



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년02월21일
(11) 등록번호 10-1234981
(24) 등록일자 2013년02월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7024399(분할)
(22) 출원일자(국제) 2004년10월11일
심사청구일자 2011년11월16일
(85) 번역문제출일자 2011년10월17일
(65) 공개번호 10-2011-0120364
(43) 공개일자 2011년11월03일
(62) 원출원 특허 10-2006-7009012
원출원일자(국제) 2004년10월11일
심사청구일자 2009년10월09일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2004/004279
(87) 국제공개번호 WO 2005/035771
국제공개일자 2005년04월21일
(30) 우선권주장
60/509,936 2003년10월10일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2002031137 A2
WO2002036792 A1

(73) 특허권자
파우더젯 백신, 인코포레이티드
미국 19808 텔라웨어주 윌밍톤 수트 400 켄터빌
로드 2711
(72) 발명자
폴러, 제임스
미국 16066 펜실베이니아주 캔베리 티더블유포 사우스
스리지 드라이브135
(74) 대리인
김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 7 항

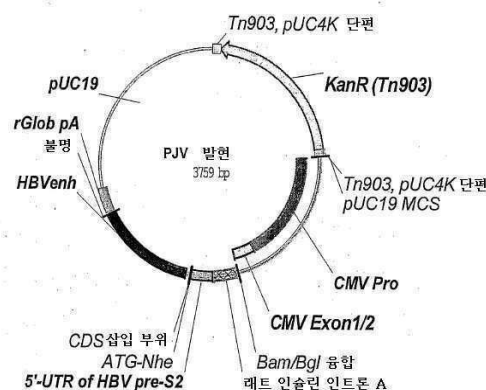
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 핵산 구조물

(57) 요약

본 발명은 (a) hCMV 즉시형 초기 프로모터 서열; (b) hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 엑손 1 및 적어도 일부분의 엑손 2; 및 (c) hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 인트론 A 영역 대신에 제공된 이중 인트론을 포함하는 키메라 프로모터 서열 및 이와 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 삽입을 위한 클로닝 부위를 포함하는 핵산 구조물을 제공한다.

대표도 - 도8



특허청구의 범위

청구항 1

- (a) hCMV 즉시 초기 프로모터 서열;
 - (b) 인트론 A가 부재한 hCMV 주요 즉시 초기 유전자의 엑손 1 및 엑손 2 서열의 2 내지 9개의 염기를 포함하는 엑손 서열; 및
 - (c) 엑손 서열 (b)의 3'인 이중 인트론
- 을 포함하는, 분리 정제된 키메라 프로모터 서열.

청구항 2

제1항에 있어서,

hCMV 즉시 초기 프로모터 서열 (a)가 서열 1인 분리 정제된 키메라 프로모터 서열.

청구항 3

제1항에 있어서, 엑손 서열 (b)가 서열 2인 분리 정제된 키메라 프로모터 서열.

청구항 4

제1항에 있어서, 이중 인트론 (c)가 래트 인슐린 유전자 인트론 A 서열, 치킨 케라틴 유전자 인트론 A 서열, 및 치킨 심장 액틴 유전자 인트론 A 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것인 분리 정제된 키메라 프로모터 서열.

청구항 5

제4항에 있어서, 래트 인슐린 유전자 인트론 A 서열이 서열 3을 포함하는 것인 분리 정제된 키메라 프로모터 서열.

청구항 6

제1항에 있어서, 서열 4의 서열을 포함하는 분리 정제된 키메라 프로모터 서열.

청구항 7

- (a) 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 키메라 프로모터 서열; 및 (b) 키메라 프로모터와 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 삽입을 위한 클로닝 부위를 포함하는, 코딩 서열을 발현하는데 유용한 핵산 구조물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 분자생물학 및 면역학 분야에 관한 것으로서, 일반적으로 핵산 면역화 기술에 유용한 제제에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 항원성 폴리펩티드의 발현을 위한 핵산 구조물 및 이러한 제제를 사용한 핵산 면역화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유전자 치료 및 핵산 면역화는 후천성 및 선천성 질환 모두에 대한 치료 및 예방을 위한 기대되는 접근법이다. 이들 기술은 목적하는 핵산을 피검물 (subject)에 전달하여 생체 내에서 발현시키는 것을 제공한다. 전달은 피검물 세포 또는 조직을 생체 외에서 트랜스펙션시키고 형질전환된 물질을 숙주에 재도입함으로써 수행될 수 있다. 다르게는, 핵산을 수용체에 직접적으로 생체 내에서 투여할 수 있다.

[0003] 이러한 기술은 각각 충분한 치료적 또는 항원적 유전자 생성물을 제공하기 위해 트랜스펙션된 세포에서 핵산의 효과적인 발현을 필요로 한다. 트랜스펙션 효율, 목적하는 유전자 또는 서열이 전사되고 mRNA가 해독되는

효율을 포함하는, 수개의 인자가 수득되는 발현 수준에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다.

- [0004] 많은 발현 시스템이 당 기술 분야에서 기술되어 있으며, 통상적으로 이들은 각각 발현 조절 서열에 작동적으로 연결된 목적하는 유전자 또는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 벡터로 이루어져 있다. 이들 조절 서열은 전사 프로모터 서열 및 전사 개시 및 종결 서열을 포함한다. 포유동물 세포 발현 시스템을 위한 통상 사용되는 프로모터는 SV40 초기 프로모터, 사이토메갈로바이러스 (cytomegalovirus: CMV) 프로모터, 예를 들어 CMV 즉시형 초기 (immediate early) 프로모터 (Chapman et al (1991) Nucl. Acids Res. 19: 3979-3986), 마우스 유방암 바이러스 긴 말단 반복 (long terminal repeat: LTR) 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터 (adenovirus major late promoter: Ad MLP) 및 단순 포진 바이러스 (herpes simplex virus: HSV) 프로모터를 포함한다. 비 바이러스성 프로모터, 예를 들어 뮤린 메탈로티오네인 유전자로부터 유도된 프로모터도 일반적으로 사용된다.
- [0005] 발현 시스템은 종종 전사 조절자 요소 ("인핸서"로 언급함)를 포함한다. 인핸서는 광범위하게는 프로모터/유전자 서열에 작동적으로 연결되었을 때 유전자 서열의 전사를 증가시키는시스-작용제 (cis-acting agent)로 정의된다. 인핸서는 다른 발현 조절 요소 (예: 프로모터)보다 목적하는 서열로부터 훨씬 더 떨어진 위치에서 작용할 수 있으며, 목적하는 서열에 대해 양쪽 방향으로 위치되었을 때 작동할 수 있다 (Banerji et al. (1981) Cell 27: 299-308, deVilleirs et al. (1981) Nucl. Acids Res 9: 6251-6264). 인핸서는 폴리오마 바이러스, BK 바이러스, 사이토메갈로바이러스 (CMV), 아데노바이러스, 시미안 바이러스 40 (SV40), 모로니 육종 바이러스, 소 유두종 바이러스 및 로우즈 육종 바이러스를 포함한 다수의 바이러스 기원으로부터 확인되었다 (deVilleirs et al. 상기 참조, Rosenthal et al. (1983) Science 222: 749-755, Hearing et al. (1983) Cell 33: 695-703, Weeks et al. (1983) Mol. Cell. Biol. 3: 1222-1234, Levinson et al. (1982) Nature 295: 568-575, 및 Luciw et al. (1983) Cell 33: 705-716).
- [0006] 핵산 번역화 및 유전자 치료를 위한 많은 발현 시스템은 hCMV 즉시형 초기 프로모터를 사용한다. 미국 특허 번호 제5168062호 및 제5385839호 (Stinski) 및 EP 특허 번호 제0323997 B1호를 참조한다. hCMV 즉시형 초기 프로모터를 사용하는 발현 벡터는, 예를 들어 pWRG7128 (Roy et al, Vaccine 19,764-778, 2001), 및 pBC12/CMV 및 pJW4303 (국제 공개 번호 제WO 95/20660호에서 기술됨)을 포함한다. 챔먼 등 (Chapman et al (1991))은 hCMV 인트론 A의 부재 하에서 hCMV 즉시형 초기 프로모터로부터의 감소된 발현 수준을 보고하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 숙주 세포에서 이종의 코딩 서열의 발현을 향상시키는, 조작된 바이러스성 프로모터/발현 서열을 사용하는 핵산 구조물을 개발하였다.

과제의 해결 수단

- [0008] 따라서, 본 발명은
- [0009] (a) hCMV 즉시형 초기 프로모터 서열;
- [0010] (b) hCMV 주요 즉시형 초기 (major immediate early) 유전자의 엑손 1 및 적어도 일부분의 엑손 2; 및
- [0011] (c) hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 인트론 A 영역 대신에 제공된 이종 인트론
- [0012] 을 포함하는 키메릭 프로모터 서열 및 이와 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 삽입을 위한 클로닝 부위를 포함하는 핵산 구조물을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은
- [0014] (i) (a) hCMV 즉시형 초기 프로모터 서열; (b) hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 엑손 1 및 적어도 일부분의 엑손 2; 및 (c) hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 인트론 A 영역 대신에 제공된 이종 인트론을 포함하는 키메릭 프로모터 서열; 및
- [0015] (ii) 상기 키메릭 프로모터와 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 삽입을 위한 클로닝 부위; 및
- [0016] (iii) (a) HBV preS2 항원 서열, HBV e-항원 서열 또는 HSV 타입 2gD 항원 서열로부터 유도되고 상기 키메릭 프로모터와 작동가능하게 연결된 비-해독 리더 서열; 및/또는 (b) HBsAg (hepatitis B virus surface antigen) 서열의 3' 비해독 영역 (UTR) 또는 시미안 CMV 즉시형 초기 유전자 서열의 3'UTR로부터 유도되고 상기 키메릭

프로모터와 작동가능하게 연결되며 클로닝 부위의 아래에 있는 인핸서 서열을 포함하는 핵산 구조물;

- [0017] (i) 프로모터 서열;
- [0018] (ii) HBV preS2 항원 서열, HBV e-항원 서열 또는 HSV 타입 2gD 항원 서열로부터 유도되는 비-해독 리더 서열; 및
- [0019] (iii) (i) 및 (ii)에 작동적으로 연결되고 비-해독 리더 서열에 이중인 코딩 서열을 포함하는 핵산 구조물;
- [0020] (i) 프로모터 서열;
- [0021] (ii) 프로모터 서열 (i)에 작동적으로 연결된 코딩 서열; 및
- [0022] (iii) 코딩 서열 (ii)의 3'에 존재하고 이에 작동적으로 연결된 인핸서 서열을 포함하고, 인핸서 서열 (iii)이 HBsAg 서열의 3'UTR 또는 시미안 CMV 즉시형 초기 유전자 서열의 3'UTR로부터 유도되며, 코딩 서열 (ii)가 3' 인핸서 서열에 이중인 핵산 구조물;
- [0023] 목적하는 폴리펩티드를 암호화하는 코딩 서열을 포함하는 본 발명의 핵산 구조물을 포유동물 세포에 전달하는 단계를 포함하여, 목적하는 폴리펩티드를 포유동물 세포에서 발현시키는 방법;
- [0024] 상기 폴리펩티드를 암호화하는 코딩 서열을 포함하는 본 발명의 핵산 구조물로 코팅된 캐리어 입자를 포함하는, 입자-매개된 전달 디바이스로부터의 전달에 적합한 코팅된 입자;
- [0025] 상기 코팅된 입자를 포함하는 입자 매개된 전달 디바이스를 위한 투여 용기 (receptacle);
- [0026] 상기 코팅된 입자가 적재된 입자 매개된 전달 디바이스;
- [0027] 코딩 서열이 항원을 암호화하는 코팅된 입자의 유효량을 피검물에 투여하는 단계를 포함하는, 핵산 면역화 방법;
- [0028] (a) hCMV 즉시형 초기 프로모터 서열;
- [0029] (b) hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 엑손 1 및 적어도 일부분의 엑손 2; 및
- [0030] (c) hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 인트론 A 영역 대신에 제공된 이중 인트론을 포함하는 분리 정제된 키메라 프로모터 서열을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 상기 및 기타 목적, 양상, 양태 및 이점이 본원의 기술에 비추어 당업자에게 쉽게 이해될 것이다.

발명의 효과

- [0032] 이 구조물은 항원-암호화 유전자의 효과적인 발현에 적합하여, 핵산 면역화에 사용될 수 있다. 특히, 이 구조물은 입자-매개된 핵산 면역화에 사용하기 위해 캐리어 입자에 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 다양한 플라스미드 발현 벡터를 사용하여 수득되는 B형 간염 바이러스 표면 항원 (hepatitis B virus surface antigen: HBsAg)의 발현 수준을 나타낸다.

도 2는 SCC15 세포에서의 HBsAg의 발현 및 B16 세포에서의 β -gal의 발현에 대한 인트론 포함의 효과를 나타낸다 (3회 실험의 평균).

도 3은 SCC15 세포에서의 β -gal의 발현에 대한 래트 인슐린 인트론 A 및 HBV3'UTR의 효과를 나타낸다 (3회 실험의 평균).

도 4는 SCC15 세포에서의 HSVgD의 발현에 대한 래트 인슐린 인트론 A 및 HBV3'UTR의 효과를 나타낸다 (3회 실험의 평균).

도 5는 SCC15 및 B16 세포에서의 SEAP의 발현에 대한 래트 인슐린 인트론 A 및 HBV3'UTR의 효과를 나타낸다 (세포주당 3회 반복).

도 6은 B16 세포에서의 SEAP 또는 hFc 단편의 직접적 분비에 대한 이중 시그널 펩티드의 능력을 나타낸다.

도 7은 다양한 플라스미드 발현 벡터에 포함된 항원-암호화 핵산으로 번역화된 마우스의 혈청에서 검출된 항체의 수준을 나타낸다.

도 8은 pJV 발현 벡터의 도식적 표시이다.

도 9는 pJV7389의 도식적 표시이다.

도 10은 pJV7400의 도식적 표시이다.

도 11은 pJV7468의 도식적 표시이다.

도 12는 pJV7563의 도식적 표시이다.

도 13은 pJV7563에 대한 염기 조성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

서열의 간단한 설명

서열 1은 hCMV 즉시형 초기 프로모터 서열이다 (진뱅크 #M60321, X17403).

서열 2는 hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 엑손 1 및 2로부터의 서열이다 (진뱅크 #M60321, X17403).

서열 3은 래트 인슐린 인트론 A 서열이다 (진뱅크 #J00748).

서열 4는 본 발명에 따른 키메라 프로모터의 서열이다.

서열 5는 HBV preS2 항원 5'UTR 서열로부터의 리더 서열이다 (진뱅크 #M54923).

서열 6은 HSV 타입 2gD 5'UTR 서열로부터의 리더 서열이다 (진뱅크 #Z86099).

서열 7은 HBV e-항원 5'UTR 서열로부터의 리더 서열이다 (진뱅크 #M54923).

서열 8은 HBVenh 3'UTR 서열이다 (진뱅크 #AF143308).

서열 9는 시미안 즉시형 초기 유전자 3'UTR 서열이다 (진뱅크 #M16019).

서열 10은 래비트 β 글로빈 폴리A 서열이다 (진뱅크 #K03256).

서열 11은 시미안 sCMV 즉시형 초기 유전자 폴리A 서열이다 (진뱅크 #M16019).

서열 12는 HSV 2gB 유전자 폴리A 서열이다 (진뱅크 #Z86099).

서열 13은 HPV16 초기 유전자 폴리A 서열 (진뱅크 #K02718)이다.

서열 14는 pJV 발현 벡터의 서열이다.

서열 15는 PCR 프라이머 JF93이다.

서열 16은 PCR 프라이머 F110이다.

서열 17은 PCR 프라이머 GW1이다.

서열 18은 PCR 프라이머 JF254이다.

- [0053] 서열 19는 PCR 프라이머 GW150이다.
- [0054] 서열 20은 PCR 프라이머 JF255이다.
- [0055] 서열 21은 PCR 프라이머 DS1이다.
- [0056] 서열 22는 PCR 프라이머 DA1이다.
- [0057] 서열 23은 PCR 프라이머 JF301이다.
- [0058] 서열 24는 PCR 프라이머 JF302이다.
- [0059] 서열 25는 PCR 프라이머 JF84이다.
- [0060] 서열 26은 PCR 프라이머 JF225이다.
- [0061] 서열 27은 PCR 프라이머 JF335이다.
- [0062] 서열 28은 PCR 프라이머 JF336이다.
- [0063] 서열 29는 PCR 프라이머 JF357이다.
- [0064] 서열 30은 PCR 프라이머 JF365이다.
- [0065] 서열 31은 PCR 프라이머 JF393이다.
- [0066] 서열 32는 PCR 프라이머 JF406이다.
- [0067] 서열 33은 PCR 프라이머 JF256이다.
- [0068] 서열 34는 PCR 프라이머 JF257이다.
- [0069] 서열 35는 PCR 프라이머 JF320이다.
- [0070] 서열 36은 PCR 프라이머 JF321이다.
- [0071] 서열 37은 PCR 프라이머 JF386이다.
- [0072] 서열 38은 PCR 프라이머 FcAS이다.
- [0073] 서열 39는 올리고뉴클레오타이드 JF354이다.
- [0074] 서열 40은 PCR 프라이머 JF355이다.
- [0075] 서열 41은 PCR 프라이머 JF356이다.
- [0076] 서열 42는 올리고뉴클레오타이드 JF348이다.
- [0077] 서열 43은 PCR 프라이머 JF349이다.
- [0078] 서열 44는 PCR 프라이머 JF350이다.
- [0079] 서열 45는 올리고뉴클레오타이드 JF351이다.
- [0080] 서열 46은 PCR 프라이머 JF352이다.
- [0081] 서열 47은 PCR 프라이머 JF353이다.
- [0082] 서열 48은 PCR 프라이머 JF430이다.
- [0083] 서열 49는 PCR 프라이머 JF442이다.
- [0084] 서열 50은 PCR 프라이머 JF421이다.
- [0085] 서열 51은 PCR 프라이머 JF444이다.
- [0086] 서열 52는 슈도라비즈 바이러스 (Pseudorabies virus: PRV) 프로모터 서열이다.
- [0087] 서열 53은 로우즈 육종 바이러스 (Rous sarcoma virus: RSV) 프로모터 서열이다.

- [0088] 본 발명을 상술하기에 앞서, 본 발명이 특정 예시된 분자 또는 공정 변수 (물론 그 자체로서 변화할 수 있다)에 제한되지 않는다는 것을 알아야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 본 발명의 특정 양태를 설명하기 위한 것으로서 제한적인 것이 아니라는 것을 알아야 한다. 또한, 본 발명의 실시는, 달리 언급이 없는 한, 바이러스학, 미생물학, 분자 생물학, 재조합 DNA 기술 및 면역학에 대한 통상의 방법 (모두 통상적 기술에 속한다)을 이용할 것이다. 이러한 기술은 문헌 (Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); 및 Fundamental Virology, 2nd Edition, vol. I & II (B. N. Fields and D. M. Knipe, eds.))에서 충분히 설명된다.
- [0089] 본원에 인용된 모든 공개물, 특허 및 특허출원은 전부 참조로 본원에 삽입된다.
- [0090] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수의 형태는 내용물을 달리 분명히 지시하지 않는 한 복수의 지시물을 포함한다.
- [0091] A. 정의
- [0092] 달리 언급하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 통상의 기술을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 대등한 많은 방법 및 물질이 본 발명의 실시예에 사용될 수 있으나, 본원에는 바람직한 물질 및 방법이 기술된다.
- [0093] 본 발명을 기술함에 있어, 하기 용어가 사용될 것이며 아래 나타낸 바와 같이 정의하고자 한다.
- [0094] 본원에 사용된 용어 "핵산 면역화"는 하나 이상의 선택된 항원을 암호화하는 핵산 분자를 항원 또는 항원들의 생체 내 발현을 위해 숙주 세포에 도입하는 것을 언급하고자 사용된다. 핵산 분자는, 예를 들어 표준 근육 내 또는 피부 내 주사; 경피 입자 전달; 흡입; 국소, 경구, 비강 내 또는 점막 모드의 투여에 의해 수령 피검물에 직접적으로 도입될 수 있다. 다르게는, 핵산 분자는 피검물로부터 떼어낸 세포에 생체 외에서 도입될 수 있다. 이러한 후자의 경우에서, 목적하는 핵산 분자를 함유하는 세포는 핵산 분자에 의해 암호화되는 항원에 대해 면역 반응이 일어날 수 있도록 피검물에 재도입된다. 본원에서 이러한 면역화에 사용되는 핵산 분자는 일반적으로 "핵산 백신"으로 언급된다.
- [0095] 용어 "어주버트 (adjuvant)"는 항원 특이적 면역 반응을 특이적으로나 비특이적으로 변화, 향상, 지시, 재지시, 강화 또는 개시할 수 있는 물질 또는 조성물을 의도한다. 따라서, 항원과 함께 어주버트를 공동-투여하면, 항원이 투여되는 피검물에서 목적하는 면역 반응을 달성하는데 보다 낮은 또는 적은 양의 항원이 필요하게 되거나, 피검물에서 질적으로 및/또는 양적으로 상이한 면역 반응을 야기할 수 있다. 특히, 어주버트의 공동-투여 결과, 보다 큰 크기 및/또는 지속 기간 중의 하나와 같은 향상된 면역 반응이 생긴다. 어주버트의 유효성은 백신 조성물 단독 투여와 병행하여 백신 조성물과 함께 어주버트를 투여하고, 방사면역검정, ELISA 및 CTL 검정과 같은 표준 검정을 이용하여 2개의 군에서 항체 및/또는 세포 매개된 면역을 비교하여 결정될 수 있다.
- [0096] 용어 "코어 캐리어 (core carrier)"는 게스트 핵산 (예: DNA, RNA)이 규정된 입자 크기 및 세포 막 투과에 필요한 운동량 (momentum)을 달성하기 위한 충분한 고밀도를 부여하도록 코팅되어 게스트 분자가 입자-매개된 기술을 이용하여 전달될 수 있는 캐리어를 의미한다 (미국 특허 번호 제5,100,792호). 코어 캐리어는 통상적으로 텅스텐, 금, 백금, 철산화물 (ferrite), 폴리스티렌 및 라텍스를 포함한다 (Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, (1994) Yang, N. ed., Oxford University Press, New York, NY pages 10-11).
- [0097] 용어 "바늘 없는 주사기"는 피부를 찌르기 위한 통상의 바늘의 도움 없이 미립자 조성물을 경피로 전달하는 기구를 의미한다. 본 발명에 사용하기 위한 바늘 없는 주사기가 본원에서 기술된다.
- [0098] 용어 "경피적 (transdermal)"은 피부 내 (예: 진피 또는 상피로), 경피 (예: "피하") 및 경점막 투여, 즉 피부 또는 점막 조직 내로 또는 이들을 통한 체계의 통과에 의한 전달을 의도한다. 문헌[Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives, Hadgraft and Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989); Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications, Robinson and Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987); 및 Transdermal Delivery of Drugs, Vols. 1-3, Kydonieus and Berner (eds.), CRC Press, (1987)]참조. 따라서, 상기 용어는 미국 특허 번호 제5,630,796호에 기술된 바와 같은 바늘 없는 주사기로부터의 전달 및 미국 특허 번호 제5,865,796호에 기술된 바와 같은 입자-매개된 전달을 포함한다.
- [0099] 용어 "폴리펩티드"는 2개 이상의 서브유니트의 아미노산, 아미노산 동족체 (analog) 또는 다른 펩티드 유사물

(peptidomimetics)의 화합물을 언급하는 광범위한 의미로 사용된다. 이러한 서브유니트는 펩티드 결합 또는 다른 결합, 예를 들어 에스테르, 에테르 등에 의해 연결될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "아미노산"은 글리신 및 D 또는 L 광학 이성체를 포함한 천연 및/또는 비천연 또는 합성 아미노산, 및 아미노산 동족체 및 펩티드 유사물을 언급한다. 3개 이상의 아미노산의 펩티드는 펩티드가 짧은 경우 일반적으로 올리고펩티드로 지칭된다. 펩티드 쇠가 길면, 통상적으로 폴리펩티드 또는 단백질로 지칭된다.

[0100] 용어 "항원"은 개체에서 면역학적 반응을 유도할 수 있는 일반적으로 거대분자인 제제를 언급한다. 이 용어는 각각의 거대분자 또는 균질 또는 이질 집단의 항원성 거대분자를 언급한다. 본원에 사용된 용어 "항원"은 일반적으로 하나 이상의 에피토프를 포함하는 단백질 분자 또는 이의 부분을 언급하기 위해 사용된다. 본 발명의 목적상, 항원은 적합한 공급원으로부터 수득되거나 유도될 수 있다. 또한, 본 발명의 목적상, "항원"은 단백질이 충분한 면역원성을 유지하는 한 천연 서열에 대해 (일반적으로 자연에서 보존적인) 결실, 부가 및 치환과 같은 변형을 갖는 단백질을 포함한다. 이들 변형은, 예를 들어 부위-지시된 돌연변이유발을 통한 의도적인 것일 수 있으며, 또한 항원을 생산하는 숙주의 돌연변이에 의한 것과 같이 우연적일 수 있다.

[0101] 목적하는 항원에 대한 "면역 반응"은 그 항원에 대한 체액성 및/또는 세포성 면역 반응을 위한 개체에서의 전개이다. 본 발명의 목적상, "체액성 면역 반응"은 항체 분자에 의해 매개되는 면역 반응을 언급하고, "세포성 면역 반응"은 T-림프구 및/또는 다른 백혈구에 의해 매개되는 면역 반응이다.

[0102] 용어 "핵산 분자" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 또는 이의 동족체인 특정 길이의 뉴클레오타이드의 중합체 형태를 언급한다. 폴리뉴클레오타이드는 3차원 구조를 가질 수 있으며, 공지되거나 공지되지 않은 기능을 수행할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드의 비-제한적 예는 유전자, 유전자 단편, 엑손, 인트론, 메신저 RNA (mRNA), 전령 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지된 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 분리된 DNA, 임의의 서열의 분리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머를 포함한다.

[0103] 폴리뉴클레오타이드는 통상적으로 4개의 뉴클레오타이드 염기: 아데닌 (A); 시토신 (C); 구아닌 (G); 및 티민 (T) (폴리뉴클레오타이드가 RNA인 경우 티민 (T) 대신에 우라실 (U))의 특정 서열로 구성된다. 따라서, 용어 핵산 서열은 폴리뉴클레오타이드 분자의 알파벳 표시이다. 이러한 알파벳 표시는 중앙 프로세싱 유니트를 갖는 컴퓨터에서 데이터베이스로 입력되고 기능 게놈학 및 상동체 조사와 같은 생물정보학 적용에 사용될 수 있다.

[0104] 용어 "벡터"는 핵산 서열을 표적 세포에 전달할 수 있다 (예: 바이러스 벡터, 비-바이러스 벡터, 미립자 캐리어 및 리포솜). 통상적으로, 용어 "벡터 구조물", "발현 벡터" 및 "유전자 전달 벡터"는 목적하는 유전자의 발현을 지시할 수 있는 핵산 구조물 및 유전자 서열을 표적 세포에 전달할 수 있는 핵산 구조물을 의미한다. 따라서, 상기 용어는 바이러스 벡터뿐만 아니라 클로닝 및 발현 비히클을 포함한다. 용어 "플라스미드"는 염색체의 유전자 요소 (extrachromosomal genetic element)의 형태인 벡터이다.

[0105] 선택된 항원을 "암호화"하는 핵산 서열은 적절한 조절 서열의 조절 하에 놓일 때 생체 내에서 전사 (DNA의 경우) 및 해독 (mRNA의 경우)되는 핵산 분자이다. 코딩 서열의 경계는 5' (아미노) 말단에 있는 개시 코돈 및 3' (카르복시) 말단에 있는 해독 정지 코돈에 의해 결정된다. 본 발명의 목적상, 이러한 핵산 서열은, 이로 제한됨이 없이, 바이러스, 원핵생물 또는 진핵생물 mRNA로부터의 cDNA, 바이러스 또는 원핵생물 DNA 또는 RNA로부터의 게놈 서열, 및 합성 DNA 서열을 포함할 수 있다. 전사 종결 서열은 코딩 서열의 3'에 위치될 수 있다.

[0106] 용어 "프로모터 (promoter)"는 폴리펩티드-암호화 폴리뉴클레오타이드의 전사를 개시 및 조절하는 뉴클레오타이드 서열이다. 프로모터는 유도성 프로모터 (프로모터에 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현이 분석물, 보조인자, 조절 단백질 등에 의해 유도되는 경우), 억제성 프로모터 (프로모터에 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현이 분석물, 보조인자, 조절 단백질 등에 의해 억제되는 경우), 및 구성적 프로모터 (constitutive promoter)를 포함할 수 있다. 용어 "프로모터" 또는 "조절 요소"는 완전한 길이의 프로모터 영역 및 이들 영역의 기능적 (예: 전사 또는 해독의 조절) 절편을 포함하는 것을 의도한다.

[0107] 용어 "작동적으로 연결된 (operably linked)"은 기술된 성분이 이들의 통상의 기능을 수행하도록 배치된 요소의 배열을 언급한다. 따라서, 핵산 서열에 작동적으로 연결된 지정된 프로모터는 적합한 효소가 존재하는 경우 핵산 서열의 발현을 수행할 수 있다. 프로모터는 이의 발현을 지시하도록 기능하는 한 서열과 인접할 필요는 없다. 따라서, 예를 들어, 개입하는 비해독 전사 서열이 프로모터 서열 사이에 존재할 수 있고, 핵산 서열 및 프로모터 서열은 여전히 코딩 서열에 "작동적으로 연결된" 것으로 간주될 수 있다.

[0108] 본원에서 용어 "재조합 (recombinant)"은, 기원 (origin) 또는 조작에 의해, 자연적으로 연결되는 폴리뉴클레오

티드 전부 또는 일부분과 결합되지 않고/않거나 자연적으로 연결되는 폴리뉴클레오티드 이외의 폴리뉴클레오티드에 연결된, 계놈성, cDNA, 반합성 또는 합성 기원의 핵산 분자를 기술하기 위해 사용된다. 단일 재조합 핵산 분자에 함유되는 2개의 핵산 서열은 이들이 정상적으로는 자연적으로 서로 연결되지 않는 경우 서로에 대해 "이종 (heterologous)"이다.

- [0109] 폴리뉴클레오티드의 상동체가 본원에서 언급된다. 통상적으로, 또 다른 폴리뉴클레오티드에 대해 상동인 폴리뉴클레오티드는 그 폴리뉴클레오티드에 대해 적어도 70 %, 바람직하게는 적어도 80 % 또는 90 %, 보다 바람직하게는 적어도 95 %, 97 % 또는 99 %의 상동성이다. 상동성을 측정하기 위한 방법은 당 기술 분야에서 널리 공지되어 있으며, 핵산 동일성에 기초하여 상동성이 계산된다는 것을 당업자가 알 수 있을 것이다. 이러한 상동성은 적어도 15, 바람직하게는 적어도 30, 예를 들어 적어도 40, 60 또는 100 또는 그 이상의 연속한 뉴클레오티드의 영역에 걸쳐 존재할 수 있다.
- [0110] 폴리뉴클레오티드 상동성 또는 동일성을 측정하는 방법이 당 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, UWGCG 패키지가 (예를 들어 이의 디폴트 세팅에 사용되는) 상동성을 계산하는데 사용될 수 있는 BESTFIT 프로그램을 제공한다 (Devereux et al (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395).
- [0111] 또한, PILEUP 및 BLAST 알고리즘을 사용하여 (통상적으로 이들의 디폴트 세팅에 대한) 상동성 또는 라인 업 서열을 계산할 수 있다 (Altschul S. F. (1993) *J Mol Evol* 36: 290-300; Altschul, S, F et al (1990) *J Mol Biol* 215: 403-10).
- [0112] BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 공개적으로 이용가능하다. 이러한 알고리즘은 먼저, 데이터베이스 서열에 있는 동일한 길이의 워드와 함께 정렬했을 때 일부 포지티브 값의 역치 (threshold) 스코어 T와 일치하거나 충족하는 의문의 서열 중의 길이 W의 짧은 워드를 확인함으로써, 높은 스코어링 서열 쌍 (high scoring sequence pair: HSP)을 확인하는 것을 수반한다. T는 네이버후드 워드 스코어 역치 (neighbourhood word score threshold)으로 언급된다 (Altschul et al., 상기 참조). 이들 초기의 네이버후드 워드 적중은 이들을 함유하는 HSP를 찾기 위한 조사를 개시하기 위한 발단으로 작용한다. 워드 적중은 축적 정렬 스코어가 증가될 수 있는 한 각각의 서열을 따라 양 방향으로 연장된다. 각각의 방향에서의 워드 적중을 위한 연장은, 축적 정렬 스코어가 하나 이상의 네가티브-스코어링 잔기 정렬의 축적에 의해 0 또는 그 이하이거나 서열의 말단에 도달했을 때 정지된다. BLAST 알고리즘 변수 W, T 및 X는 감도 및 정렬 속도를 측정한다. BLAST 프로그램은 11의 워드 길이 (W), 50의 BLOSUM62 스코어링 매트릭스 (Henikoff and Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919) 정렬 (B), 10의 기대 (E), M=5, N=4 및 양 스트랜드의 비교를 디폴트로 사용한다.
- [0113] BLAST 알고리즘은 2개의 서열 사이의 유사성에 대한 통계학적 분석을 수행한다 (Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787). BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 유사성에 대한 하나의 측정은 가장 적은 합의 가능성 (smallest sum probability) (P(N))이며, 이는 2개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 조화가 우연히 발생할 수 있는 가능성에 대한 표시를 제공한다. 예를 들어, 제 1 서열을 제 2 서열에 비교하여 가장 적은 합의 가능성이 약 1 미만, 바람직하게는 약 0.1 미만, 보다 바람직하게는 약 0.01 미만, 가장 바람직하게는 약 0.001 미만인 경우, 서열은 또 다른 서열과 유사한 것으로 간주된다.
- [0114] 상동체는 통상적으로 백그라운드를 상당히 초과하는 수준으로 관련 폴리뉴클레오티드와 하이브리드화한다. 상동체와 폴리뉴클레오티드 사이의 상호작용에 의해 생성된 시그널은 통상적으로 "백그라운드 하이브리드화 (background hybridisation)" 강도의 적어도 10배, 바람직하게는 적어도 100배이다. 상호작용의 강도는, 예를 들어 프로브를, 예를 들어 32 P으로 방사선 표지하여 측정될 수 있다. 선별적 하이브리드화는 통상적으로 중간 내지 높은 엄격 조건 (예를 들어, 0.03 M 염화나트륨 및 0.003 M 나트륨 시트레이트, 약 50 °C 내지 약 60 °C)을 이용하여 달성된다.
- [0115] 엄격한 하이브리드화 조건은 50 % 포름아미드, 5x 덴하르트 용액 (Denhardt's Solution), 5x SSC, 0.1 % SDS 및 100 µg/ml 변성 연어 정자 DNA를 포함할 수 있으며, 세척 조건은 37 °C에서의 2x SSC, 0.1 % SDS에 이어 68 °C에서의 1x SSC, 0.1 % SDS를 포함할 수 있다. 적합한 하이브리드화 조건의 정의는 당 기술 분야의 기술에 속한다 (Sambrook et al., 상기 참조).
- [0116] 상동체는 3 미만, 5 미만, 10 미만, 15 미만, 20 미만 또는 그 이상의 수 미만의 돌연변이 (각각은 치환, 결실 또는 삽입일 수 있다)에 의해 관련 폴리뉴클레오티드에서 서열이 상이할 수 있다. 이들 돌연변이는 상동체의 적어도 30, 예를 들어 적어도 40, 60 또는 100 또는 그 이상의 연속한 뉴클레오티드의 영역에 걸쳐 측정될 수

있다. 폴리뉴클레오티드가 폴리펩티드를 암호화하는 경우, 치환은 바람직하게는 암호화되는 아미노산에서 "보존적 (conservative)" 변화를 만든다. 이러한 치환은 하기 표에 따라 정의된다. 제 2 컬럼의 동일한 블록에 있는 아미노산 및 바람직하게는 제 3 컬럼의 동일한 라인에 있는 아미노산이 보존적 변화에서 서로에 대해 치환될 수 있다.

표 1

지방족 (ALIPHATIC)	비극성	G A P
		I L V
	극성-비하전됨	C S T M
		N Q
	극성-하전됨	D E
		K R
방향족 (AROMATIC)		H F W Y

용어 "개체" 및 "피검물"은, 제한 없이, 비-사람 영장류, 예로 침팬지 및 다른 원숭이 (ape 및 monkey 중); 농장 동물, 예로 소, 양, 돼지, 염소 및 말; 가정용 동물, 예로 개 및 고양이; 마우스, 래트, 기니아 피그와 같은 설치 동물을 포함하는 실험 동물; 닭, 칠면조 및 다른 가금류 새, 오리, 거위 등과 같은 가정용, 야생 및 게임용 새를 포함한 새를 포함하여, 사람 및 다른 영장류를 포함한 척색동물 아문 (subphylum cordata) 일원을 언급한다. 이 용어는 특정 나이를 나타내지 않는다. 따라서, 성숙 및 신생 개체를 포함하고자 한다. 본원에 기술된 방법은 이들 척추동물 모두의 번역계가 유사하게 작동하기 때문에 상기 척추동물 중 모두에 사용하고자 한다.

B. 일반적 개요

본 발명은 이중 코딩 서열 및 특히 항원-암호화 유전자를 숙주 세포에서 효과적으로 발현하게 하는 핵산 구조물에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 키메릭 프로모터 서열 및 클로닝 부위를 포함하거나 일부 양태에서는 이들로 필수적으로 이루어져 코딩 서열이 클로닝 부위에 삽입되었을 때 코딩 서열이 키메릭 프로모터와 작동가능하게 연결되는 핵산 구조물을 제공한다.

키메릭 프로모터는

(a) hCMV 즉시형 초기 프로모터 서열;

(b) hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 엑손 1 및 적어도 일부분의 엑손 2; 및

(c) hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 인트론 A 영역 대신에 제공된 이중 인트론

을 포함하거나 일부 양태에서는 이들로 필수적으로 이루어져 있다.

hCMV 즉시형 초기 프로모터 서열 (a)는

(i) 천연 hCMV 즉시형 초기 프로모터 서열;

(ii) 이의 기능적 상동 변이체; 또는

(iii) (i) 또는 (ii)의 기능적 단편

을 포함할 수 있다.

일반적으로, 서열 (a)는 약 100 내지 약 600, 바람직하게는 200 내지 600, 예를 들어 400 내지 600개의 뉴클레오티드를 포함한다. 통상적으로, 서열 (a)는 전사 인자 또는 RNA 폴리머라제에 결합하는 (i)에 존재하는 서열, 또는 이들 서열 대신에 동일한 전사 인자 및 RNA 폴리머라제에 결합할 수 있는 이들 서열의 상동체를 포함한다. 통상적으로, 이러한 서열 또는 이들의 상동체는 (i)에서와 동일한 순서 및/또는 실질적으로 동일한 상대적 간격으로 프로모터 서열 (a)에 존재한다.

일반적으로, (i)는 hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 적어도 뉴클레오티드 -100 내지 -1, 통상적으로 -150 내지 -1, 예를 들어 -500 내지 -1 또는 -600 내지 -1를 포함한다. 서열 (i)는 통상적으로 hCMV 코어 프로모터 서열

을 포함하며, 또한 hCMV 즉시형 초기 프로모터에 존재하는 하나 이상의 인헨서 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, (i)는 미국 특허 번호 제6218140호에 기술된 바와 같이 뉴클레오티드 -118 내지 -1, 또는 -524 내지 -1, 또는 미국 특허 번호 제5385839호에 기술된 바와 같이 뉴클레오티드 -62 내지 1 또는 -465 내지 -1를 포함할 수 있다.

[0133] 일반적으로, (i)는 프로모터 서열에서 일반적으로 발견되는 TATA 박스 또는 CAAT 박스를 포함한다. 바람직하게는, 이 서열은 hCMV 즉시형 초기 프로모터에 하나 이상의 반복 서열을 포함한다.

[0134] 바람직한 양태에서, (i)는 서열 1을 포함한다.

[0135] hCMV 즉시형 초기 프로모터 서열은 공지된 방법을 이용해 수득될 수 있다. 천연 hCMV 즉시형 초기 프로모터는 표준 기술을 이용하여 바이러스 샘플로부터 직접적으로 분리될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 제5385839호는 hCMV 프로모터 영역의 클로닝을 기술한다. hCMV 즉시형 초기 프로모터의 서열은 진뱅크 #M60321 (hCMV Towne 스트레인) 및 X17403 (hCMV Ad169 스트레인)에서 입수가 가능하다. 따라서, 천연 서열은 공지된 서열에 기초하여 PCR 프라이머를 이용해 PCR로 분리될 수 있다. DNA를 수득 및 분리하기 위해 사용되는 기술에 대한 설명을 예를 들어 문헌 [Sambrook et al., 상기 참조]에서 참조한다. 또한, 적합한 hCMV 프로모터 서열은 기존 플라스미드 벡터로부터 분리될 수 있다. 또한, 프로모터 서열은 합성적으로 생성될 수 있다.

[0136] 기능적 변이체 (ii) 또는 단편 (iii)은 일반적으로 천연 프로모터 (i)의 활성을 보유하고/하거나 보완하는 것이다. 통상적으로, 이러한 활성은 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오티드, 특히 hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 (개시 및 조절을 포함한) 전사를 일으키는 능력이다. 하나의 양태에서, 변이체 또는 단편은, 예를 들어 hCMV 바이러스가 세포를 감염시키고/시키거나 세포에서 복제하는 능력을 보유하도록 하면서, hCMV 바이러스에서의 천연 프로모터의 활성을 보완할 수 있다.

[0137] 상동 변이체 (ii) 또는 단편 (iii)은 (i)의 활성을 보유하고/하거나 보완할 능력에 대해 검정될 수 있다. 예를 들어, 변이체 또는 단편은 천연 hCMV 즉시형 초기 프로모터가 결합이 있는 돌연변이체 hCMV에 대해 (감염 및/또는 복제 능력과 같은) 기능을 회복시킬 능력에 대해 검정될 수 있다.

[0138] 상동 변이체 (ii) 또는 단편 (iii)은 하기 비교 발현 검정을 이용해 유용성에 대해 시험될 수 있다. 시험 프로모터 서열은 천연 hCMV 즉시형 초기 프로모터 대신에 기본 벡터 (base vector)로 교환된다. 통상적으로, 기능적 변이체 또는 단편은 기본 벡터를 사용하여 제공되는 발현의 적어도 50 %, 예를 들어 60, 70, 80, 90 % 이상의 발현을 가능하게 한다. 일반적으로, 적어도 하나, 바람직하게는 2개의 참조 세포 타입에서 발현이 제공된다. 통상적으로, 참조 세포는 포유동물 HEK 293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 또는 COS 세포이다.

[0139] 추가적 또는 다르게는, 프로모터 서열은 하기 비교 면역원성 검정으로 시험될 수 있다. 시험 프로모터 서열은 천연 hCMV 즉시형 초기 프로모터 대신에 기본 벡터로 교환된다. 기능적 프로모터 서열은 적어도 하나, 바람직하게는 2개의 항원을 사용해 기본 벡터에 의해 달성되는 것과 적어도 같거나 그 보다 높은 항체 역가를 제공한다. 바람직하게는, 항체 역가는 기본 벡터를 사용하는 것보다 적어도 5 %, 10 %, 20 %, 30 % 또는 40 % 높다. 바람직한 항원은 HBsAg, HSV 2gD 및 flu-M2 항원이다. 이러한 검정에 따라, 천연 프로모터 서열 (i)의 기능적 상동 변이체 (ii) 또는 기능적 단편 (iii)는 천연 서열에 의해 달성되는 최대 항체 역가를 가능하게 하는 것이다.

[0140] 상술된 바와 같이, 구조물은 hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 엑손 1 및 적어도 일부분의 엑손 2로부터 유도되는 서열을 포함하는 엑손 서열 (b)을 포함할 수 있다. 엑손은 사실상 인트론에 의해 일반적으로 분리되어 있는 코딩 서열이다. 천연 hCMV 주요 즉시형 초기 유전자에서, 엑손 1 및 2는 천연 인트론 A에 의해 통상 분리된다. 본 키메라 구조물에서, 엑손 2 서열은 일반적으로 개입되는 인트론 서열 없이 엑손 1 서열의 3'에 위치되어, 엑손 1 및 엑손 2 서열은 인접한다.

[0141] 엑손 서열 (b)는

[0142] (i) 천연 엑손 서열, 통상적으로 엑손 1 및 (전체 또는 일부분의) 엑손 2;

[0143] (ii) (i)의 기능적 상동 변이체; 또는

[0144] (iii) (i) 또는 (ii)의 기능적 단편을 포함할 수 있다.

[0145] 서열 (i)는 천연 hCMV 주요 즉시형 초기 유전자 엑손 1 서열의 약 50 내지 100 %, 예를 들어 60 내지 90 % 또는 70 내지 80 %를 포함할 수 있다. 통상적으로, 천연 엑손 1 서열의 적어도 50 %, 예를 들어 60 %, 70 %, 80 %, 90 % 또는 100 %를 포함할 수 있다.

90 % 또는 그 이상이 존재한다. 또한, 엑손 서열 (b)는 엑손 2 서열의 적어도 일부분을 포함한다. 서열 (i)에서, 통상적으로 천연 엑손 2의 2개 이상의 염기, 예를 들어 2 내지 9, 2 내지 7 또는 3 내지 5개의 염기가 존재한다. 천연 엑손 2 서열의 100 % 이하, 예를 들어 5 내지 95 %, 20 내지 80 % 또는 40 내지 60 %의 천연 엑손 2 서열이 존재할 수 있다. 통상적으로, 상동 변이체는 천연 서열에 대해 언급된 상기 길이를 갖는다.

[0146] 바람직하게는, (i)는 서열 2를 포함한다.

[0147] 적합한 엑손 서열 (b)는 공지된 방법을 이용해서 수득될 수 있다. DNA의 수득 및 분리에 이용되는 기술에 대한 기술은 문헌 [Sambrook et al., 상기 참조]를 참조한다. 천연 hCMV 주요 즉시형 초기 유전자 서열은 표준 기술을 이용하여 바이러스의 샘플로부터 직접적으로 분리될 수 있다 (MacLean, A (1998) "Preparation of HSV-DNA and Production of Infectious Virus" in Herpes Simplex Virus Protocols S. Brown, A Maclean, editors, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 19-26). 엑손 1 및 엑손 2의 위치를 포함하는 hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 서열은 진뱅크 #M60321, X17403에서 이용가능하다. 따라서, 천연 엑손 1 및 2 서열은 적합한 제한 부위에서 천연 주요 유전자 서열을 절단하거나 공지된 서열에 기초하여 PCR 프라이머를 사용하는 PCR에 의해 분리될 수 있다. 다르게는, 적합한 엑손 서열은 기존 플라스미드 벡터, 예를 들어 pWRG7128로부터 분리될 수 있다. 또한, 엑손 서열은 클로닝 보다는 합성적으로 생성될 수 있다. 변이체 서열은 부위 지시된 돌연변이유발과 같은 통상의 방법으로 쉽게 구성될 수 있다.

[0148] 일반적으로, 엑손 서열은, 본 발명의 구조물에 존재하는 경우, 발현을 향상시켜, 통상적으로 상술된 천연 엑손 1 및 엑손 2 서열 (i)에 비길 만큼 향상시킨다.

[0149] 엑손 서열은 하기 비교 발현 검정을 이용하여 기능성을 검정할 수 있다. 시험 엑손 서열은 이미 기존의 엑손 서열 대신에 기본 벡터로 교환될 수 있다. 일반적으로, 엑손 서열은 이 서열이 발현을 방해하지 않는 경우 기능적이며, 바람직하게는 기본 벡터와 비교해 적어도 하나, 바람직하게는 2개의 참조 세포 타입에서 발현을 증가시킨다. 통상적으로, 참조 세포는 포유동물 HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 또는 COS 세포이다. 바람직하게는, 발현을 적어도 5 %, 10 %, 20 %, 30 % 또는 40 % 증가시킨다. 이러한 검정에 따라, 천연 엑손 서열 (i)의 기능적 상동 변이체 (ii) 또는 기능적 단편 (iii)은 천연 서열에 의해 제공되는 발현 개선의 적어도 50 %를 가능하게 하는 것이다.

[0150] 추가로 또는 다르게는, 엑손 서열은 하기 비교 면역원성 검정으로 시험될 수 있다. 시험 엑손 서열이 이미 기존의 엑손 서열 대신에 기본 벡터로 교환된다. 기능적 엑손 서열은 적어도 하나, 바람직하게는 2개의 항원을 사용해 기본 벡터에 의해 달성되는 것과 적어도 같거나 그 보다 높은 항체 역가를 제공한다. 바람직하게는, 항체 역가는 기본 벡터에 의한 것 보다 적어도 5 %, 10 %, 20 %, 30 % 또는 40 % 높다. 바람직한 항원은 HBsAg, HSV 2gD 및 flu-M2 항원이다. 이러한 검정에 따라, 천연 엑손 서열 (i)의 기능적 상동 변이체 또는 기능적 단편 (iii)은 천연 서열에 의해 제공되는 최대의 항체 역가를 가능하게 하는 것이다.

[0151] 키메라 프로모터 구조물은 hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 천연 인트론 A 영역 대신에 이중 인트론 (c)를 포함한다. 인트론은 유전자로부터 전사되는 hnRNA로부터 스플라이싱되는 비-코딩 서열이다. 이중 인트론은 사실상 코딩 서열에 존재하지 않는 것이다.

[0152] 이중 인트론 (c)은 hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 천연 인트론 A를 전체적으로 또는 부분적으로 대체한다. 통상적으로, 천연 인트론 A는 부재한다.

[0153] 일반적으로, 이중 인트론 (c)은 엑손 서열 (b)의 3'이다.

[0154] 통상적으로, 이중 인트론 (c)는

[0155] (i) 천연 인트론;

[0156] (ii) (i)의 기능적 상동 변이체; 또는

[0157] (iii) (i) 또는 (ii)의 기능적 단편을 포함한다.

[0158] 이중 인트론 (c)은 일반적으로 바이러스 또는 진핵생물 인트론이다. 바람직하게는, 인트론은 포유동물 인트론, 특히 비-사람 인트론, 예를 들어 래트 또는 치킨 인트론이다. 바람직하게는, 인트론은 인트론 A, 예를 들어 래트 인슐린 인트론 A, 치킨 케라틴 인트론 A 또는 치킨 심장 액틴 인트론 A이다.

[0159] 통상적으로, 인트론 (c)는 약 50개 뉴클레오티드 내지 약 1000개 뉴클레오티드, 예를 들어 약 100개 내지 약 500개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 인트론 (c)는, 예를 들어 50 내지 500개 뉴클레오티드, 예로 100, 200,

300 또는 400개 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 인트론은 천연 래트 인슐린 인트론 A의 약 뉴클레오타이드 50 내지 133에서 발견되는 서열 또는 이러한 서열의 상동체를 포함한다.

- [0160] 바람직하게는, 이중 인트론 (c)은 진핵생물 숙주 세포에서 RNA 전사물로부터 스플라이싱될 수 있다. 일반적으로, 인트론은 하나 이상의 공여체 서열 (예: GT), 수용체 서열 (예: AG), 3' 피리미딘 풍부 영역 및 분지점 서열을 포함한다. 피리미딘 풍부 영역은, 존재하는 경우, 예를 들어 적어도 5, 8, 10개는 그 이상의 피리미딘을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 인트론은 하나 이상의 공여체 서열, 수용체 서열 및 분지점 서열을 포함한다. 통상적으로, 키메라 구조물에서, 인트론 (c)는 천연 인트론 (i)의 인트론/엑손 경계에서 발견되는 엑손 서열로부터 유도되는 비-인트론 플랭킹 서열 (non-intron flanking sequence)을 포함한다. 플랭킹 엑손 서열은 천연 엑손 서열 또는 실질적으로 천연 서열과 동일한 활성을 보유하는, 예를 들어 스프라이싱 작용을 보유하는 서열의 상동체일 수 있다. 통상적으로, 엑손 서열의 5 내지 10개, 바람직하게는 7 내지 10개 염기가 인트론의 각각의 말단에 포함된다.
- [0161] 인트론 (c)은 기능적인 한 인위적 인트론일 수 있다. 예를 들어, 재조합 또는 키메라 인트론이 사용될 수 있다. 이러한 인트론은 하나 이상의 천연 인트론의 서열을 포함할 수 있다.
- [0162] 통상적으로, 인트론 (c)는 전사 인자 또는 조절 단백질에 결합되는 hCMV 인트론 A에 존재하는 서열을 포함하거나 이러한 서열 대신에 동일한 인자 또는 단백질에 결합할 수 있는 이들 서열의 상동체를 포함한다. 통상적으로, 이러한 서열 또는 이들의 상동체는 hCMV 인트론 A에서와 동일한 순서 및/또는 실질적으로 동일한 상대적 간격으로 인트론 (c)에 존재한다.
- [0163] 인트론 (c)는 천연 인트론 (i)의 서열이 변형되어 내부 제한 부위가 제거된 변형된 상동 변이체 (ii)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 내부 *NheI* 부위가 파괴된 래트 인슐린 인트론 A의 상동 변이체가 사용될 수 있다.
- [0164] 바람직하게는, 인트론 (c)는
- [0165] (i) 서열 3;
- [0166] (ii) (i)의 기능적 상동 변이체; 또는
- [0167] (iii) (i) 또는 (ii)의 기능적 단편을 포함한다.
- [0168] 인트론 서열 (c)는 표준 클로닝 기술을 이용하여 수득될 수 있다. 예를 들어, 래트 인슐린 인트론 A 서열은 진뱅크 J00748, 치킨 케라틴 인트론 A 서열은 진뱅크 J00847, 치킨 심장 인트론 A 서열은 진뱅크 X02212에서 이용 가능하다. 인트론 서열은 공지된 서열에 기초하여 프라이머를 사용하여 천연 공급원으로부터 분리될 수 있다. 서열은 합성적으로 제조될 수 있다. 변이체 서열은 돌연변이유발에 의해 수득될 수 있다.
- [0169] 통상적으로, 기능적 인트론 서열, 예를 들어 기능적 변이체 (ii) 또는 기능적 단편 (iii)은 천연 인트론 (i)와 실질적으로 동일한 활성을 갖고/갖거나 천연 인트론 (i)의 활성을 보완하는 것이다. 하나의 양태에서, 활성을 스플라이싱 활성이다.
- [0170] 인트론 (c)는 통상의 스플라이싱 검정을 이용하여 스플라이싱 활성에 대해 시험될 수 있다. 일반적으로, 기능적 상동체 (ii) 또는 기능적 단편 (iii)은 상기 검정에서 천연 인트론 (i)의 스플라이싱 효율의 적어도 50 %, 예를 들어 60 %, 70 %, 80 %, 90 % 및 100 %까지 또는 그 이상을 나타낼 것이다.
- [0171] 일반적으로, 이중 인트론 서열은, 본 발명의 구조물에 존재하는 경우, 발현을 향상시킬 것이다. 통상적으로, 변이체 (ii) 또는 단편 (iii) 인트론은 천연 인트론에 견줄만하게 향상시킬 것이다.
- [0172] 잠재적 인트론 서열 (c)의 기능성은 하기 비교 발현 검정을 이용하여 시험될 수 있다. 이중 인트론이 기본 벡터로 교환된다. 일반적으로, 이중 인트론 서열은, 서열의 추가가 기본 벡터와 비교해 적어도 하나, 바람직하게는 2개의 참조 세포 타입에서의 발현을 25 % 이상 증가시키면, 기능적이다. 통상적으로, 참조 세포는 포유동물 HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 또는 COS 세포이다. 발현의 증가는 적어도 35 %, 45 %, 55 % 또는 그 이상일 수 있다. 이러한 검정에 따라, 천연 인트론 서열 (i)의 기능적 변이체 (ii) 또는 기능적 단편 (iii)은 천연 서열에 의해 달성되는 발현을 50 % 초과하게 개선시키는 것이다.
- [0173] 추가로 또는 다르게는, 이중 인트론 (c) 서열은 하기 비교 면역원성 검정을 이용해 기능성에 대해 시험될 수 있다. 인트론 (c) 서열이 기본 벡터에 추가된다. 기능적 인트론 (c) 서열은 적어도 하나, 바람직하게는 2개의 항원을 사용해 기본 벡터에 의해 달성되는 것보다 높은 항체 역가를 제공한다. 바람직하게는, 항체 역가는 기본 벡터를 사용하는 것보다 적어도 5 % 또는 10 %, 예를 들어 20 %, 30 % 또는 40 % 높다. 바람직한 항원은

HBsAg, HSV 2gD 및 Flu-M2 항원이다. 이러한 검정에 따라, 천연 인트론 서열 (i)의 기능적 변이체 (ii) 또는 기능적 단편 (iii)는 천연 서열에 의해 달성되는 최대 항체 역가를 가능하게 하는 것이다.

[0174] 적합한 이중 인트론 서열은 표준 클로닝 기술을 이용하여 수득될 수 있다. 예를 들어, 래트 인슐린 인트론 A 서열은 진뱅크 J00748, 치킨 케라틴 인트론 A는 진뱅크 J00847, 치킨 심장 액틴 인트론 A는 X02212에서 이용 가능하다. 인트론 서열은 공지된 서열 데이터에 기초하여 프라이머를 사용하여 천연 공급원으로부터 분리될 수 있다. 또한, 적합한 서열은 합성적으로 제조될 수 있다.

[0175] 구성 성분 서열 (a), (b) 및 (c)는 표준 클로닝 또는 분자 생물학 기술을 이용하여 키메릭 프로모터를 형성하기 위해 적합하게 함께 연결되게 제공될 수 있다. 바람직하게는, 인트론 서열 (c)는 엑손 서열 (b)의 3'에 제공된다. 키메릭 프로모터 구조물은 적당한 효소가 존재할 때 프로모터가 클로닝 부위에 삽입되는 코딩 서열의 발현을 수행하도록 클로닝 부위에 연결된다. 멀티-클로닝 부위, 예를 들어 pUC19, pBC SK, pBluescript II KS, cDNA3.1, pSP72, pGEM 7Z 멀티클로닝 부위를 포함해 적합한 클로닝 부위가 당 분야에서 공지되어 있다.

[0176] 통상적으로, 클로닝 부위에 삽입을 위한 (또는 삽입되는) 핵산은 치료학적으로 관련된 폴리펩티드를 암호화한다. 코딩 서열은 핵산 번역화 또는 유전자 치료에 사용하기에 적합한 것이 바람직하다. 따라서, 핵산 삽입물은 번역원성을 제공할 수 있는 서열, 예를 들어 피검물에 전달되었을 때 체액성 및/또는 세포성 면역 반응을 유도하는 면역원성 서열을 포함할 수 있다. 다르게는, 핵산은 치료학적 폴리펩티드, 예를 들어 표적 세포 계층으로부터 결합되거나 없는 단백질 또는 목적하는 생물학적 또는 치료학적 효과 (예: 항바이러스 기능)를 갖는 비-천연 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 포함할 수 있다. 유전적 장애를 치료하기 위해, 특정 장애에서 결합이 있는 것으로 공지된 유전자에 상응하는 기능적 유전자를 피검물에 투여할 수 있다. 바람직하게는, 핵산은 DNA이다.

[0177] 삽입에 적합한 핵산은 염증 질환, 자가면역, 만성 및 감염성 질환, 예를 들어 AIDS, 암, 신경학적 질환, 심혈관 질환, 고콜레스테롤혈증; 다양한 빈혈, 지중해빈혈 및 혈우병을 포함한 다양한 혈액 장애; 낭포성 섬유증, 고세병 (Gaucher's Disease), 아데노신 데아미나제 (ADA) 결핍증, 기증 등과 같은 유전자 결함의 치료에 사용되는 것을 포함한다.

[0178] 예를 들어, 고형 종양의 치료를 위한 방법에서, 독성 펩티드 (즉, 화학치료제, 예를 들어 리신, 디프테리아 독소 및 코브라 독 인자)를 암호화하는 유전자, 종양 억제 유전자, 예를 들어 p53, 형질전환 발암유전자 (oncogene)에 대한 안티센스인 mRNA 서열을 코딩하는 유전자, 항신생물 펩티드, 예를 들어 종양 괴사 인자 (TNF) 및 다른 사이토키ンを 암호화하는 유전자, 또는 형질전환 발암유전자의 트랜스도미넌트 (transdominant) 음성 돌연변이체가 종양 부위에 또는 근처에서 발현을 위해 삽입될 수 있다.

[0179] 유사하게, 항바이러스 및/또는 항세균 활성을 나타내거나 숙주 면역계를 자극하는 것으로 공지된 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 또한 포함될 수 있다. 핵산은 다양한 사이토킨 (또는 이의 기능적 단편), 예를 들어 인터루킨, 인터페론 및 콜로니 자극 인자 중 하나를 암호화할 수 있다. 핵산은, 이로 제한됨이 없이, 암, 알레르기, 독성 및 하기 예시한 병원체 (이로 제한되지 않음)에 의한 감염을 포함한 많은 상태의 치료 또는 예방을 위한 항원을 암호화할 수 있다: 사람 유두종 바이러스 (HPV), HIV, HSV2/HSV1, 인플루엔자 바이러스 (타입 A, B 및 C), 폴리오 바이러스, RSV 바이러스, 리노바이러스, 로타바이러스, A형 간염 바이러스, 놀윙크 바이러스 그룹, 엔테로바이러스, 아스트로바이러스, 홍역 바이러스, Par 인플루엔자 바이러스, 이하선염 바이러스 (Mumps virus), 대상포진 바이러스 (Varicella-Zoster virus), 사이토메갈로바이러스, 엡스타인-바르 바이러스, 아데노 바이러스, 루벨라 바이러스, 사람 T-세포 림프종 타입 I 바이러스 (HTLV-I), B형 간염 바이러스 (HBV), C형 간염 바이러스 (HCV), D형 간염 바이러스, 수두 바이러스 (Pox virus), 마르부르크 및 에볼라를 포함한 진균, 바이러스 병원체; *엠. 투베르쿨로시스* (*M. tuberculosis*), *클라미디아* (*Chlamydia*), *엔. 고노르호에* (*N. gonorrhoeae*), *쉬겔라* (*Shigella*), *살모넬라* (*Salmonella*), *비브리오 콜레라* (*Vibrio Cholera*), *트레포네마 팔리두아* (*Treponema pallidum*), *슈도모나스* (*Pseudomonas*), *보르데텔라 페르투스* (*Bordetella pertussis*), *브루셀라* (*Brucella*), *프란시스셀라 툴로렌시스* (*Francisella tularensis*), *헬리코박터 필로리* (*Helicobacter pylori*), *렙토스프리아 인터로가우스* (*Leptospira interrogans*), *레지오넬라 뉴모필라* (*Legionella pneumophila*), *예르시니아 페스티스* (*Yersinia pestis*), *스트렙토코쿠스* (*Streptococcus*) (타입 A 및 B), *뉴모코쿠스* (*Pneumococcus*), *메닝고코쿠스* (*Meningococcus*), *헤모필루스 인플루엔자* (*Hemophilus influenza*) (타입 b), *톡소플라즈마 곤디* (*Toxoplasma gondii*), *콕실리박테리오시스* (*Campylobacteriosis*), *모락셀라 카타르할리스* (*Moraxella catarrhalis*), *도노바노시스* (*Donovanosis*), 및 *악티노미코시스* (*Actinomycosis*)를 포함한 세균 병원체; *칸디다* 및 *아스페르길루스*를 포함한 진균 병원체; *촌충*, *편충*, *회충*, *아메바*, *편모충*, *크립토스*

포리둠, 쉬토소마, 뉴모시스티스 카리니 (*Pneumocystis carinii*), 트리코모나스감염증 및 선모충병을 포함한 기생동물 병원체. 또한, 핵산은 많은 수의학적 질환, 예를 들어 구제역 (Foot and Mouth disease), 코로나바이러스, 파스테우렐라 톨토시다 (*Pasteurella multocida*), 헬리코박터 (*Helicobacter*), 스트롱질루스 불가리스 (*Strongylus vulgaris*), 악티노바실루스 플레우로뉴모니아 (*Actinobacillus pleuropneumonia*), 소 바이러스성 설사 바이러스 (BVDV), 클렙시엘라 뉴모니에 (*Klebsiella pneumoniae*), 이. 콜라이 (*E. coli*), 보르테텔라 페루투시스 (*Bordetella pertussis*), 보루테텔라 파라페르투시스 (*Bordetella parapertussis*) 및 보르테텔라 브로치셉티카 (*Bordetella brochiseptica*)에 대한 적합한 면역 반응을 제공하는데 사용될 수 있다. 따라서, 하나의 양태에서, 본 발명의 핵산 구조물은 백신으로의 이용을 찾을 수 있다.

[0180] 일부 양태에서, 핵산 구조물은 어주번트를 암호화할 것이다. 따라서, 코딩 서열의 삽입을 위한 클로닝 부위로 삽입되는 서열은 어주번트로 작용할 수 있는 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 바람직한 예에서, 암호화되는 어주번트는 ADP-리보실화 세균 독소일 수 있다. 이들은 디프테리아 독소 (DT), 백일해 독소 (PT), 콜레라 독소 (CT), 이. 콜라이 열 불안정 독소 (LT1 및 LT2), 슈도모나스 내독소 A, 슈도모나스 내독소 S, 비. 세레우스 (*B. cereus*) 세포외효소, 비. 스페리쿠스 (*B. sphaericus*) 독소, 씨. 보툴리눔 (*C. botulinum*) C2 및 C3 독소, 씨. 리모숨 (*C. limosum*) 세포외효소, 및 씨. 페르프린젠스 (*C. perfringens*), 씨. 스피리포르마 (*C. spiriforma*), 씨. 디피실 (*C. difficile*) 및 스탕필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*) EDIN으로부터의 독소를 포함한다. 대부분의 ADP-리보실화 세균 독소는 A 및 B 서브유니트를 포함한다. 구조물은 A 서브유니트, B 서브유니트 및/또는 두 서브유니트 모두를 발현할 수 있다..

[0181] 바람직한 예에서, 핵산 구조물은 이. 콜라이 열 불안정 독소 및/또는 콜레라 독소를 암호화할 수 있으며, 특히 이. 콜라이 열 불안정 독소를 발현할 수 있다. CT 서브유니트 A 및 B 유전자의 완전한 서열을 위한 진뱅크 등록은 Locus VIBCTXABB (Accession No. D30053)에서 찾을 수 있으며, LT 서브유니트 A 및 B 유전자의 완전한 서열을 위한 진뱅크 등록은 Locus AB0116677 (Accession No. AB011677)에서 찾을 수 있다.

[0182] 상기 구조물은 특정 어주번트의 활성 변이체 또는 단편을 발현할 수 있다. 변이체 단편은 이것이 유도된 폴리펩티드의 어주번트 활성 중 적어도 일부를 보유하는 경우 활성이라고 말할 수 있다. 따라서, 변이체 및/또는 단편은 어주번트가 없이 항원이 투여되었을 때 보여지는 면역 반응과 비교하여 특정 항원에 대한 면역 반응을 향상시킬 수 있을 것이다. 암호화된 서열은 CT A 및/또는 B 서브유니트의 활성 단편 또는 변이체일 수 있으며, 특히 LT A 및/또는 B 서브유니트의 활성 단편일 수 있다.

[0183] 독소 서브유니트는 천연적으로 발생하는 시그널 서열을 결실시킬 수 있다. 천연적으로 발생하는 세포외독소 서브유니트는 독성을 없애기 위해 변형될 수 있다. A 서브유니트는 ADP-리보실 트랜스퍼라제 활성을 파괴하거나 불활성화시키기 위해 변형될 수 있다.

[0184] 따라서, 본 발명의 어주번트 구조물은 특정 항원에 대한 면역 반응을 향상시키기 위해 사용될 수 있다. 향상된 면역 반응은 보다 크거나 지속적인 면역 반응을 수반할 수 있다. 항원이 면역 반응에 다시 직면하게 되었을 때 면역 반응이 어주번트 없이 투여되었을 때보다 크다는 것을 의미할 수 있다. 향상된 면역 반응은 보다 높은 항체 역가를 생기게 할 수 있다. 일부 구조물 및 특히 세포외독소 서브유니트를 발현하는 구조물에서, 어주번트는 문제의 항원에 대한 증강된 세포성 반응 및 T 헬퍼 1-타입 면역 반응을 일으킬 수 있다.

[0185] 클로닝 부위로 삽입을 위한 핵산은 폴리아데닐화 (폴리A: polyA) 서열을 포함할 수 있다. 이러한 폴리A 서열은 일반적으로 코딩 서열에 대해 천연적인 것이다. 달리, 이중 폴리A 서열을 본 발명의 핵산 구조물에 제공할 수 있다. 통상적으로, 폴리A 서열은 클로닝 부위의 아래에 제공되어 클로닝 부위에 삽입되는 코딩 서열에 작용적으로 연결된다. 표준 클로닝 기술을 이용하여 적합한 폴리A 서열을 구조물에 포함시킬 수 있다. 이러한 폴리A 서열은 당 기술 분야에서 공지되어 있다.

[0186] 폴리A 서열은

[0187] (i) 천연 폴리A 서열;

[0188] (ii) (i)의 기능적 상동 변이체; 또는

[0189] (iii) (i) 또는 (ii)의 기능적 단편.

[0190] 천연 폴리A 서열 (i)는, 예를 들어 래비트 β 글로빈 유전자 폴리A, 사람 유두종 바이러스 (HPV) 초기 또는 후기 유전자 폴리A, HSV-2gB 유전자 폴리A, 시미안 CMV 즉시형 초기 유전자 폴리A 또는 HSV gD 후기 유전자 폴리A

일 수 있다.

- [0191] 바람직하게는, 천연 폴리A 서열 (i)는 서열 10 (진뱅크 K03256), 서열 11 (진뱅크 M16019), 서열 12 (진뱅크 Z80699) 및 서열 13 (진뱅크 K02718)로 이루어진 군 중에서 선택된다.
- [0192] 일반적으로, 기능적 폴리A 서열은 폴리아데닐화 활성을 보유하는 것이다.
- [0193] 폴리A 서열은 일반적 발현 검정을 이용하여 RNA 전사물의 폴리아데닐화를 일으키는 능력에 대해 시험될 수 있다. 기능적 상동 변이체 (ii) 또는 기능적 단편 (iii)은 통상적으로 이 검정에서 천연 폴리A 서열의 폴리A 활성의 적어도 50 %, 예를 들어 60 %, 70 %, 80 % 또는 그 이상을 나타낸다.
- [0194] 일반적으로, 폴리A 서열은, 본 발명의 구조물에 존재하는 경우, 발현을 향상시켜, 통상적으로 상술된 천연 폴리A 서열 (i)과 견줄만하게 향상시킬 것이다.
- [0195] 또한, 폴리A 서열은 하기 비교 발현 검정을 이용하여 기능성에 대해 검정될 수 있다. 시험 폴리A 영역이 RBGpA 대신에 기본 벡터로 교환된다. 시험 폴리A는 폴리A가 발현을 방해하지 않고 바람직하게는 기본 벡터와 비교하여 적어도 하나, 바람직하게는 2개의 참조 세포 타입에서 발현을 증가시키는 경우 기능성인 것으로 간주된다. 바람직하게는, 적어도 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % 또는 50 % 이상의 발현 증가가 있다. 바람직한 세포 타입은 포유동물 HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 또는 COS 세포이다. 검정에 따라, 상동 변이체 (ii) 또는 단편 (iii)는, 천연 폴리A 서열 (i)에 의해 달성되는 발현을 50 % 초과하게 증가시키는 경우, 기능적이다.
- [0196] 다르게는 또는 추가로, 폴리A 서열은 하기 비교 면역원성 검정으로 활성에 대해 시험될 수 있다. 폴리A 서열은 RBGpA 대신에 기본 벡터로 교환된다. 기능적 폴리A 서열은 적어도 하나, 바람직하게는 2개의 항원을 사용해 기본 벡터에 의해 달성되는 것과 적어도 같거나 그 보다 높은 항체 역가를 제공한다. 바람직하게는, 항체 역가는 기본 벡터로 달성되는 것보다 적어도 5 %, 10 %, 예를 들어 20 %, 30 % 또는 40 % 높다. 바람직한 항원은 HBsAg, HSV 2gD 및 Flu-M2 항원이다. 상동 변이체 (ii) 또는 기능적 단편 (iii)는, 천연 폴리A 서열에 의해 달성되는 최대 항체 역가를 가능하는 경우, 기능적이다.
- [0197] 핵산 구조물은 클로닝 부위에 삽입되는 코딩 서열의 발현에 영향을 미치는 추가의 조절 서열을 포함할 수 있다. 구조물은 비-해독 리더 서열을 포함할 수 있다. 이 서열은 키메릭 프로모터 및 또한 클로닝 부위에 삽입되는 코딩 서열과 작동가능하게 연결된 구조물에 제공된다. 리더는 삽입된 코딩 서열의 발현을 위한 해독 개시 부위를 제공하며, 통상적으로 Kozak 서열을 포함한다.
- [0198] 통상적으로, 비해독 리더 서열은
- [0199] (i) 천연 비해독 리더 서열;
- [0200] (ii) (i)의 기능적 상동 변이체; 또는
- [0201] (iii) (i) 또는 (ii)의 기능적 단편을 포함한다.
- [0202] 일반적으로, 천연 서열 (i)는 진핵생물 서열 또는 바이러스 서열, 특히 진핵생물을 감염시키는 바이러스 서열이다. 바람직하게는, 천연 서열 (i)은 HBV 또는 HSV 서열, 예를 들어 HBV preS2 항원 서열, HBV e-항원 서열 또는 HSV 타입 2gD 항원 서열이다. 특히 바람직하게는, (i)는 서열 5, 서열 6 및 서열 7로 이루어진 군 중에서 선택된다.
- [0203] 통상적으로, 리더 서열은 전사 성분 또는 조절 단백질에 결합되는 (i)에 존재하는 서열, 또는 동일한 성분 또는 단백질을 결합할 수 있는 이들 서열의 상동체를 포함한다. 통상적으로, 이러한 서열 또는 이들의 상동체는 (i)에서와 동일한 순서 및/또는 실질적으로 동일한 상대적 간격으로 리더 서열에 존재한다. 일반적으로, 리더 서열은 삽입된 코딩 서열의 발현을 위한 해독 개시 부위를 포함한다. 통상적으로, 리더 서열은 Kozak 서열을 포함한다.
- [0204] 일반적으로, 비해독 리더 서열은 약 10 내지 약 200개 뉴클레오티드, 예를 들어 약 15 내지 150개 뉴클레오티드, 바람직하게는 15 내지 약 130개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 예를 들어 15, 50, 75 또는 100개 뉴클레오티드를 포함하는 리더 서열이 사용될 수 있다.
- [0205] 일반적으로, 기능적 비해독 리더 서열은 리더 서열과 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현을 위한 해독 개시 부위를 제공할 수 있는 것이다. 통상적으로, 기능적 변이체 (ii) 또는 단편 (iii)은 천연 서열 (i)와 실질적으로 동일한 활성을 갖고/갖거나 천연 서열 (i)의 활성을 보완하여, 통상적으로 이 서열과 작동가능하게 연결된

코딩 서열의 발현을 용이하게 하거나 향상시킨다.

- [0206] 변이체 (ii) 또는 단편 (iii)은 표준 프로토콜을 이용하여 천연 리더 서열에 대해 비해독 리더 서열로서의 활성에 대해 시험될 수 있다. 예를 들어, 천연 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 천연 리더 서열 (i)을 포함하는 발현 벡터가 제조될 수 있으며, 발현이 적합한 숙주 세포, 예를 들어 포유동물 HEK 293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 또는 COS 세포에서 모니터링될 수 있다. 천연 리더 서열이 상동 변이체 또는 단편에 의해 대체된 시험 구조물이 제조될 수 있으며, 발현이 동일한 숙주 세포에서 다시 모니터링될 수 있다. 일반적으로, 변이체 (ii) 또는 단편 (iii)은 천연 서열에 의해 제공되는 발현의 적어도 50 %, 예를 들어 60 %, 70 %, 80 %, 90 % 또는 100 % 또는 그 이상을 제공한다.
- [0207] 또한, 잠재적 리더 서열은 하기 비교 발현 검정으로 유용성에 대해 시험될 수 있다. 시험 리더 서열은 HBV preS2 5'UTR 대신에 기본 벡터로 교환된다: 기능적 리더 서열은 적어도 하나, 바람직하게는 2개의 세포 타입에서 기본 벡터와 비교해 발현을 방해하지 않고 바람직하게는 발현을 증가시킨다. 일반적으로, 발현은 적어도 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % 또는 50 % 증가된다. 바람직한 세포 타입은 포유동물 HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 또는 COS 세포이다. 상동 변이체 (ii) 또는 기능적 단편 (iii)는, 천연 리더 서열에 의해 달성되는 발현을 50 % 초과하게 증가시키는 경우, 기능적이다.
- [0208] 달리 또는 추가로, 리더 서열은 하기 비교 번역원성 검정으로 시험될 수 있다. 리더 서열은 HBV preS2 5'UTR 대신에 기본 벡터로 교환된다. 기능적 리더 서열은 적어도 하나, 바람직하게는 2개의 항원을 사용해 기본 벡터에 의해 달성되는 것과 적어도 같거나 그 보다 높은 항체 역가를 제공한다. 바람직하게는, 항체 역가는 기본 벡터를 사용하는 것보다 적어도 5 %, 10 %, 20 %, 30 % 또는 40 % 높다. 바람직한 항원은 HBsAg, HSV 2gD 및 Flu-M2 항원이다. 상동 변이체 (ii) 또는 기능적 단편 (iii)는, 천연 리더 서열에 의해 달성되는 최대 항체 역가를 가능하게 하는 경우, 기능적이다.
- [0209] 적합한 리더 서열은 표준 프로토콜을 이용해 수득될 수 있다. 예를 들어, HBV preS2 항원 서열, HBV e-항원 서열 및 HSV 타입 2gD 항원 서열이 각각 진뱅크 M54923, M54923 및 Z86099에서 이용가능하다. 프라이머는 공지된 서열에 기초하여 디자인되고 상동 서열을 분리하는데 사용될 수 있다. 리더 서열은 공지된 서열에 기초하여 합성될 수 있다.
- [0210] 핵산 구조물은 인헨서 서열을 포함할 수 있다. 인헨서 서열은 통상적으로 키메릭 프로모터 및 삽입된 코딩 서열과 작동가능한 연결로 클로닝 부위의 3'에 제공되며, 삽입된 서열의 전사를 증가시키도록 작용한다.
- [0211] 일반적으로, 인헨서는
- [0212] (i) 천연 인헨서;
- [0213] (ii) (i)의 기능적 상동 변이체; 또는
- [0214] (iii) (i) 또는 (ii)의 기능적 단편을 포함한다.
- [0215] 인헨서는 일반적으로 약 50 내지 약 850개 뉴클레오티드, 예를 들어 약 75 내지 약 500개 뉴클레오티드를 포함한다. 약 100, 200, 300 또는 400개 뉴클레오티드의 인헨서가 사용될 수 있다.
- [0216] 통상적으로, (i)는 진핵생물 또는 바이러스 인헨서, 특히 진핵생물을 감염시키는 바이러스의 인헨서이다. 통상적으로, 이러한 인헨서는 유전자의 3' 비해독 영역 (3'UTR)에서 나타난다. 바람직하게는, (i)는 HBV 또는 CMV 인헨서, 예를 들어 HBs Ag 3'UTR 또는 시미안 hCMV 즉시형 초기 유전자 3'UTR이다. 바람직하게는, (i)는 서열 8 또는 서열 9이다.
- [0217] 일반적으로, 구조물 중의 인헨서는 전사 성분 또는 조절 단백질, 예를 들어 전사 인자를 결합하는 (i)에서 발견되는 서열, 또는 동일한 성분 또는 단백질을 결합하는 이 서열의 상동체를 포함한다. 바람직하게는, 이들 서열은 (i)에서와 동일한 순서 및/또는 실질적으로 동일한 상대적 간격으로 인헨서에 존재한다.
- [0218] 일반적으로, 기능적 인헨서는 인헨서 서열에 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 코딩 서열의 발현을 향상 또는 증진시키는 것이다. 통상적으로, 기능적 상동 변이체 (ii) 또는 단편 (iii)는 천연 인헨서 (i)와 실질적으로 동일한 활성 (예를 들어, 발현의 향상)을 갖고/갖거나 활성을 보완한다.
- [0219] 인헨서 활성은 인헨서 트랩 검정을 이용하여 검정될 수 있다. 프로토콜이 당 기술 분야에서 공지되어 있다. 기능적 상동 변이체 (ii) 또는 단편 (iii)은 바람직하게는 이러한 검정에서 천연 인헨서에 의해 나타나는 인헨서 활성의 적어도 50 %를 제공한다. 통상적으로, 활성은 천연 인헨서의 활성의 적어도 60 %, 70 %, 80 %, 90,

100 % 또는 그 이상이다. 일반적으로, 기능적 변이체 (ii) 또는 단편 (iii)은 이 검정에서 천연 인헨서 (i)의 활성을 보완할 수 있다.

[0220] 또한, 인헨서 유용성은 하기 비교 발현 검정 세트를 이용해 시험될 수 있다. 시험 3'UTR 서열이 기본 벡터로 교환된다. 3'UTR은 이 서열이 발현을 방해하지 않고 바람직하게는 이 검정에서 기본 벡터와 비교해 적어도 하나, 바람직하게는 2개의 참조 세포 타입에서 발현을 증가시킨다면 유용성을 갖는다. 바람직하게는, 발현은 적어도 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % 또는 50 % 증가된다. 바람직한 세포 타입은 포유동물 HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 또는 COS 세포이다. 이러한 검정에 따라, 상동 변이체 (ii) 또는 기능적 단편 (iii)는, 천연 인헨서 서열 (i)에 의해 달성되는 발현을 50 % 초과하게 개선시키는 경우, 기능적이다.

[0221] 추가로 또는 달리, 인헨서 서열은 하기 비교 번역원성 검정으로 시험될 수 있다. 3'UTR이 기본 벡터로 교환된다. 기능적 인헨서 서열은 적어도 하나, 바람직하게는 2개의 항원을 사용해 기본 벡터에 의해 달성되는 것과 적어도 같거나 그 보다 높은 항체 역가를 제공한다. 바람직하게는, 항체 역가는 기본 벡터를 사용하는 것보다 적어도 5 %, 10 %, 20 %, 30 % 또는 40 % 높다. 바람직한 항원은 HBsAg, HSV 2gD 및 Flu-M2 항원이다. 상동 변이체 (ii) 또는 기능적 단편 (iii)는, 천연 인헨서 서열에 의해 달성되는 최대 항체 역가를 가능하게 하는 경우, 기능적이다.

[0222] 적합한 인헨서 서열은 표준 클로닝 방법을 이용해 수득될 수 있다. 예를 들어, HBsAg 3'UTR 서열 또는 시미안 hCMV 즉시형 초기 유전자 3'UTR 서열을 진뱅크 AF143308 및 M16019에서 입수할 수 있다. 프라이머는 공지된 서열에 기초하여 디자인되고 상동 서열을 분리하는데 사용될 수 있다.

[0223] 바람직한 양태에서, 핵산 구조물은 이중 폴리A 서열, 이중 리더 서열 및 이중 인헨서 서열을 포함하며, 이들 모두 삽입된 코딩 서열의 효과적인 발현을 위해 키메릭 프로모터와 작동가능하게 연결된다.

[0224] 추가의 양상으로, 또한, 본 발명은

[0225] (i) 프로모터 서열;

[0226] (ii) HBV preS2 항원 서열, HBV e-항원 서열 또는 HSV 타입 2gD 항원 서열로부터 유도되는 비-해독 리더 서열; 및

[0227] (iii) (i) 및 (ii)에 작동적으로 연결되고 비-해독 리더 서열에 이중인 코딩 서열을 포함하거나 때로는 이들로 필수적으로 이루어진 핵산 구조물을 제공한다.

[0228] 통상적으로, 프로모터 서열 (i)은 바이러스 또는 진핵생물 프로모터 서열로부터 유도된다. 프로모터 서열은 천연 프로모터 서열, 천연 서열의 기능적 상동체 또는 이들의 기능적 단편일 수 있다. 적합한 천연 프로모터는, 예를 들어 hCMV 즉시형 초기 프로모터, 슈도라비즈 바이러스 (PRV) 프로모터 또는 로우즈 육종 바이러스 (RSV) 프로모터를 포함한다. 바람직하게는, 천연 프로모터는 서열 52 또는 서열 53을 포함한다.

[0229] 프로모터가 기능적이라면, 상술된 키메릭 프로모터와 같은 인위적 프로모터가 사용될 수 있다.

[0230] 기능적 프로모터 서열은 일반적으로 적합한 숙주 세포에서 작동적으로 연결된 코딩 서열의 (개시 및 조절을 포함한) 전사를 일으킬 수 있는 것이다.

[0231] 프로모터 서열은 통상의 발현 검정을 이용하여 프로모터 활성에 대해 시험될 수 있다. 천연 프로모터 서열의 기능적 상동체 또는 단편은 통상적으로 이러한 검정에서 천연 서열에 의해 제공되는 발현의 적어도 50 %, 예를 들어 적어도 60, 70, 80 또는 90 %를 제공한다.

[0232] 비-해독 리더 서열 (ii)는 상기 기술된 바와 같다. 적합한 코딩 서열 (iii)는 키메릭 프로모터 구조물에 대해 기술된 것을 포함한다. 그러나, 본 발명의 양상에서, 코딩 서열은 비-해독되는 리더 서열에 대해 이중이다. 본 구조물은 통상적으로 상술된 바와 같이 코딩 서열에 대해 천연적일 수 있거나 구조물에서 이중 폴리A 서열로서 제공될 수 있는 폴리A 서열을 포함한다. 적합한 폴리A 서열은 이미 상술되었다. 구조물은 추가로 코딩 서열의 3'에 있는 인헨서 서열을 포함한다. 적합한 인헨서 서열은 키메릭 프로모터 구조물에 대해 상술된 바와 같다.

[0233] 또 다른 양상으로, 본 발명은

[0234] (i) 프로모터 서열;

- [0235] (ii) 프로모터 서열 (i)에 작동적으로 연결된 코딩 서열; 및
- [0236] (iii) 코딩 서열 (ii)의 3'에 존재하고 이에 작동적으로 연결된 인핸서 서열을 포함하거나, 일부 양태에서는 이들로 필수적으로 이루어지고,
- [0237] 인핸서 서열 (iii)이 HBsAg 서열의 3'UTR 또는 시미안 CMV 즉시형 초기 유전자 서열의 3'UTR로부터 유도되며, 코딩 서열 (ii)가 3' 인핸서 서열에 이중인 핵산 구조물을 제공한다.
- [0238] 구조물은 키메릭 프로모터 구조물에 대해 이미 기술된 바와 같은 비-해독 리더 서열을 포함할 수 있다.
- [0239] 통상적으로, 프로모터 서열 (i)은 바이러스 또는 진핵생물 프로모터 서열로부터 유도된다. 프로모터 서열은 천연 프로모터 서열, 천연 서열의 기능적 상동체 또는 이들의 기능적 단편일 수 있다. 적합한 천연 프로모터는, 예를 들어 hCMV 즉시형 초기 프로모터, 슈도라비즈 바이러스 (PRV) 프로모터 또는 로우즈 육종 바이러스 (RSV) 프로모터를 포함한다. 바람직하게는, 천연 프로모터는 서열 52 또는 서열 53을 포함한다.
- [0240] 프로모터가 기능적이라면, 상술된 키메릭 프로모터와 같은 인위적인 프로모터 구조물이 사용될 수 있다.
- [0241] 기능적 프로모터 서열은 일반적으로 적합한 숙주 세포에서 작동적으로 연결된 코딩 서열의 (개시 및 조절을 포함한) 전사를 일으킬 수 있는 것이다.
- [0242] 프로모터 서열은 통상의 발현 검정을 이용하여 프로모터 활성화에 대해 시험될 수 있다. 천연 프로모터 서열의 기능적 상동체 또는 단편은 통상적으로 이러한 검정에서 천연 서열에 의해 제공되는 발현의 적어도 50 %, 예를 들어 적어도 60, 70, 80 또는 90 %를 제공한다.
- [0243] 적합한 코딩 서열 (ii)는 키메릭 프로모터 구조물에 대해 이미 언급된 것을 포함한다. 그러나, 본 양상에서, 코딩 서열은 3' 인핸서 서열에 대해 이중이다. 본 구조물의 인핸서 서열 (iii)은 상기 기술되어 있다. 또한, 본 구조물은 통상적으로 폴리A 서열을 포함한다. 키메릭 프로모터 구조물의 경우에서와 같이, 이러한 폴리A 영역은 코딩 서열 (ii)에 대해 천연적일 수 있거나 구조물에서 이중 폴리A 성분으로 제공될 수 있다.
- [0244] 본 발명의 양상에 따른 구조물은 시그널 펩티드 서열을 포함할 수 있다. 시그널 펩티드 서열은, 시그널 펩티드가 프로모터와 작동가능하게 연결된 코딩 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드의 발현 및 분비를 용이하게 하도록 프로모터와 작동가능한 연결로 삽입된다.
- [0245] 통상적으로, 시그널 펩티드 서열은 10 내지 30개 아미노산, 예를 들어 15 내지 20개 아미노산의 펩티드를 암호화한다. 종종 아미노산은 주로 소수성이다. 통상적으로, 시그널 펩티드는 발현 세포의 소포체 (endoplasmic reticulum)에 대한 시그널 펩티드를 갖는 성장하는 폴리펩티드 쇄를 표적한다. 시그널 펩티드는 소포체에서 잘려 골지체를 통한 폴리펩티드의 분비를 가능하게 한다.
- [0246] 본 발명에 사용하기 위한 시그널 펩티드는
- [0247] (i) 천연 시그널 펩티드 서열;
- [0248] (ii) 시그널 펩티드 활성을 보유하는 (i)의 상동 변이체; 또는
- [0249] (iii) 시그널 펩티드 활성을 보유하는 (i)또는 (ii)의 단편을 포함할 수 있다.
- [0250] 서열 (i)은, 예를 들어 사람 조직 플라스미노겐 활성화자 시그널 펩티드 (hTPAsp) (진뱅크 L00141), 아프로티닌 시그널 펩티드 (진뱅크 AAD13685), 담배 엑스텐신 시그널 펩티드 (진뱅크 JU0465), 또는 치킨 리소자임 시그널 펩티드 (진뱅크 AF410481)일 수 있다.
- [0251] 본 발명에 사용하기에 적합한 시그널 펩티드는 이중 단백질을 분비시킬 수 있는 것이다. 기능적 시그널 펩티드는 시험 시그널 펩티드의 효과를 공지된 시그널 펩티드, 예를 들어 사람 조직 플라스미노겐 활성화자 시그널 펩티드 (hTPAsp)의 효과 및 시그널 펩티드가 없는 효과와 비교하는 검정으로 확인될 수 있다. 하기에 나타난 비교 발현 검정이 하기 변형과 함께 이용될 수 있다. 시험 시그널 펩티드 존재, hTPAsp 존재 또는 시그널 펩티드 부재의 기본 벡터를 포함하는 분비 발현 벡터를 제작한다. 천연 발생 시그널 펩티드가 없는 폴리펩티드에 대한 코딩 서열을 벡터에 삽입하고 이 벡터를 참조 숙주 세포로 형질전환시킨다. 바람직하게는, 세포는 포유동물 HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 또는 COS 세포이다. 세포 배지를 폴리펩티드 발현 수준에 대해 분석한다. 기능적 시그널 펩티드는 적어도 하나, 바람직하게는 2개의 폴리펩티드를 사용해 시그널 펩티드가 없는 벡터보다 높은 수준의 폴리펩티드 분비를 가능하게 한다. 통상적으로, 분비는 5 % 이상 높거나, 보다 바람직하게는 10 % 이상, 예를 들어 20 또는 50 % 이상 높다. 통상적으로, 분비 수준은 hTPAsp를 사용하여 얻어지는 수준과 견줄

만하다.

- [0252] 발현 세포의 밖으로 암호화된 단백질, 특히 항원을 분비시키면 많은 이점이 있을 수 있다. 예를 들어, 증가된 항원 분비는 면역 세포 (대식구, 랑게한스 세포, B-세포, T-세포 등)에 의한 보다 큰 항원 증대 및 반응을 가능하게 하고, 항원이 혈류 및 시그널 세포 (사이토킨)에 도달하는 것을 가능하게 하며, 항원이 세포 리간드를 찾고 기능 (항체, 독소, 예로 콜레라 독소, 이. 콜라이 LT)을 발휘하며 정상적 세포 생화학 과정 (세포 수용체)에 참여하는 것을 가능하게 할 수 있다.
- [0253] 본 발명의 핵산 구조물은 플라스미드 발현 벡터의 형태일 수 있다. 이때, 벡터는 추가의 요소, 예를 들어 복제 기원 또는 선별 유전자를 포함할 수 있다. 이러한 요소가 당 기술 분야에서 공지되어 있으며, 표준 기술을 이용하여 포함시킬 수 있다. 하나의 양태에서, 플라스미드 벡터는 서열 14의 서열을 갖는다. 달리, 구조물은 바이러스 벡터 구조물에 포함될 수 있다.
- [0254] 일부 양태에서, 본 발명의 핵산 구조물은 본원에 기술된 키메라 프로모터 2개 이상을 포함할 수 있다. 따라서, 구조물은 다수의 키메라 프로모터를 포함할 수 있으며, 특히 구조물은 2개, 3개, 4개, 5개 또는 그 이상의 키메라 프로모터를 가질 수 있다. 키메라 프로모터는 바람직하게는 코딩 서열의 삽입을 위한 클로닝 부위에 각각 분리되어 작동적으로 연결될 것이다. 따라서, 구조물은 2개, 3개, 4개, 5개 또는 그 이상의 코딩 서열을 발현할 수 있다. 발현되는 코딩 서열은 본원에 상술된 것 일 수 있다. 바람직한 예에서, 구조물은 2개의 키메라 프로모터를 가지며, 각각의 프로모터는 이들과 작동적으로 연결된 코딩 서열을 갖는다. 특히, 2개의 프로모터는 서로 떨어져서 전사될 수 있다.
- [0255] 특히, 2개의 프로모터를 갖는 구조물은, 상술된 것, 바람직하게는 LTA 및 B 서브유니트를 포함하여, ADP-리보실화 세균 독소의 A 및 B 서브유니트를 발현할 수 있다.
- [0256] 구조물이 다수의 키메라 프로모터를 갖는 경우, 각각은 본원에 기술된 서열을 포함하거나 이와 작동적으로 연결될 수 있다. 특히 바람직한 예에서, 하나 이상의 프로모터의 이중 인트론은 래트 인슐린 유전자 인트론 A 서열일 수 있다. 또한, 하나 이상의 키메라 프로모터는 바람직하게는 HSV-2gB pre-S2의 5'UTR를 포함한다. 하나 이상의 프로모터는 래트 β -글로빈 유전자의 폴리아데닐화 서열을 포함할 수 있다.
- [0257] 바람직한 경우에서, 본 발명의 핵산 구조물은 2개의 키메라 프로모터 서열을 포함할 수 있으며, 각각의 프로모터 서열은 이에 삽입되는 코딩 서열을 갖는 클로닝 부위에 작동적으로 연결되고, 이 때 각각의 프로모터는
- [0258] (a) hCMV 즉시형 초기 프로모터 서열;
- [0259] (b) hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 엑손 1 및 적어도 일부분의 엑손 2; 및
- [0260] (c) hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 인트론 A 영역 대신에 제공된 이중 인트론을 포함하며,
- [0261] 하나의 키메라 프로모터에 작동적으로 연결된 코딩 서열은 LTA 서브유니트를 암호화하고 다른 프로모터에 연결된 코딩 서열은 LTB 서브유니트를 암호화한다. 따라서, 이 구조물은 2개의 서브유니트를 함께 발현할 수 있다. 바람직하게는,
- [0262] - 각각의 프로모터의 이중 인트론은 래트 인슐린 유전자 인트론 A 서열이고;
- [0263] - 각각의 LT 서브유니트를 암호화하는 서열은 HBV pre-S2의 5'UTR에 작동적으로 연결되며/되거나;
- [0264] - 각각의 LT 암호화 서열은 래트 β -글로빈 유전자 폴리아데닐화 서열에 작동적으로 연결된다.
- [0265] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 구조물은 세포 또는 세포성 물질이 실질적으로 없거나 이들과 결합될 수 있다. 이는 실질적으로 분리된 형태이거나 실질적으로 정제된 형태이며, 이 경우 일반적으로 제조 시 폴리뉴클레오티드 또는 건조 질량의 적어도 90 %, 예를 들어 적어도 95 %, 98 % 또는 99 %를 포함할 것이다.
- [0266] 본 발명의 핵산 분자는 프로모터와 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오티드의 발현을 위한 적합한 숙주 세포에 전달될 수 있다. 바람직하게는, 숙주 세포는 포유동물 세포, 특히 사람 세포이다. 이러한 세포에 핵산을 전달하기 위한 적합한 방법은 당 기술 분야에서 공지되어 있으며, 예를 들어 텍스트란 매개된 트랜스펙션, 인산칼슘 침전, 전기천공 및 세포핵으로의 직접적 미세주입을 포함한다.
- [0267] 상술된 바와 같이, 구조물 중의 핵산 코딩 서열은 치료학적으로 관련된 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 따라서, 본 구조물은 표준 유전자 전달 프로토콜을 이용한 핵산 면역화 또는 유전자 치료에 사용될 수 있다. 유전자 전달에 적합한 방법은 후술되는 바와 같이 당 기술 분야에서 공지되어 있다. 핵산 분자는 직접적으로 피검

물에 전달되거나, 다르게는 피검물로부터 유도된 세포에 생체 외에서 전달된 후 이 세포가 피검물에 재이식될 수 있다.

[0268] 핵산 번역화 또는 유전자 치료에 이용하기 위해, 핵산 구조물은 통상의 제약학적 제제로 제형화될 수 있다. 이는 당 기술 분야의 전문가가 이용가능한 제약학적 제형 화학 및 방법학을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 핵산 서열 (예를 들어 DNA 플라스미드와 같이 적합한 벡터 형태로 존재)을 포함하는 조성물을 하나 이상의 제약학적으로 허용되는 부형제 또는 비히클과 함께 배합하여 액상 제제를 제공할 수 있다.

[0269] 보조 물질, 예를 들어 습윤제 또는 유화제, pH 완충 물질 등이 부형제 또는 비히클에 존재할 수 있다. 이들 부형제, 비히클 및 보조 물질은 일반적으로 지나친 독성 없이 투여될 수 있고, 백신 조성물의 경우, 조성물이 투여된 개체에서 면역 반응을 유도하지 않을 제약학적 제제이다. 제약학적으로 허용되는 부형제는, 이로 제한됨이 없이, 액체, 예를 들어 물, 염수, 폴리에틸렌글리콜, 히알uron산, 글리세롤 및 에탄올을 포함한다. 또한, 제약학적으로 허용되는 염은, 예를 들어 무기산염, 예를 들어 염산염, 브롬산염, 인산염, 황산염 등; 유기산염, 예를 들어 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트, 벤조에이트 등을 포함할 수 있다. 또한, 필수적이지는 않으나, 제제는 특히 펩티드, 단백질 또는 다른 기타 분자가 조성물에 포함되는 경우 이들을 위한 안정화제로서 작용하는 제약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 것이 바람직하다. 펩티드에 대한 안정화제로서도 작용하는 적합한 캐리어의 예는, 이로 제한됨이 없이, 제약학적 등급의 텍스트로즈, 슈크로즈, 락토즈, 트레할로즈, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 텍스트란 등을 포함한다. 다른 적합한 캐리어는, 이로 제한됨이 없이, 전분; 셀룰로즈, 인산나트륨 또는 인산칼슘, 시트르산, 타르타르산, 글리신, 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 이들의 배합물을 포함한다. 제약학적으로 허용되는 부형제, 비히클 및 보조 물질에 대한 철저한 논의를 본원에 참조로 삽입된 문헌 (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N. J. 1991))에서 찾을 수 있다.

[0270] 또한, 핵산 흡수 (uptake) 및/또는 발현에 대한 특정 촉진자 ("트랜스펙션 촉진 제제), 예를 들어 부피바카인, 카르디오톡신 및 슈크로즈와 같은 촉진자 및 핵산 분자의 전달에 통상 사용되는 리포솜 또는 리피드 제제와 같은 트랜스펙션 촉진 비히클이 조성물에 포함될 수 있다. 음이온성 및 중성 리포솜이 널리 이용가능하며, 핵산 분자의 전달에 대해 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 리포솜에 대해 문헌 [A Practical Approach, (1990) RPC New Ed., IRL Press]]을 참조한다. 또한, 양이온성 지질 제제가 핵산 분자의 전달에 사용하기 위한 널리 공지된 비히클이다. 적합한 지질 제제는 DOTMA (N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드) (상품명 리포펙틴 (LipofectinTM)으로 이용가능), 및 DOTAP (1,2-비스(올레일옥시)-3-(트리메틸암모니오)프로판)을 포함한다 (Felgner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7416; Malone et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6077-6081; 미국 특허 번호 제5,283,185호 및 제5,527,928호, 및 국제 공개 번호 제WO 90/11092호, 제WO 91/15501호 및 제WO 95/26356호). 이들 양이온성 지질은 바람직하게는 중성 지질, 예를 들어 DOPE (디올레일 포스파티딜에탄올아민)와 함께 사용될 수 있다. 상기 지질 또는 리포솜 제제에 첨가될 수 있는 추가의 트랜스펙션-촉진 조성물은 스페르민 유도체 (국제 공개 번호 WO 93/18759) 및 막-투과성 화합물, 예를 들어 GALA, 그라미시딘 S 및 양이온성 담즙염 (국제 공개 번호 제WO 93/19768호)을 포함한다.

[0271] 다르게는, 본 발명의 핵산 분자는 캡슐화되거나 특정 캐리어에 흡수되거나 이와 결합될 수 있다. 적합한 미립자 캐리어는 폴리메틸 메타크릴레이트 중합체로부터 유도되는 것 및 폴리(락타이드) 및 폴리(락타이드-코-글리콜라이드)로부터 유도되는 PLG 미세입자를 포함한다 (Jeffery et al. (1993) Pharm. Res. 10: 362-368). 또한, 다른 미립자 시스템 및 중합체, 예를 들어 폴리리신, 폴리아르기닌, 폴리오르니틴, 스페르민, 스페르미딘 및 이들 분자의 결합체가 사용될 수 있다.

[0272] 일단 제형화되면, 조성물은 다양한 공지된 경로 및 기술을 이용하여 생체 내에서 피검체에 전달될 수 있다. 예를 들어, 액상 제제는 주사용 용액, 현탁액 또는 에멀전으로 제공되고 통상의 바늘 및 주사기를 사용해 비경구, 피하, 피부 내, 근육 내, 정맥 내 주사를 통하거나 액체 체트 주입 시스템을 이용하여 투여될 수 있다. 또한, 액상 제제는 피부 또는 점막 조직에 국소적으로 투여되거나 호흡 또는 폐 투여에 적합한 미분된 스프레이로 제공될 수 있다. 다른 투여 모드는 경구 투여, 좌제 및 능동 또는 수동적 경피 전달 기술을 포함한다.

[0273] 다르게는, 조성물은 생체 외에서 투여될 수 있으며, 예를 들어 피검물에 형질전환된 세포를 전달 및 재이식시키는 것이 공지되어 있다 (예: 텍스트란-매개된 트랜스펙션, 인산칼슘 침전, 전기천공 및 세포핵으로의 직접적 미세주입).

- [0274] 조성물은 투여 제형에 적합하고 예방 및/또는 치료학적으로 유효한 양으로 피검물에 투여된다. 적합한 유효량은 비교적 넓은 범위이며 통상의 시도로 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 필요량을 결정하는데 있어 "Physicians Desk Reference" 및 "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics"이 유용하다. 예를 들어, 일반적으로 폴리뉴클레오티드의 유효량은 약 0.001 내지 1000 μg , 보다 바람직하게는 0.01 to 10.0 μg 의 범위일 것이다.
- [0275] 하나의 예로서, 본 발명의 핵산 구조물은 또 다른 핵산 구조물과 함께 사용될 수 있다. 하나의 경우로서, 핵산 구조물은 어주번트의 발현을 위해 본원에 기술된 것일 수 있으며, 다른 구조물은 하나 이상의 항원을 암호화하는 구조물일 수 있다. 바람직한 경우에서, 2개의 구조물은 본 발명의 키메릭 프로모터를 사용할 수 있다.
- [0276] 하나의 구조물이 어주번트를 발현하고 및 다른 구조물이 항원을 발현하는 경우, 그 항원은 특히 HSV 또는 간염 바이러스 (특히 B형 간염 바이러스)로부터의 것일 수 있다. 항원은 특히 HSV ICPO, ICP4, ICP 22 및/ICP 27 항원일 수 있으며, 바람직하게는 4개 모두이다. 이러한 항원이 발현되는 경우, 어주번트 구조물은 특히 LTA 및/또는 LTB, 특히 이들 모두를 발현할 것이다.
- [0277] 2개의 구조물은 분리해서, 동시에 또는 연속해서 투여될 수 있다. 2개의 구조물은 동일하거나 상이한 조성물로 투여될 수 있다. 특히, 하나의 구조물이 어주번트 효과를 갖는 경우, 2개의 구조물은 어주번트 효과가 나타나게 전달될 것이다. 즉, 생성되는 면역 반응은 어주번트가 항원과 함께 투여되지 않은 경우보다 크고 및/또는 긴 기간 동안 지속될 것이다. 바람직한 예에서, 2개의 구조물은 동일한 조성물, 특히 동일한 캐리어 입자로 전달될 수 있다.
- [0278] 바람직한 양태에서, 본 발명의 핵산 구조물은 입자-매개된 전달 기술을 이용해 표적 세포에 전달된다. 핵산 제제를 전달하기 위한 입자 매개된 방법이 당 기술 분야에서 공지되어 있다.
- [0279] 입자 매개된 전달을 위한 입자는 당 기술 분야의 다양한 기술을 이용해 본 핵산 분자를 캐리어 입자 (예: 코어 캐리어)에 코팅함으로써 형성될 수 있다. 캐리어 입자는 입자 매개된 전달 디바이스로부터 세포 내 전달에 통상적으로 사용되는 입자 크기의 적합한 밀도를 갖는 물질 중에서 선택된다. 통상적으로, 캐리어 입자의 직경은 0.1 내지 5 μm , 예를 들어 0.5 내지 3 μm , 바람직하게는 1 내지 2 μm 이다. 최적 캐리어 입자 크기는, 물론, 표적 세포의 직경에 따를 것이다. 다르게는, 코팅된 콜로이드성 금 (gold)이 조직 (예: 피부 또는 근육)으로 투여되고 (예: 주입되고) 이어서 면역-컴피턴트 (competent) 세포에 의해 취해지는 콜로이드성 금 입자가 사용될 수 있다.
- [0280] 종종, 캐리어 입자는 불활성 금속 중에서 선택된다. 금속은 이들이 생리학적으로 활성이 아닌 불활성이어야 한다. 본 발명의 목적상, 텅스텐, 금, 백금 및 이리듐 캐리어 입자가 사용될 수 있다. 텅스텐 및 금 입자가 바람직하다. 텅스텐 입자는 평균 입자 직경 0.5 to 2.0 μm 가 쉽게 이용가능하다. 이러한 입자가 입자의 가속 전달 방법에 사용하기 위한 최적 밀도를 갖고 DNA로의 매우 효과적인 코팅을 가능하게 하지만, 텅스텐은 특정 세포 타입에 잠재적으로 독성일 수 있다. 또한, 금 입자 또는 미세결정 금 (예: 금 분말 A1570 (Engelhard Corp., East Newark, NJ))을 본 발명의 방법에 사용할 수 있다. 금 입자는 균일한 입자 크기를 제공하고 (1 내지 3 μm 입자 크기 (Alpha Chemicals), 0.95 μm 를 포함한 입자 크기 (Degussa, South Plainfield, NJ)), 감소된 독성을 제공한다. 미세결정 금은 통상적으로 0.1 내지 5 μm 범위의 다양한 입자 크기 분포를 제공한다. 그러나, 불규칙한 표면적의 미세결정 금이 핵산을 사용한 고도로 효과적인 코팅을 제공한다.
- [0281] DNA 또는 RNA를 금 또는 텅스텐 입자에 코팅 또는 침전시키기 위한 많은 방법이 공지되고 기술되어 있다. 대부분의 이러한 방법은 일반적으로 예정량의 금 또는 텅스텐을 플라스미드 DNA, CaCl_2 및 스페르미딘과 배합한다. 생성된 용액은 반응 혼합물의 균일함을 확실히 하기 위해 코팅 절차 동안 연속적으로 와동시킨다. 핵산을 침전시킨 후, 코팅된 입자를 적합한 막에 옮기고, 사용 전에 건조시키며, 샘플 모듈 또는 카세트의 표면에 코팅시키거나, 특히 입자 매개된 전달 기구에 사용하기 위한 전달 카세트에 적재 (loading) 할 수 있다.
- [0282] 다르게는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 미립자 조성물로서 제형화될 수 있다. 제형화는 상술된 표준 제약학적 제형 화학을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는 적합한 조성물을 제공하기 위해 하나 이상의 제약학적으로 허용되는 부형제 또는 비히클과 배합될 수 있다. 이어서, 제형화된 조성물은 단순 증발 (공기 건조), 진공 건조, 분무 건조, 냉동 건조 (동결건조), 분무-동결 건조, 분무 코팅, 침전, 임계 유체 입자 제형 등과 같은 표준 기술을 이용하여 입자로 제조된다. 필요한 경우, 생성된 입자는 본원에 참조로 삽입된 공동 소유의 국제 공개 번호 제WO 97/48485호에 기술된 기술을 이용해 조밀화될 수 있다.
- [0283] 이들 방법은 입자 크기가 약 0.01 내지 약 250 μm , 바람직하게는 약 10 내지 약 150 μm , 가장 바람직하게는 약

20 내지 약 60 μm 이고, 입자 밀도가 약 0.1 내지 약 25 g/cm^3 이며, 벌크 밀도가 약 0.5 내지 약 3.0 g/cm^3 또는 그 이상인 핵산 입자를 얻는데 이용될 수 있다.

[0284] 형성된 핵산 분자를 포함하는 입자는 단일 유닛 투여 또는 다수투여 용기로 포장될 수 있다. 이러한 용기는 적당량의 입자를 포함하는 밀폐된 용기를 포함할 수 있다. 입자는 멸균 제형으로 포장될 수 있으며, 이렇게 밀폐된 용기는 피검물에 전달하여 사용할 때까지 제형물의 멸균을 유지하도록 디자인될 수 있다. 용기는 바람직하게는 입자 매개된 전달 디바이스에 직접 사용하기 위해 개조된다. 통상적으로, 이러한 용기는 캡슐, 포일 파우치, 사세트 (sachet), 카세트 등의 형태를 취한다. 또한, 입자 전달 디바이스는 적합한 용량의 입자를 포함하는 미리-적재된 상태로 제공될 수 있다. 또한, 미리-적재된 디바이스는 밀폐된 용기에 미리포장될 수 있다.

[0285] 입자가 포장되는 용기는 조성물을 확인하고 관련 용량 정보를 제공하기 위해 추가로 표지를 붙일 수 있다. 또한, 용기는 정부 기관, 예를 들어 식약청에 의해 규정된 형태의 공고문 (공고문은 제조물에 대한 연방법 하에 정부 기관에 의한 승인을 나타낸다), 사람 투여를 위해 포함된 핵산 제제의 이용 또는 판매에 대해 표지를 붙일 수 있다.

[0286] 입자-매개된 전달에 적합한 입자 가속 디바이스가 당 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 통용되는 유전자 건 디바이스 (gun device)는 표적 세포를 향해 코팅된 캐리어 입자를 나아가게 하기 위해 폭발적, 전기적 또는 기체의 발포를 이용한다. 코팅된 캐리어 입자는 이동가능한 캐리어 시트에 방출가능하게 부착되거나, 표면을 따라 제거가능하게 접착되어 표면을 따라 가스 스트림을 통과시키면 표면으로부터 입자를 들어올리고 이를 표적 물로 가속시킬 수 있다. 기체 발포 디바이스의 예가 미국 특허 번호 제4,945,050호에 기술되어 있다. 본원에 기술된 전기적 발포 장치에 대한 하나의 예가 미국 특허 번호 제5,120,657호에 기술되어 있다. 또 다른 전기적 발포 장치가 미국 특허 번호 제5,149,655호에 기술되어 있다. 이들 특허 모두의 기술이 본원에 전부 참조로 삽입된다.

[0287] 또한, 입자는 바늘 없는 주사기 디바이스, 예를 들어 미국 특허 번호 제5,630,796호 (Bellhouse et al.) ("PowderJect[®] 바늘 없는 주사기 디바이스") 및 국제 공개 번호 제WO 94/24263호, 제WO 96/04947호, 제WO 96/12513호 및 제WO 96/20022호 (이들 모두 본원에 참조로 삽입된다)를 사용하여 투여될 수 있다.

[0288] 미국 특허 번호 제5,630,796호에 기술된 것과 같은 디바이스가, 상단으로부터 하단으로 순차적으로, 기체 실린더, 입자 카세트 또는 패키지 및 관련 소음 매질을 갖는 초음파 노즐을 포함하는 펜-모양의 장치로 제공될 수 있다. 입자는 적합한 용기, 예를 들어 자체-포함된 밀폐 유닛을 형성하기 위해 워셔-모양의 스페이서로 열-밀폐되는 2개의 파열가능한 중합체 막으로 형성되는 카세트에 제공된다. 막 물질은 초음파 유동이 개시되는 조건을 지시하는 특정 모드의 개방 및 파열 압력을 달성하도록 선택될 수 있다.

[0289] 디바이스는 가동시 실린더로부터 디바이스 내의 팽창 챔버로 압축 기체를 방출시키도록 작동된다. 방출된 기체는 입자 카세트를 접촉하고, 충분한 압력이 되면 갑자기 카세트 막을 깨뜨려 입자를 후속 전달을 위해 초음파 노즐로 몰아간다. 이 노즐은 일정량의 입자를 예정된 영역의 표적 표면으로 전달하기 위한 특정 기체 속도 및 유동 패턴을 취하도록 디자인된다. 소음기는 초음파 기체 유동에 의해 생성되는 시끄러움을 줄이기 위해 사용된다.

[0290] 또한, 국제 공개 번호 제WO 96/20022호에 기술된 전달 시스템은 분말 조성물을 가속하고 전달하기 위해 압축 기체 공급원의 에너지를 사용한다. 이는 입자를 가속시키기 위해 기체 유동 대신 충격파를 사용하는 미국 특허 번호 제5,630,796호의 시스템과 구별된다. 보다 특히, 유연한 돔 뒤에서 생성되는 충격파에 의해 제공되는 순간적 압력 상승이 돔의 후면에 일격을 가해, 표적물 표면의 방향으로 유연한 돔의 갑작스러운 외전 (eversion)을 일으킨다. 이러한 갑작스러운 외전은 분말화된 조성물 (돔의 바깥에 위치됨)을 충분한 속도, 따라서 운동량으로 발사시켜 표적 조직, 예를 들어 구강 점막 조직을 투과한다. 분말화된 조성물은 완전한 돔 외전 시에 방출된다. 또한, 돔은 고압 기체 유동을 완전히 포함하여 고압 기체 유동은 조직과 접촉하지 않는다. 기체가 이러한 전달 작동 동안 방출되지 않기 때문에, 이 시스템은 본질적으로 조용하다. 이러한 디자인은, 예를 들어 입자를 최소한으로 침해하는 수술 부위로 전달하기 위한 다른 예외적이거나 달리 민감한 적용에 이용될 수 있다.

[0291] 입자는 피검물에 직접적으로 생체 내에서 전달되거나 피검물로부터 취한 세포에 세포 외에서 전달되어 형질전환된 세포는 피검물에 재이식될 수 있다. 생체 내 전달을 위해, 입자는 통상적으로 피하, 상피, 피부 내, 점막 내 (예: 비강, 직장 및/또는 질), 복강 내, 정맥 내, 경구 또는 근육 내로 주입된다. 바람직하게는, 전달은 마

지막으로 분화된 세포에 대한 것이다; 그러나, 입자는 또한 비-분화되거나 부분적으로 분화된 세포, 예를 들어 혈액의 줄기 세포 및 피부 섬유아세포 (fibroblast)로 전달될 수 있다. 가장 바람직하게는, 전달은 피부 상피 세포에 대한 것이다.

[0292] 입자는 투여 제형에 적합한 방식 및 예방 및/또는 치료학적으로 효과적인 양으로 피검물에 투여된다. 본 미립자 조성물의 "치료학적 유효량"은 질환 또는 상태 증후군을 치료 또는 예방하기에 충분하며, 통상의 시도로 결정될 수 있는 비교적 넓은 범위에 속할 것이다. 일반적으로, 입자는 투여 당 핵산 0.001 내지 1000 μg , 보다 바람직하게는 0.01 내지 10.0 μg 의 양으로 전달된다. 그러나, 정확한 필요량은 치료되는 개체의 나이 및 일반적인 상태, 선택된 특정 뉴클레오타이드, 기타 요인에 기인하여 다양할 것이다. 적합한 유효량은 임상 시험을 통해 쉽게 결정될 수 있다. 필요량을 결정하는데 문헌["Physicians Desk Reference"] 및 ["Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics"]가 유용하다.

[0293] 검정

[0294] 비교 발현 검정

[0295] 구성 요소의 유용성에 대한 적합한 시험은 그 요소가 폴리펩티드의 발현에 효과적인가를 결정한다. 구성 요소의 유용성을 시험하기 위한 비교의 기본은 "기본 벡터"이며, 일반적으로 (달리 언급이 없는 한) hCMV 프로모터, hCMV 엑손 1, hCMV 엑손 2의 9개 염기, HBV preS2로부터의 5'UTR 및 래비트- β 글로빈 폴리아데닐화 영역을 갖고, 코딩 서열의 발현을 이끌도록 위치된다. 통상적으로, 기본 벡터는 pJV7384, pJV 7401, pJV 7450 또는 pJV 7533이다. 이중 인트론 및 3'UTR이 추가되거나, 프로모터 서열, 엑손, 5'UTR 및 폴리A 부위가 시험 발현 벡터를 만들기 위해 기본 벡터로 교환된다. 따라서, 기능적 변이체 또는 단편이 시험될 수 있다.

[0296] 기본 벡터 및 시험 벡터는 적합한 숙주 세포로 형질전환되고, 세포는 폴리펩티드 발현 수준에 대해 분석된다. 바람직하게는, 포유동물 숙주 세포가 사용된다. 적합한 세포는 포유동물 HEK 293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 또는 COS 세포를 포함한다.

[0297] 통상적으로, 기능적 요소는 기본 벡터와 비교되는, 예를 들어 최소한 동일하거나 보다 큰 발현을 야기한다. 바람직하게는, 발현은 하나 이상의 세포 타입에서 하나 이상의 코딩 서열을 사용하여 시험된다.

[0298] 적합한 실험 프로토콜이 하기 실시예 1 내지 13에서 예시적으로 제공된다.

[0299] 비교 면역원성 검정

[0300] 발현될 폴리펩티드가 항원인 경우, 기능적 또는 특히 바람직한 구조물 요소를 확인하기 위해 추가의 시험이 수행될 수 있다. 이러한 검정에서, 구성 요소의 효과 또는 면역 반응은 발현 벡터를 시험 유기체에 전달한 후 측정된다. 항원에 대한 항체 수준이 면역 반응을 판단하는데 가장 쉬운 방법이다. 마우스의 군을 기본 벡터 또는 상기한 바와 같이 제작된 시험 벡터로 백신처리한다. 적당한 시간 후 혈청을 수집하고 항체 수준에 대해 분석한다.

[0301] 이러한 실험은 2번 수행되며, 양 실험의 모든 군으로부터의 항체 수준을 플로팅한다. 기능적 요소는 특정 항원에 대한 양 실험에서 기본 벡터와 적어도 동일하거나 기본 벡터보다 높은 항체 역가를 나타낼 것이다. 바람직하게는, 그 결과는 발현 패널에서 요소(들)의 유용성의 폭을 입증하기 위해 하나 이상의 항원을 사용하여 나타낼 것이다.

[0302] 적합한 실험 프로토콜이 하기 실시예 14에서 예시적으로 제공된다.

[0303] C. 실험

[0304] 본 발명을 수행하기 위한 구체적 양태에 대한 실시예가 하기에 나타나 있다. 이 실시예는 단지 설명을 목적으로 하는 것으로서, 어떠한 식으로든 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0305] 사용되는 수 (예: 양, 온도 등)에 대해 정확성을 기하도록 노력하였으나, 일부 실험적 오차 및 편차는 허용되어야 한다.

- [0306] 방법
- [0307] 표준 PCR 조건
- [0308] 박테리의 제작을 위해 이용되는 표준 PCR 조건은 하기와 같다: 1 x PCR 코어 완충액 w/1.5mM MgCl₂ (Promega Corporation, Madison, WI), 0.400 μM의 각각의 프라이머, 200 μM의 각각의 dNTP (USB, Inc, Cleveland, OH), 2.5 μ Taq 폴리머라제 (Promega Corporation, Madison, WI), 1.0 ng 템플레이트 DNA, 물 (100 μl가 될 때까지), 및 무기 오일 (Aldrich Chemical, Inc, Milwaukee, WI) 오버레이. PTC-200 열순환반응기 (MJ Research, Inc, Waltham, MA)를 다음과 같이 작동하도록 프로그래밍하였다: 4'@95 °C, 30 사이클의 (1'@95 °C/1'15"@55 °C/1'@72 °C), 10'@72 °C, 4 °C 유지). 제한 효소 (New England Biolabs, Beverly, MA)로 절단하기 전에 QIAquickPCR 정제 키트 (Qiagen Inc, Valencia, CA)을 사용해 PCR 반응물로부터 증폭 생성물을 분리시켰다.
- [0309] 모든 PCR 생성물은 증폭이 정확한가를 확인하기 위해 클로닝 후 서열분석하였다.
- [0310] 실시예
- [0311] 실시예 1: B형 간염 바이러스 표면 항원 (HBsAg) 박터 패널의 제작
- [0312] HBsAg 발현을 위한 많은 플라스미드 발현 박터를 제작하였다.
- [0313] 출발 물질
- [0314] (i) pWRG7128 (Roy, M, et. al. Vaccine (2001) 19: 764-778): hCMV 즉시형 초기 프로모터 서열, hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 제 1 엑손, 제 1 인트론 및 일부분의 제 2 엑손, 플랭킹 영역 (HBV preS2 5'UTR 유도된 서열 및 3' 전사 후 반응 요소)을 갖는 HBsAg 코딩 서열 및 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역 (BGHpA)을 포함.
- [0315] (ii) pJV7284: 래비트 β 글로빈 폴리아데닐화 영역 (RBGpA)을 BGHpA 대신 교체한 pWRG7128의 유도체.
- [0316] (a) pJV7384 (CMV(인트론 부재), HBV preS2 5'UTR 및 RBGpA)
- [0317] pWRG7128을 표준 조건을 이용하면서 JF93 (서열 15) 및 F110 (서열 16)을 사용해 PCR하고, *Sa*I 및 *Bam*H1으로 절단하여 CMV 프로모터, 엑손 1 및 일부분의 엑손 2 서열을 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pAM6 (ATCC, Mannassas, VA)를 *Bam*H1 및 *Bst*X1로 절단하여 HBsAg의 5'UTR 및 HBsAg 코딩 영역의 약 70 %를 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7284을 *Sa*I 및 *Bst*X1으로 절단하여 박터 단편을 생성하고, 이 박터 단편에 상기 2개의 삽입 단편을 결합시켜 pJV7293를 생성하였다.
- [0318] pWRG7128을 프라이머 GW1 (서열 17) 및 JF254 (서열 18)을 사용해 PCR하고, *Bst*X1 및 *Bg*12로 절단하여 HBsAg 코딩 영역의 3'-말단을 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7293를 *Bst*X1 및 *Bg*12로 절단하여 박터 단편을 생성하고, 이 박터 단편에 상기 삽입 단편을 결합시켜 박터 pJV7384를 생성하였다.
- [0319] (b) pJV7382 (CMV(인트론 부재), HBsAg 3'UTR, HBV preS2 5'UTR 및 RBGpA)
- [0320] pJV7293를 *Xho*1 및 *Xba*1로 절단하여 CMV 프로모터/엑손 및 HBsAg 코딩 서열의 5'UTR를 포함하는 삽입 단편을 생성하였다. pWRG7128를 *Xba*1 및 *Bcl*1로 절단하여 HBsAg 코딩 서열의 대부분 및 3'UTR를 포함하는 삽입 단편을 생성하였다. pJV7284을 *Xho*1 및 *Bg*12로 절단하여 박터 단편을 생성하고, 이 박터 단편으로 상기 2개의 삽입 단편을 결합시켜 pJV7382를 생성하였다.
- [0321] (c) pJV7389 (CMV(RIA), HBsAg 3'UTR, HBV preS2 5'UTR 및 RBGpA)
- [0322] 래트 인슐린 인트론 A (RIA)을 프라이머 GW150 (서열 19) 및 JF255 (서열 20)을 사용해 플라스미드 p5'rIns (기원 불명)로부터 PCR하였다. PCR 생성물을 *Bam*H1로 절단하고 *Bam*H1-선형화시킨 pJV7382에 삽입하여 pJV7389를 생성하였다.

- [0323] (d) pJV7387 (CMV(RIA), HBV preS2 5'UTR 및 RBGpA)
- [0324] pJV7384를 BstX1 및 EcoR1로 절단하여 HBsAg 코딩 영역의 3'-말단 및 RBGpA를 포함하는 삽입 단편을 생성하였다. pJV7389를 BstX1 및 EcoR1로 절단하여 벡터 단편을 생성하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7387를 생성하였다.
- [0325] 실시예 2: 단순 포진 바이러스 당단백질 D 항원 (HSVgD) 벡터 패닐의 제작
- [0326] HSVgD의 발현을 위한 많은 플라스미드 발현 벡터를 제작하였다.
- [0327] 출발 물질
- [0328] (a) pJV7334: HBsAg 코딩 서열이 ATG 개시 코돈의 바로 아래에서 인-프레임 Nhe1으로 대체되고, HBV Enh의 바로 5'에서 BamH1을 갖는 스퍼퍼 말단 (stuffer fragment)이 이어지는 pWRG7284 (pJV 7284)의 유도체.
- [0329] (b) pWRG7202: 코딩 서열이 Nhe1 부위의 아래에서 사람 조직 플라스미노겐 활성화자 (TPA) 시그널 펩티드와 융합하는 것을 가능하게 하는 스퍼퍼 단편을 갖는 pGem3Z (Promega)의 유도체.
- [0330] (a) pJV7392 (CMV(천연 인트론), HBsAg 3'UTR, HBsAg 5'UTR 및 RBGpA)
- [0331] HSV 2gD에 대한 코딩 영역을 프라이머 DS1 (서열 21) 및 DA1 (서열 22)를 사용하여 바이러스 DNA 스톱 (Advanced Biotech, Inc, Columbia, MD)으로 PCR을 하고, Nhe1 및 EcoR1로 절단하여 삽입 단편을 생성하였다. pWRG7202를 Nhe1 및 EcoR1로 절단하여 벡터 단편을 생성하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7391를 생성하였다.
- [0332] pJV7391을 Nhe1 및 Bgl2으로 절단하여 HSV 2gD 코딩 서열을 포함하는 삽입 단편을 생성하였다. pJV7334를 Nhe1 및 BamH1로 절단하여 벡터 단편을 생성하고 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7392를 생성하였다. 이 벡터는 하기 발현 요소로 이루어진다: hCMV 즉시형 초기 프로모터 서열, hCMV 주요 즉시형 초기 유전자의 제 1 엑손, 제 1 인트론 및 일부분의 제 2 엑손, HBsAg로부터의 5'UTR, HSV 2gD 유전자에 대한 코딩 서열, HBsAg로부터의 3'UTR, 및 RBGpA.
- [0333] (b) pJV7399 (CMV(인트론 부재), HBsAg 3'UTR HBsAg 5'UTR 및 RBGpA)
- [0334] pJV7392의 인트론 없는 버전을 하기와 같이 제작하였다. pJV7384를 Hind3 및 Nde1로 절단하여 카나마이신 내성 유전자의 5' 말단 및 CMV 프로모터를 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7384를 Nde1 및 Ssp1로 절단하여 CMV 프로모터의 3' 말단, CMV 엑손 1/2 및 HBsAg로부터의 5'UTR의 5' 말단을 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. 이들 삽입 단편을 pJV7392에 삽입하고 이로부터 Hind3-Ssp1 단편을 제거하여 pJV7399를 생성하였다.
- [0335] (c) pJV7400 (CMV(RIA), HBsAg 3'UTR, HBsAg 5'UTR 및 RBGpA)
- [0336] pJV7392의 RIA 버전을 하기와 같이 제작하였다. pJV7384를 Hind3 및 Nde1로 절단하여 카나마이신 내성 유전자의 5' 말단 및 CMV 프로모터를 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7387을 Nde1 및 Ssp1로 절단하여 CMV 프로모터의 3' 말단, CMV 엑손 1/2 (일부분), RIA, 및 HBsAg로부터의 5'UTR의 5' 말단을 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. 이러한 삽입 단편을 pJV7392에 삽입하고, 이로부터 Hind3-Ssp1 단편을 제거하여 pJV7400을 생성하였다.
- [0337] (d) pJV7401 (CMV(인트론 부재), HBsAg 5'UTR 및 RBGpA)
- [0338] pJV7399의 3'UTR이 없는 버전을 다음과 같이 제작하였다. pJV7391을 Bsp1201 및 Bgl2로 절단하여 HSV 2gD 유

전자의 3' 말단을 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7284를 Bgl2 및 EcoR1로 절단하여 RBGpA 시그널을 분리하였다. 이러한 삽입 단편을 pJV7399에 삽입하고, 이로부터 Bsp1201-EcoR1 단편을 제거하여 pJV7401를 생성하였다.

[0339] (e) pJV7402 (CMV(RIA), HBsAg 5'UTR 및 RBGpA)

[0340] pJV7400의 3'UTR이 없는 버전을 다음과 같이 제작하였다. pJV7391을 Bsp1201 및 Bgl2로 절단하여 HSV 2gD 유전자의 3' 말단을 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7284를 Bgl2 및 EcoR1로 절단하여 RBGpA 시그널을 분리하였다. 이러한 삽입 단편을 pJV7400에 삽입하고, 이로부터 Bsp1201-EcoR1 단편을 제거하여 pJV7402를 생성하였다.

[0341] 실시예 3: Flu M2 항원 벡터 패널의 제작

[0342] (a) pJV7450 (CMV(인트론 부재), HBsAg 5'UTR 및 RBGpA)

[0343] Flu M2에 대한 코딩 영역을 프라이머 JF301 (서열 23) 및 JF302 (서열 24)를 사용해 플라스미드 pFL-M2 (Joel Haynes, PJV)으로 PCR하고, Nhe1 및 Bgl2로 절단하여 삽입 단편을 생성하였다. pJV7401을 Nhe1 및 Bgl2로 절단하여 벡터 단편을 생성하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7450을 생성하였다.

[0344] (b) pJV7452 (CMV(인트론 부재), HBsAg 3'UTR, HBsAg 5'UTR 및 RBGpA)

[0345] 3'UTR 단편을 프라이머 JF84 (서열 25) 및 JF225 (서열 26)를 사용해 pJV7389로 PCR하고, Bsp1201로 절단하며, T4 DNA 폴리머라제로 채우고, Bgl2 링커 (cat# 1036, New England Biolabs)와 연결하였다. 이어서, 이 단편을 Bgl2 및 EcoR1로 절단하여 HBsAg의 3'UTR 및 RBGpA 영역을 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7450을 Bgl2 및 EcoR1로 절단하여 벡터 단편을 생성하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7452를 생성하였다.

[0346] (c) pJV7458 (CMV(RIA) HBsAg 5'UTR 및 RBGpA)

[0347] RIA를 포함하는 pJV7450의 버전을 하기와 같이 제작하였다. pJV7389를 BamH1로 절단하여 RIA 포함 삽입 단편을 분리하였다. pJV7450을 BamH1으로 절단하여 벡터 단편을 생성하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7458을 생성하였다.

[0348] (d) pJV7468 (CMV(RIA), HBsAg 3'UTR, HBsAg 5'UTR 및 RBGpA)

[0349] HBsAg의 3'UTR을 포함하는 pJV7458의 버전을 하기와 같이 제작하였다. pJV7452를 Bgl2 및 EcoR1로 절단하여 HBsAg 3'UTR 및 RBGpA를 포함하는 삽입 단편을 생성하였다. pJV7458을 Bgl2 및 EcoR1로 절단하여 벡터 단편을 생성하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7468을 생성하였다.

[0350] 실시예 4: β -gal 벡터 패널의 제작

[0351] (a) pJV7488 (CMV(인트론 부재), HBsAg 3'UTR, HBsAg 5'UTR 및 RBGpA)

[0352] CMV-beta (Clontech)를 프라이머 JF335 (서열 27) 및 JF336 (서열 28)을 사용해 PCR하고, Nhe1 및 Bgl2로 절단하여 β -갈락토시다제를 암호화하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7452를 Nhe1 및 Bgl2로 절단하여 벡터 단편을 생성하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7488을 생성하였다.

[0353] (b) pJV7533 (CMV(인트론 부재), HBsAg 5'UTR 및 RBGpA)

[0354] pJV7450을 Bgl2 및 EcoR1로 절단하여 RBGpA를 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7488을 Bgl2 및 EcoR1로

절단하여 벡터 단편을 생성하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7533을 생성하였다.

[0355] (c) pJV7551 (CMV(RIA/Nhe1), HBsAg 3'UTR, HBsAg 5'UTR 및 RBGpA)

[0356] pJV7530 (실시예 5 참조)을 Xho1 및 BamH1로 절단하여 CMV 프로모터부터 RIA까지를 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7488을 Xho1 및 BamH1로 절단하여 벡터 단편을 생성하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7551을 생성하였다.

[0357] (d) pJV7552 (CMV(RIA/Nhe1), HBsAg 5'UTR 및 RBGpA)

[0358] pJV7530을 Xho1 및 BamH1로 절단하여 CMV 프로모터부터 RIA까지를 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7533을 Xho1 및 BamH1로 절단하여 벡터 단편을 생성하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7552를 생성하였다.

[0359] 실시예 5: pJV 발현 벡터 (pJV7563)의 제작

[0360] (a) pJV7496

[0361] pJV7389를 프라이머 JF357 (서열 29) 및 JF365 (서열 30)를 사용해 PCR하고, T4 DNA 폴리머라제로 처리하여 말단을 무디게 한 후, Sal1로 절단하여 카나마이신 내성물을 암호화하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7389를 Ava1로 절단하고, T4 DNA 폴리머라제로 처리하여 말단을 무디게 한 후, Sal1로 절단하여 벡터 단편을 분리시키고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7496을 생성하였다.

[0362] (b) pJV7530

[0363] pJV7389를 프라이머 JF393 (서열 31) 및 JF406 (서열 32)를 사용해 PCR하고, Bgl2 및 BamH1로 절단하여 내부 Nhe1 부위가 없는 RIA를 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7496을 BamH1으로 절단하여 벡터 단편을 제조하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7530을 생성하였다.

[0364] (c) pJV7549

[0365] pJV7468을 BamH1 및 EcoR5로 절단하여 M2 및 일부분의 HBV 3'ENH를 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7530을 BamH1 및 EcoR5로 절단하여 벡터 단편을 제조하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7549를 생성하였다.

[0366] (d) pJV7563

[0367] 프라이머 JF256 (서열 33) 및 JF257 (서열 34)를 어닐링하여 다수 클로닝 부위로 이루어진 삽입 단편을 제조하였다. pJV7549를 Nhe1 및 Bgl2로 절단하여 벡터 단편을 제조하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7563를 생성하였다. pJV7563 플라스미드 맵이 도 12에 나타나 있다. pJV7563 플라스미드에 대한 기본 조성이 도 13에 나타나 있다. 플라스미드 pJV7563의 구성 요소 및 이들의 위치는 하기와 같다:

[0368] 1-44 트랜스포존 903 서열

[0369] 45-860 트랜스포존 903으로부터의 카나마이신 내성 코딩 서열

[0370] 861-896 트랜스포존 903 서열

[0371] 897-902 Sal1 부위

[0372] 903-1587 CMV 프로모터

- [0373] 1588-1718 CMV의 즉시형 초기 유전자로부터의 비해독 리더 서열
- [0374] 1719-1724 BamH1 및 Bgl111 제한 효소의 융합
- [0375] 1725-1857 래트 인슐린 인트론 A
- [0376] 1858-1863 BamH1 부위
- [0377] 1864-1984 HBV 표면 항원 5'-비해독 리더
- [0378] 1985-1993 합성 개시 코돈/Nhe1 클로닝 부위
- [0379] 1994-2011 합성 클로닝 부위
- [0380] 2012-2544 HBV 인헨서
- [0381] 2545-2555 기존 (old) 벡터 서열. NCBI 데이터베이스와 충돌 없음
- [0382] 2556-2686 래비트 β -글로빈 폴리아데닐화 영역
- [0383] 687-3759 pUC19 벡터 서열
- [0384] 실시예 6. 모델 항원으로서 사람의 분비되는 알칼리 포스파타제 (SEAP) 및 사람 IgG Fc 단편 (hFc)를 사용한 시그널 펩티드 발현 패널의 제작
- [0385] (i) pJV7507 (hTPAsp 및 SEAP)
- [0386] pSEAP-Basic (Clontech)을 프라이머 JF320 (서열 35) 및 JF321 (서열 36)을 사용해 PCR하고, Nhe1 및 Bgl2로 절단하여 사람 SEAP 단편으로 이루어진 삽입 단편을 분리하였다. pJV7079 (Macklin, et. al.)를 Nhe1 및 Bgl2로 절단하여 벡터 단편을 제조하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7507을 생성하였다.
- [0387] (ii) pJV7508 (hTPAsp 및 hFc)
- [0388] 사람 DNA를 프라이머 JF386 (서열 37) 및 FcAS (서열 38)로 PCR하고, Nhe1 및 Bgl2로 절단하여 사람 IgG Fc 단편으로 이루어진 삽입 단편을 분리하였다. pJV7079를 Nhe1 및 Bgl2로 절단하여 벡터 단편을 제조하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7508을 생성하였다.
- [0389] (iii) 아프로티닌 시그널 펩티드 코딩 서열의 제조
- [0390] 합성 올리고 JF354 (서열 39)를 프라이머 JF355 (서열 40) 및 JF356 (서열 41)을 사용해 PCR하여 아프로티닌 시그널 펩티드에 대한 코딩 서열을 생성하였다.
- [0391] (iv) 담배 엑스텐신 (Tobacco Extensin) 시그널 펩티드 코딩 서열의 제조
- [0392] 합성 올리고 JF348 (서열 42)을 프라이머 JF349 (서열 43) 및 JF350 (서열 44)을 사용해 PCR하여 담배 엑스텐신 시그널 펩티드에 대한 코딩 서열을 생성하였다.
- [0393] (v) 치킨 리소자임 시그널 펩티드 코딩 서열의 제조
- [0394] 합성 올리고 JF351 (서열 45)을 프라이머 JF352 (서열 46) 및 JF353 (서열 47)을 사용해 PCR하여 치킨 리소자임 시그널 펩티드에 대한 코딩 서열을 생성하였다.
- [0395] (a) Flu M2 항원 시그널 펩티드 패널

- [0396] pJV7499 (CMV(인트론 부재), HBsAg5'UTR, RBGpA, 아프로티닌 시그널 펩티드)
- [0397] pJV7497 (CMV(인트론 부재), HBsAg5'UTR, RBGpA, 담배 엑스텐신 시그널 펩티드)
- [0398] pJV7500 (CMV(인트론 부재), HBsAg5'UTR, RBGpA, 치킨 리소자임 시그널 펩티드)
- [0399] 시그널 펩티드에 대한 코딩 서열을 Spe1 및 Nhe1로 절단하여 삽입 단편을 분리하였다. pJV7450을 Nhe1로 절단하여 벡터 단편을 제조하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7499 (아프로티닌), pJV7497 (담배 엑스텐신), 및 pJV7500 (치킨 리소자임)을 생성하였다.
- [0400] (b) SEAP 시그널 펩티드 패널
- [0401] pJV7513 (CMV(인트론 부재), HBsAg5'UTR, RBGpA, 아프로티닌 시그널 펩티드)
- [0402] pJV7512 (CMV(인트론 부재), HBsAg5'UTR, RBGpA, 담배 엑스텐신 시그널 펩티드)
- [0403] pJV7510 (CMV(인트론 부재), HBsAg5'UTR, RBGpA, 치킨 리소자임 시그널 펩티드)
- [0404] pJV7499, 7497, 및 7500을 Xho1 및 Nhe1로 절단하여 이 플라스미드의 CMV 프로모터부터 시그널 펩티드 코딩 서열까지로 이루어진 삽입 단편을 분리하였다. pJV7507을 Xho1 및 Nhe1으로 절단하여 벡터 단편을 제조하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7513 (아프로티닌), pJV7512 (담배 엑스텐신), 및 pJV7510 (치킨 리소자임)을 생성하였다.
- [0405] (c) hFc 시그널 펩티드 패널
- [0406] pJV7524 (CMV(인트론 부재), HBsAg5'UTR, RBGpA, 아프로티닌 시그널 펩티드)
- [0407] pJV7525 (CMV(인트론 부재), HBsAg5'UTR, RBGpA, 담배 엑스텐신 시그널 펩티드)
- [0408] pJV7526 (CMV(인트론 부재), HBsAg5'UTR, RBGpA, 치킨 리소자임 시그널 펩티드)
- [0409] pJV7499, 7497, 및 7500을 Xho1 및 Nhe1로 절단하여 이 플라스미드의 CMV 프로모터로부터 시그널 펩티드 코딩 서열까지로 이루어진 삽입 단편을 분리하였다. pJV7508을 Xho1 및 Nhe1으로 절단하여 벡터 단편을 제조하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7524 (아프로티닌), pJV7525 (담배 엑스텐신), 및 pJV7526 (치킨 리소자임)을 생성하였다.
- [0410]
- [0411] 실시예 7: 사람의 분비되는 알칼리 포스파타제 (SEAP) 패널의 제작
- [0412] (a) pJV7531 (CMV(인트론 부재), HBsAg5'UTR, RBGpA, 치킨 리소자임 시그널 펩티드)
- [0413] pJV7510을 Sal1 및 Bgl2로 절단하여 CMV 프로모터로부터 리소자임 시그널 펩티드까지를 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7450을 Sal1 및 Bgl2로 절단하여 벡터 단편을 제조하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7531을 생성하였다.
- [0414] (b) pJV7554 (CMV(RIA/Nhe1), HBsAg5'UTR, RBGpA, 치킨 리소자임 시그널 펩티드)
- [0415] pJV7530을 Xho1 및 BamH1으로 절단하여 CMV 프로모터로부터 RIA까지를 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7531을 Xho1 및 BamH1으로 절단하여 벡터 단편을 제조하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7554를 생성하였다.
- [0416] (c) pJV7568 (CMV(인트론 부재), HBsAg 3'UTR, HBsAg5'UTR, RBGpA, 치킨 리소자임 시그널 펩티드)
- [0417] pJV7563을 Bgl2 및 EcoR1으로 절단하여 HBV 3'UTR 및 RBGpA를 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7531을 Bgl2 및 EcoR1으로 절단하여 벡터 단편을 제조하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7568을 생성하였다.

- [0418] (d) pJV7572 (CMV(RIA/NheI), HBsAg 3'UTR, HBsAg5'UTR, RBGpA, 치킨 리소자임 시그널 펩티드)
- [0419] pJV7563을 Bgl2 및 EcoR1으로 절단하여 HBV 3'UTR 및 RBGpA를 포함하는 삽입 단편을 분리하였다. pJV7554를 Bgl2 및 EcoR1으로 절단하여 벡터 단편을 제조하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7572를 생성하였다.
- [0420] 실시예 8: 치킨 케라틴 및 치킨 심장 액틴 인트론을 사용한 β -gal 및 HBsAg 벡터의 제작
- [0421] (a) pJV7557 (β -gal, CMV(cA 인트론), HBsAg3'UTR, HBsAg5'UTR 및 RBGpA)
- [0422] 치킨 DNA를 프라이머 JF430 (서열 48) 및 JF442 (서열 49)를 사용해 PCR하고, Bgl2 및 BamH1으로 절단하여 치킨 심장 액틴으로부터의 인트론 및 플랭킹 엑손 서열로 이루어진 삽입 단편을 분리하였다. pJV7488을 BamH1으로 절단하여 벡터 단편을 제조하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7557을 생성하였다.
- [0423] (b) pJV7558 (β -gal, CMV(cK 인트론), HBsAg3'UTR, HBsAg5'UTR 및 RBGpA)
- [0424] 치킨 DNA를 프라이머 JF421 (서열 50) 및 JF444 (서열 51)를 사용해 PCR하고, Bgl2 및 BamH1으로 절단하여 치킨 케라틴 유전자로부터의 인트론 및 플랭킹 엑손 서열로 이루어진 삽입 단편을 분리하였다. pJV7488을 BamH1으로 절단하여 벡터 단편을 제조하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜, pJV7558을 생성하였다.
- [0425] (c) pJV7578 (HBsAg, CMV(cA 인트론), HBsAg3'UTR, HBsAg5'UTR 및 RBGpA)
- [0426] pJV7557을 Sal1 및 BamH1으로 절단하여 CMV 프로모터로부터 인트론 영역까지로 이루어진 삽입 단편을 분리하였다. pJV7496을 Sal1 및 BamH1으로 절단하여 벡터 단편을 제조하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7558을 생성하였다.
- [0427] (d) pJV7579 (HBsAg, CMV(cK 인트론), HBsAg3'UTR, HBsAg5'UTR 및 RBGpA)
- [0428] pJV7558을 Sal1 및 BamH1으로 절단하여 CMV 프로모터로부터 인트론 영역까지로 이루어진 삽입 단편을 분리하였다. pJV7496을 Sal1 및 BamH1으로 절단하여 벡터 단편을 제조하고, 이 벡터 단편으로 상기 삽입 단편을 결합시켜 pJV7579를 생성하였다.
- [0429] 실시예 9: HBsAg 벡터 패널에 의한 항원 발현의 시험관 내 분석
- [0430] 1일에, SCC15 (ATCC) 또는 B16 (기원 불명, ATCC에서 입수가 가능) 세포를 20 내지 40 % 컨플루언시로 6 웰 조직 배양 평판에 도달하고, 인큐베이터에서 밤새 성장시켰다. 숙주 세포를 ATCC에서 권장되는 배지에서 증식시켰다.
- [0431] 2일에, 트랜스펙션 반응을 수행하였다. 각각의 벡터를 시험하기 위해, 20 μ l의 Lipofectin[®] 시약 (Life Technologies Inc, Grand Island, NY)을 180 μ l의 Optimen[®] 배지 (Life Technologies, Grand Island, NY)에 가하고, 45분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 각각의 벡터를 시험하기 위해, 2 μ g의 벡터를 40분에 200 μ l의 Optimen[®]로 혼합하였다. 45분에, 벡터 및 Lipofectin[®] 용액을 함께 혼합하고, 추가의 10분 동안 실온에서 방치하였다. 이러한 최종 인큐베이션 동안, 도달된 숙주 세포를 인큐베이터로부터 제거하고, Optimen[®] 배지로 2회 세척하였다. 10분에, 1.6 ml의 Optimen[®]을 Lipofectin[®]/벡터 혼합물에 가하고, 1 ml의 생성 혼합물을 2개의 세포 웰 각각에 가하였다. 숙주 세포를 인큐베이터로 놓고, 5시간 동안 방해 없이 방치시킨 후 Lipofectin[®]/벡터 혼합물을 제거하고, 표준 세포 배지로 대체하였다.
- [0432] 배지를 교환한 지 18 내지 24시간 후, 50 내지 100 μ l의 세포 유지 배지를 조직 배양 평판으로부터 제거하고,

샘플을 AUSZYME® Monoclonal Diagnostic Kit (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)에 제공된 반응 용기에 위치시켜 항원 발현에 대해 분석하였다. 시험 샘플의 용적을 PBS로 200 μ l의 용적이 되게 하고, 50 μ l의 결합제 및 반응 비드를 각각의 샘플에 가하였다. 용기를 40 $^{\circ}$ C에서 80분 동안 인큐베이션한 후, 웰을 모든 액체 반응 성분이 없도록 세척하였다. 비드를 새로운 튜브에 옮긴 후, 300 μ l의 색상 전개 완충액을 가하였다. 30분에, 1 M 황산을 가해 색상 전개 반응을 정지시키고, 반응물의 흡광도를 490 nm에서 측정하였다. 도 1에 나타난 자료는 2번의 실험으로부터의 이중 웰의 평균 흡광 판독값이다.

[0433] 도 1에 나타난 바와 같이, 기본 벡터 (CMV 프로모터, 엑손 및 폴리아데닐화 영역)에 RIA, HBV 3'UTR 또는 이들 모두의 추가로 SCC15 세포에서 HBsAg의 발현이 증가하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, 기본 벡터 (CMV 프로모터, 엑손 및 폴리아데닐화 영역)에 치킨 케라틴 또는 치킨 심장 액틴 인트론의 추가로 SCC15 세포에서 HBsAg의 발현이 증가하였다.

[0434] 실시예 10: β -gal 벡터 패널에 의한 항원 발현의 시험관 내 분석

[0435] SSC-15 또는 B16 숙주 세포를 실시예 9에 기술된 바와 같이 트랜스펙션시켰다.

[0436] 배지를 교환한 지 18 내지 40시간 후, 배지 상층액을 제거하고, 세포를 PBS로 세척하였다. 세척물을 제거한 후, 세포를 5분 동안 500 μ l의 용해 완충액 (50 mM NaPO_4 , 0.1 % Triton X-100, pH 7)에서 인큐베이션하고 이어서 플라스틱 접시로부터 세포를 물리적으로 긁어내어 세포를 용해시켰다. 용해물을 2분 동안 미세원침 (microfuge)하여 세포 부스러기를 제거하고 10 내지 25 μ l의 처리된 용해물을 500 μ l의 반응 완충액 (80 μ g/ml o-니트로페닐 갈락토피라노사이드, 50 mM NaPO_4 , pH 7)에 가하고, 10 내지 20분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션하였다. 500 μ l의 1 M Na_2CO_3 을 가해 반응을 정지시키고, 405 nm에서 판독하였다. 자료를 기본 벡터에 대한 향상된 (인트론, HBVenh 또는 둘 모두를 포함) 벡터의 발현비로 나타내었다.

[0437] 기본 벡터 (CMV 프로모터, 엑손 및 폴리아데닐화 영역)에 RIA, HBV 3'UTR 또는 이들 모두의 추가로 두 세포주 모두에서 β -gal의 발현이 증가되었다. SCC15 세포에 대한 결과가 도 3에 나타나 있다. 기본 벡터 (CMV 프로모터, 엑손, HBV 3'UTR 및 폴리아데닐화 영역)에 치킨 케라틴 또는 치킨 심장 액틴 인트론의 추가로 두 세포주 모두에서 β -gal의 발현이 증가되었다. B16 세포에 대한 결과가 도 2에 나타나 있다.

[0438] 실시예 11: HSV gD 벡터 패널에 의한 항원 발현의 시험관 내 분석

[0439] SCC15 또는 B16 숙주 세포를 실시예 9에 기술된 바와 같이 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션한지 18시간 후, 평판을 15분 동안 얼음에 놓았다. 이어서, 각각의 웰을 2 ml의 PBS (Biowhittaker, Walkerville, MD)로 세척하였다. 세포를 PBS 중에 희석된 0.05 % 글루테르알데히드 (Polysciences Inc, Warrington, PA)로 고정시키고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 모든 후속한 인큐베이션은 실온에서 1시간 동안 지속하고, 각각의 인큐베이션 사이의 세척은 상기한 바와 같았다. 평판을 PBS 중의 2 ml의 5 % 분유 (Bio Rad Laboratories, Melville, NY)로 차단하였다. 2 % 분유/PBS/0.05 % Tween-20 (Sigma, St. Louis, MO) 중의 항-gD 모노클로날 (ABI, Columbia, MD)의 1:1000 희석물 1 ml과 함께 인큐베이션하고, 이어서 PBS/0.1 % Tween-20 중의 염소 항-마우스 HRP (KPL, Gaithersburg, MD)의 1:2500 희석물 1 ml과 인큐베이션하였다. 1 ml의 TMB 마이크로웰 기질 (BioFX, Owings Mills, MD)을 사용해 색상을 전개시켰다. 반응을 1 M H_2SO_4 로 정지시키고, 액체를 플라스틱 큐벳으로 옮긴 후, 광학 밀도를 450nm에서 판독하였다. 자료를 기본 벡터에 대한 향상된 (인트론, HBVehh 또는 둘 모두를 포함) 벡터의 발현비로 나타내었다.

[0440] 기본 벡터 (CMV 프로모터, 엑손 및 폴리아데닐화 영역)에 HBV 3'UTR의 존재 또는 부재 하에 RIA의 추가로 두 세포주 모두에서 HSV gD의 발현이 증가되었다. SCC15 세포에 대한 결과가 도 4에 나타나 있다.

[0441] 실시예 12: SEAP 벡터 패널에 의한 항원 발현의 시험관 내 분석

[0442] SCC15 또는 B16 숙주 세포를 실시예 9에 기술된 바와 같이 트랜스펙션하였다. 배지를 교환한지 18 내지 40시간 후, 배지 상층액을 제거하고, 30분 동안 70 $^{\circ}$ C에서 가열하였다. 10 내지 25 μ l의 열-불활성화된 상층액을 1/10배 용적의 100 mM l-호모아르기닌과 함께 인큐베이션하였다. 500 μ l의 알칼리 포스포타제 반응 완충액

(cat # 172-1063, Bio-Rad, 지시에 따라 제조됨)을 용해물에 가하고, 10 내지 20분 동안 37 °C에서 인큐베이션 하였다. 500 μ l의 1 M NaOH을 가해 반응을 정지시키고, 405 nm에서 판독하였다. 자료를 기본 벡터에 대한 향상된 (인트론, HBVehh 또는 둘 모두를 포함) 벡터의 발현비 또는 사람 TPA 시그널 펩티드 벡터에 대한 실험 시그널 펩티드의 발현비로 나타내었다.

[0443] 도 5에 나타난 바와 같이, 기본 벡터 (CMV 프로모터, 엑손 및 폴리아데닐화 영역)에 RIA, HBV 3'UTR 또는 이들 모두의 추가로 B16 세포에서 SEAP의 발현이 증가되었다. 뜻밖에도, 기본 벡터 (CMV 프로모터, 엑손 및 폴리아데닐화 영역)에 HBV 3'UTR의 추가 만으로 SCC15 세포에서 SEAP의 발현이 증가되었다.

[0444] 소 아프로티닌, 치킨 리소자임 또는 담배 엑스텐신으로부터의 시그널 펩티드의 성숙한 SEAP의 N-말단에서의 추가로 SEAP가 2개의 세포주 모두의 세포 배지 상층액으로 효율적으로 분비되었다. B16 세포에 대한 결과가 도 6에 나타나 있다.

[0445] 실시예 13: 사람 IgG Fc 단편 시그널 펩티드 패널에 의한 항원 발현의 시험관 내 분석

[0446] SCC15 또는 B16 숙주 세포를 실시예 9에서와 같이 트랜스펙션하였다. 배지 상층액을 배지 교환 18 내지 40 시간 후 제거하였다.

[0447] ELISA 평판 (Costar)을 4 °C에서 웰 당 100 μ l의 염소 항-사람 IgG (Sigma #13382, 카보네이트 코팅 완충액 중에 1/1000배 희석)와 함께 인큐베이션하였다. 모든 후속한 인큐베이션은 각각의 인큐베이션 사이에 세척 (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 % Brij-35, pH8.0)과 함께 실온에서 1시간 동안 지속하였다. 이어서, 웰을 PBS 중의 100 μ l의 5 % 분유로 차단시킨 후, 희석 완충액 (2 % 분유, PBS, 0.05 % Tween-20) 중의 일련의 희석된 배지 상층액과 함께 인큐베이션하였다. 이어서, 웰 당 100 μ l의 염소 항-사람 IgG/HRP (Sigma #A6029, 희석 완충액 중 1/5000배 희석)와 함께 인큐베이션한 후, 100 μ l의 TMB 마이크로웰 기질을 사용하여 색상을 전개시켰다. 100 μ l의 1 M H₂SO₄로 반응을 정지시키고, 450 nm에서 판독하였다. 자료를 사람 TPA 시그널 펩티드 벡터에 대한 실험 시그널 펩티드의 발현비로 나타내었다.

[0448] 소 아프로티닌, 치킨 리소자임 또는 담배 엑스텐신으로부터의 시그널 펩티드의 사람 Fc 단편에서의 추가로 hFc가 2개의 세포주 모두의 세포 배지 상층액으로 효율적으로 분비되었다. B16 세포에 대한 결과가 도 6에 나타나 있다.

[0449] 실시예 14: 마우스의 면역화를 위한 HBsAg, HSVgD 및 Flu-M2 플라스미드 발현 벡터의 이용

[0450] a. 면역화를 위한 카트리지의 제조

[0451] 시험될 각각의 플라스미드에 대해, 25 mg의 2 마이크론 금 분말을 미세원침 튜브로 무게를 더하고, 250 μ l 분취량의 50 mM 스페르미딘 (Aldrich Chemical, Inc, Milwaukee, WI)을 가한 후, 튜브를 와동시키고, 간단히 초음파 처리하였다. 금을 미세원침하고, 스페르미딘을 새로운 100 μ l 분취물로 대체하였다. 금을 와동시켜 재현탁시키고, 25 μ g의 DNA를 튜브에 가한 후, 혼합하였다. 튜브를 가볍게 와동시키면서, 100 μ l의 10 % CaCl₂ (Fujisawa USA, Inc, Deerfield, IL)을 가해 DNA를 금 비드에 침전시켰다. 침전 반응을 벤치탑에서 10분 동안 진행한 후, 간단히 미세원침 회전으로 수집하고, 순수 에탄올 (Spectrum Quality Products, Inc, Gardena, CA)로 3회 세척하여 과량의 침전 시약을 제거하였다. 세척된 금/DNA 컴플렉스를 순수 에탄올 중의 3.6 ml의 0.05 mg/ml 폴리비닐피롤리돈 (360KD, Spectrum Quality Products, Inc, Gardena, CA)에 재현탁시켰다. 이어서, 금/DNA 컴플렉스로 Tefzela 튜브의 내측을 코팅한 튜브 터너 (PowderJect Vaccines)에 위치된 Tefzela 튜브 (McMaster-Carr, Chicago, IL)에 상기 슬러리를 주입하였다. 튜브 터닝 절차가 완결된 후, 마우스에 전달하기 위해 XR1 디바이스 (PowderJect Vaccines)로 적재되는 0.5" "쇼트 (shot)"의 백신으로 튜브를 절단하였다.

[0452] b. 백신처리 절차

[0453] 4 내지 6주령의 마우스를 Ketaset (Fort Dodge) 및 Rompuna (Bayer)의 혼합물로 마취하였다. 복부를 한쌍의 전기 클리퍼로 털을 제거하고, 2개의 비-중점 "쇼트"의 백신을 털을 제거한 영역에 XR1 디바이스 (450 psi)를 통해 전달하였다. 동물을 우리로 되돌려보내고, 백신처리 6주 후에 채혈하였다. HBsAg 발현 벡터를 평가하는데 Balb/c 마우스를 사용하였으며, HSV-gD 및 Flu M2 발현 벡터를 평가하는데 Swiss Webster 마우스를 사용하였

다.

[0454] 항-HBsAg 항체에 대한 혈청의 분석

[0455] 백신처리 6주에 혈액 샘플을 백신처리된 동물로부터 수거하였다. 이들 샘플로부터 분리된 혈청을 AUSAB® EIA 진단 키트 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)가 공급되는 반응 용기의 웰에 가하였다. 첨가되는 혈청의 용적은 샘플의 항체 역가에 따르며, 샘플을 샘플 희석 완충액으로 희석하여 정량 패널로 수득가능한 값의 범위에 이르게 하였다. AUSAB® Quantification Panel (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)의 각각의 바이알로부터 200 μ l를 반응 용기의 웰에 가하였다. 각각의 웰에 비드를 가한 후, 용기를 밀폐시키고, 40 °C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 웰을 모든 액체 반응 성분에 대해 세척하였다. 각각의 세척된 웰에 200 μ l의 결합 혼합물을 가한 후, 용기를 밀폐시키고, 40 °C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 웰을 모든 액체 반응 성분에 대해 세척하였다. 비드를 새로운 튜브로 옮긴 후, 300 μ l의 색상 전개 완충액을 가하였다. 30분 후, 색상 전개 반응을 1 M 황산을 가해 정지시키고, 반응물의 흡광도를 Quantum II® 분광광도계 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)로 490 nm에서 측정하였다. 분광광도계는 샘플의 흡광도를 정량 패널로 생성된 표준 곡선과 비교하여 샘플의 항체 수준을 계산한다. 이어서, 이들 항체 수준을 희석 지수에 대해 교정한다. 도 7에 나타난 자료는 특정 벡터로 백신처리된 모든 동물에 대한 기하학적 평균 역가이다.

[0456] 항-Flu M2 항원 항체에 대한 혈청의 분석

[0457] 96-웰 Costar 매질-결합 ELISA 평판 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)을 PBS (Biowhittaker, Walkerville, MD) 중 1 μ g/ml 농도의 합성 Flu M2 펩티드 (QCB/ Biosource, Hopkinton, MA)로 코팅하였다. 평판을 10 mM Tris (Sigma, St. Louis, MO)/150 mM NaCl (Fisher Scientific)/0.1 % Brij-35 (Sigma)로 3회 세척하고, PBS 중의 5 % 분유 (Bio Rad Laboratories, Melville, NY)로 1시간 동안 차단하였다. 모든 후속한 인큐베이션은 1시간 동안 실온에서 수행하였으며, 각각의 인큐베이션 사이의 세척은 상기한 바와 같다. 샘플 마우스 혈청, 표준물 (고역가, 항-M2 마우스 혈청) 및 음성 대조군 (항-HBsAg 마우스 혈청)을 2 % 분유/PBS/0.05 % Tween-20 (Sigma)중에 희석하고, ELISA 평판에서 인큐베이션하였다. 2 % 분유/PBS/0.05 % Tween-20에 1:8000으로 희석된 염소 항-마우스 IgG (H+L) 바이오틴 결합된 항체 (Southern Biotechnology Associate, Birmingham, AL)와 인큐베이션하고, PBS/0.1 % Tween-20에 1:8000으로 희석된 스트렙타비딘-서양고추냉이 퍼옥시다제 결합체 (Southern Biotechnology)와 인큐베이션하였다. TMB 기질 (BioFX, Owings Mills, MD)을 사용하여 색상을 전개시켰다. 1 M H₂SO₄로 반응을 정지시키고, 평판을 Emax 정밀 미세평판 판독기 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)로 450 nm에서 판독하였다. SoftMax Pro 4.1 소프트웨어 (Molecular Devices)를 사용하여 4개-변수 분석을 이용한 중점 역가를 계산하였다. 역가를 미리-결정된 역가를 갖는 표준 혈청에 대해 표준화하여 검정-대-검정 및 평판-대-평판의 차이를 최소화하였다. 그 결과가 도 7에 나타나 있다.

[0458] 항-HSV gD 항원 항체에 대한 혈청의 분석

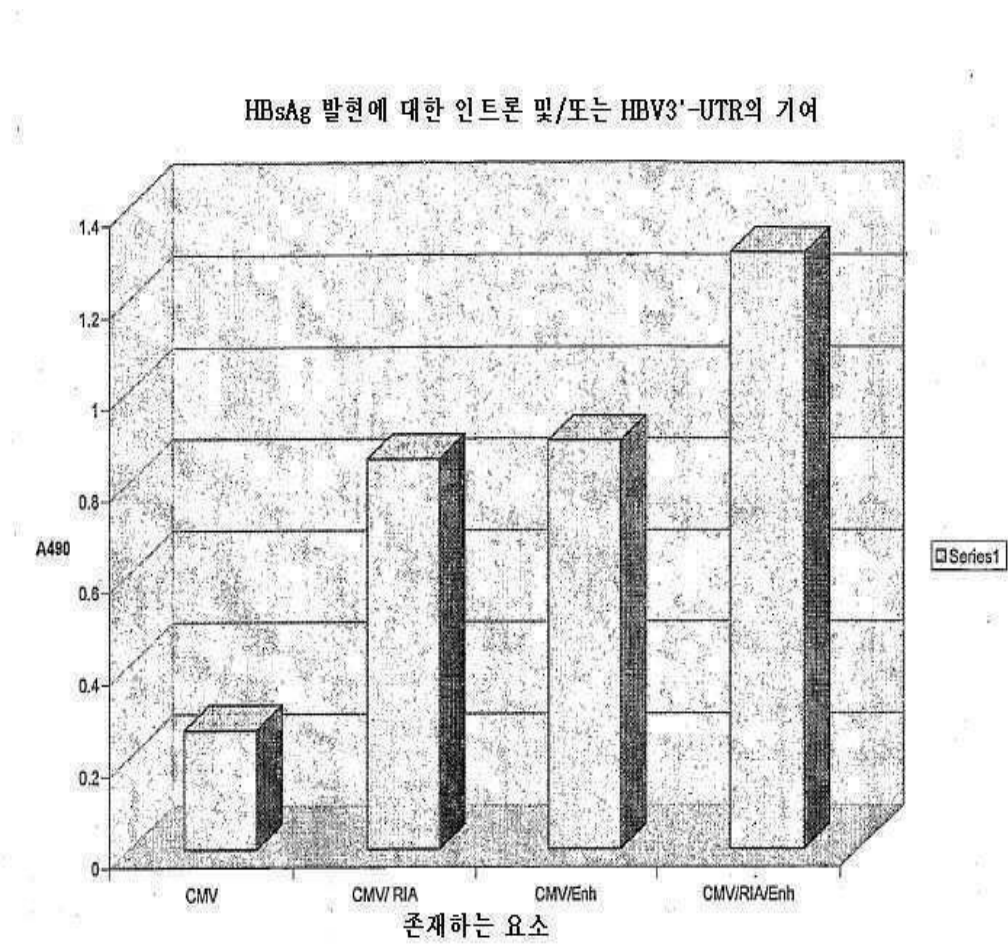
[0459] 96-웰 Costar 매질-결합 ELISA 평판 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)을 PBS (Biowhittaker, Walkerville, MD) 중 1 μ g/ml 농도의 HSV gD (Viral Therapeutics, Ithaca, NY) 단백질로 코팅하고 4 °C에서 밤새 인큐베이션하였다. 평판을 10 mM Tris (Sigma, St. Louis, MO)/150 mM NaCl (Fisher Scientific)/0.1 % Brij-35 (Sigma)로 3회 세척하고, PBS 중의 5 % 분유 (Bio Rad Laboratories, Melville, NY)로 1시간 동안 차단하였다. 모든 후속한 인큐베이션은 1시간 동안 실온에서 수행하였으며, 각각의 인큐베이션 사이의 세척은 상기한 바와 같다. 샘플 마우스 혈청, 표준물 (고역가, 항-gD 마우스 혈청) 및 음성 대조군 (항-HBsAg 마우스 혈청)을 2 % 분유/PBS/0.05 % Tween-20 (Sigma)중에 희석하고, ELISA 평판에서 인큐베이션하였다. 2 % 분유/PBS/0.05 % Tween-20에 1:8000으로 희석된 염소 항-마우스 IgG (H+L) 바이오틴 결합된 항체 (Southern Biotechnology Associate, Birmingham, AL)와 인큐베이션하고, PBS/0.1 % Tween-20에 1:8000으로 희석된 스트렙타비딘-서양고추냉이 퍼옥시다제 결합체 (Southern Biotechnology)와 인큐베이션하였다. TMB 기질 (BioFX, Owings Mills, MD)을 사용하여 색상을 전개시켰다. 1 M H₂SO₄로 반응을 정지시키고, 평판을 Emax 정밀 미세평판 판독기 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)로 450 nm에서 판독하였다. SoftMax Pro 4.1 소프트웨어

(Molecular Devices)를 사용하여 4개-변수 분석을 이용한 중점 역가를 계산하였다. 역가를 미리-결정된 역가를 갖는 표준 혈청에 대해 표준화하여 검정-대-검정 및 평판-대-평판의 차이를 최소화하였다. 그 결과가 도 7에 나타나 있다.

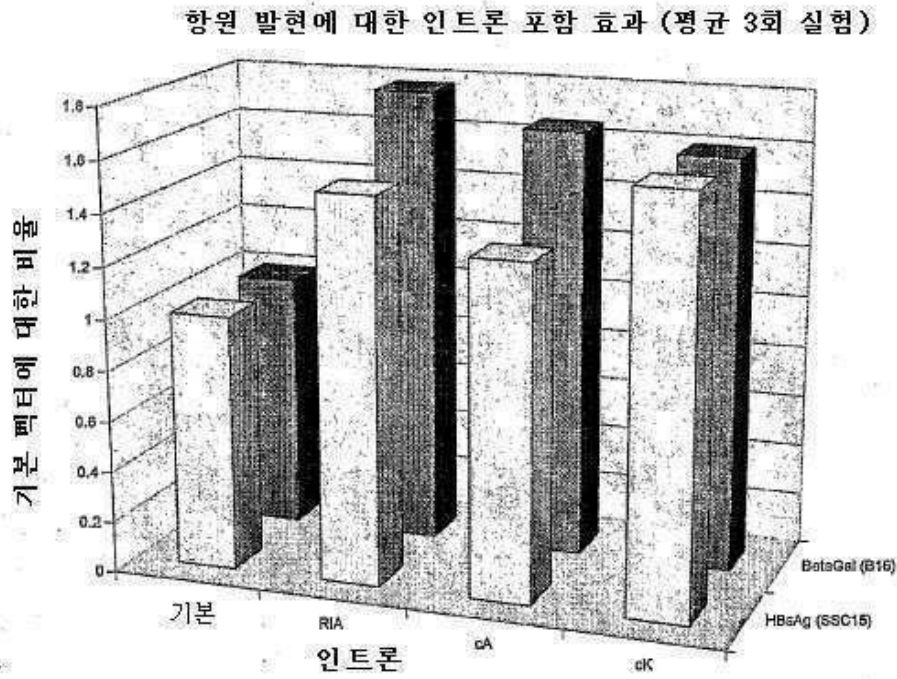
[0460] 따라서, 신규 핵산 구조물, 이들 구조물을 포함하는 조성물, 이들 구조물을 사용한 핵산 번역화 기술이 기술되었다. 본 발명의 바람직한 양태가 보다 상세히 기술되었지만, 첨부된 청구범위에 의해 정의되는 바와 같은 본 발명의 목적 및 범위를 벗어나지 않으면서 자명한 변형이 가해질 수 있다고 믿어진다.

도면

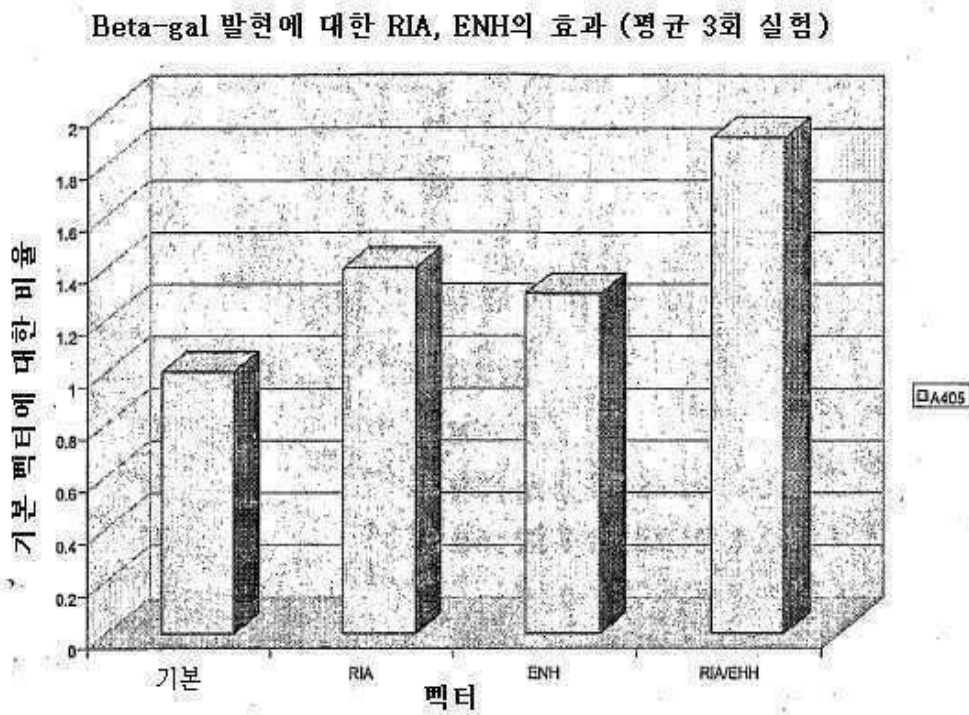
도면1



도면2

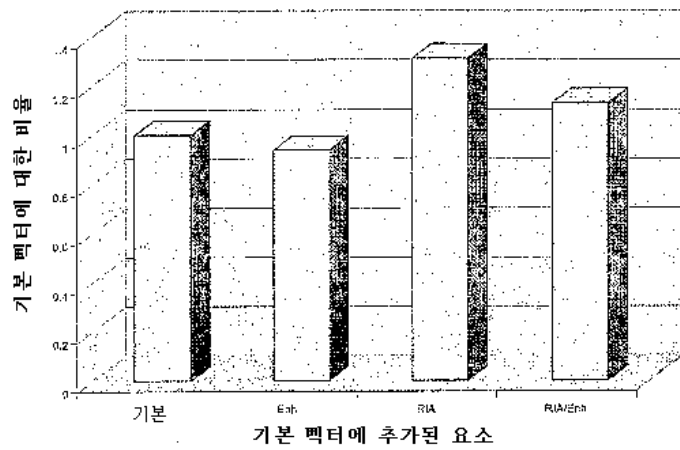


도면3



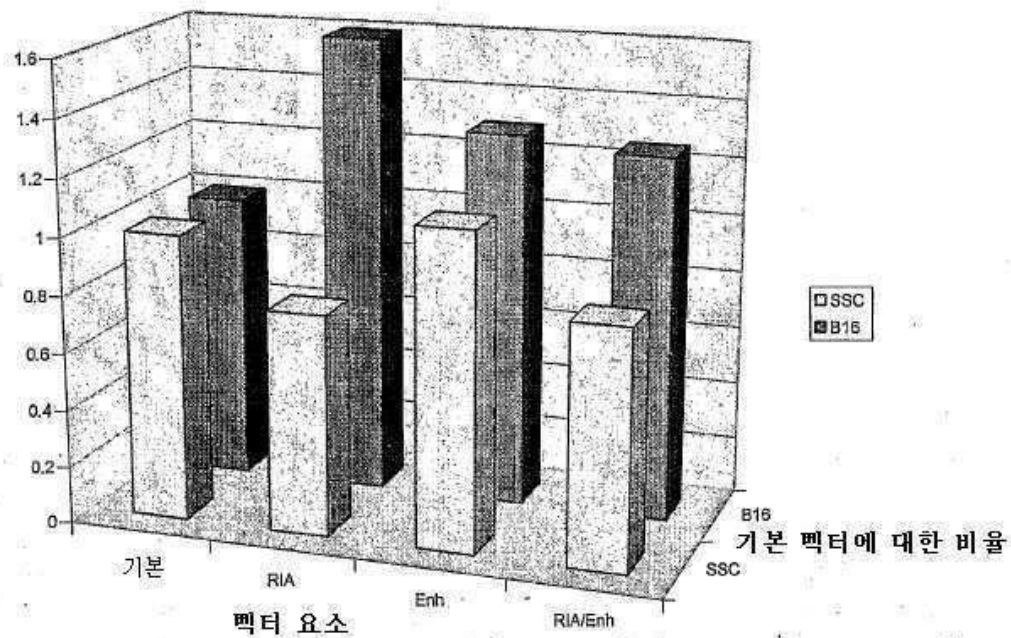
도면4

HSV gD의 발현에 대한 RIA 인트론 및 HBV Enh 포함의 효과 (평균 3회 실험)



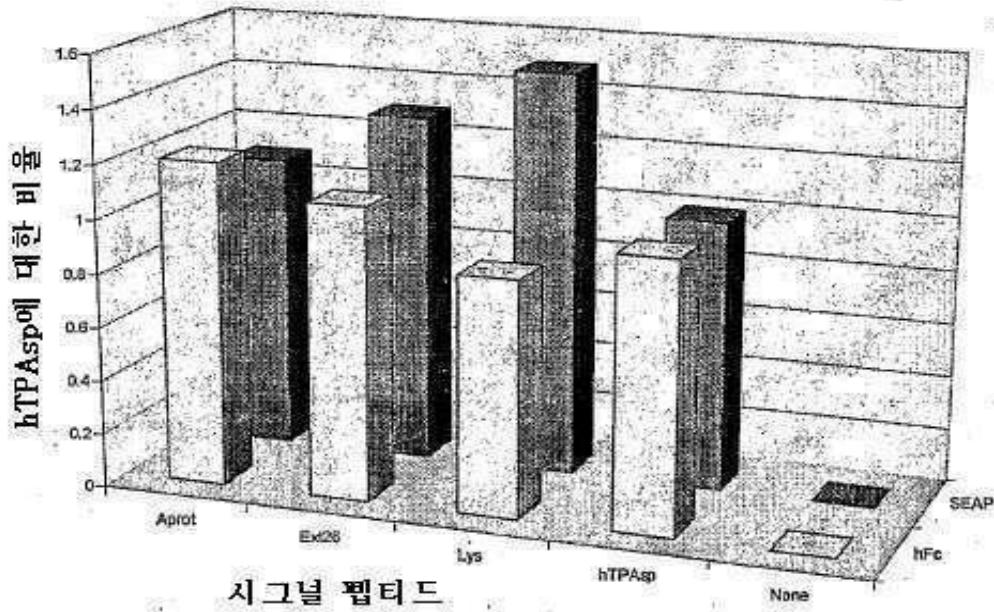
도면5

SEAP 발현에 대한 RIA, ENH의 효과 (2개 라인, 라인당 3회 반복)

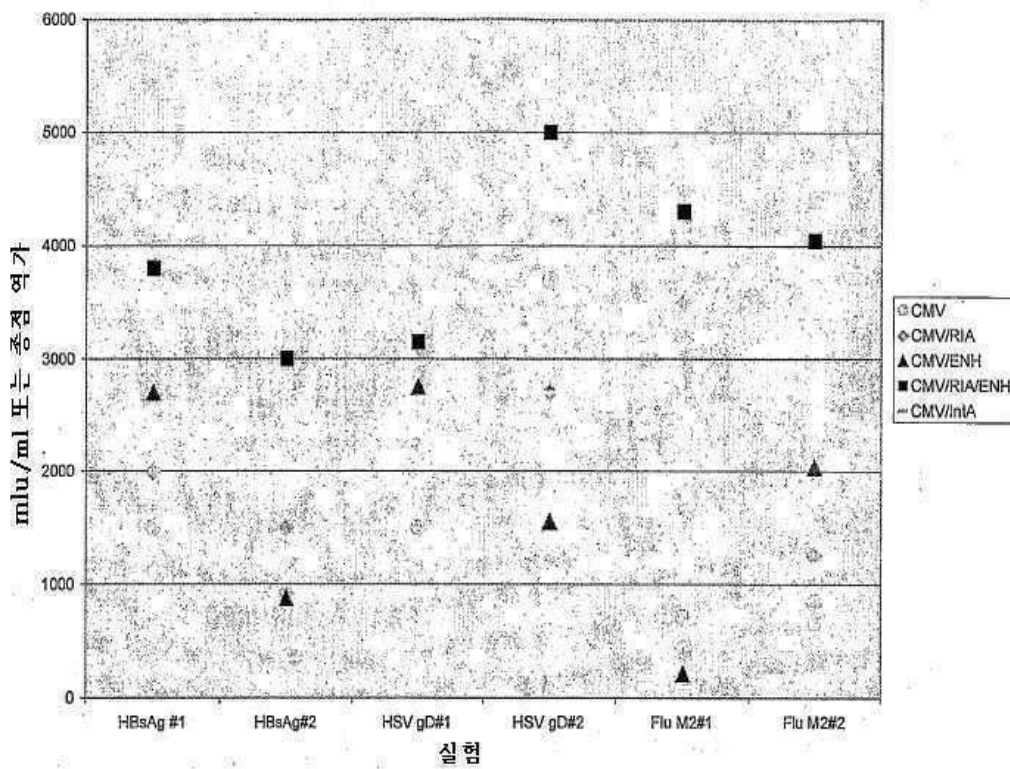


도면6

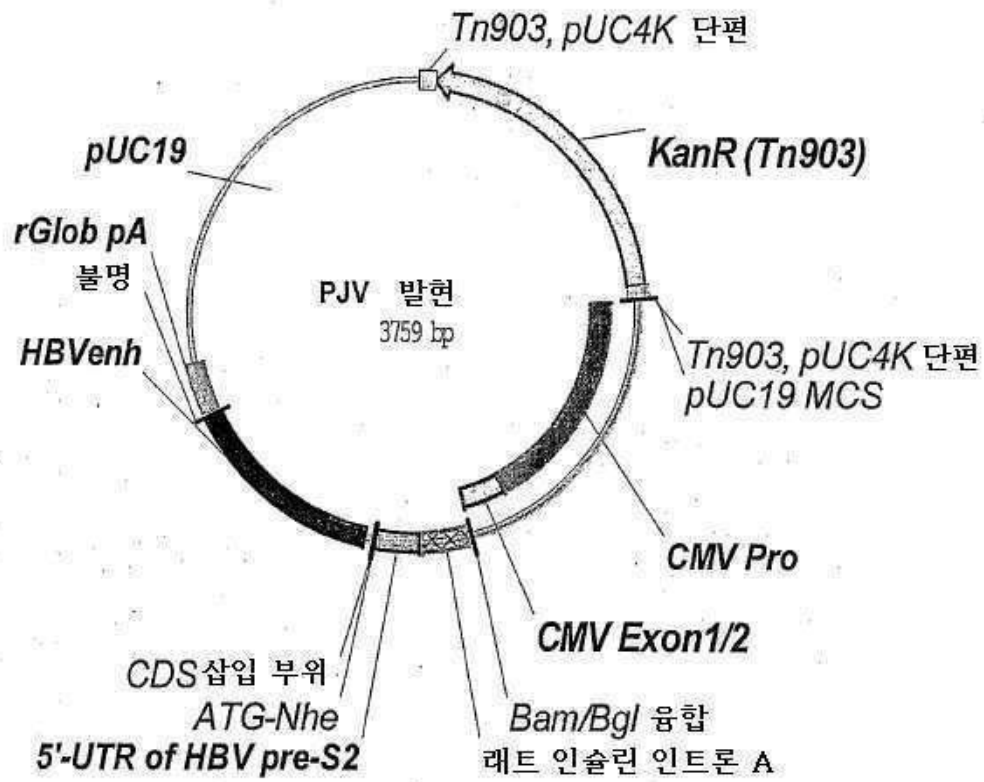
SEAP 또는 hFc 단원을 분비하는 이중 시그널 펩티드의 능력



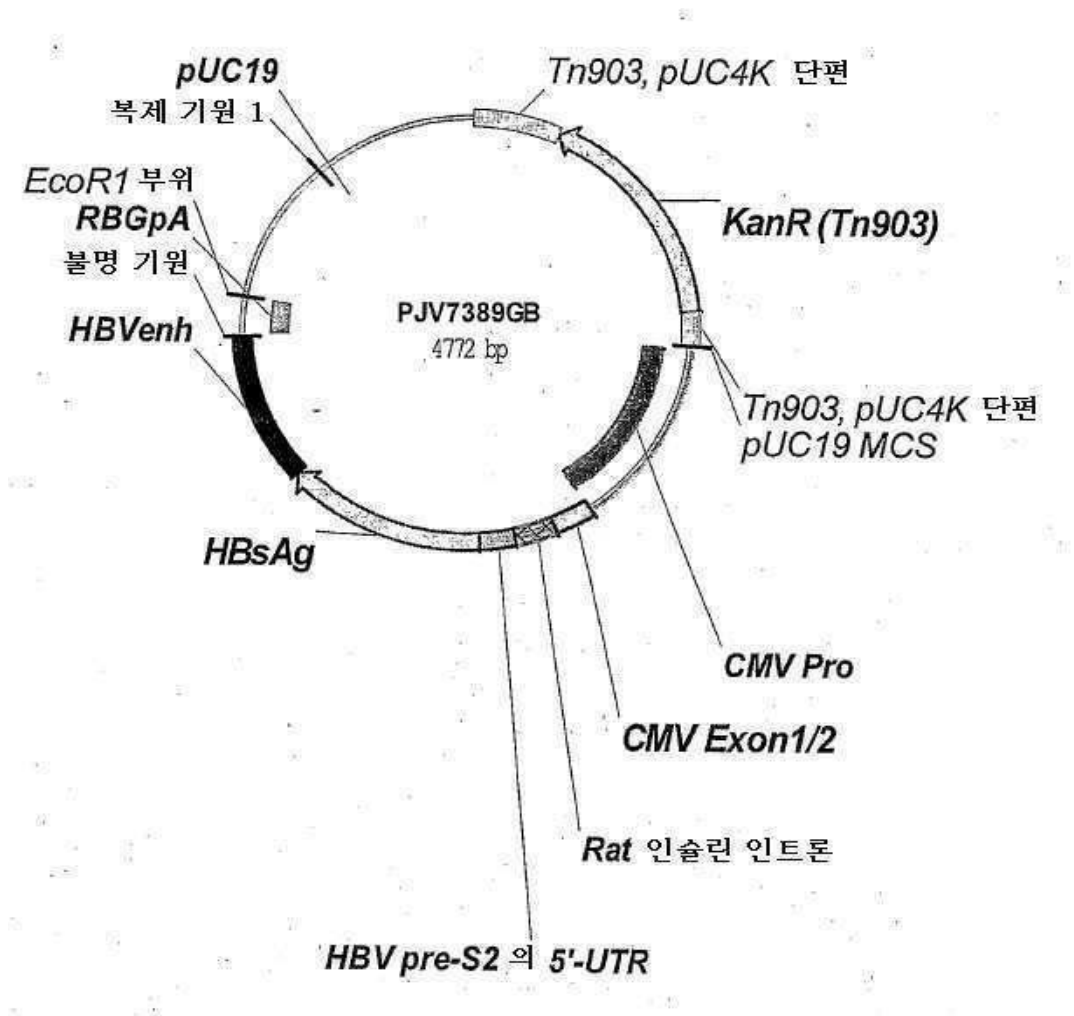
도면7



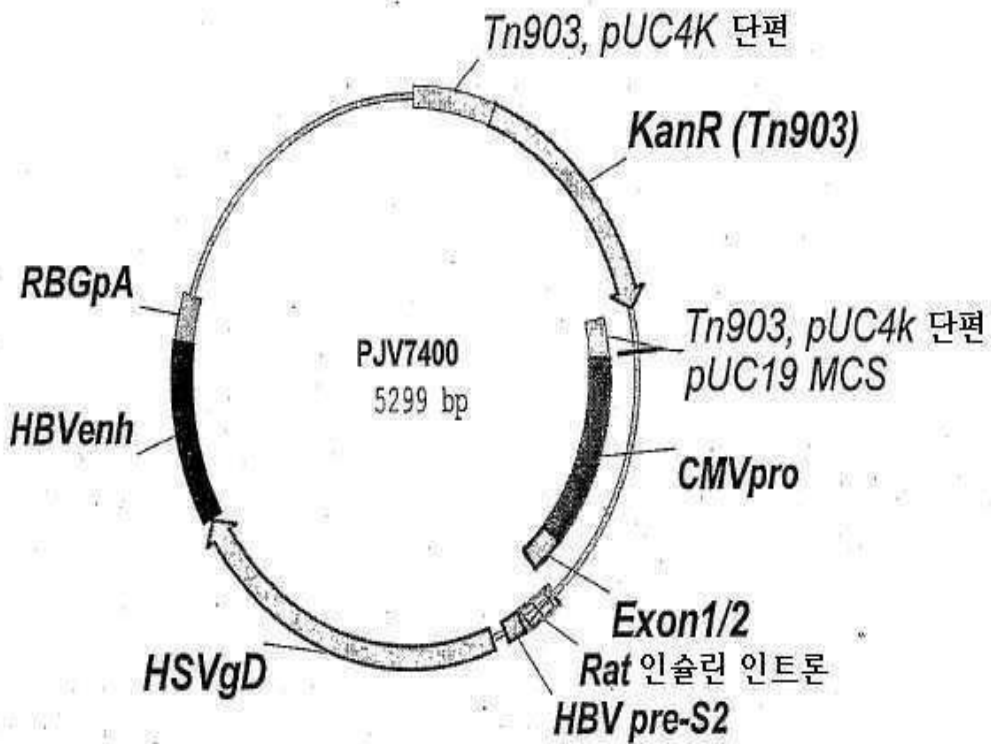
도면8



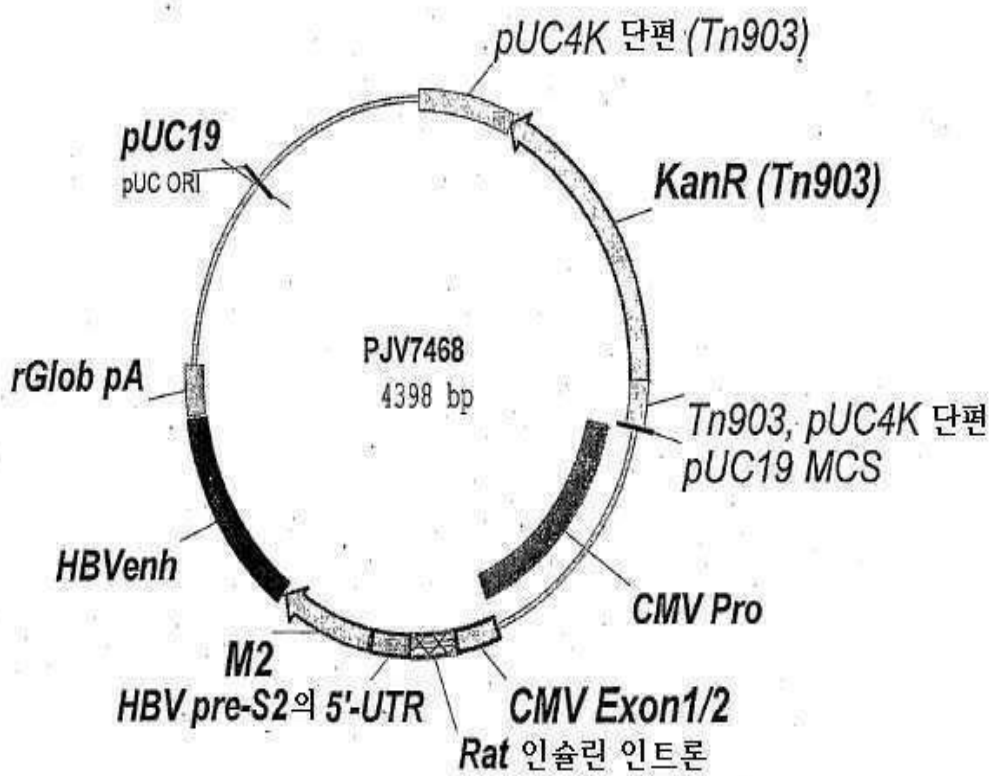
도면9



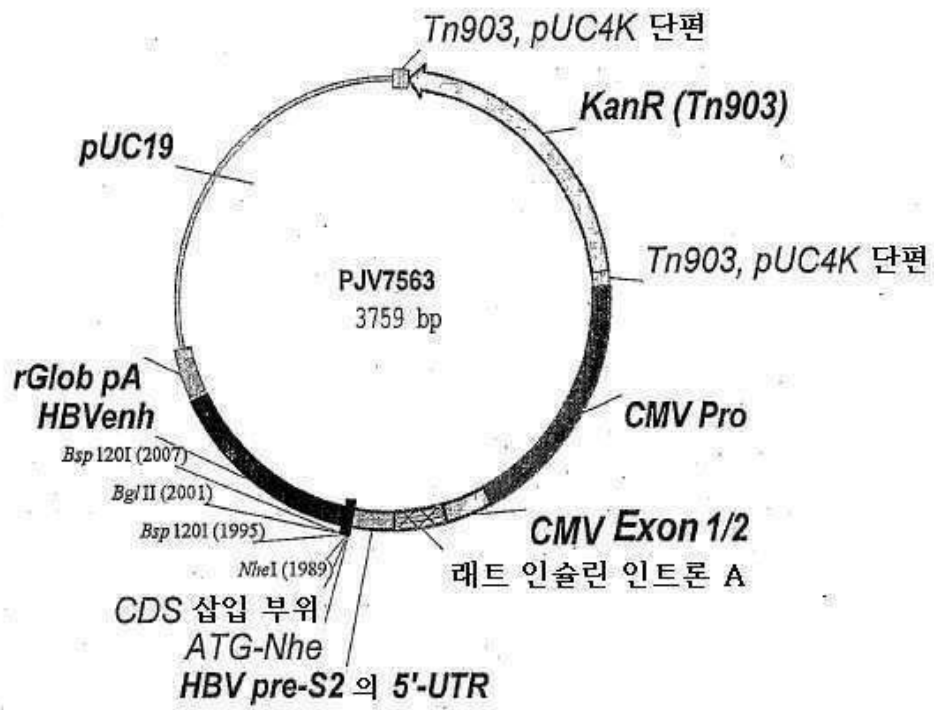
도면10



도면11



도면12



도면13

ggcgtaatgctctgccagtgttacaaccaattaaccaattctgattagaaaaactatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatat
caggattatcaataccatattttgaaaaagccgtttctglaatgaaggagaaaactaccgaggcagttccataggatggcaagatcc
tggtatcggctcgcgattccgactcgtccaacatcaatacaactattttccctcgtcaaaaataagggtatcaagtgaataatca
ccatgagtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaaagcttatgcattttccagacttggtcaacaggccagccattacgctcgtc
atcaaaatcactcgcataaccaaacggtattcattcgtgattgcgctgagcgagacgaaatacgcgacgctgttataaaaggacaa
ttacaacagggaatcgaatgcaaccggcgaggaacactgccagcgcatcaacaatatttcacatgagatgattcttctaata
cctggaatgctgtttccggggatcgagtggtgagtaaccatgcatcatcaggagtacggataaaatgcttgatggcgggaagag
gcataaattccgtcagccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgtttcagaaacaactctgg
cgcatcgggcttcccatacaatcgatagattgtcgacactgattgcccgacattatcgcgagcccaattatacccatataaatcagcat
ccatgttggaatttaacgcggcctcgcagcaagacgtttccggtgaatatggctcataacaccccttgattactgtttatgtaagcaga
caggtcgacaataattggctattggccattgcatacgttgatctatatacataatgtacatttatattggctcatgtccaatatgaccgcca
tggtgacattgattattgactagttattatagtaataacacacggggcctcattggtcatagcccatatattggagttccgcgttacataactta
cgttaaatggcccgcctggctgaccgccaacgaccccgccacttgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaata
gggactttccattgacgtcaatgggtggagattttacggttaaacgtccacttggcagtcacatcaagtgtatcatatgccaagtcaggcc
ccctattgacgtcaatgacggttaaatggcccgcctggcattatgccagtcacatgaccttacgggactttcctacttggcagtcactct
acgtattagtcacgctattaccatggtgatgcggttttggcagtcaccaatggcggtgtagcgggttgactcacggggatttcca
agttccaccccaattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgctgtaataaccccgcccggt
gacgcaaatggcggttagcggtgtacgggtggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatgcctggagacgc
catccacgctgttttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctccgcggccgggaacgggtcattggaacgcggattc
ccggtgccaaagagtgtactaccgtccggaicacagcaagcaggtatgtactctcagggtgggctggcttcccagtcaggaatccagag
cagggtattgagggacgctgtgggctcttcttcatgtacttttgcctcaaccctgactatctccaggtcaggaatccagag
tcagggtctgtattttctgctgggtccagttcagggaacagtaaacctgctccgaatattgcctctcacatctcgtcaatctccg
cgaggactggggaccctgtgacgaacatggctagcgggcccagatcgtggccctaaacaaaacaaaagatggggttattccctaa
actcatgggttacgtaattggaagttgggggacattgccacaagatcatattgtacaaaagatcaaacactgttttagaaaacttcctg
taaacaggcctattgattgaaagtatgtcaaaaggattgtgggtcttttgggctttgctgctccatttacacaatgtggatatcctgcctta
atgcctttgtatgcatgtatatacaagctaacacaggctttcactttctcgccaacttacaaggccttttctaagtaaacagtcacatgaaccttta
ccccgttgcctggcaacggcctggctgtgccaagtgtttgctgacgcaacccccactggctggggcttgccataggccatcagc
gcatcgtggaacctttgtggctcctctgccgatccatactgcggaactcctagccgctgttttgcctgcagccggtctggagcaaa
gtcataggaactgacaattctgtcgtcctctgcggaaatatacatcgtttcgtatcagctatgatcttttcccttgccaaaaattatg
gggacatcatgaagccccttgagcatctgacttctgctataaaggaaatttttatttgcataatgtgtgttggaatttttgtgtctct
cactcggaaaggaattctgcattaatgaatggccaacgcgcggggagagggcggtttgcgtattggcgctcttccgcttctcgtc
actgactcgtcgcgtcggctgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaggcggtatatacgggtatccacagaatcagg
ggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccggttgcgtggcgtttttcca
taggctcggccccctgacgagcatcacaataacgacgctcaagtcagaggtggcgaacccgacaggactataaagatacca
ggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgtcctcgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgcttttcccttccgggaa
gctggcgcttttctcatagctcacgctgtggtatctcagttcgggttaggtcgttcgtcctcaagctgggctgtgtgcacgaaccccc
cgttcagcccagaccgtcgccttctcgtgtaactatcgtcttgagtcacacccggtaagacacgacttatcggcactggcagcagc
cactggttaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtgtggcctaactacggctacactagaa
gaacagtgattgtatctgcgtctgtgtaagccagttaccttcgggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaacaacaccaccgc
tggtagcgggtgtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccittgatcttttctacggggtct
gacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttggctatgagattatcaaaaaggatctcacctagatccttttaattaaaaa
tgaagtgttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacctgtgtctgacagttaccaatgcttaacagtgagggcacctatctcagcgatct
gtctatttcgttcatccatagttgcctgactc

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> POWDERJECT VACCINES, INC. et al
- <120> NUCLEIC ACID CONSTRUCTS
- <130> N.90070A GCW/DP
- <140> PCT/GB2004/004279
- <141> 2004-10-11
- <150> US 60/509,936
- <151> 2003-10-10

<160> 53

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 685

<212> DNA

<213> Human cytomegalovirus

<400> 1

aatattggct attggccatt gcatacgttg tatctatata ataatatgta ctttatatt	60
ggctcatgtc caatatgacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa	120
tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg	180
gtaaatggcc cgcttggtcg accgccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg	240
tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta	300
cggtaaaactg ccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtcc gccccctatt	360
gacgtcaatg acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac ctacggggac	420
tttctactt ggcatgacat ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt	480
tggcagtaca ccaatgggcg tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtctccac	540
cccattgacg tcaatgggag ttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaatgt	600
cgtaataacc ccgccccgtt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat	660
ataagcagag ctcgtttagt gaacc	685

<210> 2

<211> 131

<212> DNA

<213> Human cytomegalovirus

<400> 2

gtcagatcgc ctggagacgc catccacgt gttttgacct ccatagaaga caccgggacc	60
gatccagcct ccgcggccgg gaacggtgca ttggaacgcg gattccccgt gccaagagtg	120
actcacgcgc c	131

<210> 3

<211> 135

<212> DNA

<213> Rattus rattus

<400> 3

atcagcaagc aggtatgtac tctccagggt gggcctggct tccccagtca agactccagg 60
gatttgaggg acgtgtggg ctcttctctt acatgtacct ttgtctagcc tcaacctga 120
ctatcttcca ggtca 135

<210> 4

<211> 955

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Chimeric promoter sequence

<400> 4

aatattggct attggccatt gcatacgttg tatctatata ataatatgta ctttatatt 60
ggctcatgtc caatatgacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaaatagtaa 120
tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg 180

glaaatggcc cgcttggtg accgccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg 240
tatgttccca tagtaacgcc aatagggaact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta 300
cggtaaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtcc gccccctatt 360
gacgtcaatg acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttacgggac 420
tttctactt ggacgtacat ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt 480
tggcagtaca ccaatgggcg tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtctccac 540
cccattgacg tcaatgggag ttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt 600

cgtaataacc ccgccccgtt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacgggt ggaggtctat 660
ataagcagag ctggtttagt gaaccgtcag atcgctgga gacgcatcc acgtgtttt 720
gacctccata gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg gccgggaacg gtgcattgga 780
acgggattc cccgtgcca gagtgactca ccgtccgat ctacagcaagc aggtatgtac 840
tctccagggt gggcctggct tccccagtca agactccagg gatttgaggg acgtgtggg 900
ctcttctctt acatgtacct ttgtctgcc tcaacctga ctatcttcca ggtca 955

<210> 5

<211> 121

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 5

cagagtcagg ggtctgtatt ttctgtctgg tggctccagt tcaggaacag taaacctgc 60
tccgaatatt gcctctcaca tctcgtcaat ctccgcgagg actggggacc ctgtgacgaa 120

c	121
<210> 6	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> Herpes simplex virus	
<400> 6	
ataagctgca ttgcgaacca ctagtcgccg tttttcgtgt gcatcgcgta tcacggc	57
<210> 7	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> Hepatitis B virus	
<400> 7	
ctttgtacta ggaggctgta ggcataaatt ggtctgttca ccagcacc	48
<210> 8	
<211> 533	
<212> DNA	
<213> Hepatitis B virus	
<400> 8	
taacaaaaca aaaagatggg gttattccct aaacttcatg ggttacgtaa ttggaagttg	60
ggggacattg ccacaagatc atattgtaca aaagatcaaa cactgtttta gaaaacttcc	120
tgtaaacagg cctattgatt ggaaagtatg tcaaaggatt gtgggtcttt tgggctttgc	180
tgtccattt acacaatgtg gatatcctgc cttaatgcct ttgtatgcat gtatacaagc	240
taaacaggct ttcactttct cgccaactta caaggccttt ctaagtaaac agtacatgaa	300
cctttacccc gttgctcggc aacggcctgg tctgtgcca gtgtttgctg acgcaacccc	360
cactggctgg ggcttggcca taggcatca gcgcatcgt ggaacctttg tggtcctct	420
gccgatccat actgcggaac tcctagccgc ttgttttgct cgcagccggt ctggagcaaa	480
gctcatagga actgacaatt ctgtcgtcct ctgcggaaa tatacatcgt ttc	533
<210> 9	
<211> 158	
<212> DNA	
<213> Simian cytomegalovirus	
<400> 9	
gtcagacaga cagacagtta tatgggctgg tccctataac tctgccattg taaccccata	60

tagccagaca gttagcattg catctattga tgaagtacta atgtattgta accccccta 120
tgccattgtc taactgtact aatgtatgat attatacc 158

<210> 10

<211> 131

<212> DNA

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 10

gatctttttc cctctgcca aaattatggg gacatcatga agccccttga gcatctgact 60
tctggctaataaaggaaatttattttcattgcaatagtgtgttggaattttttgtgtctc 120
tcactcggaa g 131

<210> 11

<211> 204

<212> DNA

<213> *Simian cytomegalovirus*

<400> 11

atatactac tatgtttatac tctatgatat acaatatata ctcatgaaca ctatgtactt 60
gggtgtatgac tcattattgt ctgggacttg gttgggactt ggttggttgg gaagaatgtt 120

gtgcctgtac ttgtgctgtg ctgtggatct caataaatgt gactatgttc aaaacactaa 180
gtgccccgt gtcttcttta acta 204

<210> 12

<211> 163

<212> DNA

<213> *Herpes simplex virus 2*

<400> 12

gaagacgagc tctaaggag gggaggggag ctgggcttgt gtataaataa aaagacaccg 60
atgttcaaaa atacacatga cttctggat tgtttgcct tggtttttat ttgggggggg 120
gggggcgtgt gactagaaaa acaaatgcag acatgtgcta acg 163

<210> 13

<211> 191

<212> DNA

<213> *Human papillomavirus type 16*

<400> 13


```

aattgttaca tataattgtt gtataccata acttactatt ttttcttttt tattttcata    60
tataattttt tttttgtttt gtttgtttgt tttttaataa actgttatta cttaacaatg    12
cgacacaaac gttctgcaaa acgcacaaaa cgtgcacggg ctacccaact ttataaaaca    180
tgcaaacagg c                                                            191

<210> 14
<211> 3759
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> pJV expression vector
<220><221> Intron
<222> (1725)..(1857)
<223> Rat Ins IntA
<220><221> misc_feature
<222>
> (1)..(44)
<223> Tn903, pUC4K Remnants
<220><221> misc_feature
<222> (861)..(896)
<223> Tn903, pUC4K Remnants
<220><221> misc_feature
<222> (897)..(902)
<223> pUC19 MCS
<220><221> polyA_signal
<222> (2556)..(2686)
<223> rGLOB pA
<220><221> polyA_site
<222> (2647)..(2647)
<223> PolyA_Site_1
<220><221> promoter
<222> (903)..(1587)
<223> CMV Pro
<220><221> 3'UTR
<222> (2012)..(2544)
<223> HBVenh
<220><221> 5'UTR

```

<222> (1864)..(1984)
 <223> 5'-UTR of HBV pre-S2

<220><221> misc_feature

<222> (1719)..(1724)

<223> Bam/Bgl fusion

<220><221> misc_feature

<222> (1985)..(1987)

<223> ATG-Nhe

<220><221> misc_feature

<222> (1988)..(2011)

<223> CDS insertion site

<220><221> misc_feature

<222> (2545)..(2555)

<223> unknown

<220><221> exon

<222> (1588)..(1718)

<223> CMV Exon 1/2

<220><221> misc_feature

<222> (2693)..(3759)

<223> pUC19

<220><221> misc_feature

<222> (45)..(860)

<223> KanR (Tn903) complement

<400> 14

ggcgtaatgc tctgccagtg ttacaaccaa ttaaccaatt ctgattagaa aaactcatcg	60
agcatcaaat gaaactgcaa tttattcata tcaggattat caataccata tttttgaaaa	120
agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca ccgaggcagt tccataggat ggcaagatcc	180
tggtatcggg ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatac aacctattaa tttcccctcg	240
tcaaaaataa ggttatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc cggtgagaat	300
ggcaaaagct tatgcatttc ttccagact tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca	360
tcaaaatcac tcgcatcaac caaacggtta ttcattcgtg attgcgcctg agcgagacga	420
aatacgcgat cgctgttaaa aggacaatta caaacaggaa tcgaatgcaa ccggcgcagg	480

aacactgcc a gcgcatcaac aatattttca cctgaatcag gatattcttc taatacctgg 540
aatgctgttt tccccgggat cgcagtggtg agtaaccatg catcatcagg agtacggata 600
aaatgcttga tggtcggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca 660
tctgtaacat cattggcaac gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc tggcgcatcg 720
ggcttcccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat 780
ttatacccat ataaatcagc atccatgttg gaatttaatc gcggcctcga gcaagacgtt 840

tccccgtgaa tatggctcat aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc agacaggtcg 900
acaatattgg ctattggcca ttgcatacgt tgtatctata tcataaatag tacatttata 960
ttggctcatg tccaatatga ccgccatgtt gacattgatt attgactagt tattaatagt 1020
aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcgtt acataactta 1080
cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgcca acgacccccg cccattgacg tcaataatga 1140
cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt 1200
tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta 1260

ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgctt ggcatatgc ccagtacatg accttacggg 1320
actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcacgc tattaccatg gtgatgcggg 1380
tttggcagta caccaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc 1440
accccatgta cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaaa tcaacgggac ttccaaaat 1500
gtcgtataaa ccccgccccg ttgacgcaaa tggcggttag gcgtgtacgg tgggaggtct 1560
atataagcag agctcgttta gtgaacc gtc aga tcg cct gga gac gcc atc cac 1614

Val Arg Ser Pro Gly Asp Ala Ile His

1 5

gct gtt ttg acc tcc ata gaa gac acc ggg acc gat cca gcc tcc gcg 1662
Ala Val Leu Thr Ser Ile Glu Asp Thr Gly Thr Asp Pro Ala Ser Ala
10 15 20 25

gcc ggg aac ggt gca ttg gaa cgc gga ttc ccc gtg cca aga gtg act 1710
Ala Gly Asn Gly Ala Leu Glu Arg Gly Phe Pro Val Pro Arg Val Thr
30 35 40

cac cgt cc ggatctcagc aagcaggtat gtactctcca ggggtggcct ggcttcccca 1768
His Arg

gtcaagactc cagggtattg agggacgctg tgggctcttc tcttcatgt accttttgct 1828

tgccatcaacc ctgactatct tccaggtcag gatcccagag tcaggggtct gtattttcct	1888
gctgggtgct ccagttcagg aacagtaaac cctgctccga atattgcctc tcacatctcg	1948
tcaatctccg cgaggactgg ggaccctgtg acgaacatgg ctagcgggcc cagatctggg	2008
ccctaacaaa acaaaaagat ggggttattc cctaaacttc atgggttacg taattggaag	2068
ttgggggaca ttgccacaag atcatattgt acaaaagatc aaacactgtt ttagaaaact	2128
tcctgtaaac aggcctattg attggaaagt atgtcaaagg attgtgggtc ttttgggctt	2188
tgctgtctca ttacacaat gtggatatcc tgccttaatg cctttgtatg catgtataca	2248
agctaaacag gctttcactt tctcgccaac ttacaaggcc tttctaagta aacagtacat	2308
gaacctttac cccgttgctc ggcaacggcc tggctgtgtc caagtgtttg ctgacgcaac	2368
ccccactggc tggggcttgg ccataggcca tcagcgcatg cgtggaacct ttgtggctcc	2428
tctgcggatc catactcggg aactcctagc cgtttgtttt gctcgcagcc ggtctggagc	2488
aaagctcata ggaactgaca attctgtcgt cctctcggg aaatatacat cgtttcgatc	2548
tacgtatgat ctttttcct ctgcaaaaaa ttatggggac atcatgaagc cccttgagca	2608
tctgacttct ggctaataaa ggaaatttat ttctattgca atagtgtgtt ggaatttttt	2668
gtgtctctca ctcggaagga attctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg	2728
gtttgcgtat tgggcgtct tccgttccct cgtcactga ctcgtgcgc tcggtcgttc	2788
ggctgcggcg agcggtaica gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag	2848
gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa	2908
aggccgcgtt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc	2968
gacgctcaag tcagaggtag cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc	3028
ctggaagctc cctcgtgcgc tctctgttc cgacctgcc gcttaccgga tacctgtccg	3088
cctttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgtgtagg tatctcagtt	3148
cgggtgtagt cgttcgtcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc	3208
gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc	3268
cactggcagc agccactggt aacaggattia gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag	3328
agttcttgaa gtggtggcct aactacggct aactagaag aacagtattt ggtatctgcg	3388
ctctgtgtaa gccagttacc ttcgaaaaaa gatttgtag ctcttgatcc ggcaaaaaa	3448
ccaccgctgg tagcggtagt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag	3508
gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact	3568
cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa	3628

attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt 3688

accaatgctt aatcagttag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag 3748

ttgcctgact c 3759

<210> 15

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 15

ggaggatccg gacggtgagt cactcttggc acggggaatc cg 42

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 16

ggtgaatatg gctcataaca c 21

<210> 17

<211>

> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 17

ccgccgaaca tggagaacat cgc 23

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 18

cacagatctt ttgttaggt ttaaatgtat acc 33

<210> 19

<211> 29

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 19
 ggaggatcct gacctggaag atagtcacc 29
 <210> 20

 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 20
 ggaggatcca tcagcaagca ggtatg 26
 <210> 21
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 21
 ggagctagcg ggcgtttgac ctccggcgtc ggg 33
 <210> 22
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 22
 ggagaattca gatctcctct agtaaaacaa tggctgg 37
 <210>
 > 23
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 23
 ggagctagcc ttctaaccga ggtcg 25

<210> 24
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 24
 ggaagatctc cttactccag ctctatgctg 30
 <210> 25
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 25
 ggcggaattcc ttccgagtga gagacac 27
 <210> 26
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 26
 ggagtataca tttaaagggc cctaacaaaa caaaaagatg ggg 43
 <210> 27
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 27
 ggagctagct cgtttacttt gaccaagaac g 31
 <210> 28
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 28

ggaagatctc cttatTTTTg acaccagacc aactgg	36
<210> 29	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Primer	
<400> 29	
ggagtcgacc tgtctgctta cataaacag	29
<210> 30	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Primer	
<400> 30	
cgtaatgctc tgccagtgtt acaacc	26
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Primer	
<400> 31	
gaaagatctc agcaagcagg	20
<210> 32	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Primer	
<400> 32	
ggaggatcct gacctggaag atagtcaggg ttgaggcaag caaaagg	47
<210> 33	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	

<220><223> Primer
 <400> 33
 ctagcgggcc ca 12
 <210> 34
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 34
 gatctgggcc cg 12
 <210> 35
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 35
 ggagctagca tcatcccagt tgaggagg 28
 <210> 36
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 36
 ggtagatctc ctcagtctg ctcgaagc 28
 <210> 37
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer
 <400> 37
 ccaagctagc gacaaaactc acacatgcc 29
 <210> 38
 <211> 45

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 38

ggaagatctc gttaccct gtcatttacc cggagacagg gagag 45

<210> 39

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Oligonucleotide

<400> 39

aagatgtcca gactctgtct ctccgtggcc ctctctgtgc tctcgggac actcgcc 57

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 40

ggaactagta agatgtccag actc 24

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 41

ggaagctagc ggcgagtgtc ccgag 25

<210> 42

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Oligonucleotide

<400> 42

ggaaagatgg ccagcctctt tgccacattt ctctgtgtgc tcgtgagcct cagcctcgcc 60

agcgaaagca gcgcc 75

<210> 43
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer

<400> 43
 ggaactagtg gaaagatggc cagc 24
 <210> 44
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer

<400> 44
 ggaagctagc ggcgctgctt tcgctg 26
 <210> 45
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Oligonucleotide

<400> 45
 aggtctttgc taatcttggc gctttgcttc ctgcccctgg ctgctctggg g 51
 <210> 46
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 ><223> Primer

<400> 46
 ggaactagta ggtctttgct aatc 24
 <210> 47
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Primer

<400> 47	
ggaagctagc cccagagca gccag	25
<210> 48	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Primer	
<400> 48	
ggagctagct cgtttacttt gaccaagaac g	31
<210> 49	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Primer	
<400> 49	
ggaagatctc cggtgagtgg tgctg	25
<210> 50	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Primer	
<400> 50	
gcaggatcca gtagacctgg agagaggaca ag	32
<210> 51	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><223> Primer	
<400> 51	
ggaagatcta caaggtgagc tgctgtggc	29
<210> 52	
<211> 490	
<212> DNA	

<213> Pseudo rabies virus

<400> 52

tggccgcaga gggggccggg catgcaaatc agaggcgcgc gggagacgcc tccgcgcgcc	60
cattggcccc ggagagccga gatggccgcc gcggggggccg gacatgcaa gtagacgcga	120
gaggaagtag ggagagaaat cccattggcc gtcgaggggc caagatggcg ccctcggggc	180
cggacatgca aagtagacgc gagaggaagt gggcgagaga aatccattg gccgtcgatg	240
gggcaagatg gccgcccgcc gggccgggca tgcaaatggt cctcgcgagg aagttcctcg	300
cgaatccca ttggccggcg gccgccatct tggccgggc atgcaaagca gacggcagag	360
gaagcggcg agaaaaatcc cattggccgg ccgtcgggga agtccgcggc gaaaatcggc	420

cattggtccg cttacctggg ggcgggctct cctcggggcg cttataagcg cgggtccat	480
cgtagcactt	490

<210> 53

<211> 495

<212> DNA

<213> Rous sarcoma virus

<400> 53

ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg cgagcaaaat ttaagctaca	60
acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc ttagggtag gcgttttgcg	120
ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgtatctgag gggactaggg tgtgtttagg	180
cgaaaagcgg ggttcgggtt gtacgcggtt aggagttccc tcaggatata gtagtttcgc	240
ttttgcatag ggagggggaa atgtagtctt atgcaatata cttgtagtct tgcaacatgg	300
taacgatgag ttagcaacat gccttacaag gagagaaaaa gcaccgtgca tgccgattgg	360
tggaagtaag gtggtacgat cgtgccttat taggaaggca acagacaggt ctgacatgga	420
ttggacgaac cactgaattc gcattgcag agataattgt atttaagtgc ctgctcgat	480
acaataaacg ccatt	495