



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월15일
(11) 등록번호 10-2156290
(24) 등록일자 2020년09월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/0058 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7028310
(22) 출원일자(국제) 2014년03월13일
심사청구일자 2019년01월03일
(85) 번역문제출일자 2015년10월08일
(65) 공개번호 10-2015-0133753
(43) 공개일자 2015년11월30일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2014/056651
(87) 국제공개번호 WO 2014/142235
국제공개일자 2014년09월18일
(30) 우선권주장
61/779,556 2013년03월13일 미국(US)
61/894,563 2013년10월23일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02012135844 A1
Nature Biotechnology, Vol.29, No.4, (2011),
pp341-345.

(73) 특허권자
리 종
일본국 도쿄도 츄오쿠 가치도키 6-3-2-2822
가츠라 미사코
일본국 도쿄도 츄오쿠 가치도키 6-3-2-2822
(72) 발명자
리 종
일본국 도쿄도 츄오쿠 가치도키 6-3-2-2822
가츠라 미사코
일본국 도쿄도 츄오쿠 가치도키 6-3-2-2822
펑 루오
미국 캘리포니아주 91776 산 가브리엘 웨스트 라
스 튜나스 드라이브 416 스위트 106
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 21 항

심사관 : 손영희

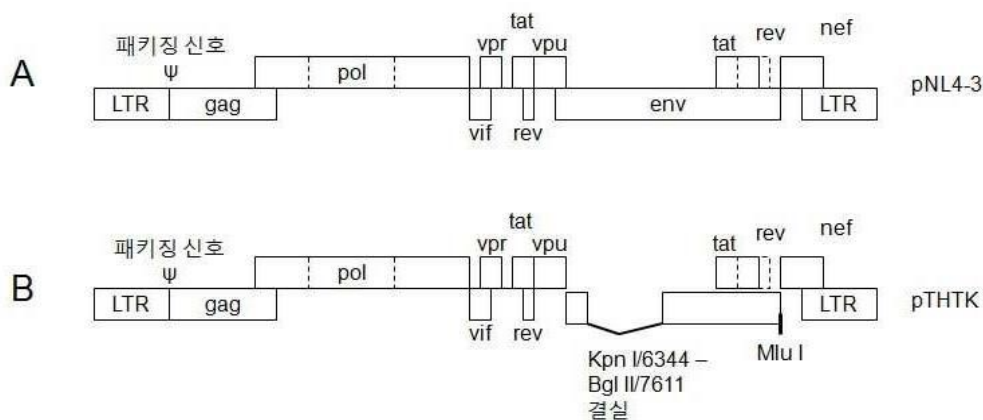
(54) 발명의 명칭 미세소포 및 이를 생산하는 방법

(57) 요약

본 발명은 형질도입 유전자 산물 및/또는 형질도입 유전자를 포함하는 렌티 바이러스 RNA를 포함하는 미세소포를 생산하기 위한 방법으로서,

인 비트로에서 렌티 바이러스 벡터를 이용하여 형질도입 유전자가 도입된 세포를 배양하여, 형질도입 유전자 산 (뒷면에 계속)

대표도



물 및/또는 형질도입 유전자를 포함하는 렌티 바이러스 RNA를 포함하는 미세소포를 세포 외로 방출시키는 단계로서, 상기 렌티 바이러스 벡터는 렌티 바이러스 유전체 서열 중의 하나 이상의 구조 단백질 유전자가 결손되고, 텔로머라아제 역전사 효소(TERT) 유전자 프로모터의 제어하에 있는 형질도입 유전자를 포함하는 것인 단계, 및 방출된 미세소포를 회수하는 단계를 포함하는 방법;

및 본 방법에 따라 얻은 미세소포 및 이의 용도를 제공한다.

(52) CPC특허분류

C12N 2740/15043 (2013.01)

C12N 2740/15071 (2013.01)

C12N 2830/008 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 단계를 포함하는 형질도입 유전자(transgene) 산물 및/또는 형질도입 유전자를 포함하는 렌티 바이러스 RNA를 포함하는 미세소포를 생산하는 방법:

인 비트로(*in vitro*)에서 렌티 바이러스 벡터를 이용하여 형질도입 유전자가 도입된 세포를 배양하여, 형질도입 유전자 산물 및/또는 형질도입 유전자를 포함하는 렌티 바이러스 RNA를 포함하는 미세소포를 세포 외로 방출시키는 단계로서, 상기 렌티 바이러스 벡터는 렌티 바이러스 유전체 서열 중의 env, gag, 및 pol 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 구조 단백질 유전자가 결손되고, 텔로머라아제 역전사 효소(TERT) 유전자 프로모터의 제어하에 있는 형질도입 유전자를 포함하는 것인 단계, 및

방출된 미세소포를 회수하는 단계.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 세포는 상기 하나 이상의 구조 단백질 유전자를 갖지 않는 것인 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 렌티 바이러스 벡터는 env 유전자가 결손된 것인 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 텔로머라아제 역전사 효소 (TERT) 유전자 프로모터는 인간 TERT 유전자 프로모터인 것인 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 인간 TERT 유전자 프로모터는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열과 90% 이상의 서열 동일성(sequence identity)을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 렌티 바이러스 벡터는

- i) 렌티 바이러스 유전체 서열을 포함하는 RNA 벡터,
- ii) 렌티 바이러스 유전체 서열을 포함하는 RNA를 코딩하는 DNA 벡터, 또는
- iii) 렌티 바이러스 유전체 서열을 포함하는 RNA를 갖는 바이러스 입자인 것인 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 렌티 바이러스 유전체 서열은 HIV 유전체 서열인 것인 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 렌티 바이러스 벡터는 종양 억제 유전자인 상기 형질도입 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 종양 억제 유전자는 PTEN 또는 p16 유전자인 것인 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 렌티 바이러스 벡터는 shRNA를 코딩하는 상기 형질도입 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 shRNA는 세포 증식 조절 인자(cell proliferation regulator)를 코딩하는 유전자를 표적으로 하는 것인 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 세포 증식 조절 인자는 CDC6인 것인 방법.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 세포는 신장 유래 세포인 것인 방법.

청구항 14

도입 유전자 산물 및/또는 형질도입 유전자를 포함하는 렌티 바이러스 RNA를 포함하는 미세소포로서, 상기 미세소포는 청구항 1 내지 13 중 어느 하나에 따른 방법에 따라 제조되는 것인 미세소포.

청구항 15

표적 세포를 청구항 14에 따른 형질도입 유전자 산물 및/또는 형질도입 유전자를 포함하는 렌티 바이러스 RNA를 포함하는 미세소포와 접촉시키고, 이들의 융합(fuse)에 의해 상기 형질도입 유전자를 상기 세포 내로 도입시키는 단계를 포함하는, 유전자 도입 방법.

청구항 16

청구항 14의 미세소포를 포함하는 조성물.

청구항 17

청구항 14의 미세소포를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 암의 치료에 사용하기 위한 것인 약학적 조성물.

청구항 19

청구항 17에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 20

청구항 14의 미세소포를 상기 형질도입 유전자 또는 상기 형질도입 유전자 산물의 도입이 필요한 인간을 제외한 동물 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 동물 환자를 치료하는 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 환자는 암에 걸린 환자인 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미세소포 및 이를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인 비보(*in vivo*)의 다양한 세포는 미세소포(작은 막 소포), 예를 들어 엑소솜(exosome)을 분비 또는 방출하는 것으로 알려져있다. 미세소포의 역할 중 하나는 불필요한 세포 내 성분을 세포 밖으로 방출하는 것으로 여겨져 왔다. 그러나 최근 미세소포는 분비 세포와 이들의 표적 세포 사이의 단백질 또는 지질 등의 물질을 전달하기

위한 정보 전달 매체(signaling vehicle)이고, 세포 간 상호작용에서 기능하는 가능성이 제시되고 있다.

[0003] 또한 지금까지 미세세포, 특히 엑소솜의 다양한 임상 용도가 제안되고 있다. 예를 들어, 특허 문헌 1에는 플라즈모디움 종(*Plasmodium sp.*) 항원을 포함하는 망상 적혈구(reticulocyte)에서 분리된 엑소솜의 말라리아 방어에서의 사용이 개시되어있다. 특허 문헌 2에는 B 세포 유래의 엑소솜을 이용한 암 치료가 개시되어있다. 특허 문헌 3에는 줄기 세포 유래 미세세포의 내피 또는 상피 재생에서의 사용이 기재되어있다.

[0004] 렌티 바이러스(lentivirus), 예를 들어, 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV)는 세포를 감염시키고 분열 및 비분열 세포 모두의 유전체에 통합(integration)되는 특성을 가진다. 따라서 렌티 바이러스 유전체 서열을 이용한 렌티 바이러스 벡터는 유전자 도입(transduction)을 위한 도구로 널리 이용되고있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 특허 문헌 1: 국제 공개 W02011/080271
(특허문헌 0002) 특허 문헌 2: 국제 공개 W02011/000551
(특허문헌 0003) 특허 문헌 3: 국제 공개 W02009/057165

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 미세세포 및 이를 생산하기 위한 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은 상기 목적을 달성하기 위해 열심히 연구를 수행하였고, 결과적으로 텔로머라아제 역전사 효소(telomerase reverse transcriptase: TERT) 유전자 프로모터의 제어하에 형질도입 유전자(transgene)를 포함하는 렌티 바이러스 벡터를 이용하여 형질도입 유전자를 세포에 도입하면, 숙주 유전체으로의 형질도입 유전자의 통합 및 이의 발현이 촉진되고, 세포에 의해 생산된 형질도입 유전자 산물 등을 갖는 미세세포의 세포 외 방출이 증가하는 것을 발견하였다. 이러한 발견을 기초로, 본 발명이 완성되었다.

[0008] 특히, 본 발명은 하기를 포함한다:

[0009] [1] 형질도입 유전자 산물 및/또는 형질도입 유전자를 포함하는 렌티 바이러스 RNA를 포함하는 미세세포를 생산하기 위한 하기의 단계를 포함하는 방법:

[0010] 인 비트로(*in vitro*)에서 렌티 바이러스 벡터를 이용하여 형질도입 유전자를 도입한 세포를 배양하여, 세포 외로 형질도입 유전자 산물 및/또는 형질도입 유전자를 포함하는 렌티 바이러스 RNA를 포함하는 미세세포를 방출시키는 단계로서, 상기 렌티 바이러스 벡터는 렌티 바이러스 유전체 서열 중의 하나 이상의 구조 단백질 유전자가 결손되고, 텔로머라아제 역전사 효소(TERT) 유전자 프로모터의 제어하에 있는 형질도입 유전자를 포함하는 것인 단계, 및

[0011] 방출된 미세세포를 회수하는 단계.

[0012] [2] [1]에 있어서, 상기 세포는 상기 하나 이상의 구조 단백질 유전자를 갖지 않는 것인 방법.

[0013] [3] [1] 또는 [2]에 있어서, 상기 렌티 바이러스 벡터는 env 유전자가 결손된 것인 방법.

[0014] [4] [1] 내지 [3] 중 어느 하나에 있어서, 상기 텔로머라아제 역전사 효소(TERT) 유전자 프로모터는 인간 TERT 유전자 프로모터인 것인 방법.

[0015] [5] [4]에 있어서, 상기 인간 TERT 유전자 프로모터는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 서열번호 1과 90% 이상의 서열 동일성(sequence identity)을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 방법.

[0016] [6] [5]에 있어서, 상기 인간 TERT 유전자 프로모터는 서열번호 1과 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드

드 서열을 포함하는 것인 방법.

- [0017] [7] [1] 내지 [6] 중 어느 하나에 있어서, 상기 렌티 바이러스 RNA는 형질도입 유전자의 상류에 TERT 유전자 프로모터 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0018] [8] [1] 내지 [7] 중 어느 하나에 있어서, 상기 렌티 바이러스 벡터는
- [0019] i) 렌티 바이러스 유전체 서열을 포함하는 RNA 벡터,
- [0020] ii) 렌티 바이러스 유전체 서열을 포함하는 RNA를 코딩(encoding)하는 DNA 벡터, 또는
- [0021] iii) 렌티 바이러스 유전체 서열을 포함하는 RNA를 갖는(carrying) 바이러스 입자인 것인 방법.
- [0022] [9] [1] 내지 [8] 중 어느 하나에 있어서, 상기 렌티 바이러스 유전체 서열은 상기 TERT 유전자 프로모터 및 상기 형질도입 유전자 사이의 TERT 전사 영역의 적어도 일부를 포함하는 것인 방법.
- [0023] [10] [9]에 있어서, 상기 TERT 전사 영역의 적어도 일부는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 2와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0024] [11] [1] 내지 [10] 중 어느 하나에 있어서, 상기 렌티 바이러스 유전체 서열은 HIV 유전체 서열인 것인 방법.
- [0025] [12] [11]에 있어서, 상기 HIV 유전체 서열은 HIV-1 유전체 서열인 것인 방법.
- [0026] [13] [12]에 있어서, 상기 HIV-1 유전체 서열은 5' LTR; 패키징 신호 ψ ; gag 유전자; pol 유전자; vif 유전자; vpr 유전자; tat 유전자; rev 유전자; vpu 유전자; 및 3' LTR을 포함하는 것인 방법.
- [0027] [14] [1] 내지 [13] 중 어느 하나에 있어서, 상기 형질도입 유전자는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 것인 방법.
- [0028] [15] [1] 내지 [14] 중 어느 하나에 있어서, 상기 렌티 바이러스 벡터는 종양 억제 유전자(tumor-suppressor gene)인 형질도입 유전자를 포함하는 것인 방법.
- [0029] [16] [15]에 있어서, 상기 종양 억제 유전자는 PTEN 또는 p16 유전자인 것인 방법.
- [0030] [17] [1] 내지 [14] 중 어느 하나에 있어서, 상기 렌티 바이러스 벡터는 shRNA를 코딩하는 형질도입 유전자를 포함하는 것인 방법.
- [0031] [18] [17]에 있어서, 상기 shRNA는 세포 증식 조절 인자를 코딩하는 유전자를 표적으로 하는 것인 방법.
- [0032] [19] [18]에 있어서, 상기 세포 증식 조절 인자는 CDC6인 것인 방법.
- [0033] [20] [1] 내지 [19] 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 인간 세포인 것인 방법.
- [0034] [21] [1] 내지 [20] 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 신장 유래 세포인 것인 방법.
- [0035] [22] [1] 내지 [21] 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 인간 배아 신장 293T 세포인 것인 방법.
- [0036] [23] 형질도입 유전자 산물 및/또는 형질도입 유전자를 포함하는 렌티 바이러스 RNA를 포함하는 미세세포로서, 상기 미세세포는 [1] 내지 [22] 중 어느 하나에 따른 방법에 의해 제조되는 것인 미세세포.
- [0037] [24] 표적 세포를 [23]에 따른 형질도입 유전자 산물 및/또는 형질도입 유전자를 포함하는 렌티 바이러스 RNA를 포함하는 미세세포와 접촉시키고, 이들의 융합(fuse)에 의해 상기 형질도입 유전자를 세포 내로 도입시키는 단계를 포함하는 유전자 도입 방법.
- [0038] [25] [24]에 있어서, 상기 표적 세포는 인 비트로에서 미세세포와 접촉되는 것인 방법.
- [0039] [26] [23]에 따른 미세세포를 포함하는 조성물.
- [0040] [27] [23]에 따른 미세세포를 포함하는 약학적 조성물.
- [0041] [28] [27]에 있어서, 암의 치료에 사용하기 위한 것인 약학적 조성물.
- [0042] [29] [28]에 있어서, 상기 암은 대장암, 췌장암, 신장암, 폐암, 신경 모세포종, 유방암, 난소암, 위암, 전립선암, 갑상선암 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약학적 조성물.
- [0043] [30] [28] 또는 [29]에 있어서, 상기 암은 CDC6의 발현 증가를 포함하는 것인 약학적 조성물.
- [0044] [31] [27] 내지 [30] 중 어느 하나에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함하는 것인 약학적 조성물.

- [0045] [32] [23]에 따른 미세소포를 상기 형질도입 유전자 또는 상기 형질도입 유전자 산물의 도입이 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 환자를 치료하는 방법.
- [0046] [33] [32]에 있어서, 상기 환자는 암에 걸린 환자인 방법.
- [0047] [34] [33]에 있어서, 상기 암은 대장암, 췌장암, 신장암, 폐암, 신경 모세포종, 유방암, 난소암, 위암, 전립선암, 갑상선암 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0048] [35] [33] 또는 [34]에 있어서, 상기 암은 CDC6의 발현 증가를 포함하는 것인 방법.
- [0049] 본 명세서는 US 가출원 번호 US 61/779,556 및 US 61/894,563에 공개된 내용을 포함하며, 이에 대해 본 출원은 우선권을 주장한다.

발명의 효과

- [0050] 본 발명은 미세소포 및 이를 생산하기 위한 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0051] 도 1은 HIV-1 골격을 갖는 플라스미드의 HIV-1 유전체 영역의 모식도이다. 도 1A는 pNL4-3의 HIV-1 유전체 영역의 모식도이다. 도 1B는 pTHTK의 HIV-1 유전체 영역의 모식도이다.
- 도 2는 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터 pRBL0213T 및 pTHTN를 나타내는 도면이다. 도 2A는 pRBL0213T 및 pTHTN의 플라스미드 DNA 맵핑을 나타내는 아가로오스 겔 사진이다. 레인 1 : pRBL0213T, *EcoR* I; 레인 2 : pRBL0213T, *Mlu* I + *Xho* I; 레인 3 : pRBL0213T, *Nhe* I; 레인 4 : pTHTN, *EcoR* I; 레인 5 : pTHTN, *Mlu* I + *Xho* I; 레인 M : 1 kb 래더. 도 2B는 pRBL0213T의 HIV-1 유전체 영역의 모식도이다. 도 2C는 pTHTN의 HIV-1 유전체 영역의 모식도이다.
- 도 3은 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터 pRBL001를 나타내는 도면이다. 도 3A는 pRBL001의 플라스미드 DNA 맵핑을 나타내는 아가로오스 겔 사진이다. 레인 1 : pRBL001, *EcoR* I; 레인 2 : pRBL001, *EcoR* I + *Nhe* I; 레인 3 : pRBL001, *Mlu* I + *Xho* I; 레인 4 : pRBL001, *Sal* I; 레인 5 : pRBL0213T, *Nhe* I; 레인 M : 1 kb 래더. 도 3B는 pRBL001의 HIV-1 유전체 영역의 모식도이다. 제한 효소 부위는 RI : *EcoR* I, *Sal* : *Sal* I, *Mlu* : *Mlu* I, *Nhe* : *Nhe* I 및 *Xho* : *Xho* I를 나타낸다.
- 도 4는 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터의 HIV-1 유전체 영역의 모식도이다. 도 4A는 pNL4-3 (HIV-1 야생형)의 HIV-1 유전체 영역의 모식도이다. 도 4B는 HIV-1 인테그라아제에 돌연변이가 있고 HIV-1 바이러스 유전체 DNA의 숙주 유전체에 통합에 결손이 있는 pD64V의 HIV-1 유전체 영역의 모식도이다. 도 4C는 pTHTK의 HIV-1 유전체 영역의 모식도이다. 도 4D는 pTHTN의 HIV-1 유전체 영역의 모식도이다. 도 4E는 hTERT 프로모터의 5' 부분이 결실 있는 pTHTH의 HIV-1 유전체 영역의 모식도이다. 도 4F는 인간 사이토 메갈로 바이러스 (CMV)에서 유래된 프로모터 서열을 갖는 pTHTC의 HIV-1 유전체 영역의 모식도이다.
- 도 5는 LTR-Tag를 검출하기 위한 *Bpm* I 부위의 제작을 나타내는 모식도이다. 도 5A는 pTHTK의 HIV-1 유전체 영역의 5' LTR에서 제작된 신규 *Bpm* I 부위를 나타내는 모식도이다. 도 5B는 HIV-1의 3' LTR에 복사된 *Bpm* I 부위에 인접한 통합 부위 (14 뉴클레오티드)에서 *Bpm* I 제한 효소가 숙주 염색체 DNA를 절단하는 것을 나타내는 모식도이다. 도 5C는 렌티 바이러스 유전체의 말단 구조의 모식도이다.
- 도 6은 결합 매개 PCR(LM-PCR)을 통해 LTR-Tag의 생성을 나타내는 모식도이다.
- 도 7은 LTR-Tag를 검출하기 위한 LM-PCR 겔 사진이다.
- 도 8은 바이러스 RNA의 스플라이싱을 조사한 그림이다. 도 8A 및 B는 1 x TAE 중 2.2 % 아가로오스 겔을 이용한 RT-PCR 반응물 전기영동의 결과를 나타내는 사진이다. 도 8A는 프라이머 5' LTRU5 및 3' NL8960를 이용한 PCR 산물을 나타내는 겔 전기영동 사진이다. 도 8B는 프라이머 5' LTRU5 및 3' NL5850를 이용한 PCR 산물을 나타내는 겔 전기영동 사진이다. 도 8B 오른쪽에 스플라이싱된 RNA 단편 a (E1 + A1 / 3'NL5850), b (E1 + A2 / 3'NL5850), c1 (E1 + E2 + E3 + A3 / 3'NL5850), c2 (E1 + E2 + A3 / 3'NL5850) 및 c3 (E1 + E3 + A3 / 3'NL5850) 밴드의 위치를 나타낸다. 도 8C는 스플라이싱되지 않은 전사를 나타내는 모식도이다. 도 8D는 스플라이싱된 RNA를 나타내는 모식도이다. 도 8D 중 A1 ~ A3는 3' 스플라이스 수용체를 나타내고, E1 ~ E3는 엑손을 나타낸다.

도 9는 p24 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 10은 PTEN 분석에 이용한 플라스미드 벡터의 구성 모식도이다. 도 10A는 PTEN 유전자 형질도입의 대조군으로의 pGL3-1375 (Empt .; 플라스미드 크기 약 7kb)를 나타낸다. 도 10B는 PTEN 유전자 형질도입의 양성 대조군으로의 pcDNA3.1 / CMV-hPTEN (Regul .; 플라스미드 크기 약 7.5 kb)을 나타낸다. 도 10C는 PTEN 유전자 형질도입을 위한 레트로 바이러스 벡터 pRBL016Bn (Retro .; 플라스미드 크기 약 7.9kb)를 나타낸다. 도 10D는 PTEN 유전자 형질도입을 위한 재조합 렌티 바이러스 벡터 pRBL0213T (Lenti .; 플라스미드 크기 약 15kb)를 나타낸다. 벡터의 제한 효소 부위는 : BamH, *Bam*H I; Bgl : *Bgl* II; RI : *Eco*R I; RV, *Eco*R V; Hd3, *Hind* III; Mlu, *Mlu* I; Nco, *Nco* I; Nde, *Nde* I; Sal, *Sal* I; Stu, *Stu* I; 및 Xho, *Xho* I를 나타낸다.

도 11은 플라스미드 벡터로의 일시적인 형질감염에서의 PTEN 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 12는 도 11의 mv 용해물 중 PTEN 활성 대 세포 용해물 중 PTEN 활성의 비율을 나타낸 그래프이다.

도 13은 재조합 렌티바이러스 입자 RBL0213T 감염에 대한 PTEN 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 14는 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터 pRBL0213T로 형질감염된 세포 또는 재조합 렌티 바이러스 입자 RBL0213T로 감염된 세포의 mv 용해물 중 PTEN 활성 대 세포 용해물 중 PTEN 활성의 비율을 나타낸 그래프이다.

도 15은 단백질 또는 내인성 또는 외인성 단백질에 대한 웨스턴 블롯 결과를 나타내는 사진이다. 도 15A 항 Vpu 항체를 사용하여 얻어진 결과를 나타낸다. 도 15B는 항 RT 항체를 사용하여 얻어진 결과를 나타낸다. 도 15C는 항 FEN-1 항체를 사용하여 얻어진 결과를 나타낸다.

도 16은 c-myc-FEN-1이 봉입된 mv에 의한 세포의 내용물의 전달을 나타내는 현미경 사진이다. 도 16A는 항 c-myc 항체 염색된 이미지를 나타낸다. 도 16B는 DAPI 염색된 이미지를 나타낸다. 도 16C는 도 16A 및 도 16B의 중첩된 이미지를 나타낸다. 도 16D는 중첩된 이미지로부터 Photoshop^(R) (Adobe Systems Inc.)의 이미지 "조정" 법의 색 곡선 프로그램에 의해 제작된 이미지를 나타낸다.

도 17은 Lenti-mv2010/CDC6 shRNA의 암세포 증식 억제 효과를 나타내는 그래프이다.

도 18은 세포 단백질 추출물 및 mv 용해물의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타내는 사진이다.

도 19는 각 시험군의 종양에 대한 병리 검사에서 관찰된 전형적인 형태를 보여주는 사진이다. A : 음성 대조군, B : 인터페론 (IFN) α -2b 주입 군, C : Cytomox PTEN 주입군, D : Cytomox p53 주입군.

도 20은 각 시험 군의 종양에 대한 병리 검사에서 관찰된 전형적인 형태를 보여주는 사진이다. A : 저용량 Cytomox EX 주입군, B : 고용량 Cytomox EX 주입 군, C : 저용량 Cytomox HD 주입군, D : 고용량 CytomoxHD 주입군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052]

실시예

[0053]

이하에서, 본 발명은 실시예를 참조하여 더욱 상세하게 설명될 것이다. 그러나, 본 발명의 기술적 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0054]

실시예 1 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터

[0055]

후술될 실시예에서 사용하는 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터는 HIV-1 유전체 DNA 벡터 pNL4-3로부터 유래된다(도 1A 및 도 4A) (Adachi A et al., J. Virol., 1986, p. 284-291). HIV-1 NL4-3 주의 전장 유전체 DNA 서열을 포함하는 재조합 pNL4-3 복제 서열은 Genbank accession No. M19921에서 이용 가능하다 (서열번호 4). 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터 pD64V (도 4B)는 pNL4-3에서 HIV-1 인테그라아제(integrase) 64번 위치의 아스파라긴산을 발린으로 치환시키는 돌연변이를 갖는다. pD64V는 캘리포니아 로스앤젤레스 대학(UCLA) 분자 및 의료 약리학학과(Department of Molecular and Medical Pharmacology)의 Dr. Sam Chow로부터 제공받았다.

[0056]

다른 사용된 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터는 컨스트럭트 pTHTK (도 1B)로부터 제작하였다. pTHTK는 상기 기재된 pNL4-3로부터 유래된다(도 1A 및 B). pTHTK은 제한 효소 Kpn I 및 Bgl II의 처리에 의해 pNL4-3의 HIV-1 유전체 DNA 중 뉴클레오티드 6344 ~ 7611(서열번호 4에 근거; 다르게 표시되지 않는 한 하기 기술에 대해 서로 이와 같다)가 결실되었다. 구부피으로 HIV-1 골격(backbone)의 *Kpn* I (6343 ~ 6348 위치) 및 *Bgl* II (7611 ~ 7616 위치)의 2 개의 부위를 평할 말단(blunt end)하고 다시 결합함으로써, 외피 p120 당단백질을 코딩

하는 HIV-1 외피 유전자가 결실된 pTHTK를 제조하였다. 또한, pTHTK를 오직 하나의 Hpa I 부위 (8648 ~ 8653 위치)에서 절단하고, *Mlu* I 링커 (서열번호 5의 7383 ~ 7674 위치의 뉴클레오티드 서열)를 추가하여 변형시켰다. pTHTK의 HIV-1 유전체 영역 (즉 5' LTR ~ 3' LTR)의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 5로 나타낸다.

[0057] 복제되는 DNA 단편(도입 유전자 발현 카세트)과의 결합을 위해 벡터 pTHTK를 5'-말단 *Mlu* I 부위 및 3' 말단 *Xho* I 부위(8887 ~ 8892 위치)에서 절단하였다. 이 벡터의 *Mlu* I-*Xho* I 부위에 형질도입 유전자 발현 카세트의 삽입은 HIV-1 nef 유전자 개방 판독 프레임(open reading frame)을 파괴한다. nef 유전자에 의해 코딩되는 nef 단백질은 바이러스 감염 및 확산 및 비리온의 세포 외 방출에 관여한다. 따라서 렌티 바이러스 플라스미드 벡터 함유 삽입(즉. nef-결손)은 야생형 HIV-1 NL4-3 주와는 달리 CD4⁺ 세포에 덜 감염성인 바이러스 입자를 제조할 것이다. 대조적으로, VSV /G에서 위형(pseudotype) RBL0213T, RBL001 또는 THTN 등에 대해서는 후술하는 바와 같이, Nef 결손인지 여부에 관계없이, 야생형 NL4-3보다 많은 바이러스 입자가 발아(budding)하였다 (예를 들면, 도 9 참조).

[0058] 상기와 같이 얻어진 pTHTK 골격을 이용하여 다음과 같이 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터를 구축하였다.

[0059] (a) pRBL0213T

[0060] pRBL0213T는 hTERT 유전자 프로모터 (hTERT 프로모터)의 제어하에 인간 PTEN 유전자를 코딩하는 DNA를 삽입한 플라스미드이다 (도 2B).

[0061] 플라스미드 pGL-1375을 hTERT 프로모터의 기원(source)으로 사용하였다 (Takakura et al., Cancer Res., 1999, p. 551-557). pGL-1375은 Dr. Satoru Kyo (일본의 카나자와 대학)에 의해 제공되었다. pGL-1375은 *Mlu* I 및 *Bgl* II 부위에 삽입된 hTERT 프로모터 DNA 단편을 갖는다. hTERT 5' 업스트림(upstream) 서열은 Genbank accession No.AF128893로 이용 가능하다. hTERT 프로모터 DNA 단편을 pGL-1375에서 잘라내어 pTHTK 골격에 삽입하였다.

[0062] 인간 PTEN mRNA 서열은 Genbank accession No. NM_000314로 이용 가능하다 (서열번호 6). pRBL0213T의 구축에 사용된 PTEN 유전자-코딩 DNA는 벡터 pcDNA3.1 / CMV-hPTEN (캘리포니아 로스앤젤레스 대학(UCLA) 분자 의학과의 Dr. Hong Wu로부터 제공)에서 잘라내었다. PTEN 유전자-코딩 DNA를 pTHTK 골격에 더 삽입하여 pRBL0213T를 제작하였다.

[0063] pRBL0213T는 hTERT 프로모터 서열 (서열번호 1), 및 hTERT 유전자 제1 엑손 및 제 2 엑손의 일부를 함유하는 hTERT 전사 영역의 5' 부분 (서열번호 2)으로 이루어진 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열; 및 PTEN 코딩 서열을 포함한다.

[0064] (b) pTHTN

[0065] pTHTN은 hTERT 프로모터의 제어하에 SV40 large T 항원 유전자의 부분 단편이 삽입된 플라스미드이다 (도 2C).

[0066] SV40 large T 항원 유전자의 부분 단편 (서열번호 21)을 pTHTK 골격에 삽입 된 hTERT 프로모터의 다운스트림에 삽입하여 pTHTN를 제작하였다. SV40 large T 항원 유전자를 포함하는 시미안 바이러스(simian virus) 40의 유전체 서열은 Genbank accession No. NC_001669에서 이용 가능하다. pTHTN은 hTERT 프로모터 서열 (서열번호 1), 및 hTERT 유전자의 제1 엑손 및 제2 엑손의 일부를 함유하는 hTERT 전사 영역의 5' 부분 (서열번호 2)으로 이루어진 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열; 및 SV40 large T 항원 유전자의 부분 단편 (서열번호 21; GenBank accession No. NC_001669의 DNA 서열의 뉴클레오티드 5175 (*Hind* III)부터 4863 (*Hae* III)까지)를 포함한다.

[0067] (c) pRBL001

[0068] pRBL001은 hTERT 프로모터의 제어하에 CDC6 shRNA를 코딩하는 DNA가 삽입된 플라스미드(재조합 렌티 바이러스 입자 THTD를 제조하기 위한 플라스미드)이다 (도 3B).

[0069] CDC6 shRNA를 코딩하는 DNA의 구축에 사용된 합성 올리고 뉴클레오티드의 서열을 다음과 같다.

[0070] Cdc6-5-A:

[0071] 5'-GATCCCCAGGCACTTGCTACCAGCAATTCAAGAGATTGCTGGTAGCAAGTGCCTTTTTTGGAAA-3' (서열번호 8)

[0072] Cdc6-3-A:

[0073] 5'-AGCTTTTCCAAAAAGGCACTTGCTACCAGCAATCTCTGAATTGCTGGTAGCAAGTGCCTGGG-3' (서열번호 9)

- [0074] pRBL001의 구축을 위해, 합성 올리고 뉴클레오타이드 Cdc6-5-A 및 Cdc6-3-A를 등몰(equimolar)의 양으로 혼합하고, 변성하고, 및 재-어닐링하여 이중 가닥 올리고 뉴클레오타이드를 제작하였다. 이 이중 가닥 올리고 뉴클레오타이드를 평활 말단 한 후 서브클론 벡터 pBlueScript의 EcoR V 부위에 삽입하였다. DNA 시퀀싱을 수행하여 이중 가닥 CDC6 올리고 뉴클레오타이드가 올바른 서열 및 배향에 삽입된 것을 확인하였다. 얻어진 서브 클론을 Xba I 부위에 직선화하고, 평활 말단하고, 상기 기재된 *Mlu* I 링커를 결합함으로써 변형시켰다. hTERT 프로모터 서열을 포함하는 DNA 단편을 *Mlu* I 및 *Bgl* II에서 상기 pGL3-1375의 소화(digestion)에 의해 얻었고, 이중 가닥 CDC6 올리고 뉴클레오타이드를 갖는 서브 클론 벡터의 *Mlu* I 및 *Bam*H I 부위에 클로닝 하였다. 얻어진 서브 클론에서 hTERT 프로모터 및 이중 가닥 CDC6 올리고 뉴클레오타이드를 함유하는 DNA 단편을 *Mlu* I 및 *Xho* I 이중 소화(double digestion)에 의해 잘라내었다. 얻어진 단편을 정제하고, *Mlu* I 및 *Xho* I로 절단된 pTHTK 골격에 삽입하고, 겔 정제하여 pRBL001를 제작하였다.
- [0075] pRBL001은 hTERT 프로모터 서열 (서열번호 1), 및 hTERT 유전자 제 1 엑손 및 제 2 엑손의 일부를 함유하는 hTERT 전사 영역의 5' 부분 (서열번호 2)으로 이루어진 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열; 및 CDC6 shRNA를 코딩하는 서열 (서열번호 10)을 포함한다. CDC6 shRNA는 CDC6 shRNA의 안티센스 서열 (서열번호 19); 링커 (서열번호 20); 및 안티센스 서열에 상보적인 서열 및 5 염기의 3' 폴리 U 오버행(overhang)으로 이루어진 센스 서열을 포함한다.
- [0076] pRBL001의 전사를 통해 생산되는 인간 CDC6 mRNA-표적 shRNA (CDC6 shRNA)는 RNA 간섭 (RNAi)을 통해 CDC6 mRNA 분해를 특이적으로 유도하여, DNA 복제 개시 인자 CDC6 단백질의 낙다운(knockdown)을 일으킨다. 인간 CDC6 mRNA 서열은 Genbank accession No. NM_001254에서 이용 가능하다. 인간 CDC6 CDS의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 7로 나타낸다. 서열번호 19의 CDC6 shRNA의 안티센스 서열로부터의 가이드 가닥(guide strand)이 CDC6 mRNA에 결합하여 RNAi를 유도한다.
- [0077] (d) pTHTH
- [0078] pTHTH는 5' 부분 (1kb)이 절실된 hTERT 프로모터의 제어하에서 SV40 large T 항원 유전자의 부분 단편이 삽입된 플라스미드이다 (도 4E).
- [0079] pTHTH를 구축하기 위해 5'의 절실 (1kb) 및 루시페라아제 유전자를 갖는 단축(shortened) hTERT 프로모터 서열을 갖는 플라스미드 pGL-378 (Dr. Satoru Kyo, 카나자와 대학, 일본에서 분양)을 *Mlu* I 플러스 *Hind* III에서 절단하여 5' 부분 (1kb)이 절실된 단축 hTERT 프로모터 서열을 포함하는 DNA 단편을 얻었다. 이 DNA 단편을 정제하고 플라스미드 pBluescript의 *Mlu* I과 *Hind* III 부위에 통합하여 플라스미드 pEND-HTPs를 제작하였다. SV40 large T 항원 유전자의 부분 단편 (서열번호 21)을 SV40 유전체 DNA를 갖는 플라스미드 *Hind* III 및 *Hae* III으로 잘라내고, 그것을 pEND-HTPs의 *Hind* III 및 *Hinc* II 부위에 삽입하였다. 이어서, 얻어진 플라스미드 서브 클론을 *Mlu* I 및 *Xho* I으로 절단하고, 5'부분 (1kb)이 절실된 단축 hTERT 프로모터 서열 및 SV40 large T 항원 유전자의 부분 단편을 포함하는 잘라진 DNA 단편을 정제하고, pTHTK의 *Mlu* I 및 *Xho* I 부위에 삽입하여 pTHTH를 제작하였다.
- [0080] pTHTH는 5' 부분 (1kb)이 절실된 hTERT 프로모터 서열, 및 hTERT 유전자의 제1 엑손 및 제2 엑손의 일부를 함유하는 hTERT 전사 영역의 5' 부분 (서열번호 2)으로 이루어진 뉴클레오타이드 서열; 및 SV40 large T 항원 유전자의 부분 단편 (서열번호 21)을 포함한다.
- [0081] (e) pTHTC
- [0082] pTHTC은 인간 사이토 메갈로 바이러스 (CMV) 프로모터의 제어하에서 SV40 large T 항원 유전자의 부분 단편이 삽입된 플라스미드이다 (도 4F).
- [0083] CMV 프로모터를 pTHTK 골격에 삽입하였다. SV40 large T 항원 유전자의 부분 단편 (서열번호 21)을 pTHTK 중 CMV 프로모터의 다운스트림에 삽입하고 pTHTC를 제작하였다.
- [0084] 실시예 2 위형 재조합 렌티 바이러스 입자의 제작
- [0085] 실시예 1에 기재된 HIV-1 env 유전자에 결실을 갖는 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터는 단독으로 감염성 바이러스 입자를 생성할 수 없다. 그러므로, 본 실시예에서는 실시예 1에 기재된 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터와 수 포성 구내염 바이러스 (VSV)의 외피 당단백질 G를 발현하는 플라스미드 pCMV-VSV/G의 인간 태아 신장 293T 세포에서 공형질감염(cotransfection)을 통해 재조합 렌티 바이러스 입자(위형)를 제작하였다. pCMV-VSV/G는 캘리포니아 로스앤젤레스 대학교 (UCLA) 분자 및 의료 약리학과의 Dr. Sam Chow로부터 제공받았다. 구

부피인 실험 절차는 다음과 같다.

- [0086] 1. 플라스미드 DNA 형질감염
- [0087] 15 ml의 DMEM / 고 포도당 (Hyclone, Utah, USA) 완전 배지 (10 % 소 태아 혈청, 100 unit/ml 페니실린과 100 μ g/ml 스트렙토 마이신 (Hyclone, Utah, USA) 첨가)를 T75 플라스크에 첨가하고, 이후에 인간 태아 신장 293T 세포를 접종하였다. 293T 세포를 37 °C에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 증식시키고, 계대 배양하면서 10 개의 T75 플라스크로 증가시켰다.
- [0088] 2 x HEPBS (10 0ml)을 다음과 같이 제조하였다. 1g의 Hepes (산성염) 1.6g NaCl, 0.75 ml의 Na₂HPO₄ (0.25 M) 및 1ml의 KCl (1 M)을 적당량의 ddH₂O에 용해시켰다. 용액의 pH를 NaOH (5 M)를 이용하여 6.9으로 조정하고 그 다음 NaOH (1 M)을 이용하여 7.12 ~ 7.14로 조정하였다. 이 용액에 총 100ml까지 ddH₂O를 첨가하고, 얻어진 용액을 0.22 μ m 구멍 크기의 시린지 필터에 통과시켜 2 x HEPBS를 제조하였다.
- [0089] 다음을 50 ml 튜브에 첨가하였다:
- [0090] (a) 170 μ g의 실시예 1에 기재된 HIV-1 env 유전자 결실을 갖는 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터 및 30 μ g의 pCMV-VSV/G를 함유하는 500 μ l의 플라스미드 DNA 용액,
- [0091] (b) 1,650 μ l의 ddH₂O,
- [0092] (c) 350 μ l의 2 M CaCl₂
- [0093] 용액을 부드럽게 혼합하고, 이후에, 큰 침전물의 형성을 방지하기 위해 온화하게 교반하면서 2,500 μ l의 2 x HEPBS를 그에 적하(dropwise) 첨가하여, 형질감염 혼합물(transinfection mixture)을 제조하였다.
- [0094] 상기 형질감염 혼합물을 함유하는 튜브를 상온에서 20 분간 두었다. 293T 세포를 증식시킨 10 개의 T75 플라스크에서 배지를 버리고, 이어서 12 ml의 신선한 DMEM/고 포도당 완전 배지를 각 플라스크에 추가하였다. 각 플라스크에 500 μ l의 형질감염 혼합물을 천천히 첨가하였다. 세포를 37 °C에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 8 시간 동안 배양하였다.
- [0095] 2. 세포 배양 및 배지의 회수
- [0096] 배지를 버리고 15 ml의 신선한 DMEM/고 포도당 완전 배지를 각 플라스크에 첨가하였다. 세포를 37 °C에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 36 시간 동안 배양하고 배지 (36 시간 후 배지)를 회수하였다. 15 ml의 신선한 DMEM/고 포도당 완전 배지를 각 플라스크에 첨가하였다. 세포를 37 °C에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 추가적인 36 시간 동안 배양하고 배지 (72 시간 후 배지)를 회수하였다. 15 ml의 신선한 DMEM/고 포도당 완전 배지를 각 플라스크에 첨가하였다. 세포를 37 °C에서 5 % CO₂ 인큐베이터에서 24 시간 더 배양하고 배지 (96 시간 후 배지)를 회수하였다. 회수된 배지를 함유하는 각 50 ml 튜브를 3,000 rpm 및 4 °C에서 5 분간 원심 분리하였다.
- [0097] 3. 역가 측정
- [0098] 200 μ l의 배지 상등액을 별도의 튜브에 옮기고, 1 x PBS를 넣어 50 ~ 200 배로 희석하였다. 이 희석된 배지 상등액에 대해 HIV-1 p24 항원 ELISA 분석 키트 (Coulter Inc., Miami, FL, USA)를 이용하여 재조합 렌티 바이러스 입자가 감염된 세포에서 배지 중에 방출된 바이러스 유래 단백질 p24의 양을 측정함으로써 바이러스 입자의 역가를 결정하였다.
- [0099] 4. 정제
- [0100] 상기 "2. 세포 배양 및 배지의 회수"에서 원심 분리하여 회수된 배지 상등액을 250 ml 고속 원심 튜브에 옮겨 9,000 xg 및 4 °C에서 60 분간 원심 분리하였다. 얻어진 상등액을 Vivaspin^(R) 20 (1,000 kDa 분자량 컷오프 (mw. co.)) (Sartorius, NY, USA)를 이용하여 한외여과하고 5 배로 농축하였다. 얻어진 용액에 MMP 용액을 첨가하여 4 °C에서 하룻밤 동안 바이러스 입자를 침전시켰다. MMP 용액 (300 ml)은 90 g의 PEG 8,000 (분자 생물학적 등급) 및 30 ml의 NaCl (UltraPure) (5 M)을 적당량의 ddH₂O에 용해하고; 및 총 300ml까지 이 용액에 ddH₂O를 첨가하여 제조하였다.

- [0101] 바이러스 입자가 침전된 용액을 9,000 xg 및 4 °C에서 30 분간 원심 분리하여 바이러스 입자를 포함하는 펠렛을 형성시켰다. 상등액을 버리고 펠렛을 10 ml의 1 x PBS에 재현탁하여 바이러스 입자를 함유하는 용액을 얻었다.
- [0102] 용액의 앨리퀀트(aliquot) 중 바이러스 입자는 PEG화 된다(Croyle et al., J. Virol. 2004, Vol. 78, p. 912-921). PEG화는 약 10 ml의 바이러스 입자를 포함하는 용액에 0.4 ml의 PEG화 용액 (33 mg/mL mPEG-NHS (메톡시 PEG 숙시니미딜 카르보네이트 NHS, m.w. 10K (NANOCs, USA)), 30 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 500 mM NaCl)을 첨가하고, 상온에서 회전 플랫폼(rotary platform)에서 60 분동안 인큐베이션함으로써 수행된다.
- [0103] PEG화된 또는 PEG화 되지 않은 바이러스 입자를 포함하는 용액을 Slide-A-Lyzer 카세트 (20 kDa mw. co.) (Thermo Scientific, IL, USA)를 이용하여 4 °C에서 1 x PBS에 대해 투석하고, 2 일간 24 시간마다 1 x PBS를 교환하였다. 투석 후 바이러스 입자 용액을 AmiconUltra15 (100 kDa mw. co.) (Millipore, MA, USA)를 이용하여 30 배 농축하였다. 이 농축된 바이러스 입자 용액을 0.45 µm 구멍 크기 시린지 필터에 통과시키고, 얻어진 조제물을 -80 °C에서 보관하였다.
- [0104] 이상의 방법에 의해 위형 재조합 렌티 바이러스 입자를 제조할 수 있었다. 실시예 1에 기재된 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터 pTHTK, pRBL0213T, pTHTN, pRBL001, pTHTH 및 pTHTC로부터 제작된 위형 재조합 렌티 바이러스 입자를 이후의 실시예에서는 각각 THTK, RBL0213T, THTN, THTD, THTH 및 THTC라 한다.
- [0105] 제작된 재조합 렌티 바이러스 입자는 후술하는 바와 같이 다양한 인간 증식 세포 및 비 분열과 분열 세포를 감염시킬 수 있다. 재조합 렌티 바이러스 입자에 의해 감염된 표적 세포는 숙주 염색체 DNA에 결국 통합된 렌티 바이러스 DNA를 합성한다. 그러므로, 얻어진 재조합 렌티 바이러스 입자는 렌티 바이러스 입자로서 사용될 수 있다.
- [0106] 실시예 3 재조합 렌티 바이러스 입자의 감염성 바이러스 입자 생산 능력 연구
- [0107] 결합-매개 PCR (LM-PCR)법에 의해 형성된 LTR-Tag의 검출에 기반하여, pTHTK 유래 위형 재조합 바이러스 입자 THTK가 세포에 감염 후 감염성 바이러스 입자를 생산할 수 있는지 분석하였다.
- [0108] 1. pTHTK의 Bpm I 부위의 제작
- [0109] LM-PCR을 수행하기 위해, pTHTK를 제1 변형하여 HIV-1 유전체 중 신규 Bpm I 부위를 제작하였다 (도 5A). HIV-1 5' LTR 영역에는 세 가지 요소 (U3, R 및 U5)가있다. Bpm I 부위는 pTHTK 중 5' LTR의 U5 요소의 3' 말단에 오버랩 PCR을 통해 제작하였다. Bpm I은 클래스 II S 제한 효소이다. Bpm I는 5'-CTGGAG-3'를 인식한다. Bpm I은 이 5'-CTGGAG-3'를 포함하는 가닥에서 그의 인식 부위의 16 뉴클레오타이드 3'측, 및 다른 가닥에서 인식 부위의 14 뉴클레오타이드 5' 측에서 DNA를 잘라서 2 뉴클레오타이드의 3' 오버행을 생산한다(도 5B).
- [0110] 도 5C에 렌티 바이러스 유전체의 말단 구조를 나타낸다. 렌티 바이러스 RNA는 프로 바이러스 DNA의 5' LTR의 R 요소로부터 3' LTR의 R 요소까지 전사됨으로써 생성된다. 즉, 렌티 바이러스 RNA는 말단에서 5' LTR의 U3 요소 및 3' LTR의 U5 요소를 갖지 않는다. 그러나 렌티 바이러스 RNA가 렌티 바이러스 DNA로 역전사 될 때, 3' LTR의 U3 요소 및 5' LTR의 U5 요소는 각각 5' LTR의 U3 요소 및 3'LTR의 U5 요소에 복사된다. 이후에, 이 렌티 바이러스 DNA는 숙주 유전체에 통합되어 프로 바이러스 DNA를 형성한다.
- [0111] 따라서 pTHTK의 HIV-1 유전체에서 생산된 5' LTR의 U5 요소 중 신규 Bpm I 부위는 감염 세포에서 렌티 바이러스 DNA가 합성될 때 3' LTR의 U5 요소에 복사된다. 이 신규 Bpm I 부위는 THTK 비리온 집합체, 바이러스 입자 감염 및 감염 세포의 프로 바이러스 DNA 통합(integration)에 영향을 미치지 않는다. 이 신규 Bpm I 부위를 갖는 pTHTK 유래 바이러스 입자 THTK가 숙주 세포에 감염되면 3' LTR의 U5 요소 중 말단에서 2 뉴클레오타이드 (5'-CA-3') 떨어진 위치에 복사된 Bpm I 부위를 갖는 프로 바이러스 DNA가 숙주 유전체에 통합된다. 따라서, Bpm I의 처리에 프로 바이러스 DNA의 통합 부위에서 14 뉴클레오타이드 떨어진 위치에서 감염된 세포로부터의 숙주 유전체 DNA가 절단된다 (도 5B).
- [0112] 2. LTR-Tag의 제조
- [0113] HIV-1 Tat 단백질을 발현하는 인간 자궁 경부암 HeLa 세포 (HeLa / tat 세포)를 상기 신규 Bpm I 부위를 갖는 pTHTK에서 실시예 2에 기재된 바와 같이 제작 한 바이러스 입자 THTK를 공인큐베이션(coincubation)에 의해 감염시켰다. HeLa/tat 세포는 캘리포니아 로스앤젤레스 대학교 (UCLA) 분자 및 의료 약리학과의 Dr. Sam Chow으로부터 제공받았다. 감염 3, 5, 10 및 15일 후 HeLa/tat 세포 유래의 숙주 유전체 DNA를 분리하였다. 유전체 DNA에 Kas I 및 Xho I 이중 소화를 수행하였다. 각각의 Kas I (637 ~ 642 위치; 서열번호 4에 근거한다. 이하 같다) 및 Xho I (8887 ~ 8892 위치)는 HIV-1 유전체 중 특유한 부위이다. Kas I 부위는 5' LTR 4 뉴클레오타이드

다운스트림에 위치하고, *Xho* I 부위는 3' LTR의 약 190 뉴클레오타이드 업스트림에 위치한다. *Kas* I 및 *Xho* I 이중 소화는 숙주 유전체 DNA로부터 프로 바이러스를 분리하지만, 프로 바이러스 DNA의 5' LTR 및 3' LTR의 서열은 숙주 유전체 DNA와 함께 남아있다. 또한 *Kas* I 인식 부위는 5' LTR에서 제작된 *Bpm* I 인식 부위 (627 ~ 681 위치)와 그의 16 뉴클레오타이드 다운스트림에서의 *Bpm* I 절단 부위 사이에 위치한다. 따라서 *Kas* I 소화 후 *Bpm* I 소화 해도 5' LTR의 *Bpm* I 부위에 따른 *Bpm* I 소화는 일어나지 않는다.

[0114] 다음으로, 특수한 DNA 신장(extension) 반응을 하기와 같이 수행하였다. 이 반응에서는 3' LTR의 약 100 뉴클레오타이드 업스트림의 서열로부터 유래된 프라이머를 이용하였다. 그러므로, 프로 바이러스 DNA의 3' LTR 및 그 다운스트림의 숙주 유전체 DNA가 현저하게 증폭되어 혼입(contaminating) DNA, 상세하게는 더 업스트림 프로 바이러스 DNA로부터 유래된 DNA의 비율은 크게 감소한다. DNA 신장을 위한 프라이머 B-NLR8950의 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다.

[0115] B-NLR8950 : 5'-B-GTGCCTGGCTAGAAGCACAAAG-3' (서열번호 11)

[0116] 이것은 비오틴 표지된 뉴클레오타이드이며, 서열은 HIV-1 NL4-3 주 유전체 DNA의 8950 ~ 8970 위치의 서열로부터 유래된다. 이 프라이머를 사용하여 하기에 나타낸 바와 같은 DNA 신장 반응을 수행하였다.

[0117] DNA 신장 반응액 :

[0118] B-NLR8950 50 μ M

[0119] *Kas* I + *Xho* I 소화된 숙주 유전체 DNA 10 μ g

[0120] dNTPs 200 μ M

[0121] Taq DNA 중합효소 5 유닛

[0122] 상기 DNA 신장 반응액을 넣은 튜브를 94 °C에서 5 분 동안 55 °C에서 5 분 동안 및 72 °C에서 30 분 동안 인큐베이션하여 DNA 신장 반응을 수행하여 비오틴화 DNA를 얻었다.

[0123] 이 비오틴화 DNA를 스트렙토아비딘 자성 비드(Dynabeads M-280)와의 결합을 통해 다음과 같이 정제하였다: 약 5 pmol의 비오틴화 DNA를 40 pmol의 Dynabeads M-280과 튜브 내에서 혼합하고 상온에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 튜브를 자성 스탠드(magnetic stand)(DynaL MPC stand)에 놓고, 2 분간 두었다. 이후에 TE (pH 8.0) 버퍼로 비드를 세척하였다. 비드의 세척은 1 ml의 TE를 이용하여 수행하였고, 두 번 더 반복하였다. 비드를 2 초 동안 원심 분리하고, 상등액을 버려 비오틴화 DNA를 정제하였다.

[0124] 이후에, 비오틴화 DNA에 *Bpm* I 소화를 수행하였다. 비오틴화 DNA를 37 °C에서 하룻밤 동안 *Bpm* I으로 소화하였다. 소화된 비오틴화 DNA를 Dynabeads M-280을 통해 정제한 후 이중 가닥 올리고 링커와 결합시켰다. 이중 가닥 올리고 링커의 한쪽 끝은 2 뉴클레오타이드의 3' 오버행을 갖고, *Bpm* I 소화 말단과 상보적이다. 이중 가닥 올리고 링커의 다른 말단은 3 뉴클레오타이드의 5' 오버행을 갖고 링커의 자기 결합(self-ligation)을 효과적으로 막는다. 이중 가닥 링커를 구성하는 올리고 뉴클레오타이드 HD-A 및 HD-S (University of California, UCLA의 Dr. Sam Chow로부터 제공받음)의 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다.

[0125] HD-A : 5'-CACGCGTCGCATCATATCTCCAGGTGTGACAG-3' (서열번호 12)

[0126] HD-S : 5'-CCTCTGTACACCTGGAGATATGATGCGACGCGTGNN-3' (서열번호 13)

[0127] HD-S의 3' 말단의 "NN"은 "A", "T", "G"와 "C"의 모든 조합을 나타내는 디제너레이트(degenerate) 서열이다.

[0128] 이중 가닥 올리고 링커와 비오틴화 DNA의 결합은 상온에서 16 시간 동안 수행하였다. 이중 가닥 올리고 링커가 연결된 비오틴화 DNA는 Dynabeads M-280을 통해 정제하였다.

[0129] 3. LTR-Tag 검출

[0130] LTR-Tag를 검출하기 위해 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 반응에서 다음의 프라이머를 사용하였다.

[0131] 정방향 프라이머 BHU5-S2 : 5'-GAGTGCTCAAAGTAGTGGT-3' (서열번호 14)

[0132] 역방향 프라이머 HDA/SBOT : 5'-CTGTCACCTGGAGATATGAT-3' (서열번호 15)

[0133] 정방향 프라이머와 역방향 프라이머의 염기 서열은 각각 HIV-1 유전체 DNA의 9617 ~ 9636 위치 및 이중 가닥 올리고 링커의 한쪽 가닥 HD-S로부터 유래한다.

- [0134] 다음 PCR 반응을 수행하였다: 94 °C, 4 분, 1 사이클; 94 °C, 60 초; 60 °C, 30 초; 72 °C, 90 초; 30 사이클; 이어서 72 °C, 10 분; 4 °C, 1 ~ 12 시간. PCR 반응의 주형 DNA로서 상기 기재된 이중 가닥 올리고 링커가 연결된 비오틴화 DNA를 사용하였다.
- [0135] PCR 후에, 5 µl의 각 반응물을 겔 (2.0 % 아가 로스)에 로딩하고 1 x TAE 중에서 전기영동 하였다. 프로 바이러스 DNA가 숙주 세포 유전체로 통합된 경우, 약 138bp의 PCR 산물 (LTR-Tag)이 검출되었다(도 6).
- [0136] 4. 결과
- [0137] 결과를 도 7에 나타내었다. 검출된 LTR-Tag(양성 LTR-Tag)는 프로 바이러스 DNA가 숙주 세포 유전체에 통합된 것을 나타낸다. 이것은 바이러스가 숙주 세포에 감염된 것을 의미한다. 위형 재조합 렌티 바이러스 입자 THPTK는 양성 LTR-Tag를 나타내었고, 성공적으로 세포에 감염되었음을 보여주었다 (도 7, 감염 후).
- [0138] 다음으로, 감염 세포의 배양 배지를 회수하고 0.45 µm 구멍 크기를 갖는 필터로 여과하고 신선한 배양 세포에 첨가("재감염")하였다. 이들 세포로부터 유전체 DNA를 단리하고, LTR-Tag를 조사하였다. 그 결과, 바이러스 입자는 LTR-Tag를 나타내었고, 이는 세포에 바이러스 입자가 감염되지 않는 것을 나타낸다(도 7, "재감염" 후). 이 결과는 재조합 렌티 바이러스 입자 THPTK가 감염된 세포에서 감염성 바이러스 입자가 생성되지 않았음을 보여주었다. 감염된 세포에서 재조합 렌티 바이러스 입자가 복제 불능인지 시험하는 LM-PCR은 거짓 양성 결과, 즉 HIV-1 서열의 직접 PCR에 의한 오염 없이 정확하였고, 완벽한 재현성을 가졌다.
- [0139] 이상의 결과에서 위형 재조합 렌티 바이러스 입자 THPTK는 세포에 감염하지만, 그 감염 세포에서 감염성 바이러스 입자는 제작되지 않는 것으로 나타났다. 이것은 위형 재조합 렌티 바이러스 입자를 렌티 바이러스 벡터로서 사용하는 본 발명의 미세소포를 제조하는 방법이 감염성 바이러스 입자를 생산하지 않는다는 것을 나타낸다.
- [0140] 실시예 4 누드 마우스에 이식된 인간 종양에의 재조합 렌티 바이러스 입자 THTD의 직접 주입
- [0141] 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조된 위형 재조합 렌티 바이러스 입자 THTD를 누드 마우스에 이식된 인간 유방암 Bcap-37 종양에 직접 주입하는 동물 실험을 수행하였다. 3 주 동안 주 2 회 동물의 종양 병소의 복수의 부위에 THTD (단백질량 : 275 µg)을 주사로 투여하고, 최종 투여 48 시간 후 경추 탈구에 의해 안락사시켰다. 대조군의 동물은 종양 병소에 1 x PBS를 주사하였다. 각 종양의 길이 및 폭 측정은 주사 후 일주일에서 두 번, 표준 캘리퍼스를 사용하여 수행하였다. 동물을 경추 탈구에 의해 안락사시킨 후, 그의 종양을 병리학적 검사를 위해 분리하고, 측정하고, 처리하였다.
- [0142] THTD 처리된 종양의 증식은 대조군 대비 34.70 % 억제되었고, 종양의 평균 무게는 대조군의 것보다 유의하게 적었다 ($p < 0.02$). THTD의 주입은 종양 조직에서 강한 섬유화의 발달을 초래하고 이로 인해 종양 성장이 억제되었다.
- [0143] 이상의 결과에서 위형 재조합 렌티 바이러스 입자 THTD는 마우스 세포를 감염시키고, 바이러스 유전체에 코딩된 CDC6 shRNA가 세포 내에서 생성된 CDC6의 발현을 억제하고 그 결과 종양 성장이 억제된 것으로 나타났다. 이것은 CDC6 shRNA를 포함하는 본 발명의 미세소포가 또한 종양 성장 억제 효과를 갖는 가능성을 나타낸다.
- [0144] 실시예 5 hTERT 프로모터에 의한 바이러스 유전체 RNA 스플라이싱(splicing) 향상
- [0145] 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조된 재조합 바이러스 입자 THTN의 유전자 전사 및 유전자 형질도입 활성을 다른 재조합 렌티 바이러스 입자와 비교하고, RT-PCR 법에 의해 RNA 스플라이싱 활성을 조사하였다(도 8).
- [0146] 1. 바이러스의 감염 및 세포의 회수
- [0147] HIV-1 Tat 단백질을 발현하는 인간 자궁 경부암 HeLa 세포 (HeLa/tat 세포)를 6 웰 플레이트에 약 2×10^5 세포/웰로 접종하고, 3 ml/웰의 DMEM/고 포도당 완전 배지를 첨가하였다. 도립 현미경 관찰하에서 약 80 %의 밀도(confluence)가 되도록 세포를 37 °C 및 5 % CO₂에서 인큐베이터에서 24 시간동안 증식시켰다. 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조된 위형 재조합 렌티 바이러스 입자 THTN, THTH 또는 THTC, 또는 pNL4-3 또는 pD64V의 인간 태아 신장 293T 세포에의 형질감염에 의해 제조된 바이러스 입자 NL4-3 또는 D64V를 HeLa/tat 세포가 증식된 웰(각 렌티 바이러스 입자에 대해 2 개의 웰)에 첨가하여 각 바이러스에 의해 세포를 감염시켰다. 2×10^5 개의 표적 세포 당 400 ng의 p24 바이러스 단백질과 동등한 약 4×10^5 감염 단위를 갖는 바이러스 용액을 각 감염에 사용하였다(감염 다중도 (m.o.i): 1.3).

- [0148] 한편, 모의 감염(mock infection)은 "죽은" THTN 비리온을 갖는 세포의 인큐베이션에 의해 수행하였다. 바이러스가 죽은 것을 확실히 하기 위해 상기 THTN 비리온은 100 °C에서 5 분간 끓여 제조하였다. 상기 "죽은" 바이러스에 의한 모의 감염은 세포에 바이러스 입자의 침입이 전혀 없음을 보증하기 때문에 RT-PCR 분석에서 전사된 바이러스 RNA는 존재하지 않는다.
- [0149] 감염 후 세포를 37 °C에서 5 % CO₂ 인큐베이터에서 8 시간 증식시켰다. 현미경으로 세포를 관찰하고 세포가 건강하고 오염이 보이지 않는 것을 확인하였다. 주의 깊게 배지를 버리고 3 ml/웰의 신선한 DMEM/고 포도당 완전 배지를 세포에 첨가하였다. 세포를 37 °C 및 5 % CO₂에서 인큐베이터에서 48 시간동안 증식시켰다. 그 후 1 x PBS를 이용하여 세포를 3 회 세척하고, 러버 폴리스맨(Rubber Policeman)을 사용하여 웰의 표면으로부터 스크래핑하여 세포를 회수하였다. 15 ml의 저속 원심 튜브에서 세포를 회수하고, 1 x PBS를 총 12 ml까지 첨가하였다. 이후에, 튜브를 3,000 rpm에서 원심 분리하여 세포 펠렛을 형성시켰다. 상등액을 버리고, 세포 펠렛을 드라이아이스 중에서 30 분 동안 동결시켰다.
- [0150] 2. RNA 추출
- [0151] GTC 버퍼를 다음과 같이 준비하였다. 212 g의 구아니딘 티오시아네이트 (mw. 118.16), 2.2 g의 구연산 나트륨 (mw. 294.1) 및 15 ml의 사르코실(sarkosyl)(10 % w/v)을 적당량의 ddH₂O에 용해시키고, 총 300 ml까지 ddH₂O를 첨가하였다(각각 최종 농도 6M, 25 mM 및 0.5 %). 사용 전에 20 ml 당 1.4 ml의 β-머캅토 에탄올을 첨가하여 GTC 버퍼를 제조하였다.
- [0152] 1,000 μl의 GTC 버퍼를 각 튜브의 세포 펠렛에 첨가하였다. 세포를 시린지를 사용하여 18 G1/2 니들에 5번 통과시켜 세포를 균질화하였다.
- [0153] 이후에, 각 튜브에 1,000 μl의 물-포화된 페놀 및 1,000 μl의 클로로포름을 첨가하고, 튜브를 볼텍싱(vortex)하였다. 이후, 각 튜브에 3 ml의 1 M 소듐 아세테이트, pH 5.3을 첨가하고, 튜브를 볼텍싱하고, 9,000xg 및 4 °C에서 10 분간 원심 분리하였다. 형성된 상층 용액을 새로운 50 ml 튜브에 옮기고, 0.6 ~ 1.0 부피의 이소프로판올을 첨가하였다. 튜브를 5 회 인버팅(inverting)함으로써 용액을 혼합하고 상온에서 하룻밤 두었다. 튜브를 30 초간 볼텍싱하였다. 200 ~ 300 μl의 용액을 1.5 ml의 마이크로 튜브에 옮기고, 13,000 rpm 및 4 °C에서 15 분간 원심 분리하여 RNA 펠렛을 형성시켰다. 상등액은 버리고 RNA 펠렛을 1 ml의 75 % 에탄올로 세척하고, 13,000 rpm 및 4 °C에서 5 분간 원심 분리하였다. 상등액은 버리고 RNA 펠렛을 공기 건조시켰다.
- [0154] 3. RT-PCR
- [0155] RNA 펠렛을 10 μl의 ddH₂O에 다시 용해시켰다. cDNA 증폭을 위한 역전사 반응과 PCR (RT-PCR)을 수행하였다. RT-PCR에서는 각 역전사에 대해 200 μg의 RNA를 사용하였다.
- [0156] 역전사 (RT) 반응은 다음과 같이 수행하였다: 10 μl의 DNase I 소화된 RNA (약 200 μg), 1 μl의 10 mM dATP/dCTP/dGTP/dTTP 스택, 1 μl의 RNasein^(R) (30 단위/μl, Promega), 2 μl의 10 x PCR 버퍼, 1μl의 0.1 μg/μl 랜덤 프라이머 (랜덤 헥사머), 1 μl의 50 mM MgCl₂를 부드럽게 혼합하고, 이후에 1 μl의 Mo-MuLV 역전사 효소 (200 단위/μl)를 그에 첨가하고, 2 초 동안 원심 분리하여 튜브 내에서 혼합하였다. 튜브를 상온에서 우선 10 분, 이어서 42 °C에서 60 분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 튜브를 100 °C의 배스(bath)에서 15 분 동안 가열하고, 얼음에 5 분간 냉각하였다. 튜브의 RT 반응액을 4 개의 새로운 튜브로 나누고(각 튜브에 50 μg의 RNA에 대응되는 양으로), 새로운 사용을 위해 -80 °C에서 저장하였다.
- [0157] 다음으로, PCR 반응을 다음과 같이 수행하였다. 2.5 μl 프라이머 5' LTRU5 (20 μM), 2.5 μl 프라이머 3' NL5850 (20 μM) 또는 프라이머 3' NL8960, 5 μl의 RT 반응액, 40 μl의 PCR 혼합물을 혼합하고 PCR 반응용 열 사이클러(thermal cycler)(Applied Biosystems)를 이용하여 다음의 온도 조건에 노출시켰다: 94 °C, 4 분을 포함하는 1 사이클; 94 °C, 60 초, 60 °C, 30 초, 및 72 °C, 90 초를 포함하는 각각의 16 사이클; 이어서 72 °C, 10 분
- [0158] 사용한 프라이머의 염기 서열은 다음과 같다.
- [0159] 프라이머 5' LTRU5 : 5'-TCTGGCTAACTAGGGAACCCACTG-3'(서열번호 16)
- [0160] 프라이머 3' NL5850 : 5'-GCTATGTCGACACCCAATTCTGAA-3'(서열번호 17)

- [0161] 프라이머 3 'NL8960 : 5'-TGTGCTTCTAGCCAGGCACAAGC-3'(서열번호 18)
- [0162] 상기 PCR 혼합물 (6 샘플)은 다음을 혼합하여 최종 용량 240 μ l로 제조하였다:
- [0163] 10 mM dATP/dCTP/dGTP/dTTP 스탁 6 μ l
- [0164] 32P- α -dCTP (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l, GE, USA) 1 μ l
- [0165] 10 x PCR 버퍼 30 μ l
- [0166] Taq DNA 중합 효소 (5 단위/ μ l) 3 μ l
- [0167] ddH₂O 201 μ l
- [0168] PCR 후에, 20 μ l의 각 PCR 반응물에 3 μ l의 DNA 로딩 버퍼를 첨가하였다. 혼합물을 2.2 % 아가로오스 겔에 로딩하고 1 x TAE 중에서 전기영동하였다. 겔을 포장하고, 건조시키고, -80 °C에서 하룻밤 X 선 필름에 노출시켰다. X 선 필름을 현상하고 사진을 촬영하였다. 1 x TAE는 242 g의 Tris Base (분자 생물학적 등급) 57.1 ml의 빙초산 (분자 생물학적 등급) 100 ml의 0.5 M EDTA, pH 8.0 (분자 생물학적 등급)을 적당량의 ddH₂O에 용해시키고; 총 1,000 ml가 될 때까지 ddH₂O를 첨가하여 제조하였고; ddH₂O로 50 배 희석하여 50 x TAE를 제조하였다.
- [0169] 상이한 재조합 렌티 바이러스 입자가 감염된 HeLa/tat 세포에서 이들 입자로부터 유래된 렌티 바이러스 RNA의 스플라이싱을 비교하였다. HIV-1 인테그라아제 결손된 및 그에 의해 HIV-1 프로 바이러스 DNA 통합 결손된 바이러스 입자 D64V를 음성 대조군으로 사용하였다.
- [0170] 4. 결과
- [0171] 프라이머 5' LTRU5 및 3' NL5850를 이용한 PCR 결과를 도 8B에 나타내었다. HIV-1은 다양한 바이러스 mRNA를 형성하도록 결합된 7 개의 주요 스플라이싱된 RNA 단편을 갖는다. 프라이머 5' LTRU5 및 3' NL5850를 사용한 결과, 이들 단편 중 5 개의 주요 PCR 산물이 바이러스 입자가 감염된 모든 시험된 세포에서 검출되었다. 특히 바이러스 유전체 RNA 중에 hTERT 프로모터를 포함하는 바이러스 입자 THTN를 감염시킨 세포에서 매우 높은 RNA 스플라이싱 활성을 나타내었고, 이것은 야생형 NL4-3를 감염시킨 세포의 RNA 스플라이싱 수준보다 적어도 100 배 높았다. 한편, 재조합 렌티 바이러스 입자 THTH (hTERT 프로모터의 5' 부분 (1kb)의 결실) 또는 THTC (CMV 프로모터를 갖는)를 감염시킨 세포에서는 야생형 바이러스 입자 NL4-3를 감염시킨 세포에 비해 RNA 스플라이싱 수준은 증가하지 않았다.
- [0172] 프라이머 5' LTRU5 및 3' NL8960를 이용한 PCR 결과를 도 8A에 나타내었다. 프라이머 5' LTRU5 및 3' NL8960를 이용하여 수득된 PCR 증폭 수준은 렌티 바이러스 입자로부터 유래된 바이러스 유전체 RNA의 양을 나타낸다. 그러나, 프라이머 5' LTRU5 및 3' NL8960를 이용하는 PCR은 효율적으로 PCR 산물을 생성하는데 실패하였고, 매우 약한 신호를 보여 주었다. 바이러스 유전체 RNA 중에 hTERT 프로모터를 포함하는 바이러스 입자 THTN를 감염시킨 세포는 다른 바이러스 입자 (THTH, THTC 또는 NL4-3)를 감염시킨 세포와 동일한 바이러스 유전체 RNA의 수준을 가졌다.
- [0173] 이상의 결과에서 인간 텔로머라아제 역전사 효소 (hTERT) 프로모터를 포함하는 렌티 바이러스 RNA를 갖는 위형 재조합 렌티 바이러스 입자를 감염시킨 세포에서 렌티 바이러스 RNA의 스플라이싱이 강화되고, 이로 인해 형질 도입 유전자 발현이 향상되는 것으로 밝혀졌다.
- [0174] 실시예 6 hTERT 프로모터에 의한 유전자 형질도입 및 발현의 향상
- [0175] 유전자 형질도입 활성에 대한 hTERT 프로모터의 효과를 p24 ELISA 분석에 의해 바이러스 단백질 발현을 지표로서 사용하여 조사하였다.
- [0176] 2×10^6 세포의 농도로 접종된 293T 세포 및 HeLa/tat 세포에 실시예 2에서 제조된 위형 재조합 렌티 바이러스 입자 THTN, THTH 또는 THTC 또는 바이러스 입자 NL4-3 또는 D64V를 감염시켰다(감염 다중도(m.o.i: 1.0). 감염 시, 렌티 바이러스 입자 중의 바이러스 유전체 RNA로부터 바이러스 유전체 DNA가 합성되고, 숙주 세포 유전체에 프로 바이러스 유전체 DNA로서 통합된다. 숙주 유전체로서의 유전자 통합(유전자 형질도입)의 결과로 발현되는 단백질, 예를 들면, p24 바이러스 항원은 배양 배지에 분비될 수 있다. 그러므로, 배지를 회수하고, HIV-1 p24 항원 ELISA 분석 키트 (Coulter Inc., Miami, FL, USA)를 이용하여 배지 중 바이러스 유래 단백질 p24의 양을 측정하여 각 바이러스 입자의 유전자 형질도입 활성을 조사하였다.

- [0177] 먼저, 감염 후 세포 배양 배지를 다른 시점에서 회수하였다. 회수된 배지는 원심 분리하여 세포 과편을 제거 후 1 x PBS 버퍼로 희석하여 p24 분석을 수행하였다. 희석은 일반적으로 1 : 50 ~ 1 : 200으로 하였다. 그 결과, p24의 수준은 감염 후 약 36 시간에서 상승하고, 감염 후 72 시간에 최대에 도달하고, 감염 후 96 시간에서 급격히 하강하였다. 따라서 감염 후 72 시간에 회수한 배지의 평균으로 p24 수준을 나타내었다.
- [0178] 결과를 도 9에 나타내었다. 바이러스 유전체 RNA 중 CMV 프로모터를 포함하는 바이러스 입자 THTC를 감염시킨 293T 세포는 야생형 NL4-3를 감염시킨 293T 세포보다 높은 수준의 p24이 나타났다. 이는 293T 세포에 CMV 프로모터가 유전자 형질도입 및 발현을 활성화하는 것을 나타낸다. 이러한 유전자 형질도입 및 발현의 활성화는 바이러스 유전체 RNA 중 hTERT 프로모터를 포함하고, 실시예 5에 나타낸 바와 같이 활성 RNA 스플라이싱을 나타내는 바이러스 입자 THTN에서 더욱 뚜렷하였다. THTN를 감염시킨 293T 세포에서 p24의 수준은 THTC를 감염시킨 293T 세포에서의 수준을 초과하였다. 대조적으로, hTERT 프로모터 서열의 5' 부분 (1kb)이 결실된 바이러스 입자 THTH를 감염시킨 293T 세포는 야생형 NL4-3를 감염시킨 경우와 p24 수준은 비슷하였다. 또한 유전자 형질도입을 일으키지 않는 D64V에서는 p24가 거의 검출되지 않았던 것으로부터, p24 수준은 유전자 형질도입 및 발현 수준을 반영한다는 것을 증명한다.
- [0179] 다음으로, HeLa/tat 세포를 참조하여, THTC 또는 THTH를 감염시킨 세포에서 생성된 p24 수준은 야생형 NL4-3의 경우와 동일한 정도였다. 바이러스 유전체 RNA 중 hTERT 프로모터를 포함하는 바이러스 입자 THTN를 감염시킨 HeLa/tat 세포에서만 2,500 ng / ml 이상의 p24 수준을 가졌고, 이것은 다른 바이러스 입자의 경우보다 현저히 p24 수준이 높다.
- [0180] 이상의 결과에서 유전자 형질도입 및 발현은 hTERT 프로모터에 의해 향상되고, 이것은 hTERT 프로모터를 포함하는 렌티 바이러스 RNA를 갖는 위형 재조합 렌티 바이러스 입자를 감염시킨 세포에서 바이러스 단백질 발현이 향상되었다는 것으로부터 명백해진다는 것을 알 수 있다.
- [0181] 실시예 7 hTERT 프로모터에 기반한 미세세포의 방출 향상
- [0182] 렌티 바이러스 플라스미드 벡터 pRBL0213T가 도입된 세포, 또는 바이러스 입자 RBL0213T가 감염된 세포에서 PTEN 분석에 의해 결정된 세포 내 또는 미세세포 (mv) 중 형질도입 유전자 PTEN의 활성 값을 지표로서 사용하여 그들의 미세세포 방출을 조사하였다.
- [0183] 1. 플라스미드 DNA 형질감염
- [0184] 1.5 ml의 마이크로 튜브에 200 μ l의 1 μ g / ml pRBL0213T, 50 μ l의 3 M 아세트산 나트륨, pH 5.3을 첨가하고, 이후에 1 ml의 100 % 에탄올을 첨가하였다. 용액을 혼합하고 -80 $^{\circ}$ C에서 60 분 동안 냉각하였다. 이어 튜브를 13,000 rpm에서 15 분간 원심 분리하여 DNA 펠렛을 형성시키고, 상등액을 버렸다. 튜브에 1 ml의 70 % 에탄올을 넣고 13,000 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 상등액을 조심스럽게 버리고 DNA 펠렛을 공기 건조하였다. 500 μ l의 ddH₂O의 첨가에 의해 DNA 펠렛을 용해시키고, pRBL0213T 플라스미드 DNA 용액을 제조하였다. pRBL0213T은 hTERT 프로모터의 제어하에 PTEN 유전자를 갖는 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터이다 (도 10D, Lenti).
- [0185] 또한 플라스미드 pGL3-1375, pcDNA3.1/CMV-hPTEN 및 pRBL016Bn의 플라스미드 DNA 용액을 제조하였다. pGL3-1375 (Takakura et al., Cancer Res., 1999, p. 551-557)은 hTERT 프로모터를 가지나, PTEN 유전자를 갖지 않고, PTEN 분석의 음성 대조군으로 사용하였다 (도 10A, Empt.). pcDNA3.1 / CMV-hPTEN은 일반적인 플라스미드 pcDNA3.1의 CMV 프로모터의 제어하에 PTEN 유전자가 삽입된 플라스미드이고, PTEN 분석의 양성 대조군으로 사용하였다 (도 10B, Regul). pRBL016Bn은 마우스 신경 성장 인자 수용체 (rNGFR) 유전자 프로모터의 제어하에 PTEN 유전자를 갖는 Mo-MLV 레트로 바이러스 플라스미드이다 (도 10C, Retro).
- [0186] 500 μ l의 이들 4 가지 중 하나의 플라스미드 DNA 용액 (20 μ g 플라스미드 DNA), 400 μ l의 ddH₂O 및 75 μ l의 2 M CaCl₂를 50 ml의 새로운 튜브에 첨가하고, 부드럽게 혼합하였다. 이후에, 525 μ l의 2 x HEPBS을 큰 침전물의 형성을 방지하기 위해 부드럽게 교반하면서 적하하여 첨가하였다. 튜브를 상온에 20 분간 두고 형질감염의 혼합물을 얻었다.
- [0187] 실시예 2에 기재된 같이 인간 태아 신장 293T 세포를 증식시킨 T75 플라스크에서 배지를 버리고, 이후에 12 ml의 신선한 DMEM/고 포도당 완전 배지를 각 플라스크에 추가하였다. 각 플라스크에 1,000 μ l의 형질감염 혼합물을 천천히 첨가 세포를 37 $^{\circ}$ C에서 5 % CO₂ 인큐베이터에서 8 시간 동안 배양하여 세포에 각 플라스미드 DNA를 형질감염하였다. 이어 배지를 버리고 각 플라스크에 15 ml의 신선한 DMEM/고 포도당 완전 배지를 첨가하였다.

세포를 37 °C에서 5 % CO₂ 인큐베이터에서 60 시간 동안 배양하였다. 또한 플라스미드 DNA 용액 대신에 물을 사용하여 동일한 절차에 의해 모의 형질감염을 수행하였다.

[0188] 2. 바이러스 입자 RBL0213T 감염

[0189] 실시예 2에 기재된 바와 같이 플라스미드 pRBL0213T를 이용하여 재조합 렌티 바이러스 입자 RBL0213T를 제작하여 PEG화하고, 정제하였다. 얻어진 재조합 렌티 바이러스 입자 RBL0213T를 293T 세포, CEM 세포 또는 HeLa 세포에 감염(m.o.i.:1.3)시켰다. 세포를 12 시간 동안 배양하여 바이러스 입자 RBL0213T를 감염시켰다. 신선한 배지를 그에 첨가하여 세포를 48 시간 동안 증식시켰다.

[0190] 한편, 화학적으로 불활성화된 바이러스 입자는 DMSO (Fluka) 중 100 mM AT-2 (2,2'-디피리딜 디설파이드)(2,2'-dipyridyl disulfide)(알드리티올-2)(aldithiol-2))을 제조하고; 바이러스 입자를 포함하는 용액에 1 mM의 농도로 AT-2를 첨가하고; 4 °C에서 하룻밤 처리하여 제작하였다(Rossio JL, J. Virol. 1998, Vol. 72, p. 7992-8001). AT-2는 비리온 내부 단백질 중 시스테인을 산화하여 역전사 효소의 작용을 저해함으로써 바이러스를 불활성화시키는 시약이다. AT-2 처리에 의해 HIV의 감염 가능성은 제거되지만 바이러스 표면 단백질의 완전성 및 형태는 유지된다.

[0191] 3. 세포 용해물의 제조

[0192] PTEN 분석에서 유리 포스페이트를 함유하는 용액은 높은 백그라운드를 만들기 때문에 바람직하지 않다. 버퍼 및 튜브는 포스페이트-무첨가인 것이 권장된다.

[0193] 상기의 형질감염 후 또는 감염 후 세포를 새로운 50 ml 튜브에 회수하여 3,000 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 세포를 침전시켰다. 후술하는 "4. mv 용해물 제조"에서 사용하기 위해 배지를 새로운 50 ml 튜브에 옮겼다. 침전된 세포를 30 ml의 차가운 1 x PBS로 세척하고, 다시 원심 분리하여 세포를 침전시킨 상등액을 버렸다. 세포 (2 x 10⁶ 세포)에 250 µl의 용해 완충액 (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 mM EDTA, 5 % 글리세롤)을 넣고 주사기를 사용하여 24G 니들에 10 회 통과시킴으로써 세포를 균질한 세포 추출물을 얻었다.

[0194] 세포 추출물을 4 °C에서 회전 플랫폼에서 60 분간 배양하고, 13,000 rpm 및 4 °C에서 20 분간 원심 분리하였다. 상등액 (세포 용해물)을 새로운 튜브에 옮겼다. 5 µl의 세포 용해물을 별도의 튜브에 넣고, 그 다음 1 ml의 Bio-Rad 단백질 분석 용액 (Bio-Rad, USA)를 첨가하고, OD₆₀₀를 측정하였다. 소 혈청 알부민을 표준으로 사용하여 단백질 농도를 결정하였다. 새로운 사용을 위해 나머지 세포 용해물을 -80 °C에서 보관하였다.

[0195] 4. mv 용해물질의 제조

[0196] 상기 기재된 "3. 세포 용해물의 준비"의 50 ml 튜브에 옮겨진 형질감염 또는 감염 후의 배양 배지를 9,000 xg 및 4 °C에서 60 분간 원심 분리하였다. 상등액을 새로운 튜브에 옮겨 Vivaspin^(R) 20 (1,000 kDa mw. co.) (Sartorius, Bohemia, NY, USA)를 이용하여 한외 여과하고, 버퍼를 TBS-D로 교체하였다. TBS-D는 6.5 ml의 1 M Hepes-KOH, pH 7.6, 7 ml의 5 M NaCl 및 0.25 ml의 1 M KCl을 적당량의 ddH₂O과 혼합하고; 총 250 ml까지 ddH₂O를 첨가하고; 및 제조된 TBS 용액에 사용하기 전에 50 ml의 TBS 용액 당 500 µl의 1 M 디티오프레이톨(DTT)을 첨가하여 제조하였다.

[0197] 이처럼 배지에서 조제한 용액 1 ~ 2 ml에 같은 용량의 PEG 8,000/NaCl 용액을 넣고 4 °C에서 회전 플랫폼에서 하룻밤 동안 배양하였다. PEG 8,000/NaCl 용액 (300 ml)은 90 g의 PEG 8,000 및 180 ml의 5 M NaCl을 적당량의 ddH₂O과 혼합하고; 총 300 ml까지 ddH₂O를 첨가(최종 부피)하여 제조하였다.

[0198] 배양된 용액을 13,000 rpm에서 20 분간 원심 분리하여 미세세포 (mv)를 포함 펠렛을 형성시켰다. 상등액은 버리고 65 µl의 용해 완충액 중에 펠렛을 다시 현탁하여 4 °C에서 회전 플랫폼에서 2 시간 동안 배양하여 펠렛을 용해시켰다. 이 용액을 13,000 rpm에서 20 분간 원심 분리하여 상등액 (mv 용해물)을 새로운 튜브에 옮겼다. 5 µl의 mv 용해물을 별도의 튜브에 넣고 OD₆₀₀를 측정하여 단백질 농도를 결정하였다. 새로운 사용을 위해 나머지 mv 용해물을 -80 °C에서 저장하였다.

[0199] 5. PTEN 면역 침강 (IP)

[0200] 70 µl의 세포 용해물 또는 mv 용해물 (500 µg의 단백질을 함유하는) 및 5 µl 마우스 항 PTEN 단클론 항체 (클론 6H2.1, 1 mg / ml, Upstate, USA)을 새로운 튜브에 넣고 최종 용량 100 µl까지 TBS-D를 첨가하여 각 IP 샘플을 제조하였다. IP 샘플을 4 °C에서 회전 플랫폼에서 하룻밤 동안 배양하였다. 이후에 각 IP 샘플에 50 µl

의 미리 세척된 단백질 A-아가로오스 솔루션(Thermo Scientific, Illinois, USA)를 첨가하고 4 °C에서 회전 플랫폼에서 하룻밤 동안 배양하였다. 배양 후, 아가로오스 비드를 1 ml의 TBS-D로 세척하고, 6,500 rpm에서 5 분간 원심 분리하였다. 세척은 세 번 더 반복하였다. 원심 분리 후 상등액을 버리고 아가로오스 비드를 75 µl의 TBS-D에서 다시 현탁하였다. 아가로오스 비드 용액을 더 사용하기 위해 4 °C에서 보관하였다.

[0201] 6. PTEN 분석

[0202] Echelon PTEN 포스파타아제 말라키트 그린 어세이(Echelon PTEN phosphatase malachite green assay)(Echelon Biosciences, Utah, USA)의 부분 변형에 의해 PTEN 분석을 수행하였다. 각 분석에 대해 최종 용량은 원래 용량의 25 µl로부터 100 µl까지 확장하고, 620 nm에서의 흡광도를 Promega GloMax-Multi Jr. reading system (Promega, USA)를 이용하여 측정하였다. 분석은 액체 기질 PtdIns (3,4,5) P3 (Echelon, Utah, USA)를 사용하여 제조자의 설명서에 따라 수행하였다. 각 분석에서 23 µl의 TBS-D 버퍼, 상기 "5. PTEN 면역 침강 (IP)"에서 얻은 70 µl 아가로오스 비드 용액 및 7 µl의 1 mM PtdIns (3,4,5) P3 스타크 용액을 혼합하였다. 혼합물을 37 °C에서 2 시간 동안 배양하였다. 혼합물에 450 µl의 상온의 말라키트 그린 용액 (Echelon, Utah, USA)을 첨가하고 빛으로부터 보호하기 위해 혼합물을 포함하는 튜브를 알루미늄 호일로 덮고 상온에서 30 ~ 60 분 동안 배양하였다. 블랭크(blank)로서 말라카이트 그린 용액을 사용하고, 포스파타아제 백그라운드로서 기질을 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상이한 3 회 형질감염 또는 감염으로부터 PTEN 활성 값을 얻었다. 그 값에서 기질의 활성 값 (백그라운드)을 빼서 얻어진 값의 평균을 얻었다.

[0203] 7. 결과

[0204] 각 플라스미드를 형질감염한 293T 세포에 있어서, PTEN 분석 결과를 도 11에 나타낸다. 세포 용해물에서는 강력한 CMV 프로모터를 이용하여 PTEN 유전자를 전사하는 Regul 벡터를 형질감염한 세포에서 PTEN 활성이 가장 높았다. PTEN 유전자의 전사를 유도하는 rNGFR 프로모터를 포함하는 레트로 벡터의 형질감염의 경우도 PTEN 활성이 높았다. PTEN 유전자의 전사를 유도하는 hTERT 프로모터를 포함하는 렌티 벡터로의 형질감염은 Regul. 및 레트로 벡터와 비교하여 PTEN 활성 값은 중간 정도였다. 한편, mv 용해물에서는 렌티 벡터의 형질감염의 경우에서 Regul. 및 레트로 벡터와 비교하여 PTEN 활성이 가장 높았다.

[0205] 도 12는 도 11에서 나타낸 mv 용해물 중 PTEN 활성 대 세포 용해물 중 PTEN 활성의 비율을 나타낸다. 렌티 벡터의 형질감염에서 mv 용해물 중 PTEN 활성의 비율이 가장 높았다 (27.37 %). 또한 렌티 벡터와 hTERT 프로모터를 이용하여 유전자를 전사하는 PTEN 유전자를 갖지 않는 Empt 벡터의 형질감염에서 mv 용해물 중 Regul. 및 레트로 벡터보다 훨씬 높은 PTEN 활성의 비율을 보여 것은 주목할 만하다. 이러한 결과는 Empt 벡터의 형질감염은 숙주 세포의 내인성 PTEN의 mv 봉입(encapsulation)을 촉진하고, Lenti 벡터의 형질감염은 내인성 및 형질도입 유전자 산물 PTEN의 mv 봉입을 촉진하고 mv의 세포 외 환경으로의 방출을 향상시킨다는 것을 증명한다.

[0206] 또한, 바이러스 입자 RBL0213T를 감염시킨 293T 세포, HeLa 세포 및 CEM 세포에서 PTEN 분석 결과를 도 13에 나타낸다. 입자가 감염성인지 불활성화형 (모의 감염)인지에 관계없이 재조합 렌티 바이러스 입자 RBL0213T로 배양된 세포는 형질감염의 경우보다 더 많은 수의 mv를 방출하였다 (도 13, mv 용해물). 대조적으로, 재조합 렌티 바이러스 입자 RBL0213T를 감염 또는 모의 감염시킨 세포의 세포 용해물은 형질감염의 경우와 동일한 PTEN 활성을 갖는다(도 13, 세포 용해물). 그러나, 바이러스 입자 RBL0213T를 감염시킨 HeLa 세포 용해물에서는 증가된 PTEN 활성이 관찰되었다. 이상에서 재조합 렌티 바이러스 입자 RBL0213T 감염은 렌티 벡터 pRBL0213T의 형질감염과 비교하여 세포 용해물 중과는 달리 mv 용해물 중 PTEN 활성을 증가시키는 경향이 있는 것으로 나타났다. 또한 렌티 바이러스 입자의 감염은 시험된 세포 중 인간 자궁 경부암 HeLa 세포가 많은 수의 형질도입 유전자 산물 PTEN 봉입된 mv를 형성하고 방출하게 하는 것으로 나타났다 (도 13, mv 용해물). 또한 바이러스 입자 RBL0213T의 용액에 대해 PTEN 분석을 실시한 결과, PTEN 활성값은 매우 작았고($OD_{620} = 0.065$), 이것은 PTEN이 바이러스 입자에 거의 포함되지 않는다는 것을 나타낸다.

[0207] 도 14는 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터 pRBL0213T로 형질감염된 293T 세포 또는 재조합 렌티 바이러스 입자 RBL0213T로 감염 혹은 모의 감염된 293T, CEM 및 HeLa 세포의 mv 용해물 중 PTEN 활성 대 세포 용해물 중 PTEN 활성의 비율을 나타낸다. 감염 (Infect) 및 모의 감염 (Mock.)은 모의 감염의 mv 방출의 비특이적 자극을 상쇄한 값을 나타낸다. mv 용해물 중 PTEN 활성 대 세포 용해물 중 PTEN 활성의 비율은 모의 감염시보다 감염시켰고, 이것은 재조합 렌티 바이러스 입자 RBL0213T 감염 세포에서 mv 방출이 향상된 것을 나타낸다. 또한 렌티 벡터로 형질감염된 세포에서 mv 방출 비율은 27.37 %이었다(도 12). 반면 재조합 렌티 바이러스 입자 RBL0213T에 감염된 세포에서 mv 방출 비율은 38.75 %에 달하였고 (도 14), 이것은 재조합 렌티 바이러스 입자 RBL0213T

에 의한 감염이 mv 방출을 더욱 현저하게 촉진한다는 것을 나타낸다.

- [0208] 이상의 결과에서 렌티 바이러스 RNA 중에 hTERT 프로모터를 포함하는 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터로 형질감염한 세포 내에서 많은 양의 미세소포가 생성되고 형질도입 유전자 산물을 갖는 미세소포의 방출이 향상된다는 것을 나타낸다. 이러한 플라스미드를 이용하여 제작된 렌티 바이러스 입자에 감염된 세포는 강하게 향상된 미세소포 방출을 나타낸다는 것을 보여준다.
- [0209] 실시예 8 미세소포의 제조
- [0210] 본 발명의 미세소포 (mv)를 다음과 같이 준비하였다.
- [0211] 1. 플라스미드 DNA 형질감염 또는 바이러스 감염
- [0212] 15 ml의 DMEM/고 포도당 (Hyclone, Utah, USA) 완전 배지 (10 % 소 태아 혈청, 100 단위/ml 페니실린과 100 μ g/ml 스트렙토 마이신 (Hyclone, Utah, USA) 첨가)를 T75 플라스크에 첨가하고, 인간 태아 신장 293T 세포를 접종하였다. 293T 세포를 37 °C에서 5 % CO₂ 인큐베이터에서 증식시켜 계대하면서 10 개의 T75 플라스크로 늘렸다. 293T 세포에 하기의 플라스미드 DNA 형질감염 또는 바이러스 감염 시켰다.
- [0213] (A) 플라스미드 DNA 형질감염
- [0214] 다음을 50 ml 튜브에 추가하였다.
- [0215] (a) 170 μ g의 실시예 1에 기재된 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터 pTHTN 또는 pRBL001을 함유하는 500 μ l의 플라스미드 DNA 용액,
- [0216] (b) 1,650 μ l의 ddH₂O,
- [0217] (c) 350 μ l의 2 M CaCl₂
- [0218] 용액을 부드럽게 혼합하고, 이어서 2,500 μ l의 2 x HEPBS을 큰 침전물의 형성을 방지하도록 온화하게 교반하면서 적하하여 첨가하여 형질감염 혼합물을 제조하였다. 이 형질감염 혼합물을 넣은 튜브를 상온에 20 분간 두었다. 293T 세포를 증식시킨 10 개의 T75 플라스크에서 배지를 버리고, 이어서 12 ml의 신선한 DMEM/고 포도당 완전 배지를 각 플라스크에 추가하였다. 각 플라스크에 500 μ l의 형질감염 혼합물을 천천히 첨가하고, 세포를 37 °C에서 5 % CO₂ 인큐베이터에서 8 시간 동안 배양하였다.
- [0219] (B) 바이러스 감염
- [0220] 293T 세포를 실시예 2에 기재된 바와 같이 제작된 위형 재조합 렌티 바이러스 입자 THTN 또는 THTD와 37 °C에서 5 % CO₂ 인큐베이터에서 16 시간 동안 공배양하여 감염시켰다(감염 다중성: 0.3 ~ 0.4).
- [0221] 2. 세포 배양 및 배지의 회수
- [0222] 배지를 버리고 15 ml의 신선한 DMEM/고 포도당 완전 배지를 각 플라스크에 추가하였다. 세포를 37 °C에서 5 % CO₂ 인큐베이터에서 60 시간 동안 배양하여 배지를 회수하였다.
- [0223] 3. 정제
- [0224] 회수된 배지를 함유하는 50 ml 튜브를 3,000 rpm 및 4 °C에서 5 분간 원심 분리하였다. 이와 같이 원심 분리한 배지 상등액을 250 ml 고속 원심 관에 옮겨 9,000 xg 및 4 °C에서 60 분간 원심 분리하였다. 얻어진 상등액을 Vivaspin^(R) 20 (1,000 kDa 분자량 컷오프 (mw. co.)) (Sartorius, NY, USA)를 이용하여 한외 여과하고 5 배로 농축하였다. 얻어진 용액에 MMP 용액을 첨가하여 4 °C에서 하룻밤 동안 mv를 침전시켰다.
- [0225] mv를 침전시킨 용액을 9,000 xg 및 4 °C에서 30 분간 원심 분리하여 mv를 포함한 펠렛을 형성시켰다. 상등액은 버리고 펠렛을 10 ml의 1 x PBS에 재현탁하고, mv를 포함하는 용액을 얻었다.
- [0226] mv 중 용액의 일부(aliquot)를 PEG화 하였다(Croyle et al., J. Virol. 2004, Vol. 78, p. 912-921). PEG화는 약 10 ml의 mv를 포함하는 용액에 0.4 ml의 PEG화 용액 (33 mg/mL mPEG-NHS (메톡시화 PEG 숙시니미딜 카르보네이트 NHS, mw 10K (NANOCs, USA)) 30 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 500 mM NaCl)을 첨가하고, 혼합물을 상온에서 회전 플랫폼에서 60 분 동안 배양하여 수행하였다.

- [0227] PEG화된 또는 PEG화되지 않은 mv를 포함한 용액을 Slide-A-Lyzer 카세트 (20 kDa mw. co.) (Thermo Scientific, IL, USA)를 이용하여 4 °C에서 1 x PBS에 대해 투석하고, 2일 동안 24 시간마다 1 x PBS를 신선한 것으로 대체하였다. 투석 후 mv 용액을 AmiconUltra15 (100 kDa mw. co.) (Millipore, MA, USA)를 이용하여 30 배 농축하였다. 이 농축된 mv 용액을 0.45 µm 구멍 크기 시린지 필터에 통과시켜 얻은 조제물을 -80 °C에서 보관하였다.
- [0228] 이상의 방법에 의해 형질도입 유전자 산물로서 SV40 large T 항원의 부분 단편을 갖는 미세세포 Lenti-mv2010를 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터 pTHTN 또는 위형 재조합 렌티 바이러스 입자 THTN을 사용하여 제조하였다. 또한 형질도입 유전자 산물 CDC6 shRNA를 갖는 미세세포 Lenti-mv2010/CDC6 shRNA를 재조합 렌티 바이러스 플라스미드 벡터 pRBL001 또는 위형 재조합 렌티 바이러스 입자 THTD를 사용하여 제조하였다.
- [0229] 실시예 9 미세세포 중 함유된 단백질의 검출
- [0230] 본 실시예에서는 미세세포에 함유된 단백질을 조사하였다. 또한 미세세포-매개 물질의 세포에의 전달을 조사하였다.
- [0231] 인간 태아 신장 293T 세포를 N 말단 c-myc 태그된 DNA 플랩 엔도뉴클레아제(flap endonuclease) 1 (c-myc-FEN-1)을 발현하는 플라스미드 (pcDNA3.1 골격)로 형질감염시켜 c-myc 태그된 FEN-1을 이소성(ectopically)으로 발현시켰다. FEN-1은 HIV-1 바이러스 유전체 DNA의 성숙과 숙주 유전체와의 통합에 중요한 세포성 도움 인자로서 기능을 하는 것으로 알려졌다. 실시예 8에 기재된 바와 같이 제작된 바이러스 입자 THTN 감염된 세포로부터 유래된 미세세포 Lenti-mv2010를 상기 c-myc-FEN-1 발현 플라스미드로 형질감염된 293T 세포의 일부 또는 형질감염되지 않은 293T 세포와 공동 배양하였다. 배양 60 시간 후 세포에서 핵 및 세포질 추출물을 제조하였다. 또한 세포 배양 배지를 회수하고 실시예 8의 "3. 정제"에 기재된 방법 (단 PEG화 제외)에 의해 mv를 제조하였다. 얻어진 핵 및 세포질 추출물, 및 mv를 웨스턴 블롯으로 분석하였다.
- [0232] 항 HIV-1 Vpu 항체를 사용하여 Vpu 단백질을 검출한 결과를 도 15A에 나타낸다. Vpu 단백질은 c-myc-FEN-1 발현 플라스미드로 형질감염한 후 Lenti-mv2010와 공동 배양된 293T 세포의 세포질 추출물 및 그 세포에서 방출된 mv 중에 검출되었다(도 15A, THTN). 그러나, c-myc-FEN-1 발현 플라스미드로 형질감염했지만 Lenti-mv2010와 공동 배양하지 않은 293T 세포에서는 발견되지 않았다 (도 15A, pcDNA3.1). Vpu는 비리온의 세포막에의 테세린(Tetherin)-또는 CD317-매개 부착을 억제하여, HIV-1 비리온의 방출을 강화하는 단백질이다(Sauter et al., Cell, 2010, Vol. 141, p. 392-398). 이것은, 재조합 렌티 바이러스 입자 THTN를 감염시킨 293T 세포로부터 유래된 미세세포 Lenti-mv2010는 바이러스 단백질 Vpu를 포함하고; 내용물이 미세세포를 통해 다른 세포로 전달되고; 전달받은 세포로부터 방출된 미세세포가 Vpu 단백질을 또한 포함하였다는 것을 나타낸다.
- [0233] 항 HIV-1 역전사 효소 (RT) 항체를 이용하여 RT 단백질을 검출한 결과를 도 15B에 나타낸다. RT 단백질은 재조합 렌티 바이러스 입자 THTN를 감염시킨 293T 세포로부터 유래된 미세세포 Lenti-mv2010에서 검출되었다 (도 15B, Lenti-mv2010). 그러나, RT 단백질은 AT-2에 의해 화학적으로 불활성화된 바이러스 입자 THTN로 모의 감염시킨 293T 세포로부터 유래된 mv에서 발견되지 않았다 (도 15B, Mock). 또한 RT 단백질은 c-myc-FEN-1 발현 플라스미드로 형질감염된 후 Lenti-mv2010와 배양된 세포의 세포질 추출물 (도 15B, THTN- 세포질) 및 이 세포로부터 제조된 mv (도 15B, THTN-mv)에서 발견되었다. 그러나 RT 단백질은 c-myc-FEN-1 발현 플라스미드 fh 형질감염했지만 Lenti-mv2010와 공동 배양되지 않은 293T 세포로부터 제조된 mv (도 15B, mv / pcDNA3.1) 및 처리되지 않은 293T 세포 (도 15B, 293T)에서 발견되지 않았다. 이것은, 재조합 렌티 바이러스 입자 THTN를 감염시킨 293T 세포로부터 유래된 미세세포 Lenti-mv2010는 바이러스 단백질 RT를 포함하고; 내용물이 미세세포를 통해 다른 세포로 전달되고; 및 전달받은 세포로부터 방출된 미세세포가 RT 단백질을 또한 포함하였다는 것을 나타낸다.
- [0234] 항 FEN-1 항체를 이용하여 내인성 FEN-1 및 외인성 FEN-1을 검출한 결과를 도 15C에 나타낸다. 내인성 FEN-1 및 외인성 FEN-1 (즉 c-myc-FEN-1)은 c-myc-FEN-1 발현 플라스미드로 형질감염한 후 Lenti-mv2010와 공동 배양한 293T 세포로부터 제조된 핵 및 세포질에서 검출되고, 그 세포로부터 방출된 mv에서 검출되었다 (도 15C, THTN / FEN-1). Lenti-mv2010와 공동 배양했지만, c-myc-FEN-1 발현 플라스미드로 형질감염되지 않은 293T 세포에 대해서, 오직 내인성 FEN-1만이 핵, 및 세포질, 및 그 세포로부터 방출된 mv에서 검출되었다 (도 15C, THTN). 이것은 세포 내인성 단백질 (FEN-1) 및 외인성 단백질 (c-myc-FEN-1) 둘 모두가 미세세포에 봉입되었다는 것을 나타낸다.
- [0235] 이상의 결과에서 세포 내에서, 아마도 바이러스 단백질 Vpu 및 엔도솜 선별 복합체 (ESCRT)라는 세포 단백질 수

송 시스템의 도움으로 바이러스 단백질 및 다른 세포-내인성 및 외인성 단백질이 미세소포에 봉입되었다는 것을 알 수 있다. 또한, 미세소포에 봉입된 내용물은 다른 세포에 전달될 수 있다는 것을 증명한다.

- [0236] 실시예 10
- [0237] 미세소포를 통한 물질 전달
- [0238] 정제된 PEG화 mv를 통한 물질 전달 (유전자)을 배양 세포를 사용하여 조사하였다.
- [0239] 세포로 c-myc-FEN-1 발현 플라스미드로 형질감염한 293T 세포를 이용하는 것을 제외하고는 실시예 8에 기재된 THTN 감염에 의한 미세소포의 제조 방법에 따라 c-myc-FEN-1이 봉입된 PEG화 미세소포 Lenti-mv2010/c-myc-FEN-1을 제조하였다. Lenti-mv2010/c-myc-FEN-1을 공배양에 의해 인간 자궁 경부암 HeLa 세포에 도입하였다. 공배양된 HeLa 세포를 항 c-myc 항체를 이용하여 간접 면역형광 염색에 제공하였다.
- [0240] 결과를 도 16에 나타낸다. 도 16A는 항 c-myc 항체 염색된 이미지를 나타낸다. 도 16B는 DAPI 염색된 이미지를 나타낸다. 도 16C는 도 16A 및 도 16B의 이미지를 중첩시킨 이미지를 나타낸다. 도 16D는 이 중첩된 이미지로부터 Photoshop (R) (Adobe Systems Inc.)의 이미지 "조정"법의 색 곡선 프로그램에 의해 제작된 이미지를 나타낸다. 도 16D에서, 적색이 짙어지면서 c-myc-FEN-1 수준이 증가하고 황록색은 c-myc-FEN-1이 없는 것을 나타낸다. c-myc-FEN-1을 발현하는 다수의 적색 세포가 도 16D에 나타나고, 이것은 Lenti-mv2010/c-myc-FEN-1의 공배양의 결과에 의해 많은 수의 세포에 c-myc-FEN1이 전달된 것을 나타낸다. PEG화 미세소포는 매우 안정하고, 활성이기 때문에 많은 세포에 채워지고, 미세소포에 봉입된 내용물을 다른 세포에 전달 할 수 있는 것으로 나타났다.
- [0241] 실시예 11 CDC6 shRNA를 담지하는 미세소포에 의한 암세포 증식 억제
- [0242] CDC6 shRNA를 담지하는 미세소포 (Lenti-mv2010/CDC6 shRNA)의 암세포 증식 억제 효과를 시험하였다.
- [0243] 인간 유방암 MCF7 세포, 인간 신경 모세포종 LA-N-2 세포 및 신경 모세포종 KANR 세포를 실시예 8에 기재된 바와 같이 제조된 CDC6 shRNA를 담지하는 미세소포 Lenti-mv2010/CDC6 shRNA로 개별적으로 배양하였다. 대조군으로는 실시예 8에 기재된 바와 같이 제조된 SV40 large T 항원의 부분 단편을 담지하는 미세소포 Lenti-mv2010를 사용하였다. 이어서, MTT Cell Viability and Proliferation Assay Kit (ScienCell, USA)에 의해 세포의 증식을 조사하였다. 이 분석은 살아있는 세포에서 환원된 기질의 흡광도를 지표로 배양 세포의 증식을 정량화한다.
- [0244] 결과를 도 17에 나타낸다. 가로축은 1 세포 당 배양된 mv 수를 나타내고, 세로축은 얻어진 흡광도 값 대 mv 배양의 부재에서 얻어진 흡광도 값의 비율 (증식 인덱스)를 나타낸다. MCF7 세포와 LA-N-2 세포는 Lenti-mv2010/CDC6 shRNA로의 배양에 의해 증식이 현저하게 억제되었지만, Lenti-mv2010 (대조군)으로의 배양에 의해 증식은 억제되지 않았다 (도 17). 한편, KANR 세포는 Lenti-mv2010/CDC6 shRNA로의 배양에 의해 증식이 저해되지 않았다. MCF7 세포와 LA-N-2 세포에서 증가된 CDC6 발현이 나타났지만, KANR 세포에서 CDC6 발현이 거의 검출되지 않았다. 이것은 미세소포에 포함된 CDC6 shRNA가 CDC6 낙다운 시켜, 암세포의 증식 저해를 초래했다는 것을 나타낸다.
- [0245] 이상의 결과에서 CDC6 shRNA를 담지하는 미세소포는 CDC6을 발현하는 암세포에 CDC6 shRNA를 전달하고 그 증식을 억제할 수 있는 것으로 나타났다.
- [0246] 실시예 12
- [0247] CDC6 shRNA를 담지하는 미세소포에 의한 암세포 증식 억제의 분자 메커니즘
- [0248] Lenti-mv2010/CDC6 shRNA 의한 암세포 증식 억제의 분자 메커니즘을 조사하였다. 높은 수준의 CDC6 단백질은 인간 암의 발암 활성과 관련이 있고 CDC6와 종양 억제 인자 p16INK4a 단백질 수준은 반비례 관계가 있는 것으로 알려져있다 (Gonzalez, S. et al., Nature, 2006, p. 702-706). MCF7 세포의 세포주기 진행은 p16INK4a의 존재 하에서도 저해되지 않는다. 이것은 암세포의 p16INK4a-Rb 경로의 불활성화를 나타낸다. 그러나 p16INK4a-Rb 경로는 Lenti-mv2010/CDC6 shRNA를 통한 CDC6 낙다운에 의해 MCF7 암세포에서 다시 활성화될 수 있다. 따라서, p16INK4a-Rb 경로의 재활성화를 알아보기 위해 비 방사성 면역 침강 키나아제 분석을 수행하였다. CDC6는 CDK4 키나아제 복합물에서 발견되며, Rb-C 인산화에 요구된다.
- [0249] MCF7 세포를 Lenti-mv2010/CDC6 shRNA와 배양하여 CDC6를 제거(낙다운)하였다. 그 결과, Rb-C 인산화가 억제되었다. CDC6 낙다운은 적어도 25 배 p16INK4a의 CDK 억제 활성을 증가시켰다. 이것은 p16INK4a-Rb 경로의 재활성화를 나타낸다.

- [0250] 이상의 결과에서 CDC6 shRNA를 담지하는 미세세포는 암세포에서 CDC6를 낮추는시키고, p16INK4a-Rb 경로를 재활성화하여 암세포 증식 억제 기능을 한다는 것을 알 수 있다.
- [0251] 실시예 13
- [0252] 웨스턴 블롯 분석
- [0253] 본 실시예에서는 PTEN 코딩 벡터로 형질감염된 세포의 단백질 추출물과 세포를 배양하여 얻은 미세세포의 추출물에서 PTEN 단백질을 웨스턴 블롯 분석을 통해 검출하였다. 벡터로는 실시예 7 및 도 10에 기재된 플라스미드 벡터 pGL3-1375, pcDNA3.1/CMV-hPTEN, pRBL016Bn 및 pRBL0213T, 및 실시예 2 및 7에 기재된 렌티 바이러스 입자 벡터 RBL0213T를 사용하였다.
- [0254] 1. 단백질 추출물의 제조
- [0255] 약 1×10^6 개의 293T 세포에 대해 상기 기재된 각종 플라스미드 벡터를 형질감염하였다. 형질감염 60 시간 후, 실시예 7의 "3. 세포 용해물의 제조"의 설명대로 세포를 회수하여 펠렛화하여 균질화하고 상등액을 회수하고 세포 단백질 추출물을 제조하였다.
- [0256] 또한 형질감염 60 시간 후 배지를 회수하고 실시예 7의 "4. mv 용해물의 제조"에 기재된 바와 같이 그로부터 미세세포 용해물을 제조하였다.
- [0257] 또한 렌티 바이러스 입자 벡터 RBL0213T를 실시예 7의 "2. 바이러스 입자 RBL0213T 감염"에 기재된 바와 같이, 완전 DMEM 배지 25 mL 중 0.3 m.o.i로 약 1×10^6 개의 293T 세포에 감염시켰다. 60 시간의 감염 후, 실시예 7의 "3. 세포 용해물의 제조"에 기재된 바와 같이 세포 단백질 추출물을 제조하였다. 또한 60 시간의 감염 후 배지를 회수하고, 실시예 7의 "4. mv 용해물의 제조"에 기재된 바와 같이 그로부터 미세세포 용해물을 제조하였다.
- [0258] 얻어진 세포 단백질 추출물 (단백질 약 20 μ g) 또는 미세세포 용해물 (단백질 약 50 μ g)을 2 x SDS 로딩 버퍼 (4 % SDS, 250 mM Tris-HCl, pH6.8, 3 % β -머캅토에탄올, 15 % 글리세롤, 0.05 % 브로모 페놀 블루)와 혼합하고 끓는 배스에서 15 분간 배양하였다. 이후에, 그 단백질 샘플을 12 % SDS-PAGE 겔 (Precise™ Protein Gel)에서 Thermo Scientific Owl Model P82 Minigel Protein Electrophoresis System을 이용하여 전기 영동에 의해 분리하였다. 전기 영동 후 겔에서 단백질을 PVDF 멤브레인에 옮기고, 마우스 항 PTEN 단클론 항체 (일차 항체; 클론 6H2.1, MilliPore)로 프루브하고, 이어서 염소 항 마우스 이차 항체 (1 : 5,000 희석 MilliPore)를 사용하여 PTEN 단백질을 발현하였다.
- [0259] 세포 단백질 추출물 (레인 1 ~ 5) 및 미세세포 용해물 (레인 6 ~ 10)의 검출 결과를 도 18에 나타낸다. 레인 1과 6은 pGL3-1375 (Empt)로 형질감염한 세포를 나타낸다. 레인 2와 7은 pcDNA3.1 / CMV-hPTEN (Regul)로 형질감염한 세포를 나타낸다. 레인 3과 8은 pRBL016Bn (Retro)로 형질감염한 세포를 나타낸다. 레인 4와 9는 pRBL0213T (Lenti)로 형질감염한 세포를 나타낸다. 레인 5와 10은 RBL0213T로 감염된 세포를 나타낸다.
- [0260] 내인성 PTEN이 검출되었고(레인 1 및 6), 및 세포 단백질 추출물 (레인 2-5) 및 미세세포 용해물 (레인 7-10)에서 형질도입 유전자 산물 PTEN이 검출되었다. 이 결과는 형질도입 유전자 산물 PTEN이 생성되었고, 미세세포로 봉입되고, 미세세포(유전 공학으로 제작된 미세세포)가 세포로부터 방출된 것을 나타낸다.
- [0261] Regul., Retro. 또는 Lenti. 형질감염된 세포로부터 제조된 형질도입 유전자 산물 PTEN 수준 (레인 2-4)은 Empt. 형질감염된 세포로부터 제조된 것(레인 1)에 비해 2 ~ 3 배 증가하였다. 또한 RBL0213T 렌티바이러스 벡터에 감염된 세포로부터 제조된 형질도입 유전자 산물 PTEN 수준 (레인 5)은 내인성 PTEN 수준 (레인 1)을 훨씬 웃돌았다.
- [0262] 또한 RBL0213T 렌티바이러스 벡터 감염 세포를 이용하여 제조된 미세세포 용해물 중의 형질도입 유전자 산물 PTEN 수준 (레인 10)은 Empt., Regul., Retro, Lenti. 형질감염된 세포로부터 제조된 미세세포 용해물 중의 형질도입 유전자 산물 PTEN 수준 (레인 6-9)과 비교하여 명확하게 증가하였다. 이것은 본 발명에 따른 바이러스 입자-유사 렌티 바이러스 벡터에 의한 감염이 형질도입 유전자 산물을 갖는 미세세포의 생성과 방출의 촉진에 매우 적합하다는 것을 보여주고 있다.
- [0263] 실시예 14
- [0264] 유전자 공학적 미세세포의 종양 성장 억제에 대한 효과

- [0265] 본 실시예에서는 종양 억제 유전자 산물을 담지하는 유전자 공학적 미세세포 (여기에서는 Cytomox라고도 함)를 종양에 직접 주입함으로써 그 미세세포의 종양 성장 억제 효과를 조사하였다.
- [0266] 1. 시험 시료의 준비
- [0267] 다음 시험 시료를 종양 내 주입에 사용하였다.
- [0268] i) Cytomox HD (emvp 130001)
- [0269] 실시예 7의 "4. mv 용해물의 제조" 및 실시예 8에 따라 인간 태아 신장 293T 세포를 렌티 바이러스 벡터 pRBL001 및 pRBL0203 모두에 의해 형질감염하여 배양 한 세포를 침전시켜 배지를 회수하고, 미세세포를 제조하였다. 미세세포를 Cytomox HD라고 칭하였다. 렌티바이러스 벡터 pRBL001은 실시예 1에 기재되어 있으며, 여기에서는 CDC6 shRNA를 생성하기 위한 벡터로 사용하였다. 렌티바이러스 벡터 pRBL0203은 pTHTK 골격 중 hTERT 프로모터의 제어하에 삽입된 인간 p16^{INK4a} 유전자를 포함하는 플라스미드이고, 실시예 1과 유사하게 제작하였다. 구부피으로는 p16INK4a cDNA를 갖는 플라스미드 컨스트럭트인 pCMV p16INK4a (Plasmid 10916; 서열번호 25; Medema et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US A. (1995) 92 (14) : 6289- 6293)를 *EcoR* I과 *Xho* I으로 절단하고, 얻어진 단편 (약 0.45 kb의 p16 cDNA)을 pGL3-1375로부터의 1.5 kb hTERT 프로모터가 *Mlu* I-*BamH* I 부위에 클로닝된, pEND-HTP1의 *Hind* III-*Xho* I 부위에 서브클로닝하였다. hTERT 프로모터 및 그 다운스트림의 p16INK4a cDNA를 포함하는 DNA 단편을 *Mlu* I 및 *Xho* I으로 절단하고, 그 2.0 kb 단편을 pTHTK 골격에 삽입하여 벡터 pRBL0203를 제작하였다.
- [0270] ii) Cytomox p53 (emvp 130003)
- [0271] 실시예 8에 따라, 인간 태아 신장 293T 세포를 벡터 pGLQ-p53EX로 형질감염하고, 배양된 세포를 침전시켜 배지를 회수하고, 미세세포를 제조하였다. 벡터 pGLQ-p53EX은 인간 p53 유전자 (서열번호 26; GenBank accession no. BC003596의 CDS)을 포함하는 플라스미드 발현 벡터이다. 구부피으로는 p53 cDNA를 갖는 플라스미드 pBSH19로부터의 약 2.0 kb 인간 p53 종양 억제 인자 cDNA를 갖는 서브 클론 벡터 pBS-TP53PU를 *Hind* III에 의해 그 3' 말단에서 직선화하였다. 생성된 *Hind* III 부위를 평활(blunted)하고, 이어서 벡터의 *Sal* I 소화하였다. 그 골격을 정제하고 pGL3-378에서 분리된 약 0.3 kb의 DNA 단편 (평활 말단 *Xba* I 및 *Sal* I 말단을 갖는)과 결합시켜 pBS-TP53PA를 형성하였다. p53 cDNA 단편을 pBS-TP53PA에서 *Stu* I 및 *Sal* I으로 절단하고, pGL3-378 벡터에 평활 말단 *Xba* I-*Sal* I 부위에서 삽입하여 pGLQ-3UTR을 형성하였다. 약 1.4 kb의 p53 cDNA (인간 p53 유전자의 코딩 영역 전체를 포함)를 다른 서브 클론 벡터 pUTK-p53TT로부터 *Hind* III와 *Xho* I으로 절단하고, pGLQ-3UTR에 삽입하여 pGLQ-p53EX를 제작하였다.
- [0272] iii) Cytomox PTEN (emvp 130006)
- [0273] 실시예 7의 "4. mv 용해물의 제조" 및 실시예 8에 따라 인간 태아 신장 293T 세포를 렌티 바이러스 벡터 pRBL0213T로 형질감염하고, 배양한 세포를 침전시켜 배지를 회수하고, 미세세포를 제조하였다. 미세세포를 Cytomox PTEN라고 명명하였다. 렌티 바이러스 벡터 pRBL0213T은 실시예 1에 기재되어 있으며, 여기에서는 인간 PTEN 단백질을 생성하기 위한 벡터로 사용하였다.
- [0274] iv) Cytomox EX (T 130075)
- [0275] 실시예 2에 기재된 바와 같이 플라스미드 pRBL001 및 pRBL0203에 의해 재조합 렌티 바이러스 입자 RBL001 및 RBL0203를 제작하였다. 실시예 7의 "4. mv 용해물의 제조" 및 실시예 8에 따라, 이 렌티 바이러스 입자를 인간 태아 신장 293T 세포에 감염시키고, 감염된 세포를 침전시켜 배지를 회수하고 미세세포를 제조하였다. 구부피으로는 세포에 실시예 8에 기재된 같이 렌티바이러스 벡터 RBL001 및 RBL0203 모두를 형질감염하고, 감염 60 시간 후, 배지를 회수하고 원심 분리하여 세포 파편을 제거하였다. 배지에 9,000 g, 4 °C에서 60 분간 고속 원심분리를 수행하였다. 미세세포를 정제하기 위해 실시예 8에 기재된 바와 같이 상등액을 회수하고, 미량의 펠렛을 1 x PBS에 재현탁하고, 투석을 수행하고, Amicon Ultra 15 (100 kDa mw. co.) (Millipore)로 농축하였다. 얻어진 조제물 (미세세포)을 Cytomox EX라고 명명하였다.
- [0276] v) 재조합 인터페론 α-2b (양성 대조군)
- [0277] 재조합 인터페론 α-2b (Schering-Plough (Brinny) Co., Ireland)를 양성 대조군으로 사용하였다.
- [0278] 2. 동물

- [0279] BALB/c-nu 마우스 (암컷; 총 80 마리; SPF 등급; 각 14 ~ 16 그램) 중국 의과학 아카데미의 실험 동물 센터 (Laboratory Animal Center of Chinese Academy of Medical Sciences)에서 구입하여 사용하였다.
- [0280] 마우스는 모든 배기 환기 시스템을 갖춘 동물실에서 사육용으로 유지되었다. 동물 시설의 온도는 약 40 ~ 60 %의 상대 습도 20 ~ 25 °C ($\pm <3$ °C)로 유지하였다. 동물 시설은 약 등급 100의 청정 공기 유량으로 매일 12 시간 조명 점등 작업을 하였고, 조명은 작업 영역에 대해서 약 150 ~ 300 LX, 동물 케이지 구역에서 100 ~ 200 LX이었다. 암모니아 농도를 14 mg/m³ 미만이었고, 소음은 60 dB 미만이었다. 마우스에 매일 새로운 먹이 및 식수 (탈이온화 및 한외 여과한 것)를 주었다.
- [0281] 3. 종양 이식
- [0282] BALB/c-nu 마우스에 인간 유방암 유래 Bcap-37 주 세포를 이식하고 Bcap-37 종양 담지 숙주 동물을 제작하였다. 무균 조건의 바이오 안전 캐비넷에서 그 종양 담지 숙주 동물의 Bcap-37 종양을 잘라, 종양 조직을 1x PBS로 세척하였다. 종양 붕괴하지 않고 잘 증식하는 종양 영역을 회수하고 메스로 2 mm³의 작은 조각 블록으로 절단하였다. 종양 블록을 1 x PBS로 세척하고, 튜빙 니들(tubing needle)로 각 마우스 오른쪽 겨드랑이의 피부 아래에 1 개씩 이식하였다. 총 8 군 (각 군 10 마리)을 준비하였다. 종양 이식 11일 후 종양은 110 ~ 120 mm³ 크기로 성장하였다.
- [0283] 4. 미세소포 (Cytomox)의 주입
- [0284] 증식된 종양을 갖는 상기 마우스에 미세소포를 주입하였다. 미세소포의 종양 내 주입은 분리된 미세소포를 포함하는 주사액을 이용하여 각 마우스의 종양으로 일주일에 2 회, 3 주간에 걸쳐 수행하였다. 즉 주사는 총 6 회 수행하였다.
- [0285] Cytomox HD 및 Cytomox EX 모두에 대해 처음 세 번의 주입은 더 적은 투여 량인 10.0 ~ 30.0 µg 단백질/kg으로 실시하고 이후 3 회 주입은 더 많은 복용량인 1.0 ~ 3.0 mg 단백질/kg으로 수행하였다. Cytomox HD 10.0 µg 단백질/kg 및 이후의 1.0 mg 단백질/kg 주입한 군을 여기에서 저용량 Cytomox HD 주입군으로 표시한다. Cytomox HD 30.0 µg 단백질/kg 및 이후의 3.0 mg 단백질/kg 주입한 군을 여기에서 고용량 Cytomox HD 주입군으로 표시한다. 또한 Cytomox EX를 같이 주입한 다른 2 개의 군을 여기에서 각각 저용량 Cytomox EX 주입군 및 고용량 Cytomox EX 주입군이라 표시한다. Cytomox p53 및 Cytomox PTEN은 처음 세 번의 주입은 10.0 µg 단백질/kg, 이후 3 번의 주사는 투여 량을 증가시켜 1.0mg 단백질/kg에서 수행하였다(Cytomox p53 주입군 및 Cytomox PTEN 주입군). 양성 대조군으로 재조합 인터페론 α-2b를 250 x 104 IU/kg로 마우스의 종양에 일주일에 두 번, 세 주 동안 주입하였다(양성 대조군). 대조군으로 1 x PBS를 종양 담지 마우스의 종양에 일주일에 두 번, 세 주 동안 주입하였다(음성 대조군). 각 군의 동물은 최종 투여 48 시간 후 경추 탈구에 의해 안락사시켰다. 죽은 쥐에서 종양을 회수하고 병리 검사를 위해 고정화 처리하였다.
- [0286] 그 결과, 이 시험에서 고용량 투여 동안에서도 시험 동물에 대한 급성 독성 효과가 없었고, 동물이 유전자 공학적 미세소포 (Cytomox)의 주입에 의해 죽지 않았다.
- [0287] 5. 체중, 및 종양 무게 및 종양 크기 측정
- [0288] 마우스의 체중은 시험 시료 주입 전 (종양을 포함한 무게) 및 안락사 전에 측정하였다. 또한 폐사한 마우스의 몸에서 종양을 제거한 후 무게 (순 체중)도 측정하였다. 제거된 종양의 무게를 측정하였다.
- [0289] 종양 무게 측정값에 따라 종양 성장 억제 효과를 다음과 같이 계산되었다.
- [0290] 종양 성장 억제 효과 (I) (%) = $[1 - T/C] \times 100$
- [0291] T : 각 시험 시료 (Cytomox 또는 양성 대조군)을 주입한 각 군의 평균 종양 무게 (g)
- [0292] C : 음성 대조군의 평균 종양 무게 (g)
- [0293] 계산된 종양 성장 억제 효과를 표 1에 나타낸다.

표 1

시험 시료	용량* (/주입/kg 체중)	종양 무게 (g±SD)	종양 성장 억제율 (%)
음성 대조군	-	1.73±1.11	
IFN α-2b	250 x 10 ⁴ IU	1.45±0.58	16.06
Cytomox HD	3 mg	1.41±0.66	18.37
Cytomox HD	1 mg	1.48±0.61	14.67
Cytomox EX	3 mg	1.36±0.57	21.32
Cytomox EX	1 mg	1.68±0.40	2.83
Cytomox p53	1 mg	1.48±0.67	14.73
Cytomox PTEN	1 mg	1.57±0.59	9.13

*용량은 후반부 중 3 회 주입의 복용량을 나타낸다.

[0294]

[0295]

표 1에서 나타난 바와 같이, 재조합 인터페론 α-2b의 직접 종양 병소 주입은 16.06 %의 종양 성장 억제를 일으켰다. Cytomox HD의 종양 내 주입은 종양 성장을 고용량(3 mg/회/kg)에서 18.37 % 억제하는 반면 저용량 (1 mg/회/kg)은 14.67 % 억제하였다. 즉, 종양 성장 억제 효과의 용량 의존적 증가가 관찰되었다. 마찬가지로 Cytomox EX의 종양 내 주입은 종양 성장을 고용량 (3 mg/회/kg)에서 21.32 % 억제하는 반면 저용량 (1 mg/회/kg)에서 2.83 % 억제한 것으로 나타났고, 종양 성장 억제 효과의 용량 의존적 증가가 또한 관찰되었다. Cytomoxp53 또는 Cytomox PTEN의 종양 내 주입도 종양 성장 억제를 가져왔다. 이러한 결과는 유전자 공학적 미세세포가 세포에 침입할 수 있고 그 형질도입 유전자 산물의 기능이 종양 세포에 전달되는 것을 나타내고 있다.

[0296]

또한, 시험 시료의 주입 후 마우스의 종양의 길이 및 폭 측정을 일주일에 2 회 수행하였다. 측정은 표준 캘리퍼스를 사용하여 수행하였다. 측정값에 따라 다음과 같이 종양 부피를 계산하였다.

[0297]

종양 부피 (mm³) = (종양의 길이 x 종양의 폭)²/2

[0298]

시험 시료 주입 4일 후 (종양 이식 15일 후), 고용량 Cytomox HD 주입군, 고용량 Cytomox EX 주입군 및 Cytomox PTEN 주입군에서는 음성 대조군에 비해 종양 부피의 증가가 측정 최종일 (종양 이식 31일 후 및 시험 시료 주입의 20일 후)까지 지속적으로 억제되었다. Cytomox p53 주입군에서도 시험 시료 주입 12일 후 종양 부피의 증가가 크게 억제되었다. 특히 고용량 Cytomox HD 주입군과 고용량 Cytomox EX 주입군에서는 음성 대조군에 비해 종양 부피의 차이가 시간이 지나면서 커졌다. 종양 이식 31일 후 (측정 마지막 날)에는 종양 부피는 대조군 (PBS)에서 1,250 mm³, 인터페론-α 2b에서 약 1,000 mm³, Cytomox HD (evmp 130001 고용량)에서 약 950 mm³, Cytomox p53 (evmp 130003 고용량)에서 약 1,000 mm³, Cytomox PTEN (evmp 130006 고용량)에서 약 1,100 mm³ 및 Cytomox EX (T130075 고용량)에서 약 1,000 mm³이었다.

[0299]

6. 종양의 병리 형태 학적 평가

[0300]

제거된 종양에 대해 병리학적 검사를 수행하여 그 형태를 평가하였다. 평가 기준은 다음과 같다:

[0301]

"-": 종양 병소의 종양 영역에서 괴사가 있는데, 섬유화는 없다.

[0302]

"+": 종양 조직에서 염증의 정도가 낮고, 섬유화 등급은 낮다.

[0303]

"++": 종양 조직의 염증 및 종양 조직의 쇠퇴(decay)가 있고, 섬유화가 종양 전체에서 관찰된다.

[0304]

"+++": 종양 조직의 쇠퇴를 갖는 유의적인 염증 및 섬유화의 가장 높은 등급이 종양 전체에서 관찰된다.

[0305]

결과를 표 2에 나타낸다.

표 2

마우스 번호	음성 대조군	IFN α -2b 250x10 ⁴ IU/kg	HD 1mg/kg	HD 3mg/kg	P53 1mg/kg	PTEN 1mg/kg	EX 1mg/kg	EX 3mg/kg
1	-	+	++	+	++	+	++	+++
2	+	++	+	+++	+	+	+	++
3	-	+	+	+	++	+	++	+++
4	+	++	++	++	+	+	+	+
5	+	+++	+	+++	+	++	+	++
6	-	++	+	+	++	+	+	+++
7	-	++	+	+	+	++	++	++
8	+	+++	++	++	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	++	+	+++
10	+	++	+	+	++	+	++	+

[0306]

[0307]

표 2에 나타난 바와 같이, 종양 억제 유전자 산물을 담지하는 미세세포의 종양 병소에 대한 투여는 대조군과 달리 주로 종양 조직의 쇠퇴를 일으키고 종양의 염증 및 섬유화를 촉진하였다. 특히 고용량의 Cytomox HD 또는 Cytomox EX의 종양 병소에서의 주입은 종양 덩어리의 종양 영역에서 혈관 신생의 부족에 의한 종양 괴사와는 상이한, 고 수준의 종양 조직의 염증 및 쇠퇴, 및 넓은 범위의 섬유화를 일으켰다. 쇠퇴된 종양 조직이 종양 확장을 막는 섬유화가 된 것으로 고려된다.

[0308]

도 19 및 20에 각 군의 종양에 대한 병리 검사에서 관찰된 전형적인 형태를 나타낸다.

[0309]

7. 종양의 웨스턴 블롯 분석

[0310]

단백질 추출을 Cytomox PTEN 주입군 및 음성 대조군의 제거된 종양에 대해 통상적인 방법에 의해 수행하였고, 실시예 13에 기재된 바와 같이, 웨스턴 블롯 분석을 통해 PTEN 단백질을 검출하였다. 그 결과, 음성 대조군의 종양 (미세세포-비주입된 종양 조직) 및 미세세포 주입군의 종양 (미세세포-주입된 종양 조직) 모두에서 PTEN이 검출되었지만, 미세세포-주입된 종양 조직에서 PTEN 수준은 미세세포-비주입된 종양 조직에 비해 2 배 높았다. 이 결과는 미세세포에 의한 세포 침입 및 형질도입 유전자/도입 유전자 산물의 전달 효율이 충분히 높은 것을 나타낸다. 또한 이 결과에서 나타난 바와 같이, Cytomox PTEN이 주입된 종양 세포에서 PTEN 수준의 증가에 따라 종양의 증식이 억제되었다 (표 1 중 9.13 %의 억제를 참조).

산업상 이용가능성

[0311]

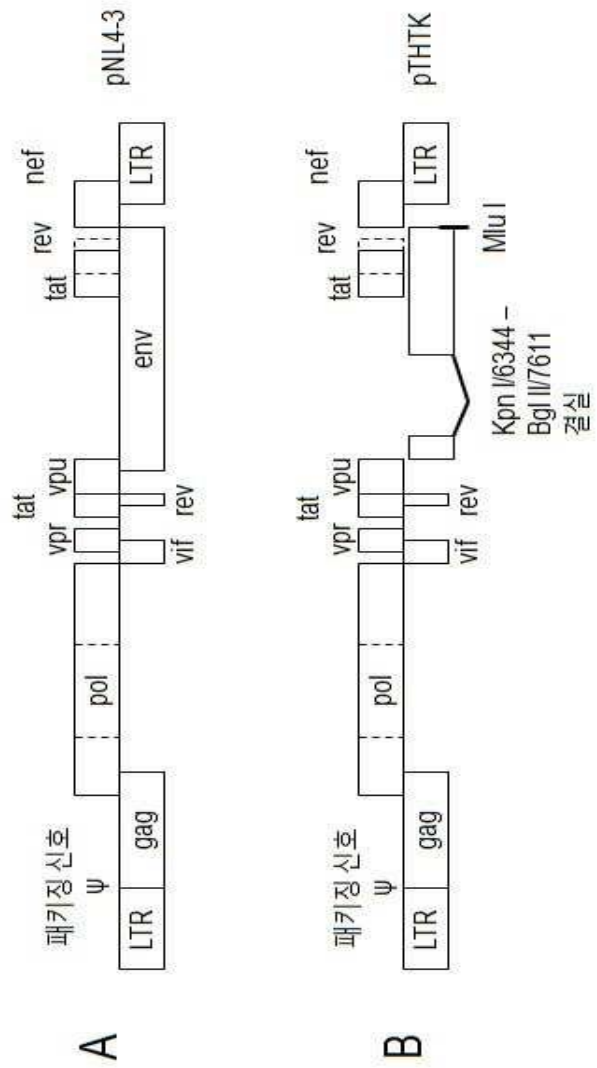
본 발명은 유전자 공학적 미세세포의 효율적인 제작을 위해 유용하다. 본 발명에 따른 미세세포는 세포의 생물학적 물질의 전달을 위해 사용할 수 있다.

[0312]

본 명세서에서 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원을 그대로 참고로서 본 명세서에 통합된다.

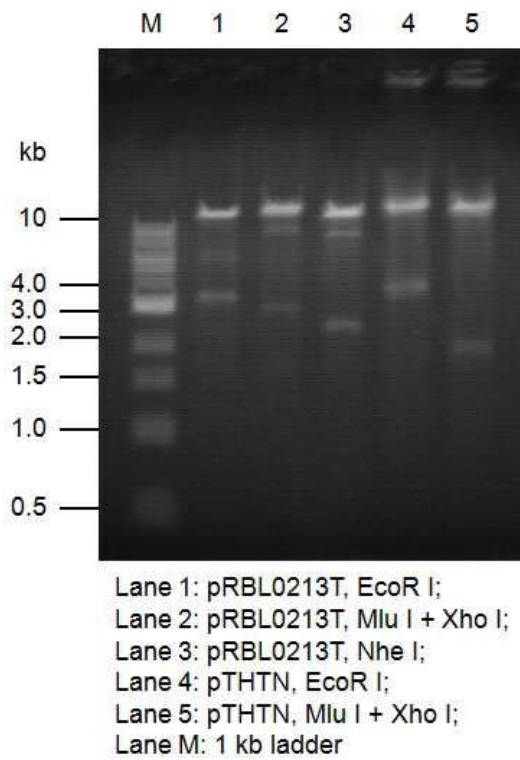
도면

도면1

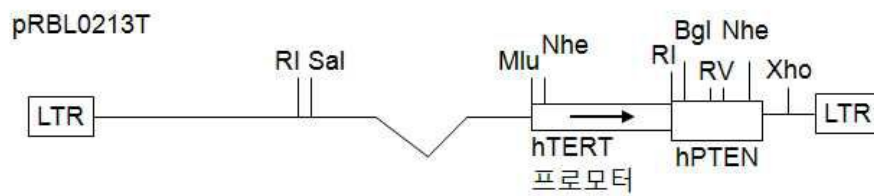


도면2

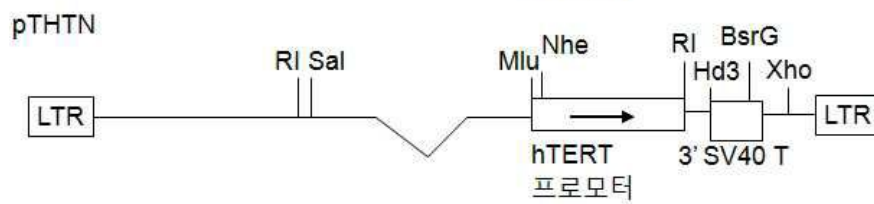
A



B

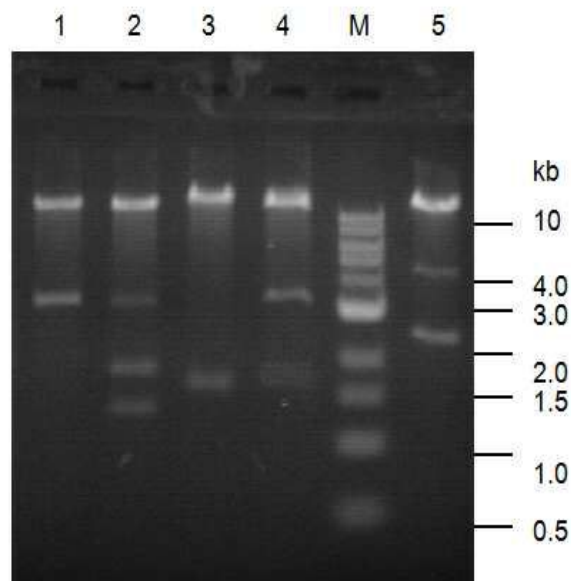


C



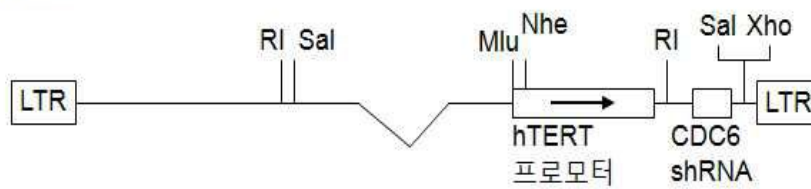
도면3

A

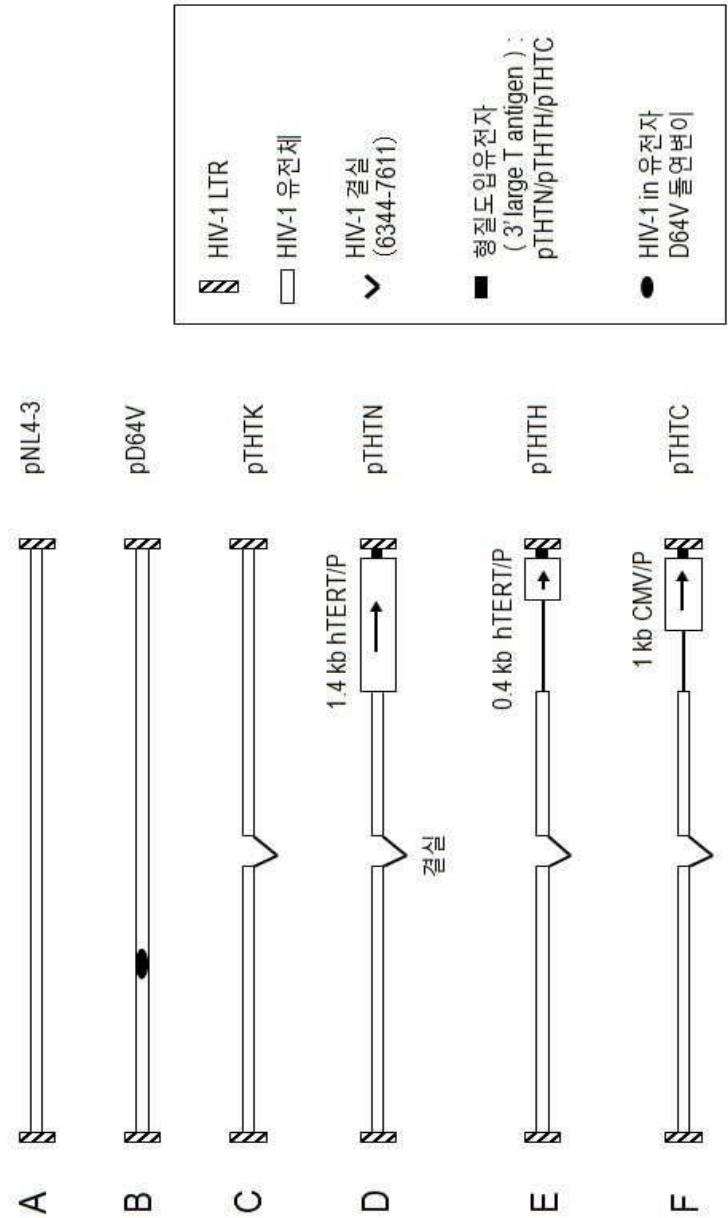


Lane 1: pRBL001, EcoR I;
 Lane 2: pRBL001, EcoR I + Nhe I;
 Lane 3: pRBL001, Mlu I + Xho I;
 Lane 4: pRBL001, Sal I;
 Lane 5: pRBL0213T, Nhe I;
 Lane M: 1 kb ladder

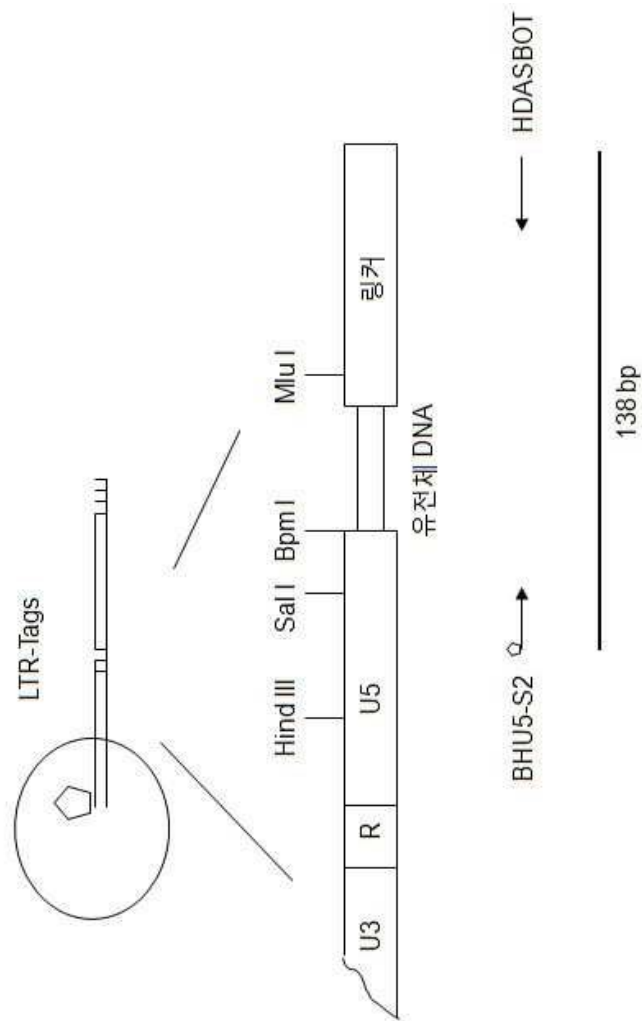
B pRBL001



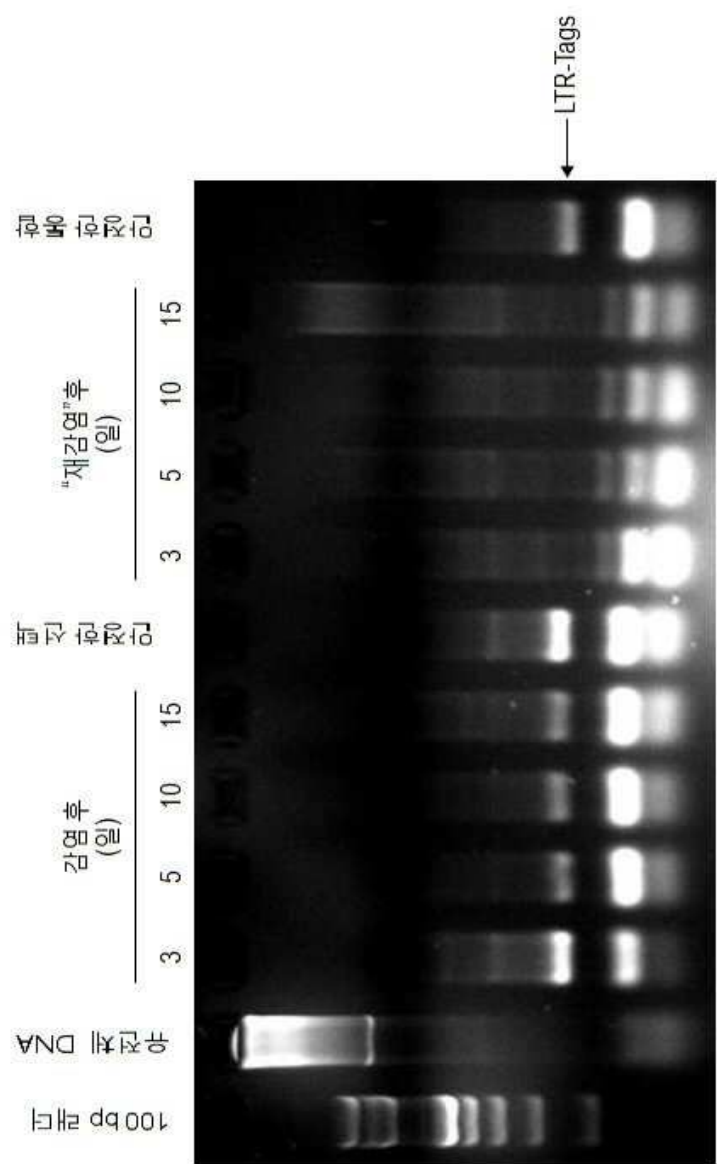
도면4



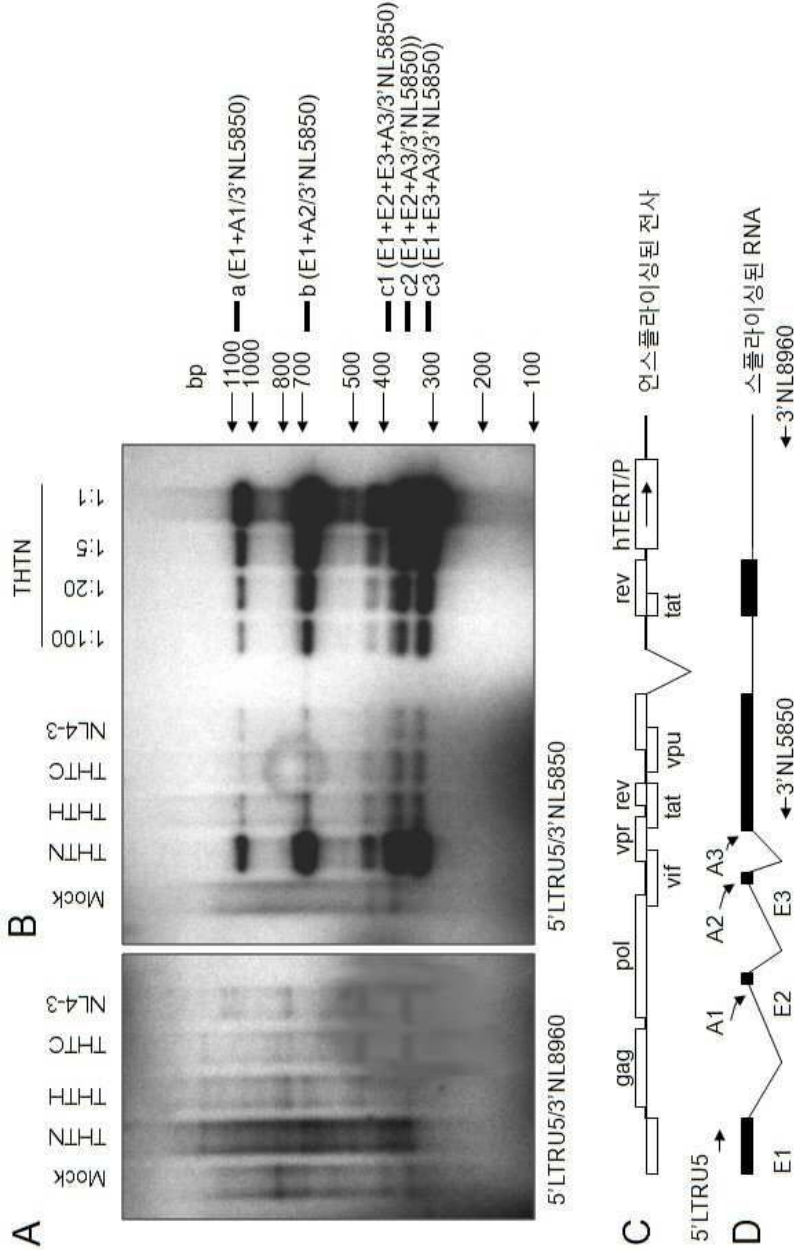
도면6



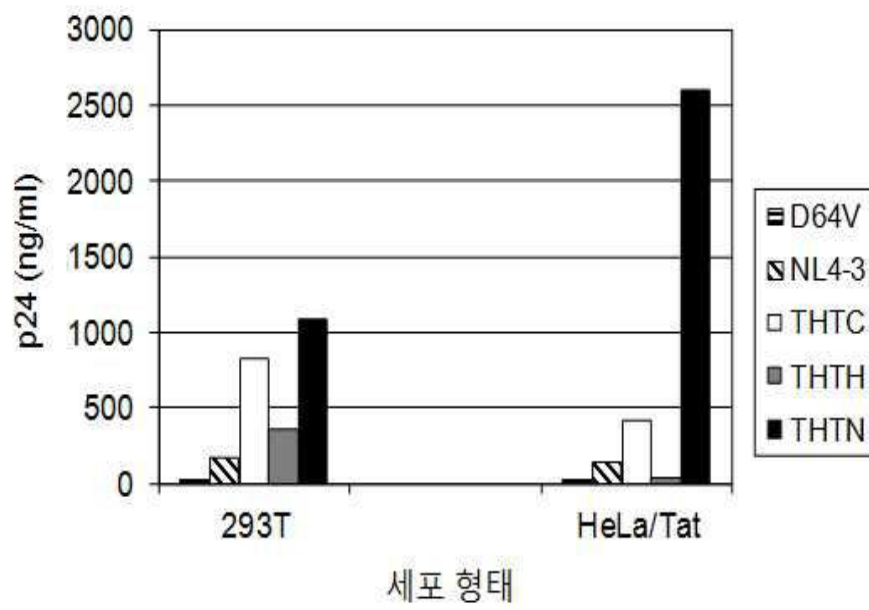
도면7



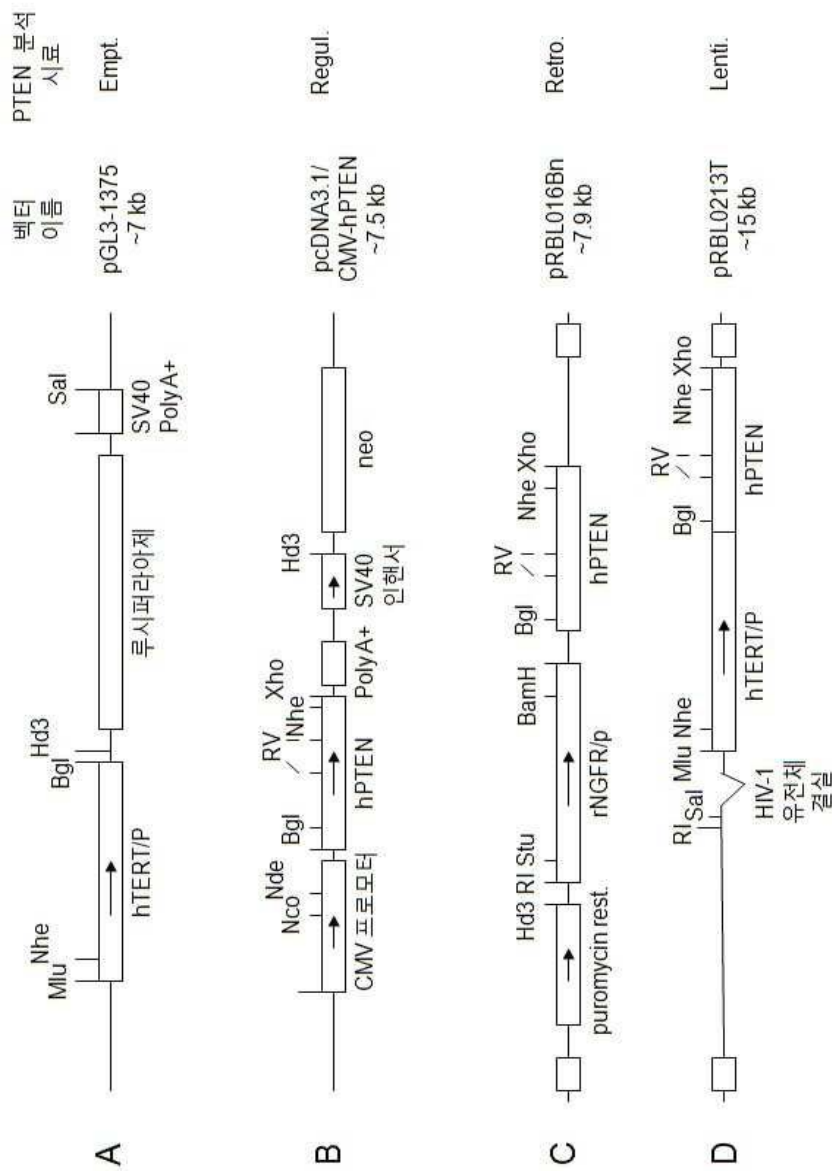
도면8



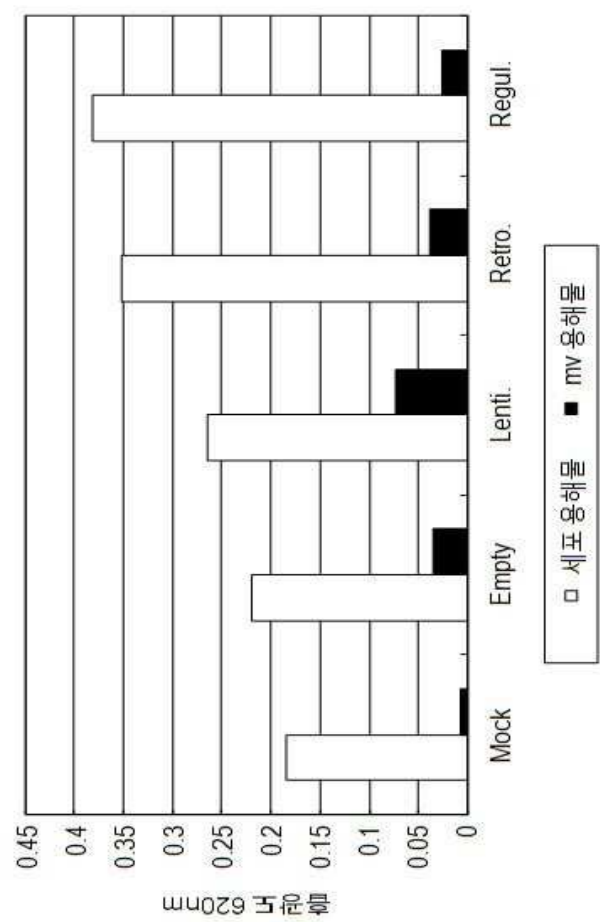
도면9



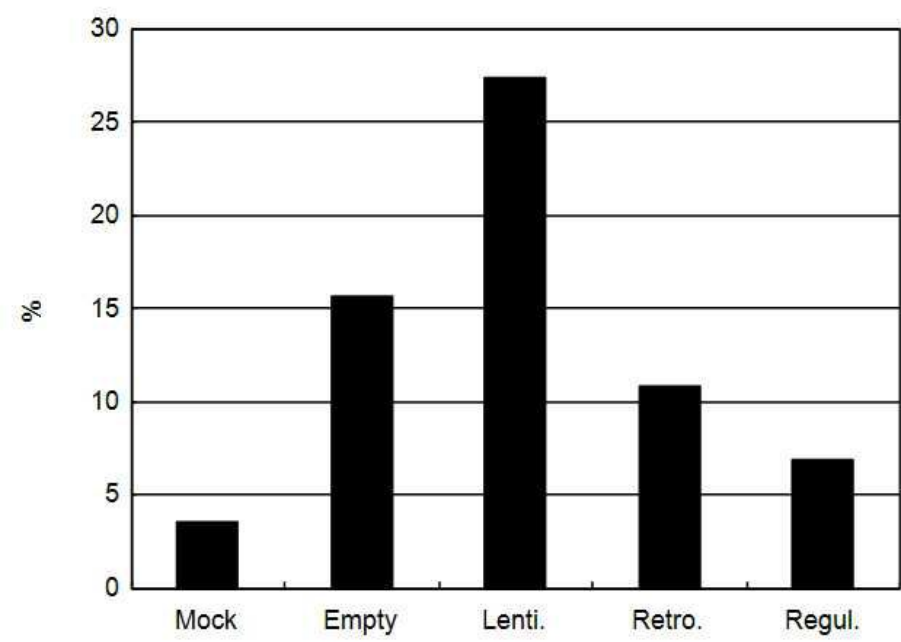
도면10



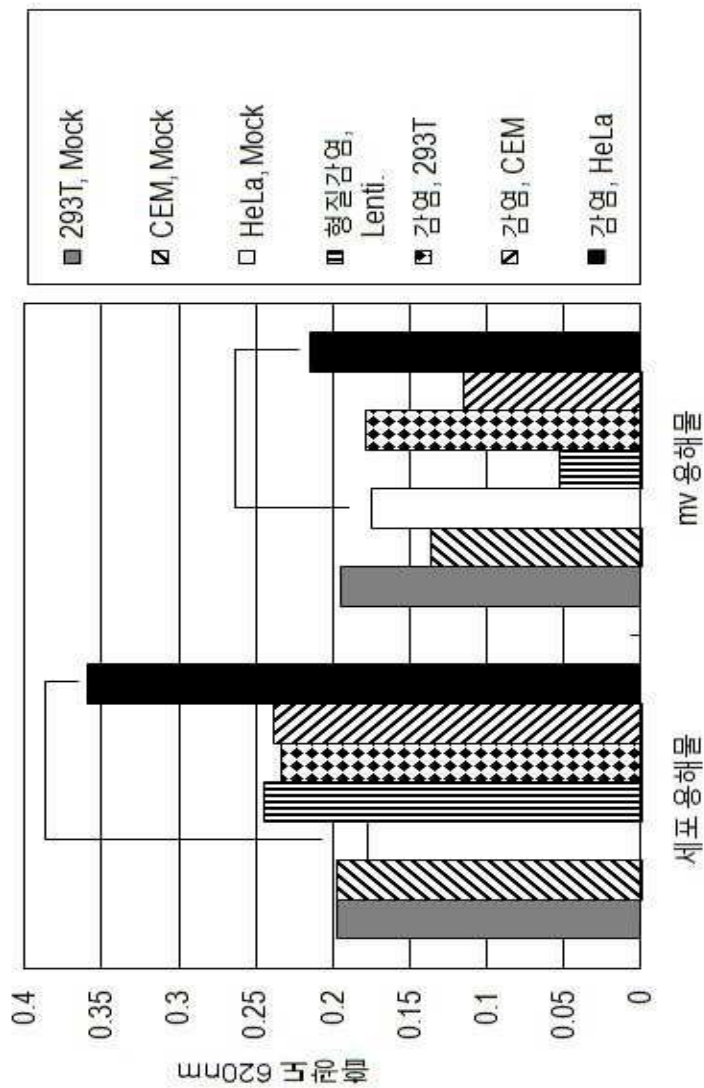
도면11



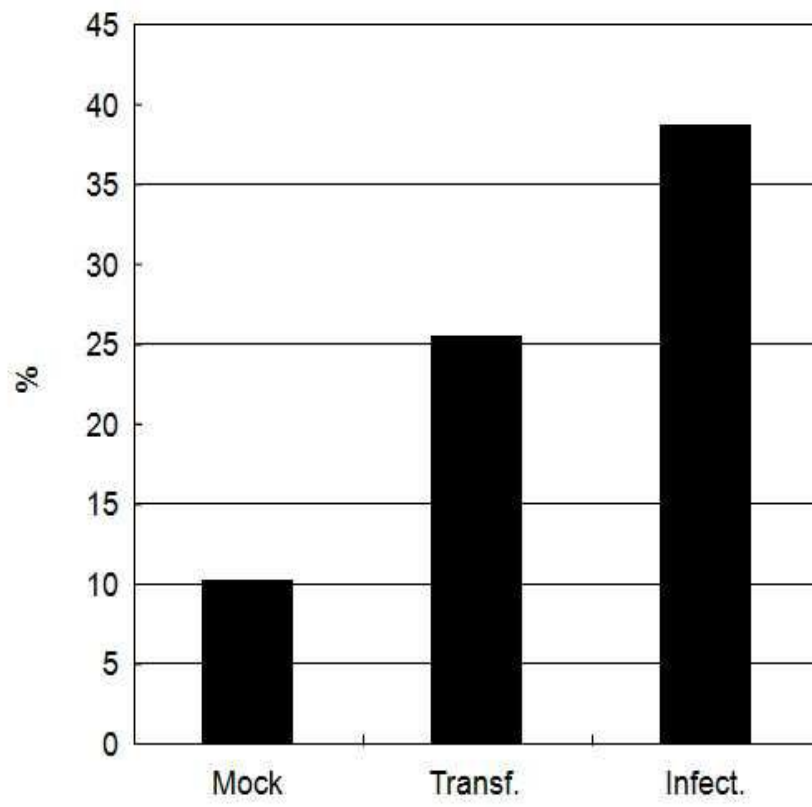
도면12



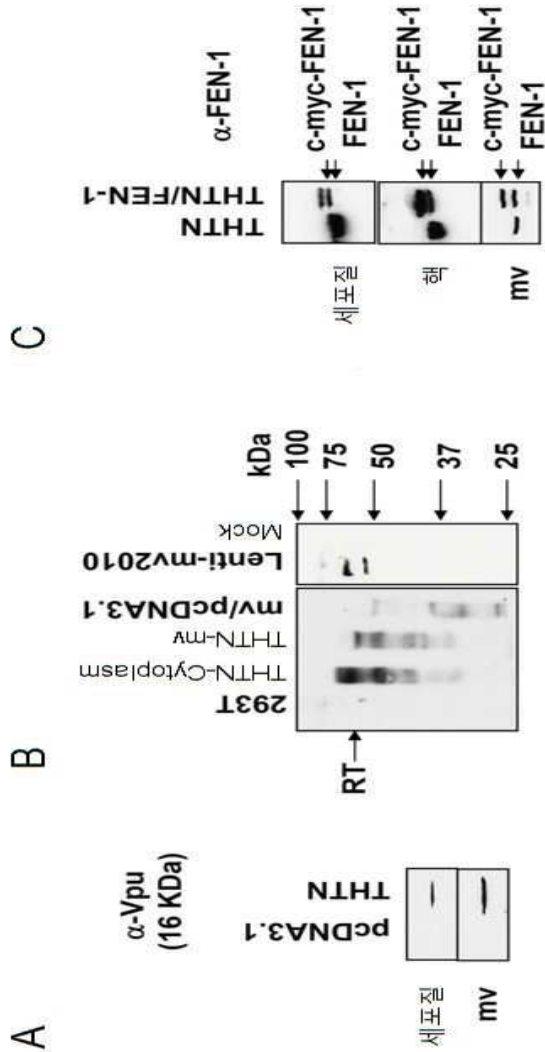
도면13



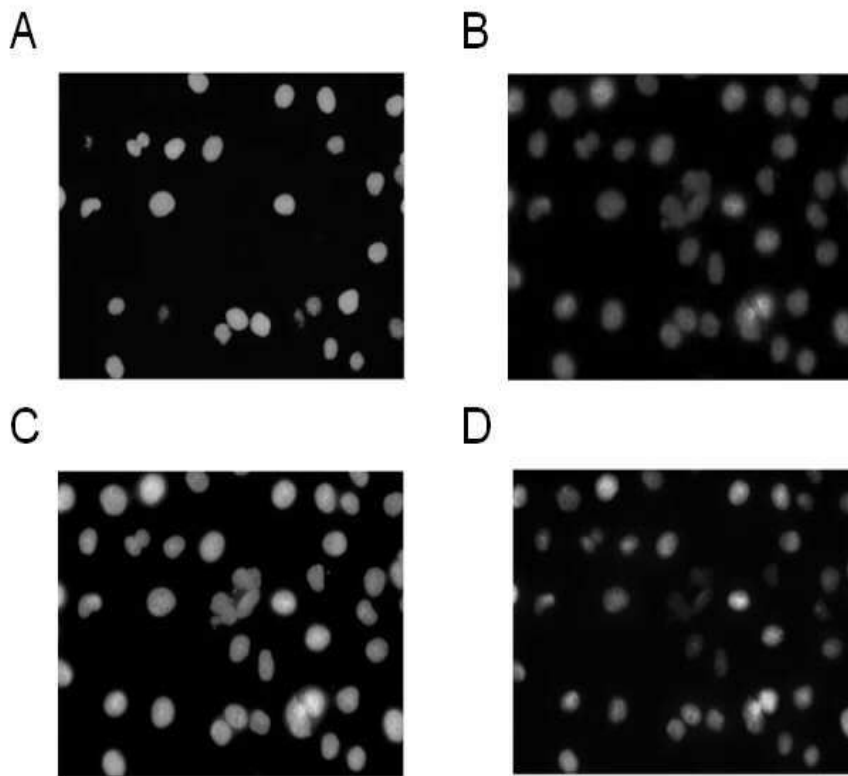
도면14



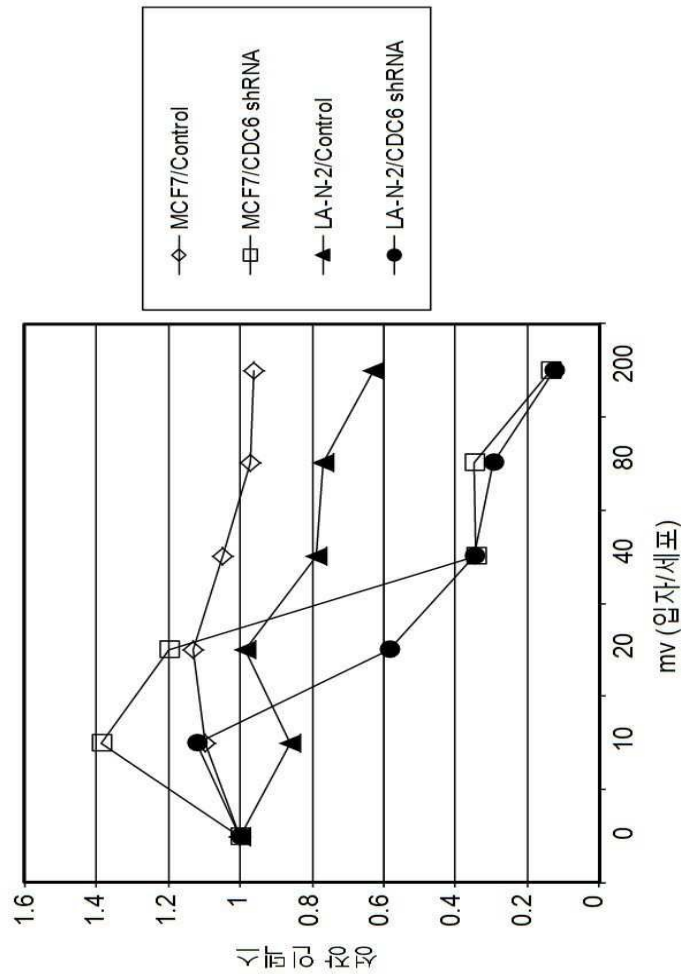
도면15



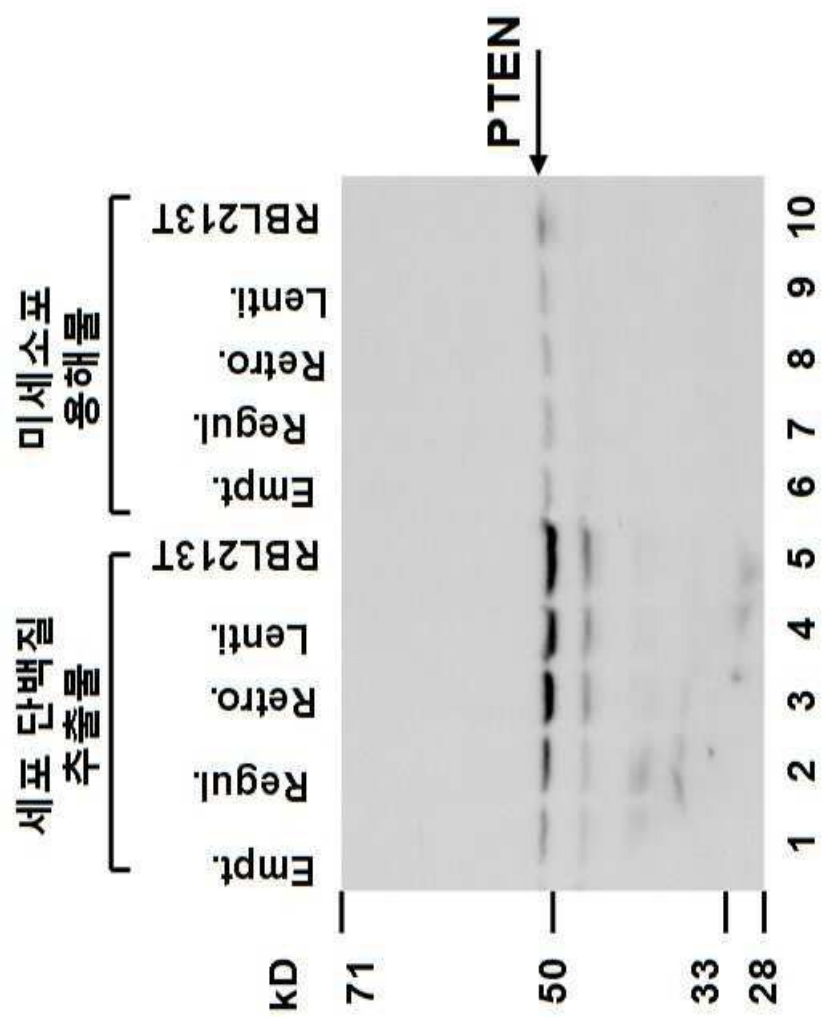
도면16



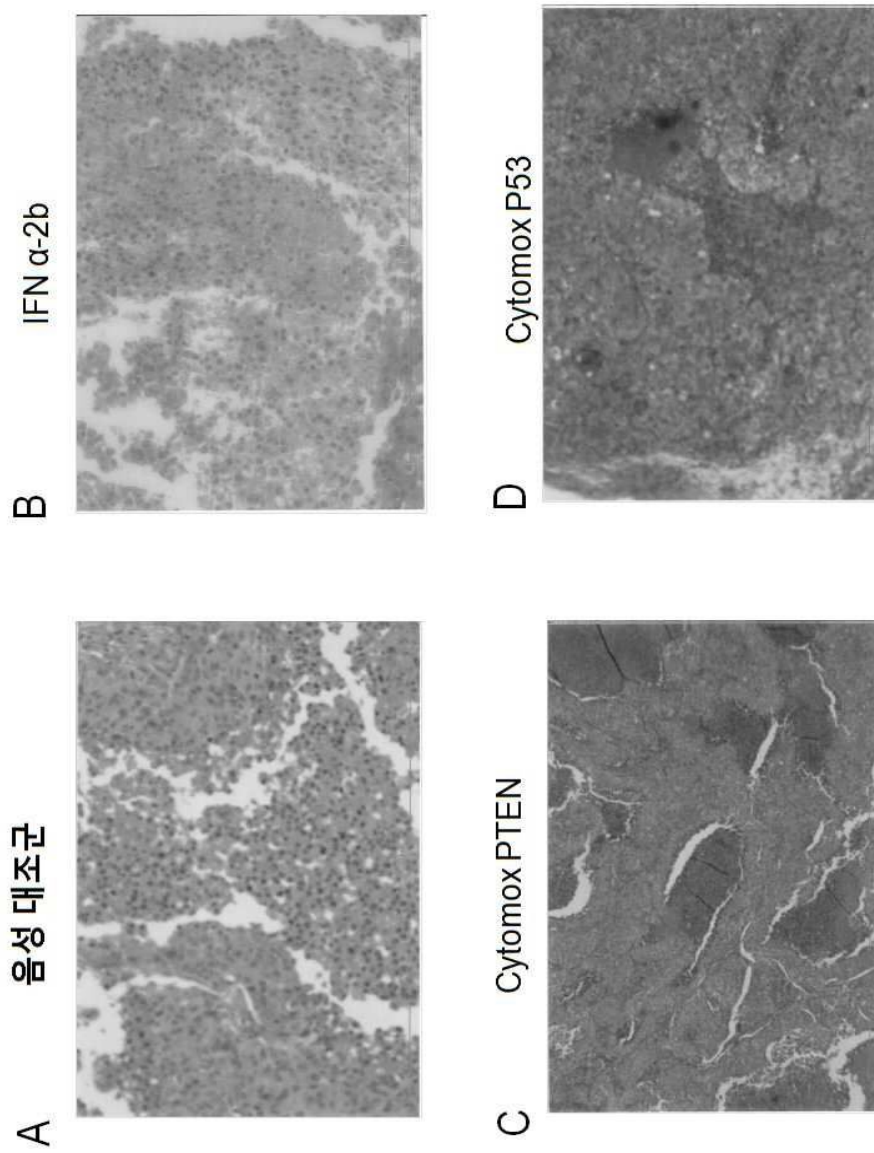
도면17



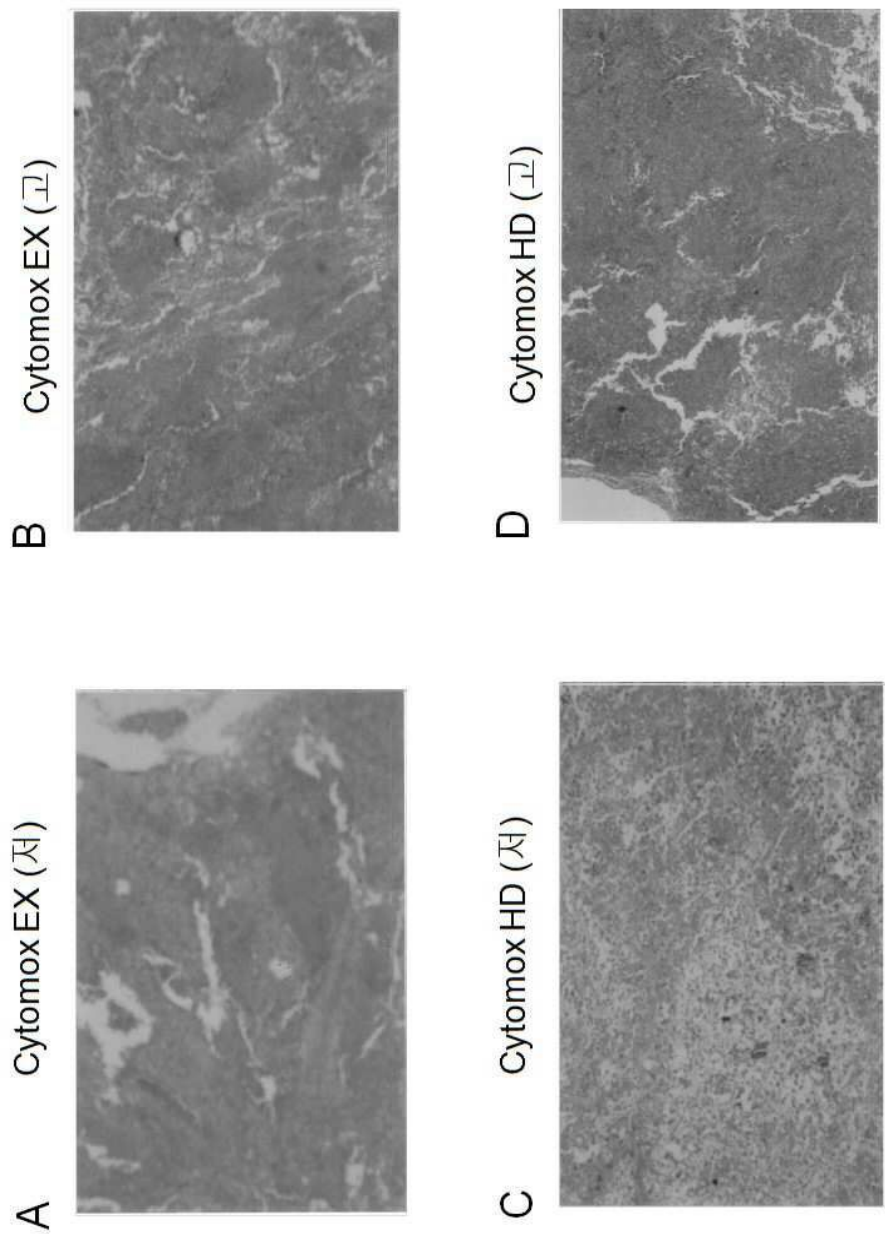
도면18



도면19



도면20



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Li, Zhong
Katsura, Misako
- <120> Microvesicles and method for producing the same
- <130> PH-5503-PCT
- <150> US 61/779,556
- <151> 2013-03-13
- <150> US 61/894,563

<151> 2013-10-23

<160> 27

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1389

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> The nucleotide sequence of the TERT gene promoter

<400> 1

```

gacaattcac aaacacagcc ctttaaaaag gcttagggat cactaagggg atttctagaa    60
gagcgacctg taatcctaag tatttacaag acgaggctaa cctccagcga gcgtgacagc    120

ccaggaggagg tgcgaggcct gttcaaatgc tagctccata aataaagcaa tttcctccgg    180
cagtttctga aagtaggaaa ggttacattt aaggttgcgt ttgttagcat ttcagtgttt    240
gccgacctca gctacagcat ccctgcaagg cctcgggaga cccagaagtt tctcgccccc    300
ttagatcaa acctagagcaa cccggagtct ggattcctgg gaagtcctca gctgtcctgc    360
ggttgtgccg gggccccagg tctggagggg accagtggcc gtgtggcttc tactgtcggg    420
ctggaagtcg ggctcctag ctctgcagtc cgaggcttgg agccaggtgc ctggaccccg    480
aggctgcctt ccacctgtg cgggcgggat gtgaccagat gttggcctca tctgccagac    540

agagtgccgg ggcccagggt caaggccgtt gtggctggtg tgaggcgccc ggtgcgcggc    600
cagcaggagc gcctggctcc atttcccacc ctttctcgac gggaccgccc cggtaggtga    660
ttaacagatt tggggtggtt tgctcatggt ggggaccctt cgccgcctga gaacctgcaa    720
agagaaatga cgggcctgtg tcaaggagcc caagtgcggg ggaagtgttg caggagggca    780
ctccgggagg tcccgcgtgc ccgtccaggg agcaatgcgt cctcgggttc gtccccagcc    840
gcgtctacgc gcctccgtcc tccccttcac gtccggcatt cgtggtgccc ggagcccgac    900
gccccgcgtc cggacctgga ggcagccctg ggtctccgga tcaggccagc ggccaaaggg    960

tcgccgcacg cacctgttcc cagggcctcc acatcatggc ccttccctcg ggttacccca    1020
cagcctaggc cgattcgacc tctctccgtt ggggccctcg ctggcgctcc tgacacctgg    1080
gagcgcgagc ggcgcgcggg cggggaagcg cggcccagac ccccgggtcc gcccgagca    1140
gctgcgtgtt cggggccagg ccgggctccc agtggattcg cgggcacaga cgccaggac    1200
cgcgctcccc acgtggcgga gggactgggg acccgggcac ccgtcctgcc ctttcacctt    1260
ccagctccgc ctctccgcg cggaccccg cccgtcccga cccctcccgg gtccccggcc    1320

```

cagccccctc cgggccctcc cagccccctc ccttcctttc cgcggccccc cctctctctc 1380

gcggcgcgga 1389

<210> 2

<211> 429

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> The nucleotide sequence of 5' part of TERT transcribed region

<400> 2

gtttcaggca gcgtcgcgtc ctgctgcgca cgtgggaagc cctggccccc gccacccccg 60

cgatgccgcg cgctccccgc tgccgagccg tgcgtccct gctgcgcagc cactaccgcg 120

aggtgtgtcc gctggccacg ttcgtgcggc gcctggggcc ccagggtgg cggtgtgtgc 180

agcgcgggga cccggcggtt ttccgcgcgc tgggtggcca gtgcctggtg tgcgtgccct 240

gggacgcacg gcccccccc gccccccct cttccgccca ggtgggcctc cccggggtcg 300

gcgtccggct ggggttgagg gcggccgggg ggaaccagcg acatgcggag agcagcgcag 360

gcgactcagg gcgtttccc cgcaggtgtc ctgcctgaag gagctggtgg cccgagtgtc 420

gcagaggct 429

<210> 3

<211> 1818

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> The nucleotide sequence comprising the TERT gene promoter and 5' part of TERT transcribed region

<400> 3

gacaattcac aaacacagcc ctttaaaaag gcttagggat cactaagggg atttctagaa 60

gagcgacctg taatcctaag tatttacaag acgaggetaa cctccagcga gcgtgacagc 120

ccaggaggagg tgcgaggcct gttcaaatgc tagctccata aataaagcaa tttcctccgg 180

cagttttctg aagtaggaaa gggtacattt aaggttgcgt ttgttagcat ttcagtgttt 240

gccgacctca gctacagcat ccctgcaagg cctcgggaga cccagaagtt tctcgcctcc 300

ttagatccaa acctagagcaa cccggagtct ggattcctgg gaagtcctca gctgtcctgc 360

ggttgtgccg gggccccagg tctggagggg accagtggcc gtgtggcttc tactgtctgg 420

ctggaagtgc ggcctcctag ctctgcagtc cgaggcttgg agccaggtgc ctggaccccc 480

aggctgccct ccacctgtg cgggcgggat gtgaccagat gttggcctca tctgccagac 540
 agagtgccgg gggccagggt caagccgtt gtggctggtg tgaggcgccc ggtgcgcggc 600
 cagcaggagc gcctggctcc atttcccacc ctttctcgac gggaccgccc cgggtgggtga 660
 ttaacagatt tggggtggtt tgctcatggt ggggaccctt cggcgctga gaacctgcaa 720
 agagaaatga cgggcctgtg tcaaggagcc caagtgcgg ggaagtgtt cagggaggca 780
 ctccgggagg tcccgcgtgc ccgtccaggg agcaatgcgt cctcgggttc gtccccagcc 840
 gcgtctacgc gcctccgtcc tccccttcac gtccggcatt cgtggtgccc ggagcccagc 900

gccccgcgtc cggacctgga ggcagccctg ggtctccgga tcaggccagc ggccaaaggg 960
 tcgccgcacg cacctgttcc caggccctcc acatcatggc ccttccctcg ggttacccca 1020
 cagcctaggc cgattcgacc tctctccgtt ggggccctcg ctggcgctcc tgcacctgg 1080
 gagcgcgagc ggcgcgcggg cggggaagcg cggcccagac ccccggttcc gcccgagca 1140
 gctgcgctgt cggggccagg ccgggctccc agtggattcg cgggcacaga gcccaggac 1200
 cgcgctccc acgtggcgga gggactgggg acccgggcac ccgtcctgcc cttcacctt 1260
 ccagctccgc ctctccgcg cggacccgc cccgtccga cccctcccgg gtccccggcc 1320

cagccccctc cgggccctcc cagccccctc ctttctttc cgcggccccg cctctctc 1380
 gcggcgcgag tttcaggcag cgctgcgtcc tgcgcgcac gtgggaagcc ctggccccgg 1440
 ccacccccgc gatgcgcgc gctccccgt gccgagccgt gcgtccctg ctgcgcagcc 1500
 actaccgca ggtgctgcc ctggccacgt tcgtgcggcg cctggggccc cagggtggc 1560
 ggctggtgca gcgcggggac ccggcggtt tccgcgcgt ggtggcccag tgcctggtgt 1620
 gcgtgccctg ggacgcacgg ccgcccccg ccgccccctc cttccgccag gtgggcctcc 1680
 ccggggtcgg cgtccgctg gggttgagg cggccggggg gaaccagca catgcggaga 1740

gcagcgcagg cgactcagg cgcttcccc gcaggtgtcc tgctgaagg agctggtggc 1800
 ccgagtgtg cagaggct 1818

<210> 4
 <211> 14825
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> pNL4-3
 <400> 4

tggaaaggct aatttggtcc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca 60
 cacaaggcta ctccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120
 tgacctttgg atggtgcttc aagttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca 180

atgaaggaga gaacaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggacccgg 240

agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccag 300

agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg 360

ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat 420

gctacatata agcagctgct ttttgcctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga 480

gcctgggagc tctctggcta actagggaac cactgctta agcctcaata aagcttgctt 540

tgagtgtca aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc 600

agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag 660

cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgcctgaa gcgcgcacgg 720

caagaggcga ggggcggcga ctggtgagta cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga 780

aggagagaga tgggtgcgag agcgtcggta ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa 840

aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca 900

agcaggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggccttt tagagacatc agaagctgt 960

agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca 1020

ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc 1080

aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa 1140

gcagcagctg acacaggaaa caacagccag gtcagccaaa attaccctat agtcagaaac 1200

ctccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaatgc atgggtaaaa 1260

gtagtagaag agaagcttt cagcccagaa gtaataccca tgttttcagc attatcagaa 1320

ggagccacc cacaagattt aaataccatg ctaaacacag tggggggaca tcaagcagcc 1380

atgcaaatgt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag aatgggatag attgcatcca 1440

gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac caagggaag tgacatagca 1500

ggaactacta gtacccttca ggaacaaata gcatggatga cacataatcc acctatcca 1560

gtaggagaaa tctataaaag atggataatc ctgggattaa ataaaatagt aagaatgtat 1620

agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaaagg aaccttttag agactatgta 1680

gaccgattct ataaaactct aagagccgag caagcttcac aagaggtaaa aaattggatg 1740

acagaaacct tgttggtcca aaatgcgaac ccagattgta agactatgtt aaaagcattg 1800

ggaccaggag cgacactaga agaaatgatg acagcatgtc agggagtggg gggacccggc 1860

cataaagcaa gagttttggc tgaagcaatg agccaagtaa caaatccagc taccataatg 1920

atacagaaag gcaatttttag gaaccaaaga aagactgtta agtgtttcaa ttgtggcaaa	1980
gaagggcaca tagccaaaaa ttgcagggcc cctaggaaaa agggctgttg gaaatgtgga	2040
aaggaaggac accaaatgaa agattgtact gagagacagg ctaatTTTTT agggaagatc	2100
tggccttccc acaagggaag gccagggaaat tttcttcaga gcagaccaga gccaacagcc	2160
ccaccagaag agagcttcag gtttggggaa gagacaacaa ctccctctca gaagcaggag	2220
ccgatagaca aggaactgta tccttttagct tccctcagat cactctttgg cagcgacccc	2280
tcgtcacaat aaagataggg gggcaattaa aggaagctct attagataca ggagcagatg	2340
atacagtatt agaagaaatg aatttgccag gaagatggaa accaaaaatg atagggggaa	2400
ttggagggtt tatcaaagta agacagtatg atcagatact catagaaatc tgccggacata	2460
aagctatagg tacagtatta gtaggacctt cacctgtcaa cataattgga agaaatctgt	2520
tgactcagat tggtgcact ttaaattttc ccattagtcc tattgagact gtaccagtaa	2580
aattaaagcc aggaatggat ggcccaaaaag ttaaacaatg gccattgaca gaagaaaaaa	2640
taaaagcatt agtagaaatt tgtacagaaa tggaaaagga aggaaaaatt tcaaaaattg	2700
ggcctgaaaa tcatacaat actccagtat ttgccataaa gaaaaaagac agtactaaat	2760
ggagaaaatt agtagatttc agagaactta ataagagaac tcaagatttc tgggaagttc	2820
aattaggaat accacatcct gcagggttaa aacagaaaaa atcagtaaca gtactggatg	2880
tgggcgatgc atatttttca gtcccttag ataaagactt caggaaagtat actgcattta	2940
ccatacctag tataaacaat gagacaccag ggattagata tcagtaaat gtgcttcac	3000
agggatggaa aggatcacca gcaatattcc agtgtagcat gacaaaaatc ttagagcctt	3060
ttagaaaaca aaatccagac atagtcact atcaatacat ggatgatttg tatgtaggat	3120
ctgacttaga aatagggcag catagaacaa aaatagagga actgagacaa catctgttga	3180
ggtggggatt taccacacca gacaaaaaac atcagaaaga acctccattc ctttggatgg	3240
gttatgaact ccatcctgat aaatggacag tacagcctat agtgctgcca gaaaaggaca	3300
gctggactgt caatgacata cagaaattag tgggaaaatt gaattgggca agtcagattt	3360
atgcagggat taaagtaagg caattatgta aacttcttag gggaaccaa gcactaacag	3420
aagtagtacc actaacagaa gaagcagagc tagaactggc agaaaacagg gagattctaa	3480
aagaaccggt acatggagtg tattatgacc catcaaaaga cttaatagca gaaatacaga	3540
agcaggggca aggccaatgg acatatcaaa ttatcaaga gccatttaaa aatctgaaaa	3600
caggaaagta tgcaagaatg aagggtgccc aactaatga tgtgaaacaa ttaacagagg	3660
cagtacaaaa aatagccaca gaaagcatag taatatgggg aaagactcct aaattttaat	3720
taccataca aaaggaaaca tgggaagcat ggtggacaga gtattggcaa gccacctgga	3780

ttcctgagtg ggagtttgtc aatacccttc ccttagtgaa gttatggtac cagtttagaga 3840
 aagaacccat aataggagca gaaactttct atgtagatgg ggcagccaat agggaaacta 3900
 aattaggaaa agcaggatat gtaactgaca gaggaagaca aaaagtgtgc cccctaacgg 3960
 acacaacaaa tcagaagact gagttacaag caattcatct agctttgcag gattcgggat 4020

 tagaagtaaa catagtaca gactcacaat atgcattggg aatcattcaa gcacaaccag 4080
 ataagagtga atcagagtta gtcagtcaaa taatagagca gtttaataaaa aaggaaaaag 4140
 tctacctggc atgggtacca gcacacaaag gaattggagg aaatgaacaa gtagataaat 4200
 tggtcagtgc tggaatcagg aaagtactat ttttagatgg aatagataag gccaagaag 4260
 aacatgagaa atatcacagt aattggagag caatggctag tgattttaac ctaccacctg 4320
 tagtagcaaa agaaatagta gccagctgtg ataaatgtca gctaaaaggg gaagccatgc 4380
 atggacaagt agactgtagc ccaggaatat ggcagctaga ttgtacacat ttagaaggaa 4440

 aagttatctt ggtagcagtt catgtagcca gtggatatat agaagcagaa gtaattccag 4500
 cagagacagg gcaagaaaca gcatacttcc tcttaaaatt agcaggaaga tggccagtaa 4560
 aaacagtaca tacagacaat ggcagcaatt tcaccagtac tacagttaag gccgcctgtt 4620
 ggtgggcggg gatcaagcag gaatttggca ttcctacaa tcccaaagt caaggagtaa 4680
 tagaatctat gaataaagaa ttaaagaaaa ttataggaca ggtaagagat caggctgaac 4740
 atcttaagac agcagtacaa atggcagtat tcatccacaa ttttaaaaga aaagggggga 4800
 ttggggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat agcaacagac atacaaacta 4860

 aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaattttcg ggtttattac agggacagca 4920
 gagatccagt ttggaaagga ccagcaaagc tcctctggaa aggtgaaggg gcagtagtaa 4980
 tacaagataa tagtgacata aaagtagtgc caagaagaaa agcaaagatc atcagggatt 5040
 atggaaaaca gatggcaggt gatgattgtg tggcaagtag acaggatgag gattaacaca 5100
 tggaaaagat tagtaaaaca ccatatgtat atttcaagga aagctaagga ctggttttat 5160
 agacatcact atgaaagtac taatccaaaa ataagttcag aagtacacat cccactaggg 5220
 gatgctaaat tagtaataac aacatattgg ggtctgcata caggagaaag agactggcat 5280

 ttgggtcagg gagtctccat agaattggagg aaaaagagat atagcacaca agtagaccct 5340
 gacctagcag accaactaat tcatctgcac tattttgatt gtttttcaga atctgtata 5400
 agaaatacca tattaggacg tatagttagt cctagggtgtg aatatcaagc aggacataac 5460
 aaggtaggat ctctacagta cttggcacta gcagcattaa taaaacaaa acagataaag 5520
 ccacctttgc ctagtgttag gaaactgaca gaggacagat ggaacaagcc ccagaagacc 5580
 aagggccaca gagggagcca tacaatgaat ggacactaga gcttttagag gaacttaaga 5640

gtgaagctgt tagacatttt cctaggatat ggctccataa cttaggacaa catatctatg 5700

aaacttacgg ggatacttgg gcaggagtgg aagccataat aagaattctg caacaactgc 5760

tgtttatcca tticagaatt ggggtgctgac atagcagaat aggcgttact cgacagagga 5820

gagcaagaaa tggagccagt agatcctaga ctagagccct ggaagcatcc aggaagtcag 5880

cctaaaactg cttgtaccaa ttgctattgt aaaaagtgtt gctttcattg ccaagtttgt 5940

ttcatgacaa aagccttagg catctcctat ggcaggaaga agcggagaca gcgacgaaga 6000

gctcatcaga acagtcagac tcatcaagct tctctatcaa agcagtaagt agtacctgta 6060

atgcaaccta taatagtagc aatagtagca ttagtagtag caataataat agcaatagtt 6120

gtgtggtcca tagtaatcat agaatatagg aaaatatata gacaaagaaa aatagacagg 6180

ttaattgata gactaataga aagagcagaa gacagtggca atgagagtga aggagaagta 6240

tcagcacttg tggagatggg ggtggaaatg gggcaccatg ctcttggga tattgatgat 6300

ctgtagtgt acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat ggggtacctg tgtggaagga 6360

agcaaccacc actctatfff gtgcatcaga tgctaaagca tatgatacag aggtacataa 6420

tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agacccaac ccacaagaag tagtattggt 6480

aatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aatgacatg gtagaacaga tgcagtagga 6540

tataatcagt ttatgggac aaagcctaaa gccatgtgta aaattaaccc cactctgtgt 6600

tagtttaag tgcactgatt tgaagaatga tactaatacc aatagtagta gcgggagaat 6660

gataatggag aaaggagaga taaaaaactg ctctttcaat atcagcacia gcataagaga 6720

taagggtcag aaagaatatg cattctttta taaacttgat atagtacaa tagataatac 6780

cagctatagg ttgataagtt gtaacacctc agtcattaca caggcctgtc caaaggtatc 6840

ctttgagcca attccatc attattgtgc cccggctggt tttgcgattc taaaatgtaa 6900

taataagacg ttcaatggaa caggacatg tacaaatgtc agcacagtac aatgtacaca 6960

tggaatcagg ccagtagtat caactcaact gctgttaaataa ggagctctag cagaagaaga 7020

tgtagtaatt agatctgcca atttcacaga caatgctaaa accataatag tacagctgaa 7080

cacatctgta gaaattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaaaaa gtatccgtat 7140

ccagagggga ccaggagag catttggttac aataggaaaa ataggaaata tgagacaagc 7200

acattgtaac attagtagag caaaatggaa tgccacttta aaacagatag ctagcaaatt 7260

aagagaacaa ttiggaata ataaacaat aatctttaag caatcctcag gaggggaccc 7320

agaaattgta acgcacagtt ttaattgtgg aggggaattt ttctactgta attcaacaca 7380

actgtttaat agtacttggg ttaatagtagc ttggagtact gaagggtcaa ataactga 7440
 aggaagtgc acaatcacac tcccatgcag aataaaacaa ttataaaca tgtggcagga 7500
 agtaggaaaa gcaatgtatg cccctcccat cagtggacaa attagatgtt catcaaatat 7560
 tactgggctg ctattaacaa gagatgggtg taataacaac aatgggtccg agatcttcag 7620
 acctggagga ggcgatafga gggacaattg gagaagtga ttatataaat ataaagtgt 7680
 aaaaattgaa ccattaggag tagcaccac caaggcaaag agaagagtgg tgcagagaga 7740
 aaaaagagca gtgggaatag gagctttgtt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac 7800

 tatgggcgca gcgtcaatga cgctgacggt acaggccaga caattattgt ctgatatagt 7860
 gcagcagcag aacaatttgc tgagggtat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac 7920
 agtctggggc atcaaacagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga 7980
 tcaacagctc ctggggattt ggggttgctc tgaaaaactc atttgacca ctgctgtgcc 8040
 ttggaatgct agttggagta ataatctct ggaacagatt tggaataaca tgacctggat 8100
 ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc 8160
 gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt 8220

 gtggaattgg tttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt 8280
 aggaggcttg gtaggtttaa gaatagtttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag 8340
 gcaggatata tcaccattat cgtttcagac ccacctcca atcccgaggg gaccgcagag 8400
 gcccgaagga atagaagaag aaggtggaga gagagacaga gacagatcca ttcgattagt 8460
 gaacggatcc ttagcactta tctgggacga tctgcggagc ctgtgcctct tcagctacca 8520
 ccgcttgaga gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg 8580
 gtgggaagcc ctcaaatatt ggtggaatct cctacagtat tggagtcagg aactaaagaa 8640

 tagtctgtt aacttgcga atgccacagc catagcagta gctgagggga cagatagggt 8700
 tatagaagta ttacaagcag cttatagagc tattcgccac atacctagaa gaataagaca 8760
 gggcttggaa aggattttgc tataagatgg gtggcaagtg gtcaaaaagt agtgtgattg 8820
 gatggcctgc tgtaagggaag aagatgagac gagctgagcc agcagcagat ggggtgggag 8880
 cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctaaca 8940
 atgctgcttg tgcttgcta gaagcacaag aggaggaaga ggtgggtttt ccagtcacac 9000
 ctgaggtacc tttaagacca atgacttaca aggcagctgt agatcttagc cactttttaa 9060

 aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc actcccaaag aagacaagat atccttgatc 9120
 tgtggatcta ccacacaaa ggctacttcc ctgattggca gaactacaca ccagggccag 9180
 gggtcagata tccactgacc ttggtatggt gctacaagct agtaccagtt gagccagata 9240

aggtagaaga ggccaataaa ggagagaaca ccagcttgtt acaccctgtg agcctgcatg 9300
 gaatggatga cctgagaga gaagtgttag agtggagggt tgacagccgc ctagcatttc 9360
 atcacgtggc ccgagagctg catccggagt acttcaagaa ctgctgacat cgagcttgct 9420
 acaagggact ttccgctggg gactttccag ggaggcgtgg cctgggcggg actggggagt 9480

 ggcgagccct cagatgctgc atataagcag ctgctttttg cctgtactgg gtctctctgg 9540
 ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaaccact gcttaagcct 9600
 caataaagct tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgttgtg tgactctggt 9660
 aactagatg cctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa tctctagcac ccaggaggtg 9720
 gaggttgtag tgagccaaga tcgcgccact gcattccagc ctgggcaaga aaacaagact 9780
 gtctaaaata ataataataa gttaagggtg ttaaataat ttatacatgg aggtcataaa 9840
 aatatatata tttgggctgg gcgcagtggc tcacacctgc gcccgccct tttggaggcc 9900

 gaggcagggt gatcacctga gtttgggagt tccagaccag cctgaccaac atggagaaac 9960
 ccttctctg tgtattttta gtagatttta tttatgtgt atttattca caggatttc 10020
 tggaaaactg aaactgtttt tcctctactc tgataccaca agaatcatca gcacagagga 10080
 agacttctgt gatcaaatgt ggtgggagag ggaggttttc accagcacat gagcagtcag 10140
 ttctgccga gactcggcgg gtgtccttcg gttcagttcc aacaccgct gcctggagag 10200
 aggtcagacc acagggtgag ggctcagtc ccaagacata aacaccaag acataaacac 10260
 ccaacaggtc caccgccct gctgcccagg cagagccgat tcaccaagac gggaattagg 10320

 atagagaaag agtaagtcac acagagccgg ctgtgcggga gaacggagtt ctattatgac 10380
 tcaaatcagt ctcccaagc attcggggat cagagttttt aaggataact tagtgtgtag 10440
 ggggccagt agttggagat gaaagcgtag ggagtcgaag gtgtcctttt gcgccagtc 10500
 agttcctggg tgggggccac aagatcggat gagccagttt atcaatccgg gggtgccagc 10560
 tgatccatgg agtgcagggt ctgcaaaata tctcaagcac tgattgatct taggttttac 10620
 aatagtatg ttacccagg aacaatttgg ggaaggtcag aatctgtag cctgtagctg 10680
 catgactcct aaaccataat ttctttttt ttttttttt tttattttg agacagggtc 10740

 tctactctgc acctaggctg gagtgcagt gtgcaatcac agctcactgc agcctcaacg 10800
 tcgtaagtc aagcgtcct cccacctcag cctgctgggt agctgagact acaagcgacg 10860
 cccagttaa tttttgtatt tttggtagag gcagcgtttt gccgtgtggc cctggctggt 10920
 ctgaaactcc tgggctcaag tgatccagcc tcagcctccc aaagtgtgg gacaaccggg 10980
 gccagtcact gcacctggcc ctaaaccata atttctaate ttttggttaa tttgttagtc 11040
 ctacaaaggc agtctagtc ccaggcaaaa agggggtttg tttcgggaaa gggtgttac 11100

tgtctttgtt tcaaactata aactaagttc ctctaaact tagttcggcc tacacccagg 11160

 aatgaacaag gagagcttgg aggttagaag cacgatggaa ttggttaggt cagatctctt 11220
 tcactgtctg agttataatt ttgcaatggt ggttcaaaga ctgcccgtt ctgacaccag 11280
 tcgctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgtctt 11340
 tccgttctct cgtctactga ctgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca 11400
 gctcactcaa agcgggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac 11460
 atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt 11520
 ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcaag tcagaggtgg 11580

 cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc 11640
 tctctgttc cgacctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcggaagc 11700
 gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc 11760
 aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccagcc gctgcgcctt atccggtaac 11820
 tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt 11880
 aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct 11940
 aactacggct acactagaag aacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc 12000

 ttcggaaaaa gatttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgtgg tagcggtggt 12060
 tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg 12120
 atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc 12180
 atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa 12240
 tcaatctaaa gtatatatga gtaaaccttg tctgacagtt accaatgctt aatcagttag 12300
 gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctgtg 12360
 tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga 12420

 gaccacgct caccggtccc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag 12480
 cgcagaagtg gtctgcaac ttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa 12540
 gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc 12600
 atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca 12660
 aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctctccg 12720
 atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttaactca tggttatggc agcactgcat 12780
 aattctctta ctgcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc 12840

aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg 12900
gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgtttctcg 12960
gggcgaaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt 13020
gcaccaact gatcttcage atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca 13080
ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata 13140
ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac 13200
atatttgaat gtatttagaa aaataaaca atagggttc cgcgcacatt tccccgaaaa 13260

gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt 13320
atcacgaggc ctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg 13380
cagctcccg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt 13440
caggcgcgct cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc ggcatcagag 13500
cagattgtac tgagagtga ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga 13560
aaataccgca tcaggcgcca ttcgccattc aggctgcgca actgttggga agggcgatcg 13620
gtgcgggect cttcgctatt acgccagggg aggcagagat tgcagtaagc tgagatcgca 13680

gcactgcact ccagcctggg cgacagagta agactctgtc tcaaaaataa aataaataa 13740
tcaatcagat attccaatct tttcctttat ttatttattt attttctatt ttggaaacac 13800
agtccttctt tattccagaa ttacacatat attctatttt tctttatatg ctccagtttt 13860
ttttagacct tcacctgaaa tgtgtgtata caaatctag gccagtccag cagagcctaa 13920
aggtaaaaaa taaaataata aaaaataaat aaaatctagc tcaactcttc acatcaaaat 13980
ggagatacag ctgttagcat taaataccaa ataaccatc ttgtcctcaa taattttaag 14040
cgctctctc caccacatct aactcctgtc aaaggcatgt gcccttccg ggcgctctgc 14100

tgtgtgccca accaactggc atgtggactc tgcagggtcc ctaactgcca agccccacag 14160
tgtgccctga ggctgccct tcttctagc ggctgcccc actcggcttt gctttcccta 14220
gtttcagtta ctgctgtca gccaaagtct gaaactaggt gcgcacagag cggttaagact 14280
gcgagagaaa gagaccagct ttacaggggg tttatcacag tgcacctga cagtcgtcag 14340
ctcacaggg ggtttatcac attgcacct gacagtcgtc agcctcacag ggggtttatc 14400
acagtgcacc cttacaatca ttccatttga ttcacaattt ttttagtctc tactgtgcct 14460
aacttgaag ttaaatttga tcagagggtg gttcccagag gggaaaacag tatatacagg 14520

gttcagtact atcgcatctc aggcctccac ctgggtcttg gaatgtgtcc cccgaggggt 14580
gatgactacc tcagttggat ctccacaggt cacagtga caagataacc aagacacctc 14640
ccaaggctac cacaatgggc cgccctccac gtgcacatgg ccggaggaa tgccatgtcg 14700

gaggtgcaag cacacctgcg catcagagtc cttggtgtgg agggaggagac cagcgcagct 14760
tccagccatc cacctgatga acagaacctt gggaaagccc cagttctact tacaccagga 14820
aaggc 14825

<210> 5

<211> 8733

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> The nucleotide sequence from 5' LTR to 3' LTR in pTHTK

<400> 5

tggaagggtc aatttggtcc caaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca 60
cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggtac agatatccac 120
tgacctttgg atggtgcttc aagttagtac cagttgaacc agagcaagta gaaggagcca 180
atgaaggaga gaacaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggaccgag 240
agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccag 300
agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg 360

ctggggactt tccaggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat 420
gtacatatata agcagctgct ttttcctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga 480
gcctgggagc tctctggcta actagggaac cactgctta agcctcaata aagcttgctt 540
tgagtgtcga aagttagtgt tgccgtctg ttgtgtgact ctggttaacta gagatccctc 600
agaccctttt agtcagtggt gaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag 660
cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttctgtaa gcgcgcacgg 720
caagaggcga ggggcggcga ctggtgagta cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga 780

aggagagaga tgggtgagc agcgtcggta ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa 840
aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca 900
agcaggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt 960
agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca 1020
ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc 1080
aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa 1140
gcagcagctg acacaggaaa caacagccag gtcagccaaa attacctat agtcagaac 1200

ctccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaatgc atgggtaaaa 1260
glagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtaataacca tgttttcagc attatcagaa 1320

ggagccaccc cacaagattt aaataccatg ctaaacacag tggggggaca tcaagcagcc 1380
 atgcaaatgt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag aatgggatag attgcatcca 1440
 gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac caagggaag tgacatagca 1500
 ggaactacta gtacccttca ggaacaaata ggatggatga cacataatcc acctatccca 1560
 gtaggagaaa tctataaaag atggataatc ctgggattaa ataaaatagt aagaatgtat 1620

 agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaagg aaccctttag agactatgta 1680
 gaccgattct ataaaactct aagagccgag caagcttcac aagaggtaaa aaattggatg 1740
 acagaaacct tgttgggtcca aaatgcgaac ccagattgta agactatgtt aaaagcattg 1800
 ggaccaggag cgacactaga agaaatgatg acagcatgtc agggagtggg gggacccggc 1860
 cataaagcaa gatttttggc tgaagcaatg agccaagtaa caaatccagc taccataatg 1920
 atacagaaag gcaatttttag gaaccaaaga aagactgtta agtgtttcaa ttgtggcaaa 1980
 gaagggcaca tagccaaaaa ttgcagggcc cctaggaaaa agggctgttg gaaatgtgga 2040

 aaggaaggac accaaatgaa agattgtact gagagacagg ctaatttttt aggaagatc 2100
 tggccttccc acaagggaag gccaggaat tttcttcaga gcagaccaga gccaacagcc 2160
 ccaccagaag agagcttcag gtttggggaa gagacaacaa ctccctctca gaagcaggag 2220
 ccgatagaca aggaactgta tcttttagct tccctcagat cactctttgg cagcgacccc 2280
 tctgcacaat aaagataggg gggcaattaa aggaagctct attagataca ggagcagatg 2340
 atacagtatt agaagaaatg aatttgccag gaagatggaa accaaaaatg atagggggaa 2400
 ttggaggttt tatcaaagta agacagtatg atcagatact catagaaatc tgcggacata 2460

 aagctatagg tacagtatta gtaggacctt cacctgtcaa cataattgga agaaatctgt 2520
 tgactcagat tgctgcact ttaaattttc ccattagtcc tattgagact gtaccagtaa 2580
 aattaaagcc aggaatggat ggcccaaaag ttaacaatg gccattgaca gaagaaaaaa 2640
 taaaagcatt agtagaaatt tgtacagaaa tggaaaagga aggaaaaatt tcaaaaattg 2700
 ggctgaaaa tccatacaat actccagtat ttgccataaa gaaaaaagac agtactaaat 2760
 ggagaaaatt agtagatttc agagaactta ataagagaac tcaagatttc tgggaagttc 2820
 aattaggaat accacatcct gcagggttaa aacagaaaaa atcagtaaca gtactggatg 2880

 tggcgatgc atatttttca gtcccttag ataaagactt caggaagtat actgcattta 2940
 ccatacctag tataaacaat gagacaccag ggattagata tcagtacaat gtgcttcac 3000
 agggatggaa aggatcacca gcaatattcc agttagcat gacaaaaatc ttagagcctt 3060
 ttagaaaaca aaatccagac atagtcactt atcaatacat ggatgatttg tatgtaggat 3120
 ctgacttaga aatagggcag catagaacaa aaatagagga actgagacaa catctgttga 3180

ggtggggatt taccacacca gacaaaaaac atcagaaaga acctccattc ctttggatgg 3240
 gttatgaact ccatcctgat aaatggacag tacagcctat agtgctgcca gaaaaggaca 3300

 gctggactgt caatgacata cagaaattag tgggaaaatt gaattgggca agtcagattt 3360
 atgcagggat taaagtaagg caattatgta aacttcttag gggaaccaa gcactaacag 3420
 aagtagtacc actaacagaa gaagcagagc tagaactggc agaaaacagg gagattctaa 3480
 aagaaccggt acatggagtg tattatgacc catcaaaaga cttaatagca gaaatacaga 3540
 agcaggggca aggccaatgg acatatcaa tttatcaaga gccatttaa aatctgaaaa 3600
 caggaaagta tgcaagaatg aagggtgccc acactaatga tgtgaaacaa ttaacagagg 3660
 cagtacaaaa aatagccaca gaaagcatag taatatgggg aaagactcct aaatttaa 3720

 taccataca aaaggaaaca tgggaagcat ggtggacaga gtattggcaa gccacctgga 3780
 ttcctgagt ggagtttgc aataccctc ccttagtgaa gttatggtac cagttagaga 3840
 aagaacccat aataggagca gaaactttct atgtagatgg ggcagccaat agggaaacta 3900
 aattaggaaa agcaggatat gtaactgaca gaggaagaca aaaagtgtc cccctaacgg 3960
 acacaacaaa tcagaagact gagttacaag caattcatct agctttgcag gattcgggat 4020
 tagaagtaa catagtaca gactcacaat atgcattggg aatcattcaa gcacaaccag 4080
 ataagagtga atcagagtta gtcagtcaa taatagagca gttataaaa aaggaaaaag 4140

 tctacctggc atgggtacca gcacacaaag gaattggagg aaatgaacaa gtagataaat 4200
 tggctagtc tggaatcagg aaagtactat ttttagatgg aatagataag gcccagaag 4260
 aacatgagaa atatcacagt aattggagag caatggctag tgattttaac ctaccacctg 4320
 tagtagcaaa agaaatagta gccagctgtg ataaatgtca gctaaaaggg gaagccatgc 4380
 atggacaagt agactgtagc ccaggaatat ggcagctaga ttgtacacat ttagaaggaa 4440
 aagttatctt ggtagcagtt catgtagcca gtggatatat agaagcagaa gtaattccag 4500
 cagagacagg gcaagaaaca gcatacttcc tcttaaatt agcaggaaga tggccagtaa 4560

 aaacagtaca tacagacaat ggcagcaatt tcaccagtac tacagttaag gccgcctgtt 4620
 ggtggcgagg gatcaagcag gaatttggca ttcctacaa tccccaaagt caaggagtaa 4680
 tagaatctat gaataaagaa ttaaagaaaa ttataggaca ggtaagagat caggctgaac 4740
 atcttaagac agcagtaca atggcagtat tcatccacaa ttttaaaaga aaagggggga 4800
 ttggggggta cagtgcagg gaaagaatag tagacataat agcaacagac atacaacta 4860
 aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaattttcg ggtttattac agggacagca 4920

gagatccagt ttggaaagga ccagcaaagc tcctctggaa aggtgaaggg gcagtagtaa 4980

tacaagataa tagtgacata aaagtagtgc caagaagaaa agcaaagatc atcagggatt 5040

atggaaaaca gatggcaggt gatgattgtg tggcaagtag acaggatgag gattaacaca 5100

tggaaaagat tagtaaaaca ccatatgtat atttcaagga aagctaagga ctggttttat 5160

agacatcact atgaaagtac taatccaaaa ataagttcag aagtacacat cccactaggg 5220

gatgctaaat tagtaataac aacatattgg ggtctgcata caggagaaag agactggcat 5280

ttgggtcagg gagtctccat agaattggagg aaaaagagat atagcacaca agtagaccct 5340

gacctagcag accaactaat tcctctgcac tattttgatt gtttttcaga atctgctata 5400

agaaatacca tattaggacg tatagttagt cctaggtgtg aatatcaagc aggacataac 5460

aaggtaggat ctctacagta cttggcacta gcagcattaa taaaaccaa acagataaag 5520

ccacctttgc ctagtgttag gaaactgaca gaggacagat ggaacaagcc ccagaagacc 5580

aagggccaca gaggagacca tacaatgaat ggacactaga gcttttagag gaacttaaga 5640

gtgaagctgt tagacatttt cctaggatat ggctccataa cttaggacaa catatctatg 5700

aaacttacgg ggatacttgg gcaggagtgg aagccataat aagaattctg caacaactgc 5760

tgtttatcca tttcagaatt ggggtgtcgac atagcagaat aggcgttact cgacagagga 5820

gagcaagaaa tggagccagt agatcctaga ctagagccct ggaagcatcc aggaagtcag 5880

cctaaaactg ctgtaccaa ttgctattgt aaaaagtgtt gctttcattg ccaagtttgt 5940

ttcatgacaa aagccttagg catctcctat ggcaggaaga agcggagaca gcgacgaaga 6000

gtcatcaga acagtcagac tcatcaagct tctctatcaa agcagtaagt agtacatgta 6060

atgcaaccta taatagtagc aatagtagca ttagtagtag caataataat agcaatagtt 6120

gtgtggtcca tagtaatcat agaatatagg aaaatatata gacaaagaaa aatagacagg 6180

ttaattgata gactaataga aagagcagaa gacagtggca atgagagtga aggagaagta 6240

tcagcacttg tggagatggg ggtggaaatg gggcaccatg ctccctggga tattgatgat 6300

ctgtagtgtc acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat ggggatcttc agacctggag 6360

gaggcgatat gagggacaat tggagaagtg aattatataa atataaagta gtaaaaattg 6420

aaccattagg agtagcacc accaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag 6480

cagtgggaat aggagctttg ttcccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggag 6540

cagcgtcaat gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctgatata gtgcagcagc 6600

agaacaattt gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg 6660

gcatcaaca gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc 6720
 tcctggggat ttgggggttc tctggaaaac tcatttgcac cactgctgtg ccttggaatg 6780
 ctagttggag taataaatct ctggaacaga ttggaataa catgacctgg atggagtggg 6840
 acagagaaat taacaattac acaagcttaa tacactcctt aattgaagaa tcgcaaaacc 6900
 agcaagaaaa gaatgaacaa gaattattgg aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt 6960
 ggtttaacat acaaaattgg ctgtggtata taaaattatt cataatgata gtaggaggct 7020
 tggtaggttt aagaatagtt ttgtctgtac ttctatagt gaatagagtt aggcagggat 7080

 attcaccatt atcgtttcag acccacctcc caatcccag gggacccgac aggcccgaa 7140
 gaatagaaga agaaggtgga gagagagaca gagacagatc cattcgatta gtgaacggat 7200
 ccttagcact tatctgggac gatctgcgga gcctgtgcct cttcagctac caccgcttga 7260
 gagacttact cttgattgta acgaggattg tggaacttct gggacgcagg ggggtgggaag 7320
 ccctcaaata ttggtggaat ctccctacagt attggagtca ggaactaaag aatagtgtg 7380
 ttatcgaatt cctgcagccc gggggatccg agctcggtac caagcttaag tttaaagct 7440
 agcatggctt cgtacccccg ccatcaacac gcgtctgcgt tcgaccagge tgcgcgttct 7500

 cgcgcccata gcaaccgacg tacggcgttg cgccctcgcc ggcagcaaga agccacggaa 7560
 gtccgcccgg agcagaaaaat gccacgcta ctgcgggttt atatagacgg tccccacggg 7620
 atggggaaaa ccaccaccac gcaactgctg gtggccctgg gttcgcgcga cgataacttg 7680
 ctcaatgcca cagccatagc agtagctgag gggacagata gggttataga agtattacaa 7740
 gcagcttata gagctattcg ccacatacct agaagaataa gacagggtt ggaaaggatt 7800
 ttgtataag atgggtggca agtgggtcaa aagtagtgtg attggatggc ctgctgtaag 7860
 ggaaagaatg agacgagctg agccagcagc agatggggtg ggagcagtat ctcgagacct 7920

 agaaaaacat ggagcaatca caagtagcaa tacagcagct aacaatgctg cttgtgcctg 7980
 gctagaagca caagaggagg aagaggtggg tttccagtc acacctcagg tacctttaag 8040
 accaatgact tacaaggcag ctgtagatct tagccacttt ttaaaagaaa aggggggact 8100
 ggaagggtta attcactccc aaagaagaca agatatectt gatctgtgga tctaccacac 8160
 acaaggctac ttccctgatt ggcagaacta cacaccaggg ccagggttca gatatccact 8220
 gacctttgga tgggtgtaca agctagtacc agttgagcca gataaggtag aagaggccaa 8280
 taaaggagag aacaccagct tgttacacc tgtgagcctg catggaatgg atgacctga 8340

 gagagaagtg ttagagtgga ggtttgacag ccgcctagca ttcatcacg tggcccgaga 8400
 gctgcatccg gactacttca agaactgctg acatcgagct tgctacaagg gactttccgc 8460
 tggggacttt ccaggggaggc gtggcctggg cgggactggg gagtggcgag ccctcagatg 8520

ctgcatataa gcagctgctt ttgcctgia ctgggtctct ctggtagac cagatctgag 8580
 cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgctt 8640
 gagtgttca agtagtgtgt gcccgctctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca 8700
 gaccctttta gtcagtgtgg aaaatctcta gca 8733

<210> 6

<211> 1212

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> PTEN CDS

<400> 6

atgacagcca tcatcaaaga gatcgttagc agaaacaaaa ggagatatca agaggatgga 60
 ttcgacttag acttgaccta tatttatcca aacattattg ctatgggatt tcctgcagaa 120
 agacttgaag gcgtatacag gaacaatatt gatgatgtag taaggttttt ggattcaaag 180
 cataaaaaacc attacaagat atacaatctt tgtgtgaaa gacattatga caccgcaaaa 240
 tttaattgca gagtigcaca atatcctttt gaagaccata acccaccaca gctagaactt 300
 atcaaaccct ttgtgaaga tcttgaccaa tggctaagtg aagatgacaa tcatgttgca 360

gcaattcact gtaaagctgg aaaggacga actggtgtaa tgatatgtgc atatttatta 420
 catcggggca aatttttaaa ggcacaagag gccctagatt tctatgggga agtaaggacc 480
 agagacaaaa agggagtaac tattcccagt cagaggcgct atgtgtatta ttatagctac 540
 ctgttaaaga atcatctgga ttatagacca gtggcactgt tgtttcacia gatgatgttt 600
 gaaactattc caatgttcag tggcggaact tgcaatctc agtttgttgt ctgccagcta 660
 aaggtaaga tatattcctc caattcagga cccacacgac gggaagacaa gttcatgtac 720
 tttagattcc ctgagccgtt acctgtgtgt ggtgatatca aagtagagtt ctccacaaa 780

cagaacaaga tgctaaaaaa ggacaaaatg ttccactttt gggtaaatac attcttcata 840
 ccaggaccag aggaaacctc agaaaaagta gaaaatggaa gtctatgtga tcaagaaatc 900
 gatagcattt gcagtataga gcgtgcagat aatgacaagg aatatctagt acttacttta 960
 acaaaaaatg atcttgacaa agcaataaaa gacaaagcca accgatactt ttctccaaat 1020
 tttaaggatga agctgtactt cacaaaaaca gtagaggagc cgtcaaatcc agaggetagc 1080
 agttcaactt ctgtaacacc agatgttagt gacaatgaac ctgatcatta tagatatctt 1140
 gacaccactg actctgatcc agagaatgaa ccttttgatg aagatcagca tacacaaatt 1200

acaaaagtct ga 1212

<210> 7

<211> 1683

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> CDC6 CDS

<400> 7

atgcctcaaa cccgatccca ggcacaggct acaatcagtt ttccaaaaag gaagctgtct	60
cgggcattga acaaagctaa aaactccagt gatgccaaac tagaaccaac aaatgtccaa	120
accgtaacct gttctcctcg tgtaaaagcc ctgcctctca gccccaggaa acgtctgggc	180
gatgacaacc tatgcaacac tccccattta cctccttggt ctccaccaa gcaaggcaag	240
aaagagaatg gtccccctca ctacataca cttaaggac gaagattggt atttgacaat	300
cagctgacaa ttaagtctcc tagcaaaaga gaactagcca aagttacca aaacaaaata	360
ctttcttcag ttagaaaaag tcaagagatc acaacaatt ctgagcagag atgtccactg	420
aagaaagaat ctgcatgtgt gagactattc aagcaagaag gcaacttgta ccagcaagca	480
aagctggtcc tgaacacagc tgtccagat cggctgcctg ccagggaag ggagatggat	540
gtcatcagga atttcttgag ggaacacatc tgtgggaaaa aagctggaag cctttacctt	600
tctggtgctc ctggaactgg aaaaactgcc tgcctaagcc ggattctgca agacctcaag	660
aaggaactga aaggctttaa aactatcatg ctgaattgca tgtccttgag gactgcccag	720
gctgtattcc cagctattgc tcaggagatt tgtcaggaag aggtatccag gccagctggg	780
aaggacatga tgaggaaatt ggaaaaacat atgactgcag agaagggccc catgattgtg	840
ttggtattgg acgagatgga tcaactggac agcaaaggcc aggatgtatt gtacacgcta	900
tttgaatggc catggctaag caattctcac ttggtgctga ttggtattgc taataccctg	960
gatctcacag atagaattct acctaggctt caagctagag aaaaatgtaa gccacagctg	1020
ttgaacttcc caccttatac cagaaatcag atagtcacta ttttgcaaga tcgacttaat	1080
caggtatcta gagatcaggt tctggacaat gctgcagttc aattctgtgc ccgcaaagtc	1140
tctgctgttt caggagatgt tcgcaaagca ctggatgttt gcaggagagc tattgaaatt	1200
gtagagttag atgtcaaaag ccagactatt ctcaaaccac tgtctgaatg taaatcacct	1260
tctgagcctc tgattcccaa gaggtttggt ctattcaca tatccaagt catctcagaa	1320
gttgatggta acaggatgac cttgagccaa gaaggagcac aagattcctt ccctcttcag	1380
cagaagatct tggtttgctc ttgatgctc ttgatcaggc agttgaaaat caaagaggtc	1440
actctgggga agttatatga agcctacagt aaagtctgtc gcaaacagca ggtggcggct	1500

gtggaccagt cagagtgttt gtcactttca gggctcttgg aagccagggg catTTtagga 1560

ttaaagagaa acaaggaaac ccgtttgaca aaggtgtttt tcaagattga agagaaagaa 1620

atagaacatg ctctgaaaga taaagcttta attggaaata tcttagctac tggattgcct 1680

taa 1683

<210> 8

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Oligonucleotide Cdc6-5-A

<400> 8

gatccccagg cacttgctac cagcaattca agagattgct ggtagcaagt gcctTTTTtg 60

gaaa 64

<210> 9

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Oligonucleotide Cdc6-3-A

<400> 9

agcttttcca aaaaaggcac ttgctaccag caatctcttg aattgctggt agcaagtgcc 60

tggg 64

<210> 10

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> DNA sequence which encodes CDC6 shRNA

<400> 10

cccaggcact tgctaccagc aattcaagag attgctggta gcaagtcct tttttggaaa 60

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer B-NLR8950

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Biotynylated
 <400> 11
 gtgcctggct agaagcaca g 21
 <210> 12
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Oligonucleotide HD-A
 <400> 12
 cagcggtcgc atcatatctc caggtgtgac ag 32
 <210> 13
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Oligonucleotide HD-S
 <220><221> misc_feature
 <222> (36)..(37)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 13
 cctctgtcac acctggagat atgatgacgac gcgtggn 37
 <210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Forward primer BHU5-S2
 <400> 14
 gagtgctcaa agtagtggt 19
 <210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Reverse primer HDA/SBOT

<400> 15
ctgtcacacc tggagatatg at 22
<210> 16
<211>
24
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> Primer 5' LTRU5
<400> 16
tctggctaac tagggaaccc actg 24
<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> Primer 3' NL5850
<400> 17
gctatgtcga cacccaattc tgaa 24
<210> 18
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> Primer 3' NL8960
<400> 18
tgtgcttcta gccaggcaca agc 23
<210> 19
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial sequence
<220><223> The nucleotide sequence of antisense sequence of CDC6 shRNA
<400> 19
uugcugguag caagugccu 19
<210> 20
<211> 9
<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220><223> The nucleotide sequence of linker of CDC6 shRNA

<400> 20

uucaagaga

9

<210> 21

<211> 312

<212> DNA

<213> Simian virus 40

<400> 21

agctttgcaa agatggataa agttttaaac agagaggaat ctttgcagct aatggacctt 60
ctaggtcttg aaaggagtgc ctgggggaat attcctctga tgagaaaggc atatttaaaa 120
aaatgcaagg agtttcatcc tgataaagga ggagatgaag aaaaaatgaa gaaaatgaat 180
actctgtaca agaaaatgga agatggagta aaatatgctc atcaacctga ctttggaggc 240
ttctgggatg caactgaggt atttgcttct tccttaaate ctggtgttga tgcaatgtac 300
tgcaacaat gg 312

<210> 22

<211> 403

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 22

Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr

1 5 10 15

Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile

20 25 30

Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn

35 40 45

Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu Asp Ser Lys His Lys Asn His

50 55 60

Tyr Lys Ile Tyr Asn Leu Cys Ala Glu Arg His Tyr Asp Thr Ala Lys

65 70 75 80

Phe Asn Cys Arg Val Ala Gln Tyr Pro Phe Glu Asp His Asn Pro Pro

85 90 95

Gln Leu Glu Leu Ile Lys Pro Phe Cys Glu Asp Leu Asp Gln Trp Leu
100 105 110

Ser Glu Asp Asp Asn His Val Ala Ala Ile His Cys Lys Ala Gly Lys
115 120 125

Gly Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala Tyr Leu Leu His Arg Gly Lys
130 135 140

Phe Leu Lys Ala Gln Glu Ala Leu Asp Phe Tyr Gly Glu Val Arg Thr
145 150 155 160

Arg Asp Lys Lys Gly Val Thr Ile Pro Ser Gln Arg Arg Tyr Val Tyr
165 170 175

Tyr Tyr Ser Tyr Leu Leu Lys Asn His Leu Asp Tyr Arg Pro Val Ala
180 185 190

Leu Leu Phe His Lys Met Met Phe Glu Thr Ile Pro Met Phe Ser Gly
195 200 205

Gly Thr Cys Asn Pro Gln Phe Val Val Cys Gln Leu Lys Val Lys Ile
210 215 220

Tyr Ser Ser Asn Ser Gly Pro Thr Arg Arg Glu Asp Lys Phe Met Tyr
225 230 235 240

Phe Glu Phe Pro Gln Pro Leu Pro Val Cys Gly Asp Ile Lys Val Glu
245 250 255

Phe Phe His Lys Gln Asn Lys Met Leu Lys Lys Asp Lys Met Phe His
260 265 270

Phe Trp Val Asn Thr Phe Phe Ile Pro Gly Pro Glu Glu Thr Ser Glu
275 280 285

Lys Val Glu Asn Gly Ser Leu Cys Asp Gln Glu Ile Asp Ser Ile Cys
290 295 300

Ser Ile Glu Arg Ala Asp Asn Asp Lys Glu Tyr Leu Val Leu Thr Leu
305 310 315 320

Thr Lys Asn Asp Leu Asp Lys Ala Asn Lys Asp Lys Ala Asn Arg Tyr
325 330 335

Phe Ser Pro Asn Phe Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Lys Thr Val Glu

340 345 350
 Glu Pro Ser Asn Pro Glu Ala Ser Ser Ser Thr Ser Val Thr Pro Asp
 355 360 365
 Val Ser Asp Asn Glu Pro Asp His Tyr Arg Tyr Ser Asp Thr Thr Asp
 370 375 380

Ser Asp Pro Glu Asn Glu Pro Phe Asp Glu Asp Gln His Thr Gln Ile
 385 390 395 400
 Thr Lys Val

<210> 23

<211> 471

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(471)

<400> 23

atg gag ccg gcg gcg ggg agc agc atg gag cct tcg gct gac tgg ctg 48
 Met Glu Pro Ala Ala Gly Ser Ser Met Glu Pro Ser Ala Asp Trp Leu
 1 5 10 15
 gcc acg gcc gcg gcc cgg ggt cgg gta gag gag gtg cgg gcg ctg ctg 96

Ala Thr Ala Ala Ala Arg Gly Arg Val Glu Glu Val Arg Ala Leu Leu
 20 25 30
 gag gcg ggg gcg ctg ccc aac gca ccg aat agt tac ggt cgg agg ccg 144
 Glu Ala Gly Ala Leu Pro Asn Ala Pro Asn Ser Tyr Gly Arg Arg Pro
 35 40 45
 atc cag gtc atg atg atg ggc agc gcc cga gtg gcg gag ctg ctg ctg 192
 Ile Gln Val Met Met Met Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu

50 55 60
 ctc cac ggc gcg gag ccc aac tgc gcc gac ccc gcc act ctc acc cga 240
 Leu His Gly Ala Glu Pro Asn Cys Ala Asp Pro Ala Thr Leu Thr Arg
 65 70 75 80
 ccc gtg cac gac gct gcc cgg gag ggc ttc ctg gac acg ctg gtg gtg 288

Pro Val His Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu Val Val
85 90 95

ctg cac cgg gcc ggg gcg cgg ctg gac gtg cgc gat gcc tgg ggc cgt 336
Leu His Arg Ala Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly Arg
100 105 110

ctg ccc gtg gac ctg gct gag gag ctg ggc cat cgc gat gtc gca cgg 384
Leu Pro Val Asp Leu Ala Glu Glu Leu Gly His Arg Asp Val Ala Arg
115 120 125

tac ctg cgc gcg gct gcg ggg ggc acc aga ggc agt aac cat gcc cgc 432

Tyr Leu Arg Ala Ala Ala Gly Gly Thr Arg Gly Ser Asn His Ala Arg
130 135 140

ata gat gcc gcg gaa ggt ccc tca gac atc ccc gat tga 471
Ile Asp Ala Ala Glu Gly Pro Ser Asp Ile Pro Asp
145 150 155

<210> 24
<211> 156
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 24

Met Glu Pro Ala Ala Gly Ser Ser Met Glu Pro Ser Ala Asp Trp Leu

1 5 10 15
Ala Thr Ala Ala Ala Arg Gly Arg Val Glu Glu Val Arg Ala Leu Leu
20 25 30
Glu Ala Gly Ala Leu Pro Asn Ala Pro Asn Ser Tyr Gly Arg Arg Pro
35 40 45
Ile Gln Val Met Met Met Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu
50 55 60
Leu His Gly Ala Glu Pro Asn Cys Ala Asp Pro Ala Thr Leu Thr Arg

65 70 75 80
Pro Val His Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu Val Val
85 90 95

Leu His Arg Ala Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly Arg
 100 105 110
 Leu Pro Val Asp Leu Ala Glu Glu Leu Gly His Arg Asp Val Ala Arg
 115 120 125
 Tyr Leu Arg Ala Ala Ala Gly Gly Thr Arg Gly Ser Asn His Ala Arg

130 135 140
 Ile Asp Ala Ala Glu Gly Pro Ser Asp Ile Pro Asp
 145 150 155

<210> 25

<211> 831

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> pCMV p16INK4a

<400> 25

agtacggcgg ccagtgtgct ggaattcacc accatggagc cttcggtga ctggctggcc 60
 acggccgcgg cccggggctcg ggtagaggag gtgcgggcgc tgctggaggc gggggcgctg 120
 cccaacgcac cgaatagtta cggtcggagg ccgatccagg tcatgatgat gggcagcgcc 180
 cgagtggcgg agctgctgct gctccacggc gcggagccca actgcgccga ccccgccact 240

ctcacccgac ccgtgcacga cgctccccgg gagggcttcc tggacacgct ggtggtgctg 300
 caccggggcgg gggcgcggtt ggacgtgcgc gatgcctggg gccgtctgcc cgtggacctg 360
 gctgaggagc tgggccatcg cgatgtcgca cggtaacctgc gcgcggctgc ggggggcacc 420
 agaggcagta accatgcccc catagatgcc gcggaaggtc cctcagatat ccccgattga 480
 ctcgagcatg catctagagg gccctattct atagtgtcac ctaaatgcta gagctcgctg 540
 atcagcctcg actgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt gtttgcctt ccccgctgcc 600
 ttctctgacc ctggaagggt ccaactccac tgctctttcc taataaaatg aggaaattgc 660

atcgcatgtg ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt ggggtggggc aggacagcaa 720
 gggggaggat tgggaagaca atagcaagca tgctggggat gcggtgggct ctatggcttc 780
 tgaggcggaa agaaccagct ggggctctag ggggtatccc cacgcgcctt g 831

<210> 26

<211> 1182

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(1182)

<400> 26

atg gag gag ccg cag tca gat cct agc gtc gag ccc cct ctg agt cag 48

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln

1 5 10 15

gaa aca ttt tca gac cta tgg aaa cta ctt cct gaa aac aac gtt ctg 96

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu

20 25 30

tcc ccc ttg ccg tcc caa gca atg gat gat ttg atg ctg tcc ccg gac 144

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp

35 40 45

gat att gaa caa tgg ttc act gaa gac cca ggt cca gat gaa gct ccc 192

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro

50 55 60

aga atg cca gag gct gct ccc cgc gtg gcc cct gca cca gca gct cct 240

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Arg Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro

65 70 75 80

aca ccg gcg gcc cct gca cca gcc ccc tcc tgg ccc ctg tca tct tct 288

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser

85 90 95

gtc cct tcc cag aaa acc tac cag ggc agc tac ggt ttc cgt ctg ggc 336

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly

100 105 110

ttc ttg cat tct ggg aca gcc aag tct gtg act tgc acg tac tcc cct 384

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro

115 120 125

gcc ctc aac aag atg ttt tgc caa ctg gcc aag acc tgc cct gtg cag 432

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln

130 135 140

ctg tgg gtt gat tcc aca ccc ccg ccc ggc acc cgc gtc cgc gcc atg 480

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
 145 150 155 160
 gcc atc tac aag cag tca cag cac atg acg gag gtt gtg agg cgc tgc 528

 Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
 165 170 175
 ccc cac cat gag cgc tgc tca gat agc gat ggt ctg gcc cct cct cag 576
 Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
 180 185 190
 cat ctt atc cga gtg gaa gga aat ttg cgt gtg gag tat ttg gat gac 624
 His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp

 195 200 205
 aga aac acttttt cga cat agt gtg gtg gtg ccc tat gag ccg cct gag 672
 Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
 210 215 220
 gtt ggc tct gac tgt acc acc atc cac tac aac tac atg tgt aac agt 720
 Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
 225 230 235 240

 tcc tgc atg ggc ggc atg aac cgg agg ccc atc ctc acc atc atc aca 768
 Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
 245 250 255
 ctg gaa gac tcc agt ggt aat cta ctg gga cgg aac agc ttt gag gtg 816
 Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
 260 265 270
 cgt gtt tgt gcc tgt gct ggg aga gac cgg cgc aca gag gaa gag aat 864

 Arg Val Cys Ala Cys Ala Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
 275 280 285
 ctc cgc aag aaa ggg gag cct cac cac gag ctg ccc cca ggg agc act 912
 Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
 290 295 300
 aag cga gca ctg ccc aac aac acc agc tcc tct ccc cag cca aag aag 960

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys

305 310 315 320
aaa cca ctg gat gga gaa tat ttc acc ctt cag atc cgt ggg cgt gag 1008

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
325 330 335

cgc ttc gag atg ttc cga gag ctg aat gag gcc ttg gaa ctc aag gat 1056
Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
340 345 350

gcc cag gct ggg aag gag cca ggg ggg agc agg gct cac tcc agc cac 1104
Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
ctg aag tcc aaa aag ggt cag tct acc tcc cgc cat aaa aaa ctc atg 1152

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
370 375 380

ttc aag aca gaa ggg cct gac tca gac tga 1182
Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp

385 390

<210> 27

<211> 393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln

1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu

20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp

35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro

50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Arg Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro

65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
 85 90 95
 Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
 100 105 110

 Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
 115 120 125
 Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
 130 135 140
 Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
 145 150 155 160
 Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
 165 170 175

 Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
 180 185 190
 His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
 195 200 205
 Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
 210 215 220
 Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
 225 230 235 240

 Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
 245 250 255
 Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
 260 265 270
 Arg Val Cys Ala Cys Ala Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
 275 280 285
 Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
 290 295 300

 Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
 305 310 315 320
 Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu

	325		330		335
Arg	Phe	Glu	Met	Phe	Arg
Glu	Leu	Asn	Glu	Ala	Leu
Glu	Leu	Lys	Asp		
	340		345		350
Ala	Gln	Ala	Gly	Lys	Glu
Pro	Gly	Gly	Ser	Arg	Ala
His	Ser	Ser	His		
	355		360		365
Leu	Lys	Ser	Lys	Lys	Gly
Gln	Ser	Thr	Ser	Arg	His
Lys	Lys	Leu	Met		
	370		375		380
Phe	Lys	Thr	Glu	Gly	Pro
Asp	Ser	Asp			
	385		390		