



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년11월21일
(11) 등록번호 10-1085210
(24) 등록일자 2011년11월14일

(51) Int. Cl.
C12N 15/11 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7005341(분할)
(22) 출원일자(국제출원일자) 1999년03월19일
심사청구일자 2006년03월16일
(85) 번역문제출일자 2006년03월16일
(65) 공개번호 10-2006-0030526
(43) 공개일자 2006년04월10일
(62) 원출원 특허 10-2000-7010419
원출원일자(국제출원일자) 1999년03월19일
심사청구일자 2004년03월18일
(86) 국제출원번호 PCT/AU1999/000195
(87) 국제공개번호 WO 1999/49029
국제공개일자 1999년09월30일
(30) 우선권주장
PP 2492 1998년03월20일 오스트레일리아(AU)
PP 2499 1998년03월20일 오스트레일리아(AU)
(56) 선행기술조사문헌
Nature Genetics 18(1): 56-59 (1998.1)
Nucleic Acids Res. 25(16): 3218-3227
(1997.8.15)
US5578716 A

(73) 특허권자
커먼웰쓰 사이언티픽 앤드 인더스트리얼 리서치
오가니제이션
오스트레일리아 2612 오스트레일리언 캐피탈 테리
토리 캠펔 라임스톤 애비뉴
(72) 발명자
그라함 마이클 웨인
오스트레일리아 큐엘디 4076 세인트 루시아 라글
란 스트리트 42
라이스 로버트 노만
오스트레일리아 큐엘디 4073 시너몬 파크 폴리 플
레이스 39
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박장원

전체 청구항 수 : 총 12 항

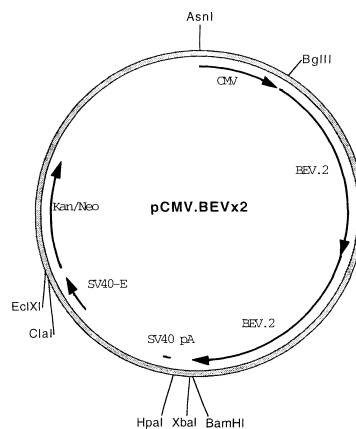
심사관 : 노은주

(54) 유전자 발현 조절방법

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 트랜스제닉 개체, 특히 트랜스제닉 동물 또는 식물의 세포, 조직 또는 기관에서 고유한 유전자 발현을 조절하기 위한 유전자 발현 조절 방법 및 합성 유전자에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 세포, 조직, 기관 또는 개체 전체에서 표적 유전자의 발현을 후-전사적으로 변형 또는 조절하기 위한 재조합 dna 기술을 이용함으로써 신규한 표현형을 생산한다. 도입될 경우 개체 내에서 표적 유전자 또는 고유한 유전자의 발현을 억제, 지연 또는 감소시킬 수 있는 신규한 합성 유전자 및 유전 구조물도 제공된다.

대표도 - 도20



(72) 발명자

그라함 마이클 웨인

오스트레일리아 큐엘디 4076 세인트 루시아 라글란 스트리트 42

라이스 로버트 노만

오스트레일리아 큐엘디 4073 시너몬 파크 폴리 플 레이스39

워터하우스 피터 미가엘

오스트레일리아 에이씨티 2602 오크너 반진크 스트리트 5

왕 밍보

오스트레일리아 에이씨티 2617 칼콘 키크와 스트리트 3

(81) 지정국

AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, AE, ZA, GD, GH, GM, HR, ID, SL, YU, ZW, IN, AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG, SL, GH, GM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, FI, CY), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG, GW),

특허청구의 범위

청구항 1

식물 세포에서 표적 유전자의 발현을 억제, 지연 또는 그 외의 방법으로 감소시킬 수 있는 합성 유전자로서, 상기 합성 유전자는 상기 표적 유전자의 뉴클레오타이드 서열과 95% 이상 동일한, 적어도 100개 길이의 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열의 다중 복제물을 포함하는 외래 핵산 분자를 포함하고, 여기서 상기 다중 복제물은 분단된 팔린드롬 서열로서 제시되며 외래 핵산은 단일 프로모터 서열에 의해 작동적으로 조절되는 것인 합성 유전자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 표적 유전자는 상기 식물 세포의 게놈에 대하여 내인성인 것인 합성 유전자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 표적 유전자는 상기 식물 세포의 게놈에 대하여 비내인성인 것인 합성 유전자.

청구항 4

제1항에 있어서, 식물 세포에서 작동가능한 터미네이터를 추가로 포함하는 것인 합성 유전자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 기재된 합성 유전자와 담체, 부형제 또는 희석제를 함유하여 이루어지는, 식물 세포에서 표적 유전자의 발현을 억제, 지연 또는 그 외의 방법으로 감소시키기 위한 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 기재된 합성 유전자를 포함하는 분리된 식물 세포.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 기재된 합성 유전자를 포함하는 트랜스제닉 식물.

청구항 8

식물 세포에서 표적 유전자의 발현을 억제, 지연 또는 그 외의 방법으로 감소시키는 방법으로서 다음 단계, 즉:

- i) 상기 표적 유전자의 뉴클레오타이드 서열과 95% 이상 동일한, 적어도 100개 길이의 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열의 다중 복제물을 포함하는 외래 핵산 분자를 선택하는 공정, 여기서 상기 다중 복제물은 분단된 팔린드롬 서열로서 제시됨,
 - ii) 단일 프로모터 서열의 작동적 조절 하에 상기 외래 핵산 분자를 포함하는 합성 유전자를 제조하는 공정,
 - iii) 상기 합성 유전자를 상기 세포에 도입하는 공정, 및
 - iv) 상기 합성 유전자를 상기 세포에서 발현시키는 공정
- 을 포함하여 이루어지는 방법.

단, 상기 표적 유전자의 발현의 억제, 지연 또는 그 외의 방법에 의한 감소는 반드시 상기 표적 유전자의 전사의 억제나 감소에 의한 것만은 아니다.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 표적 유전자는 상기 식물 세포에 대하여 내인성인 것인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 표적 유전자는 상기 식물 세포에 대하여 비내인성인 것인 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 표적 유전자의 mRNA 전사 산물의 번역이 감소 또는 지연되는 것인 방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 표적 유전자의 mRNA 전사 산물은 내인성 숙주 세포계에 의하여 서열 특이적으로 분해되는 것인 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- [0069] 진핵 생물체에 있어서 대사경로를 조절하는 것은 그 개체의 특정 세포, 조직 또는 기관내에서 새로운 형질을 창출하거나 새로운 형질을 도입하는 목적에 알맞다. 재조합 DNA 기술은 진핵생물의 유전자 발현을 조절하는 메카니즘을 이해하는데 커다란 진전을 가져왔으나, 새로운 형질을 생산하기 위해 유전자 발현을 실제로 조작하는데 있어서는 그다지 큰 진전이 이루어지지 않았다. 더욱이, 인공적인 방식으로 진핵생물의 유전자 발현 수위를 조절할 수 있는 수단은 극히 제한되어 있다.
- [0070] 유전자 발현을 억압, 지연 또는 감소시키는 한가지 접근방식은 정상적으로는 전사되어 폴리펩티드로 번역되게 되는 핵 유전자의 상보적인 가닥으로부터 전사되는 mRNA 분자를 이용한다. 이 접근방식에 관여하는 정확한 메카니즘은 확립되지 않았지만, 이중-가닥 mRNA가 상보적인 뉴클레오타이드 서열 사이에서 염기쌍에 의해 형성되어, 컴플렉스를 만들고, 이것은 저효율로 번역되고/또는 번역에 앞서 세포내 리보뉴클리아제 효소에 의해 분해되는 것으로 추정되어왔다.
- [0071] 특정 유전자의 발현을 표적화하는 이들 두가지 방식의 효율은 매우 저조하고 변동폭이 심한 결과가 얻어지기 일쑤이다. 예컨대, 5'-미번역 영역, 3'-미번역 영역, 코딩 영역 또는 표적 유전자 발현에 있어서 인트론 서열과 같이, 상이한 유전자 영역을 이용할 경우 불일치되는 결과들이 얻어진다. 따라서, 현존하는 기술을 이용하여 유전자 발현을 억압, 지연 또는 감소시키는 가장 효과적인 수단을 제공해주는 유전서열의 특징에 관해서는 현재 어떠한 일치도 보지 못하고 있다. 뿐만 아니라, 이러한 고도의 변동폭은 세대간에 존재하기 때문에 유전자 발현이 현저히 변형된 어떤 개체의 자손에 있어서 특정 유전자의 억압 정도를 예측하는 것은 불가능하다.
- [0072] 최근, Dorer와 Henikoff (1994)는 Polycomb 중 (즉, Pc-G 시스템; Pal-Bhadra 외, 1997)에 의한 *Drosophila* 계놈에 있어서 직렬적으로 반복된 유전자 복제물의 사일런싱 (silencing)과 분산된 *Drosophila* Adh 유전자의 전사 억압을 입증한 바 있다. 그러나, 유전자-표적 기술과의 이러한 접근방식의 조합의 부재하에서는, 특정 유전자의 발현을 표적화할 수 있는 서열이 계놈의 분산된 위치로 도입되는 재조합 수단에 있어서는, 직렬반복된 유전자 복제물의 이러한 사일런싱은 동물 세포에서 유전자 발현을 조작하기 위한 시도에서는 거의 유용성이 없다. 비록 이론상으로는 가능하지만, 이러한 조합은 분리에 이용되는 유전자-표적화 접근방식의 저효율에 기초할 때 단지 낮은 효율로만 기능할 것으로 예상되며, 또한, 복잡한 벡터 시스템을 필요로 할 것이다. 또한, *Drosophila* Pc-G 시스템과 같이 전사 억압을 이용하는 경우 특정 표적 유전자의 발현을 변형시킬 수 있는 조절 메카니즘에 대한 지식이 요구되는 것으로 보이며, 그 결과, 동물 세포에 있어서 유전자 발현을 억압, 지연 또는 감소시키는 일반적인 기술로서는 실용화되기 어려울 것이다.
- [0073] 이러한 현상에 관여하는 메카니즘에 대한 이해의 부족은 유전자 발현 정도를 조절하는 기술, 특히 재조합 DNA 기술에 의한 특정 유전자의 발현을 지연, 억압 또는 감소시키는 기술이 거의 발전되지 않았음을 의미하는 것이다.
- [0074] 뿐만 아니라, 이러한 접근방식의 예측불허성 결과, 진핵 또는 원핵생물에서 특정 유전자의 발현 정도를 변형시키기 위한 상업적으로 살아있는 수단이 현재 없다.
- [0075] 따라서, 유전자 발현을 변형시키는 개선된 방법, 특히 새로운 표현형 형질을 도입시키기 위한 목적에서 동물 세포에서 유전자 발현을 억압, 지연 또는 감소시키는 방법을 개선시킬 필요가 생겼다. 특히, 이러한 방법은 부수적인 유전자-표적 접근법을 수행할 필요 없이, 표현형의 변형을 위한 일반적인 수단을 제공하는 것이어야만 한다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- [0076] 본 발명은 유전자 발현을 변경시키는 방법 및 트랜스제닉 개체의 세포, 조직 및 기관에서의 고유의 유전자 발현을 변형시키기 위한 합성 유전자에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는, 트랜스제닉(transgenic) 동물 또는 식물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 세포, 조직, 기관 또는 개체 전체에 있어서의 표적 유전자의 발현을 후-전사적으로 변경 또는 조절함으로써, 신규한 표현형을 생산하는 재조합 DNA 기술에 관한 것이다. 어떤 개체에 도입될 경우 고유 유전자 또는 표적 유전자의 발현의 지연 또는 감소를 억압할 수 있는 신규한 합성 유전자 및 유전 구조물도 제공된다.
- [0077] 일반사항

- [0078] 본 명세서에서 언급되는 참고문헌은 본 명세서 끝 부분에 요약해 두었다.
- [0079] 본문에서 "~로부터 유도된"이라는 용어는 특정의 정수가 특정의 소스 또는 스페이스로부터 얻어질 수 있음을 의미하는 것이며, 반드시 그 특정 소스 또는 스페이스로부터 직접 얻어질 필요는 없다.
- [0080] 본 명세서에서, 달리 언급되지 않는 한, "포함한다 (comprises)" 또는 "포함한다(comprises)" 또는 "포함하는 (comprising)"는 표현은 언급된 단계 또는 요소 또는 정수 또는 단계 또는 요소 또는 정수들의 그룹을 포함함을 의미하나, 그렇다고 그 외의 다른 단계 또는 요소 또는 정수나 또는 요소나 정수의 그룹을 포함하지 않는다는 것은 아니다.
- [0081] 본 발명이 속한 분야의 당업자들은 본 명세서에 설명된 사항 외에 본 발명에 어떠한 변형이나 변경이 가해질 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 본 발명은 이러한 모든 변형과 변경을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명은 또한 본 명세서에서 언급된 모든 단계, 특성, 조성물 및 화합물을 개별적으로나 집합적으로 모두 포함하며 이들 단계나 특성들의 2가지 이상의 여하한 모든 조합도 포함하는 것이다.
- [0082] 본 발명은 본 명세서에 설명된 특정 구체예에 의해 그 범위가 한정되는 것이 아니며, 이러한 특정 구체예는 단지 예시 목적을 위해 제시된 것이다. 기능적으로 동등한 생성물, 조성물 및 방법은 본 발명의 범위에 명백히 속하는 것이다.
- [0083] 본 명세서에 포함된 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열 정보를 함유하는 서열 동정 번호 (SEQ ID NOS.)를 요약서 뒤에 첨부하였으며 PatentIn Version 2.0 프로그램을 이용하여 작성하였다. 각각의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열은 <210> 표지 밑에 나타내었으며 그 뒤에 서열 동정표 (예컨대 <210>1, <210>2, 등)를 나타내었다. 서열의 길이, 종류 (DNA, 단백질 (PRT), 등) 및 각각의 뉴클레오타이드나 아미노산 서열의 기원이 되는 개체는 번호표 <211>, <212>, 및 <213>에 각각 나타내었다. 본 명세서에서 나타낸 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 번호표지 <400> 이하에 나타내었고 서열 동정표 (예컨대 <400>1, <400>2, 등)를 나타내었다.
- [0084] 본 명세서에서 모든 뉴클레오타이드 잔기는 IUPAC-ICB Biochemical Nomenclature Commision의 권장 표시를 따랐으며, A는 아데닌, C는 시토신, G는 구아닌, T는 티민, Y는 피리미딘 잔기, R은 퓨린 잔기, M은 아데닌 또는 시토신, K는 구아닌 또는 티민, S는 구아닌 또는 시토신, W는 아데닌 또는 티민, H는 구아닌 이외의 뉴클레오타이드, B는 아데닌 이외의 뉴클레오타이드, V는 티민 이외의 뉴클레오타이드, D는 시토신 이외의 뉴클레오타이드를 나타내고 N은 어떠한 뉴클레오타이드를 나타내는 것이어도 좋다.
- [0085] 본 명세서에서 사용한, IUPAC-ICB Biochemical Nomenclature Commision에 의해 권장되는 아미노산 잔기 표시를 다음 표 1에 수록하였다.

[표 1]

아미노산	3-문자 코드	1-문자 코드
알라닌	Ala	A
아르기닌	Arg	R
아스파라긴	Asn	N
아스파르트산	Asp	D
시스틴	Cys	C
글루타민	Gln	Q
글루탐산	Glu	E
글리신	Gly	G
히스티딘	His	H
이소류신	Ile	I
류신	Leu	L
라이신	Lys	K
메티오닌	Met	M
페닐알라닌	Phe	F
프롤린	Pro	P
세린	Ser	S
트레오닌	Thr	T
트립토판	Trp	W
티로신	Tyr	Y
발린	Val	V

아스파테이트/아스파라긴	Baa	B
글루타메이트/글루타민	Zaa	Z
여하한 아미노산	Xaa	X

[0088] 발명의 요약

[0089] 본 발명은 핵산 분자의 전사 생성물이, 그 발현을 변형시키고자 하는 뉴클레오타이드 서열로서 고유의 또는 비-고유의 표적 서열의 전사체의 뉴클레오타이드 서열과 실제로 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인, 프로모터에 작동적으로 결합된 핵산 분자를 포함하는 형질전환 세포들로부터 한가지 이상의 소망되는 형질을 나타내는 세포들을 생산 및 선택할 수 있다는 본 발명자들의 놀라운 발견에 부분적으로 기초한 것이다. 형질전환된 세포들은 신규한 형질, 특히 바이러스 내성 및 고유 유전자의 변형 발현과 같은 신규 형질을 나타낼 수 있는 조직 전체, 기관 또는 개체 내에서 재생된다.

[0090] 따라서, 본 발명의 한가지 측면은 동물 세포, 조직 또는 기관에서 표적 유전자를 발현시키기 위한 변형방법을 제공하며 상기 방법은 상기 세포, 조직 또는 기관에 표적 유전자 또는 그의 대역 또는 그의 상보물의 뉴클레오타이드 서열과 실제로 동일한 뉴클레오타이드 서열의 멀티플 복제물 (multiple copies)을 포함하는 한가지 이상의 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자를, 변형시키고자 하는 상기 표적 유전자의 mRNA 산물이 번역되는데 충분한 시간 및 조건하에 도입하는 단계를 적어도 포함하는, 표적 유전자의 발현 조절방법을 제공하는 것으로서, 이때 단, 상기 mRNA 산물의 전사는 배타적으로 억압 또는 감소되는 것은 아니다.

[0091] 특히 바람직한 구체예에서, 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자는 표적 유전자의 mRNA 산물의 뉴클레오타이드 서열과 실제로 동일한 mRNA 분자의 복제물을 복수개 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 표적 유전자의 멀티플 복제물들은 직렬적으로 반복된 서열들인 것이 좋다.

[0092] 더욱 바람직한 구체예에서, 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자는 mRNA를 생산하기 위해 적어도 전사가 가능한 발현가능 형태이어야 한다.

[0093] 표적 유전자는 동물 세포에 고유한 유전자이거나, 또는, 외래 유전자, 그중에서도 바이러스 또는 외래의 유전적 서열일 수 있다. 바람직하게는, 표적 유전자는 바이러스 유전 서열인 것이 좋다.

[0094] 본 발명은 진핵 유전자 발현, 특히 인간 또는 동물의 유전자 발현의 조절, 및 심지어는 척추 동물 및 무척추동물, 예컨대, 곤충, 수중 동물 (예컨대 어류, 조개류, 연체동물, 갑각류 예컨대 게, 가재 및 참새우, 조류 및 포유류)의 유전자 발현을 조절하는데 유용하다.

[0095] 여러가지 종류의 형질은 적절한 공정과 충분히 많은 수의 형질전환된 세포 중에서 선택가능하다. 이러한 형질에는, 육안관찰가능한 형질, 질병-저항성 형질 및 병원체-저항성 형질들이 포함되나 이에 한정되지 않는다. 조절적인 효과는 식물과 동물에서 발현되는 여러가지 유전자, 예컨대, 세포 대사 또는 세포 형질전환에 책임이 있는 내인성 유전자, 온코진, 전사 인자 및 기타 세포 대사에 관여하는 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자에 적용가능하다.

[0096] 예컨대, 마우스에 있어서 티로시나제 유전자의 발현을 표적화시킴으로써 안료 생산을 변경시킬 수 있다. 이는 흑색 마우스에 있어서 백반증의 신규한 표현형을 제공한다. 식물 세포 또는 동물 세포에 있어서 바이러스 복제에 요구되는 유전자를 표적화함으로써, 바이러스 레플리카제, 폴리머라제, 코트 단백질 또는 언코팅 유전자, 또는 프로테아제 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 멀티플 복제물을 포함하는 유전자 구조물을 그것이 발현되는 세포 내로 도입하여, 그 세포에게 바이러스에 대한 면역성을 부여할 수 있다.

[0097] 본 발명을 수행함에 있어서, 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자들은 일반적으로 표적 유전자 서열과 약 85% 이상의 상동성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 것이나, 그보다 높은 상동성은 표적 유전자 서열의 보다 효과적인 발현 조절을 가능케할 것이다. 실제로 더 큰 상동성 또는 약 90% 이상의 상동성이 바람직하며, 심지어는 절대적 동일성에 대해 약 95% 이상의 상동성을 갖는 소망된다.

[0098] 도입된 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자 서열은 절대적인 상동성까지는 필요로 하지 않고, 표적 유전자의 최초 전사 산물 또는 완전히 가공된 mRNA에 대해, 완전한 길이를 가질 필요는 없다. 완전한 길이보다는 짧은 길이의 서열에서 상동성이 더 높으면, 더 길고 덜 상동적인 서열을 보상해준다. 또한, 도입된 서열은 동일한 인트론 또는 엑손 패턴을 가질 필요는 없고, 비-코딩 세그먼트의 상동성이 똑같이 효과적일 것이다. 일반적으로, 표적 유전자의 크기에 따라 20-100 이상의 뉴클레오타이드보다 긴 서열이 사용되어야 하며, 약 200-300 이상의 뉴

클레오타이드보다 큰 서열이 바람직하지만, 500-1000 이상의 뉴클레오타이드 서열이 특히 바람직할 것이다.

[0099] 본 발명의 두번째 측면은 트랜스펙션 또는 형질전환된 원핵 또는 진핵 생물의 세포, 조직 또는 기관에서 표적 유전자 발현을 변형시킬 수 있는 합성 유전자를 제공하는 것으로, 여기서 상기 합성 유전자는 상기 세포, 조직 또는 기관에서 작동가능한 프로모터 서열의 조절 하에, 작동적으로 위치된 상기 표적 유전자 또는 그의 유도체 또는 상보적인 서열의 뉴클레오타이드 서열과 실제로 동일한 뉴클레오타이드 서열의 복제물을 복수개 함유하는 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자를 적어도 포함하는 것이다.

[0100] 본 발명의 세번째 측면은 트랜스펙션 또는 형질전환된 원핵 또는 진핵 생물의 세포, 조직, 또는 기관에서 표적 유전자 발현을 변형시킬 수 있는 합성 유전자를 제공하는 것으로, 여기서 상기 합성 유전자는 적어도 멀티플 구조 유전자 서열을 포함하며, 상기 구조적 유전자 서열 각각은 상기 표적 유전자 또는 그의 유도체 또는 그와 상보적인 서열의 뉴클레오타이드 서열과 실제로 동일한 뉴클레오타이드 서열을 함유하고, 여기서 상기 멀티플 구조 유전자 서열은 상기 세포, 조직 또는 기관에서 작동가능한 싱글 프로모터 서열의 조절 하에 작동적으로 위치된다.

[0101] 본 발명의 네번째 측면은 트랜스펙션 또는 형질전환된 원핵 또는 진핵 생물의 세포, 조직, 또는 기관에서 표적 유전자 발현을 변형시킬 수 있는 합성 유전자를 제공하는 것으로, 여기서 상기 합성 유전자는 적어도 멀티플 구조 유전자 서열을 포함하며, 상기 구조적 유전자 각각은 상기 세포, 조직 또는 기관에서 작동가능한 프로모터 서열의 조절 하에 작동적으로 위치하고, 상기 구조적 유전자 서열 각각은 상기 표적 유전자 또는 그의 유도체 또는 그와 상보적인 서열의 뉴클레오타이드 서열과 실제로 동일한 것이다.

[0102] 본 발명의 다섯번째 측면은 형질전환 또는 트랜스펙션된 세포, 조직 또는 기관에서 고유 유전자 또는 표적 유전자의 발현을 변형시킬 수 있는 유전 구조물을 제공하는 것으로서 이 때, 상기 유전 구조물은 적어도 본 발명의 합성 유전자와 한가지 이상의 복제 오리진 및/또는 선별가능한 마커 유전자 서열을 포함한다.

[0103] 동식물, 특히 조직-특이적이거나 기관-특이적인 또는 발달-조절된 것들과 같은 다세포 개체에서 많은 신규한 형질을 관찰하기 위해서, 본 발명에서 설명된 합성 유전자 및 유전 구조물을 지니는 형질전환된 세포들을 개체 전체 내에서 재생시키는 것이 요구될 것이다. 당업자라면 이것이 형질전환된 식물 세포 또는 동물 세포, 이러한 세포의 집단, 조직 또는 기관으로부터 개체 전체를 성장시키는 것을 의미하는 것임을 알 것이다. 분리된 세포 및 조직으로부터 특정 식물 및 동물을 재생시키기 위한 표준 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0104] 따라서, 본 발명의 여섯번째 측면은 본 발명에서 설명된 합성 유전자 및 유전 구조물을 포함하는 세포, 조직, 기관 또는 개체를 제공한다.

발명의 구성 및 작용

[0105] 본 발명은 세포, 조직 또는 개체에 있어서 표적 유전자의 발현을 조절하는 방법을 제공하는 것으로서, 상기 방법은 적어도 상기 표적 유전자 또는 그의 대역 또는 그의 상보물의 뉴클레오타이드 서열과 실제로 동일한 뉴클레오타이드 서열의 멀티플 복제물을 포함하는, 한가지 이상의 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자를, 변형시키고자 하는 상기 표적 유전자의 mRNA 산물을 번역시키는데 충분한 시간 및 조건 하에서 상기 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 것을 포함하는 방법으로, 단, 상기 mRNA 산물의 전사는 배타적으로 억압되거나 감소되지는 않는다.

[0106] "멀티플 복제물 (multiple copies)"이라 함은 동일한 핵산 분자 상에, 같거나 다른 방향으로, 물리적으로 매우 근접하게 연결되거나 또는 나란히 배열된 표적 세포의 2가지 이상의 복제물이 제공됨을 의미하는 것이다. 이 때, 요구되는 경우 각각의 반복단위 사이에 2차 구조물을 용이하게 형성할 수 있도록 스테퍼 (stuffer) 단편 또는 인터제닉 대역에 의해 임의로 분리된다. 스테퍼 단편은 핵산 분자에 공유적으로 연결될 수 있는 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기, 탄수화물 분자 또는 올리고당 분자 또는 탄소 원자 또는 그의 상동체, 동족체, 또는 유도체의 모든 조합을 포함할 수 있다.

[0107] 바람직하게는, 스테퍼 단편이 뉴클레오타이드 서열, 그의 상동체, 동족체, 또는 유도체를 포함하는 것이 좋다.

[0108] 더욱 바람직하게는, 스테퍼 단편이 약 10 내지 50 뉴클레오타이드 길이, 더욱 바람직하게는 약 50-100 뉴클레오타이드 길이, 더욱 바람직하게는 약 100 -500 뉴클레오타이드 길이의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것이 좋다.

[0109] 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자는 인트론/엑손 스플라이스 정션 서열을 포함하며, 스테퍼 단편은 유전자

의 5'-말단 부근의 구조 유전자의 3'-스플라이스와 그에 이은 다운스트림 유닛의 5'-스플라이스 부분 사이의 인트론 서열 기능으로 할 수 있다. 다른 한편, 각 유닛의 5' 말단에서 번역 개시 코돈의 첨가 또는 스테퍼 단편의 양 말단에서의 인트론/엑손 스플라이스 정션 부재하에서는, 당업자에게 잘 알려진 바와 같이, 분산된 외래 핵산 분자의 2개 이상의 인접한 뉴클레오타이드 서열 단위를 번역하고자 하는 경우, 그들 사이에 위치한 스테퍼 단편은 인-프레임 번역 스톱 코돈을 포함해서는 아니된다.

- [0110] 바람직한 스테퍼 단편은 예컨대 루시페라제, β -갈락투로나제, β -갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제 또는 녹색 형광 단백질과 같은 검색가능한 마커 단백질 또는 그의 생물학적으로 활성적인 상동체 및 유도체를 코딩하는 것이다. 부가적인 스테퍼 단편도 배제되지 않는다.
- [0111] 이 구체예에 따라, 검색가능한 마커 또는 그의 상동체 또는 유도체는 본 발명의 합성 유전자의 세포, 조직 또는 기관에서의 발현을, 특징적으로 검색가능한 표현형, 바람직하게는 육안-검색가능한 표현형을 부여하는 그의 능력에 의해 지시해준다.
- [0112] 본 명세서에서 "조절하는 (modulating)"이라는 용어는 표적 유전자의 발현이 충분히 감소되고/또는 유전자 발현의 타이밍이 지연되고/또는 본 발명 방법의 부재시의 상기 유전자의 발현에 비해 표적 유전자 발현이 발달적 또는 조직-특이적이거나, 세포-특이적인 유형으로 변경됨을 가리키는 것이다.
- [0113] 본 발명의 범위를 이에 한정하는 것은 아니며, 본 발명은 진핵생물, 특히 외떡잎 식물 또는 쌍떡잎 식물과 같은 식물 또는 인간 또는 기타 동물과 척추동물 및 무척추동물, 예컨대 곤충, 수중 동물 (예컨대 어류, 조개류, 연체동물, 갑각류, 예컨대 게, 가재 또는 참새우, 및 조류 또는 포유류)의 특정 세포, 조직 또는 기관에서 표적 유전자 발현을 충분히 억압, 지연 또는 감소시키는 것을 포함하는 유전자 발현의 조절에 관한 것이다.
- [0114] 더욱 바람직하게는, 표적 유전자 발현이 세포, 조직 또는 개체내로 도입된 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자에 의해 완전히 불활성화되는 것이 좋다.
- [0115] 어떠한 이론이나 작용 방식에 구애됨이 없이, 내인성 숙주세포 시스템에 의해 표적 유전자의 mRNA 전사체의 서열-특이적인 분해의 결과, 본 발명의 실행으로부터 결과되는 표적 유전자의 감소되거나 제거된 발현은 표적 유전자의 mRNA 전사 산물의 감소되거나 지연된 번역, 또는, 상기 mRNA의 번역의 방지에 기여할 것이다.
- [0116] 최적의 결과를 위해, 표적 유전자의 mRNA 전사체의 서열-특이적인 분해는, 표적 유전자의 mRNA 전사체가 정상적으로 번역되었을 시점 또는 단계에 앞서 일어나거나 다른 한편, 표적 유전자의 mRNA 전사체가 일반적으로 번역되는 동일한 시점에서 번역되는 것이 바람직하다. 따라서, 도입된 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자의 발현을 조절하기 위해 적절한 프로모터 서열을 선택하는 것은 본 발명의 수행능력을 최적화시키기 위한 중요한 고려사항이다. 이러한 이유로, 강력한 연속적인 프로모터 또는 유도가능한 프로모터 시스템이 도입된 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자의 발현을 조절하는데 있어서 특히 바람직하게 사용된다.
- [0117] 본 발명은 전사 감소가 이것을 일으키는 유일한 메커니즘이 아니고 상기 전사 감소가 적어도 정상상태의 mRNA 풀(pool)의 감소된 번역을 수반한다는 전제 하에서, 저하된 전사에 의해 표적 유전자의 감소된 전사가 일어나는, 감소된 발현을 명백히 포함한다.
- [0118] 표적 유전자는 동물 세포에 고유한 유전 서열이거나, 또는 고유하지 않은 유전 서열, 예컨대, 바이러스나 기타 외래 병원성 생명체로부터 유도된 서열로서, 세포내로 들어와서 감염 후 세포의 기구를 이용할 수 있는 서열일 수도 있다.
- [0119] 표적 유전자가 동물 세포에 고유하지 않은 유전 서열인 경우, 표적 유전자가 바이러스 또는 다른 병원체의 복제나 재생에 필수적인 기능을 코딩할 것이 소망된다. 이러한 구체예에서, 본 발명은 동물 세포의 바이러스 감염을 예방 및 치료하는데, 또는 상기 병원체에 대해 내성을 부여하거나 촉진하는데 유용하다.
- [0120] 바람직하게는, 표적 유전자는 식물 또는 동물 세포, 조직 또는 기관의 바이러스 병원체의 한가지 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0121] 예컨대, 동물과 인간의 경우, 바이러스 병원체는 레트로바이러스, 예컨대, 면역결핍 바이러스, 단일가닥(+) RNA 바이러스, 예컨대 소의 엔테로바이러스 (BEV: bovine enterovirus) 또는 신비스 알파바이러스 (Sinbis alphavirus)일 수 있다. 다른 한편, 표적 유전자는 동물 세포, 조직 또는 기관의 소의 헤르페스 바이러스 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스 I (HSV I)과 같은 바이러스 병원체의 한가지 이상의 뉴클레오타이드 서열을 함유할 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

- [0122] 식물의 경우, 바이러스 병원체는 포티바이러스 (potyvirus), 카울리모바이러스 (caulimovirus), 바드나바이러스 (badnavirus), 제미니바이러스 (geminivirus), 레오바이러스 (reovirus), 라브도바이러스 (rhabdovirus), 부나 바이러스 (bunyavirus), 토스포바이러스 (tospovirus), 테누이바이러스 (tenuivirus), 톰버스바이러스 (tombusvirus), 루테오바이러스 (luteovirus), 소베모바이러스 (sobemovirus), 브로모바이러스 (bromovirus), 쿠코모바이러스 (cucomovirus), 일라바이러스 (ilavirus), 알파모바이러스 (alfamovirus), 토바모바이러스 (tobamovirus), 토브라바이러스 (tobravirus), 포텍스바이러스 (potexvirus) 및 클로스트로바이러스 (clostrovirus)인 것이 바람직하며, CaMV, SCSV, PVX, PVY, PLRV, 및 TMV가 특히 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0123] 특히 바이러스 병원체와 관련해서, 당업자들은 바이러스-코딩된 기능이 숙주 세포에 의해 코딩된 폴리펩타이드에 의해, *in trans*적으로 상보될 수 있음을 이해할 것이다. 예컨대, 숙주 세포에서 소의 헤르페스 바이러스 게놈을 복제하는 것은 불활성화된 바이러스 DNA 폴리머라제 유전자를 상보할 수 있는 숙주 세포의 DNA 폴리머라제에 의해 쉽게 수행할 수 있다.
- [0124] 따라서, 표적 유전자가 동물 세포에 고유하지 않은 유전 서열인 경우, 본 발명의 또 다른 구체예는 바이러스-특이적인 유전 서열과 같이 숙주 세포 기능에 의해 상보될 수 없는 바이러스 또는 외래 폴리펩타이드를 코딩하는 표적 유전자를 제공해준다. 본 발명의 이러한 구체예에 따른 표적 유전자의 예로는 바이러스 코트 단백질, 언코딩 단백질 및 RNA-의존성 DNA 폴리머라제 및 RNA-의존성 RNA 폴리머라제 등을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0125] 본 발명의 특히 바람직한 구체예에서, 표적 유전자는 BEV RNA-의존성 RNA 폴리머라제 유전자 또는 그의 상동체, 동족체, 또는 유도체이거나 PVY Nia 프로테아제-코딩 서열이다.
- [0126] 표적 유전자의 발현이 변형된 세포는 다세포 동물이나 식물은 물론 그의 세포 및 조직 배양체로부터 유도된 것이면 어떠한 세포건 무방하다. 바람직하게는, 동물 세포는 곤충, 과충류, 양서류, 조류, 인간 또는 다른 포유동물로부터 유도된 것이 좋다. 예시적인 동물 세포로는 배간세포 (embryonic stem cells), 배양된 피부 섬유아세포, 뉴런 세포, 체세포, 조혈간세포, T-세포 및 COS, VERO, HeLa, 마우스 C127, 중국산 햄스터 난소 (CHO: Chinese hamster ovary), WI-38, 베이비 햄스터 신장 (BHK: baby hamster kidney), 또는 MDBK 세포주와 같은 불멸화 세포주를 들 수 있다. 이러한 세포 및 세포주들은 당업자가 쉽게 구할 수 있다. 따라서, 표적 유전자의 발현이 변형되는 조직 또는 기관은 이러한 동물 세포를 비롯하여 어하한 조직이나 기관일 수 있다.
- [0127] 바람직하게는, 식물 세포가 외떡잎 식물 또는 쌍떡잎 식물종 또는 그로부터 유도된 세포주인 것이 좋다.
- [0128] 본 명세서에서 "분산된 핵산 분자 (dispersed nucleic acid molecule)"이라는 용어는 상기 핵산 분자를 도입받는 세포, 조직 또는 기관으로부터 기원하는 유전자의 뉴클레오타이드 서열과 실제로 동일하거나 상보적인 뉴클레오타이드 서열의 한가지 이상의 멀티플 복제물, 바람직하게는 직렬방향의 반복체 (tandem direct repeats)를 포함하는 핵산 분자를 가리키는 것으로, 이 때, 상기 핵산 분자는, 재조합 수단에 의해 동물의 세포, 조직 또는 기관 내로 도입되어 염색체외의 핵산으로서 존재하거나 또는 상기 유전자에 유전적으로 연관되지 않은 통합된 염색체 핵산처럼 존재하게 된다는 측면에서 고유하지 않은 (non-endogenous) 것이다. 더욱 구체적으로, "분산된 핵산 분자"는 직렬-연결되지 않은 탓으로, 또는, 동일 염색체 상의 상이한 염색체 위치를 점유함으로써, 또는 상이한 염색체상에 위치하거나 또는 세포내에서 에피솜, 플라스미드, 코스미드 또는 바이러스 입자로서 존재함에 의해, 물리적 지도로 표시되는 표적 유전자에 연관되지 않은 염색체 또는 염색체외 핵산을 포함할 것이다.
- [0129] "외래 핵산 분자"라 함은 그 외래 핵산 분자가 도입되는 개체와 상이한 개체의 유전적 서열로부터 기원하는 뉴클레오타이드 서열의 한개 이상 멀티플 복제물, 바람직하게는 직렬방향의 반복체를 갖는 분리된 핵산 분자를 의미한다. 이러한 정의에는, 바이러스 병원체로부터 유래한 유전자와 같이, 상기 핵산 분자가 도입된 분류학적 그룹과 상이한 분류학적 그룹의 상이한 개체로부터 기원하는 핵산 분자뿐만 아니라, 상기 핵산 분자가 도입되는 분류학적 그룹으로서의 동일한 가장 하위의 분류학적 그룹 (즉 동일 집단(population))의 상이한 개체로부터 기원하는 핵산 분자도 포함된다.
- [0130] 따라서, 본 발명의 특성에 따라 외래 핵산 분자가 대응하여 작용하게 되는 표적 유전자는 형질전환 또는 인트로그레션 (introgression) 기술에 의해 한 개체로부터 다른 개체로 도입된 핵산 분자일 수 있다. 본 발명의 이러한 구체예에 따른 예시적인 표적 유전자에는 해파리 *Aequoria victoria*로부터 유래된 녹색 형광 단백질-코딩 유전자 (Prasher 외, 1992; 국제특허공개 W095/07463), 티로시나제 유전자 및 특히 쥐의 티로시나제 유전자 (Kwon 외, 1988), lacZ 유전자의 폴리펩티드 리프레서를 코딩할 수 있는 *Escherichia coli* lacI 유전자, 본 명세서

에 예시된 포르신 α -1,3-갈락토실트랜스페라제 유전자 (NCBI Accession No. L36535), 및 본 명세서에 예시된 PVY 및 BEV 구조 유전자 또는 상기 유전자들의 상동체, 동족체, 또는 유도체 또는 그에 상보적인 뉴클레오타이드 서열이 포함된다.

- [0131] 본 발명은 예컨대, 각각 공동-발현되는 표적 유전자와 실제로 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 분산된 핵산 분자 또는 노이래 핵산 분자를 이용함으로써, 특정 세포에서 공동-발현되는 몇가지 표적 유전자의 발현을 동시에 표적화하는데도 유용하다.
- [0132] "실제로 동일한"이라는 표현은 본 발명의 도입된 분산된 또는 외래 핵산 분자 및 표적 유전자 서열이 표준 세포 내 조건에서 염기쌍을 이루는 것을 허용하는 뉴클레오타이드 서열 수준에서 충분히 동일함을 의미하는 것이다.
- [0133] 바람직하게는, 본 발명의 분산된 또는 외래 핵산 분자 중 각각 반복체의 뉴클레오타이드 서열과 표적 유전자 서열 일부의 뉴클레오타이드 서열은 뉴클레오타이드 서열 수준에서 적어도 약 80-85%, 바람직하게는 적어도 약 85-90% 동일한 것이고, 더욱 바람직하게는 적어도 약 90-95% 동일, 더욱 바람직하게는 적어도 약 95-99% 동일, 또는 100% 동일한 것이 좋다.
- [0134] 본 발명이, 본 발명의 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자 중 정확한 수의 반복 서열에 한정되는 것이 아님에도 불구하고, 본 발명은 세포내에서 발현하고자 하는 표적 유전자 서열의 적어도 2개의 복제물을 요구함을 이해할 것이다.
- [0135] 바람직하게는, 표적 유전자 서열의 멀티플 복제물이, 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산분자 중에서 직렬적으로 역반복된 서열 및/또는 직렬방향으로 반복된 서열로서 존재하는 것이 좋다. 이러한 배열은 Galt, BEV 또는 PVY 유전자 대역을 포함하는 "테스트 플라스미드"에 의해 예시된다.
- [0136] 바람직하게는, 세포, 조직 또는 기관 내로 도입되는 분산된 또는 외래 핵산 분자가 RNA 또는 DNA를 포함하는 것이 좋다.
- [0137] 바람직하게는, 분산된 또는 외래 핵산 분자가 추가로 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 표적 유전자에 의해 코딩된 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 뉴클레오타이드 서열과 상보적인 것이 좋다. 더욱 바람직하게는, 핵산 분자가 하나 이상의 ATG 또는 AUG 번역 개시 코돈을 포함하는 것이 좋다.
- [0138] 표적 유전자의 발현을 조절할 목적으로 세포, 조직 또는 기관 내로 분산된 핵산 분자나 외래 핵산 분자를 도입하기 위해 표준방법을 이용할 수 있다. 예컨대, 핵산 분자는 네이키드 DNA 또는 RNA로서 도입될 수 있고, 임의로 리포좀 내, 약독화 바이러스 입자내에 캡슐화될 수도 있으며, 또는 바이러스 코트 또는 전달 단백질과 함께 결합되거나 또는 금, 또는 재조합 바이러스 벡터 또는 박테리아 벡터 또는 유전 구조물과 같은 불활성 담체와 결합되어 도입 될 수도 있다.
- [0139] 투여 수단에는 주사 및 경구 투여 (예컨대 의료용 식품중에 혼입되어)가 포함된다.
- [0140] 본 발명의 핵산 분자는 또한 소화관의 식물층에 인코포레이션될 수 있는 세균에서 발현되기에 최적화된 세균의 발현 시스템을 이용하는 것과 같이, 살아있는 전달 시스템에 의해서도 전달될 수 있다. 다른 한편으로, 바이러스 발현 시스템도 이용가능하다. 이와 관련해서, 바이러스 발현의 한가지 형태는 감염 유효량의 살아있는 벡터 (예컨대 바이러스 또는 세균)를 동물에게 제공하는 것으로, 일반적으로 스프레이, 배식 또는 물주기에 의해 살아있는 벡터를 투여하는 것이다. 바이러스 발현 시스템의 또 다른 형태는 세포를 감염시킬 수 있으나 그 안에서 복제를 할 수는 없는 비-복제성 바이러스 벡터이다. 비-복제성 바이러스 벡터는 과도적인 발현을 위해 인간 또는 동물에게 목적하는 유전 물질을 도입하는 수단을 제공한다. 이러한 벡터의 투여 형태는 살아있는 바이러스 벡터의 경우와 같다.
- [0141] 목적하는 핵산 분자를 숙주 세포에 전달하는데 이용되는 담체, 부형제 및/또는 희석제는 인간 또는 척추동물에 적용가능한 것이어야 한다. 이러한 담체, 부형제 및/또는 희석제는 당업자에게 잘 알려진 것들이다. 척추동물에게 적합한 담체 및/또는 희석제는 용매, 분산 매질, 수용액, 코팅, 항균제 및 항진균제, 강장제 및 흡수지연제 등을 포함한다. 활성성분과 어울릴 수 없는 종래의 여하한 매질이나 제제를 제외하고는, 모든 통상적인 매질이나 제제를 본 조성물에 사용하는 것을 고려할 수 있다. 보충적인 활성 성분도 조성물에 포함시킬 수 있다.
- [0142] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 적어도 다음에 기재된 단계들을 포함하는, 세포, 조직 또는 기관에서의 표적 유전자의 발현 조절방법을 제공한다:
- [0143] (i) 상기 표적 유전자 또는 그의 대역과 실제로 동일하거나 또는 그와 상보적인 뉴클레오타이드 서열의 멀티플

복제물을 포함하는 한가지 이상의 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자를 선택하고;

- [0144] (ii) 상기 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자를, 변형시키고자 하는 상기 표적 분자의 mRNA 생성물이 번역 되기에 충분한 시간과 조건하에서 상기 세포, 조직 또는 기관에 도입한다 (단, 상기 mRNA 산물의 전사는 배타적 으로 억압되거나 감소되는 것은 아님).
- [0145] 표적 유전자의 표적화 발현을 위해 적절한 뉴클레오타이드를 선택하기 위해, 몇가지 접근방법이 이용될 수 있다. 한가지 구체예에서, 특성화된 유전자의 특정 대역의 멀티플 복제물을 적절한 프로모터를 이용해서 작동가 능한 커넥션에서 클로닝시켜 표적 유전자 발현의 감소효능에 대해 분석할 수 있다. 다른 한편, 유전 서열의 멀 티플 복제물을 포함하는 샷건(shotgun) 라이브러리를 제조하고 이들의 표적 유전자 발현 감소능력을 분석할 수 도 있다. 후자의 접근방식과 관련된 한가지 장점은 세포내에서 소망되지 않은 표현형을 특정화하는데 있어서 어 떠한 특정 표적 유전자의 유의성을 미리 알지 않아도 좋다는 것이다. 예컨대, 바이러스 서브-게놈 단편을 포함 하는 샷건 라이브러리를 이용하여, 숙주 세포의 발병학에 있어서 어떤 바이러스 유전자가 기여하는지에 대한 사 전 지식 없이, 동물 숙주 세포에 대한 바이러스 면역성을 부여하는 그의 능력에 대해 직접 테스트할 수 있다.
- [0146] 본 명세서에서 "샷건 라이브러리"라 함은 다양한 뉴클레오타이드 서열의 세트로서, 여기서 각 세트의 각각의 구 성원은 세포성 숙주에 있어서 유지 및/또는 복제에 적합한 바이러스 벡터 분자, 적합한 플라스미드, 코스미드, 또는 박테리오파지에 함유되는 것이 바람직하다. "샷건 라이브러리"는 뉴클레오타이드 서열이 유도된 개체의 게놈에 모든 서열이 "세트"로 존재할 정도로 뉴클레오타이드 서열간의 다양성의 정도가 많은 수인 대표적인 라이 브러리와, 또는 상기 서열간의 다양성의 정도가 덜한 제한된 라이브러리를 포함한다. "샷건 라이브러리"는 뉴클 레오타이드 서열이 또한 제한 엔도뉴클리아제의 일부 분해 또는 쉬어링(shearing)에 의해 얻어지는 바이러스 또 는 세포성 게놈 단편을 포함하는, 무작위적인 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함한다. "샷건 라이브러리"는 또 한 다양한 세트의 개별적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포, 바이러스 입자 및 박테리오파지 입자를 추가 로 포함한다.
- [0147] 본 발명의 이 구체예에 따른 바람직한 샷건 라이브러리는 동식물의 바이러스 병원체로부터 유도된 직렬 반복된 일련의 뉴클레오타이드 서열 세트를 포함하는 "대표적인 라이브러리 (representative libraries)"이다.
- [0148] 본 발명의 특히 바람직한 구체예에서, 샷건 라이브러리는 다양한 아미노산 서열을 코딩하는 직렬-반복된 뉴클레 오타이드 서열의 다양한 세트를 포함하는 세포, 바이러스 입자 또는 박테리오파지를 포함하는 것으로서, 여기서, 상기 다양한 뉴클레오타이드 서열 세트의 구성원은 상기 직렬-반복된 뉴클레오타이드 서열을 세포내에 서 발현시킬 수 있는 프로모터 서열의 통제하에 작동적으로 위치한다.
- [0149] 따라서, 직렬-반복된 서열의 각 유닛의 뉴클레오타이드 서열은 적어도 약 1 내지 200 뉴클레오타이드 길이이다. 이보다 큰 단편, 특히 바이러스, 식물 또는 동물의 게놈으로부터 유도된 무작위적으로 절단된 핵산의 이용도 배 제되지 않는다.
- [0150] 도입된 핵산 분자는 발현가능한 형태인 것이 바람직하다.
- [0151] "발현가능한 형태"라 함은 주체의 핵산 분자가 적어도 전사 수준에서 세포, 조직, 기관 또는 개체 전체에서 발 현될 수 있는 배열로 제공됨을 의미하는 것이다 (즉, 임의로 번역가능하거나 또는 번역되어 재조합 펩티드, 올 리고펩티드 또는 폴리펩티드 분자를 생산하는 mRNA 산물을 적어도 생산하도록 동물세포에서 발현되는 것).
- [0152] 예를 들면, 목적하는 세포, 조직 또는 기관에서 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자를 발현시키기 위해, 합 성 유전자 또는 상기 합성 유전자를 함유하는 유전 구조물을 생산하고, 여기서 상기 합성 유전자는 상술한 바와 같이, 그 안에서 발현을 조절할 수 있는 프로모터 서열과 작동적으로 연결된 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 것이다. 따라서, 주체의 핵산 분자는 진행 전사가 일어나는데 충분한 한가지 이상의 조절적 요소에 작동적으로 연결될 것이다.
- [0153] 따라서, 본 발명의 또 다른 구체예는:
- [0154] (i) 표적 유전자의 뉴클레오타이드 서열과 실제로 동일한 뉴클레오타이드 서열 또는 그의 대역 또는 그에 상보 적인 뉴클레오타이드 서열의 멀티플 복제물, 바람직하게는 직렬 복제물을 포함하는, 한가지 이상의 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자를 선택하고;
- [0155] (ii) 상기 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자를 포함하는 합성 유전자를 제조하고;
- [0156] (iii) 상기 세포, 조직 또는 기관에 상기 합성 유전자를 도입한 다음;

- [0157] (iv) 상기 세포, 조직 또는 기관에서 변형시키고자 하는 표적 유전자의 mRNA 산물을 번역하는데 충분한 시간과 조건하에서 상기 합성 유전자를 발현시키는 단계를 포함하는 (단, 상기 mRNA의 전사는 배타적으로 억압 또는 감소되는 것은 아님) 동물 세포, 조직 또는 기관에서 표적 유전자의 발현을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0158] 본 명세서에서 "유전자" 또는 "유전자들"이라 함은 가장 광의로 이해되는 것으로서:
- [0159] (i) 전사 및/또는 번역 조절 서열 및/또는 코딩 대역 및/또는 미-번역 서열 (즉, 인트론, 5'- 및 3'-미번역 서열)로 이루어진 전통적인 게놈 유전자; 및/또는
- [0160] *(ii) 코딩 대역 (즉 엑손)에 대응하는 mRNA 또는 cDNA 및 유전자의 5'- 및 3'-미번역 서열; 및/또는
- [0161] (iii) 구조 유전자에게 발현 특성을 부여할 수 있는 전사 및/또는 번역 조절 대역으로 이루어진 이종의 (heterologous) 프로모터 서열 및/또는 미번역 서열을 임의로 추가 포함하는 코딩 대역 (즉 엑손)에 대응하는 구조 유전자가 이에 포함된다.
- [0162] 본 명세서에서 "유전자"는 또한, 어떤 기능적인 산물, 특히 센스 또는 안티센스 mRNA 산물 또는 펩티드, 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 또는 생물학적으로 활성인 단백질의 전체 또는 일부를 코딩하는 합성 또는 융합 분자를 설명하는데도 이용된다.
- [0163] "합성 유전자"라 함은 비-자연적으로 발생된 유전자를 가리키는 것으로, 구조 유전자 서열에 작동적으로 연결된 적어도 한가지 이상의 전사 및/또는 번역 조절 서열을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0164] "구조 유전자"라 함은 mRNA를 생산하도록 전달될 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 가리키는 것으로, 임의로 펩티드, 올리고펩티드, 폴리펩티드 또는 생물학적으로 활성적인 단백질 분자를 코딩하는 것이다. 당업자라면 예컨대 mRNA가 기능적인 번역 개시 시그널을 결여하거나, 또는 mRNA가 안티센스 mRNA인 경우와 같이, 모든 mRNA가 펩티드, 올리고펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질로 번역될 수 있는 것은 아님을 이해할 것이다. 본 발명은 펩티드, 올리고펩티드, 폴리펩티드 또는 생물학적 활성 단백질을 코딩할 수 없는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 합성 유전자를 명백히 포함한다. 특히, 본 발명자들은 이러한 합성 유전자가 원핵 또는 진핵 생물의 세포, 조직 또는 기관에서 표적 유전자의 발현을 변형시키는데 이로울 수 있음을 발견한 바 있다.
- [0165] "구조 유전자 대역 (structural gene region)"이라 함은 세포, 조직 또는 기관에서, 그것이 작동적으로 연결된 프로모터 서열의 조절 하에 발현되는, 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자를 포함하는 합성 유전자의 그 부분을 가리키는 것이다. 구조 유전자 대역은 단일 프로모터 서열 또는 복수개의 프로모터 서열의 조절 하에 하나 이상의 분산된 핵산 분자 및/또는 외래 핵산 분자를 작동적으로 포함할 수 있다. 따라서, 합성 유전자의 구조 유전자 대역은 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 뉴클레오타이드 서열 또는 그에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 함유할 수 있다. 이에 대해, 본 발명을 수행하는데 이용되는 구조 유전자 대역은 또한 아미노산 서열은 코딩하나 기능적인 번역 개시 코돈 및/또는 기능적인 번역 종결 코돈은 결여함으로 해서, 완전한 오픈 리딩 프레임은 포함하지 않는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수도 있다. 이 점에 있어서, "구조 유전자 대역"이라는 용어는 어떤 유전자를 발현시키는 진핵 세포에서 정상적으로 번역될 그 유전자의 5'-업스트림 또는 3'-다운스트림 서열과 같이, 비-코딩 뉴클레오타이드 서열까지 포함한다.
- [0166] 따라서, 본 발명에서, 구조 유전자 대역은 동일하거나 상이한 유전자의 2개 이상의 오픈 리딩 프레임들간의 융합도 포함할 수 있다. 이러한 구체예에서, 본 발명은 상이한 비-연속적 대역을 표적화함으로써 한 유전자의 발현을 조절하거나, 또는 다중 유전자 집단의 상이한 유전자를 비롯한 몇개의 상이한 유전자들의 발현을 동시에 조절하는데 이용될 수 있을 것이다. 동물 세포에 고유하지 않고, 특히 바이러스 병원균으로부터 유도된 2개 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 융합 핵산 분자의 경우, 그러한 융합은 몇가지 병원체에 있어서 유전자의 발현을 표적화시킴으로써, 그 몇가지 병원체에 대한 면역성이나 방어능력을 동시에 부여하는 추가적인 잇점을 제공할 수 있다. 다른 한편, 또는 그에 부가해서, 융합은 그 병원체의 두가지 이상의 유전자의 발현을 표적화함으로써 여하한 병원체에 대해 보다 효과적인 면역성을 제공할 수 있을 것이다.
- [0167] 본 발명의 이 측면에 따른 특히 바람직한 구조 유전자 대역은 적어도 하나의 번역가능한 오픈 리딩 프레임을 함유하는 것, 반드시 상기 구조 유전자 대역의 5'-말단에서는 아니지만, 더욱 바람직하게는 상기 오픈 리딩 프레임의 5'-말단에 위치한 번역 개시 코돈을 추가로 포함하는 것이다. 이와 관련해서, 구조 유전자 대역은 적어도 하나의 번역가능한 오픈 리딩 프레임 및/또는 AUG 또는 ATG 번역 개시 코돈을 함유할 수 있음에도 불구하고, 이러한 서열을 포함한다고 해서 본 발명이 표적 유전자의 발현을 조절하기 위해, 도입된 핵산 분자의 번역을 요구

함을 시사하는 것은 아니다. 어떠한 이론이나 작용 형태에 구애됨이 없이, 주제의 핵산 분자 내에서 적어도 하나의 번역가능한 오픈 리딩 프레임 및/또는 번역 개시 코돈을 포함하는 것은 mRNA 전사 산물의 안정성을 증가시키는 데 기여할 것이고, 따라서 본 발명의 효과도 증대될 것이다.

[0168] 각 구조 유전자 서열의 길이, 그의 방향성과 서로에 대한 상동성 정도에 따라, 본 발명의 합성 유전자에 관여할 수 있는 구조 유전자 서열의 최적 수자는 크게 달라질 것이다. 예컨대, 당업자라면 생체내에 있어서 팔린드롬 뉴클레오타이드 서열의 고유한 불안정성과 역전된 반복 뉴클레오타이드 서열들을 포함하는 긴 합성 유전자를 구축하는 것이, 생체내에서 그러한 서열들이 재결합하려는 성향으로 인해, 어렵다는 것을 이해할 것이다. 이러한 어려움에도 불구하고, 본 발명의 합성 유전자에 포함될 구조 유전자 서열의 최적의 갯수는 레코미니제-결핍 세포주를 이용하여, 반복 서열의 수를 재조합을 제거하거나 최소화하는 수준으로 감소시키고, 멀티플 구조 유전자 서열의 총 길이를 허용가능한 한도, 바람직하게는 5-10kb 이하, 더욱 바람직하게는 2-5kb 이하, 더욱 바람직하게는 0.5-2.0kb 이하로 유지하는 본 발명의 합성 유전자의 제조와 같은 표준 공정에 따라, 당업자가 과도한 실험을 하지 않고도 실험적으로 구할 수 있다.

[0169] 구조 유전자 대역이 두개 이상의 분산된 핵산 부자 또는 외래 핵산 분자를 포함하는 경우에는 본 명세서에서 "멀티플 구조 유전자 대역 (multiple structural gene region)" 또는 그와 유사한 용어로 칭할 것이다. 본 발명은 바람직하게는 특정 구조 유전자의 직접적인 반복 서열, 역전된 반복 서열, 또는 간접된 팔린드롬 서열, 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자 또는 그의 단편을 포함하는 멀티플 구조 유전자 대역을 이용하는 것도 명백히 포함한다.

[0170] 주제의 합성 유전자의 멀티플 구조 유전자 단위에 포함된 각각의 분산된 또는 외래 핵산 분자들은 동일 개체에서 상이한 표적에 대해 실제로 동일한 뉴클레오타이드 서열을 함유할 수 있다. 이러한 배열은 바이러스 표적 유전자의 발현을 변형시킴으로써, 합성 유전자가 세포, 조직 또는 기관, 특히 바이러스 병원체에 대한 방어를 목적으로 의도된 경우 특히 유용할 수 있다. 예컨대, 멀티플 구조 유전자는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제, Nia 프로테아제, 및 모트 단백질 또는 바이러스 감염, 복제 또는 재생산에 필수적인 기타 표적 유전자 중에서 선택된 두가지 이상의 표적 유전자와 실제로 동일한 뉴클레오타이드 서열 (즉, 두개 이상의 분산된 또는 외래 핵산 분자)를 함유할 수 있다. 그러나, 이 배열에 있어서는 주제의 합성 유전자의 멀티플 구조 유전자가 프로모터 서열의 제어 하에 발현되는 것보다는 실제로 동일한 표적 유전자가 감염된 세포, 조직 또는 기관에서 거의 동시에 (또는 후에) 발현되도록 구조 유전자가 선택되는 것이 바람직하다. 이는, 멀티플 구조 유전자의 프로모터 조절 발현이 보통, 바이러스 표적 유전자가 여러가지 감염 단계에서 발현될 때 바이러스의 전체 라이프 사이클에 걸쳐 세포, 조직 또는 기관에서 발현되도록 선택됨을 의미하는 것이다.

[0171] 분산된 또는 외래 핵산 분자의 개별적인 서열 유닛에 있어서, 멀티플 구조 유전자의 개별적인 유닛은 서로 어떠한 상대적인 방향으로든 공간적으로 연결될 수 있다. 예컨대, 헤드-투 헤드, 헤드-투-테일, 또는 테일-투-테일 방식을 들 수 있으며 이러한 모든 배열이 본 발명의 범위에 속한다.

[0172] 진핵세포에서의 발현을 위해, 합성 유전자는 일반적으로 본 발명의 핵산 분자에 더하여, 프로모터, 또는 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자의 발현을 용이하게 하기 위해 고안된 임의의 다른 조절 서열을 함유한다.

[0173] 본 명세서에서 "프로모터"라 함은 가장 광의의 의미로 사용되며 정확한 전사 개시에 요구되는 TATA 박스를 비롯한, 전통적인 게놈 유전자의 전사 조절 서열을 포함하며, 발달 및/또는 외부 자극에 응답하여, 또는 조직-특이적인 방식으로 유전자 발현을 변경시키는 부가적인 조절 요소 (즉, 업스트림 활성화 서열, 인핸서 및 사일렌서) 및 CCAAT 박스 서열은 있을수도, 없을수도 있다. 프로모터는 대개, 반드시는 아니지만, 그가 발현을 조절하는 구조 유전자 대역의 업스트림 또는 5'에 위치한다. 또한, 프로모터를 함유하는 조절 요소들은 대개 유전자의 전사 개시 부위의 2kb 내에 위치한다.

[0174] 본 명세서에서, "프로모터"라는 용어는 세포에서 핵산 분자의 발현을 활성화 또는 촉진시켜주는 합성 또는 융합 분자, 또는 유도체를 설명하는데도 이용된다.

[0175] 바람직한 프로모터들은 센스 분자의 발현을 추가로 촉진하기 위해/또는 공간적인 발현 및/또는 /또는 상기 센스 분자의 일시적인 발현을 변형시키기 위해, 하나 이상의 특이적인 조절 요소들의 부가적인 복제물들을 함유할 수 있다. 예컨대, 구리 유도성을 부여하는 조절 요소들은 센스 분자의 발현을 촉진하는 이종의(heterologous) 프로모터 서열에 인접하게 위치하여, 상기 분자의 발현시 구리 유도성을 부여할 수 있다.

[0176] 프로모터 서열의 조절적인 통제하에 분산된 또는 외래 핵산 분자를 위치시킨다는 것은 프로모터 서열에 의해 발현이 제어되도록 상기 분자를 위치시킨다는 의미이다. 프로모터는 일반적으로 이들이 조절하는 유전자에 대해

5'(업스트림)에 위치한다. 이중 프로모터/구조 유전자 조합의 제작시, 프로모터와, 그의 본래 세팅, 에서 그가 조절하는 유전자, 즉 프로모터가 유래된 유전자 사이의 거리와 거의 동일한 거리만큼 프로모터를 유전자 전사 개시 부위로부터 떨어뜨려 위치시키는 것이 일반적으로 바람직하다. 기술분야에 알려진 바와 같이, 이러한 거리 내에서의 얼마간의 변화는 프로모터 기능에 손상을 입힘이 없이 가능하다. 유사한 방식으로, 조절 서열 요소는 그것이 조절하는 이중 유전자에 대해, 그 요소의 본래 세팅, 즉 그것이 유도된 유전자의 위치에 의해 그 위치가 결정되는 것이 바람직하다. 이점에 있어서도, 기술분야에 공지인 바와 같이, 얼마간의 거리 변동이 가능하다.

[0177] 본 발명의 합성 유전자에 사용하는데 적합한 프로모터의 예로는, 식물, 동물, 곤충, 곰팡이, 효모 또는 세균 세포에서 기능할 수 있는, 바이러스, 곰팡이, 세균, 동물 및 식물 유래 프로모터가 포함된다. 프로모터는 구조 유전자 성분의 발현을, 발현이 일어나는 세포, 조직 또는 기관과 연계적으로, 또는 상이하게, 발현이 일어나는 발달 단계와 관련해서 조절하거나, 또는 생리적 스트레스, 또는 병원체 또는 금속 이온과 같은 외부 자극에 대응하여 조절할 수 있다.

[0178] 바람직하게는, 프로모터가 적어도 표적 유전자가 발현되는 기간 동안은 진핵세포, 조직 또는 기관에서 핵산 분자의 발현을 조절할 수 있는 것이 좋고, 더욱 바람직하게는, 상기 세포, 조직 또는 기관에서 표적 유전자의 검색가능한 발현의 개시를 즉시 진행시키는 것이 좋다.

[0179] 따라서, 강한 연속적인 프로모터 또는 바이러스 감염 또는 표적 유전자 발현의 개시에 의해 유도될 수 있는 프로모터가 본 발명의 목적을 위해 특히 바람직하다.

[0180] 식물-작동가능한, 그리고 동물-작동가능한 프로모터가 본 발명의 합성 유전자에 사용되는데 특히 바람직하다. 바람직한 프로모터의 예로는 박테리오파지 T7 프로모터, 박테리오파지 T3 프로모터, SP6 프로모터, lac 오퍼레이터-프로모터, tac 프로모터, SV40 레이트(late) 프로모터, SV40 어얼리(early) 프로모터, RSV-LTR 프로모터, CMV IE 프로모터, CaMV 35S 프로모터, SCSV 프로모터, SCBV 프로모터 등을 들 수 있다.

[0181] 표적 유전자의 발현과 동시에 발생하거나 또는 표적 유전자의 발현에 선행하는, 고도의 발현에 요구되는 바람직한 사항들을 고려할 때, 프로모터 서열은 CMV-IE 프로모터 또는 SV40 어얼리 프로모터 서열, SV40 레이트 프로모터 서열, CaMV 35S 프로모터, 또는 SCBV 프로모터 등과 같이 요소를 이루는 (constitutive) 강력한 프로모터일 것이 강력히 요구된다. 당업자라면 상기 언급한 프로모터 외에 부가적인 프로모터 서열도 가능함을 이해할 수 있을 것이다.

[0182] 본 명세서에서 "작동적으로 연결되어 있는 (in operable connection with)" 또는 "조절하에 작동적인 (operably under the control)"이라는 용어 또는 이와 유사한 표현들은 세포, 조직, 기관 또는 개체 전체에 있어서, 구조 유전자 대역 또는 멀티플 구조 유전자 대역의 발현이 그와 공간적으로 연결된 프로모터 서열에 의해 조절됨을 가리키는 것이다.

[0183] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 구조 유전자 대역 (즉 분산된 핵산 분자 또는 외래 핵산 분자) 또는 멀티플 구조 유전자 대역은 전사될 경우, 번역되면 표적 유전자 또는 그의 단편의 폴리펩티드 산물을 코딩할 수 있는 mRNA 산물이 합성되도록, 프로모터 서열에 상대적으로 프로모터 방향과 관련해서 작동적으로 위치된다.

[0184] 그러나, 본 발명은 이러한 배열을 사용하는 것으로 한정되는 것이 아니며, 본 발명은, 그의 mRNA 전사 산물의 적어도 일부가 표적 유전자 또는 그의 단편에 의해 코딩된 mRNA와 상보적이 되도록, 구조유전자 대역 또는 멀티플 구조 유전자 대역이 프로모터 서열에 상대적으로 "안티센스" 방향으로 위치하는, 합성 유전자와 유전 구조물의 이용까지 명백히 확장된다.

[0185] 분산된 핵산 분자, 외래 핵산 분자 또는 멀티플 구조 유전자 대역이 표적 유전자의 직렬 방향 및/또는 역전된 반복 서열을 포함하므로, 상술한 모든 배열의 조합 역시 본 발명에 포함됨이 자명하다.

[0186] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 구조 유전자 대역 또는 멀티플 구조 유전자 대역은 제 1 프로모터 서열과 제 2 프로모터 서열 두가지 모두에 작동적으로 연결되며, 여기서 상기 프로모터들은 상기 구조 유전자 대역 또는 멀티플 구조 유전자 대역 중 적어도 한 유닛이 제 1 프로모터 서열에 대해 "센스 방향", 그리고 제 2 프로모터 서열에 대해 "안티센스" 방향으로 위치되는 방식으로 말단부와 중앙부에 위치한다. 이 구체예에 따라, 제 1 및 제 2 프로모터 서열은 이들이 결합하는 세포 전사 요소간의 경쟁을 방지하기 위해 서로 상이한 것이 바람직하다. 이러한 배열의 장점은 세포내 표적 유전자 발현을 감소시키는데 있어 제 1 및 제 2 프로모터로부터의 전사 효과를 비교하여 각각의 시험된 뉴클레오타이드 서열의 최적 방향성을 결정할 수 있다는 것이다.

[0187] 합성 유전자는 예컨대 전사 종결 서열과 같이, 효과적인 전사를 위한 부가적인 조절 요소를 함유한다.

- [0188] "터미네이터"라 함은 전사 종결을 신호해주는 전사 단위의 마지막에 있는 DNA 서열을 가리킨다. 터미네이터는 일차 전사물의 3'-말단에 폴리아데닐레이트 서열의 부가를 쉽게해주는, 폴리아데닐화 시그날을 포함하는 3'-비-번역된 DNA 서열이다. 식물 세포에서 활성적인 터미네이터들이 알려져 있으며 문헌에 설명되어 있다. 이들은 세균, 곰팡이, 바이러스, 동물 및/또는 식물로부터 분리되거나 또는 *de novo* 방식으로 합성가능하다.
- [0189] 프로모터 서열과 마찬가지로, 터미네이터도 그것이 이용될 세포, 조직 또는 기관에서 작동가능한 것이면 어떠한 터미네이터 서열이든 무방하다.
- [0190] 본 발명의 합성 유전자에 사용하는데 특히 적합한 터미네이터의 예로는 SV40 폴리아데닐화 시그날, HSV TK 폴리아데닐화 시그날, CYC1 터미네이터, ADH 터미네이터, SPA 터미네이터, *Agrobacterium tumefaciens*의 노팔린 신제이스(nopaline syntase: NOS) 유전자 터미네이터, Cauliflower 모자이크 바이러스 (CaMV)의 터미네이터 35S 유전자, *Zea mays*로부터의 *zein* 유전자 터미네이터, Rubisco 스몰 서브유닛 (SSU) 유전자 터미네이터 서열, 서브클로버 스텐트 바이러스 (SCSV: subclover stunt virus) 유전자 서열 터미네이터, 여하한 rho-독립성 *E. coli* 터미네이터 또는 *lacZ* 알파 터미네이터를 들 수 있다.
- [0191] 특히 바람직한 구체예에서, 터미네이터는 동물 세포, 조직, 및 기관에서 작동가능한 SV40 폴리아데닐화 시그날 또는 HSV TK 폴리아데닐화 시그날, 식물 세포, 조직 또는 기관에서 활성적인 옥토파인 신제이스 (octopine synthase: OCS) 또는 노팔린 신제이스 (NOS) 터미네이터, 또는 원핵 생물에서 활성적인 *lacZ* 알파 터미네이터이다.
- [0192] 당업자라면 본 발명을 수행하는데 사용하기에 적합할 수 있는 다른 터미네이터 서열들을 알 수 있을 것이다. 이러한 서열은 과도한 실험을 거치지 않고도 쉽게 사용될 수 있다.
- [0193] 본 명세서에 설명된 합성 유전자 또는 이를 함유하는 유전 구조물을 세포에 도입하는 수단 (즉 트랜스펙션 또는 형질전환)은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0194] 또 다른 추가적인 구체예에서, 그 자신의 프로모터 서열의 조절 하에 각각의 구조 유전자 대역이 작동적으로 위치된 두가지 이상의 구조 유전자 대역 또는 멀티플 구조 유전자 대역을 함유하는 유전 구조물이 이용된다. 본 명세서에 설명된 다른 구체예의 경우와 마찬가지로, 각 구조 유전자 대역의 방향성은 표적 유전자 발현에 미치는 그의 조절 효과를 최대화하도록 변형시킬 수 있다.
- [0195] 이 구체예에 따라, 구조 유전자 단위의 발현을 조절하는 프로모터는, 세포 전사 인자와 RNA 폴리머라제 사이의 경쟁을 감소시키기 위해, 서로 상이한 프로모터 서열인 것이 바람직하다. 바람직한 프로모터들은 상술한 바와 같이 선택된다.
- [0196] 당업자들은 분리된 프로모터 서열로부터 그들의 발현을 조절하기 위해 상기 설명된 개별적인 구조 유전자의 배열이차 배치를 어떻게 변형시킬 수 있는지 알 수 있을 것이다.
- [0197] 상기 설명된 합성 유전자들은 예컨대 그것이 발현되는 세포, 조직 또는 기관에서 합성 유전자의 검색을 용이하게 하기 위해 검색가능한 마커 효소 또는 그의 기능적 동족체 또는 유도체를 코딩하는 마커 뉴클레오타이드 서열을 포함시킴으로써 더욱 변형시킬 수 있다. 이 구체예에 따르면, 마커 뉴클레오타이드 서열은 번역가능한 포맷으로 존재하여, 예컨대 한가지 이상의 구조 유전자의 번역산물과 함께 융합 폴리펩티드로서, 또는 비-융합 폴리펩티드로서 발현될 것이다.
- [0198] 당업자들은 본 명세서에 설명된 합성 유전자들을 생산하는 방법과 소망되는 조건 하에서 특정 세포 또는 세포 유형으로, 발현시키는데 필요한 요구사항들을 알 것이다. 특히, 본 발명을 수행하는데 필요한 유전적 조작에 본 명세서에 설명된 유전 구조물 또는 그의 유도체를 *E. coli*와 같은 원핵세포 또는 식물 세포 또는 동물세포에서 전파시키는 것이 필요할 수 있음이 당업자에게 알려져있다.
- [0199] 본 발명의 합성 유전자는 유전 구조물 형태로 선형 DNA로서 변형시킬 필요없이, 임의로 적절한 담체, 예컨대, 세포, 바이러스 입자 또는 리포솜에 함유된채로 적절한 세포, 조직 또는 기관에 도입될 수 있다. 유전 구조물을 제조하기 위해, 본 발명의 합성 유전자를 그것이 도입되는 숙주 세포, 조직 또는 기관내에서 유지될 수 있고/또는 복제될 수 있고/ 또는 발현될 수 있는 박테리오파지 벡터, 바이러스 벡터 또는 플라스미드, 코스미드, 또는 인공 염색체 벡터와 같은 적절한 벡터나 에피솜 분자내로 삽입한다.
- [0200] 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 적어도 본 발명에 설명된 한가지 이상의 구체예에 따라 합성 유전자를 함유하고 한가지 이상의 복제 및/또는 선별가능한 마커 유전자 서열의 기원을 함유하는 유전 구조물을 제공한다.

- [0201] 바이러스 병원균에 대한 저항 특성을 제공하는 것에 더해, 신규한 유전형질을 도입하기 위해, 진행세포를 형질 전환시키는데 있어서는 유전 구조물이 특히 적합하다. 이러한 부가적인 신규 형질은 별도의 유전 구조물에 도입할 수도 있고, 또는, 본 명세서에 설명된 합성 유전자를 함유하는 동일한 유전 구조물에 도입될 수도 있다. 당업자들은, 단일 유전 구조물에 있어서 본 발명에 설명된 합성 유전자와 부가적인 형질들을 코딩하는 유전 서열을 포함하는 것이, 줄어든 유전 조작 및 조직 배양 오구사항과 증진된 비용 효율측면에서 얼마나 유리한 것인지 인식할 수 있을 것이다.
- [0202] 대체로, 세균에 사용하기에 적합한 선별가능한 마커 유전자 또는 복제 오리진은 진행세포에서 발현시키고자 하거나, 또는 그에 전달하고자 하는, 또는 진행세포의 게놈내로 통합시키려고 하는 유전 구조물내에 함유된 유전 서열로부터 물리적으로 분리된다.
- [0203] 특히 바람직한 구체예에서, 복제 오리진은 세균 세포에서 기능적이며 pUC 또는 ColI1 오리진 또는 복제의 오리진은 진행 세포, 조직에서 작동가능하며, 더욱 바람직하게는 복제의 SV40 오리진 또는 복제의 2 마이크로 (2 μ m) 오리진을 함유하는 것이 좋다.
- [0204] 본 명세서에서, "선별가능한 마커 유전자"라 함은 그의 발현이, 본 발명의 유전 구조물 또는 그의 유도체로 트랜스펙션되거나 형질전환된 세포의 동정 및/또는 선별을 용이화하기 위한 것인, 세포상에 표현형을 부여하는 어떠한 유전자도 모두 포함한다.
- [0205] 본 명세서에서 고려되는 적절한 선별가능한 마커 유전자로는 암피실린-내성 유전자 (Amp^r), 테트라사이클린-내성 유전자 (Tc^r), 세균성 카나마이신-내성 유전자 (Kan^r), 제오신 내성 유전자 (Zeocin은 InVitrogen Corporation의 상표인 블레오마이신 패밀리의 약물임), 항생제 아우레오바시딘 A에 내성을 부여하는 AURI-C 유전자, 포스포노트리신-내성 유전자, 네오마이신 포스포트랜스페라제 유전자 (npt II), 하이그로마이신-내성 유전자, β -글루쿠로니다제 (GUS) 유전자, 클로람페니콜 아세틸트랜스페라제 (CAT) 유전자, 녹색 형광 단백질 코딩 유전자 또는 루시페라제 유전자를 들 수 있다.
- [0206] 바람직하게는, 선별가능한 마커 유전자가 npt II 또는 Kan^r 유전자 또는 녹색 형광 단백질 (GFP)-코딩 유전자인 것이 좋다.
- [0207] 당업자들은 본 발명을 수행하는데 있어서 유용한 기타의 선별가능한 마커 유전자들을 알 수 있을 것이며 본 발명이 선별가능한 마커 유전자의 특성에 구애되지 않음을 이해할 수 있을 것이다.
- [0208] 본 발명은 원핵 또는 진핵세포에서의 상기 유전 구조물의 유지 및/또는 복제 및/또는 상기 유전 구조물 또는 그의 일부를 진행세포 또는 개체의 게놈내로 통합시키기 위한 추가적인 유전 서열을 포함하여, 본 명세서에서 기본적으로 설명된 모든 유전 구조물까지 확장되는 것이다.
- [0209] 분산된 또는 외래 핵산 분자들에 있어서, 예컨대, 리포솜-매개 트랜스펙션 또는 형질전환, 또는 약독화 바이러스 입자 또는 세균 세포를 이용한 세포의 형질전환, 세포 메이팅, Ausubel 등 (1992)에 의해 설명된 바와 같이 당업자에게 잘 알려진 형질전환 또는 트랜스펙션 기술과 같은 상술한 표준 방법들을 이용하여 표적 유전자 발현을 조절할 목적으로 세포, 조직 또는 기관내로 합성 유전자 및 유전 구조물을 도입시킬 수 있다.
- [0210] 재조합 DNA를 식물 조직 또는 세포에 도입시키기 위한 부가적인 수단에는 $CaCl_2$ 및 그의 유도체를 이용한 형질전환, 특히 Hanahan (1983)에 의해 설명된 방법, 프로토플라스트로의 직접적인 DNA 업테이크 (Krens외, 1982; Paszkowski외, 1984), 프로토플라스트로의 PEG-매개 업테이크 (Armstrong외, 1990), 미립자 폭발법 (microparticle bombardment), 전기영동법 (Fromm외, 1985), DNA의 마이크로인젝션 (Crossway외, 1986), 조직체외배양체 또는 세포의 미립자 폭발 (Christou외, 1988; Sanford, 1988), 핵산을 이용한 조직의 진공-침투, 또는 식물의 경우, An외 (1985)등, Herrera-Estrella 등 (1983a, 1983b, 1985)이 설명한 바와 같이, *Agrobacterium*으로부터 식물세포로의 T-DNA-매개 전달이 포함된다.
- [0211] 세포의 미립자 폭발법을 위해서, 미립자를 세포 내로 분사하여 형질전환된 세포를 생산한다. 본 발명을 수행하는데 있어서 여하한 모든 탄체(ballistic) 세포 형질전환법과 장치를 이용할 수 있다. 예시적인 장치와 방법으로는 Stomp외 (미국특허 5,122,466호), 및 Sanford 및 Wolf (미국특허 4,945,050호)에 의해 설명된 것을 들 수 있다. 탄체 형질전환 공정을 이용하는 경우, 유전 구조물은 형질전환시키고자 하는 세포 내에서 복제가 가능한 플라스미드를 인코포레이션할 수 있다.
- [0212] 이러한 시스템에 사용하기에 적합한 미립자의 예로는 1 내지 5 μ m의 금으로 만들어진 구체를 들 수 있다. DNA

구조물을 침전과 같은 적절한 기술에 의해 이 미립자상에 증착시킨다.

[0213] 본 발명의 추가적인 구체예에서, 합성 유전자와 합성 구조물을 그것이 발현될 세포의 계놈내로 통합시키기 위해 변형을 가한다. 당업자들은 숙주 세포의 계놈 내로 유전자 서열 또는 유전 구조물을 통합시키기 위해서는 어떤 부가적인 유전자 서열이 요구될 수 있음을 알 것이다. 식물의 경우, *Agrabacterium tumefaciens* Ti 플라스미드의 T-DNA로부터의 좌우 경계 서열이 일반적으로 요구된다.

[0214] 본 발명은 또한 본 명세서에 설명된 합성 유전자 또는 이를 함유하는 유전 구조물을 포함하는 분리된 세포, 조직 또는 기관도 포괄한다. 본 발명의 범위는 또한 상기 세포, 조직 및 기관으로부터 유도된 재생 조직, 기관 및 개체 전체 및 그의 번식체와 자손까지 확장된다.

[0215] 예컨대, 호르몬-함유 배지상에서 형질전환된 식물 세포, 또는 조직 또는 기관으로부터 식물을 재생시킬 수 있고, 재생된 식물은 형질전환된 세포와 형질전환되지 않은 세포의 키메라; 클론성 형질전환체 (예컨대, 발현 카세트를 함유하도록 형질전환된 모든 세포); 형질전환된 조직과 형질전환되지 않은 조직의 이식체 (예컨대 감귤종에서 형질전환되지 않은 접순에 이식된 형질전환된 대목)와 같이 여러가지 다양한 형태를 취할 수 있다. 형질전환된 식물은 여러가지 수단, 예컨대 클론 번식 또는 전통적인 육종 기술에 의해 번식시킬 수 있다. 예컨대, 1세대 (또는 T1) 형질전환 식물은 자기복제되어 동형접합성 (homozygous) 2세대 (또는 T2) 형질전환식물을 생산하고, 전통적인 육종 기술에 의해 T2식물을 더욱 번식시킬 수 있는 것이다.

[0216] 다음의 비제한적인 실시예를 참고로 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0217] 실시예 1

[0218] **CMV 프로모터 서열 및/또는 SV40L 프로모터 서열에 링크된 BEV 폴리머라제 유전자 서열을 함유하는 유전 구조물**

[0219] 1. 시판되는 플라스미드

[0220] **플라스미드 pBluescript II (SK+)**

[0221] 플라스미드 pBluescript II (SK+)는 Stratagene사가 시판하고 있으며, LacZ 프로모터 서열과 lacZ-알파 전사 터미네이터를 포함하고, 구조 유전자를 삽입할 수 있는 복수개의 클로닝 부위를 갖는다. 이 플라스미드는 또한 복제를 위한 f1 오리진과 ColE1 및 암피실린-내성 유전자를 추가로 함유한다.

[0222] **플라스미드 pSVL**

[0223] 플라스미드 pSVL은 Pharmacia사가 시판하며 SV40 레이트 프로모터 서열의 소스 역할을 한다. pSVL의 뉴클레오타이드 서열도 GenBank Accession Number U13868로서 공중 구입가능하다.

[0224] **플라스미드 pCR2.1**

[0225] 플라스미드 pCR2.1은 Invitrogen사가 시판하며 LacZ 프로모터 서열과 lacZ-α 전사 터미네이터를 함유하고, 그 사이에 구조 유전자가 삽입될 수 있는 클로닝 부위를 갖는다. 플라스미드 pCR2.1은 폴리머라제 연쇄 반응시 Taq 폴리머라제에 의해 종종 합성되는 A-overhang을 이용하여 핵산 단편을 클로닝하기 위해 고안된 것이다. 이러한 유형으로 클로닝된 PCR 단편들은 2개의 EcoRI 부위에 의해 플랜킹된다. 이 플라스미드는 복제를 위한 f1 오리진과 ColE1 및 카마나신-내성 및 암피실린-내성 유전자를 추가로 함유한다.

[0226] **플라스미드 pEGFP-N1 MCS**

[0227] 플라스미드 pEGFP-N1 MCS (도 1; Clontech)는 보다 밝은 형광을 내도록 최적화시킨 야생형 녹색 형광 단백질 (GFP; Prasher 외, 1992; Chalfie 외, 1994; Inouye 및 Tsuji 1994)의 적색을 띤 변종을 코딩하는 오픈 리딩 프레임에 작동적으로 연결된 CMV IE 프로모터를 함유한다. pEGFP-N1 MCS에 의해 코딩된 이 특이적인 GFP 변종은 Cormack 등 (1996)에 의해 개시된 바 있다. 플라스미드 pEGFP-N1 MCS는 CMV IE 프로모터와 GFP 오픈 리딩 프레임 사이에 위치한 Bg/II 및 BamHI 부위 및 그외의 많은 제한 엔도뉴클리아제 절단부위를 함유하는 복수개의 클로닝 부위를 갖는다. 이러한 멀티플 클로닝 부위로 클로닝된 구조 유전자들은 기능적인 번역 개시 부위를 결합 경우 전사 수준에서 발현되겠지만, 이러한 구조 유전자 서열은 단백질 수준으로는 발현 (즉, 번역) 되지 않을 것이다. 기능적인 번역 개시 부위를 포함하는 멀티플 클로닝 부위내로 삽입된 구조 유전자 서열들은 GFP-코딩 서열과 함께 인-프레임 (in-frame) 클로닝될 경우 GFP 융합 폴리펩타이드로서 발현될 것이다. 이 플라스미드는 또한 GFP 오픈 리딩 프레임의 SV40 폴리아데닐화 시그널 하류를 추가로 포함함으로써, CMV-IE 프로모터 서열로부터 전사된 mRNA의 3'-말단을 적절히 프로세싱시킨다. 이 플라스미드는 또한 동물 세포에서 복제 기능하는

SV40 오리진; 카나마이신, 네오마이신 또는 G418에 대해 형질전환 세포를 선별하기 위해, HSV 티미딘 키나제 폴리아데닐화 시그널 (도 1에서 HSV TK poly(A)) 및 Tn5로부터 유도된 네오마이신/카나마이신-내성 유전자 (도 1의 Kan/neo)에 작동적으로 결합된 SV40 어얼리 프로모터 (도 1에서 SV40 EP)를 함유하는 네오마이신-내성 유전자; 세균 세포에서 기능적인 복제의 pUC19 오리진 (도 1에서 pUC Ori); 및 단일-사슬 DNA 생산을 위한 복제용 f1 오리진(도 1의 f1 오리진)을 추가로 함유한다.

2. 발현 카세트

플라스미드 pCMV.cass

플라스미드 pCMV.cass (도 2)는 CMV-IE 프로모터 서열의 조절 하에 구조 유전자 서열의 발현을 추진하기 위한 발현 카세트이다. 플라스미드 pCMV.cass는 다음과 같이 GFP 오픈 리딩 프레임의 결실에 의해 pEGFP-N1 MCS로부터 유도되었다: 플라스미드 pEGFP-N1 MCS를 PinAI 및 NotI로 절단하고, PfuI 폴리머라제를 이용하여 blunt-엔드로 만든다음 재접합시켰다. 구조 유전자 서열들을 PinAI 부위를 결여한 것을 제외하고 pEGFP-N1 MCS의 멀티플 클로닝 부위와 동일한, 멀티플 클로닝 부위를 이용하여 플라스미드 pCMV.cass내로 클로닝하였다.

플라스미드 pCMV.SV40L.cass

플라스미드 pCMV.SV40L.cass (도 3)는, CMV-IE 프로모터와 SV40 레이트 프로모터 서열들이 동일한 방향으로 전사를 지시할 수 있도록, 플라스미드 pCMV.cass (도 2)의 SalI 부위내로 SalI 단편으로서 서브-클로닝된, 플라스미드 pCR.SV40L (도 4)로부터의 SV40 레이트 프로모터 서열과 합성 폴리 A 부위를 포함한다. 따라서, SV40 프로모터 서열의 5'-말단의 합성 폴리(A) 부위는 이 플라스미드 중의 CMV IE 프로모터로부터 발현된 구조유전자의 전사 터미네이터로서 사용되며, 이것은 또한 SV40 레이트 프로모터와 합성 폴리(A) 부위 사이에 존재하는 멀티플 클로닝 부위를 통해 상기 구조 유전자를 삽입할 수 있게 해준다 (도 5). 멀티플 클로닝 부위는 BamHI 및 Bg/II 부위를 비롯하여, CMV-IE 및 SV40 레이트 프로모터 뒤에 위치한다.

플라스미드 pCMV.SVLR.cass

플라스미드 pCMV.SVLR.cass (도 4)는 CMV-IE 또는 SV40 레이트 프로모터가 원하는 바에 따라, 센스 또는 안티센스 방향으로 구조 유전자 또는 멀티플 구조 유전자 유닛의 전사를 추진할 수 있게 하도록, 플라스미드 pCMV.cass (도 2)의 SalI 부위에 SalI 단편으로서 서브-클로닝된 플라스미드 pCR.SV40L로부터 유래된 SV40 레이트 프로모터 서열을 포함한다. 멀티플 클로닝 부위는 이 플라스미드 내의 반대되는 CMV-IE와 SV40 레이트 프로모터 서열 사이에 위치하여, 구조 유전자 서열의 도입을 쉽게 해준다. 이 플라스미드로부터 구조 유전자 서열을 발현시키기 위해서는, 3' 말단에 위치한 그 자신의 전사 종결 서열내로 도입되어야 하는데, 이는, 이 플라스미드 내에는 반대되는 CMV-IE 및 SV40 레이트 프로모터 서열 사이에 위치한 전사 종결 서열이 전혀 없기 때문이다. 바람직하게는, pCMV.SV40LR.cass 내로 도입시키고자 하는 멀티플 구조 유전자 유닛 또는 구조 유전자 서열이 다음과 같이 5' 및 3' 폴리아데닐화 시그널을 두개 모두 함유하는 것이 좋다;

(i) CMV IE 프로모터 서열로부터 센스 방향으로 및/또는 SV40 레이트 프로모터로부터 안티센스 방향으로 구조 유전자 서열 또는 멀티플 구조 유전자 유닛을 발현시키고자 할 경우, 5' 폴리아데닐화 시그널은 안티센스 방향에, 3' 폴리아데닐화 시그널은 센스 방향에 놓일 것이며;

(ii) CMV IE 프로모터 서열로부터 안티센스 방향으로 및/또는 SV40 레이트 프로모터로부터 센스 방향으로 구조 유전자 서열 또는 멀티플 구조 유전자 유닛을 발현시키고자 할 경우에는, 5' 폴리아데닐화 시그널은 센스 방향에, 3' 폴리아데닐화 시그널은 안티센스 방향에 놓일 것이다.

그렇지 않으면, 또는 이에 더해, 적절하게-배향된 터미네이터 서열을 도 4에 도시된 바와 같이, CMV 및 SV40 프로모터의 의 5'-말단에 위치시킬 수 있다.

다른 한편, 플라스미드 pCMV.SV40LR.cass는 CMV IE 프로모터 또는 SV40 프로모터 서열 중 어느 하나로부터 센스 또는 안티센스 방향으로, 그 사이에 위치한 여하한 구조 유전자의 발현을 용이하게 하기 위해 적합한 방향으로, CMV IE와 SV40 레이트 프로모터 서열 사이에 위치한 2개의 폴리아데닐화 시그널을 함유하는 유도체 플라스미드를 생산하도록 추가로 변형된다. 본 발명은 이러한 변형체도 명백히 포괄한다.

또 다른 한편, 적절히 배향된 터미네이터들은 안티센스 방향에서 2개의 프로모터 각각의 관독 (readthrough) 후 전사 종결이 일어날 수 있도록, CMV 프로모터와 SV40L 프로모터 사이에 위치될 수 있다.

3. 중간 구조물 (intermediate constructs)

- [0241] **플라스미드 pCR.Bgl-GFP-Bam**
- [0242] 플라스미드 pCR.Bgl-GFP-Bam (도 5)은 lacZ 프로모터의 조절 하에 작동적으로 위치된 플라스미드 pEGFP-N1 MCS (도 1)로부터 유도된 GFP 오픈 리딩 프레임의 내부 대역을 포함한다. 이 플라스미드를 만들기 위해, 증폭 프라이머인 Bgl-GFP (SEQ ID NO: 1) 및 GFP-Bam (SEQ ID NO: 2)을 이용하여 pEGFP-N1 MCS로부터 GFP 오픈 리딩 프레임의 대역을 증폭시켜 플라스미드 pCR2.1 내로 클로닝하였다. 플라스미드 pCR.Bgl-GFP Bam 내의 내부 GFP-코딩 대역은 기능적인 번역 개시 코돈 및 종결 코돈을 갖지 않는다.
- [0243] **플라스미드 pBSI(SK+).EGFP**
- [0244] 플라스미드 pBSI(SK+).EGFP (도 6)은 lacZ 프로모터 조절 하에 작동적으로 위치된 플라스미드 pEGFP-N1 MCS (도 1)로부터 유래된 EGFP 오픈 리딩 프레임을 포함한다. 이 플라스미드를 만들기 위해, pEGFP-N1 MCS의 EGFP 코딩 대역을 Not1/Xho1 단편으로서 절단하여 플라스미드 pBluescript II (SK+)의 Not1/Xho1 클로닝 부위 내로 클로닝시켰다.
- [0245] **플라스미드 pCMV.EGFP**
- [0246] 플라스미드 pCMV.EGFP (도 7)은 CMV-IE 프로모터 서열의 조절 하에 EGFP 구조 유전자를 발현시킬 수 있다. 이 플라스미드를 만들기 위해 플라스미드 pBSII(SK+)로부터 EGFP 서열을 BamHI/SacI 단편으로서 절단하여 플라스미드 pCMV.cass (도 2)의 BglII/SacI 부위내로 클로닝하였다.
- [0247] **플라스미드 pCR.SV40L**
- [0248] 플라스미드 pCR.SV40L (도 8)은 pCR2.1 (Stratagene)내로 클리닝된, 플라스미드 pSVL (GenBank Accession No. U13868; Pharmacia)로부터 유래된 SV40 레이트 프로모터를 포함한다. 이 플라스미드를 만들기 위해, SalI 클로닝 부위를 갖는 프라이머 SV40-1 (SEQ ID NO: 3)과 SV40-2 (SEQ ID NO: 4)를 이용하여 SV40 레이트 프로모터를 증폭시켜, 증폭된 DNA 단편이 pCMV.cass내로 서브-클로닝되는 것을 용이하게 하였다. 이 프라이머는 또한 5'-말단에 합성 폴리(A) 부위를 함유하므로, 증폭 산물은 SV40 프로모터 서열의 5' 말단에서 합성 폴리(A) 부위를 함유한다.
- [0249] **플라스미드 pCR.BEV.1**
- [0250] 표준 증폭 조건 하에서 BEV-1 (SEQ ID NO: 5) 및 BEV-2 (SEQ ID NO: 6)로 표시되는 프라이머들을 이용하여, BEV RNA-의존성 RNA 폴리머라제 코딩 대역을 코딩하는 완전한 길이의 cDNA 클론으로부터 BEV RNA-의존성 RNA 폴리머라제 코딩 대역을 1,385 kb DNA 단편으로서 증폭시켰다. 증폭된 DNA는 BEV-1 프라이머 서열로부터 유래된 5'-BglII 제한효소 부위와 BEV-2 프라이머 서열로부터 유래된 3' BamHI 제한효소 부위를 함유하였다. 또한, BEV-1 프라이머 서열이 위치 15-17에서 조작된 번역 개시 시그널인 5'-ATG-3'를 함유함에 따라, 증폭된 BEV 폴리머라제 구조 유전자는 BEV 폴리머라제-코딩 뉴클레오타이드 서열과 함께 개시 부위 인-프레임을 함유한다. 따라서, 증폭된 BEV 폴리머라제 구조 유전자는 BEV 폴리머라제 코딩 서열 바로 상류에 (즉, 병치된)ATG 개시 코돈을 갖는다. 증폭된 DNA에는 번역 종결 코돈은 없다. 이 플라스미드를 도 9에 도시하였다.
- [0251] **플라스미드 PCR.BEV.2**
- [0252] 프라이머 BEV-1 및 BEV-3을 이용하여 완전한 BEV 폴리머라제 코딩 대역을 코딩하는 완전한 길이의 cDNA 클론으로부터 완전한 BEV 폴리머라제 코딩 대역을 증폭시켰다. 프라이머 BEV-3은 위치 5 내지 10에 BamHI 제한효소 부위와 위치 11 내지 13에 번역 종결 시그널의 상보물을 갖는다. 그 결과, 오픈 리딩 프레임은 번역 개시 시그널과 번역 종결 시그널을 BglII 및 BamHI 제한효소 부위 사이에 함유하였다. 증폭된 단편을 pCR2.1 (Stratagene) 내로 클로닝시켜 플라스미드 pCR2.BEV.2를 만들었다 (도 10).
- [0253] **플라스미드 PCR.BEV.3**
- [0254] 증폭 프라이머들인 BEV-3 (SEQ ID NO: 7) 및 BEV-4 (SEQ ID NO: 8)를 이용하여 완전한 길이의 BEV 폴리머라제 cDNA 클론으로부터 번역불가능한 BEV 폴리머라제 구조 유전자를 증폭시켰다. 프라이머 BEV-4는 위치 5-10에 BglII 클로닝 부위를 함유하며 이 BglII 부위의 하류 서열들은 BEV 폴리머라제 유전자의 뉴클레오타이드 서열들과 동일하다. 프라이머 BEV-3 및 BEV-4의 증폭된 DNA 산물에는 기능적인 ATG 개시 코돈이 없다. BEV 폴리머라제는 폴리단백질의 일부로서 발현되고, 그 결과, 이 유전자에는 ATG 번역 개시 코돈이 없다. 증폭된 DNA를 플라스미드 pCR2.1 (Stratagene)내로 클로닝시켜 플라스미드 PCR.BEV.3를 만들었다 (도 11).

- [0255] **플라스미드 pCMV.EGFP.BEV2**
- [0256] pCR.BEV.2로부터의 BEV 폴리머라제 서열을 BglIII/BamHI 단편으로서 pCMV.EGFP의 BamHI 부위에 클로닝시킴으로써 플라스미드 pCMV.EGFP.BEV2를 만들었다 (도 12).
- [0257] **4. 대조군 플라스미드**
- [0258] **플라스미드 pCMV.BEV.2**
- [0259] 플라스미드 pCMV.BEV.2 (도 13)은 CMV-IE 프로모터 서열의 조절 하에 BEV 폴리머라제 오픈 리딩 프레임 전체를 발현시킬 수 있다. 플라스미드 pCMV.BEV.2를 만들기 위해, pCR.BEV.2로부터 BEV 폴리머라제 서열을 BglII-to-BamHI 단편으로서 센스 방향으로 BglII/BamHI-절단된 pCMV.cass (도 2) 내로 서브-클로닝시켰다.
- [0260] **플라스미드 pCMV.BEV.3**
- [0261] 플라스미드 pCMV.BEV.3 (도 14)는 CMV-IE 프로모터 서열의 조절 하에 센스 방향으로 번역불가능한 BEV 폴리머라제 구조 유전자를 발현시킨다. pCMV.BEVnt를 생산하기 위해, pCR.BEV.3으로부터의 BEV 폴리머라제 서열을 BglII-to-BamHI 단편으로서 센스 방향으로 BglII/BamHI-절단된 pCMV.cass (도 2)내로 서브-클로닝시켰다.
- [0262] **플라스미드 pCMV.VEB**
- [0263] 플라스미드 pCMV.VEB (도 15)는 CMV-IE 프로모터 서열의 조절 하에 안티센스 BEV 폴리머라제 mRNA를 발현시킨다. 플라스미드 pCMV.VEB를 만들기 위해, pCR.BEV.2로부터 BEV 폴리머라제 서열을 안티센스 방향으로, BglII-to-BamHI 단편으로서 BglII/BamHI-절단된 pCMV.cass (도 2) 내로 서브-클로닝시켰다.
- [0264] **플라스미드 pCMV.BEV.GFP**
- [0265] pCR.Bgl-GFP-Bam으로부터 GFP 단편을 BglIII/BamHI 단편으로서 BamHI-절단된 pCMV.BEV.2내로 클로닝시켜 플라스미드 pCMV.BEV.GFP (도 16)을 만들었다. 이 플라스미드는 몇몇 실험에서 대조군 역할을 하며 중간 구조물 역할도 한다.
- [0266] **플라스미드 pCMV.BEV.SV40-L.0**
- [0267] 플라스미드 pCMV.BEV.SV40-L.0 (도 17)은 플라스미드 pCMV.SV40L.cass의 SV40 레이트 프로모터 서열과 CMV-IE 프로모터 사이의 센스 방향에 삽입된 플라스미드 pCR.BEV.2로부터 유도된 번역가능한 BEV 폴리머라제 구조 유전자를 함유한다. 플라스미드 pCMV.BEV.SV40L.0를 생산하기 위해, BEV 폴리머라제 구조 유전자를 BEIII-to-BamHI 단편으로서 BglII-절단된 pCMV.SV40L.cass DNA 내로 서브-클로닝시켰다.
- [0268] **플라스미드 pCMV.O.SV40L.BEV**
- [0269] 플라스미드 pCMV.O.SV40L.BEV (도 18)은 플라스미드 pCMV.SV40L.cass 내에 존재하는 SV40 레이트 프로모터 서열과 탠덤 CMV-IE 프로모터 하류에 클로닝된 플라스미드 pCR.BEV.2로부터 유도된 번역가능한 BEV 폴리머라제 구조 유전자를 함유한다. 플라스미드 pCMV.O.SV40L.BEV를 만들기 위해, BEV 폴리머라제 구조 유전자를 센스 방향으로, BglII-to-BamHI 단편으로서 BglII-절단된 pCMV.SV40L.cass DNA 내로 서브-클로닝시켰다.
- [0270] **플라스미드 pCMV.O.SV40L.VEB**
- [0271] 플라스미드 pCMV.O.SV40L.VEB (도 19)는 플라스미드 pCMV.SV40L.cass 내에 존재하는 SV40 레이트 프로모터 서열과 탠덤 CMV-IE 프로모터 하류에 클로닝된 플라스미드 pCR.BEV.2로부터 유도된 안티센스 BEV 폴리머라제 구조 유전자를 함유한다. 플라스미드 pCMV.O.SV40L.VEB를 만들기 위해, BEV 폴리머라제 구조 유전자를, 안티센스 방향으로 BglII-to-BamHI 단편으로서 BglII-절단된 pCMV.SV40L.cass DNA 내로 서브-클로닝시켰다.
- [0272] **5. 테스트 플라스미드**
- [0273] **플라스미드 pCMV.BEVx2**
- [0274] 플라스미드 pCMV.BEVx2 (도 20)은 CMV-IE 프로모터 서열의 조절 하에 완전한 BEV 폴리머라제 오픈 리딩 프레임의 직접적인 반복물을 함유한다. 적어도 진핵 세포에서는, CMV-IE 프로모터에 더 가깝게 위치한 오픈 리딩 프레임은 번역가능하다. pCMV.BEVx2를 만들기 위해, 플라스미드 pCR.BEV.2로부터의 BEV 폴리머라제 구조 유전자를 센스 방향에서 BglII-to-BamHI 단편으로서, 이미 그 안에 존재하는 BEV 폴리머라제 구조 유전자의 바로 하류의 BglII-절단된 pCMV.BEV.2 내로 서브-클로닝시켰다.

- [0275] **플라스미드 pCMV.BEVx3**
- [0276] 플라스미드 pCMV.BEVx3 (도 21)은 CMV-IE 프로모터 조절 하에 3개의 완전한 BEV 폴리머라제 오픈 리딩 프레임의 직접 반복물을 함유한다. 플라스미드 pCMV.BEVx3를 만들기 위해, 플라스미드 pCR.BEV.2로부터의 BEV 폴리머라제 단편을 센스 방향에서 BglII/BamHI 단편으로서, 이미 그 안에 존재하는 BEV 폴리머라제 서열의 바로 하류의 pCMV.BEVx2의 BamHI 부위 내로 서브-클로닝시켰다.
- [0277] **플라스미드 pCMV.BEVx4**
- [0278] 플라스미드 pCMV.BEVx4 (도 22)는 CMV-IE 프로모터 조절 하에 4개의 완전한 BEV 폴리머라제 오픈 리딩 프레임의 직접 반복물을 함유한다. 플라스미드 pCMV.BEVx4를 만들기 위해, 플라스미드 pCR.BEV.2로부터의 BEV 폴리머라제 단편을 센스 방향에서 BglII/BamHI 단편으로서, 이미 그 안에 존재하는 BEV 폴리머라제 서열의 바로 하류의 pCMV.BEVx3의 BamHI 부위 내로 서브-클로닝시켰다.
- [0279] **플라스미드 pCMV.BEV.SV40L.BEV**
- [0280] 플라스미드 pCMV.BEV.SV40L.BEV (도 23)은 CMV-IE 프로모터와 SV40 레이트 프로모터 서열의 조절 하에 작동적으로, 그리고 별도로 위치한 2개의 BEV 폴리머라제 구조 유전자를 함유하는 멀티플 구조 유전자 유닛을 포함한다. 플라스미드 pCMV.BEV.SV40L.BEV을 만들기 위해, pCRBEV.2에 존재하는 번역가능한 BEV 폴리머라제 구조 유전자를 센스 방향에서 BglII-to-BamHI 단편으로서, BamHI-절단된 pCMV.BEV.SV40L-0 중에 존재하는 SV40 레이트 프로모터 서열 뒤에 서브-클로닝시켰다.
- [0281] **플라스미드 pCMV.BEV.SV40L.VEB**
- [0282] 플라스미드 pCMV.BEV.SV40L.VEB (도 24)는 CMV-IE 프로모터 및 SV40 레이트 프로모터 서열의 조절 하에 작동적으로, 그리고 별도로 위치하는 2개의 BEV 폴리머라제 구조 유전자를 함유하는 멀티플 구조 유전자 유닛을 포함한다. 플라스미드 pCMV.BEV.SV40L.VEB를 만들기 위해, pCR.BEV.2내에 존재하는 번역가능한 BEV 폴리머라제 구조 유전자를 안티센스 방향으로, BamHI-절단된 pCMV.BEV.SV40L-0에 존재하는 SV40 레이트 프로모터 서열 뒤에 BglII-to-BamHI 단편으로서 서브클로닝시켰다. 이 플라스미드에서, BEV 폴리머라제 구조 유전자가 CMV-IE 프로모터의 조절 하에 센스 방향으로 발현되어 번역가능한 mRNA가 생산되는 한편, BEV 폴리머라제 구조 유전자도 SV40 프로모터의 조절 하에 발현되어 안티센스 mRNA가 생산된다.
- [0283] **플라스미드 pCMV.BEV.GFP.VEB**
- [0284] 플라스미드 pCMV.BEV.GFP.VEB (도 25)는 역전된 반복물(inverted repeat) 내의 각각의 BEV 구조 유전자 서열 사이에 GFP 오픈 리딩 프레임 (스터퍼 단편)이 삽입됨에 의해 간섭된, BEV 구조 유전자 역전 반복물 또는 팔린드롬을 함유한다. 플라스미드 pCMV.BEV.GFP.VEB를 만들기 위해, 먼저 pCR.Bgl-GFP-Bam으로부터의 GFP 스퍼 단편을 BglII-to-BamHI 단편으로서 센스 방향으로, BamHI-절단된 pCMV.BEV.2내로 서브클로닝시켜 중간 플라스미드 pCMV.BEV.GFP를 만들었다. 여기서 BEV 폴리머라제-코딩 서열 및 GFP-코딩 서열들은 동일한 5'-BglII-to-BamHI-3' 단편 내에 함유되었다. 이어서 pCMV.BEV.2로부터의 BEV 폴리머라제 구조 유전자를 BglII-to-BamHI 단편으로서 안티센스 방향으로 BamHI-절단된 pCMV.BEV.GFP 내로 클로닝시켰다. 플라스미드 pCMV.BEV.GFP.VEB내의 CMV-IE 프로모터 서열에 더 가까운 BEV 폴리머라제 구조 유전자는 적어도 진핵 세포에서는 번역가능하다.
- [0285] **플라스미드 pCMV.EGFP.BEV2.PFG**
- [0286] 플라스미드 pCMV.EGFP.BEV2.PFG (도 26)은 역전된 반복물 내의 각각의 GFP 구조 유전자 사이에 BEV 폴리머라제 서열을 삽입시킴으로써 간섭된, GFP 팔린드롬을 함유한다. 이 플라스미드를 만들기 위해, pCR.Bgl-GFP-Bam으로부터의 GFP 단편을 CMV 프로모터에 대해 안티센스 방향으로, BglII/BamHI 단편으로서 pCMV.EGFP.BEV2의 BamHI 부위내로 클로닝시켰다.
- [0287] **플라스미드 pCMV.BEV.SV40LR**
- [0288] 플라스미드 pCMV.BEV.SV40LR (도 27)은 반대되는 CMV-IE 프로모터와 SV40 레이트 프로모터 서열의 조절 하에 작동적으로 그리고 별도로 위치한 BEV 폴리머라제 오픈 리딩 프레임 전체를 함유하는 구조 유전자를 함유하기 때문에, 완전한 길이의 BEV 폴리머라제 구조 유전자의 적어도 양 사슬로부터 BEV 폴리머라제 전사물을 잠재적으로 생산한다. 플라스미드 pCMV.BEV.SV40LR을 만들기 위해, pCR.BEV.2에 존재하는 번역가능한 BEV 폴리머라제 구조 유전자를 BglII-to-BamHI 단편으로서, 플라스미드 pCMV.SV40LR.cass의 단일 BglII 부위내로 서브클로닝시켜, BEV 오픈 리딩 프레임이 CMV-IE 프로모터 서열에 대해 센스 방향으로 존재하도록 하였다.

- [0289] 당업자들은 이 클로닝 전략을 이용함으로써, CMV IE 프로모터 서열에 대해 안티센스 방향으로, pCR.BEv.2로부터의 BEV 폴리머라제 단편이 삽입된 플라스미드를 생산하는 것이 가능함을 인식할 수 있을 것이다. 본 발명은 이러한 유전 구조물도 포괄한다.
- [0290] 실시예 2
- [0291] CMV 프로모터 서열 및/또는 SV40L 프로모터 서열에 작동적으로 연결된
- [0292] 포르신 α -1,3-갈락토실트랜스페라제 (Galt) 구조 유전자 서열 또는
- [0293] 서열들을 함유하는 유전 구조물
- [0294] 1. 시판되는 플라스미드
- [0295] 플라스미드 pcDNA3
- [0296] 플라스미드 pcDNA3은 Invitrogen사가 시판하며 구조 유전자 서열을 삽입하기 위한 복수개의 클로닝 부위를 갖고 있고, CMV-IE 프로모터와 BGHpA 전사 터미네이터를 함유한다. 이 플라스미드는 ColE1 및 f1 복제 오리진과 네오마이신-내성 유전자 및 암피실린-내성 유전자를 추가로 함유한다.
- [0297] 2. 중간 플라스미드
- [0298] 플라스미드 pcDNA3.Galt
- [0299] 플라스미드 pcDNA3.Galt (BresaGen Limited, South Australia, Australia; 도 28)는 플라스미드 pcDNA3 (Invitrogen)이며 CMV-IE 프로모터 서열의 조절 하에 포르신 유전자 알파-1,3-갈락토실트랜스페라제 (Galt)를 작동적으로 코딩하므로 그로부터 발현가능하다. 플라스미드 pcDNA3.Galt를 만들기 위해, 포르신 유전자 알파-1,3-갈락토실트랜스페라제 cDNA를 pcDNA3의 EcoRI 클로닝 부위내로 EcoRI 단편으로서 클로닝시켰다. 이 플라스미드는 ColE1 및 f1 복제 오리진과 네오마이신 내성 유전자 및 암피실린 내성 유전자를 추가로 함유한다.
- [0300] 3. 대조군 플라스미드
- [0301] 플라스미드 pCMV.Galt
- [0302] 플라스미드 pCMV.Galt (도 29)는 CMV-IE 프로모터 서열의 조절 하에 Galt 구조 유전자를 발현할 수 있다. 플라스미드 pCMV.Galt를 만들기 위해, 플라스미드 pcDNA3.Galt로부터의 Galt 서열을 EcoRI 단편으로서 절단하여 플라스미드 pCMV.cass (도 2)의 EcoRI 부위내로 센스 방향으로 클로닝시켰다.
- [0303] 플라스미드 pCMV.EGFP.Galt
- [0304] 플라스미드 pCMV.EGFP.Galt (도 30)는 CMV-IE 프로모터 서열의 조절 하에 Galt 융합 폴리펩타이드로서 Galt 구조 유전자를 발현할 수 있다. 플라스미드 pCMV.EGFP.Galt를 만들기 위해, pCMV.Galt (도 29)로부터 Galt 서열을 BglII/BamHI 단편으로서 절단하여 pCMV.EGFP의 BamHI 부위내로 클로닝시켰다.
- [0305] 플라스미드 pCMV.Galt.GFP
- [0306] pcDNA3으로부터 Galt cDNA를 EcoRI 단편으로서 EcoRI-절단된 pCMV.EGFP내로 센스 방향으로 클로닝시켜 플라스미드 pCMV.Galt.GFP (도 31)을 만들었다. 이 플라스미드는 대조군 및 구조 중간체로서의 역할을 모두 한다.
- [0307] 플라스미드 pCMV.Galt.SV40L.0
- [0308] 플라스미드 pCMV.Galt.SV40L.0 (도 32)는 pCMV.SV40L.cass에 존재하는 CMV 프로모터의 하류에 클로닝된 Galt 구조 유전자를 함유한다. 이 플라스미드를 만들기 위해, pCMV.Galt로부터의 Galt cDNA 단편을 BglII/BamHI 단편으로서 BglII-절단된 pCMV.SV40L.cass 내로 센스 방향으로 클로닝시켰다.
- [0309] 플라스미드 pCMV.0.SV40L.tlaG
- [0310] 플라스미드 pCMV.0.SV40L.tlaG (도 33)는 pCMV.SV40L.cass에 존재하는 SV40L 프로모터의 안티센스 방향 하류에 Galt 구조 유전자 클론들을 함유한다. 이 플라스미드를 만들기 위해, pCMV.Galt로부터의 Galt cDNA 단편을 안티센스 방향에서 BamHI-절단된 pCMV.SV40L.cass 내로 BglII/BamHI로서 클로닝시켰다.
- [0311] 플라스미드 pCMV.0.SV40L.Galt
- [0312] 플라스미드 pCMV.0.SV40L.Galt (도 34)는 pCMV.SV4L.cass에 존재하는 SV40L 프로모터의 하류에 클로닝된 Galt

구조 유전자를 함유한다. 이 플라스미드를 만들기 위해, pCMV.Galt로부터의 Galt cDNA 단편을 BglII/BamHI으로 서 센스 방향으로 BamHI-절단된 pCMV.SV40L.cass 내로 클로닝시켰다.

[0313] 4. 테스트 플라스미드

[0314] 플라스미드 pCMV.Galtx2

[0315] 플라스미드 pCMV.Galtx2 (도 35)는 CMV-IE 프로모터 서열의 조절 하에 Galt 오픈 리딩 프레임의 직접적인 반복물을 함유한다. 적어도 진핵세포에서는, CMV-IE 프로모터에 더 가까이 위치한 오픈 리딩 프레임은 번역가능하다. 플라스미드 pCMV.Galtx2를 만들기 위해, pCMV.Galt로부터의 Galt 구조 유전자를 BglII/BamHI 단편으로서 절단하고 센스 방향으로 pCMV.Galt의 BamHI 클로닝 부위 내로 클로닝시켰다.

[0316] 플라스미드 pCMV.Galtx4

[0317] 플라스미드 pCMV.Galtx4 (도 36)은 CMV-IE 프로모터 서열의 조절 하에 Galt 오픈 리딩 프레임의 직접적인 4중 반복물을 함유한다. 적어도 진핵세포에서는, CMV-IE 프로모터에 더 가까이 위치한 오픈 리딩 프레임은 번역가능하다. 플라스미드 pCMV.Galtx4를 만들기 위해, pCMV.Galtx2로부터의 Galtx2 서열을 BglII/BamHI 단편으로서 절단하고 센스 방향으로 pCMV.Galtx2의 BamHI 클로닝 부위 내로 클로닝시켰다.

[0318] 플라스미드 pCMV.Galt.SV40L.Galt

[0319] 플라스미드 pCMV.Galt.SV40L.Galt (도 37)은 Galt의 2가지 센스 전사체, 즉, CMV 프로모터에 추진되는 하나와 SV40L 프로모터에 의해 추진되는 또 다른 하나를 발현시키기 위해 고안된 것이다. 이 플라스미드를 만들기 위해, pCMV.Galt로부터의 Galt cDNA 단편을 센스 방향에서 BglII-절단된 pCMV.O.SV40.Galt 내로 BglII/BamHI 단편으로서 클로닝시켰다.

[0320] 플라스미드 pCMV.Galt.SV40L.tlaG

[0321] 플라스미드 pCMV.Galt.SV40L.tlaG (도 38)은 CMV 프로모터에 의해 추진된 Galt의 센스 전사체와 SV40L 프로모터에 의해 추진된 안티센스 전사체를 발현시키기 위해 고안된 것이다. 이 플라스미드를 만들기 위해, pCMV.Galt로부터의 Galt cDNA 단편을 센스 방향에서 BglII/BamHI 단편으로서 BalII-절단된 pCMV.O.SV40.talG내로 클로닝시켰다.

[0322] 플라스미드 pCMV.Galt.GFP.tlaG

[0323] 플라스미드 pCMV.Galt.GFP.tlaG (도 39)는 역전된 반복체 내에 각각의 구조 유전자 사이의 GFP 서열의 삽입에 의해 간섭된 Galt 팔린드롬을 함유한다. 이 플라스미드를 만들기 위해, pCMV.Galt로부터 BglII/BamHI Galt cDNA 단편을 CMV 프로모터에 대해 안티센스 방향으로 pCMV.Galt.GFP의 BamHI 부위로 클로닝시켰다.

[0324] 플라스미드 pCMV.EGFP.Galt.PFG

[0325] 플라스미드 pCMV.EGFP.Galt.PFG (도 40)는 그 발현이 CMV 프로모터에 의해 추진되는, 역전된 반복체의 각각의 GFP 구조 유전자 각각의 사이에 Galt 서열의 삽입에 의해 간섭된 GFP 팔린드롬을 함유한다. 이 플라스미드를 만들기 위해, pCMV.Galt로부터의 Galt 서열을 BglII/BamHI 단편으로서 센스 방향으로 BamHI-절단된 pCMV.EGFP내로 클로닝시켜 중간체 pCMV.EGFP.Galt (도시하지 않음)을 만들고; 이어서 안티센스 방향으로 pCR.Bgl-pCMV.EGFP.Galt로부터 GFP 서열을 얻었다.

[0326] 플라스미드 pCMV.Galt.SV40LR

[0327] 플라스미드 pCMV.Galt.SV40LR (도 41)은 발현 카세트 pCMV.SV40LR.cass 내에 반대되는 CMV와 SV40L 사이에 클로닝된 Galt cDNA 서열을 발현시키기 위해 고안된 것이다. 이 플라스미드를 만들기 위해, pCMV.Galt로부터의 Galt 서열을 35S 프로모터에 대해 센스 방향에서 BglII-절단된 pCMV.SV40LR.cass 내에 BglII/BamHI 단편으로서 클로닝시켰다.

[0328] 실시예 3

[0329] 35S 프로모터 서열 및/또는 SCBV 프로모터 서열에 작동적으로 연결된

[0330] PVY Nia 서열을 함유하는 유전 구조물

[0331] 1. 바이너리 벡터 (binary vector)

- [0332] **플라스미드 pART27**
- [0333] 플라스미드 pART27은, pART7 발현 카세트와 혼용가능하도록 특별히 고안된 바이너리 벡터이다. 이것은 E.coli 및 Agrobacterium tumefaciens의 세균 복제 오리진, 세균 선별을 위한 스펙티오마이신 내성 유전자, Agrobacterium에서 식물 세포로의 DNA 전달을 위한 좌우 T-DNA 경계 및 형질전환된 식물 세포의 선별을 가능케 하는 카나마이신 내성 카세트를 함유한다. 카나마이신 내성 카세트는 T-DNA 경계 사이에 위치하며, pART27 역시 T-DNA 경계 사이에 클로닝될 pART7과 같이, 벡터내에 준비된 구조물의 클로닝을 가능하게 해주는 독특한 NotI 제한효소 부위도 함유한다. pART27의 제조는 Gleave, AP (1992)에 설명되어 있다.
- [0334] 이 벡터내로 NotI 삽입물을 클로닝하면, 2개의 삽입 방향이 얻어질 수 있다. 다음의 실시예 전반에 걸쳐, 설명된 pART7 구조물 중의 35S 프로모터의 방향에 상대적으로, 동일한 삽입 방향을 선택하였다: 이것은 상이한 구조물과 상이한 삽입 방향을 비교함으로써 일어날 수 있는 여하한 실험적 인공물을 최소화하기 위한 것이었다.
- [0335] **2. 시판하는 플라스미드**
- [0336] **플라스미드 pBC(KS-)**
- [0337] 플라스미드 pBC(KS-)는 Stratagene사가 시판하며 LacZ 프로모터 서열과 lacZ-알파 전사 터미네이터를 함유하고 구조 유전자 서열을 삽입하기 위한 멀티플 클로닝 부위를 갖는다. 이 플라스미드는 또한 ColE1 및 fl 복제 오리진과 클로람페니콜-내성 유전자도 함유한다.
- [0338] **플라스미드 pSP72**
- [0339] 플라스미드 pSP72는 Promega사가 시판하며 구조 유전자 서열을 삽입하기 위한 멀티플 클로닝 부위를 함유한다. 이 플라스미드는 또한 ColI1 복제 오리진과 암피실린-내성 유전자도 포함한다.
- [0340] **3. 발현 카세트**
- [0341] **플라스미드 pART7**
- [0342] 플라스미드 pART7은 35S 프로모터 뒤에 클로닝된 서열들의 발현을 추진하기 위해 고안된 발현 카세트이다. 이것은 옥티파인 (octipine) 신제이즈 터미네이터의 대역과 클로닝을 돕기 위한 폴리링커를 함유한다. 35S 발현 카세트는 단일 NotI 부위를 함유하는 pART27과 같은 바이너리 발현 벡터 내로의 클로닝을 가능케 하는 2개의 NotI 제한효소 부위에 의해 플랭킹되어 있다. 이것의 구조는 Gleave, AP (1992)에 설명되어 있고 그 지도는 도 42에 나타내었다.
- [0343] **플라스미드 pART7.35S.SCBV.cass**
- [0344] 플라스미드 pART7.35S.SCBV.cass는 단일 플라스미드 내로 클로닝된 2개의 별개의 유전자 서열들을 발현하기 위해 고안되었다. 이 플라스미드를 만들기 위해, nos 터미네이터와 SCBV 프로모터에 상응하는 서열들을 PCR에 의해 증폭시키고 이어서 35S 프로모터와 OCS 사이의 pART7의 폴리링커내로 클로닝시켰다.
- [0345] 얻어진 플라스미드는 다음의 성분 배치를 갖는다:
- [0346] 35S 프로모터 - 폴리링커 1 - NOS 터미네이터 - SCBV 프로모터 - 폴리링커 2 - OCS 터미네이터.
- [0347] 폴리링커 1 내로 클로닝된 서열들의 발현은 35S 프로모터에 의해 제어되고, 폴리링커 2 내로 클로닝된 서열들의 발현은 SCBV 프로모터에 의해 제어된다.
- [0348] 다음의 두가지 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 플라스미드 pAHC27 (Christensen and Quail, 1996)으로부터 NOS 터미네이터 서열을 증폭시켰다;
- NOS 5' (정방향 프라이머; SEQ ID NO: 9)**
5'-GGATTCCCGGGACGTCGCGAATTTCCCCCGATCGTTC-3'; 및
- NOS 3' (역방향 프라이머; SEQ ID NO: 10)**
5'-CCATGGCCATATAGGCCCGATCTAGTAACATAG-3'
- [0349]
- [0350] NOS 5'의 뉴클레오타이드 잔기 1 내지 17 및 NOS 3'의 뉴클레오타이드 잔기 1 내지 15는 부가적인 제한효소 부

위를 첨가함으로써 구조물 제조를 돕기 위해 고안된 부가적인 뉴클레오타이드를 나타낸다. NOS 5'의 경우 이들은 BamHI, SmaI, AatII이고 NOS3'의 NruI 부위의 최초 4개의 염기의 경우 이들은 NcoI과 SfiI 부위이다. 각각의 올리고뉴클레오타이드의 잔여 서열들은 pAHC27 중의 NOS 서열의 5' 및 3' 말단과 각각 동일하다.

[0351] 2개의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 플라스미드 pScBV-20 (Tzafir와, 1998)으로부터 SCBV 프로모터 서열들을 증폭시켰다:

SCBV 5': 5'-CCATGGCCTATATGGCCATTCCCCACATTCAAG-3' (SEQ ID NO: 11); 및

[0352] SCBV 3': 5'-AACGTTAACTTCTACCCAGTTCCAGAG-3' (SEQ ID NO: 12)

[0353] SCBV 5'의 뉴클레오타이드 잔기 1 내지 17은 구조물 제조를 돕기 위해 고안된 NcoI 및 SfiI 제한효소 부위를 코딩하며, 나머지 서열들은 SCMV 프로모터 대역의 상류 서열과 동일하다. SCBV 3'의 뉴클레오타이드 잔기 1 내지 9는 Psp10461 및 구조물 제조를 돕기 위해 고안된 HpaI 제한 효소 및 Psp 10461 제한효소 부위를 코딩하며, 나머지 서열들은 SCBV의 전사개시 부위 근처 서열의 역서열 및 상보서열과 동일하다.

[0354] PCR을 이용하여 pScBV-20으로부터 서열들을 증폭시키고 pCR2.1 (Invitrogen) 내로 클로닝시켜 pCR.NOS 및 pCR.SCBV를 각각 생산하였다. SmaI I/SfiI 절단 pCR.NOS 및 SfiI/HpaI 절단 pCR.SCBV를 SmaI 절단 pART7에 접합시키고 적절한 방향성을 갖는 플라스미드를 선택하여 pART7.35S.SCBV.cass로 명명하고 그의 구조를 도 43에 나타내었다.

[0355] 4. 중간 구조물

[0356] 플라스미드 pBC.PVY

[0357] 표준 프로토콜에 따라 PVY-감염된 담배로부터 분리된 역전사된 RNA를 템플레이트로서 이용하여 PVY 게놈 대역을 증폭시키고 플라스미드 pGEM3 (Stratagene) 내로 클로닝시켜 PGEM.PVY를 만들었다. PVY 균주 0 서열 (Acc. No. D12539, Genbank)의 SalI/HindIII 단편 위치 1536-2270에 상응하는, PGEM.PVY로부터의 SalI/HindIII 단편을 플라스미드 pBC(Stratagene Inc.) 내로 서브클로닝시켜 PBC.PVY를 만들었다 (도 44).

[0358] 플라스미드 pSP72.PVY

[0359] pBC.PVY로부터의 EcoRI/SalI 단편을 EcoRI/SalI 절단 pSP72 (Promega)에 삽입함으로써 플라스미드 pSP72.PVY를 제조하였다. 이 구조물은 후속적인 조작을 돕기 위해 사용된 PVY 삽입물을 플랭킹하는 부가적인 제한효소 부위를 함유한다. 이 구조물의 지도를 도 45에 나타내었다.

[0360] 플라스미드 ClapBC.PVY

[0361] pSP72.PVY로부터의 ClaI/SalI 단편을 ClaI/SalI cutpBC (Stratagene)에 삽입함으로써 플라스미드 ClapBC.PVY를 만들었다. 이 구조물은 후속적인 조작을 돕기 위해 사용된 PVY 삽입물을 플랭킹하는 부가적인 제한효소 부위를 함유한다. 이 구조물의 지도를 도 46에 나타내었다.

[0362] 플라스미드 pBC.PVYx2

[0363] 플라스미드 pBC.PVYx2는 PBC.PVY로부터 유래하는 PVY서열의 2개의 직접적인 헤드-투-테일 반복물을 함유한다. 이 플라스미드는 pSP72.PVY로부터의 AccI/ClaI PVY 단편을 AccI 절단 pBC.PVY로 클로닝함으로써 생성되며 도 47에 나타내었다.

[0364] 플라스미드 pSP72.PVYx2

[0365] 플라스미드 pSP72.PVYx2는 pBC.PVY로부터 유래하는 PVY 서열의 2개의 직접적인 헤드-투-테일 반복물을 함유한다. 이 플라스미드는 pBC.PVY로부터의 AccI/ClaI PVY 단편을 AccI 절단 pSP72.PVY로 클로닝함으로써 생성되며 도 48에 나타내었다.

[0366] 플라스미드 pBC.PVYx3

[0367] 플라스미드 pBC.PVYx3은 pBC.PVY로부터 유래하는 PVY 서열의 3개의 직접적인 헤드-투-테일 반복물을 함유한다. 이 플라스미드는 pSP72.PVY로부터의 AccI/ClaI PVY 단편을 AccI 절단 pBC.PVYx2 내로 클로닝함으로써 생성되며

도 49에 나타내었다.

[0368] **플라스미드 pSP72.PVYx4**

[0369] 플라스미드 pSP72.PVYx4는 pBC.PVY로부터 유래하는 PVY 서열의 4개의 직접적인 헤드-투-테일 반복물을 함유한다. 이 플라스미드는 pSP72.PVYx2로부터의 PVY의 직접 반복물을 AccI/CaII 단편으로서 AccI 절단 pBC.PVYx2내로 클로닝함으로써 생성되며 도 50에 나타내었다.

[0370] **플라스미드 pBC.PVY.LNYV**

[0371] PVY의 직접적인 팔린드롬을 만들려는 시도는 모두 실패하였는데, 이는 아마도 이러한 서열 배열이 흔히 이용된 E.coli 클로닝 숙주에서 불안정하기 때문인 것으로 추정된다. 그러나 간접된 팔린드롬은 안정한 것으로 증명되었다.

[0372] PVY 서열의 간접된 팔린드롬을 만들기 위해, 약 360bp의 "스터퍼" 단편을 PVY 서열의 ClaI pBV.PVY 상류에 삽입하였다. 스테퍼 단편은 다음과 같이 만들었다:

[0373] 양상치 괴사 황색 바이러스 (LNYV: lettuce necrotic yellows virus)의 게놈 RNA (Deitzgen외, 1989)로부터 제조된 cDNA 라이브러리 (이 바이러스의 4b 유전자를 함유하는 것으로 알려짐)로부터 클론을 먼저 얻은 다음 다음의 프라이머를 이용해서 PCR에 의해 증폭시켰다:

LNYV 1:5'-ATGGGATCCGTTATGCCAAGAAGAAGGA-3' (SEQ ID NO: 13); 및

LNYV 2:5'-TGTGGATCCCTAACGGACCCGATG-3' (SEQ ID NO: 14)

[0374] 이 프라이머들의 처음의 9개의 뉴클레오타이드는 BamHI 부위를 코딩하며, 나머지 뉴클레오타이드는 LNYV 4b 유전자의 서열과 동일하다.

[0376] 증폭에 이어, 단편을 pCR2.1 (Stratagene)의 EcoRI 부위로 클로닝시켰다. 이 EcoRI 단편을 ClaI pBC.PVY의 EcoRI 부위 내로 클로닝시켜 중간 플라스미드 pBC.PVY.LNYV를 만들고 그 지도를 도 51에 나타내었다.

[0377] **플라스미드 pBC.PVY.LNYV.PVY**

[0378] 플라스미드 pBC.PVY.LNYV.YVP는 PVY 서열의 간접된 직접 반복물을 함유한다. 이 플라스미드를 만들기 위해, pSP72로부터의 HpaI/HincII 단편을 SmaI-절단된 pBC.PVY.LNYV내로 클로닝시키고 센스 방향을 함유하는 플라스미드를 분리하였다. 이 구조물의 지도를 도 52에 나타내었다.

[0379] **플라스미드 pBC.PVY.LNYV.YVP_Δ**

[0380] 플라스미드 pBC.PVY.LNYV.YVP_Δ는 PVY 서열의 부분 간접된 팔린드롬을 함유한다. 팔린드롬의 한쪽 팔은 PBC.PVY로부터의 모든 PVY 서열을 함유하고, 다른쪽 팔은 pSP72.PVY의 EcoRV 및 HincII 부위 사이의 서열에 해당하는, PVY로부터의 서열의 일부를 함유한다. 이 플라스미드를 만들기 위해, pSP72.PVY로부터의 EcoRV/HincII 단편을 SmaI-절단된 pBC.PVY.LNYV에 클로닝시키고 소망되는 방향을 갖는 플라스미드를 분리하고 이 구조물의 지도를 도 53에 나타내었다.

[0381] **플라스미드 pBC.PVY.LNYV.YVP**

[0382] 플라스미드 pBC.PVY.LNYV.YVP는 PVY 서열의 간접된 팔린드롬을 함유한다. 이 플라스미드를 만들기 위해 pSP72로부터의 HpaI/HincII 단편을 SmaI-절단된 pBC.PVY.LNYV내로 클로닝시키고 안티센스 방향을 함유하는 플라스미드를 분리하여 그 구조를 도 54에 나타내었다.

[0383] **5. 대조군 플라스미드**

[0384] **플라스미드 pART7.PVY & pART7.PVY**

[0385] 플라스미드 pART7.PVY (도 55)는 35S 프로모터에 의해 추진된 PVY 서열을 발현시키기 위해 고안되었다. 이 플라스미드는 이들 실험에서 대조군 구조물 역할을 하며 그 밖의 모든 구조물을 이것과 비교하였다. 이 플라스미드를 만들기 위해, ClaI pBC.PVY로부터의 ClaI/AccI 단편을 ClaI-절단된 pART7내로 클로닝시키고 PVY 게놈과 관련해서 센스 PVY 서열을 발현할 것으로 예상되는 플라스미드를 선별하였다. 35S 프로모터, PVY 서열 및 OCS 터미네이터로 구성된 서열들을 NotI 단편으로서 절단하고 NotI-절단된 pART27 내로 클로닝시키고, 소망하는 삽입 방향

을 갖는 플라스미드를 선별하여 pART27로 표시하였다.

[0386] **플라스미드 pART7.35S.PVY.SCBV.0 & pART27.35S.PVY.SCBV.0**

[0387] 플라스미드 pART7.35S.PVY.SCBV.0 (도 56)은 트랜스제닉 식물에서 단일 플라스미드로부터의 다중 구조물을 공동-발현시키기 위해 대조군으로서 작용하도록 고안되었다. 35S 프로모터는 PVY 센스 서열을 발현시키도록 고안된 반면, SCBV 프로모터는 빈 것이었다. 이 플라스미드를 만들기 위해, Cla pBC.PVY로부터의 PVY 단편을 XhoI/EcoRI 단편으로서 XhoI/EcoRI-절단된 pARET7.35S.SCBV.cass 내로 클로닝시켜 p35S.PVY.SCBV>0를 만들었다. 35S 프로모터 추진 센스 PVY 서열 및 NOS 터미네이터 및 SCBV 프로모터 및 OCS 터미네이터로 구성된 서열들을 NotI 단편으로서 절단하여 pART27 내로 클로닝시켜, 소망되는 삽입물 방향을 갖는 플라스미드를 분리하고 이를 pART27.35S.PVY.SCBV.0로 명명하였다.

[0388] **플라스미드 pART7.35S.0.SCBV.PVY & pART27.35S.0.SCBV.PVY**

[0389] 플라스미드 pART27.35S.0.SCBV.PVY (도 57)은 트랜스제닉 식물에 있어서 단일 플라스미드로부터 복수개의 구조물의 공동-발현을 위한 부가적인 대조군으로서 작용하도록 만들어졌다. 35S 프로모터 뒤에는 발현가능한 서열이 클로닝되지 않은 반면, SCBV 프로모터는 PVY 센스 단편의 발현을 추진하였다. 이 플라스미드를 만들기 위해, Cla pBC.PVY로부터의 PVY 단편을 ClaI 단편으로서, ClaI-절단된 pART7.35S.SCBV.cass 내로 클로닝시키고, 센스 방향으로 PVY 서열을 갖는 플라스미드를 분리하여 p35S.0.SCBV.PVY로 명명하였다. 35S 프로모터 및 NOS 터미네이터, SCBV 프로모터 추진 센스 PVY 서열 및 OCS 터미네이터로 구성된 서열을 NotI 단편으로서 절단하여 pART27 내로 클로닝시켰다. 소망되는 삽입 방향성을 갖는 플라스미드를 분리하여 pART27.35S.0.SCBV.PVY로 명명하였다.

[0390] **플라스미드 pART7.35S.0.SCBV.YVP & pART7.35S.0.SCBV.YVP**

[0391] 플라스미드 pART7.35S.0.SCBV.YVP (도 58)은 트랜스제닉 식물에서 단일 플라스미드로부터 복수개의 구조물의 공동-발현을 위한 부가적인 대조군으로서 작용하도록 만들어졌다. 35S 프로모터 뒤에는 발현가능한 서열이 클로닝되지 않은 반면, SCBV 프로모터는 PVY 안티센스 단편의 발현을 추진하였다. 이 플라스미드를 만들기 위해, Cla pBC.PVY로부터의 PVY 단편을 ClaI 단편으로서, ClaI-절단된 p35S.SCBV.cass 내로 클로닝시키고, 안티센스 방향으로 PVY 서열을 함유하는 플라스미드를 분리하여 p35S.0.SCBV.YVP로 명명하였다. 35S 프로모터 및 NOS 터미네이터, SCBV 프로모터 추진 센스 PVY 서열 및 OCS 터미네이터로 구성된 서열을 NotI 단편으로서 절단하여 pART27 내로 클로닝시켰다. 소망되는 삽입 방향성을 갖는 플라스미드를 분리하여 pART27.35S.0.SCBV.YVP로 명명하였다.

[0392] **6. 테스트 플라스미드**

[0393] **플라스미드 pART7.PVYx2 & pART27.PVYx2**

[0394] 플라스미드 pART7.PVYx2 (도 59)는 트랜스제닉 식물에서 35S 프로모터에 의해 추진된 PVY 서열의 직접 반복물을 발현시키기 위해 고안되었다. 이 플라스미드를 만들기 위해, pBC.PVYx2로부터의 직접 반복물을 XhoI/BamHI 단편으로서 XhoI/BamHI 절단 pART7 내로 클로닝시켰다. 35S 프로모터, PVY의 직접 반복물 및 OCS 터미네이터로 구성된 서열을 pART7.PVYx2로부터의 NotI 단편으로서 절단하여 NotI-절단된 pART27 내로 클로닝시키고, 소망되는 삽입 방향성을 갖는 플라스미드를 선별하여 pART27.PVYx2로 명명하였다.

[0395] **플라스미드 pART7.PVYx3 & pART27.PVYx3**

[0396] 플라스미드 pART7.PVYx3 (도 60)은 트랜스제닉 식물에서 35S 프로모터에 의해 추진된 3개의 PVY 서열의 직접 반복물을 발현시키기 위해 고안되었다. 이 플라스미드를 만들기 위해, pBC.PVYx3으로부터의 직접 반복물을 XhoI/BamHI 단편으로서 XhoI/BamHI 절단 pART7 내로 클로닝시켰다. 35S 프로모터, PVY의 직접 반복물 및 OCS 터미네이터로 구성된 서열을 pART7.PVYx3로부터의 NotI 단편으로서 절단하여 NotI-절단된 pART27 내로 클로닝시키고, 소망되는 삽입 방향성을 갖는 플라스미드를 선별하여 pART27.PVYx3으로 명명하였다.

[0397] **플라스미드 pART7.PVYx4 & pART27.PVYx4**

[0398] 플라스미드 pART7.PVYx4 (도 61)은 트랜스제닉 식물에서 35S 프로모터에 의해 추진된 4개의 PVY 서열의 직접 반복물을 발현시키기 위해 고안되었다. 이 플라스미드를 만들기 위해, pBC.PVYx4로부터의 직접 반복물을 XhoI/BamHI 단편으로서 XhoI/BamHI 절단 pART7 내로 클로닝시켰다. 35S 프로모터, PVY의 직접 반복물 및 OCS 터미네이터로 구성된 서열을 pART7.PVYx3로부터의 NotI 단편으로서 절단하여 NotI-절단된 pART27 내로 클로닝시키고, 소망되는 삽입 방향성을 갖는 플라스미드를 선별하여 pART27.PVYx3으로 명명하였다.

[0399] **플라스미드 pART7.PVY.LNYV.PVY & pART27.PVY.LNYV.PVY**

- [0400] 플라스미드 pART7.PVY.LNYV.PVY (도 62)는 트랜스제닉 식물에서 35S 프로모터에 의해 추진된 PVY 서열의 간접된 반복물을 발현시키기 위해 고안되었다. 이 플라스미드는 pBC.PVY.LNYV.PVY로부터의 PVY의 간접된 직접 반복물을 XhoI/BamHI 단편으로서 XhoI/BamHI로 절단된 pART7 내로 클로닝시킴으로써 만들었다. 35S 프로모터, PVY 서열의 간접된 직접 반복물 및 OCS 터미네이터로 구성된 서열을 pART7.PVY.LNYV.PVY로부터 NotI 단편으로서 절단하여 NotI-절단된 pART27 내로 클로닝시키고, 소망되는 삽입 방향성을 갖는 플라스미드를 선별하여 pART27.PVY.LNYV.PVY로 명명하였다.
- [0401] **플라스미드 pART7.PVY.LNYV.YVP_Δ & pART27.PVY.LNYV.YVP_Δ**
- [0402] 플라스미드 pART7.PVY.LNYV.YVP_Δ (도 63)은 트랜스제닉 식물에서 35S 프로모터에 의해 추진된 PVY 서열의 부분 간접된 팔린드롬을 발현시키기 위해 고안되었다. 이 구조물은 pBC.PVY.LNYV.YVP_Δ로부터의 PVY 서열의 부분 간접된 팔린드롬을 XhoI/XbaI 단편으로서 XhoI/XbaI에 의해 절단된 pART7 내로 클로닝시킴으로써 제조하였다. 35S 프로모터, PVY 서열의 부분 간접된 팔린드롬 및 OCS 터미네이터로 구성된 서열을 pART7.PVY.LNYV.YVP_Δ로부터 NotI 단편으로서 절단하여 NotI-절단된 pART27 내로 클로닝시키고, 소망되는 삽입 방향성을 갖는 플라스미드를 선별하여 pART27.PVY.LNYV.YVP_Δ로 명명하였다.
- [0403] **플라스미드 pART7.PVY.LNYV.YVP & pART27.PVY.LNYV.YVP**
- [0404] 플라스미드 pART7.PVY.LNYV.YVP (도 64)는 트랜스제닉 식물에서 35S 프로모터에 의해 추진된 PVY 서열의 간접된 팔린드롬을 발현시키기 위해 고안되었다. 이 구조물은 pBC.PVY.LNYV.YVP_Δ로부터의 PVY 서열의 간접된 팔린드롬을 XhoI/XbaI 단편으로서 XhoI/XbaI에 의해 절단된 pART7 내로 클로닝시킴으로써 제조하였다. 35S 프로모터, PVY 서열의 간접된 팔린드롬 및 OCS 터미네이터로 구성된 서열을 pART7.PVY.LNYV.YVP로부터 NotI 단편으로서 절단하여 pART27 내로 클로닝시키고, 소망되는 삽입 방향성을 갖는 플라스미드를 선별하여 pART27.PVY.LNYV.YVP로 명명하였다.
- [0405] **플라스미드 pART7.35S.PVY.SCBV.YVP & pART27.35S.PVY.SCBV.YVP**
- [0406] 플라스미드 pART7.35S.PVY.SCBV.YVP (도 65)는 트랜스제닉 식물에서 센스 구조물과 안티센스 구조물을 공동발현시키기 위한 것이다. 이 플라스미드를 만들기 위해 ClaI pBC.PVY로부터의 PVY 단편을 XhoI/EcoRI 단편으로서, XhoI/EcoRI - 절단된 p35S.SCBV.O.SCBV.YVP 내로 클로닝시켰다. 35S 프로모터 추진 센스 PVY 서열, NOS 터미네이터 및 SCBV 프로모터 추진 안티센스 PVY 및 OCS 터미네이터로 구성된 서열을 NotI 단편으로서 절단하여 pART27 내로 클로닝시키고, 소망되는 삽입 방향성을 갖는 플라스미드를 선별하여 pART27.35S.PVY.SCBV.YVP로 명명하였다.
- [0407] **플라스미드 pART7.35S.PVYx3.SCBV.YVPx3 & pART27.35S.PVYx3.SCBV.YVPx3**
- [0408] 플라스미드 pART7.35S.PVYx3.SCBV.YVPx3 (도 66)는 트랜스제닉 식물에서 PVY의 센스 구조물과 안티센스 구조물을 공동발현시키기 위한 것이다. 이 플라스미드를 만들기 위해 ClaI pBC.PVYx3으로부터의 직접적인 삼중 PVY 반복물을 ClaI/AccI 단편으로서, ClaI-절단된 p35S.SCBV.cass 내로 클로닝시키고 안티센스 방향성을 갖는 플라스미드를 분리함으로써, 중간체인 pART35S.O.SCBV.YVPx3을 제조하였다. p35S.PVYx3.SCBV.YVPx3의 경우, ClaI pBC.PVYx3으로부터의 직접적인 삼중 PVY 반복물을 KpnI/SmaI 단편으로서 KpnI/SmaI-절단 p35S.O.SCBV.YVPx3 내로 클로닝시켜 p35S.PVYx3.SCBV.YVPx3을 만들었다. 프로모터 2개 모두와, 터미네이터 및 직접 PVY 반복물을 포함하는 서열을 NotI 단편으로서 분리하여 pART27 내로 클로닝시켰다. 적절한 방향성을 갖는 플라스미드를 선별하여 pART27.35S.PVYx3.SCBV로 명명하였다.
- [0409] **플라스미드 pART7.PVYx3.LNYV.YVPx3 & pART27.PVYx3.LNYV.YVPx3**
- [0410] 플라스미드 pART7.PVYx3.LNYV.YVPx3 (도 67)은 PVY 서열의 삼중 반복물을 간접된 팔린드롬으로서 발현시키기 위한 것이다. 이 플라스미드를 만들기 위해 pBC.PVY.LNYV.YVP로부터의 PVY.LNYV.YVP 단편을 AccI/ClaI 단편으로서, 플라스미드 pART7.PVYx2 내로 클로닝시킴으로써 중간체인 pART7x3.PVY.LNYV.YV를 구축하였다. pART7.35S.PVYx3.LNYV.YVPx3은, pBC.PVYx2로부터의 부가적인 PVY 직접 반복물을 AccI/ClaI 단편으로서 ClaI 절단된 pART7x3.PVY.LNYV.YVP 내로 클로닝시킴으로써 만들었다. 35S 프로모터, 모든 PVY 서열 및 OCS 터미네이터를 포함하는, pART7.35S.PVYx3.LNYV.YVPx3으로부터의 서열을 NotI 단편으로서 절단하여 NotI-절단된 pART27 내로 클로닝시켜, 적절한 방향성을 갖는 플라스미드를 선별하여 pART27.35S.PVYx3.LNYV로 명명하였다.

- [0411] 플라스미드 pART7.PVY 멀티 & pART27.PVY 멀티
- [0412] 플라스미드 pART7.PVY 멀티 (도 68)은 트랜스제닉 식물에서 PVY 서열 대역의 고차 직접 반복물 (higher order direct repeats)를 발현시키기 위해 고안되었다. PVY로부터 PVY Nia 대역의 72bp의 고차 직접 반복물은 다음과 같이, 2개의 부분적으로 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 어닐링시킴으로써 제조하였다:
- PVY1:
- 5'-TAATGAGGATGATGTCCCTACCTTTAATTGGCAGAAATTTCTGTGGAAAGAC
AGGGAAATCTTTCCGCATTT-3' (SEQ ID NO: 15); 및
- PVY2:
- 5'-TTCTGCCAATTAAGGTAGGGACATCATCCTCATTAAAATGCCGAAAGATT
TCCCTGTCTTTCCACAGAAAT-3' (SEQ ID NO: 16)
- [0413]
- [0414] 올리고뉴클레오타이드를 T4 폴리뉴클레오타이드 키나아제로 포스포릴화시키고, 가열한 다음 서서히 냉각시켜 자가-어닐링시키고, T4 DNA 리가제로 라이게이션시킨 다음, Klenow 폴리머라제로 말단-충전시킨 다음 pCR2.1 (Invitrogen) 내로 클로닝시켰다. 복수개의 반복물을 함유하는 플라스미드를 분리하고 서열을 센스 방향에서 EcoRI 단편으로서 EcoRI-절단된 pART7 내로 클로닝시켜 중간체 pART7.PVY 멀티를 만들었다. pART27.PVY 멀티를 만들기 위해서, 35S 프로모터, PVY 서열 및 OCS 터미네이터를 NotI 단편으로서 절단하고 NotI-절단된 pART27 내로 클로닝시켰다. 적절한 삽입 방향성을 갖는 플라스미드를 분리하여 pART27.PVY 멀티로 명명하였다.
- [0415] **실시예 4**
- [0416] **포유류에 있어서 바이러스 유전자 발현의 불활성화**
- [0417] 안정하게 형질전환된 세포주에서 바이러스 서열을 발현시키으로써 바이러스 면역세포주가 만들어진다.
- [0418] 특히, 세포 용균은 스크리닝하기가 매우 간편하고, 바이러스 면역성을 생산할 수 있는 잠재적으로 희귀한 형질 전환을 직접적으로 선별할 수 있게 해주므로, 이러한 접근법에는 용균 바이러스 (lytic virus)가 이용된다. 단순한 단일 사슬 RNA 바이러스 (소의 엔테로바이러스-BEV) 또는 복합 이중 사슬 DNA 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 I (HSV I)으로부터 유래된 서브-게놈 단편들을 적절한 벡터 내로 클로닝시키고 형질전환된 세포 내에서 발현시켰다. 강력한 시토크로마 바이러스 (CMV-IE) 프로모터에 의해 추진된 바이러스 서열을 발현시키도록 고안된 유전 구조물을 이용하여 포유류 세포주를 형질전환시킨다. 이용된 서열은 특정 바이러스 레플리카제 유전자를 포함한다. 대표적인 바이러스 유전자 서열을 포함하는 무작위적인 "샷건" 라이브러리도 이용가능하며 바이러스 서열의 발현을 표적화하기 위해, 분산된 핵산 분자를 도입하였다.
- [0419] BEV RNA-의존성 RNA 폴리머라제 유전자로부터 유래된 뉴클레오타이드 서열들을 함유하는, 이 공정에 이용되기 위한 예시적인 유전 구조물이 본 명세서에 설명된다.
- [0420] 바이러스 폴리머라제 구조물의 경우, 다수 (약 100개)의 형질전환된 세포주를 만들어서 각각의 바이러스로 감염시킨다. 샷건 라이브러리를 이용하여 형질전환된 세포의 경우, 매우 많은 수 (수백개)의 형질전환된 세포주를 생산하여 바이러스 면역성에 대해 벌크 스크리닝한다. 바이러스 챌린지에 이어, 내성 세포주를 선별하고 면역성을 부여하는 서열을 결정하기 위해 추가로 분석한다.
- [0421] 내성 세포주들은 포유류에서 바이러스 유전자 발현을 불활성화시키기 위해 도입된 뉴클레오타이드 서열의 능력을 뒷받침해준다.
- [0422] 이에 더해, 관찰된 변형의 생화학적 특성 및 분자 특성을 보다 정확히 결정하는데 있어서, 이러한 실험으로부터 얻어진 내성 세포주들을 이용한다.
- [0423] **실시예 5**
- [0424] **트랜스제닉 식물에 있어서 바이러스 내성의 유도**
- [0425] 3-부모 교배 (tri-parental matings)를 이용하여, 아그로박테리움 튜메파시엔스, 스트레인 LBA4404를 다음의 구조물들로 독립적으로 형질전환시켰다:

pART27.PVY, pART27.PVYx2, pART27.PVYx3, pART27.PVYx4,
pART27.PVY.LNYV.PVY, pART27.PVY.LNYV.YVP Δ , pART27.PVY.LNYV.YVP,
pART27.35S.PVY.SCBV.O, pART27.35S.O.SCBV.PVY, pART27.35S.O.SCBV.YVP,
pART27.35S.PVY.SCBV.YVP, pART27.35S.PVYx3.SCBV.YVPx3,
pART27.PVYx3.LNYV.YVPx3 및 pART27.PVYx10,

[0426]

[0427]

이들 스트레인들로부터 DNA 미니-프래그를 제조하고 NotI으로 절단하여 이들이 적절한 바이너리 벡터를 함유하고 있는지를 확인하였다.

[0428]

표준 공정에 따라 이들 Agrobacterium 균주를 이용하여 Nicotiana Tabaccum (cultivar W38)을 형질전환시켰다. 형질전환된 것으로 추정되는 싹들을 절단하고 카나마이신을 함유하는 배지에 접종하였다. 이 조건 하에서 본 발명자들은 오직 트랜스제닉 싹들만이 카나마이신 플레이트상에 뿌리내린다는 것을 일관되게 관찰하였다. 접종된 싹들을 토양에 이식하여 키웠다. 2 내지 3주일 후, 적어도 3세트의 잎을 갖는 생장이 왕성한 식물을 선별하여 PVY로 감염시켰다.

[0429]

바이러스로 미리 감염시킨 W38 담배로부터 바이러스 접종물을 제조하고, 명백한 바이러스 증상을 나타내는 잎 물질 약 2 g을 100mM Na 포스페이트 완충액 (pH 7.5) 10ml 중 카르바룬덤 (carbarundum)으로 분쇄하였다. 접종물을 Na 포스페이트 완충액 200ml로 추가 희석하였다. 각각의 트랜스제닉 식물로부터 잎사귀 2장에 카르바룬덤을 뿌리고, 접종물 0.4ml를 각각의 잎사귀에 도포한 다음 손가락으로 잎사귀를 세게 문질렀다. 이 방법에 의해, 비-트랜스제닉 대조군 식물의 100%가 PVY로 감염되었다.

[0430]

바이러스 내성 및 면역성을 분석하기 위해, 증상 발달에 대해 트랜스제닉 식물을 모니터링한다. PVY 스트레인 (PVY-D, 호주 PVY 분리물)은 W38 담배에 명백한 증상을 부여하며, 접종된 잎들 중 2개의 잎에서 줄기가 투명해지는 증상이 관찰되었고, 이어서 잎들은 균일하게 백화병변 (chlorotic lesions)을 나타내었다. 증상 발병을 6 주일에 걸쳐 모니터링하였다.

[0431]

트랜스제닉 세포주들은, 잎사귀의 백화병 병변의 감소가 명백한, 감소된 바이러스 증상을 나타내는 경우, 내성이 있는 것으로 설명된다. 단지 몇개에 불과한 바이러스 병변이 관찰된 매우 강한 내성으로부터, 식물 성장의 말기까지 식물의 잎사귀에 감소된 증상을 발현시키는 것에 이르기까지 내성 범위는 다양하다.

[0432]

바이러스 증상이 전혀 입증되지 않은 트랜스제닉 식물들은 면역성 있는 것으로 분류하였다. 이들 식물에 면역성이 있음을 확실히 하기 위하여, 이들에게 바이러스를 재 접종하자, 대부분의 식물은 면역성이 유지되었고, 증상을 나타낸 소수의 식물은 내성있는 것으로 재분류하였다.

[0433]

생산된 식물에 대해 서던 블롯을 수행하고, 후속적인 생산에 있어서 내성을 모니터링하여 내성/면역성이 전달 가능한 것인지 결정한다. 또한, 기타의 PVY 균주로 챌린지시킴으로써 바이러스 내성의 폭을 모니터링하여, 숙주 범위 민감성이 변형되는지를 결정한다.

[0434]

이 실험들의 결과를 다음 표 2에 나타내었다. 이 데이터들은 표적 유전자 서열의 직접 반복물 (팔린드롬 배열이긴, 직접 반복 서열로서의 간접된 팔린드롬이긴)이 트랜스제닉 식물에 있어서 바이러스 내성 및/또는 면역성을 부여할 수 있음을 가리킨다.

[0435]

따라서, 이러한 역전된 및/또는 직접 반복된 서열은 트랜스제닉 식물에 있어서 바이러스 표적 유전자의 발현을 조절한다.

[0436]

직접 및 역전된 반복 서열, 즉, pART27.35S.PVYx3.SCBV.YVPx3 및 pART27.PVYx3.LNYV.YVPx3의 용도를 결합한 구조물 역시 유전자 발현을 조절하는데 유용하다.

[0437]

실시예 6

[0438]

동물 세포에 있어서 Galt의 불활성화

[0439]

Galt 불활성화를 평가하기 위해, 포르신 PK2 세포를 적절한 구조물로 형질전환시켰다. PK2 세포들은 Galt 효소를 연속적으로 발현시킨다. (그의 활성으로 인해 이들 세포의 표면에 발현된 일군의 단백질에게 다양한 α -1,3-갈락토실기가 부가됨). 세포를 리포펙틴을 이용하여 형질전환시키고 안정하게 형질전환된 세포들을 제네테신(genetecin)을 이용하여 선별하였다.

[0440]

렉틴 IB4를 이용하여, 초기 분석으로서 Galt-코딩 에피토프, 즉, 모든 세포 표면 단백질을 수식하는 α -1,3-갈락토실 부분의 존재여부에 대해 세포주를 조사하였다. in situ 또는 FACS 소팅을 이용하여 IB4 결합을 분석하였

다.

[0441] in situ 결합의 경우, 세포를 차가운 메탄올과 함께 고체 지지체에 5분간 고정시키고, 세포를 PBS (포스페이트 완충염수)로 행군다음, 비-특이적인 IB4 결합을 PBS 중에서 1% BSA를 이용하여 10분간 블로킹시켰다. 실온에서 30분간, 고정된 세포를 1% BSA, PBS 중에서 20ug/ml IB4-바이오틴 (Sigma)를 이용하여 프로브시키고, 세포를 PBS로 세정한 다음 PBS 중 ExtraAvidin-FITC (Sigma)의 1:200 희석액으로 30분간 프로브시키고 이어서 PBS로 다시 세척하였다. 이어서 형광 현미경으로 세포를 검사하자, 이 조건하에서, PK2 대조군 세포의 외부표면이 균일하게 녹색으로 염색된 것으로 나타났다.

[0442] FACS 분석의 경우, 세포들을 트립신으로 처리한 후, HBSS/Hepes (20mM Hepes를 함유하는 Hank's 완충 염수용액, pH 7.4)에 현탁, 세척하고 4℃에서 45분간 HBSS/Hepes 중 10ug/ml IB4-바이오틴 (Sigma)로 프로브시켰다. 세포들을 HBSS/Hepes로 세척하고, HBSS/Hepes 중 ExtrAvidin-FIT (Sigma)의 1:200 희석물로 4℃에서 45분간 프로브시킨 다음 FACS 소팅시기에 앞서 차가운 HBSS/Hepes로 세척하였다.

[0443] 이 접근방법을 이용하여 형질전환된 세포주를 Galt 불활성화에 대해 분석하고 구조 유효성의 정량적인 평가를 결정하였다. 또한 Galt 불활성화를 나타내는 세포주들을 분리하여 추가로 분자 분석을 행하여 유전자 불활성화의 메커니즘을 결정하였다.

[0444] [표 2]

플라스미드 구조물	테스트된 식물수	특정 표현형을 나타낸 식물의 백분율		
		민감	면역	내성
PART27.PVY	19	16	1	2
PART27.PVYx2	13	5	4	4
PART27.PVYx3	21	2	5	14
PART27.PVYx4	21	5	7	9
PART27.35S.PVY.SCBC.0	25	8	0	17
PART27.35S.O.SCBV.PVY	22	8	0	14
PART27.35S.O.SCBV.VVP	18	14	0	4
PART27.35S.PVY.SCBV.VVP	17	3	8	6
PART27.PVY.LNVV.PVY	26	18	2	6
PART27.PVY.LNVV.VVP	20	6	10	4
PART27.PVY.LNVV.VVP _A	18	7	11	0

[0445]

참조문헌

1. An *et al.* (1985) *EMBO J* 4:277-284.
2. Armstrong, *et al.* *Plant Cell Reports* 9: 335-339, 1990.
3. Ausubel, F.M. *et al.* (1987) *In: Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience (ISBN 047140338)..
4. Chalfie, M. *et al.* (1994) *Science* 263: 802-805.
5. Christensen, A.H. and Quail, P.H. (1996) *Transgenic Research* 5: 213-218.
6. Christou, P., *et al.* *Plant Physiol* 87: 671-674, 1988.
7. Cormack, B. *et al.* (1996) *Gene* 173: 33-38.
8. Crossway *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 202:179-185, 1986.
9. Dorer, D.R., and Henikoff, S. (1994) *Cell* 7: 993-1002.
10. Fromm *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:5824-5828, 1985.
11. Gleave, A.P. (1992) *Plant Molecular Biology* 20:1203-1207.
12. Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166: 557-560.
13. Herrera-Estrella *et al.*, *Nature* 303: 209-213, 1983a.
14. Herrera-Estrella *et al.*, *EMBO J.* 2: 987-995, 1983b.
15. Herrera-Estrella *et al.* *In: Plant Genetic Engineering*, Cambridge University Press, N.Y., pp 63-93, 1985.
16. Inouye, S. and Tsuji, F.I. (1994) *FEBS Letts.* 341: 277-280.
17. Jackson, I.J. (1995) *Ann. Rev. Genet.* 28: 189-217.
18. Krens, F.A., *et al.*, *Nature* 296: 72-74, 1982.
19. Kwon, B.S. *et al.* (1988) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 153:1301- 1309.
20. Pal-Bhadra, M. *et al.* (1997) *Cell* 90: 479-490.
21. Paszkowski *et al.*, *EMBO J.* 3:2717-2722, 1984
22. Prasher, D.C. *et al.* (1992) *Gene* 111: 229-233.
23. Sanford, J.C., *et al.*, *Particulate Science and Technology* 5: 27-37, 1987.

[0446]

발명의 효과

[0447]

본 발명의 역전된 및/또는 직접 반복된 반복물은 트랜스제닉 개체의 세포, 조직 및 기관에서 바이러스 표적 유전자의 발현을 조절한다.

도면의 간단한 설명

[0001]

도 1은 플라스미드 pEGFP-N1MCS의 다이어그램.

[0002]

도 2는 플라스미드 pCMV.cass의 다이어그램.

[0003]

도 3은 플라스미드 pCMV.SV40L.cass의 다이어그램.

[0004]

도 4는 플라스미드 pCMV.SV40LR.cass의 다이어그램.

[0005]

도 5는 플라스미드 pCR.Bgl-GFP-Bam의 다이어그램.

[0006]

도 6은 플라스미드 pBSII(SK+).EGFP의 다이어그램.

[0007]

도 7은 플라스미드 pCMV.EGFP의 다이어그램.

[0008]

도 8은 플라스미드 pCR.SV40L의 다이어그램.

[0009]

도 9는 플라스미드 pCR.BEV.1의 다이어그램.

[0010]

도 10은 플라스미드 pCR.BEV.2의 다이어그램.

[0011]

도 11은 플라스미드 pCR.BEV.3의 다이어그램.

[0012]

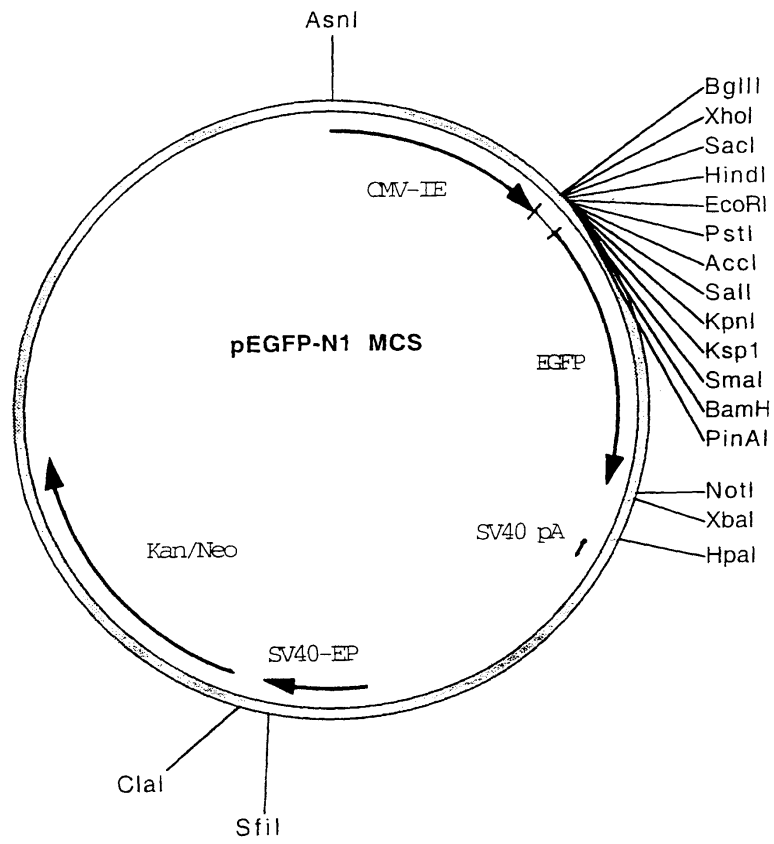
도 12는 플라스미드 pCMV.EGFP.BEV.2의 다이어그램.

- [0013] 도 13은 플라스미드 pCMV.BEV.2의 다이어그램.
- [0014] 도 14는 플라스미드 pCMV.BEV.3의 다이어그램.
- [0015] 도 15는 플라스미드 pCMV.VEB의 다이어그램.
- [0016] 도 16은 플라스미드 pCMV.BEV.GFP의 다이어그램.
- [0017] 도 17은 플라스미드 pCMV.BEV.SV40L-0의 다이어그램.
- [0018] 도 18은 플라스미드 pCMV.0.SV40L.BEV의 다이어그램.
- [0019] 도 19는 플라스미드 pCMV.0.SV40L.VEB의 다이어그램.
- [0020] 도 20은 플라스미드 pCMV.BEVx2의 다이어그램.
- [0021] 도 21은 플라스미드 pCMV.BEVx3의 다이어그램.
- [0022] 도 22는 플라스미드 pCMV.BEVx4의 다이어그램.
- [0023] 도 23은 플라스미드 pCMV.BEV.SV40L.BEV의 다이어그램.
- [0024] 도 24는 플라스미드 pCMV.BEV.SV40L.VEB의 다이어그램.
- [0025] 도 25는 플라스미드 pCMV.BEV.GFP.VEB의 다이어그램.
- [0026] 도 26은 플라스미드 pCMV.EGFP.BEV2.PFG의 다이어그램.
- [0027] 도 27은 플라스미드 pCMV.BEV.SV40LR의 다이어그램.
- [0028] 도 28은 플라스미드 pCDNA3.Galt의 다이어그램.
- [0029] 도 29는 플라스미드 pCMV.Galt의 다이어그램.
- [0030] 도 30은 플라스미드 pCMV.EGFP.Galt의 다이어그램.
- [0031] 도 31은 플라스미드 pCMV.Galt.GFP의 다이어그램.
- [0032] 도 32는 플라스미드 pCMV.Galt.SV40L.0의 다이어그램.
- [0033] 도 33은 플라스미드 pCMV.Galt.SV40L.tlaG의 다이어그램.
- [0034] 도 34는 플라스미드 pCMV.0.SV40L.Galt의 다이어그램.
- [0035] 도 35는 플라스미드 pCMV.Galtx2의 다이어그램.
- [0036] 도 36은 플라스미드 pCMV.Galtx4의 다이어그램.
- [0037] 도 37은 플라스미드 pCMV.Galt.SV40L.Galt의 다이어그램.
- [0038] 도 38은 플라스미드 pCMV.Galt.SV40L.tlaG의 다이어그램.
- [0039] 도 39는 플라스미드 pCMV.Galt.GFP.tlaG의 다이어그램.
- [0040] 도 40은 플라스미드 pCMV.EGFP.Galt.PFG의 다이어그램.
- [0041] 도 41은 플라스미드 pCMV.Galt.SV40LR의 다이어그램.
- [0042] 도 42는 플라스미드 pART7의 다이어그램.
- [0043] 도 43은 플라스미드 pART7.35S.SCBV.cass의 다이어그램.
- [0044] 도 44는 플라스미드 pBC.PVY의 다이어그램.
- [0045] 도 45는 플라스미드 pSP72.PVY의 다이어그램.
- [0046] 도 46은 플라스미드 pClapBC.PVY의 다이어그램.
- [0047] 도 47은 플라스미드 pBC.PVYx2의 다이어그램.
- [0048] 도 48은 플라스미드 pSP72.PVYx2의 다이어그램.

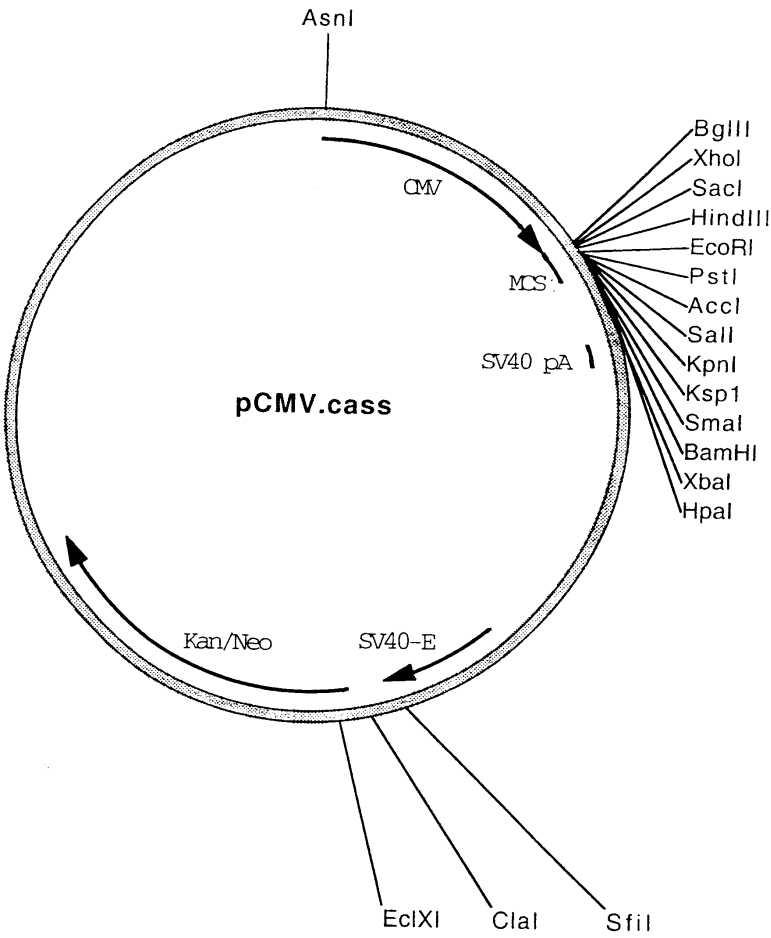
- [0049] 도 49는 플라스미드 pBC.PVYx3의 다이어그램.
- [0050] 도 50은 플라스미드 pBC.PVYx4 다이어그램.
- [0051] 도 51은 플라스미드 pBC.PVYLNyV의 다이어그램.
- [0052] 도 52는 플라스미드 pBC.PVY.LNyV.PVY의 다이어그램.
- [0053] 도 53은 플라스미드 pBC.PVY.LNyV.YVP△의 다이어그램.
- [0054] 도 54는 플라스미드 pBC.PVY.LNyV.YVP의 다이어그램.
- [0055] 도 55는 플라스미드 pART27.PVY의 다이어그램.
- [0056] 도 56은 플라스미드 pART27.35S.PVY.SCBV.0의 다이어그램.
- [0057] 도 57은 플라스미드 pART27.35S.0.SCBV.PVY의 다이어그램.
- [0058] 도 58은 플라스미드 pART27.35S.0.SCBV.YVP의 다이어그램.
- [0059] 도 59는 플라스미드 pART7.PVYx2의 다이어그램.
- [0060] 도 60은 플라스미드 pART7.PVYx3의 다이어그램.
- [0061] 도 61은 플라스미드 pART7.PVYx4의 다이어그램.
- [0062] 도 62는 플라스미드 pART7.PVY.LNyV.PVY의 다이어그램.
- [0063] 도 63은 플라스미드 pART7.PVY.LNyV.YVP△의 다이어그램.
- [0064] 도 64는 플라스미드 pART7.PVY.LNyV.YVP의 다이어그램.
- [0065] 도 65는 플라스미드 pART7.35S.PVY.SCBV.YVP의 다이어그램.
- [0066] 도 66은 플라스미드 pART7.35S.PVYx3.SCBV.YVPx3의 다이어그램.
- [0067] 도 67은 플라스미드 pART7.PVYx3.LNyV.YVPx3의 다이어그램.
- [0068] 도 68은 플라스미드 pART7.PVYMULTI의 다이어그램.

도면

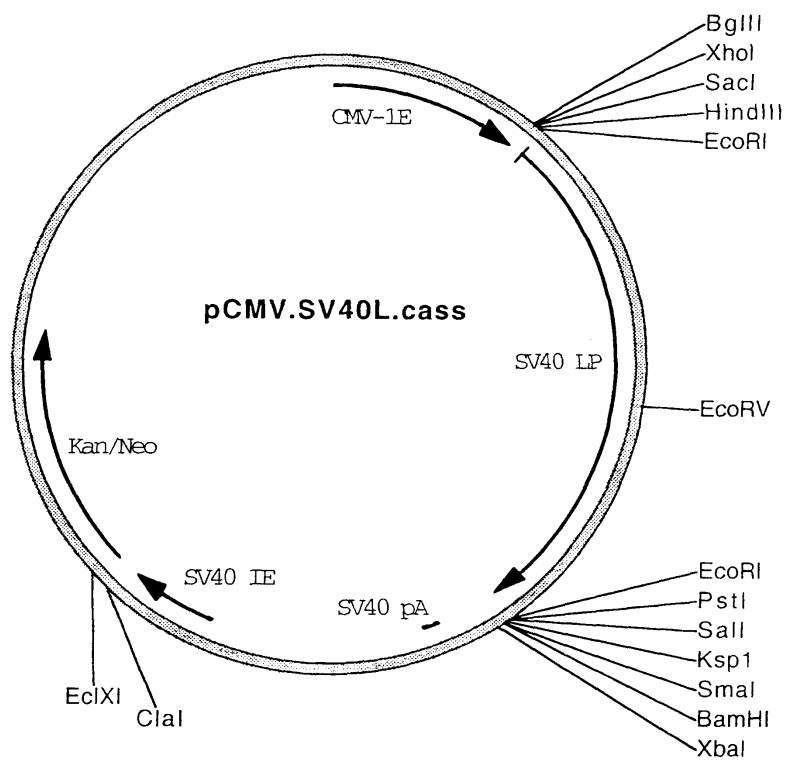
도면1



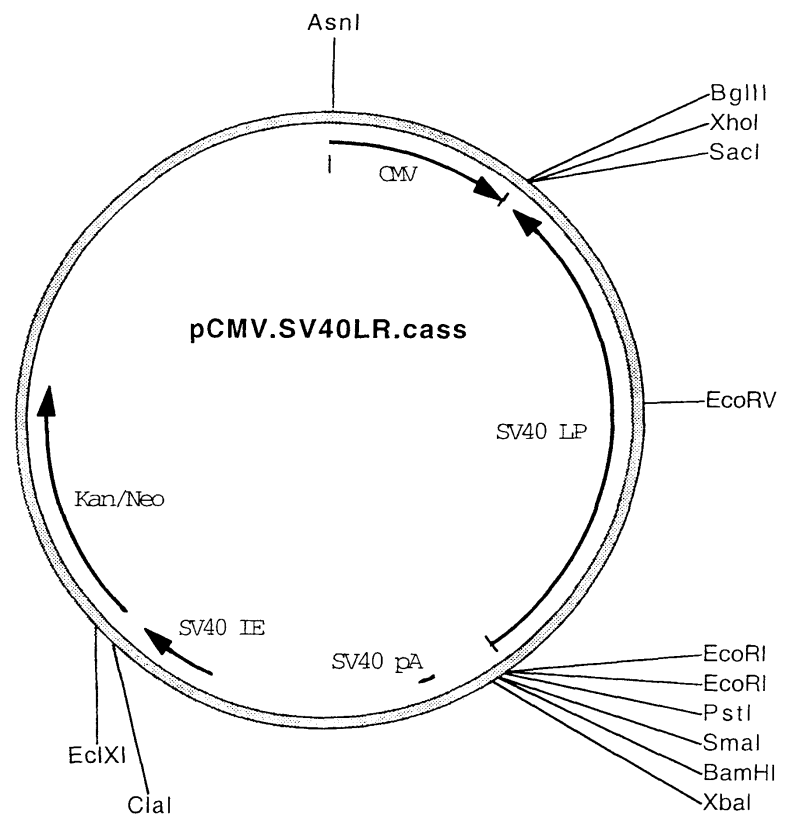
도면2



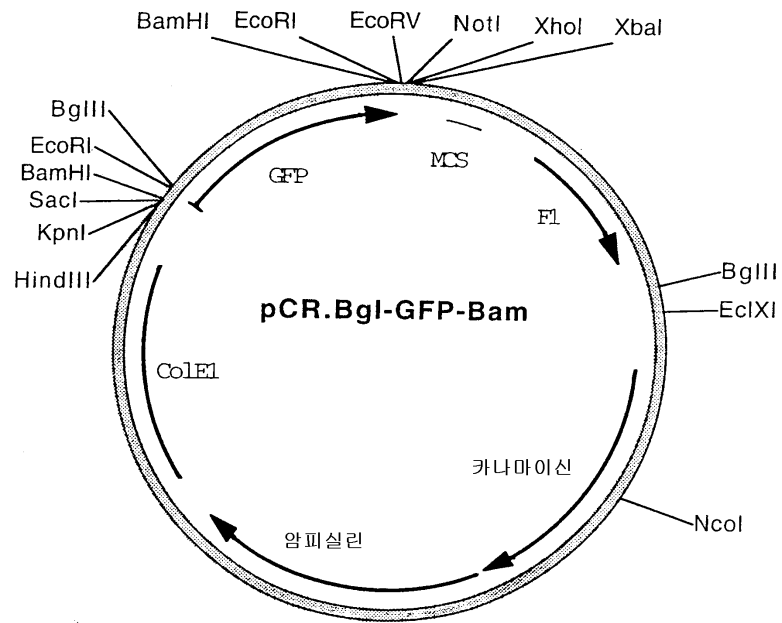
도면3



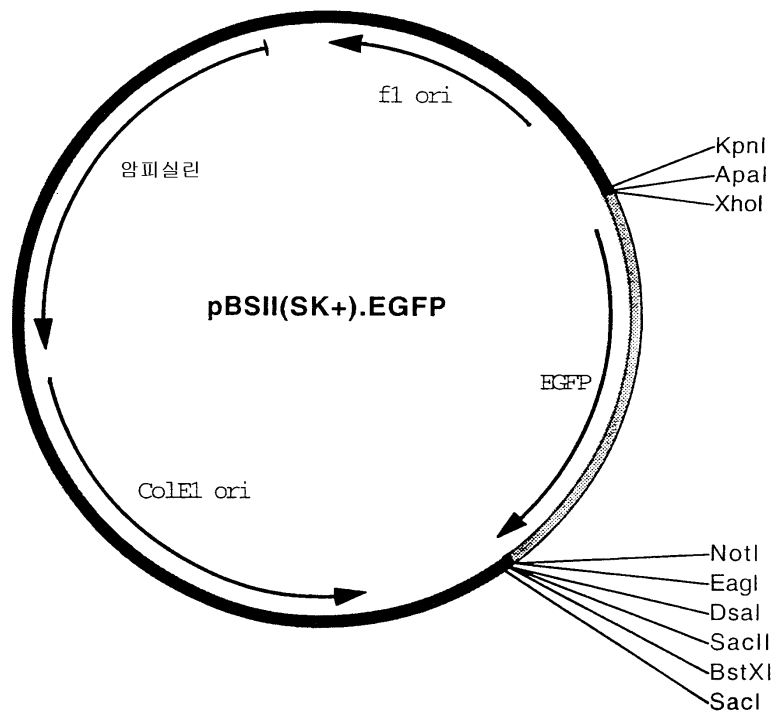
도면4



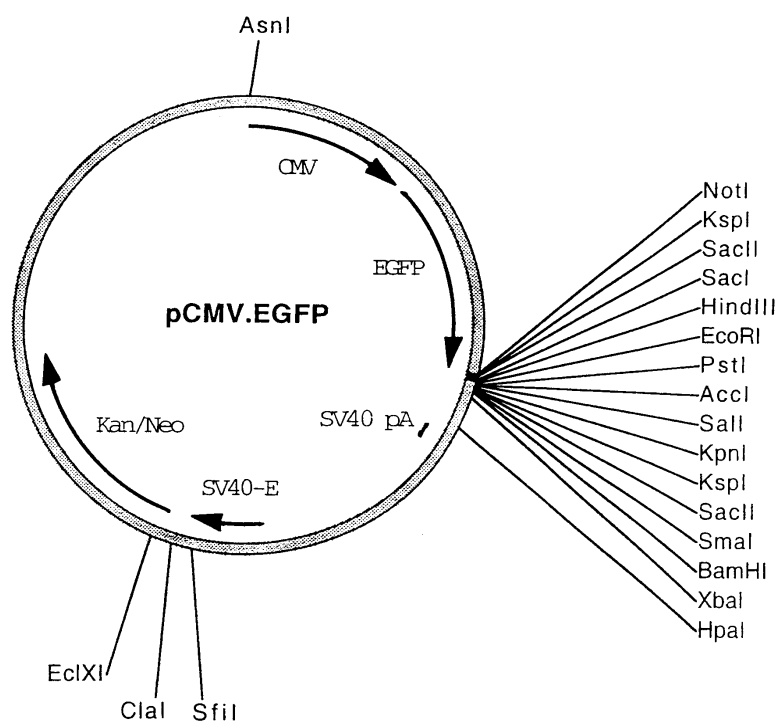
도면5



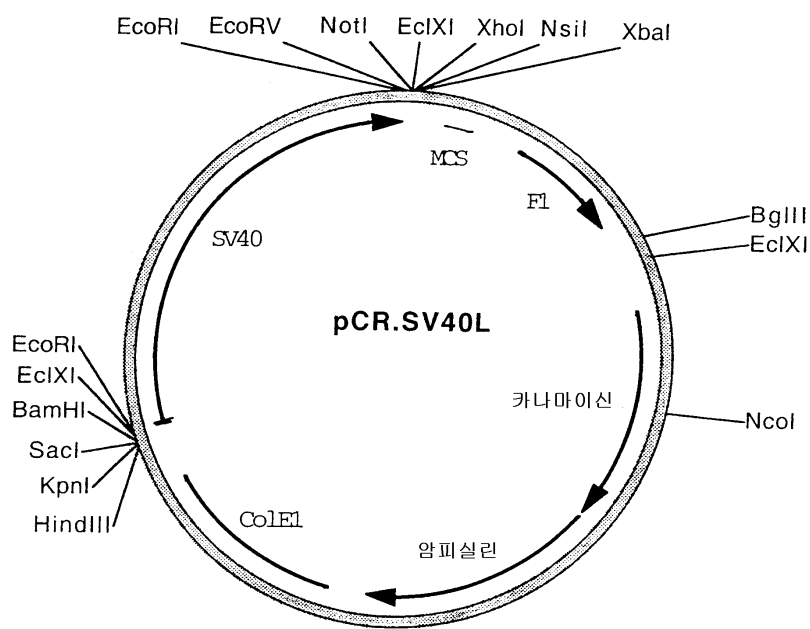
도면6



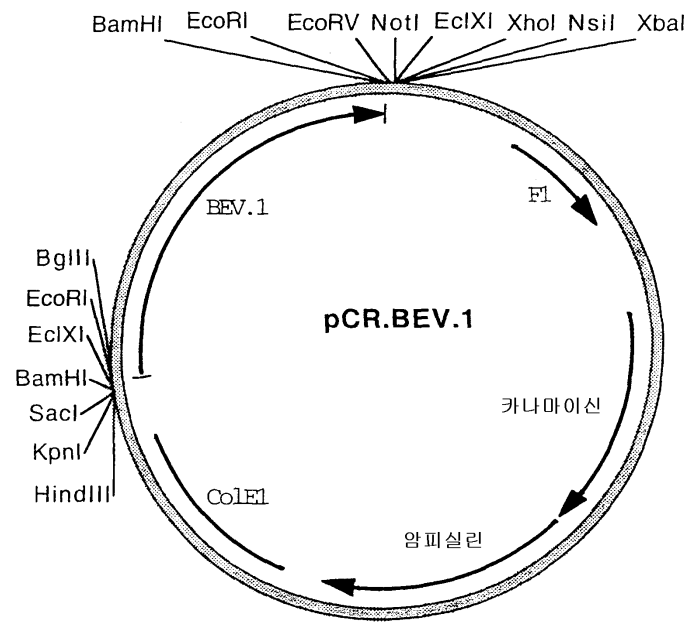
도면7



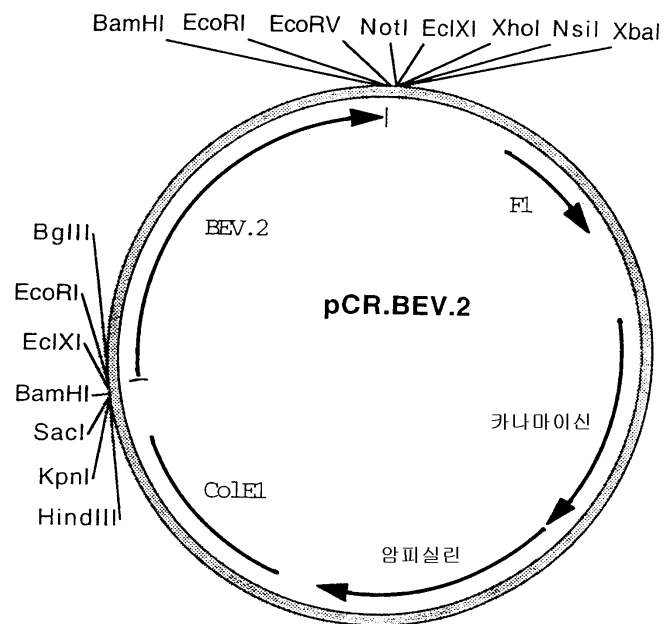
도면8



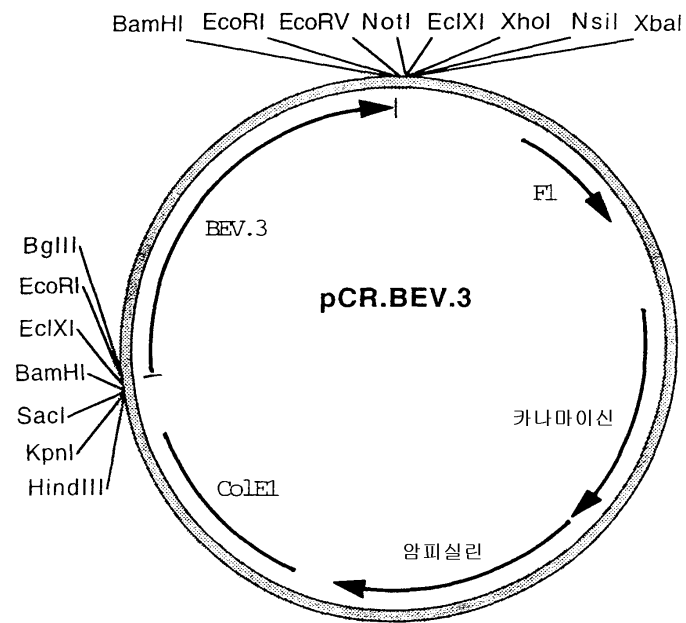
도면9



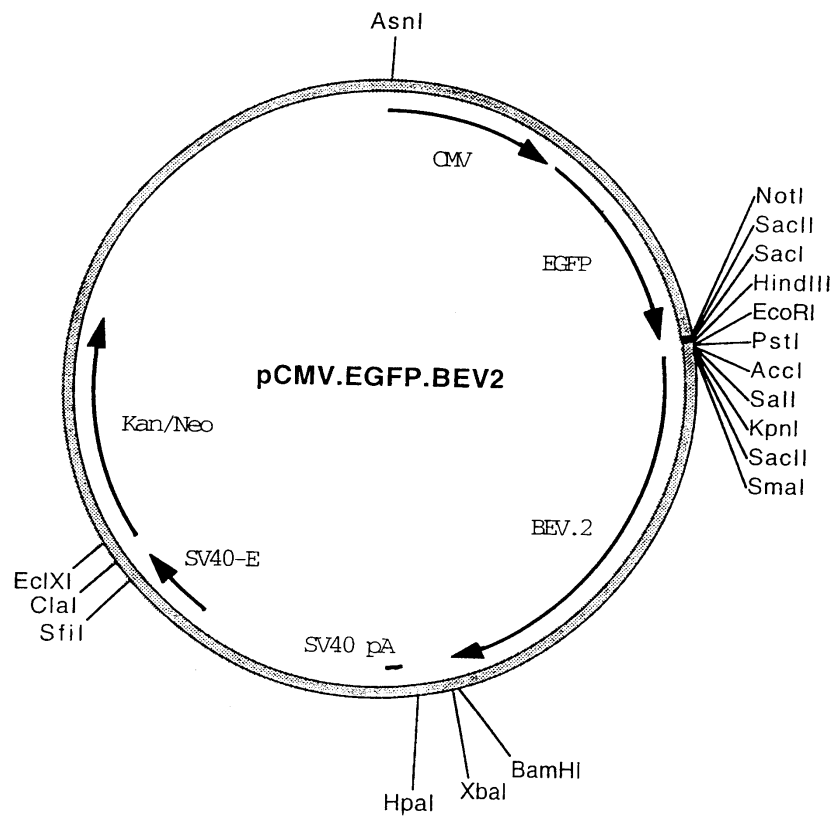
도면10



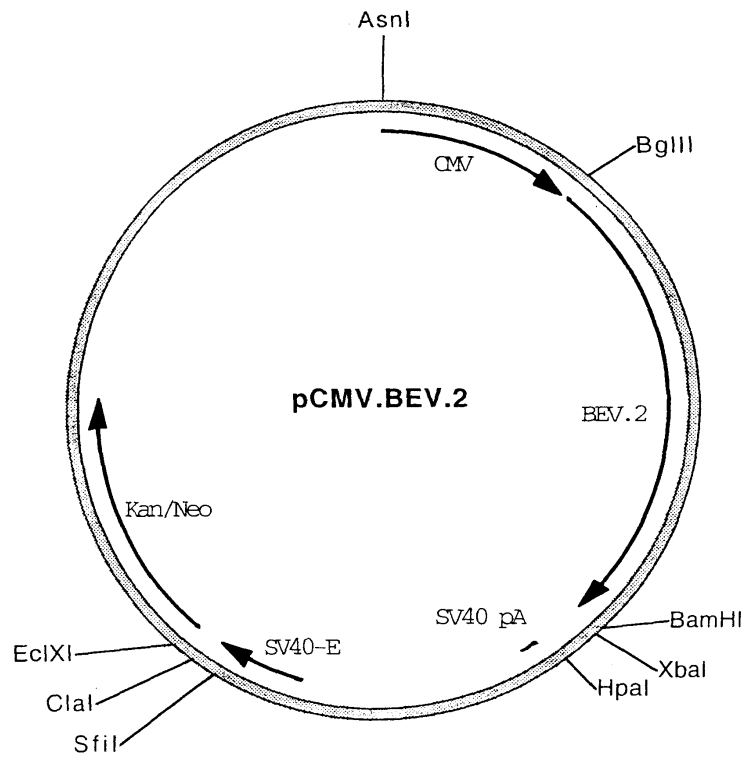
도면11



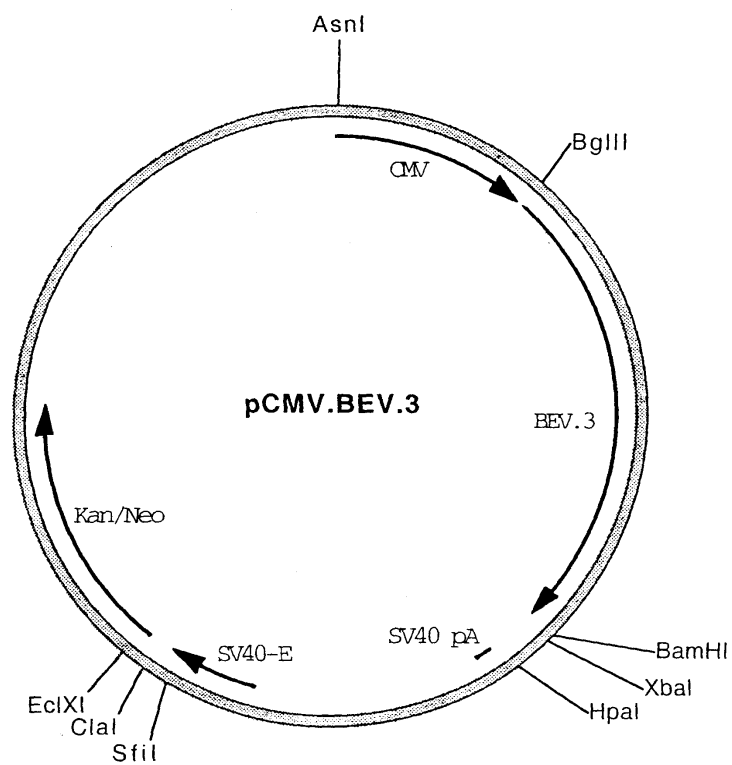
도면12



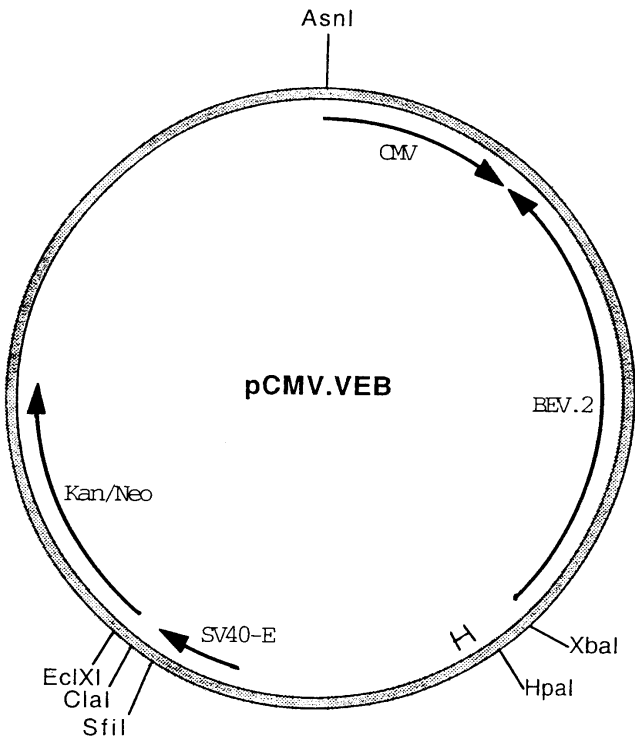
도면13



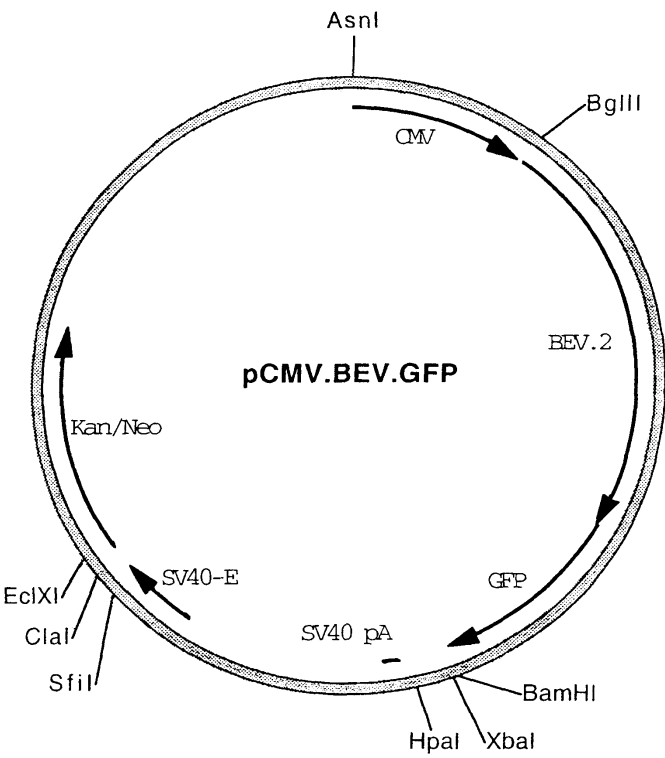
도면14



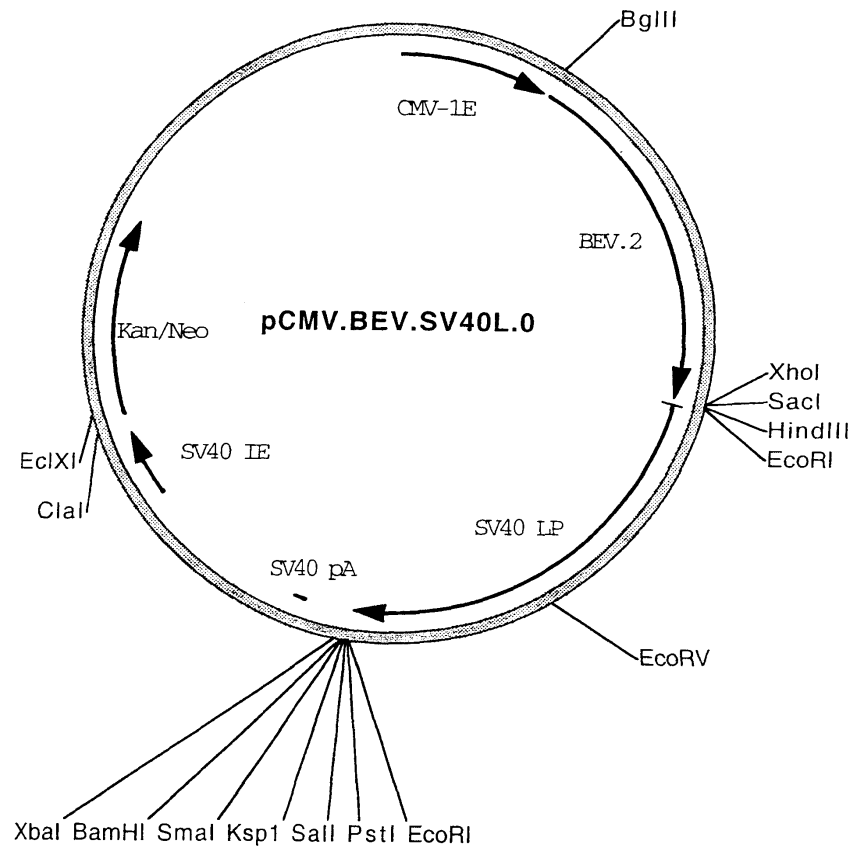
도면15



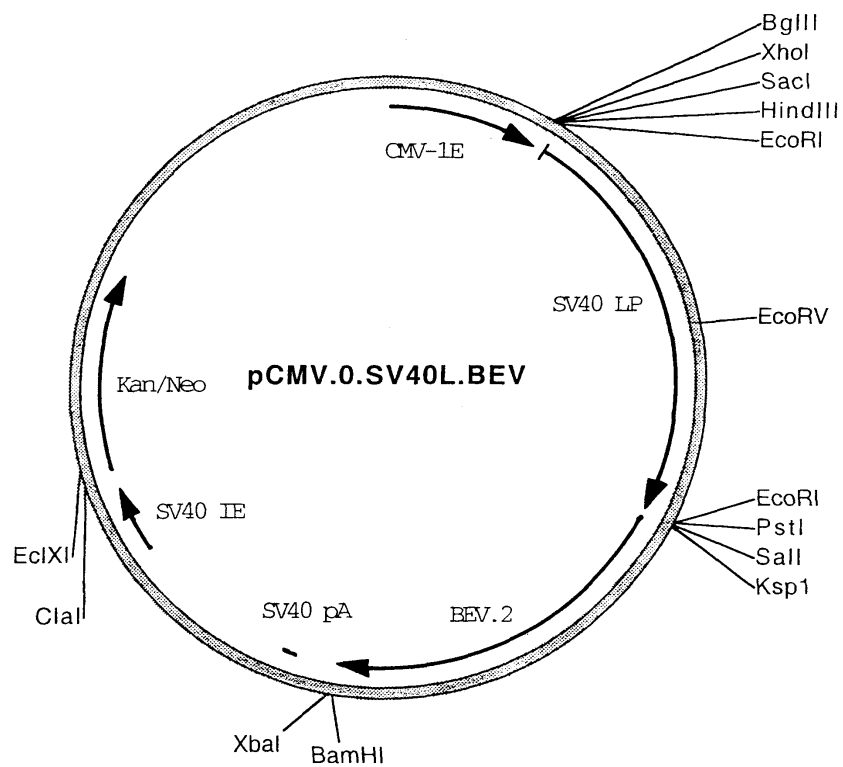
도면16



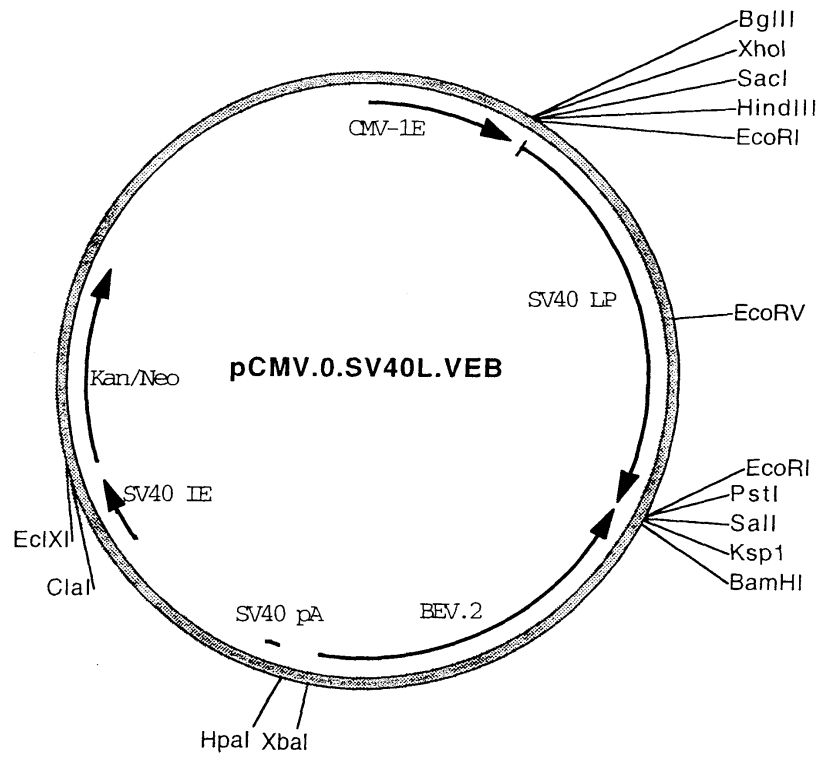
도면17



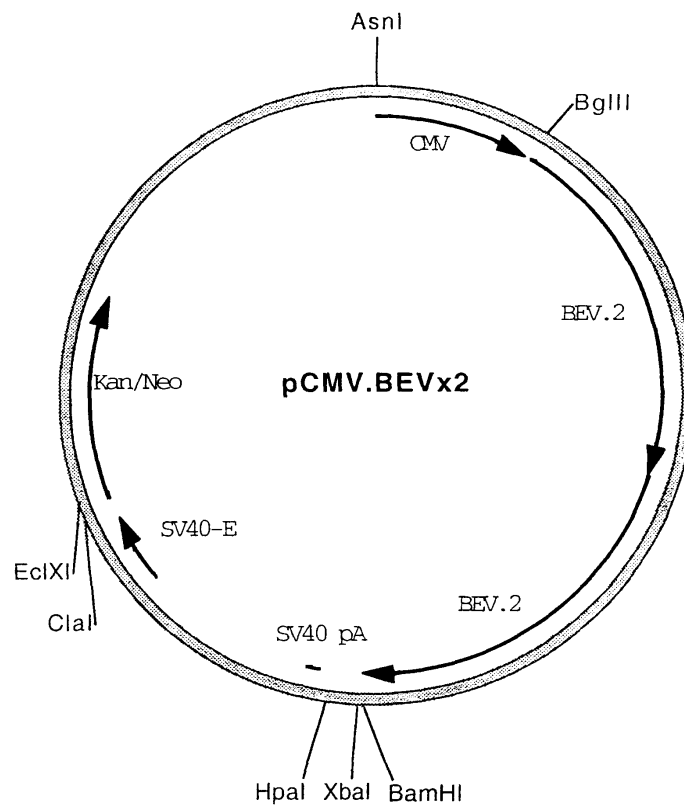
도면18



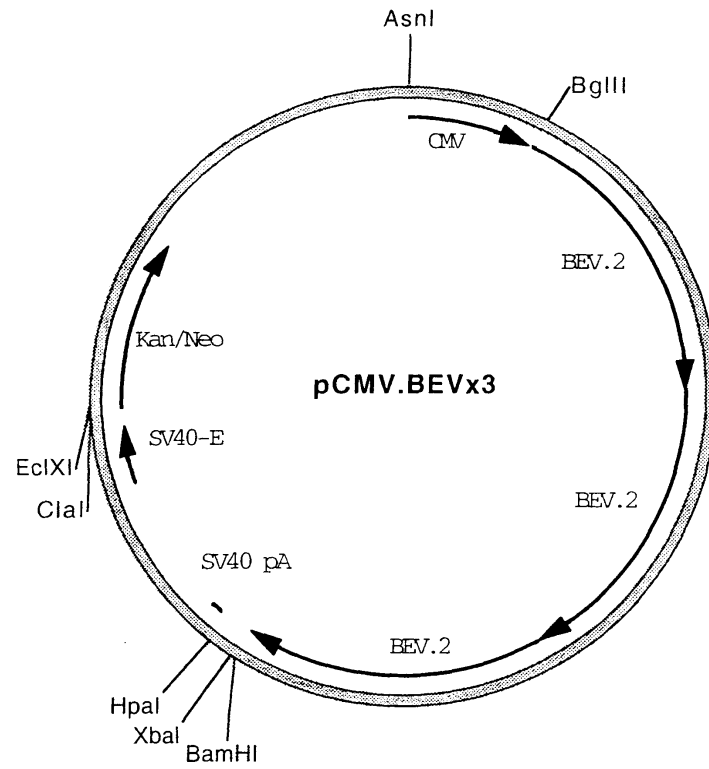
도면19



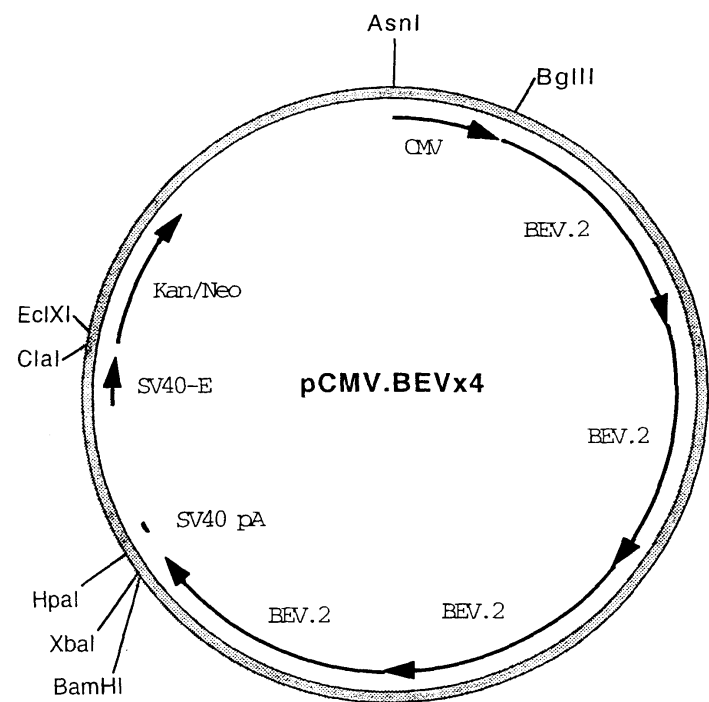
도면20



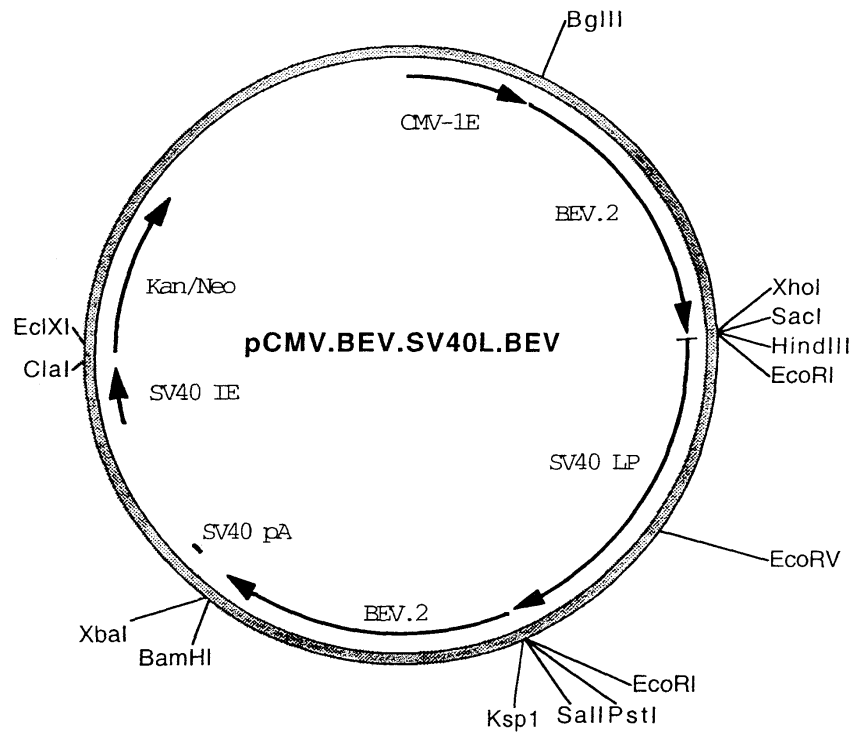
도면21



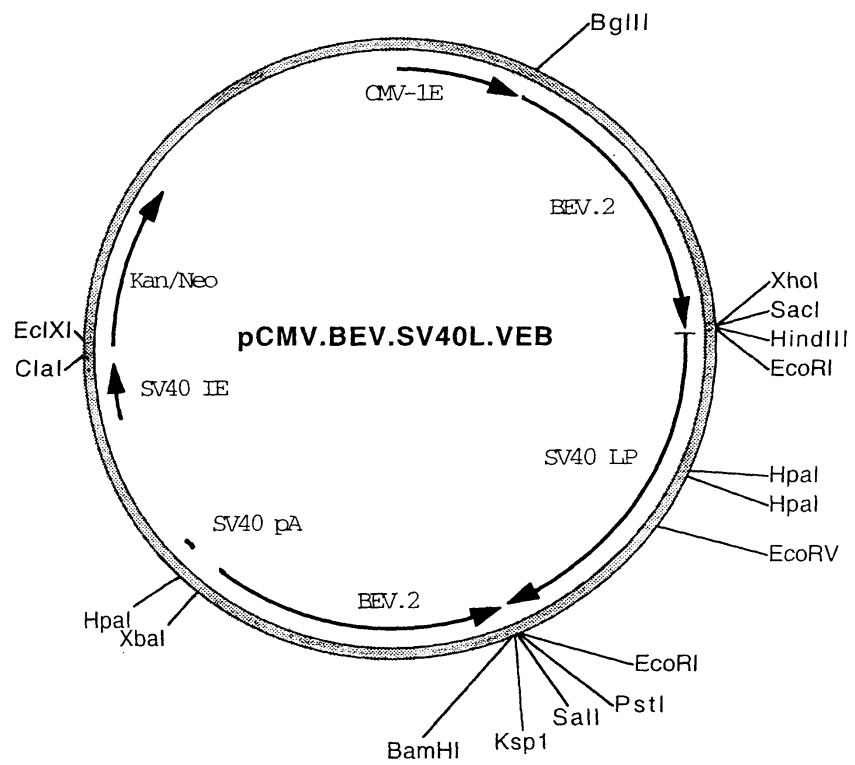
도면22



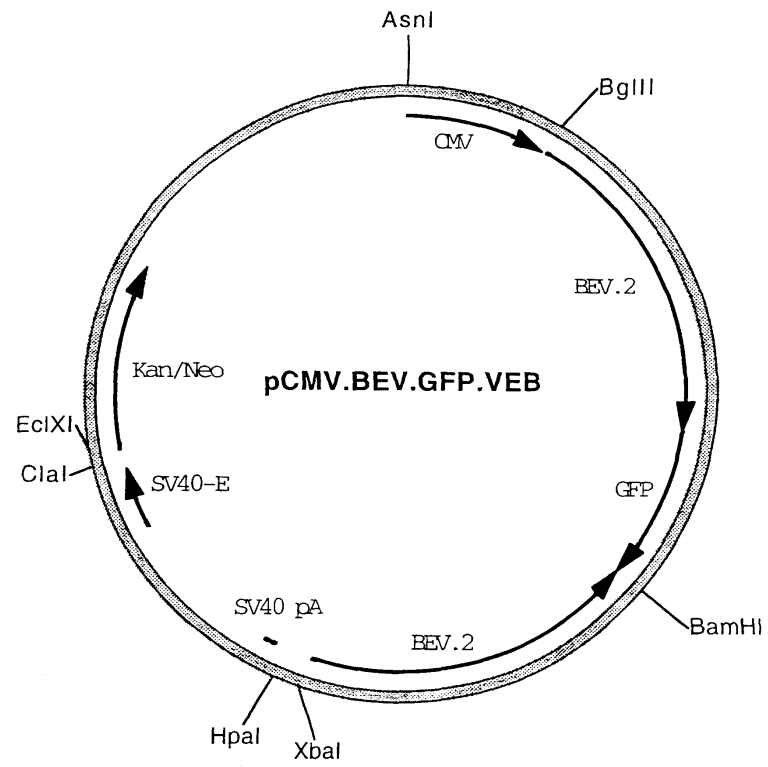
도면23



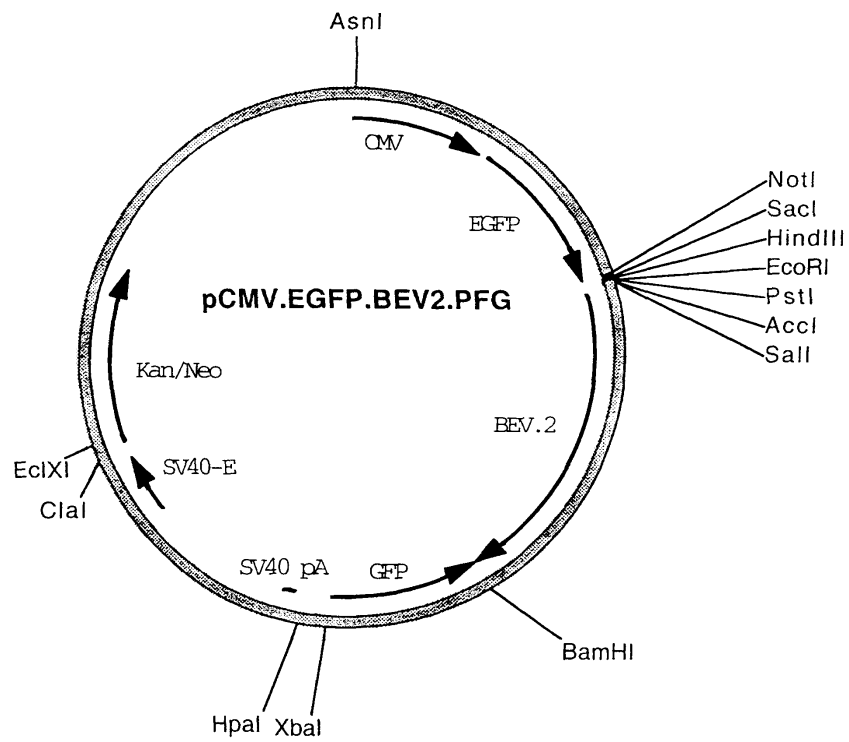
도면24



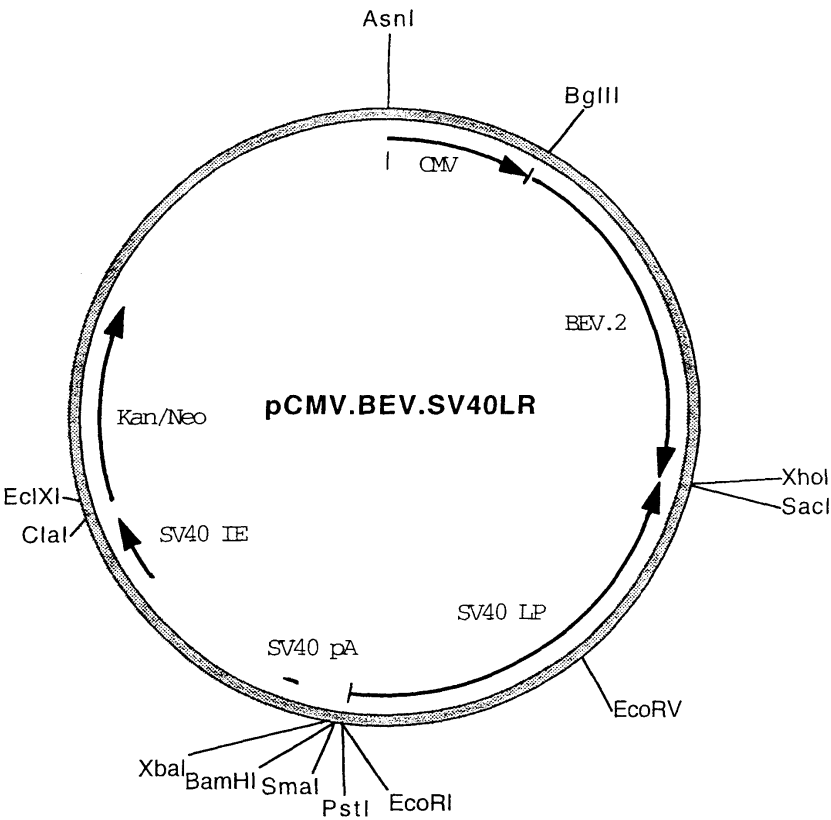
도면25



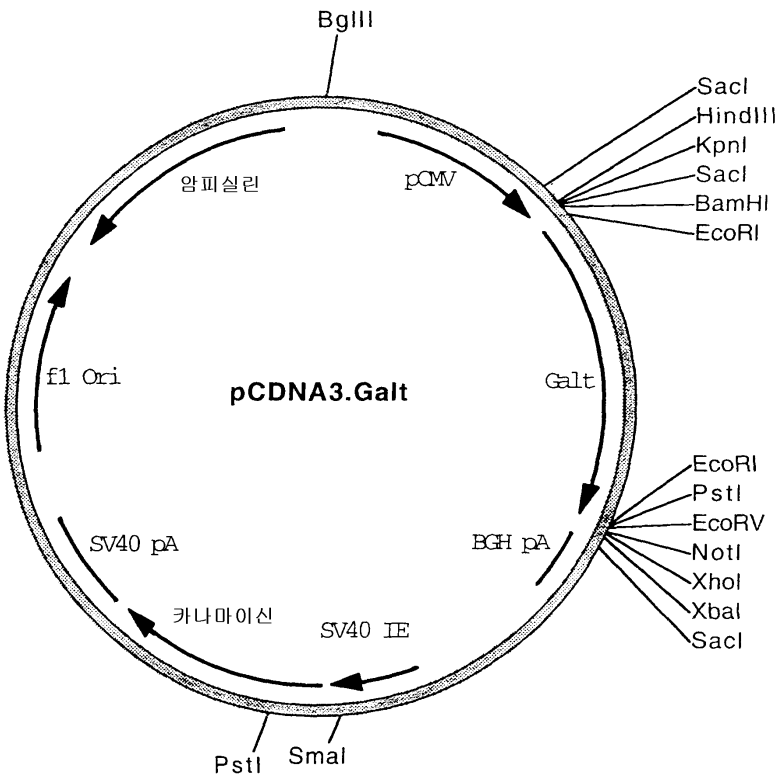
도면26



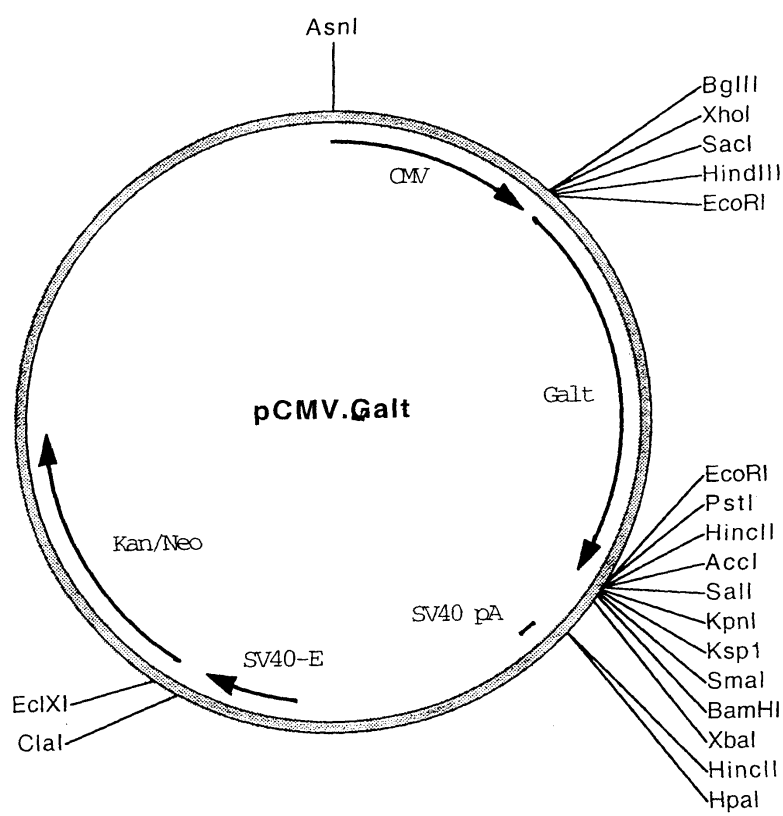
도면27



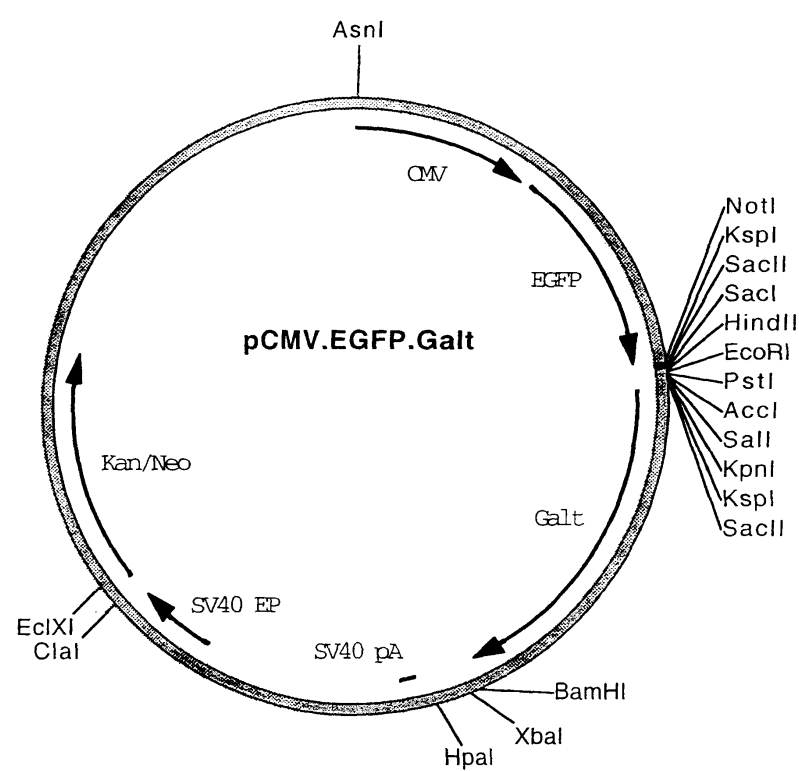
도면28



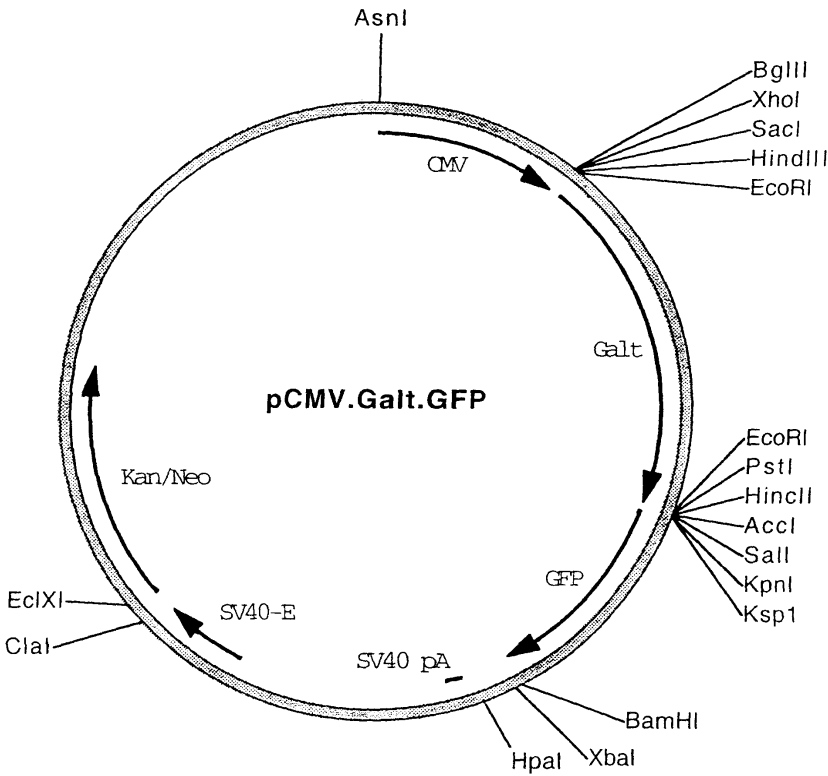
도면29



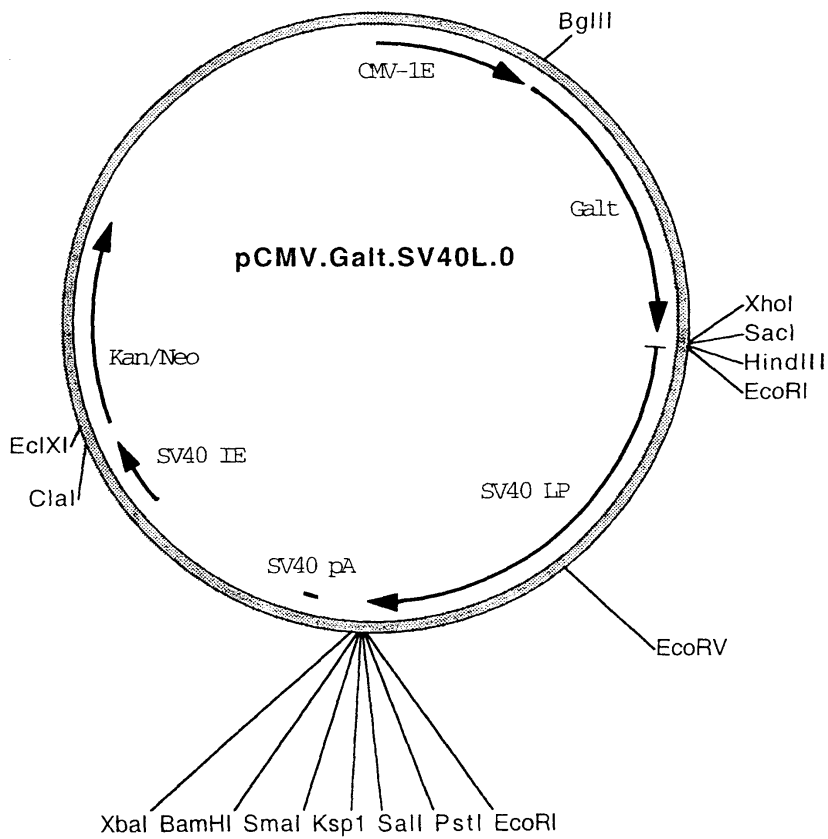
도면30



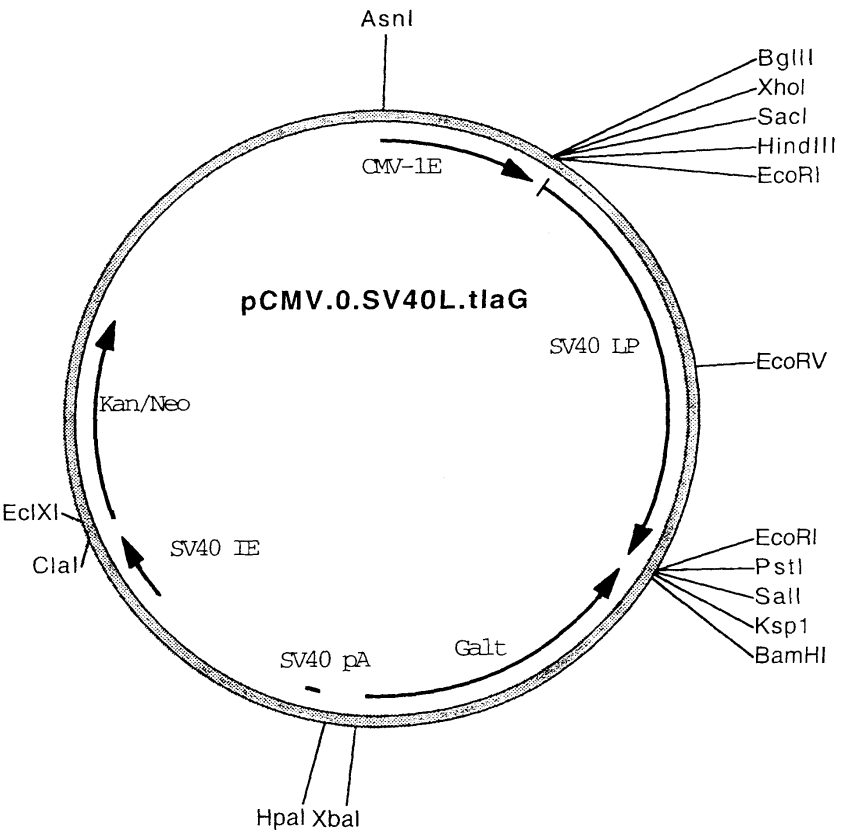
도면31



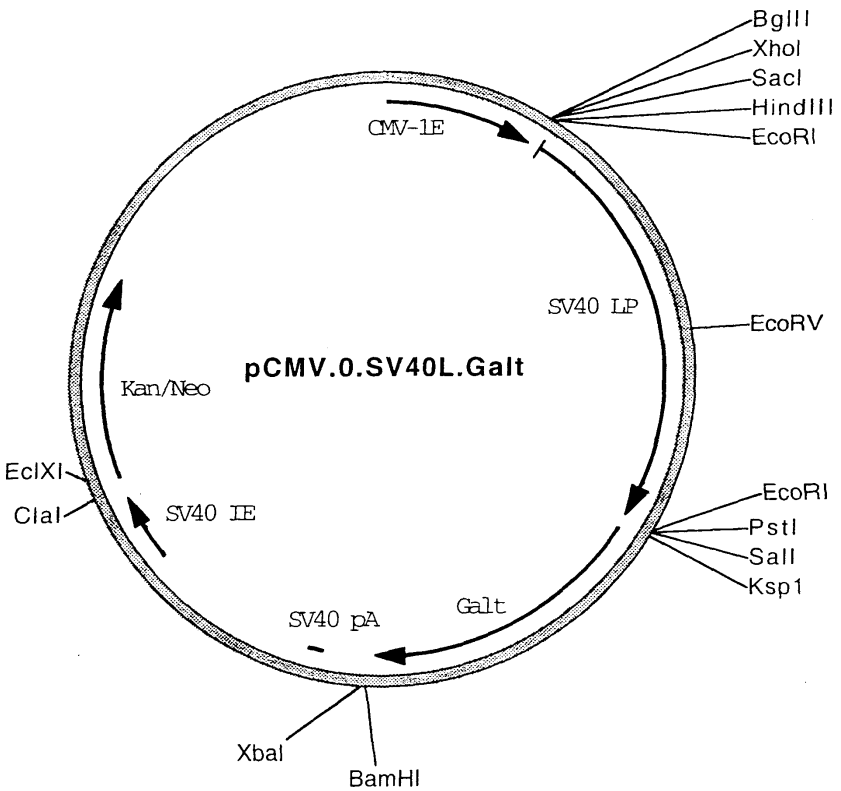
도면32



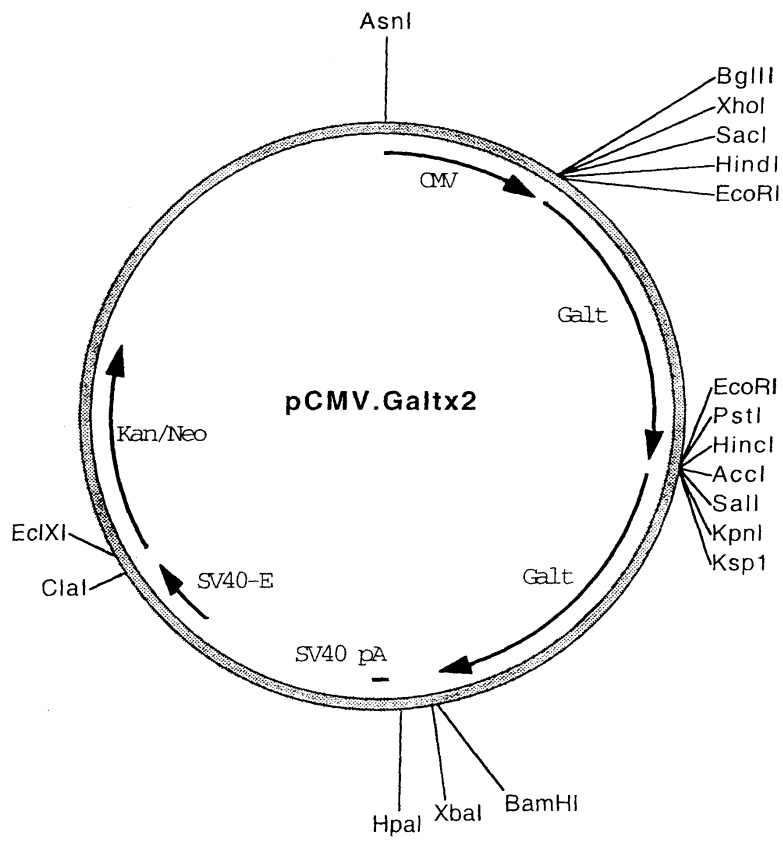
도면33



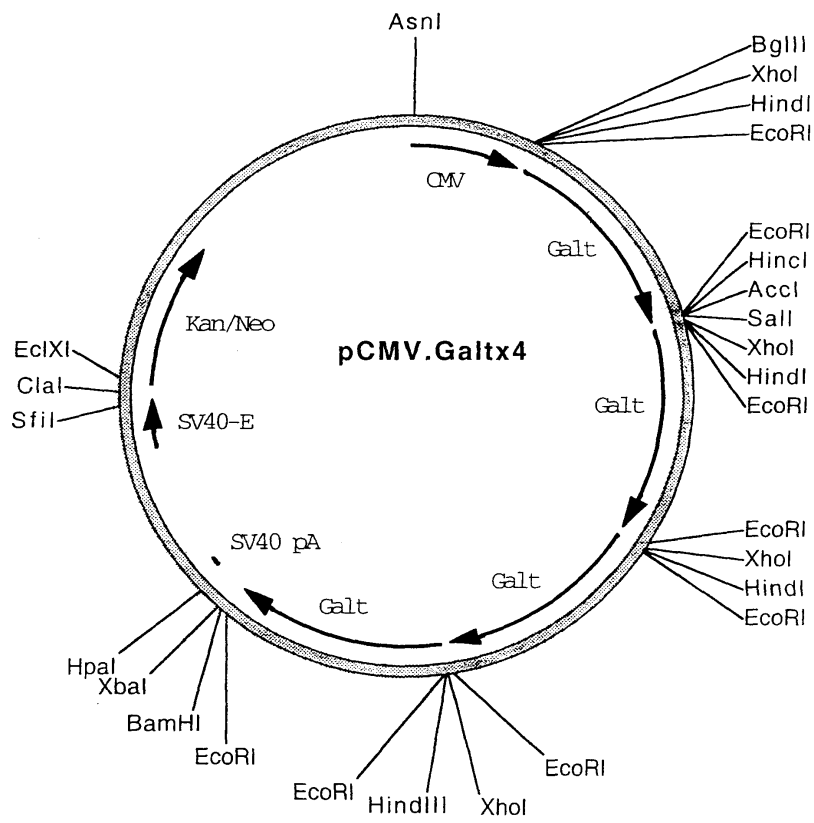
도면34



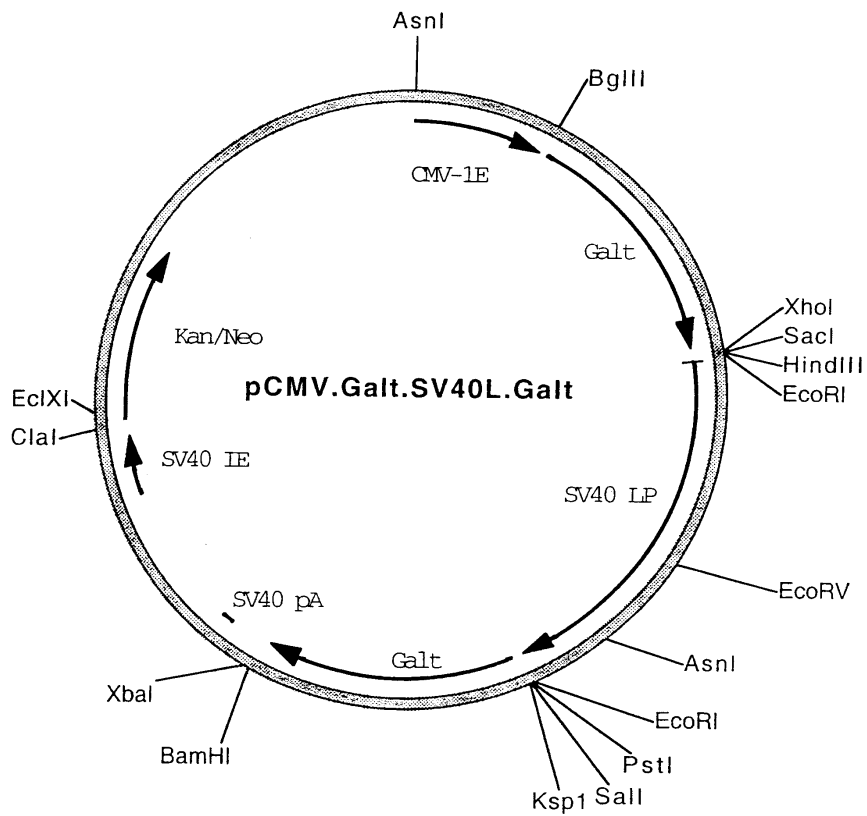
도면35



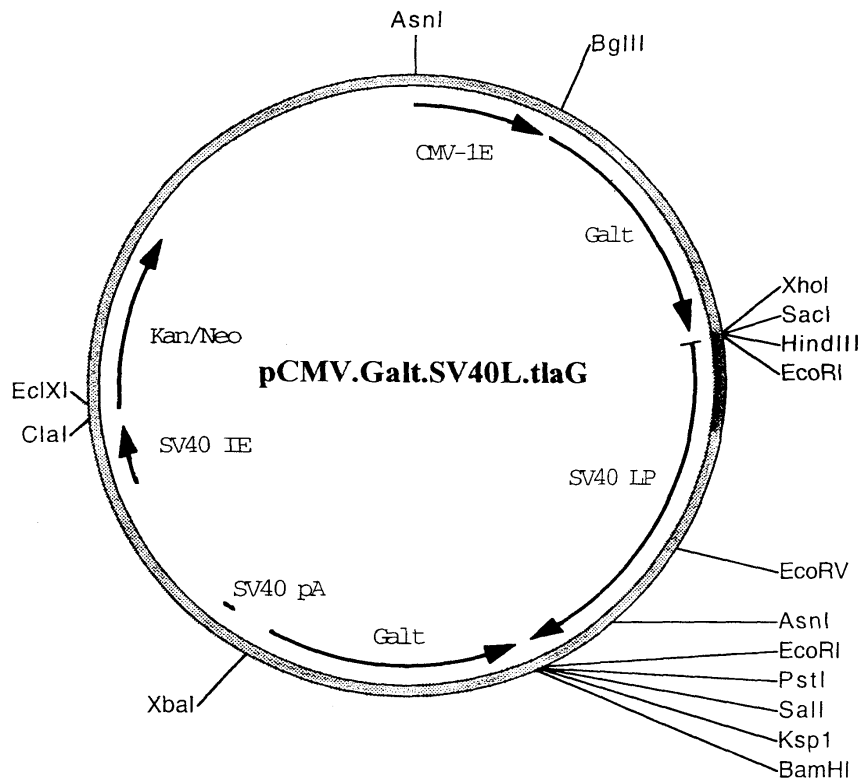
도면36



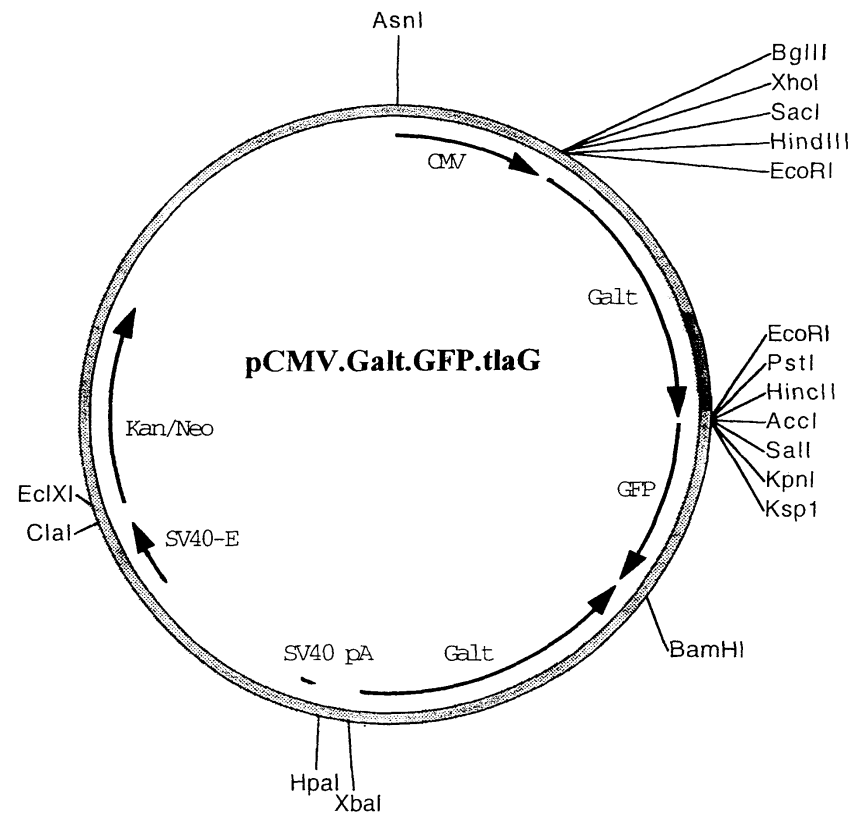
도면37



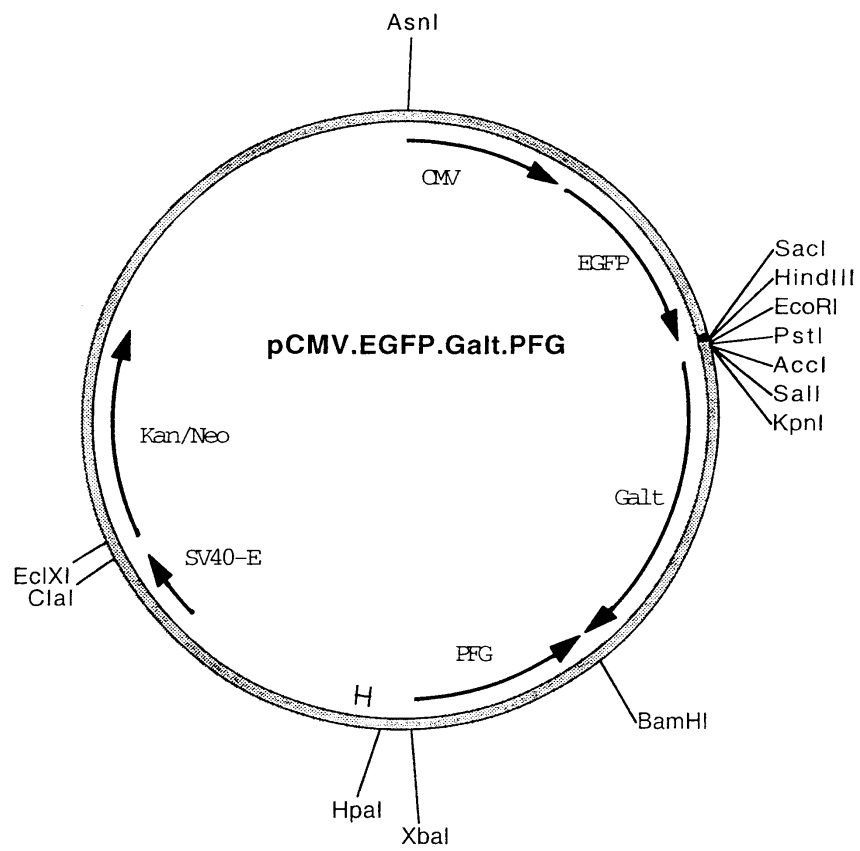
도면38



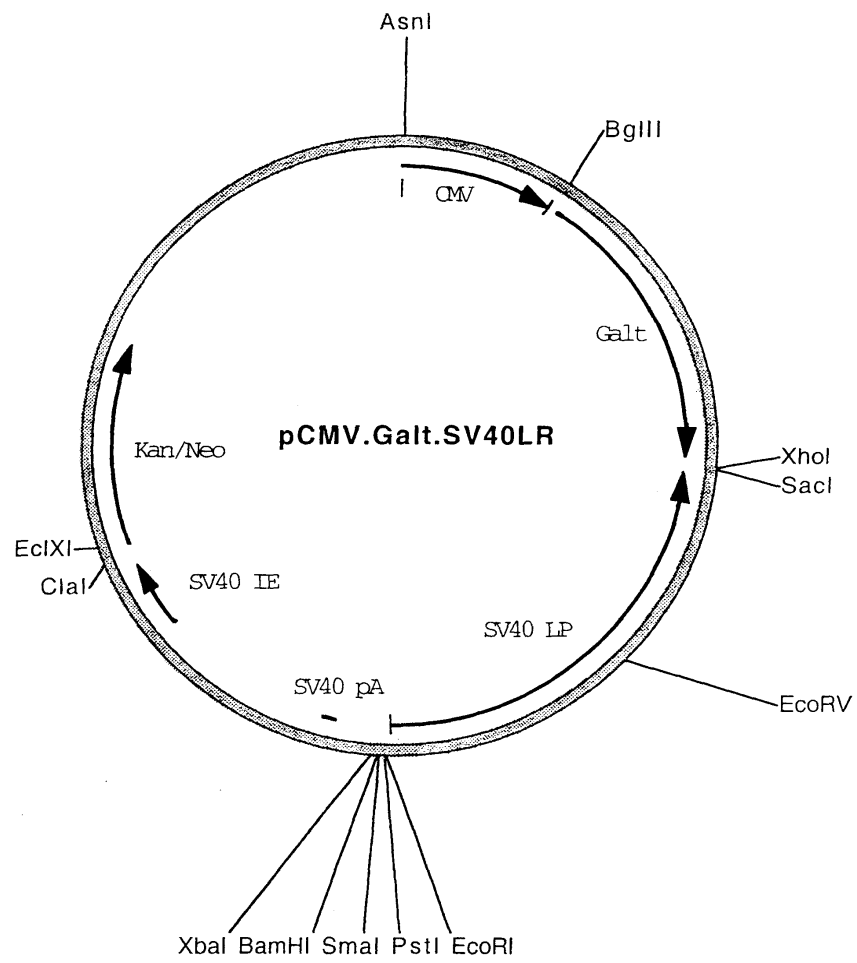
도면39



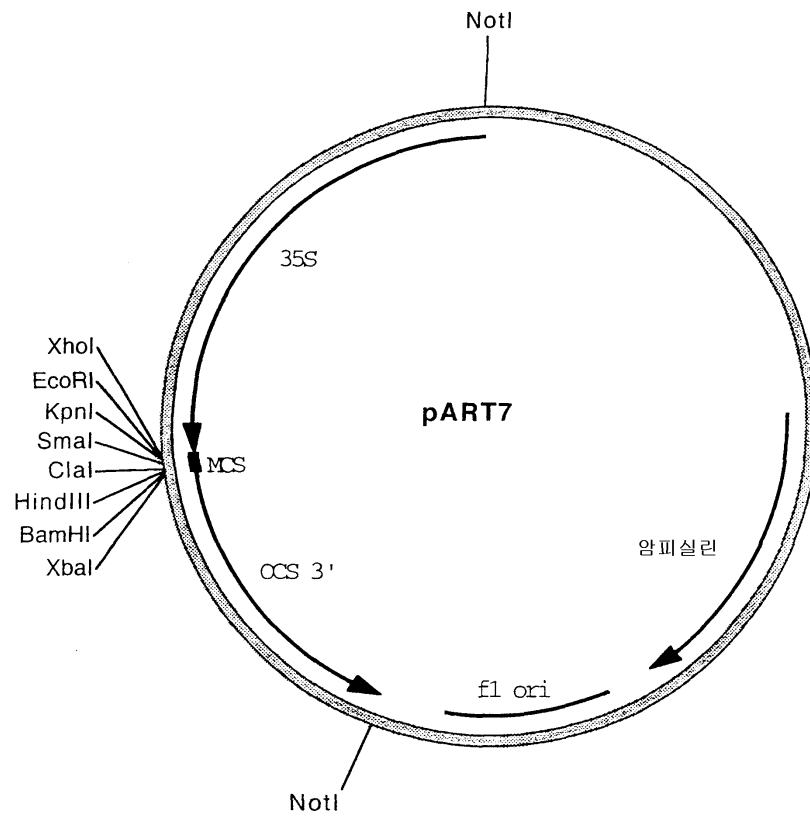
도면40



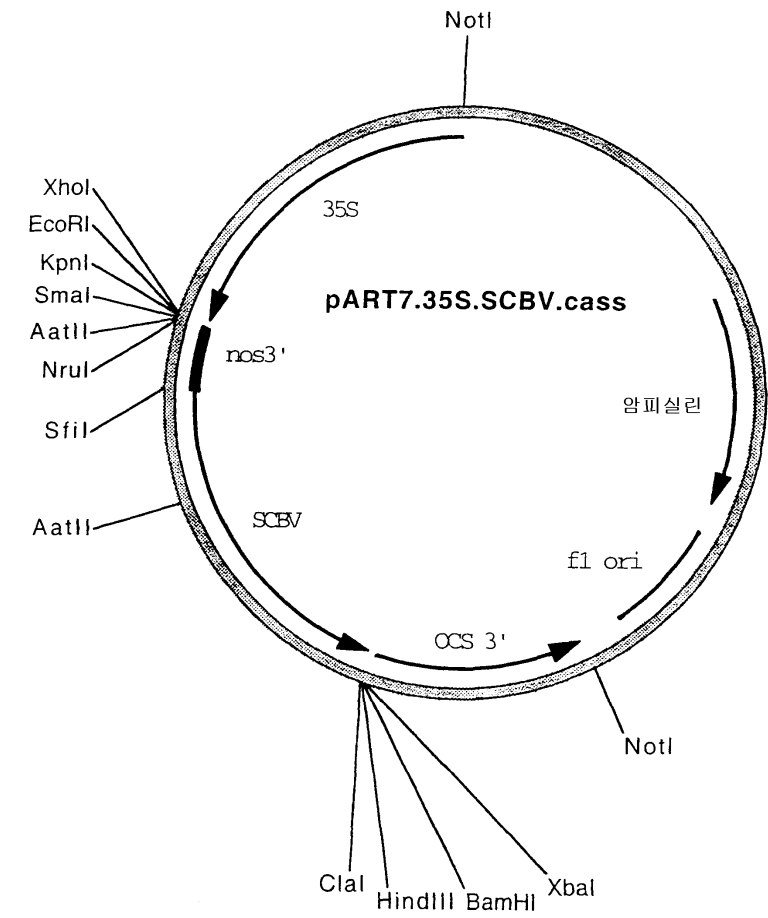
도면41



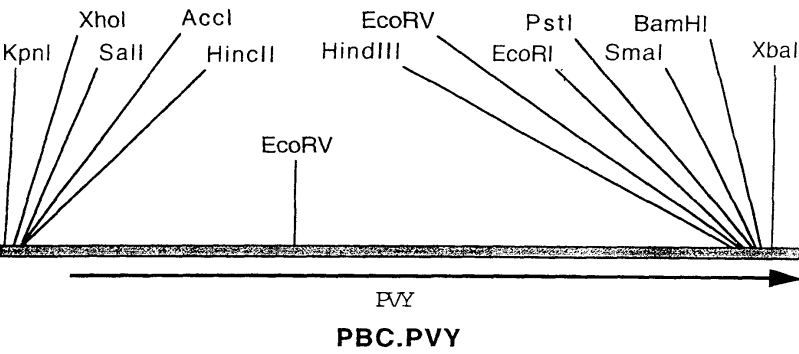
도면42



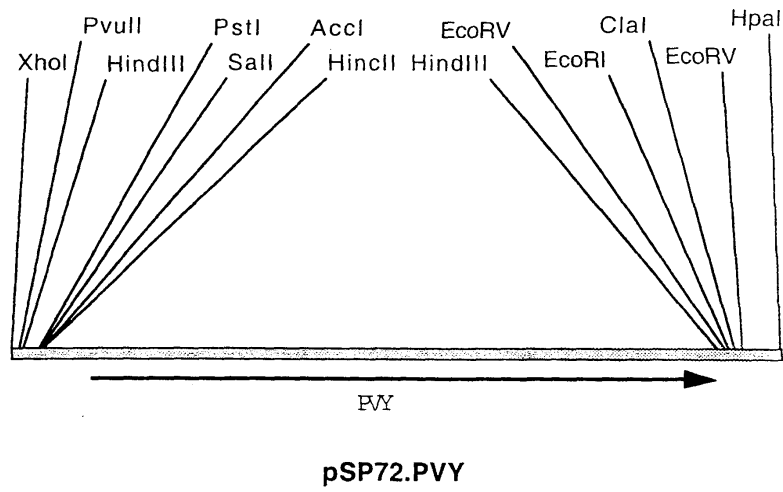
도면43



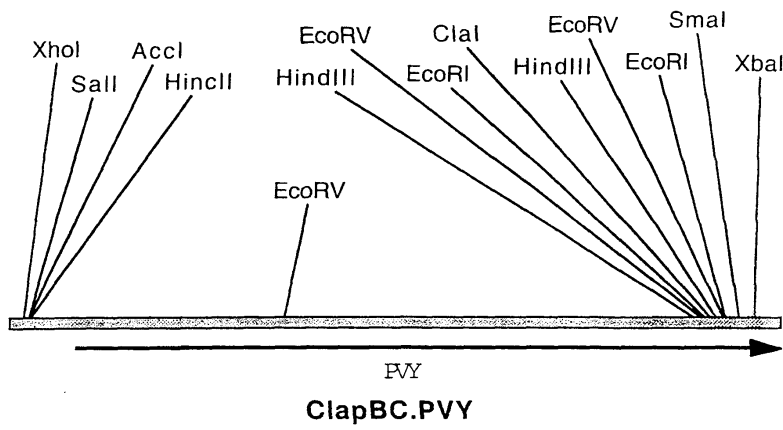
도면44



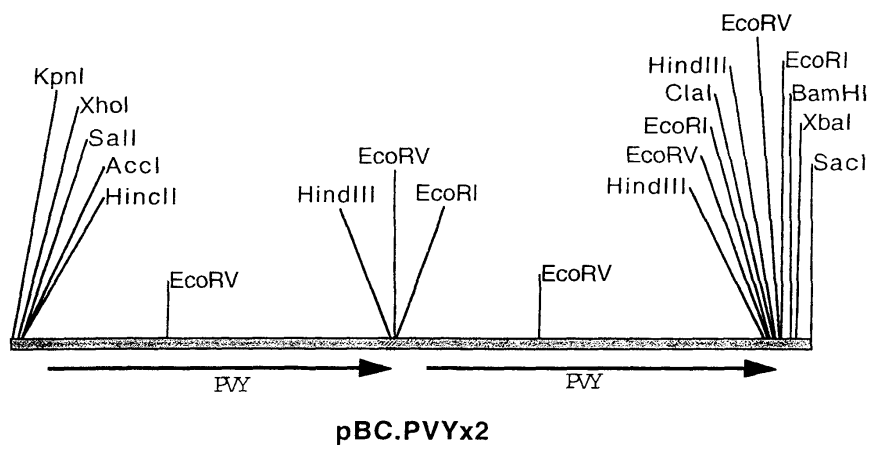
도면45



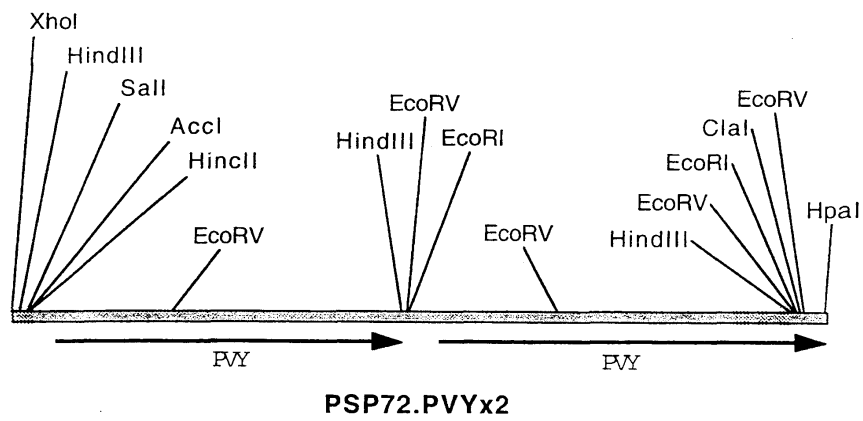
도면46



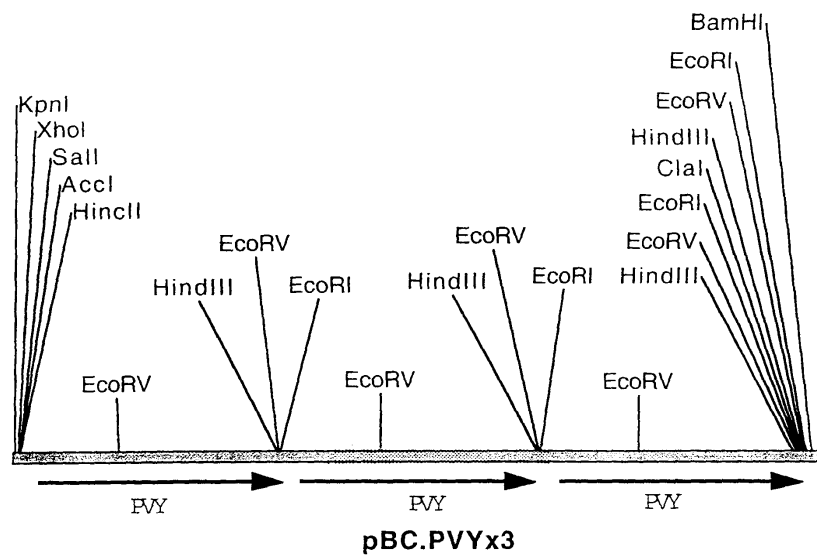
도면47



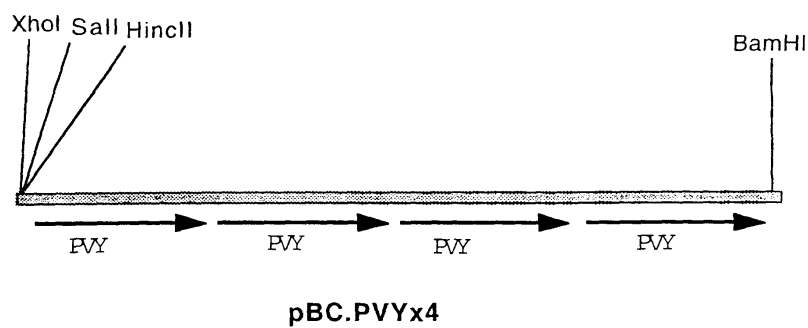
도면48



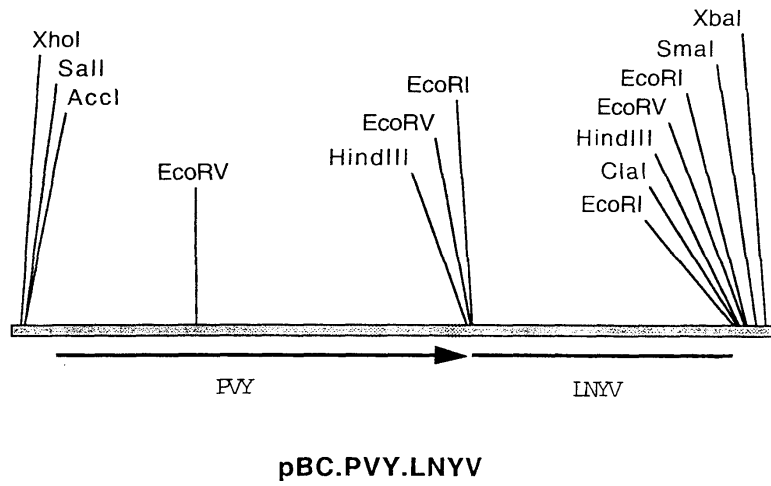
도면49



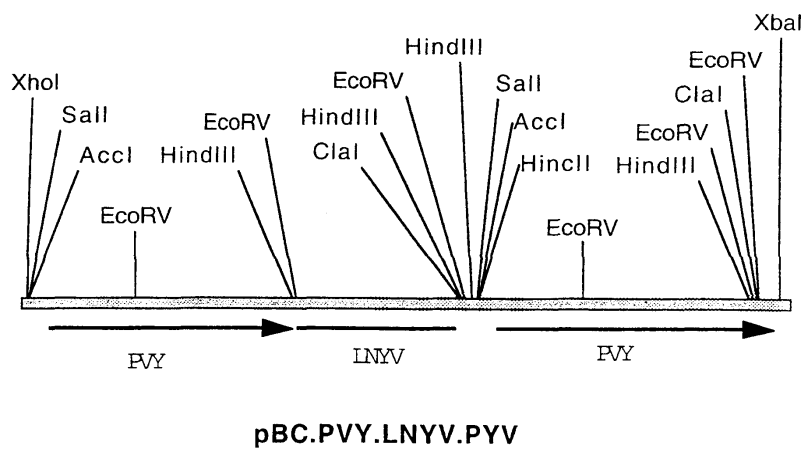
도면50



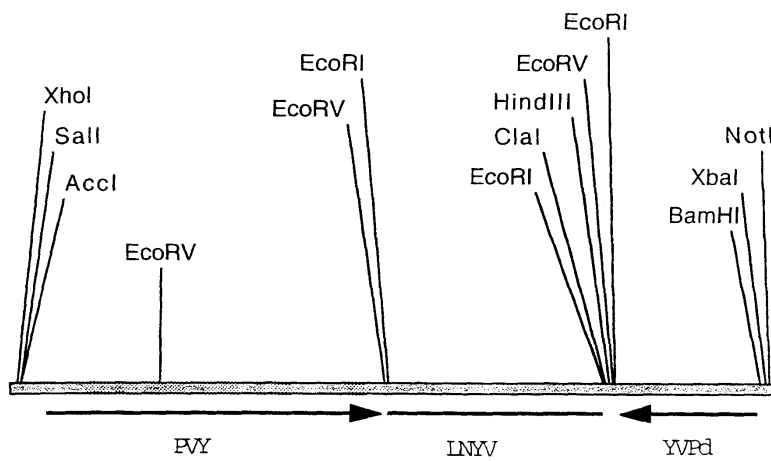
도면51



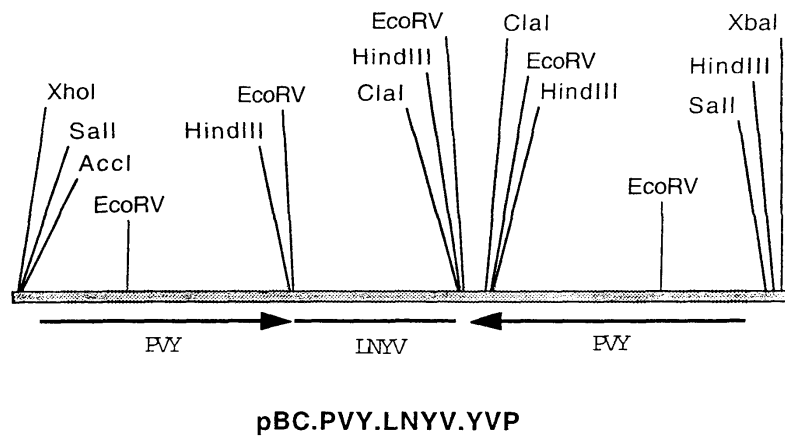
도면52



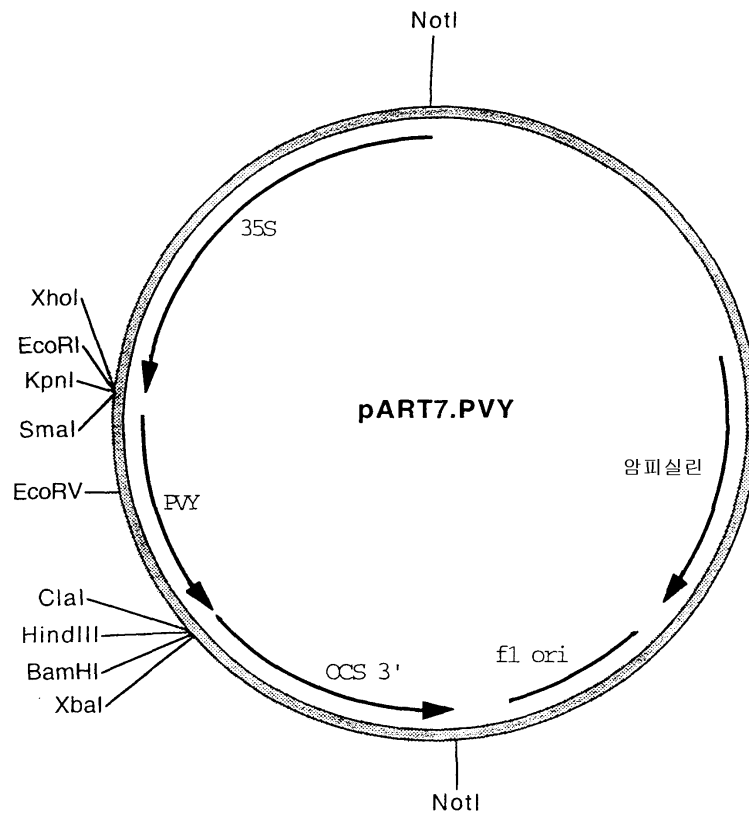
도면53



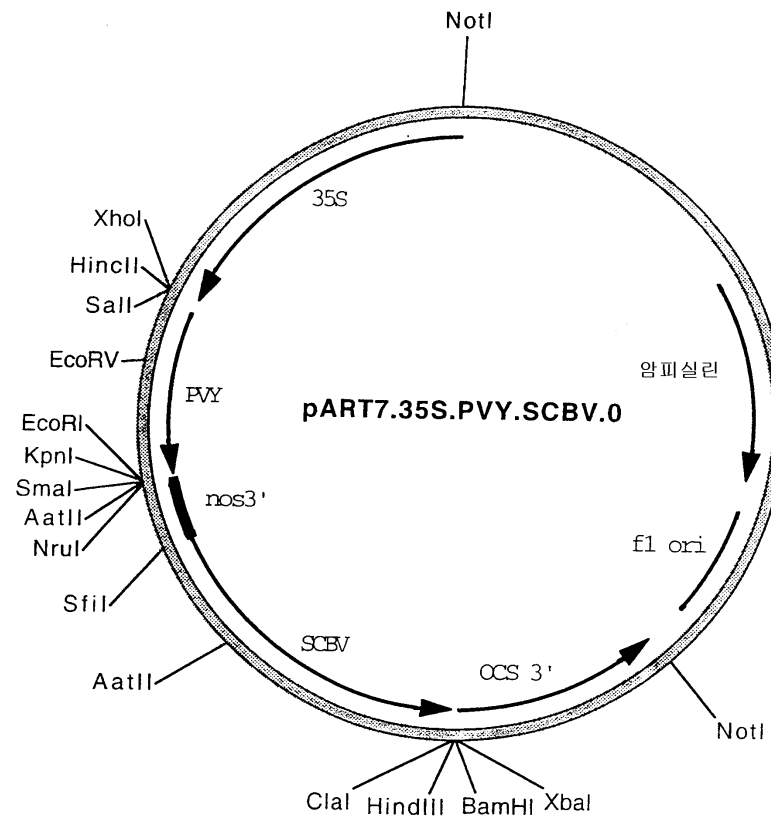
도면54



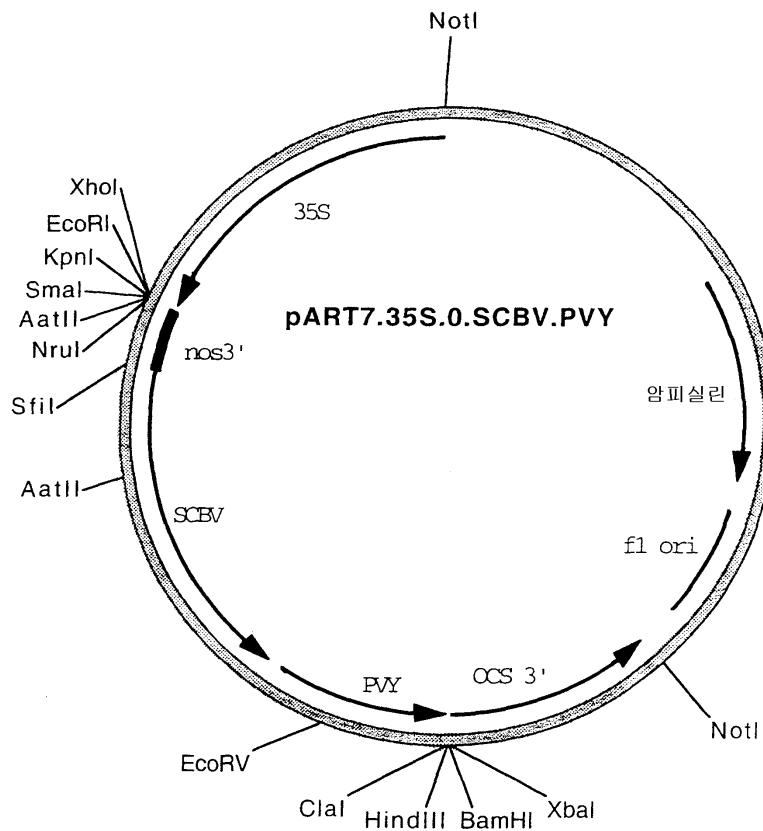
도면55



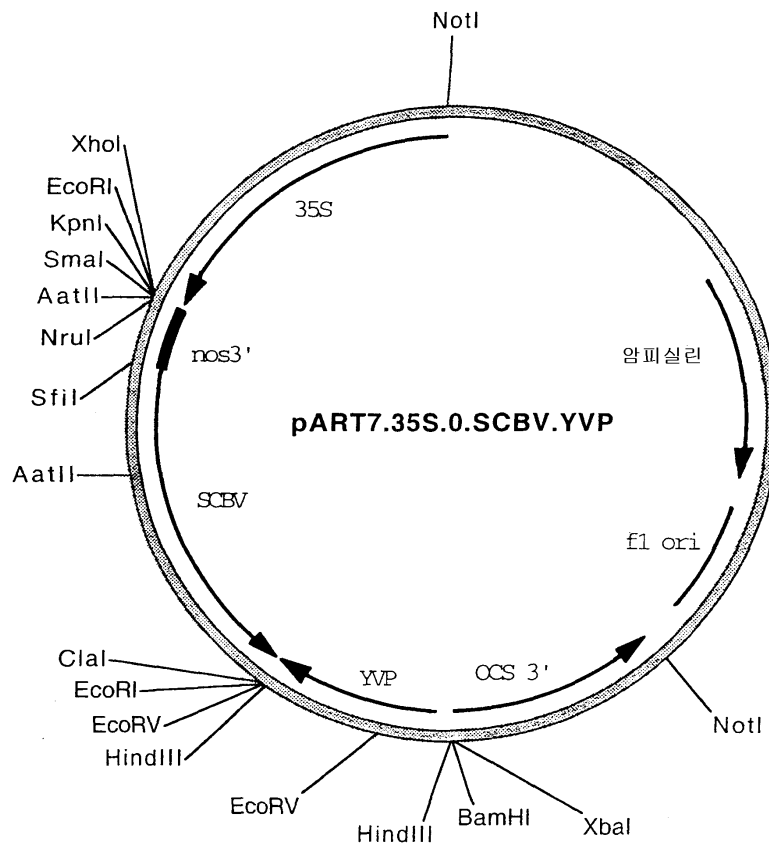
도면56



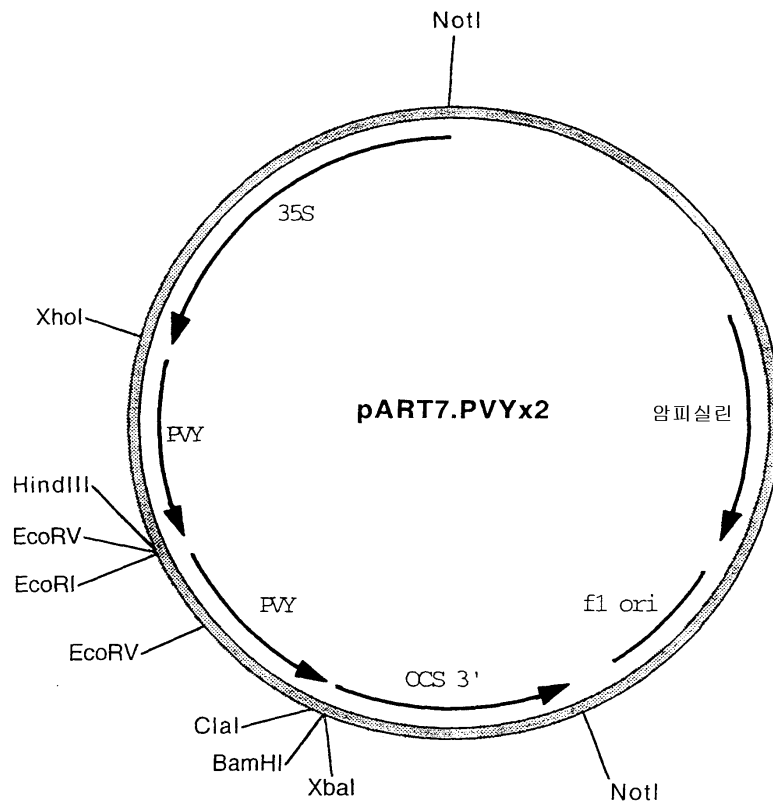
도면57



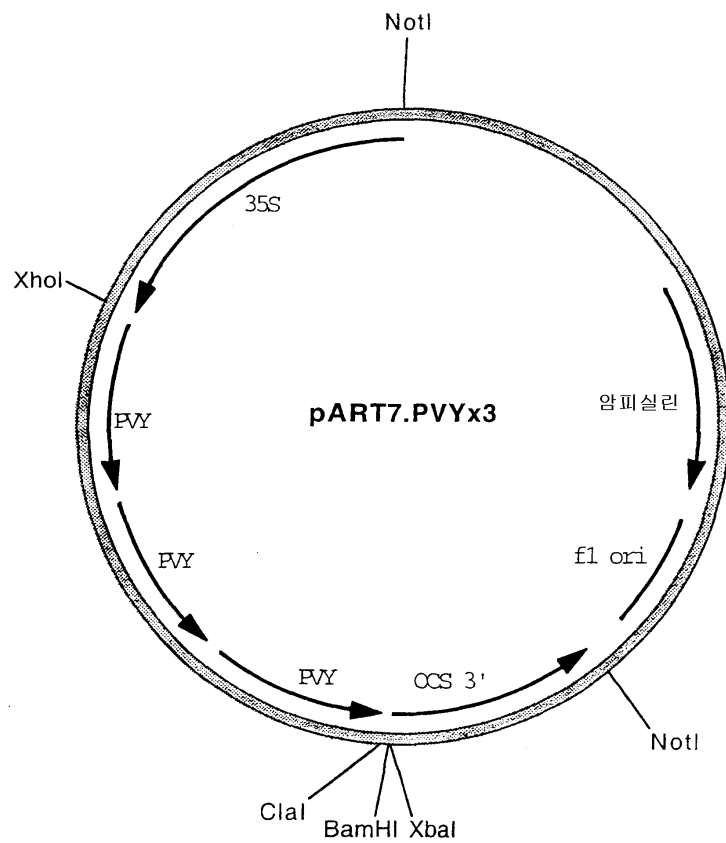
도면58



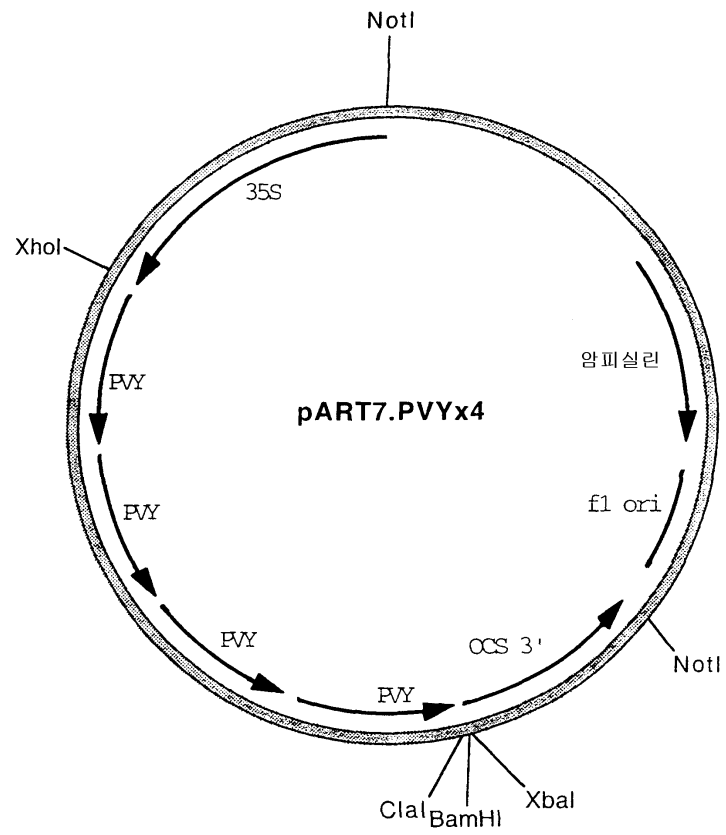
도면59



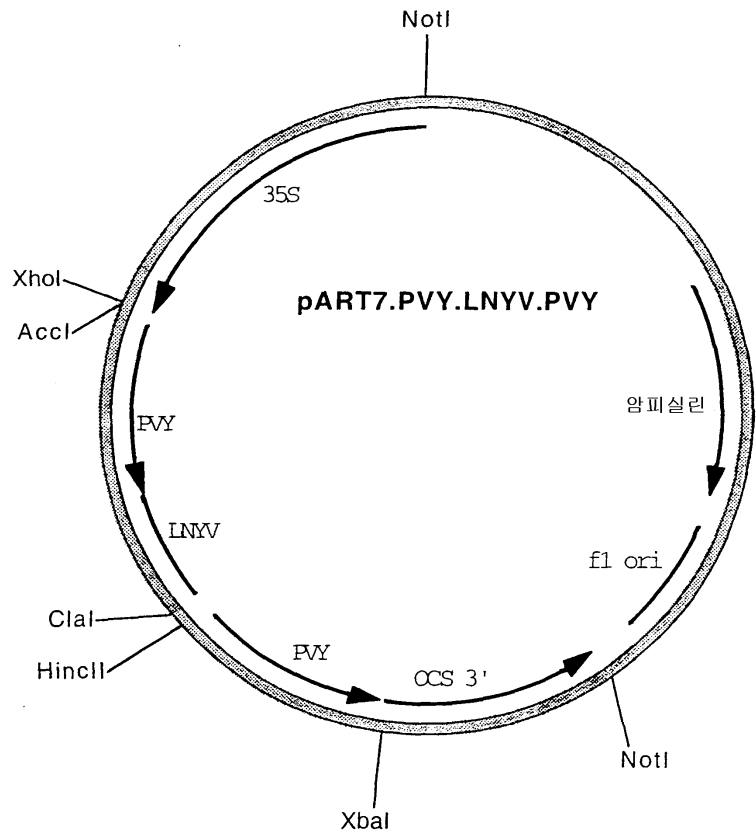
도면60



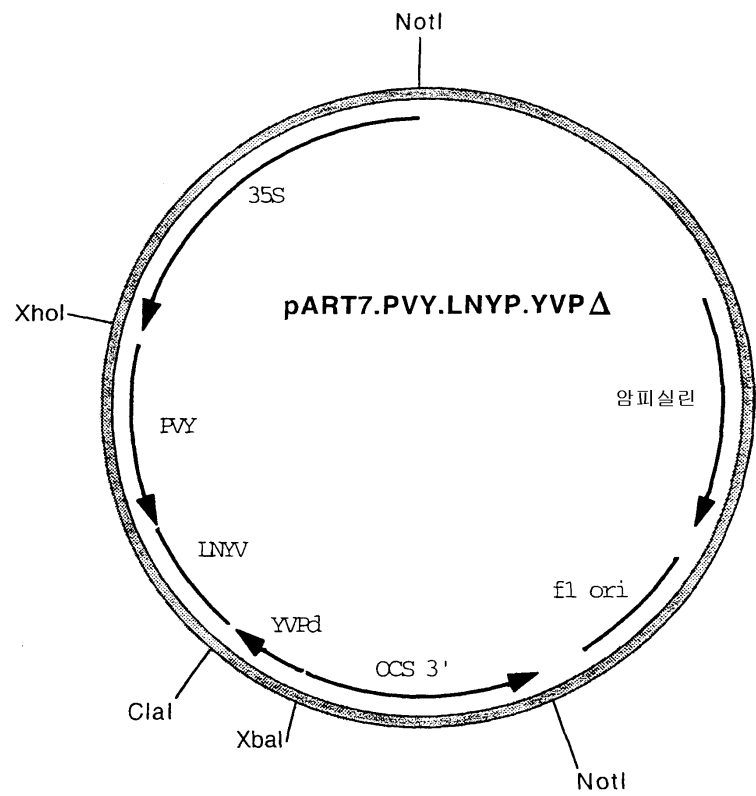
도면61



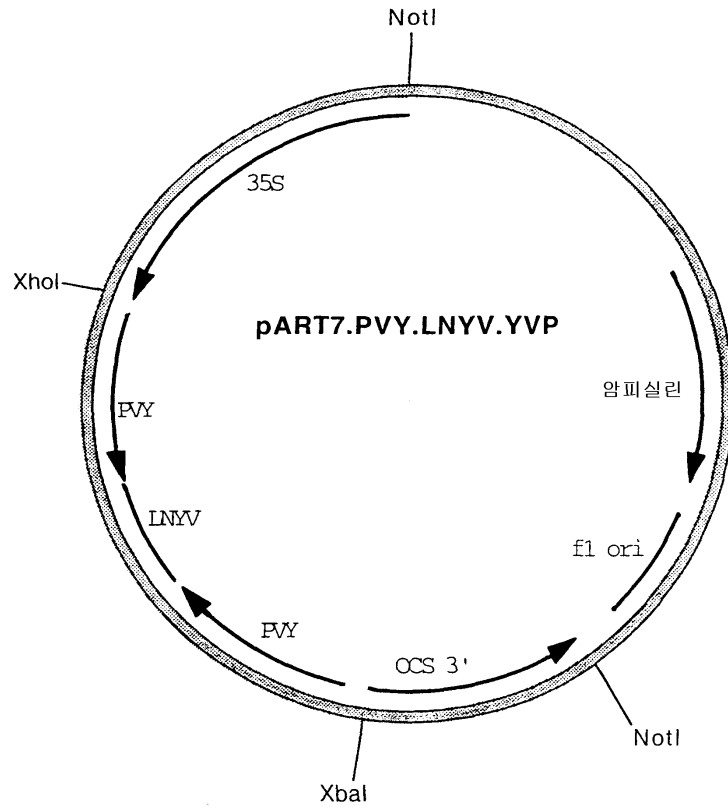
도면62



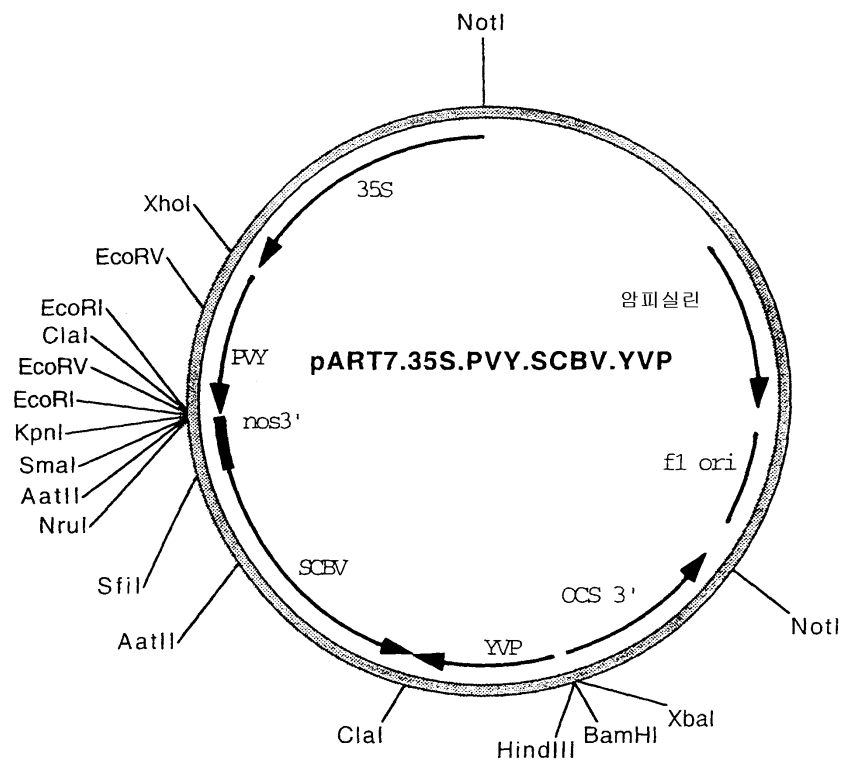
도면63



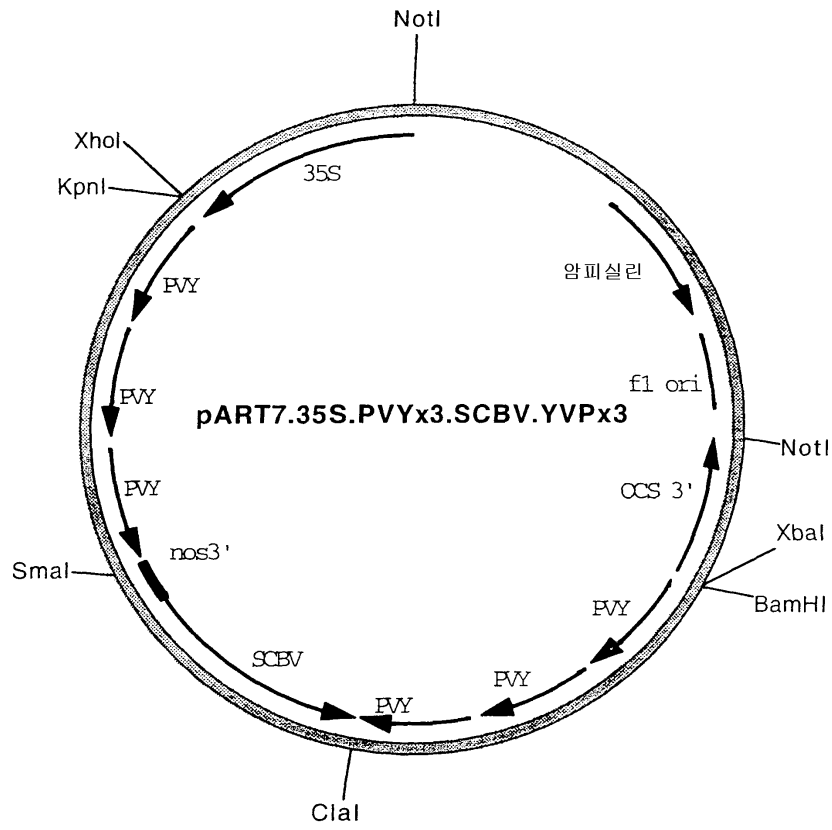
도면64



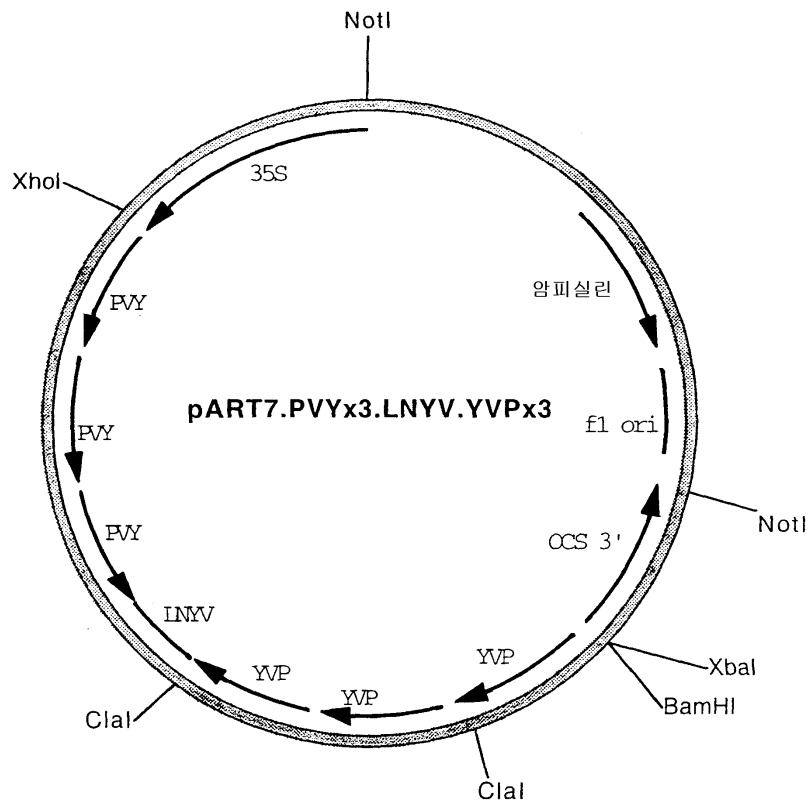
도면65



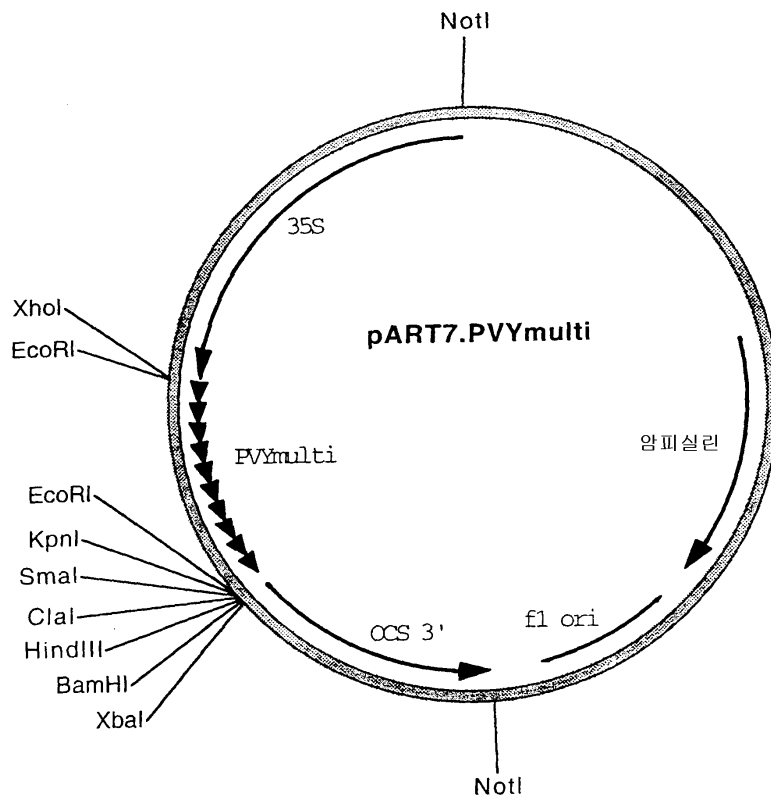
도면66



도면67



도면68



서열 목록

<110> Benitec Australia Limited AND
State of Queensland through its Department of Primary
Industries

<120> Control of gene expression

<130> KP-CH-004039

<140> 10-2000-7010419

<141> 2000-09-20

<150> AU PP2492

<151> 1998-03-20

<150> AU PP2499

<151> 1998-03-20

<160> 16

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> jellyfish

<400> 1

agatctgtaa acggccacaa gttcag

26

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> jellyfish

<400> 2

ggatccttgt acagctcgtc catgcc

26

<210> 3

<211> 74

<212> DNA

<213> virus

<400> 3
gtcgacaata aaatatcttt attttcatta catctgtgtg ttggtttttt gtgtgatttt 60

tgcaaaagcc tagg 74

<210> 4
<211> 31
<212> DNA
<213> virus

<400> 4
gtcgacgttt agagcagaag taacacttcc g 31

<210> 5
<211> 38
<212> DNA
<213> virus

<400> 5
cggcagatct aacaatggca ggacaaatcg agtacatc 38

<210> 6
<211> 31
<212> DNA
<213> virus

<400> 6
cccgggatcc tcgaaagaat cgtaccatt c 31

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> virus

<400> 7
gggcggatcc ttagaaagaa tcgtaccac 29

<210> 8
<211> 28

<212>	DNA	
<213>	virus	
<400>	8	
	cggcagatct ggacaaatcg agtacatc	28
<210>	9	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	agrobacterium	
<400>	9	
	ggattcccg gacgtcgca atttccccg atcgttc	37
<210>	10	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	agrobacterium	
<400>	10	
	ccatggccat ataggccga tctagtaaca tag	33
<210>	11	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	virus	
<400>	11	
	ccatggccta tatggccatt cccacattc aag	33
<210>	12	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	virus	
<400>	12	
	aacgttaact tctaccagc tccagag	27
<210>	13	
<211>	28	
<212>	DNA	

<213>	virus	
<400>	13	
	atgggatccg ttatgccaag aagaagga	28
<210>	14	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	virus	
<400>	14	
	tgtggatccc taacggaccc gatg	24
<210>	15	
<211>	72	
<212>	DNA	
<213>	virus	
<400>	15	
	taatgaggat gatgtcccta cttttaattg gcagaaattt ctgtggaaag acagggaaat	60
	ctttcggcat tt	72
<210>	16	
<211>	72	
<212>	DNA	
<213>	virus	
<400>	16	
	ttctgccaat taaaggtagg gacatcatcc tcattaaat gccgaaagat ttccctgtct	-1
	ttccacagaa at	12