 발명에 따른 핵산 작제물은 바람직하게는 DNA로 구성된다. 용어 핵산 작제물은 핵산으로 구성되며 타겟 세포내에서 전사될 수 있는 인공 구조물을 의미하는 것으로 이해된다. 이들은 바람직하게는 백터, 예를 들면 플라스미드와 같은 비-바이러스 백터 또는 바이러스 백터내로 삽입된다. 숙련가라면 비-바이러스 백터 및 바이러스 백터의 제조에 익숙할 것이다.

본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산 작제물을 지닌 세포에 관한 것이다.

일반적으로, 작동인자 유전자의 선택은 유전자 작제물로 치료될 질환에 따른다.

종양 질환, 백혈병, 자가면역 질환, 알레르기, 천식, 염증, 기관 거부, 이식조직 대 숙주 반응, 혈액 응고 시스템 질환, 심장혈관 질환, 빈혈, 감염 또는 CNA에 대한 손상의 치료요법을 위한 이러한 작동인자 유전자의 예는 특허원 제W096/06940호, 제W0/06938호, 제W096/06941호 및 제W096/06939호에 상세히 기술되어 있다.

예를 들어, 본 발명에 따른 작동인자 유전자는 사이토킨, 케모킨, 성장 인자, 사이토킨에 대한 수용체, 케모킨에 대한 수용체 또는 성장 인자에 대한 수용체를 암호화하며 또한 사이토킨 길항제, 세포성색전, 세포독성 또는 아포토시스(apoptosis)를 유발하는 단백질, 항체 또는 항체 단편, 맥관형성 억제제, 응집 인자, 응집 억제제, 피브린분해 단백질, 약물의 전구체를 분해함으로써 약물을 형성하는 효소, 혈액 순환에 효과를 발휘하는 단백질 또는 면역 반응을 일으키는 감염성 병원체의 항원을 암호화한다.

본 발명에 따른 핵산 작제물은 또한 프로모터 서열 또는 내부 리보소움 도입 부위(internal ribosomal entry sites : IRES)에 의해 서로 연결된 2개 이상의 동일하거나 상이한 작동인자 유전자를 포함할 수 있다. 이들의 예는 상술한 특허원에 제공된다.

본 발명에 따른 핵산 작제물은 예를 들면, 내피 세포만-특이적으로 또는 내피 세포-특이적으로 및 대사적으로 특이적인 방식으로, 내피 세포-특이적으로 및 세포 주기-특이적으로 및/또는 내피 세포-특이적으로 및 바이러스-특이적으로, 악리학적으로 활성인 화합물 또는 약물의 불활성 전구체를 분해함으로써 활성 약물을 형성하는 효소를 암호화하는 유전자를 발현시키는데 사용될 수 있다.

일반적으로 핵산 작제물의 적합한 백터내로의 클로닝에 이어 예를 들면, 환자에게 투여함을 포함하는 상술한 질환 치료용 약물을 제조하기 위한 본 발명에 따른 핵산 작제물을 사용하는 것이 바람직하다. 숙련가라면 본 발명에 따른 프로모터 또는 본 발명에 따른 핵산 작제물의 기타 적용에 친숙할 것이다.

표 및 도면과 함께 다음의 실시예는 본 발명을 이에 한정함이 없이 더욱 상세히 기술하기 위함이다.

서열 3은 사람 엔도글린 프로모터의 서열이다. 염기쌍 1은 5'에 가장 가까이 위치한 서열의 영역에 상응한다. 고도로 보존된 Alu 서열은 염기쌍 1360 내지 1666번의 영역내에 위치하는 반면, 정리된 엠. 무스 쿨루스(*M. musculus*) cDNA와의 상동성을 2300번 염기쌍에서의 3' 영역에서 시작하며, 에이치. 사피엔스(*H. sapiens*) cDNA(5'-비해독된 영역)의 정리된 부위는 2379번 염기쌍에서 개시한다.

실시예

프로모터핀더 DNA 워킹 키트(PromoterFinder™ DNA Walking kit : Clontech 제조원)는 프로모터를 클로닝하는데 사용한다. 이 키트를 사용하여, 정리된 서열의 5'에 위치한 약 2.4kb 염기쌍 단편을 사람 엔도글린 cDNA의 5'-비해독된 영역으로부터 2개의 유전자-특이적인 서열 1 및 서열 2의 프라이머의 보조로 2회의 PCR을 수행하여 증폭시킨다.

서열 1

E1: GCTGGGCTGGAGTTGCTGTCCGAAGGATG

서열 2

E2: AATGGATGGCAGTGACAGCAGCAGTCCTG

이를 위한 PCR 조건은 하기와 같다:

1. PCR : 프라이머 E1, 94°C에서 25초, 94°C에서 25초, 63°C에서 20초, 68°C에서 4분, 39주기, 68°C에서 4분
2. (한 세트의) PCR : 프라이머 E2, 94°C에서 25초, 94°C에서 25초, 61°C에서 20초, 68°C에서 4분, 26주기, 68°C에서 4분

폴리머라제 : 엑스팬드 롱 템플레이트 PCR 시스템(Expand™ Long Template PCR system : Boehringer Mannheim 제조원)

PCR 단편을 QIAquick™ 스픈 컬럼(Qiagen 제조원)을 통해 정제하고 TA 클로닝 벡터[Original TA Cloning™ kit(Invitrogen 제조원)]내로 삽입한다. 이 작제물, pCR 2.1엔도(도 1a 참조)를 서열분석하고 클로닝된 영역을 사람 엔도글린 유전자의 5' 영역 2415개 염기쌍으로 정의한다(참조: 서열 3).

이 벡터로부터의 클로닝된 영역을 루시퍼라제 리포터 벡터, 즉 pGL3(Promega 제조원)내로 클로닝하고 이의 프로모터 활성을 헬라 및 ECV304 세포내에서 작제물 pGL3엔도(참조: 도 1b)로서 시험한다.

세포를 DEAE/덱스트란 방법[참조: Sompayrac et al., PNAS 78, 7575(1981)] 또는 LipofectAMINE™ (Gibco BRL 제조원)으로 형질감염시킨다. pGL3엔도 작제물외에, SV40 기본 프로모터를 표준물로서 형질감염시키고, SV40 인핸서의 존재 또는 부재하에 fIk-1-(VEGF)(-225번/ATG로부터 개시하여) 프로모터 및 또는 폰 빌레브란트 인자(vWF)(-487번/+247번) 프로모터를 또한 형질감염시킨다. SV40 인핸서를 포함하는 후자의 vWF 프로모터는 이의 활성이 야생형 프로모터보다 현저히 높은 한편 이의 선택성이, 비록 감소된다 하더라도 없어지지는 않는다는 점에서 구별된다. 모든 작제물을 pGL3내로 클로닝하고, 허버(Herber) 등의 문헌[참조: Oncogene 9, 1295 (1994)] 및 루시벨로(Lucibello) 등의 문헌[참조: EMBO J. 14, 132 (1995)]에 기술된 바와 같이 루시퍼라제 검정을 수행한다.

ECV 304 세포내 상이한 프로모터의 루시퍼라제 활성(참조: 도 2)은 엔도글린 유전자의 5' 영역의 클로닝된 단편이 프로모터 활성을 지님을 입증한다. 이 활성은 다른 통상의 내피 세포-특이적인 프로모터의 활성과 비교하는 경우 매우 높다. 이것은 fIk-1 프로모터의 것보다 4배가 높고 vWF 프로모터의 것보다는 8 배 이상 더 높다. 심지어 vWF 프로모터가 SV40 인핸서 서열로 증강되는 경우에서조차도 pGL3엔도의 활성이 더욱 높다. 이러한 데이터는 클로닝된 영역이 사람 엔도글린 유전자의 프로모터임을 확증한다.

도 3은 ECV 304 세포내에서 엔도글린 프로모터의 활성과 헬라 경부암 세포주내에서의 활성을 비교한 것이다. SV 40 기본 프로모터로 표준화하는 경우, ECV 304 세포내에서의 활성은 헬라 세포에서보다 약 29배 더욱 높다. 이것은 클로닝된 프로모터가 내피 세포내에서 활성일 뿐만 아니라 이를 세포에 대해서도 선택성을 나타낸다.

도 4는 엔도글린 프로모터상에서의 전사 인자용의 추정되는 결합 부위를 나타낸다. 프로모터의 선택성과 활성에 관여하며 몇몇의 보존된 NF-KB 결합 부위를 포함하는 일부의 강력하게 상동인 강력한 결합 부위는 보존된 Alu 서열과 정리된 cDNA사이의 영역내에 위치한다.

서열 3

1 CGGGGGTTCC TCCTCTGTAA AGTGGAGGTA

31 TAACGGTACC CACCTCCTGG GGTGGCTGTG

61 AGGATTCAAGA GCTGATAAGG TGAACGCCTA

91 GGGCGGGCC CGGTGCAGAG AGAGCGCTCA
121 GCTCCTAGGG CTGGATTAAC TGTCCCTGGG
151 GCACAGATCT CGGTCTGGGG CCTGTGGAAA
181 CCTCAGAGCC ACCCCTGAAC CCCCACCGAG
211 CCACCCCTTG CCTCGCAGTG CCCATGGCCT
241 CGTCTCCGAG GTTACAGGAA AAGGCAGAGG
271 AGATGCCCTT CTCAGGGTGG CCCTCTGGGA
301 GAGGACACTC TCCCTTGACC TCAAAGCCAC
331 GCTTGGCTGC AAACTGGCCA GGCAGCCACA
361 AGGCTGGGCA AGCAGAACGA TCCCTAATCC
391 CCACCCAAAG AGCCACACCG ACCCTCCCAG
421 CCGCTGTGAC AGCTCCTGCA GAGACAAACA
451 CACGGCCTAC TCTTGTCAAC CGGGCCGGCC
481 AATAAGCACG GAGAGGCAAG GCCTCAGACC
511 CTGGACAGAC ATCCTCCCTC CAGAGGCACC
541 AGGGCCTCAG CCTTCTCCTC CCTCCCTGGG
571 CCTCAATTTC TCCACCTGTG ACCCAGGGCA
601 GGTGGATCCA GGGAGAAGAA CCTTCTGGCT
631 CCATCTCACC ATGGGTCTTG CCAGCACACA
661 CAAAGATTG GCCTCTCAAA GCCTAGCTCT

691 GCCAGCGTCC TTCTGCTCAA GAACTCTCCA
721 TGAECTCCCAG TGGCCCTAAG GACAAAGTCC
751 TGGCATTGAGGCC ATGCAGGGCC
781 AGACTCTGCC TCTCCAGCTT CCTGTCCCCA
811 CCACACCCCT GCTGGTCTCA CGGTGGTCCG
841 ACTGTTTCCT GCTTCTGTGC CTTTGCTTAG
871 TCTGGCACCC CTGCCTGGCA TGCTTCCTC
901 ACCCCTTCTT CTCCCCAATC CCAACTCACC
931 CAGTCTTCAG AAGGGCAGGC CTAAATACCA
961 GGCCCTCCAG GTGGCCCAGG ATTCCCTTCTC
991 TGAGCTTCAG TGCGCTGGC CCTGGGTGCT
1021 ACCTGTGAGT AGTCCCACGG TGGGTACATA
1051 GTAGGTGCGC TTACTGTTCG CAGAATGAAC
1081 ATGGGACAGT TTGGGGACTG TCACCCAGCT
1111 CAGGGAGCAC TGATGGGGAA GCATCTCCTG
1141 TATGTCCCAG GGCTCAGTGC TGTAGTGTCC
1171 TGACCCCTCAG AAATCTCATA ATGGCTTGTT
1201 CAGGAAGGCA TCGTGCCCCA CTTTGCAAAC
1231 AGGGGGTGCT GAGAATTGAG GGGCCTTGTC

1261 CAAGGTCTCA TGGCTAGGAG CAAGCAGAAT
 1291 CGGATTGAA CCCAGGGCCA CGTGACTTCA
 1321 GAAGTGCCAT TAAAGTCCCC ATAATTCGGA
 1351 GCTGTCTTCT TTTTTTTTTT CTTTCTTTTT
 1381 TTTGAGACCG AGCCTCACTC TGTCACCTAG
 1411 GCCAGGAGTG CAGTGGTCTG ATCTCAGCTC
 1441 ACTGCAACCT CCGCCTCCTA GGTTCAAGTG
 1471 ATTCTCTAGC CTCAGCCTCC CAAGTAGCTG
 1501 GGACTACAGG CGCACGTCAT CATGCCAGC
 1531 TAACTTTGT ATTTTAGTA GAGATGGGTT
 1561 TTCACCATGT TGGTCAGGCT GGTCTCGAAC
 1591 TCCTGACCTC AAGTGATCCG TCTGCCTCGG
 1621 CCTCTCAAAG TGCTGGGATT ATAGGCTTGA
 1651 GCCACTACAC TCGGCCTGGA GCTGTGTTT
 1681 GTCGGTGAAG GATTTCCAC CCATGAAGGG
 1711 GTCAGACGTG AAGCGTGTGG CCCTGGGCAG
 1741 CTCCCTGAG CCCAGAGACG CCAGCCCTAG
 1771 CCGCCTTGCT GTGCCACTTT GGGACTTCCC
 1801 TCCCTAGCCT GAGCTTCAGT TTTCCTGCCT
 1831 GTTAGGCAGC CCCATGTCAA CTGCACTTAG

1861	TAGGCCGGGT TTGATGCCCG ACAAGACGTG
1891	AAGTGGTGGA GGTGGGCAGG ATCCCAGCGC
1921	TACCATCTTC TTGAACCAGT GATCTCAACA
1951	CATCGGATTCTGTTTCCTC ATCTGCAAAA
1981	TGGGATCAGT GAGCTCAGGT GGGTCACAAA
2011	TTCTACAGGA ACTACTTAG CCAAGCCCCGG
2041	CCCCCTGAAA GTTCCCCTCG GTGGGCAGTT
2071	AGGGTGATTG TTTTCATCTG TGGGGCTCCC
2101	TGATGCGTCC CACCCACCAAG CCTTGGAGAG
2131	GGTGGGATGG GAGGGTGGGG TGCTTGGGGA
2161	GACAAGCCTA GAGCCTGGC CCTCCCACCC
2191	CACTGCCTCC CCCCATCCCA GGGCCCCCCA
2221	CCCAGTGACA AAGCCCGTGG CACTTCCTCT
2251	ACCCGGTTGG CAGGCGGCCT GGCCCAGCCC
2281	CTTCTCTAAG GAAGCGCATT TCCTGCCTCC
2311	CTGGGCCGGC CGGGCTGGAT GAGCCGGGAG
2341	CTCCCTGCTG CCGGTACATAC CACAGCCTTC
2371	ATCTGCGCCC TGGGGCCAGG ACTGCTGCTG
2401	TCACTGCCAT CCATT

발명의 효과

본 발명에 의해서 제공된 사람 엔도글린 유전자의 프로모터는 매우 강력한 프로모터 활성 및 내피-특이성을 지니며, 이와 결합된 활성화 서열을 포함하는 핵산 작제물은 종양 질환, 백혈병, 자가면역 질환, 알레르기, 관절염, 염증, 기관 거부, 이식체 대 속주 반응, 혈액 응고 질환, 심장혈관 질환, 빈혈, 감염 또는 CNS 손상증에서 선택된 질환 치료용 약물에 사용 가능하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

서열식 3에 나타낸 서열 또는 이의 작용성 잔기 및 이의 변이체를 포함하는 사람 엔도글린 유전자의 프로모터.

청구항 2

제1항에 있어서, 작용성 잔기가 약 1 내지 약 2378번, 약 36 내지 약 2378번, 약 470 내지 약 2378번, 약 948 내지 약 2378번, 약 1310 내지 약 2378번, 약 1847 내지 약 2378번, 약 36 내지 약 2415번, 약 470 내지 약 2415번, 약 948 내지 약 2415번, 약 1310 내지 약 2415번 또는 약 1847 내지 약 2415번의 서열을 포함하는 프로모터.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 사람 엔도글린 유전자의 프로모터 서열 하나 이상을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 4

제3항에 있어서, 작동인자 유전자와 작동인자 유전자(성분 b))의 전사를 활성화시키는 사람 엔도글린 유전자의 프로모터 서열(성분 a))을 추가로 포함하는 핵산 작제물.

청구항 5

제4항에 있어서, 사람 엔도글린 프로모터 서열이 작동인자 유전자의 상부에 정렬된 핵산 작제물.

청구항 6

제3항 내지 제5항중 어느 한 항에 있어서, 사람 엔도글린 프로모터 서열이 바이러스-특이적인 서열, 대사-특이적인 서열, 세포-특이적인 서열 또는 세포 주기-특이적인 활성화 서열을 포함하는 그룹중에서 선택된 하나 이상의 추가의 활성화 서열과 결합된 핵산 작제물.

청구항 7

제3항 내지 제6항중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 DNA인 핵산 작제물.

청구항 8

제3항 내지 제7항중 어느 한 항에 있어서, 백터내로 삽입된 핵산 작제물.

청구항 9

제8항에 있어서, 백터가 플라스미드 백터 또는 바이러스 백터인 핵산 작제물.

청구항 10

제4항 내지 제9항중 어느 한 항에 있어서, 작동인자 유전자가 사이토킨, 케모킨, 성장 인자, 사이토킨에 대한 수용체, 케모킨에 대한 수용체, 성장 인자에 대한 수용체 및 또한 사이토킨 길항제, 증식억제 효과 또는 세포성색전 효과 또는 아포토시스(apoptosis) 효과를 갖는 단백질, 항체, 항체 단편, 맥관형성 억제제, 응집 인자, 응집 억제제, 피브린분해 단백질, 약물의 전구체를 분해함으로써 약물을 형성하는 효소, 혈액 순환 효과를 갖는 단백질 또는 면역 반응을 일으키는 감염성 병원체의 항원으로 이루어진 그룹중에서 선택된 활성 화합물을 암호화하는 유전자의 핵산 작제물.

청구항 11

제3항 내지 제10항중 어느 한 항에 있어서, 프로모터 서열 또는 내부 리보소ーム 도입 부위(internal ribosomal entry site : IRES)에 의해 서로 연결된 몇개의 작동인자 유전자를 포함하는 핵산 작제물.

청구항 12

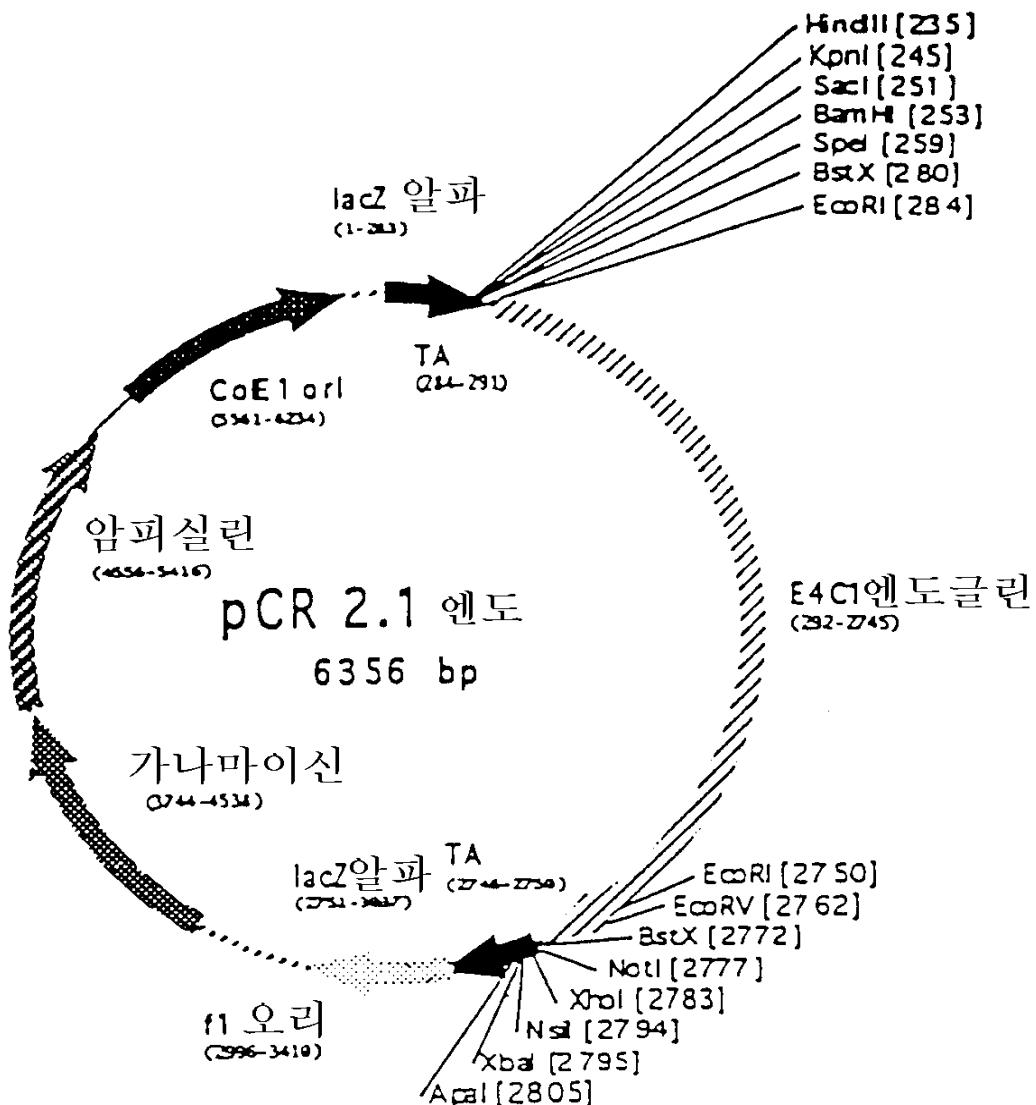
제3항 내지 제11항중 어느 한 항에 따른 핵산 작제물을 지닌 세포.

청구항 13

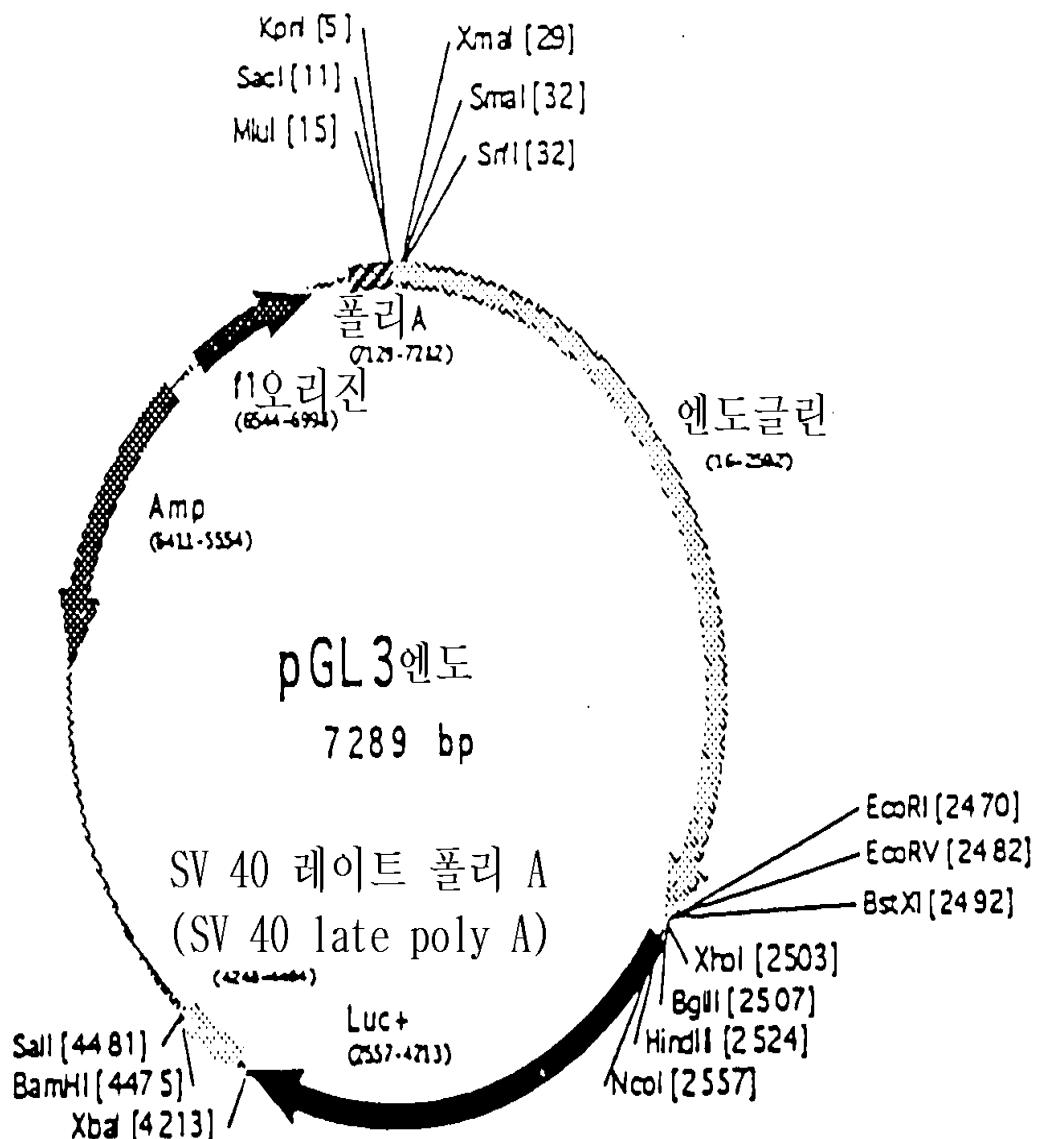
종양 질환, 백혈병, 자가면역 질환, 알레르기, 관절염, 염증, 기관 거부, 이식체 대 속주 반응, 혈액 응고 질환, 심장혈관 질환, 빈혈, 감염 또는 CNS 손상으로 이루어진 그룹중에서 선택된 질환 치료용 약물을 제조하기 위한, 제3항 내지 제10항중 어느 한 항에 따른 핵산 작제물 또는 제12항에 따른 세포의 용도.

도면

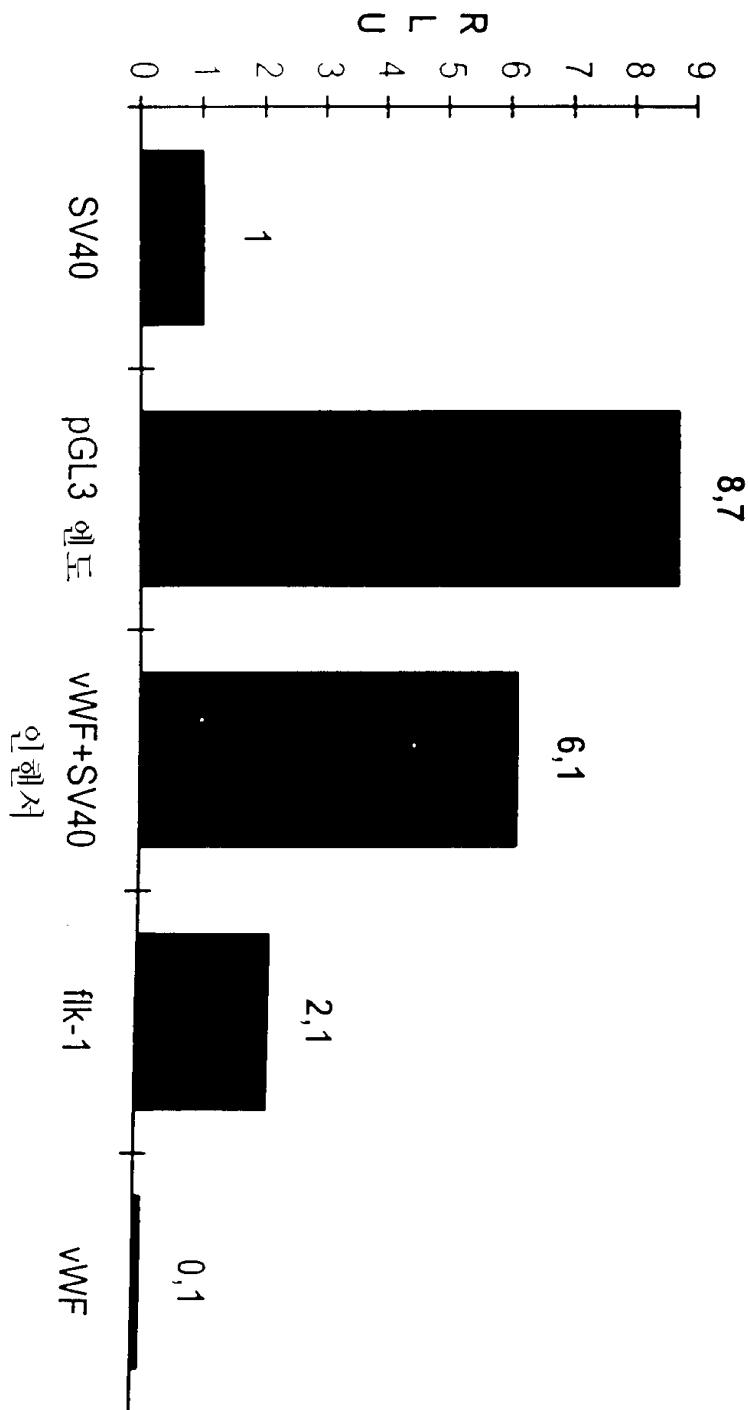
도면 1a



도면 1b

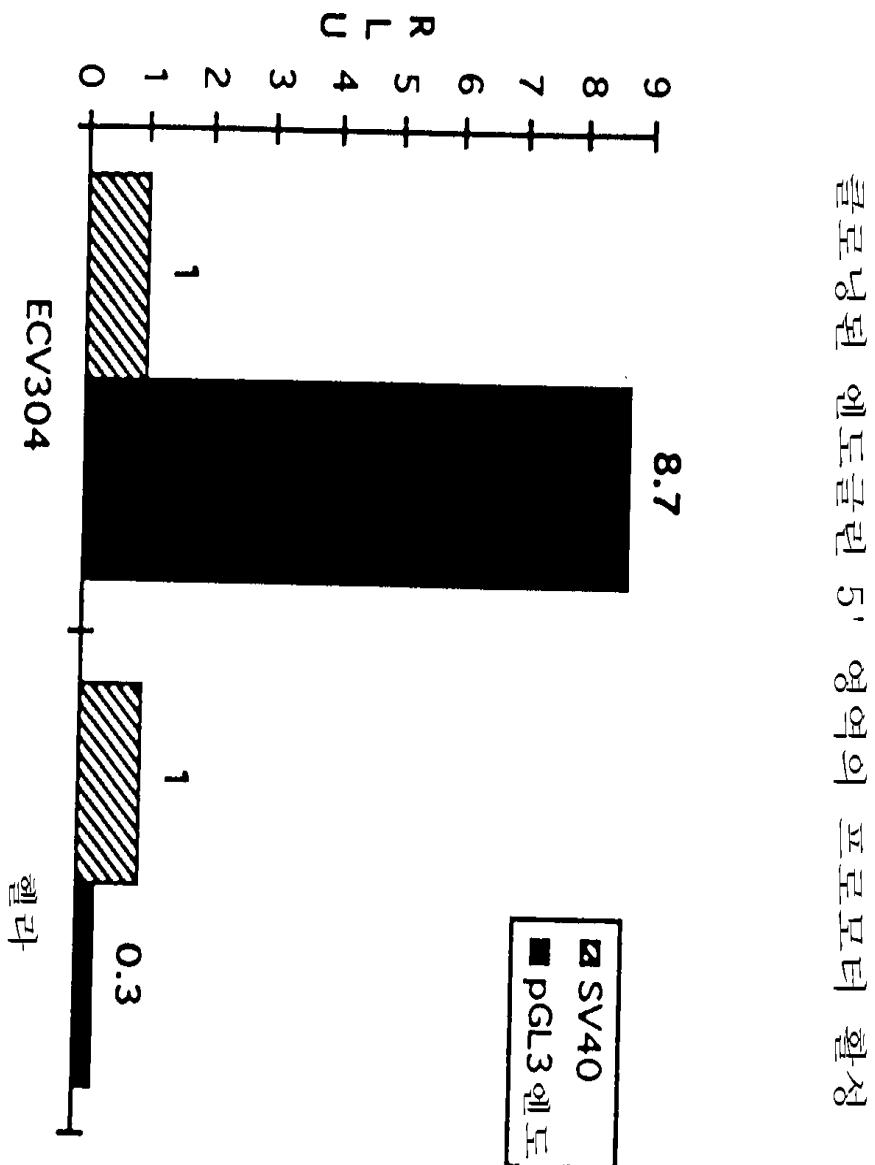


도면2



ECV304 세포내에서 상이한 내피 세포-특이적인 프로모터의 비교

도면3



도면4

