



등록특허 10-2755545



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월17일
(11) 등록번호 10-2755545
(24) 등록일자 2025년01월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
C07K 14/47 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7024944
- (22) 출원일자(국제) 2017년02월28일
심사청구일자 2021년10월28일
- (85) 번역문제출일자 2018년08월29일
- (65) 공개번호 10-2018-0132045
- (43) 공개일자 2018년12월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2017/050537
- (87) 국제공개번호 WO 2017/149292
국제공개일자 2017년09월08일
- (30) 우선권주장
1603577.6 2016년03월01일 영국(GB)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2012112603 A1
(뒷면에 계속)

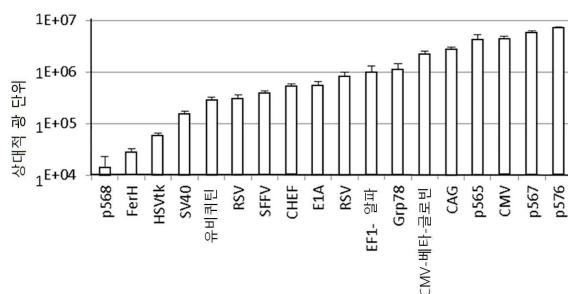
- (73) 특허권자
옥스포드 제네티스 리미티드
영국, 옥스포드 오엑스4 4에이치지, 로버트 로빈슨 애비뉴, 메더워 센터
- (72) 발명자
카우드, 리안
영국, 옥스포드 옥스포드셔 오엑스4 4지에이, 더 옥스포드 사이언스 파크, 로버트 로빈슨 애비뉴, 메더워 1, 퍼스트 플로어, 옥스포드 제네티스 리미티드
- 파커-마누엘, 리차드**
영국, 옥스포드 옥스포드셔 오엑스4 4지에이, 더 옥스포드 사이언스 파크, 로버트 로빈슨 애비뉴, 메더워 1, 퍼스트 플로어, 옥스포드 제네티스 리미티드
- 수, 웨이형**
영국, 옥스포드 옥스포드셔 오엑스4 4지에이, 더 옥스포드 사이언스 파크, 로버트 로빈슨 애비뉴, 메더워 1, 퍼스트 플로어, 옥스포드 제네티스 리미티드
- (74) 대리인
이명진

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 **프로모터****(57) 요약**

본 발명은 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉진할 수 있는 핵산 분자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 이런 발현 벡터는 예를 들어, 항체 및 렌티 바이러스 폴리펩타이드와 같은 재조합 단백질을 생산하는데 사용될 수 있다.

대 표 도

(52) CPC특허분류

C12N 2830/85 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

NCBI GenBank: LM652706.1(2015.8.24.)*

WO2007081336 A1

WO2016022075 A1

Gene Med., 11:941-950(2009.)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

핵산 분자로서,

(a) 서열번호: 1 또는 서열번호: 2로 기재되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 가지는 제1 폴리뉴클레오티드; 및

(b) 서열번호: 4로 기재되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 가지는 제2 폴리뉴클레오티드를 포함하되;

상기에서 (a) 및 (b)는 이 순서로 5'-3'으로 연속적으로 연결되거나, 또는 1 내지 10개의 링커 뉴클레오티드가 제1 및 제2 폴리뉴클레오티드 사이에 존재하고, 상기 핵산 분자는 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉진할 수 있는, 핵산 분자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 1 또는 서열번호: 2로 기재되는 뉴클레오티드 서열 중 하나와 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 가지는, 핵산 분자.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제2 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 4로 기재되는 폴리뉴클레오티드 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 가지는, 핵산 분자.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 핵산 분자는 이하의 것들을 포함하는, 핵산 분자:

(a) 서열번호: 1 또는 서열번호: 2로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제1 폴리뉴클레오티드; 및

(b) 서열번호: 4로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제2 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 핵산 분자는:

(c) 서열번호: 5, 서열번호: 6 또는 서열번호: 7로 기재되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 80% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 가지는 제3 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함하되,

상기에서 (a), (b) 및 (c)는 이 순서로 5'-3'으로 연속적으로 연결되거나, 또는 1 내지 10개의 뉴클레오티드가 제1, 제2 및/또는 제3 폴리뉴클레오티드 사이에 존재하고, 상기 핵산 분자는 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉진할 수 있는, 핵산 분자.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 제3 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 5, 서열번호: 6 또는 서열번호: 7으로 기재된 뉴클레오티드 서열 중 하나와 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 가지는, 핵산 분자.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 핵산 분자는:

- (a) 서열번호: 1 또는 서열번호: 2로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제1 폴리뉴클레오티드;
- (b) 서열번호: 4로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제2 폴리뉴클레오티드; 및
- (c) 서열번호: 5, 서열번호: 6 또는 서열번호: 7로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제3 폴리뉴클레오티드를 포함하되;

상기에서 (a), (b) 및 (c)는 이 순서로 연속적으로 5'-3'으로 연결되거나, 또는 1 내지 10개의 뉴클레오티드가 제1, 제2 및/또는 제3 폴리뉴클레오티드 사이에 존재하고, 상기 핵산 분자는 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉진할 수 있는, 핵산 분자.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 핵산 문자가 유도성 요소, 억제성 요소 또는 활성화 요소를 추가로 포함하는, 핵산 문자.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 포유동물 세포는 마우스, 래트, 햄스터, 원숭이 또는 인간 세포인, 핵산 문자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 핵산 문자를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 발현 벡터는 아데노바이러스 벡터, pSV 또는 pCMV 플라스미드 벡터, 백시니아 또는 레트로바이러스 벡터, 바콜로바이러스 벡터, 또는 렌티 바이러스 벡터인, 발현 벡터.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 핵산 문자는 이종 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게-연결된 핵산 문자인, 발현 벡터.

청구항 13

제10항의 발현 벡터를 포함하는, 포유동물 숙주 세포.

청구항 14

제10항의 발현 벡터, 및 선택적으로 이하의 것들로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가적인 구성 요소를 함께 포함하는, 키트:

- (i) 헬퍼 플라스미드;
- (ii) 바이러스 계놈 플라스미드;
- (iii) 베퍼 용액;
- (iv) 제한 효소;
- (v) 형질감염 매질; 및

(vi) 포유동물 세포.

청구항 15

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉진할 수 있는 핵산 분자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 이런 발현 벡터는 예를 들어, 항체 및 렌티바이러스 폴리펩타이드와 같은 재조합 단백질을 생산하는데 사용될 수 있다.

배경 기술

[0002]

유전자의 전사가 발생하기 위해서, RNA 중합 효소가 유전자 프로모터에 결합하여 전사를 개시해야 한다. 일반적으로, RNA 중합 효소 I이 리보솜 RNA를 암호화하는 유전자를 전사하고; RNA 중합 효소 II가 메신저 RNA를 암호화하는 유전자, 일부 소핵 RNA(small nuclear RNA) 및 마이크로RNA (microRNA)를 전사하는 반면; RNA 중합 효소 III는 트랜스퍼 RNA 및 다른 소 RNA(small RNA)를 암호화하는 유전자를 전사한다.

[0003]

전사가 언제 발생하는지 및 RNA를 얼마나 생성되는지를 제어하도록 전사가 조절된다. RNA 중합 효소에 의한 유전자의 전사는 적어도 이하의 다섯 가지 메커니즘에 의해 조절될 수 있다:

[0004]

(i) 특이성 인자(Specificity factors)가 RNA 중합효소의 소정 프로모터 또는 프로모터 세트에 대한 특이성을 변경하여, 이들에 좀 더 많이 또는 적게 결합할 수 있게 한다 (예를 들어, 원핵 생물 전사에 사용되는 시그마 인자).

[0005]

(ii) 억제자가 작동자(Operator) (프로모터 영역에 가깝거나 이와 중첩되는 DNA 가닥 상의 코딩 서열)에 결합하여 그 가닥을 따라가는 RNA 중합 효소의 진행을 방해하여, 유전자의 발현을 방해한다.

[0006]

(iii) 전사 인자가 단백질-코딩 서열의 시작 지점에 RNA 중합 효소를 위치시킨 다음, mRNA를 전사하기 위해 중합 효소를 방출시킨다.

[0007]

(iv) 활성자가 RNA 중합 효소 및 특정 프로모터 사이의 상호작용을 증진시켜, 유전자의 발현을 촉진한다. 인핸서(Enhancers)는 특정 프로모터를 개시 복합체에 가져오도록 DNA를 고리화하기 위해, 활성자가 결합하는 DNA 나선 상의 위치이다.

[0008]

(v) 사일렌서(Silencers)는 특정 전사 인자가 결합할 때 유전자의 발현을 침묵시킬 수 있는 DNA 서열의 영역이다.

[0009]

대표적인 포유동물 프로모터는 기본 전사 기구(basic transcription machinery)가 결합하는 50-100 염기쌍의 핵심 영역(core region), 및 하나 이상의 전사 활성자 단백질 (전사활성자)이 결합할 수 있는 인핸서 영역으로 이루어진다. 인핸서에 결합할 수 있는 전사활성자의 수 및 종류는 어떤 특정 결합 위치가 존재하는지에 달려있다. 개시 속도는 프로모터의 인핸서에 실제로 결합된 전사활성자의 수 및 종류에 의해 좌우된다. 인핸서 외에, 다른 전사 인자가 결합할 때 유전자 발현을 낮추는 사일렌서도 있다.

[0010]

핵심 프로모터는 다양한 다른 요소들로 구성되며, 정규(canonical) 및 비-정규의 두 개의 카테고리가 있다. 정규 핵심 프로모터 요소들은: TATA 박스, 개시자 (Inr), TFⅡB 인식 요소(BRE), 하류 프로모터 요소 (DPE) 및 하류 핵심 요소(DCE)를 포함한다. 이 요소들은 많지만 전부는 아닌 단백질-코딩 유전자들의 핵심 프로모터 내에서 발견될 수 있다. TATA 박스 (서열 TATAA)는 통상적으로 전사 시작 위치 (TSS)의 20-30 bp 상류에서 발견되며, TFⅡD 일반 전사 인자에 대한 결합 위치로서 작용한다. Inr 요소 (공통 서열 YYANT/AYY)가 존재할 때, 이는 전사체의 첫 염기인 공통의 첫 번째 A를 가진 TSS를 포함한다. BRE 요소는 TATA 박스의 상류 (BREu 공통 G/C G/C G/A CGCC) 또는 하류 (BREd 공통 G/A T T/A T/G T/G T/G) 모두에서 발견될 수 있다. 정확히 정규 핵심 프로모터 요소는 아니지만, (TSS 상류 50 및 100 bp 사이에 위치한) CCAAT 박스는 이 카테고리에 종종 포함된다. CCAAT 박스는 또한 일반적인 전사 인자 (TF) 결합에도 일조한다.

[0011]

비-정규 핵심 프로모터 요소는 CpG 섬(island), ATG 사막(desert) 및 전사 개시 플랫폼 (TIP)을 포함한다. CpG

섬은 일반적으로 상대적으로 높은 비율의 CpG 디뉴클레오티드를 함유하는 DNA가 500-2000 bp 스트레치(stretch)에 걸쳐있다. CpG 디뉴클레오티드는 보통 C 잔기에 메틸화되어 전사를 감소시키나, CpG 섬 내에서 그들은 비메틸화로 남아 전사를 촉진할 것이다. ATG 사막은 주위 영역보다 낮은 빈도의 ATG 트리뉴클레오티드를 가진 DNA 영역이다. 이들은 TSS의 상류 및 하류에 거의 1000 bp에 걸쳐있고, 일반적으로 TATA 박스를 함유하지 않은 프로모터와 관련된다.

[0012] 강력한 프로모터는 높은 빈도로 전사를 개시하는 것이며 매우 유용한 도구일 수 있다. 생화학에서 예를 들어, 강력한 프로모터는 전사 과정을 연구하거나 재조합 단백질의 생산을 유도하는데 사용될 수 있다. 강력한 프로모터는 또한 유전학에서도 유용한데: 예를 들어, 이들은 shRNA 발현을 유도하여, 유전자 낙다운(knockdown) 또는 cDNA 과발현에 사용될 수 있다.

[0013] 특히 강력한 프로모터가 또한 의료 분야에 적용될 수 있는데: 예를 들어, 재조합 바이러스 백신에서 더 높은 항원 발현은 더 양호한 면역 반응을 일으킨다.

[0014] 포유동물 시스템에서 사용된 가장 강력한 프로모터는 일반적으로 항시적으로 발현되는(constitutively expressed) 세포 유전자 또는 바이러스 유전자에서 비롯된다. 그러나, 관련된 유전자의 발현 수준 면에서 가장 강력한 프로모터는 종종 가장 세포-유형 의존적인 것이다. 즉, 이들은 이들이 작동할 세포의 종류에 제한되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 따라서, 본 발명의 목적은 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 높은 수준으로 및/또는 포유동물 세포의 범위에서 촉진할 수 있는 핵산 분자를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공하는 것이다. 이런 발현 벡터는 높은 수준의 재조합 폴리펩타이드, 예를 들어, 항체 및 랜티 바이러스 폴리펩타이드를 생산하는데 사용될 수 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 일 구현예에서, 본 발명은 이하의 것들을 포함하는 핵산 분자를 제공하며:

[0018] (a) 서열번호: 1, 서열번호: 2 또는 서열번호: 3으로 기재되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 1 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 제 1 폴리뉴클레오티드의 기능적 단편; 및

[0019] (b) 서열번호: 4로 기재되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 80% 동일한 서열을 가지는 제 2 폴리펩타이드, 또는 상기 제 2 폴리뉴클레오티드의 기능적 단편;

[0020] 상기에서 (a) 및 (b)는 이 순서로 5'-3'으로 연결되고, 상기 핵산 분자는 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉진할 수 있다.

[0021] 추가 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0022] 또 다른 추가 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공하며, 상기 핵산 분자는 이종 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게-연결된다.

[0023] 본 발명은 또한 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 포유동물 숙주 세포를 제공한다.

[0024] 본 발명은 또한 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 키트를 제공한다.

[0025] 일부 구현예에서, 핵산 분자는 분리된 핵산 분자이다. 본 발명의 핵산 분자는 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉진할 수 있다, 즉, 이는 프로모터로서 기능한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 핵산 분자는 항시적 프로모터(constitutive promoter)로서 기능한다.

[0026] 본 발명의 핵산 분자는 (a) 서열번호: 1, 서열번호: 2 또는 서열번호: 3으로 기재되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 제 1 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 서열번호: 1~3의 서열은 첨부된 "서열" 섹션에 제공된다. 제 1 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 서열번호: 1, 서열번호: 2 또는 서열번호: 3으로 기재된 뉴클레오티드 서열 중 하나와 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 뉴클레

오티드 서열을 가진다. 가장 바람직하게는, 제 1 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 1, 서열번호: 2 또는 서열번호: 3의 뉴클레오티드 서열을 가진다.

[0027] 본 발명의 핵산 분자는 대안적으로는 제 1 폴리뉴클레오티드의 기능적 단편을 포함할 것이다. 본 발명에서 사용된 용어 "상기 제 1 폴리뉴클레오티드의 기능적 단편"은, 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 발현 측진에서 완전한 제 1 폴리뉴클레오티드 활성의 20% 이상 (예를 들어, 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100%)을 보유하는 제 1 폴리뉴클레오티드의 부분을 말한다. 핵산 서열의 프로모터 활성을 측정 및 비교하는 방법은, 하기에 검토된 바와 같이 통상의 기술분야에 자명하다.

[0028] 바람직하게는, 제 1 폴리뉴클레오티드의 기능적 단편은 서열번호: 1, 서열번호: 2 또는 서열번호: 3으로 기재된 폴리뉴클레오티드 서열의 길이의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%이다.

[0029] 본 발명의 핵산 분자는 또한: (b) 서열번호: 4로 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 가지는 제2 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 제 2 폴리뉴클레오티드의 기능적 단편을 포함한다. 서열번호: 4의 서열은 첨부된 "서열" 섹션에 제공된다. 바람직하게는, 제 2 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 4로 기재되는 폴리뉴클레오티드 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 가진다. 가장 바람직하게는, 제 2 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 4의 폴리뉴클레오티드 서열을 가진다.

[0030] 본 발명의 핵산 분자는 대안적으로는 제 2 폴리뉴클레오티드의 기능적 단편을 포함할 수 있다. 본 발명에 사용된 용어 "상기 제 2 폴리뉴클레오티드의 기능적 단편"은, 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 발현 측진에서 완전한 제 2 폴리뉴클레오티드 활성의 20% 이상 (예를 들어, 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100%)을 보유하는 제 2 폴리뉴클레오티드의 부분을 말한다. 핵산 서열의 프로모터 활성을 측정 및 비교하는 방법은, 하기에 검토된 바와 같이 통상의 기술분야에 자명하다. 바람직하게는, 제 2 폴리뉴클레오티드의 기능적 단편은 서열번호: 4로 기재되는 폴리뉴클레오티드 서열의 길이의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%이다.

[0031] 서열번호: 4는 전사 시작 위치 (TSS)를 포함한다: +1 위치 (즉, 전사될 첫 염기)는 서열 TCAGATC에서의 첫 번째 T이다; 이는 서열번호: 4의 3'-말단에서 발생한다. TSS의 모든 하류 부분은 RNA로 전사될 것이다.

[0032] 따라서, 제 2 폴리뉴클레오티드 또는 이의 기능적 단편이 서열 TCAGATC를 포함하는 것이 바람직하다.

[0033] 일부 바람직한 구현예에서, 핵산 분자는 이하의 것들을 포함하며:

[0034] (a) 서열번호: 1, 서열번호: 2 또는 서열번호: 3으로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 1 폴리뉴클레오티드; 및

[0035] (b) 서열번호: 4로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 2 폴리뉴클레오티드;

[0036] 상기에서 (a) 및 (b)는 5'-3'으로 연결되고, 상기 핵산 분자는 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 측진할 수 있다.

[0037] 일부 바람직한 구현예에서, 핵산 분자는 이하의 것들을 포함하며:

[0038] (a) 서열번호: 1로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 1 폴리뉴클레오티드; 및

[0039] (b) 서열번호: 4로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 2 폴리뉴클레오티드;

[0040] 상기에서 (a) 및 (b)는 이 순서로 5'-3'으로 연속적으로 연결되며, 상기 핵산 분자는 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 측진할 수 있다.

[0041] 일부 바람직한 구현예에서, 핵산 분자는 이하의 것들을 포함하며:

[0042] (a) 서열번호: 2로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 1 폴리뉴클레오티드; 및

[0043] (b) 서열번호: 4로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 2 폴리뉴클레오티드;

[0044] 상기에서 (a) 및 (b)는 이 순서로 5'-3'으로 연속적으로 연결되며, 상기 핵산 분자는 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 측진할 수 있다.

[0045] 일부 바람직한 구현예에서, 핵산 분자는 이하의 것들을 포함하며:

[0046] (a) 서열번호: 3으로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 1 폴리뉴클레오티드; 및

- [0047] (b) 서열번호: 4로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 2 폴리뉴클레오티드;
- [0048] 상기에서 (a) 및 (b)는 이 순서로 5'-3'으로 연속적으로 연결되며, 상기 핵산 분자는 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉진할 수 있다.
- [0049] 본 발명은 또한 이하의 것들을 포함하는 핵산 분자를 제공하며:
- [0050] (a) 서열번호: 1, 서열번호: 2 또는 서열번호: 3으로 기재되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 1 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 제 1 폴리뉴클레오티드의 기능적 단편;
- [0051] (b) 서열번호: 4로 기재되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 80% 동일한 서열을 가지는 제 2 폴리펩타이드, 또는 상기 제 2 폴리뉴클레오티드의 기능적 단편을 포함하는 핵산 분자; 및
- [0052] (c) 서열번호: 5, 서열번호: 6 또는 서열번호: 7로 기재되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 가지는 제3 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 제3 폴리뉴클레오티드의 기능적 단편;
- [0053] 상기에서 (a), (b) 및 (c)는 이 순서로 5'-3'으로 연결되고, 상기 핵산 분자는 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉진할 수 있다.
- [0054] 서열번호: 5-7의 서열은 첨부된 "서열" 섹션에서 제공된다.
- [0055] 제 3 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 서열번호: 5, 서열번호: 6 또는 서열번호: 7로 기재되는 뉴클레오티드 서열 중 하나와 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 가진다. 가장 바람직하게는, 제 3 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 5, 서열번호: 6 또는 서열번호: 7의 뉴클레오티드 서열을 가진다.
- [0056] 본 발명의 핵산 분자는 대안적으로는 제 3 폴리뉴클레오티드의 기능적 단편을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어 "제 3 폴리뉴클레오티드의 기능적 단편"은, 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 발현 촉진에서 완전한 제 3 폴리뉴클레오티드 활성의 20% 이상 (예를 들어, 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100%)을 보유하는 제 3 폴리뉴클레오티드의 부분을 말한다. 핵산 서열의 프로모터 활성을 측정 및 비교하는 방법은, 하기에 검토된 바와 같이 통상의 기술분야에 자명하다.
- [0057] 바람직하게는, 제 3 폴리뉴클레오티드의 기능적 단편은 서열번호: 5, 서열번호: 6 또는 서열번호: 7로 기재되는 폴리뉴클레오티드 서열의 길이의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%이다.
- [0058] 일부 바람직한 구현예에서, 핵산 분자는 이하의 것들을 포함하며:
- [0059] (a) 서열번호: 1, 서열번호: 2 또는 서열번호: 3으로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 1 폴리뉴클레오티드;
- [0060] (b) 서열번호: 4로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 2 폴리뉴클레오티드; 및
- [0061] (c) 서열번호: 5, 서열번호: 6 또는 서열번호: 7로 표시되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제3 폴리뉴클레오티드;
- [0062] 상기에서 (a), (b) 및 (c)는 이 순서로 5'-3'으로 연결되고, 상기 핵산 분자는 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉진할 수 있다.
- [0063] 일부 바람직한 구현예에서, 핵산 분자는 이하의 것들을 포함하며:
- [0064] (a) 서열번호: 1로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 1 폴리뉴클레오티드;
- [0065] (b) 서열번호: 4로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 2 폴리뉴클레오티드; 및
- [0066] (c) 서열번호: 5로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 3 폴리뉴클레오티드;
- [0067] 상기에서 (a), (b) 및 (c)는 이 순서로 5'-3'으로 연속적으로 연결되며, 상기 핵산 분자는 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉진할 수 있다.
- [0068] 일부 바람직한 구현예에서, 핵산 분자는 이하의 것들을 포함하며:
- [0069] (a) 서열번호: 2로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 1 폴리뉴클레오티드;
- [0070] (b) 서열번호: 4로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 2 폴리뉴클레오티드; 및

- [0071] (c) 서열번호: 6으로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 3 폴리뉴클레오티드;
- [0072] 상기에서 (a), (b) 및 (c)는 이 순서로 5'-3'으로 연속적으로 연결되며, 상기 핵산 분자는 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉진할 수 있다.
- [0073] 일부 바람직한 구현예에서, 핵산 분자는 이하의 것들을 포함하며:
- [0074] (a) 서열번호: 3으로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 1 폴리뉴클레오티드;
- [0075] (b) 서열번호: 4로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 2 폴리뉴클레오티드; 및
- [0076] (c) 서열번호: 7로 기재되는 뉴클레오티드 서열을 가지는 제 3 폴리뉴클레오티드;
- [0077] 상기에서 (a), (b) 및 (c)는 이 순서로 5'-3'으로 연속적으로 연결되며, 상기 핵산 분자는 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉진할 수 있다.
- [0078] 본 발명에서 사용된 용어 "이종 폴리뉴클레오티드"는, 원하는 mRNA 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 이종 폴리뉴클레오티드의 예는 폴리펩타이드, 예를 들어, 바이러스 또는 포유동물의 폴리펩타이드를 암호화하는 것들을 포함한다.
- [0079] 일부 바람직한 구현예에서, 이종 폴리뉴클레오티드는 분비 경로에 들어가는 단백질, 예를 들어, 막-유사 단백질, 분비 항체 또는 다른 분비 단백질을 암호화한다. 상기 이종 폴리뉴클레오티드를 발현하는 세포는 생물 반응기(bioreactor) 또는 혼탁 배양 용기에서 재조합 분비 단백질을 연속 생산하는데 특히 적합할 것이며, 세포 용해 없이 산물이 배양 배지로부터 수득될 수 있다.
- [0080] 다른 바람직한 이종 폴리뉴클레오티드는 막 단백질 또는 세포질 단백질과 같이, 여전히 세포-연관된 단백질을 암호화하는 것들이며, 이는 전체 세포의 맥락에서 사용될 수 있거나 세포 용해물에서 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, 이종 폴리뉴클레오티드는 항체를 암호화한다. 본 발명의 일부 다른 구현예에서, 이종 폴리뉴클레오티드는 바이러스 폴리펩타이드를 암호화한다. 바람직하게는, 바이러스 폴리펩타이드는 예를 들어, VSV G와 같은 표면 당단백질이다. VSV G 폴리펩타이드는 수포성 구내염 바이러스(Vesicular Stomatitis virus)로부터 유래된 단일 통과 막 당단백질이다. 이는 넓은 전염성 향성(infectious tropism)을 매개한다. 다른 구현예에서, 바이러스 폴리펩타이드는 Gag-Pol, Rev 또는 Tat이다. 용어 "Gag-Pol"은 기능적 역전사효소(reverse transcriptase), 인테그레이즈(integrase), 및 프로테이즈를 생산하기 위해 단백질 가수분해적으로 절단되는 렌트로바이러스 단백질, 및 바이러스 조립에 구조적으로 중요한 적어도 두 개의 단백질을 말한다. 바람직하게는, Gag-Pol 서열은 렌티 바이러스, 가장 바람직하게는 HIV 유래이다. Rev 단백질은 바이러스 계놈을 세포질로 수송하는 것을 보조 한다. 바람직하게는, Rev 폴리펩타이드 서열은 렌티 바이러스, 가장 바람직하게는 HIV 유래이다. Tat 단백질은 바이러스 전사의 효율을 증진시킨다. 바람직하게는, Tat 폴리펩타이드 서열은 렌티 바이러스, 가장 바람직하게는 HIV 유래이다.
- [0081] 제 1, 제 2, (존재하는 경우) 제 3 및 (존재하는 경우) 이종 폴리뉴클레오티드는 이 순서로 5'-3' 방향으로 연결된다.
- [0082] 하나 이상의 링커 뉴클레오티드, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 링커 뉴클레오티드가 제 1과 제 2의 폴리뉴클레오티드 사이, 제 2와 제 3 폴리뉴클레오티드 사이, 제 2와 이종 폴리뉴클레오티드 사이, 및 제 3과 이종 폴리뉴클레오티드 사이에 존재할 수 있다. 존재하는 경우, 상기 링커 폴리뉴클레오티드는 (예를 들어, 루시퍼레이즈 분석으로 측정된) 프로모터 단편의 효과에 현저히 유해한 효과를 가지지 않아야 한다. 바람직하게는, 링커 뉴클레오티드는 없다. 즉, 바람직하게는 제 1, 제 2, (존재하는 경우) 제 3, 및 (존재하는 경우) 이종 폴리뉴클레오티드는 이 순서로 5'-3' 방향으로 연속적으로 연결된다.
- [0083] 핵산 분자는 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉진할 수 있다.
- [0084] 이종 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 제 1, 제 2 및 (존재하는 경우) 제 3 폴리뉴클레오티드의 하류 위치 (즉, 3')에 작동가능하게 위치될 수 있다.
- [0085] 본 발명의 맥락에서, 용어 "전사 촉진"은 이종 폴리뉴클레오티드가 본 발명의 제 1, 제 2 및 (존재하는 경우) 제 3 폴리뉴클레오티드의 하류에 작동가능하게 부착 또는 삽입되었을 때, 이종 폴리뉴클레오티드의 발현 산물이 얻어지는 것을 의미하는 것으로 의도된다.
- [0086] 본 발명의 일부 구현예에서, 핵산 분자는 유도성 방식으로 포유동물 세포에서 작동가능하게 연결된 이종 폴리펩-

타이드의 전사를 촉진할 수 있다, 즉, 핵산 분자는 유도성 프로모터이다. 따라서 핵산 분자는 억제성 또는 활성 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 기술된 프로모터의 버전은 전사를 억제 또는 활성화할 수 있는 단백질에 대한 결합 위치를 포함하도록 변경되어, 유도성 형태를 생성할 수 있다. 이의 한 예에서, 본 발명에서 기술된 프로모터 (바람직하게는 p565 또는 p565i)는 테트라사이클린(Tetracyclin) 억제자 단백질에 대해 2 내지 7개의 결합 위치, 가장 바람직하게는 2-3 개의 위치를 포함하도록 변경될 수 있다. 상기 결합 위치의 삽입에 의해, 테트라사이클린 억제자 단백질이 프로모터에 결합하게 될 것이며, 그렇게 해서 프로모터 상의 기본 전사 인자 기구의 조립을 방지하고, 이로 인해 전사 및 번역 모두를 방지한다. 이는 단백질 발현을 파괴할 것이다. 독시사이클린(Doxycycline) 또는 테트라사이클린의 존재시, 테트라사이클린 억제자 단백질은 더 이상 DNA에 결합할 수 없으므로 억제자는 더 이상 프로모터에 결합할 수 없어, 전사 및 번역이 방해없이 진행될 수 있다. 이와 같이, 생성된 프로모터의 전사 활성은 독시사이클린 또는 테트라사이클린의 존재에 의해 유도된다고 말할 수 있고, 따라서 유도성 프로모터로 분류될 것이다.

[0087] 본 발명에서 사용된 용어 "발현 산물"은, (i) 이종 폴리뉴클레오티드의 전사된 산물인 RNA (예를 들어, hnRNA, mRNA, siRNA 또는 miRNA), 및 (ii) 이종 폴리뉴클레오티드의 전사 산물인 폴리펩타이드 중 어느 하나 또는 둘 다를 의미하는 것으로 의도된다.

[0088] 이종 폴리뉴클레오티드의 5'- 말단이 본 발명의 핵산 분자의 3'- 말단으로부터 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp, 50 bp, 30 bp 또는 10 bp 내의 영역에 위치하도록, 이종 폴리뉴클레오티드가 본 발명의 핵산 분자의 하류에 작동가능하게 삽입될 수 있다.

[0089] 본 발명의 핵산 분자에 의해 촉진된 전사 수준은 임의의 적합한 방법으로 분석될 수 있다. 예를 들어, 그런 분석을 위해, 이종 폴리뉴클레오티드는 선택 마커 유전자 (예를 들어, 네오마이신(neomycin) 저항성 유전자 또는 하이그로마이신(hygromycin) B 포스포트랜스퍼레이즈 유전자) 또는 발현 리포터 유전자 [예를 들어, LacZ, GFP (녹색 형광 단백질), 루시페레이즈 유전자 등]일 수 있다. 바람직하게는, 프로모터 활성의 확인은 FLuc 유전자를 이용함으로써 완수될 수 있다.

[0090] 본 발명의 핵산 분자의 전사 활성은 FLuc 유전자와 같은 리포터 유전자를 본 발명의 핵산 분자의 하류에 작동가능하게 삽입함으로써 측정될 수 있다. 그런 다음 반딧불이 루시페레이즈 단백질의 발현 수준은 수득한 전사 수준을 나타내는데 사용될 수 있다. 이를 달성하기 위해, (본 발명의 핵산을 FLuc 유전자의 상류에 포함하는) 필요한 DNA를 플라스미드에 도입한 후 적합한 수여자 세포 (예를 들어, 293A 세포)에 형질감염하여, 반딧불이 루시페레이즈 단백질이 발현될 수 있게 한다. 24시간 후 세포는 용해될 수 있으며, 루시페린 기질의 존재하에 광산출량을 광도계(luminometer)를 이용하여 측정함으로써 세포 용해물 내의 루시페레이즈를 모니터링할 수 있다.

[0091] 핵산 분자는 포유동물 세포에서 작동가능하게-연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 전사를 촉진할 수 있다. 바람직한 포유동물 세포는 마우스, 래트, 햄스터, 원숭이 및 인간 세포를 포함한다. 그런 세포의 예는 HEK 세포 및 파생물 (예를 들어, HEK293, HEK293T, HEK293A), PerC6, 911, CHO, HCT116, HeLa, COS 및 VERO 세포; HepG2, A549 및 MCF7과 같은 암세포; 인간 또는 동물 생검으로부터 분리된 일차 세포(primary cell); 및 [배아 줄기세포 및 유도 만능 줄기 (iPS) 세포와 같은 만능세포(pluripotent cell) 뿐만 아니라 조혈모세포(hematopoietic stem cell), 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)와 같은 다분화능 줄기세포 등을 포함하는] 줄기세포를 포함한다.

[0092] 바람직한 인간 세포는 HEK293, HEK293T 및 HEK293A 세포; 및 [배아줄기세포 및 유도 만능 줄기 (iPS) 세포와 같은 만능세포뿐만 아니라 조혈모세포, 중간엽줄기세포와 같은 다분화능 줄기 세포, 등을 포함하는] 인간 줄기 세포를 포함한다.

[0093] 추가 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 바람직하게는, 발현 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 벡터이다. 포유동물 발현 벡터의 예는 아데노바이러스 벡터, pSV 및 pCMV 플라스미드 벡터 시리즈, 백시니아 및 레트로바이러스 벡터뿐만 아니라 바콜로바이러스를 포함한다. 일부 구현예에서, 발현 벡터는 렌티 바이러스 벡터이다.

[0094] 발현 벡터는 하기 중 하나 이상을 추가적으로 포함할 수 있다: 복제 원점, 선택 마커, 및 다중 클로닝 위치.

[0095] 또 다른 추가 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공하며, 상기 핵산 분자는 이종 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게-연결된다.

[0096] 본 발명은 또한 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 포유동물 숙주 세포를 제공한다. 발현 벡터는 임의의 적합한 방법에 의해 숙주 세포에 형질감염될 수 있다. 바람직하게는, 숙주 세포는 상기에서 언급된 것과 같은 포유동물

세포 (예를 들어, 인간 세포)이다. 상기 숙주 세포는 분리된 세포일 수 있다.

(www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Newsltr/FallWinter02/blastlab.html)를 이용함으로써 달성할 수 있다. 이 페이지는 Ma et al. (Bioinformatics. 2002 Mar; 18(3): 440-5)에 의해 보고된 것과 유사한 알고리즘을 이용한다. 정렬 확장을 위한 근원(seed)으로서 정확한 단어 일치를 요구하기보다는, 불연속 메가블라스트는 주형의 더 긴 창내의 비-인접 단어를 이용한다. 코딩 모드에서, 세 번째 위치에서의 불일치를 무시하면서 첫 번째 및 두 번째 코돈 위치에서 일치하는 것을 발견하는데 초점을 맞춤으로써, 세 번째 염기 워블링(base wobbling)이 고려된다. 불연속 MEGABLAST에서의 같은 단어 사이즈를 이용한 검색은, 같은 단어 사이즈를 이용한 표준 blastn보다 더욱 민감하고 효율적이다. 불연속 메가블라스트 특유의 매개 변수는:

[0112] 단어 사이즈: 11 또는 12; 주형: 16, 18, 또는 21; 주형 종류: 코딩 (0), 논-코딩 (1), 또는 둘 다 (2)이다.

도면의 간단한 설명

[0113] 도 1은 pSF-SnapFast FLuc 리포터 벡터 백그라운드 맵(background map)을 나타낸다.

도 2는 재조합 프로모터 단편과 다양한 표준 프로모터의 비교 차트이며, 여러 바는 표준 오차를 나타낸다. 실험은 세 번 수행되었다.

도 3은 시간 경과 분석에서 가장 높은 성능의 세 재조합 프로모터 (p565, p567 및 p576)를 다양한 표준 고-발현 프로모터와 비교한 그래프를 나타낸다.

도 4는 재조합 프로모터 p565에 의해 유도된 단백질 발현 수준을 나타낸다.

도 5는 HEK293 세포에서 플라스미드 벡터 pcDNA3.1 및 SnapFast Pro1v을 각각 이용한, CMV 프로모터 및 Oxford Genetics '하이브리드' prom-565 프로모터에 의한 단백질 과발현을 나타낸다. [Life Technologies 사로부터 입수 가능한 pcDNA3.1은 단백질 발현 벡터이다. 플라스미드 벡터는 즉각 조기 CMV 프로모터(immediate early CMV promoter), T7 프로모터, 단일 가닥 DNA를 만들기 위해 F1 원점(F1 origin)에 접한 소 성장 인자 (BgH) 폴리아데닐화 신호 및 네오마이신-카나마이신(kanamycin) 포스포트랜스퍼레이즈 (아미노글리코시드-3'-포스포트랜스퍼레이즈) 및 SV40 폴리아데닐화 신호의 발현을 유도하는 SV40 프로모터를 함유한다. pcDNA3.1 벡터가 관심 대상인 외인성 단백질 발현에 사용된다면, 상기 단백질의 코딩 서열은 CMV 및 T7 프로모터의 하류 (3')나 BgH 폴리아데닐화 신호의 상류 (5')에서, 5'에서 3'의 방향으로 삽입될 필요가 있다. 플라스미드는 또한 세균 세포에서의 선별을 위해 엠피실린 저항성 유전자를 함유한다. SnapFast ProV1은 Oxford Genetics Ltd에 의해 설계된 본 발명에서 p565i로 명명되는 프로모터, 및 뒤이어 SV40 폴리아데닐화 신호를 포함하는 단백질 발현 벡터이다. SnapFast ProV1 벡터가 관심 대상 외인성 단백질 발현에 사용된다면, 상기 단백질의 코딩 서열은 p565i 프로모터의 하류 (3')이나 SV40 폴리아데닐화 신호의 상류 (5')에 5'에서 3'의 방향으로 삽입될 필요가 있다. 플라스미드는 또한 세균 세포에서의 선별을 위해 카나마이신 저항성 유전자를 함유한다]. HEK293 세포는 다양한 FLAG-표지 용합 단백질을 발현하는 pcDNA3.1 또는 SnapFast Pro1v 중 어느 하나에 의해 형질감염되었다. 배양 상등액 또는 세포 용해물 유래의 단백질 수준은, 형질감염 72시간 후에 Protein Simple Wes™ 자동화 웨스턴 블롯 시스템을 이용한 웨스턴 블롯에 의해 결정될 수 있다. FLAG-표지 용합 단백질은 마우스 항-FLAG 일차 항체 및 이차 토끼 항-마우스- IgG-HRP로 검출되었다.

도 6은 HEK293 세포에서 플라스미드 벡터 pcDNA3.1 및 SnapFast Pro1v을 각각 이용한, CMV 프로모터 및 Oxford Genetics '하이브리드' prom-565 프로모터에 의한 단백질 과발현을 나타낸다. HEK293 세포는 다양한 FLAG-표지 용합 단백질을 발현하는 pcDNA3.1 또는 SnapFast Pro1v에 의해 형질감염되었다. 배양 상등액 또는 세포 용해물 유래의 단백질 수준은, 형질감염 72시간 후에 Protein Simple Wes™ 자동화 웨스턴 블롯 시스템을 이용한 웨스턴 블롯에 의해 결정될 수 있다. FLAG-표지 용합 단백질은 마우스 항-FLAG 일차 항체 및 이차 토끼 항-마우스- IgG-HRP에 의해 검출되었다.

도 7은 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 플라스미드 벡터 pcDNA3.1 및 SnapFast Pro1v을 각각 이용한, CMV 프로모터 및 Oxford Genetics '하이브리드' prom-565 프로모터에 의한 단백질 과발현을 나타낸다. CHO 세포는 다양한 FLAG-표지 용합 단백질을 발현하는 pcDNA3.1 또는 SnapFast Pro1v에 의해 형질감염되었다. 배양 상등액 또는 세포 용해물 유래의 단백질 수준은, 형질감염 72시간 후에 Protein Simple Wes™ 자동화 웨스턴 블롯 시스템을 이용한 웨스턴 블롯에 의해 결정될 수 있다. FLAG-표지 용합 단백질은 마우스 항-FLAG 일차 항체 및 이차 토끼 항-마우스- IgG-HRP에 의해 검출되었다.

도 8은 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 플라스미드 벡터 pcDNA3.1 및 SnapFast Pro1v을 각각 이용한, CMV 프

로모터 및 Oxford Genetics '하이브리드' prom-565 프로모터에 의한 단백질 과발현을 나타낸다. CHO 세포는 다양한 FLAG-표지 융합 단백질을 발현하는 pcDNA3.1 또는 SnapFast Pro1v에 의해 형질감염되었다. 배양 상등액 또는 세포 용해물 유래의 단백질 수준은, 형질감염 72시간 후에 Protein Simple Wes™ 자동화 웨스턴 블롯 시스템을 이용한 웨스턴 블롯에 의해 결정될 수 있다. FLAG-표지 융합 단백질은 마우스 항-FLAG 일차 항체 및 이차 토끼 항-마우스-IgG-HRP로 검출되었다.

도 9는 HCT116 세포에서 본 발명의 프로모터에 의해 유도된 GFP의 발현 수준을 나타낸다.

도 10은 A549 세포에서 본 발명의 프로모터에 의해 유도된 GFP의 발현 수준을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0114] **실시예**

본 발명은 하기의 실시예에 의해 추가로 설명되며, 다르게 명시되지 않는 한, 부분 및 퍼센트는 중량 기준이고 온도는 섭씨이다. 이 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내나, 단지 설명의 방법으로서 제시된 것임을 이해해야 한다. 상기 논의 및 본 실시예로부터, 통상의 기술자는 본 발명의 필수 특징을 알아낼 수 있고, 이의 취지 및 범위를 벗어나지 않고도, 이를 다양한 용도 및 조건에 적용하기 위해 본 발명을 다양하게 수정 및 변경을 할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 나타내고 기술한 것 외에 본 발명의 다양한 변경은 전술한 기재로부터 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 그런 변경은 또한 첨부된 청구항의 범위에 포함되도록 의도된다.

본 발명에 기재된 각 참고 문헌의 개시 내용은 이의 전체가 참조로서 본 발명에 포함된다.

[0117] **실시예 1: 재조합 프로모터 단편**

표 1에 확인된 서열로 이루어진 재조합 프로모터 단편이 생산되었다.

표 1

재조합 프로모터 단편의 서열

<u>프로모터</u>	<u>제 1</u>	<u>제 2</u>	<u>제 3</u>
<u>명칭</u>	<u>폴리뉴클레오티드</u>	<u>폴리뉴클레오티드</u>	<u>폴리뉴클레오티드</u>
p567	서열번호: 3	서열번호: 4	
p567i	서열번호: 3	서열번호: 4	서열번호: 7
p576	서열번호: 2	서열번호: 4	
p576i	서열번호: 2	서열번호: 4	서열번호: 6
p565	서열번호: 1	서열번호: 4	
p565i	서열번호: 1	서열번호: 4	서열번호: 5

[0119]

제 1, 제 2, 및 (존재하는 경우) 제 3의 폴리뉴클레오티드는 상기 프로모터 단편에 연속적으로 연결되었다.

[0121] **실시예 2: 프로모터를 포함하는 발현 벡터의 제작**

반딧불이 루시퍼레이즈 분석에 사용된 리포터 벡터가 하기와 같이 제작되었다.

벡터 제조

도 1에 나타낸 SnapFast (SF) 벡터가 사용되었다. SnapFast 벡터의 골격은 pUC 세균성 복제 원점, 엠피실린 저항성 유전자 및 다중 클로닝 위치로 이루어진다. 반딧불이 루시퍼레이즈 코딩 서열은 NcoI 및 XbaI 제한효소 자리 사이의 다중 클로닝 위치로 클로닝되었다 (도 1 참조). 루시퍼레이즈 코딩 서열은 Kozak 리보솜 결합 위치를 포함한다.

리포터 플라스미드는 Bgl II로 선형화된 후, 벡터 골격의 재-라이게이션(re-ligation)을 방지하기 위해 탈-인산화된다. 절단 벡터는 젤 추출 후 컬럼 기반 정제에 의해 비절단 벡터로부터 분리되었다. 재조합 프로모터 단편 (실시예 1)은 그 뒤 Bgl II 절단 벡터로 라이게이션되었다.

- [0126] 벡터는 표준 *E. coli* 클로닝 균주로 전달되었고, LB 카나마이신 선별 플레이트에 분주되어 콜로니당 하나의 재조합 프로모터를 생성하였다. 미니 스케일-플라스미드 제조를 위해 콜로니가 선발되었다. 이 프로모터 클론은 HEK293 세포에의 형질감염 및 그 후의 루시퍼레이즈 발현 분석을 위해 사용되었다.
- [0127] **실시예 3: 프로모터 활성 분석**
- [0128] 재료 및 방법
- [0129] 플라스미드 DNA는 각 재조합 프로모터 유래의 콜로니로부터 정제되었다. 재조합 프로모터를 포함하는 리포터 벡터는 개별적으로 여러 96-웰 플레이트에 있는 HEK293 세포에 형질감염되었다. 형질감염된 세포는 37°C에서 24시간 동안 배양되었다. 각 웰은 Luciferase Assay System 키트 (Promega 사, Wisconsin, USA)를 이용하여 루시퍼레이즈 활성에 대해 분석되었다.
- [0130] 간단히, 각 분석은 하기와 같이 수행되었다: 배양 배지는 각 웰로부터 제거되었다. 리포터 용해 버퍼 100 μ l를 각 웰의 세포에 첨가하였다. 마이크로플레이트(들)을 -20°C에서 30분 동안 배양하여 세포를 용해하였고, 그 후 플레이트를 실온에서 30분 동안 배양함으로써 해동하였다. 세포 용해물은 상하 피펫팅에 의해 균질화되었다. 각 용해물의 시료 25 μ l를 광도계 튜브로 옮겼다. 루시퍼레이즈 분석 시약은 그것에 루시퍼레이즈 분석 버퍼를 첨가함으로써 환원되었다. 시료는 Lumat LB 9507 광도계 (EG&G Berthold 사)로 분석하였다. 광도계는 루시퍼레이즈 분석 시약 25 μ l를 주입한 후 2초의 기간 동안 방출된 광(light)을 기록하도록 설정되었다. 광도계의 산출량은 상대적 광 단위로 제공되었다.
- [0131] 재조합 프로모터는 표준 고-발현 프로모터의 선택과 비교되었다.
- [0132] 결과
- [0133] 결과는 도 2에 나타냈다. 재조합 프로모터 단편 p567 및 p576은 상기 분석에서 CMV [현재 최적 표준(current gold standard)]보다 더 잘 수행되었다.
- [0134] **실시예 4: 시간 경과 실험**
- [0135] 3개의 재조합 프로모터 (p565, p567 및 p576)은 시간-경과 실험을 위해 선택되었다. 결과는 도 3에 나타내었다.
- [0136] 결과는 재조합 프로모터가 형질감염 후 24시간 내지 72시간에 걸쳐 지속적으로 높은 루시퍼레이즈 발현이 발생하게 하는 것으로 나타났다.
- [0137] **실시예 5: 재조합 프로모터에 의한 발현 수준**
- [0138] 본 발명의 재조합 프로모터 p565에 의해 유도된 단백질 발현 수준을, 대조군으로서 나타낸 CMV 프로모터 발현과 함께 도 4에 나타냈다. p565 프로모터는 4가지 다른 상업적으로 유용한 항원들 (단백질 'W', 'X', 'Y' 및 'Z')의 발현에 대해 표준 CMV 프로모터와 비교되었다. 각 항원에 대해, 코딩 서열은 도 1에 나타낸 것과 동일한 벡터에서, CMV 또는 p565 프로모터의 하류에 클로닝되었다.
- [0139] 1일차에, 48-웰 마이크로타이터 플레이트에 HEK293Ad 세포를 무혈청 배양 배지 300 μ l의 부피로 웰 당 30,000 세포의 밀도로 분주하였다. 2일차에, 각 웰의 세포는 각 발현 벡터에 대해 DNA 0.75 μ g으로 형질감염되었다. 세포는 분지된 폴리에틸렌이민 (PEI)을 이용하여, DNA 1 μ g당 3 μ g의 비율로 형질감염되었다. DNA는 세포에 첨가되기 이전에 앞서, DNA:PEI 복합체를 형성하기 위해 PEI와 실온에서 20분 동안 배양되었다. 형질감염이 일어난 지 3일 후, 각 웰 유래의 상등액을 수득하여 웨스턴 블로트에 의해 항원 발현의 양에 대해 분석하였다.
- [0140] **실시예 6: HEK293 세포에서의 발현 수준**
- [0141] 분지된 PEI (23 kDa)를 이용한 일시적 형질감염 방법에 의해, 다양한 인간 유전자 (표 2 참조)가 CMV 프로모터 또는 프로모터 P565i에 의해 인간 배아 신장 세포 (HEK293)에서 과-발현되었다.

표 2

<u>HEK293 세포에서 발현된 인간 유전자</u>	
단백질	Ref
KLF4	>sp Q43474 KLF4_ 인간 krueppel-유사 인자 4
XIAP	>sp P98170 XIAP_ 인간 E3 유틜류틴-단백질 라이게이즈 XIAP
CYP2C1	>sp P33261 CP2C1_ 인간 사이토크롬 P450 2C19
CD4	>sp P16070 CD44_ 인간 CD44 항원
Myc	>sp P01106 MYC_ 인간 MyC 원암유전자 단백질
LOX	>sp P28300 LYOX_ 인간 단백질-라이신 6-옥시데이즈
RAN	>sp P62826 RAN_ 인간 GTP-결합 단백질 Ran
FEV	>sp Q99581 FEV_ 인간 단백질 FEV
ABO	>sp P16442 BGAT_ 인간 조직 혈액형 ABO 시스템 트랜스퍼레이즈
GAPDH	>sp P04406 G3P_ 인간 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로제네이즈
CDK	>sp P06493 CDK1_ 인간 사이클린-의존성 카이네이즈
MyD88	>sp Q99836 MYD88_ 인간 굴수 분화 일차 반응 단백질
CRP	>sp P02741 CRP_ 인간 C-반응 단백질
NRAS	>sp P01111 RASN_ 인간 GTPase NRas
단백질	Ref
IL10	>sp P22301 IL10_ 인간 인터루킨-10
PTH	>sp P01270 PTHY_ 인간 부갑상선 호르몬
TNF	>sp P01375 TNFA_ 인간 종양 폐사 인자
INS	>sp P01308 INS_ 인간 인슐린
CA1	>sp P00915 CAH1_ 인간 탄산무수화효소
JUN	>sp P05412 JUN_ 인간 전사 인자 AP-1
KRAS	>sp P01116 RASK_ 인간 GTPase KRas
CD68	>sp P34810 CD68_ 인간 마크로시알린(MACROSIALIN)
CD14	>sp P08571 CD14_ 인간 단핵구 분화 항원 CD14
CD34	>sp P28906 CD34_ 인간 조혈모 전구 세포 항원 CD34
PTEN	>sp P60484 PTEN_ 인간 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리포스페이트 3-포스파테이즈 및 이중-특이적 단백질 포스파테이즈 PTEN
TP53	>sp P04637 P53_ 인간 세포 종양 항원 p53
NANOG	>sp Q9H9S0 NANOG_ 인간 호메오박스 단백질 NANOG
RPE	> Q96AT9 RPE_ 인간 리볼루오스-포스페이트 3-에피머레이즈

[0142]

[0143] HEK293 세포는 플라스미드 DNA 형질감염 전 24-시간 동안, 웰 당 25,000 세포의 밀도로 48-웰 플레이트 포맷 (Sigma Aldrich 사)의 조직 배양물에 분주되었다. CMV 프로모터 또는 프로모터 P565i로부터 FLAG 표지 인간 유전자를 발현하는 각 플라스미드 DNA (750ng)는, 분자된 PEI (25 kDa)와 1:3의 비율로 혼합되었고, DNA:PEI 복합체는 48-웰 플레이트의 각 웰에 분주된 HEK293 세포에 일시적 형질감염되었다. 각 일시적 형질감염에 의한 FLAG 표지 인간 단백질의 발현은, 형질감염 72-시간 후에 마우스 항-FLAG 일차 항체 및 이차 토끼 항-마우스-IgG-HRP를 이용하여 자동화 웨스턴 블로팅 (Wes™ Protein Simple)에 의해 분석되었다. 결과는 도 5 및 6에 나타냈다.

[0144] 실시예 7: CHO 세포에서의 발현 수준

[0145] 분자된 PEI (23 kDa)를 이용한 일시적 형질감염 방법에 의해, 다양한 인간 유전자 (표 3 참조)가 CMV 프로모터

또는 프로모터 P565i에 의해 CHO K1 세포에서 과-발현되었다.

표 3

<u>CHO 세포에서 과발현된 인간 유전자</u>	
단백질	Ref
RAN	>sp P62826 RAN_ 인간 GTP-결합 핵 단백질 Ran
RPE	>sp Q96AT9 RPE_ 인간 리볼루오스-포스페이트 3-에피마레이즈
FEV	>sp Q99581 FEV_ 인간 단백질 FEV
BCL2	>sp P10415 BCL2_ 인간 세포사멸 조절자 Bcl-2
CA1	>sp P00915 CAH1_ 인간 탄수화효소
STAR	>sp P49675 STAR_ 미토콘드리아의 인간 스테로이드 글로 콜레스테롤 단백질
MYD88	>sp Q99836 MYD88_ 인간 골수 분화 일차 반응 단백질
IGF1	>sp P05019 IGF1_ 인간 인슐린-유사 성장 인자 I
ANG	>sp P03950 ANGI_ 인간 안지오텐신
PI3	>sp P19957 ELAF_ 인간 엘라핀
CXCL1	>sp P09341 GROA_ 인간 설장-조절 알파 단백질
INS1	>sp P01308 INS_ 인간 인슐린
PTMS	>sp P20962 PTMS_ 인간 파라티모신
단백질	Ref
CRP	>sp P02741 CRP_ 인간 C-반응 단백질
TNF	>sp P01375 TNFA_ 인간 종양 고사 인자
BDNF	>sp P23560 BDNF_ 인간 뇌-유래 신경영양 인자
FGF23	>sp Q9GZV9 FGF23_ 인간 설유아세포 성장 인자 23
APOE	>sp P02649 APOE_ 인간 아포지질 단백질
CCL2	>sp P13500 CCL2_ 인간 C-C 모티프 캐모카인 2
MAX	>sp P61244 MAX_ 인간 단백질 max
KRAS	>sp P01116 RASK_ 인간 GTPase KRas
NRAS	>sp P01111 RASN_ 인간 GTPase NRas
BAX	>sp Q07812 BAK_ 인간 세포사멸 조절자 BAX
RAC1	>sp P63000 RAC1_ 인간 Ras-관련 C3 보툴리눔 독소 기질 1
RHOA	>sp P61586 RHOA_ 인간 형질전환 단백질 RhoA
EPO	>sp P01588 EPO_ 인간 에리스로포이에틴
HMGB1	>sp P09429 HMGB1_ 인간 고 운동 군(high mobility group) 단백질 B1

[0146]

[0147] CHO K1 세포는 플라스미드 DNA 형질감염 전 24-시간 동안 웰 당 20,000 세포의 밀도로 48-웰 플레이트 포맷 (Sigma Aldrich)에서 조직 배양물에 분주되었다. CMV 프로모터 또는 프로모터 P565i로부터 FLAG 표지 인간 유전자를 발현하는 각 플라스미드 DNA (750ng)는, 분지된 PEI (25 kDa)와 1:3의 비율로 혼합되었고, DNA:PEI 복합체는 48-웰 플레이트의 각 웰에 분주된 CHO K1 세포에 일시적으로 형질감염되었다. 일시적 형질감염에 의한 각 FLAG 표지 인간 단백질의 발현은 형질감염 72-시간 후에, 마우스 항-FLAG 일차 항체 및 이차 토끼 항-마우스-IgG-HRP를 이용하여, 자동화 웨스턴 블로팅 (Wes™ Protein Simple)으로 분석되었다. 결과는 도 7 및 8에 나타냈다.

[0148] 실시예 8: HCT116 세포에서의 발현 수준

[0149] HCT116 세포에서 분자된 PEI (25kDa)를 이용한 일시적 형질감염 방법에 의해, 녹색 형광 단백질 (GFP)이 CMV, P565i, P565, P576, P567 프로모터에 의해 발현되었다.

[0150] HCT116 세포는 플라스미드 DNA 형질감염 전 24-시간 동안, 조직 배양 처리된 48-웰 플레이트 포맷 (Sigma Aldrich)에 웰 당 25,000 세포의 밀도로 분주되었다. CMV, P565i, P565, P576 또는 P567 프로모터에 의해 증강된 녹색 형광 단백질을 발현하는 각 플라스미드 DNA (750ng)는 분자된 PEI (25 kDa)와 1:3의 비율로 혼합되었고, DNA:PEI 복합체는 HCT116 세포로 일시적으로 형질감염되었다. HCT116 세포의 MFI에 의해 결정된 증강된 녹색 단백질 발현은, 형질감염 48-시간 후 유세포분석기에 의해 측정되었다. 결과는 도 9에 나타냈다.

[0151] 실시예 9: A549 세포에서의 발현 수준

[0152] A549 세포에서 분자된 PEI (25kDa)를 이용한 일시적 형질감염 방법에 의해 녹색 형광 단백질 (GFP)이 CMV, P565i, P565, P576, P567 프로모터에 의해 발현되었다.

[0153] A549 세포는 플라스미드 DNA 형질감염 전 24-시간 동안, 조직 배양 처리된 48-웰 플레이트 포맷 (Sigma Aldrich)에 웰 당 25,000 세포의 밀도로 분주되었다. CMV, P565i, P565, P576, 또는 P567 프로모터에 의해 증강된 녹색 형광 단백질을 발현하는 각 플라스미드 DNA (750ng)는, 분자된 PEI (25 kDa)와 1:3의 비율로 혼합되었고, DNA:PEI 복합체는 A549 세포로 일시적으로 형질감염되었다. A549 세포의 MFI에 의해 결정된 증강된 녹색 단백질 발현을 형질감염 48-시간 후 유세포분석기에 의해 측정하였다. 결과는 도 10에 나타냈다.

[0154] 서열

서열 번호 3

```
AGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTCATAGCCCATATATGGAGTTCCCGTACAT  
AACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCCAACGACCCCCGCC
```

서열 번호 2

```
CTACCGGGTAGGGGAGGCCTTTCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTAGCA  
GCCCGCTGGGACTTGGCCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCA  
CATCCACCGGTAGGCGTCAATGGAAAGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGAACATAC  
GTCATT
```

서열 번호 1

```
CGTGAGGCTCCGGTGCCCCTCAGTGGCAGAGCGCACATGCCACAGTCCCCG  
AGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCG  
GGGTAACACTGGAAAGTGTGACTGGCTCCGCCTTTCCCGAGGGTGG  
GGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTGCCTAGTCGCGTGAACGTCAATGGAAAGTCCCTA  
TTGGCGTTACTATGGGAACATACGTCATTGACGTCAATGACGGTAATGGCCC  
GCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTCCACTTGGCAGTACAT  
CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGCTGATGCGGTTGGCAGTACATCAATG  
GGCGTGGATAGCGGTTGACTCACGGGGATTTCAAGTCTCCACCCCC
```

서열 번호 4

```
ATTGACGTCAATGGGAGTTGTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTCCAAAATG  
TCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGCGGTAGGCAGTACGGTGGGA  
GGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTAGTGAACCGTCAGATC
```

[0155]

서열 번호 7

GTTGTTCGCTTGATAAACTTCCAGGATTCGGAGACAGTATTGAAGCTCAGGTACA
GAAATAATTCACCTTCTTCTCTTCTATTCAAGTGTGGCACATCTGTAAACGTTCA
CTCTTCACTTAGAGACATCCTCAACCAAATCACCAAACCAA

서열 번호 6

GCCCAGGAAGTACACGAGAAGCTCCGAGGATTGGCTGAAGTCCAACGTCTCTGAT
TGCAGGTGGCTCAGAGCACCCGTATCATTTGGAGGTGAGTGGCTTGTTGGTCCCGG
CTGAGGTGGAGTGGCTGAGGACTAGACTGAGCCCTCGGACATGGAGGTGGGG
TGGGGCAGACTCATCCCATTCTGACCAAGGCCCTGTTCTGCTCCCTCCAGGCT
CTGTGACTGGGGCACCTGCAAGGAGCTGGCCAGGCCAGCCTGACGTGGACGGCT
TCCTTGTGGTGGTGGCTTCCCTCAAGCCCGAATTGTGGACATCATCAACGCCAAA
CAA

서열 번호 5

TGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTT
AAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTCTG
ATAGGCACTGACTCTCTGCCTATTGGTCTATTCCCACCCCTAG

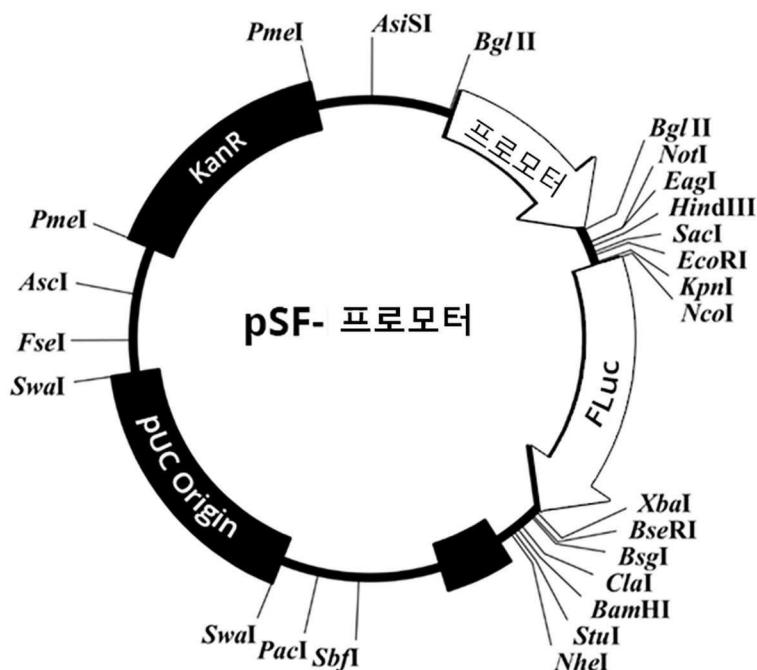
[0156]

[0157]

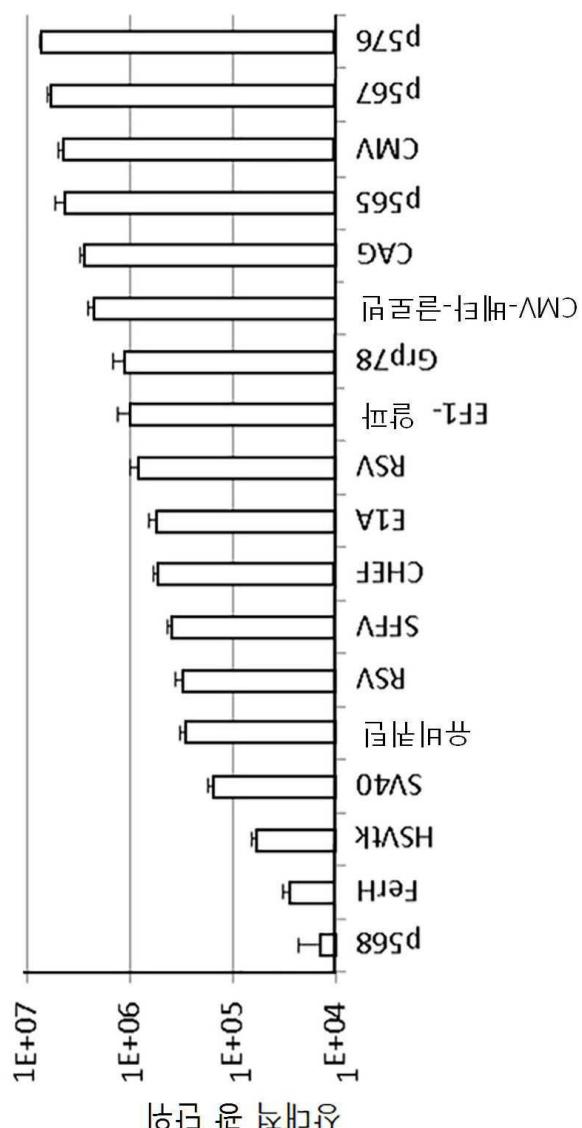
서열 목록 프리 텍스트

[0158]

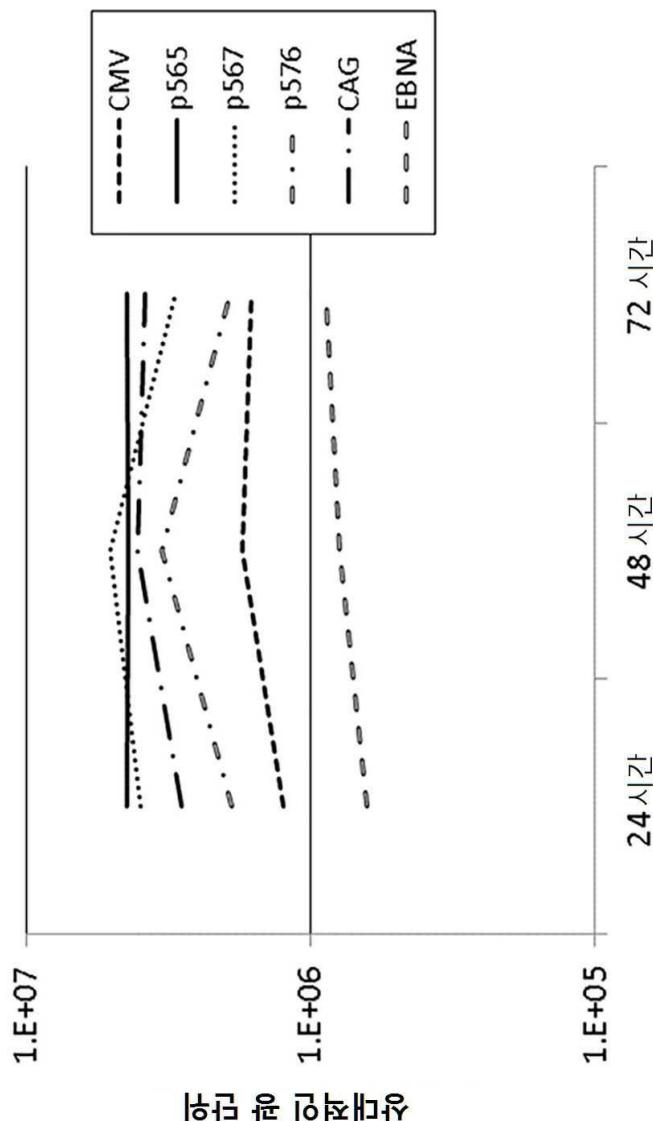
<223> 합성 프로모터 요소

도면**도면1**

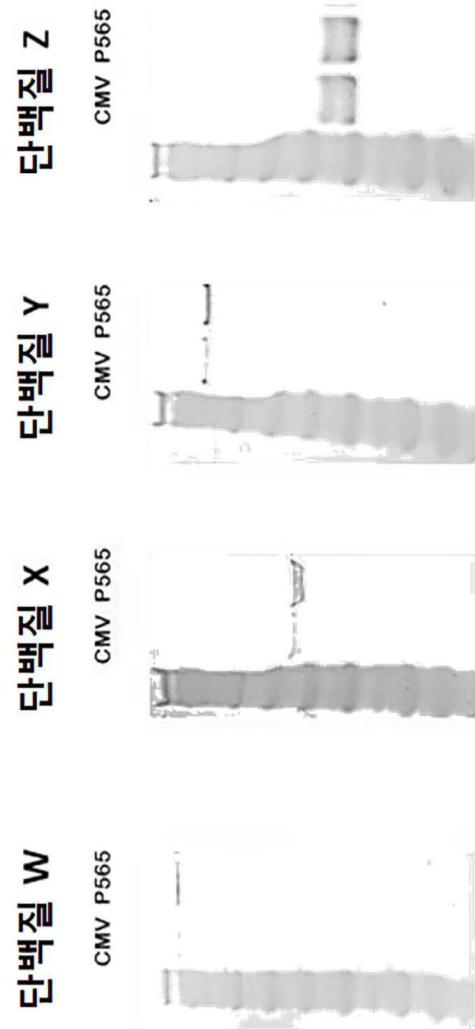
도면2



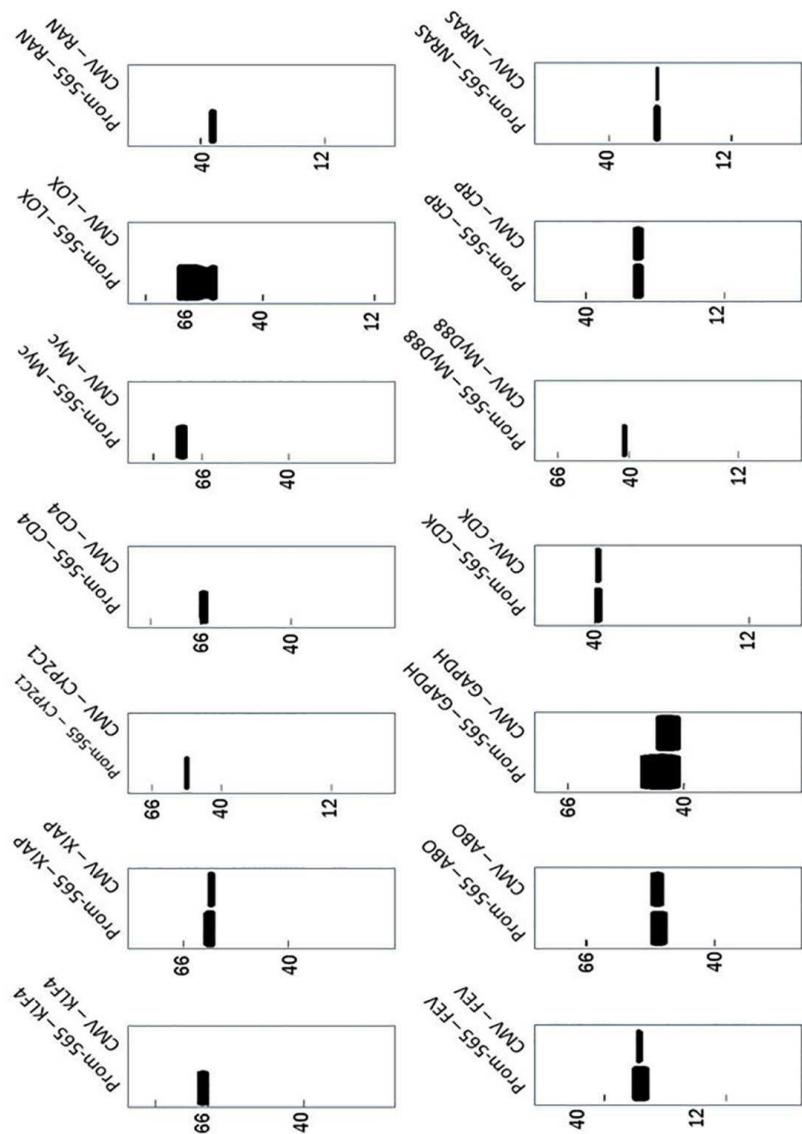
도면3



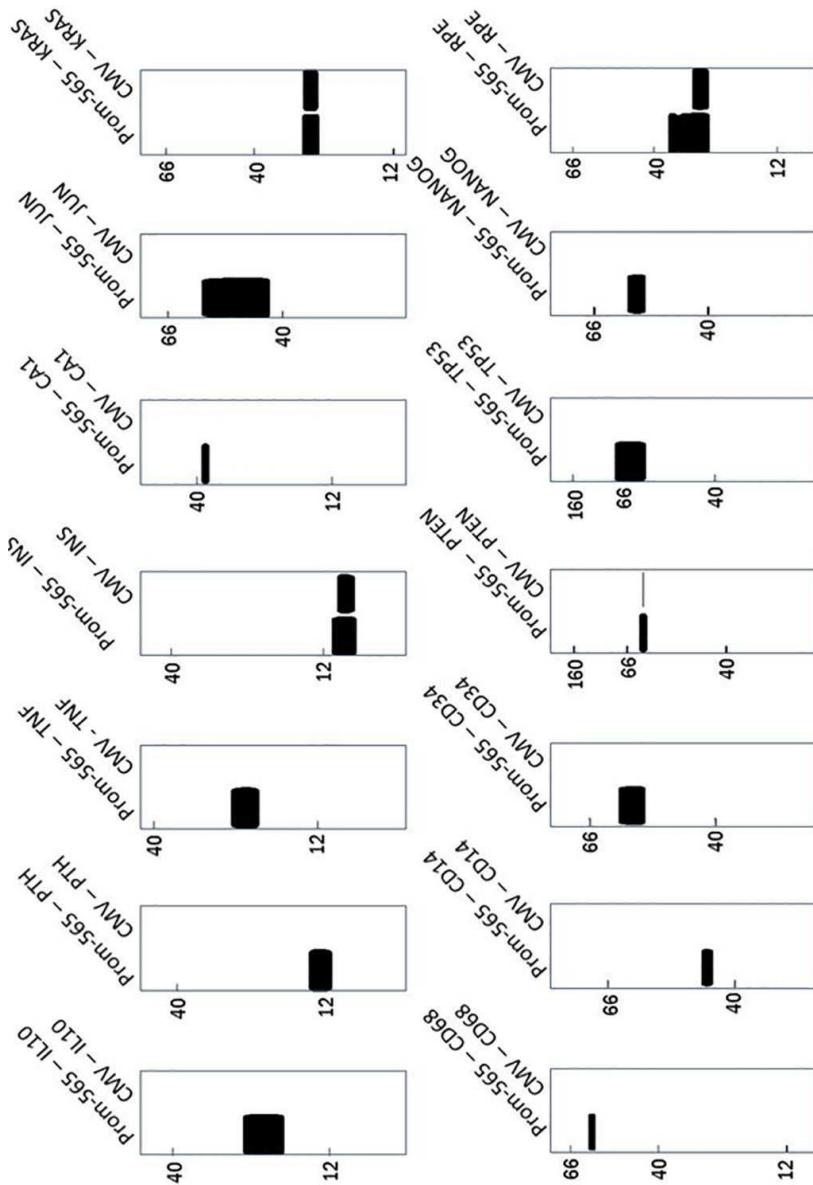
도면4



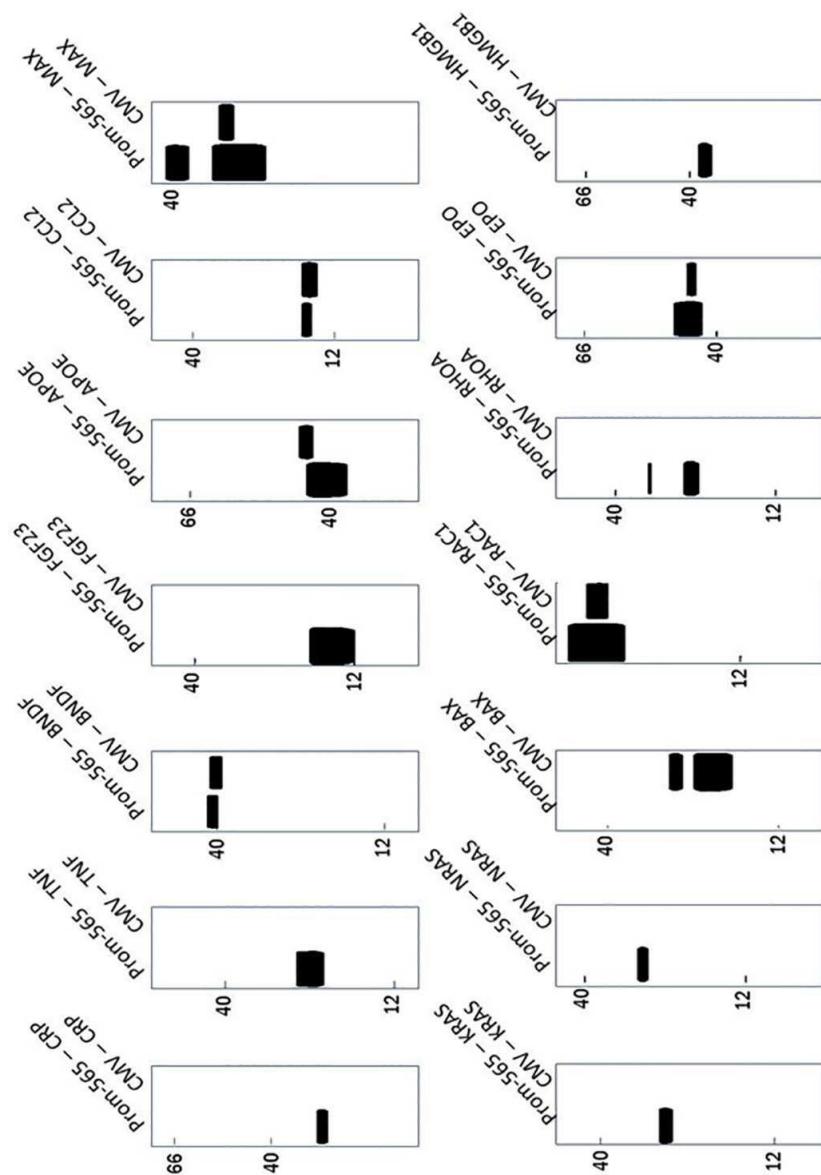
도면5



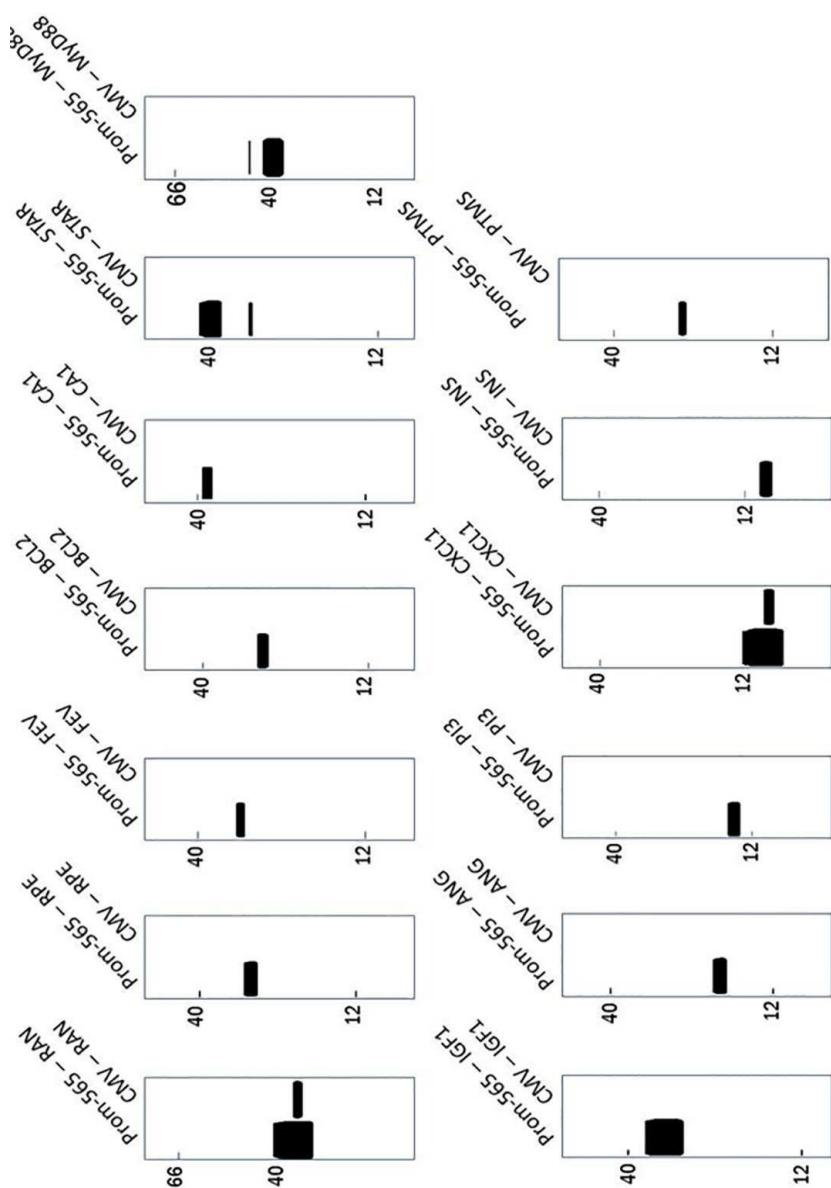
9면



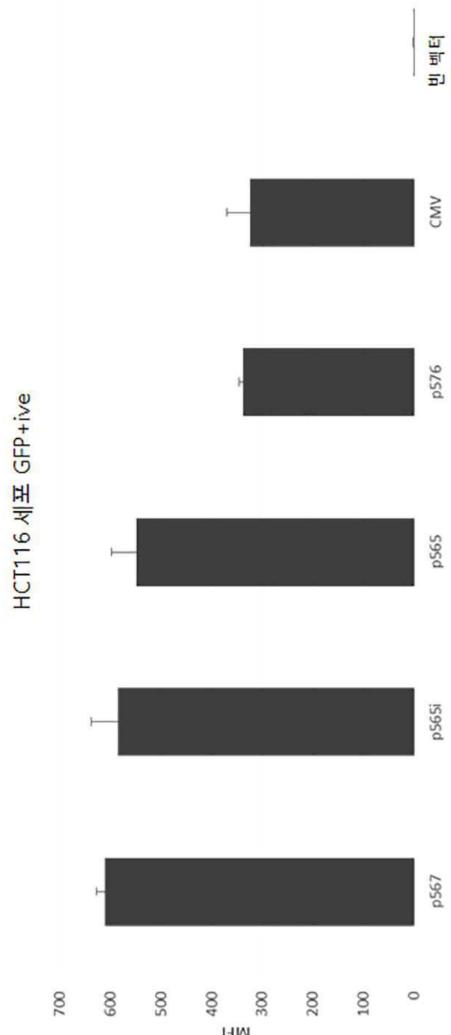
도면7



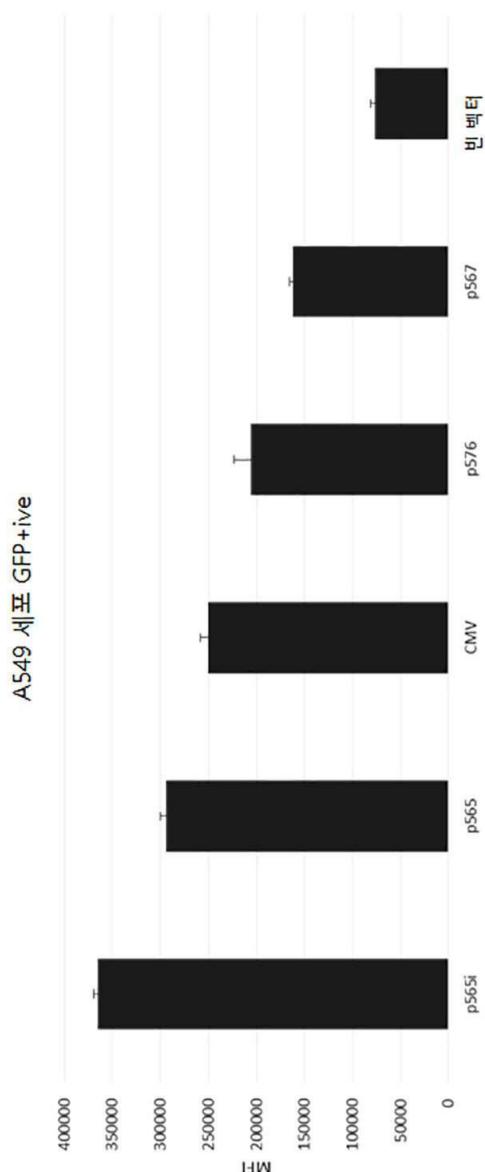
도면8



도면9



도면10



서 열 목 록

- <110> Oxford Genetics Limited
- <120> Promoter
- <130> MPI18-010
- <150> GB 1603577.6
- <151> 2016-03-01
- <160> 7
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 433
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic promoter element

<400> 1

cgtgaggctc cggtgcccgta cagtggcgag acgcacatc gcccacagtcc cccgagaagt	60
tggggggagg ggtcggaat tgaaccgggtg cctagagaag gtggcgccgg gtaaactggg	120
aaagtgtatgt cgtgtactgg ctccgcctt ttcccgaggg tgggggagaa ccgtatataa	180
gtgcactagt cgccgtgaac gtcaatggaa agtccctatt ggcgttacta tggAACATA	240
cgtcattatt gacgtcaatg acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac	300
cttatggac tticctactt ggcagtacat ctacgtatTA gtcatcgcta ttaccatgct	360
gatgcggttt tggcagtaca tcaatggcg tggatagcgg tttgactcac ggggattcc	420
aagtctccac ccc	433

<210> 2

<211> 172

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic promoter element

<

400> 2

ctaccggta ggggaggcgc tttcccaag gcagtctgga gcatgcgctt tagcagcccc	60
gctggcaact tggcgtaca caagtggct ctggcctcgc acacattcca catccacgg	120
taggcgtcaa tgaaaagtcc ctattggct tactatggaa acatacgtca tt	172

<210> 3

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic promoter element

<400> 3

agtaatcaat tacgggtca ttagttcata gcccataatggagttccgc gttacataaac	60
ttacggtaaa tggccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgccc	106

<210> 4

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic promoter element

<400> 4

```
attgacgtca atggagttt gtttggcac caaatcaac gggacttcc aaaatgtcgt      60
aacaactccg ccccatcgac gcaaatggc ggtaggcgt tacggtgaa ggtctatata      120
agcagagctg gtttagtcaa ccgtcagatc      150
```

<210> 5

<211> 157

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic promoter element

<400> 5

```
tgaagtttgtt ggtgaggccc tggcaggtt ggtatcaagg ttacaagaca ggtaaagga      60
```



```
gaccaataga aactggccat gtggagacag agaagactct tgggttctg ataggcactg      120
actctctctg cctattggtc tattttccca cccttag      157
```

<210> 6

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic promoter element

<400> 6

```
gcccaggaa tacacgagaa gctccgagga ttggctgaag tccaacgtct ctgattgcgg      60
tggctcagag caccgtatc atttggagg tgagtggctt tgggtcccggtt ctgaggtgg      120
gtgggctgag gactagactg agccctcgaa catggaggtg gggatggggc agactcatcc      180
```



```
cattttgac caagcccttg ttctgctccc ttcccgaggct ctgtgactgg ggcaacctgc      240
aaggagctgg ccagccagcc tgacgtggac ggcttccttg tgggtggtgc ttccctcaag      300
cccgaaattcg tggacatcat caacgccaaa caa      333
```

<210> 7

<211> 155

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic promoter element

<400> 7

```
gttggcgtt ttgataaact tccaggattc ggagacagta ttgaagctca ggtacagaaa      60
```

taatttcacc ttctttctc ttcttattca gtgtggcaca tctgtaaacg ttcaactttc 120

acttagagac atcccaacc aaatcaccaa accaa 155