



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년12월21일
 (11) 등록번호 10-1002955
 (24) 등록일자 2010년12월15일

(51) Int. Cl.
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
C07K 14/15 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2004-7017296
 (22) 출원일자(국제출원일자) 2003년04월25일
 심사청구일자 2008년03월25일
 (85) 번역문제출일자 2004년10월26일
 (65) 공개번호 10-2005-0008697
 (43) 공개일자 2005년01월21일
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2003/001597
 (87) 국제공개번호 WO 2003/091442
 국제공개일자 2003년11월06일
 (30) 우선권주장
 60/375,654 2002년04월26일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 Journal of Virology Vol.75(9)
 pp.4129-4138(2001년 5월)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 인스티튜트 클레이톤 드 라 리쎬르세
 스위스 체하-1211 주네브 4 카세 포스탈 745
 인쎬(인스티튜트 내셔널 드 라 쎬테 에 드 라 리
 세르세메디칼르)
 프랑스. 에프-75013 파리 튀 드 툴비아크 101
 (72) 발명자
 트로노디디에르
 스위스 체하-1245 콜론지 세민 드 수-세르 4
 코세트프랑소아즈-로익
 프랑스 에프-69007 리옹 튀 가리발디 304
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 34 항

심사관 : 박영관

(54) 개선된 키메라 당단백질 및 슈도타입 렌티바이러스 벡터

(57) 요약

본 발명은 개선된 키메라 당단백질(GP) 및 상기 당단백질로써 슈도타입화된 개선된 렌티바이러스 벡터를 제공한다. 본 발명은 또한 상기 당단백질 및 벡터의 제조 방법 및 조성물을 제공한다. 상기 개선된 키메라 GP는 MLV-A GP의 세포질 테일에 융합되는 GALV 또는 RD114 GP의 막관통 세포외 도메인을 코딩한다. 상기 GALV/TR 및 RD114/TR GP 키메라로써 슈도타입화된 벡터는 어버이 GP로 코딩된 벡터보다 유의하게 높은 역치를 갖는다. 나아가, RD114/TR-슈도타입화된 벡터는 효율적으로 농축되며, 인간 및 마카크 원숭이 혈청의 강화에 의해 유발되는 불활성화에 대해 내성이다. RD114 GP-슈도타입화된 렌티바이러스 벡터는 생체내 유전자 운반 용도로 특히 유용하다.

(72) 발명자

산드린버지니

프랑스 에프-69007 리옹 뒤 뒤프낭 콜로벨 기라르
18 레지던스 르 로다니앵

보손베르트랑

프랑스 에프-69007 리옹 뒤 가리발디 317 레지던스
르 벨라스퀘즈

네그르디디에르

프랑스 에프-69003 리옹 뒤 데 튀리에르 13

살몬페트릭

프랑스 에프-74800 아렌톤 로트 살란데

특허청구의 범위

청구항 1

MLV-A(Murine Leukemia Virus-A) 유래의 세포질 테일(cytoplasmic tail) 도메인; 및 고양이가 내생 바이러스 RD114 유래의 막관통(transmembrane) 세포외 도메인을 포함하는 키메라 당단백질(chimeric glycoprotein).

청구항 2

제1항의 키메라 당단백질을 코딩하는 핵산.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 핵산이 SEQ ID NO: 1의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산.

청구항 4

제2항의 핵산을 포함하는 발현 구조체.

청구항 5

제4항의 구조체에 의해 트랜스펙션된 세포.

청구항 6

제1항의 키메라 당단백질을 포함하는 벡터 미립(vector particle).

청구항 7

제6항에 있어서,
상기 미립이 슈도타입화된(pseudotyped) 벡터 미립인 것을 특징으로 하는 벡터 미립.

청구항 8

제6항에 있어서,
상기 미립이 재조합 바이러스 벡터 구조체를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터 미립.

청구항 9

제8항에 있어서,
상기 벡터 구조체가 레트로바이러스(retrovirus) 또는 렌티바이러스(lentivirus)로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 벡터 미립.

청구항 10

제9항에 있어서,
상기 벡터 구조체가 SIV(Simian Immunodeficiency Virus)로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 벡터 미립.

청구항 11

제9항에 있어서,
상기 벡터 구조체가 HIV(Human Immunodeficiency Virus)로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 벡터 미립.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 벡터 구조체가 트랜스 유전자(transgene)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터 미립.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 트랜스 유전자가 마커(marker) 또는 리포터(reporter) 유전자인 것을 특징으로 하는 벡터 미립.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 트랜스 유전자가 녹색 형광성 단백질(GFP)인 것을 특징으로 하는 벡터 미립.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 트랜스 유전자가 치료제 유전자(therapeutic gene)인 것을 특징으로 하는 벡터 미립.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 트랜스 유전자가 발암 유전자(oncogene) 또는 원발암 유전자(proto-oncogene)인 것을 특징으로 하는 벡터 미립.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 트랜스 유전자가 약물 감수성 유전자(drug susceptibility gene)인 것을 특징으로 하는 벡터 미립.

청구항 18

a) 형질도입될(transduced) 세포를 획득하는 단계;

b) 제8항에 따르는 슈도타입화된 벡터 미립을 획득하는 단계; 및

c) 형질도입(transduction)이 유발되기에 충분한 조건 하에서 상기 세포와 상기 단계 b)의 벡터 미립을 접촉시키는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 시험관 내(*in vitro*) 세포의 형질도입(transduction) 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

형질도입을 증강시키기에 충분한 양의 레트로넥틴(retronectin)을 제공하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 세포의 형질도입 방법.

청구항 20

삭제

청구항 21

a) 형질도입될(transduced) 세포를 획득하는 단계;

b) 제8항에 따르는 슈도타입화된 벡터 미립을 획득하는 단계; 및

c) 형질도입(transduction)이 유발되기에 충분한 조건 하에서 상기 세포와 상기 단계 b)의 벡터 미립을 접촉시키는 단계

를 포함하는, 인간을 제외한 세포의 생체 내(*in vivo*) 형질도입(transduction) 방법.

청구항 22

제18항에 있어서,

상기 세포가 척추동물 세포인 것을 특징으로 하는 세포의 형질도입 방법.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 세포가 영장류 세포인 것을 특징으로 하는 세포의 형질도입 방법.

청구항 24

제22항에 있어서,

상기 세포가 인간 세포인 것을 특징으로 하는 세포의 형질도입 방법.

청구항 25

제18항에 있어서,

상기 세포가 CD34⁺ 또는 PBL(Peripheral Blood Lymphocyte) 세포인 것을 특징으로 하는 세포의 형질도입 방법.

청구항 26

제18항의 방법에 의하여 형질도입된 세포.

청구항 27

a) (i) 적어도 하나의 벡터 구조체,

(ii) 적어도 하나의 포장 구조체(packaging construct), 및

(iii) 제1항의 키메라 당단백질을 코딩하는 발현 구조체

를 세포에 트랜스펙션시켜 생산자 세포(producer cell)를 획득하는 단계;

b) 상기 생산자 세포를 배지 내에서 배양하는 단계; 및

c) 상기 배지로부터 상기 생산자 세포를 분리하여, 상기 배지로부터 상기 재조합 바이러스 벡터 미립을 회수하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 슈도타입 바이러스 벡터 미립의 제조 방법.

청구항 28

재조합 벡터에 의해 세포의 형질도입이 유발되는 조건 하에서, 제27항에 따라 제조된 벡터 미립을 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 시험관 내(*in vitro*) 세포의 형질도입 방법.

청구항 29

제28항에 있어서,

상기 세포가 인간 세포인 것을 특징으로 하는 세포의 형질도입 방법.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 세포가 조혈 줄기 세포(hematopoietic stem cell)인 것을 특징으로 하는 세포의 형질도입 방법.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 세포가 인간 CD34⁺ 세포인 것을 특징으로 하는 세포의 형질도입 방법.

청구항 32

제30항에 있어서,

상기 세포가 줄기 세포의 다중 유효성(pluripotency)을 실질적으로 손상시키지 않고 세포 증식을 자극하도록 처리되는 것을 특징으로 하는 세포의 형질도입 방법.

청구항 33

제조합 벡터에 의해 세포의 형질도입이 유발되는 조건 하에서, 제27항에 따라 제조된 벡터 미립을 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간을 제외한 세포의 생체 내(*in vivo*) 세포의 형질도입 방법.

청구항 34

삭제

청구항 35

제28항에 있어서,

상기 형질도입된 세포가 인간이 아닌 동물 개체 내로 도입되는 것을 특징으로 하는 세포의 형질도입 방법.

청구항 36

삭제

청구항 37

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따르는 렌티바이러스 벡터 미립을 포함하는, 조혈성 또는 림프-조혈성 질환 치료용 의약 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 키메라 당단백질(chimeric glycoprotein) 및 상기 당단백질로써 슈도타입화된(pseudotyped) 개선된 렌티바이러스 벡터(lentiviral vector), 상기 당단백질 및 벡터의 제조 방법 및 조성물, 상기 벡터를 이용한 세포의 시험관내 및 생체내 형질도입 방법에 관한 것이다. 상기 개선된 조성물 및 벡터는 생체내 유전자 운반 용도에 특히 유용하다

배경기술

[0002] 레트로바이러스(retrovirus)로부터 유래되는 벡터는 다양한 바이러스 표면 당단백질(세포 향성을 결정함) 및 상이한 유형의 바이러스 코어(게놈 복제 및 통합을 결정함)의 수많은 가능한 회합(association)에 대하여, 주어진 유전자 운반 용도에 특히 유연한 특성을 제공한다¹. 예컨대, VSV-G 당단백질과 렌티바이러스로부터 유래되는 바이러스 코어의 회합은, 광범위한 향상을 가지며 비증식성 표적 세포 내로 통합될 수 있는 벡터 슈도타입을 초래한다². 이들은 생체외 및 생체내 여러 세포 유형의 형질도입에 유용한 것으로 입증된 바 있다³⁻⁷. 그럼에도 여전히, 대체 바이러스 당단백질로써 슈도타입화된 렌티바이러스 벡터의 특성을 조사하는 분야에 상당한 관심이 기울여지고 있다⁸⁻¹⁵. 이러한 매개변수가 벡터의 물리화학적 특성, 숙주 면역계와의 상호작용, 및 숙주-범위를 조절하는 것으로 여겨진다. 실제, 여러 연구를 통해, 표적 세포의 형질도입 효율이 레트로바이러스 벡터의 코팅에 사용되는 당단백질의 유형에 따라 좌우됨이 확인된 바 있다¹⁶⁻²¹. 게다가, 일부 생체내 유전자 운반 용도에

는, 전신 투여 후 특이적 세포 유입 및/또는 유전자 발현을 위해 표적화된 백터가 요구된다²². 수용체의 광범위한 분포에 기인하여, 원형질막의 지질 성분²³인 VSV-G 슈도타입은 접종 후 표적 세포에 도달하기 전까지 접하는 모든 세포의 표면에 결합할 수 있다. 나아가, VSV-G-슈도타입화된 백터는 인간 혈청에 의해 급속하게 불활성화되며, 이는 전신 유전자 전달용 백터를 슈도타입화하는 당단백질로서 VSG-G의 용도에 대해 제한을 가할 수 있다.

[0003] 원숭이 면역결핍 바이러스(SIV)로부터 유래된 렌티바이러스 백터는 본 실험실²⁵을 포함한 여러 실험실¹에서 제작된 바 있다. 이들 백터의 특성화를 통해, 비증식성 세포 내의 트랜스 유전자의 삽입에 대하여, SIV 백터는 원숭이 세포 내에서 인간 면역결핍 바이러스(HIV-1) 백터보다 우수하게 작동하기는 하나, 렌티바이러스 백터는 HIV-1로부터 유래된 것들과 유사하게 작동한다는 사실이 확인되었다.

발명의 상세한 설명

[0004] **발명의 개요**

[0005] 본 발명은 슈도타입화된 바이러스 백터 미립을 제조하는 데 사용하기 위한 키메라 및 돌연변이 당단백질에 관한 것이다. 특정 일면에 있어서, 상기 키메라 당단백질은 MLV-A로부터 유래되는 세포질 테일(cytoplasmic tail) 도메인 및 고양이 내생 바이러스 RD114로부터 유래되는 막관통 세포외 도메인을 포함한다.

[0006] 다른 일면에 있어서, 상기 당단백질은 유효한 슈도타입 형성을 가능하게 하는 최소의 변형을 렌티바이러스계 백터에 통합시킨다. 특정 일면에 있어서, 상기 당단백질은 개조된 당단백질로써 슈도타입화될 레트로바이러스 백터의 레트로바이러스 코어 프로테아제에 적합한 세포질 테일 도메인 내에 절단 부위를 포함한다. 특정 일면에 있어서, 그러한 변형은, 바이러스 코어 프로테아제에 대한 기질을 포함하며 그의 절단이 바이러스 당단백질의 방추원성(fusogenicity)에 중대한 영향을 주는 8개 아미노산의 스트레치 내로 도입된다. 이러한 변형은 중앙레트로바이러스 또는 상이한 렌티바이러스 코어 중 하나에 의한 슈도타입화를 가능하게 한다.

[0007] 이상의 일면들과 관련하여, 본 발명의 다른 일면은 키메라 및 돌연변이 당단백질의 세포질 테일 아미노산 서열과 레트로바이러스 코어의 프로테아제 아미노산 서열을 매치시킴으로써, 그들 코어 상에 현저히 개선된 당단백질 어셈블리를 형성시키는 방법에 관한 것이다.

[0008] 본 발명은 또한, 상기 당단백질을 코딩하는 핵산 구조체를 포함한다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 핵산은 SEQ ID NO: 1의 서열을 포함한다. 부가적인 일면에 있어서, 상기 구조체는, 상기 당단백질의 발현에 적합하여 재조합 바이러스 백터의 미립 내로 통합되도록 하는 발현 구조체이다. 다른 일면에 있어서, 본 발명은 상기 핵산 구조체로써 트랜스펙션된 세포를 포함한다.

[0009] 본 발명의 일면은 MLV-A로부터 유래된 세포질 테일 도메인 및 고양이 내생 바이러스 RD114로부터 유래된 막관통 세포외 도메인을 포함하는 키메라 당단백질을 포함하는 백터 미립을 포함한다. 다른 일면에 있어서, 상기 백터 미립은 슈도타입화된 백터 미립이다. 다른 일면에 있어서, 상기 백터 미립은 재조합 바이러스 백터 구조체를 추가로 포함한다.

[0010] 다른 일면에 있어서, 상기 백터 미립은 레트로바이러스 또는 렌티바이러스로부터 유래되는 백터 구조체를 포함한다. 일면에 있어서, 상기 백터 구조체는 SIV 또는 HIV로부터 유래된다.

[0011] 다른 일면에 있어서, 상기 백터 미립은 트랜스 유전자를 추가로 포함하는 백터 구조체를 포함한다. 일면에 있어서, 상기 트랜스 유전자는 마커(marker) 또는 리포터(reporter) 유전자이다. 특정 일면에 있어서, 상기 트랜스 유전자는 녹색 형광성 단백질(GFP)이다. 다른 일면에 있어서, 상기 트랜스 유전자는 치료제 유전자이다. 특정 일면에 있어서, 상기 트랜스 유전자는 발암 유전자 또는 원발암 유전자(proto-oncogene)이다. 다른 일면에 있어서, 상기 트랜스 유전자는 약물 감수성(susceptibility) 유전자이다.

[0012] 본 발명의 다른 일면은,

[0013] a) 형질도입될 세포를 획득하는 단계;

[0014] b) 상기 슈도타입화된 백터 미립을 획득하는 단계; 및

[0015] c) 형질도입이 유발되기에 충분한 조건 하에서 상기 세포와 상기 백터 미립을 접촉시키는 단계

[0016] 를 포함하는 세포 형질도입 방법에 관한 것이다.

- [0017] 다른 일면에 있어서, 상기 방법은 형질도입을 증강시키기에 충분한 양의 레트로넥틴(retroectin)을 제공하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 일면에 있어서, 상기 세포는 시험관내 형질도입된다. 다른 일면에 있어서, 상기 세포는 생체내 형질도입된다. 또 다른 일면에 있어서, 상기 세포는 척추동물 세포, 영장류 세포, 또는 인간 세포이다. 상기 세포는 또한 CD34⁺ 또는 PBL 세포이다. 다른 일면에 있어서, 본 발명은 상기 방법에 의하여 형질도입된 세포를 포함한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 일면은,
- [0019] a) (i) 적어도 하나의 벡터 구조체,
- [0020] (ii) 적어도 하나의 포장 구조체(packaging construct), 및
- [0021] (iii) 상술한 키메라 당단백질을 코딩하는 발현 구조체
- [0022] 를 세포에 트랜스펙션시켜 생산자 세포(producer cell)를 획득하는 단계;
- [0023] b) 상기 생산자 세포를 배지 내에서 배양하는 단계; 및
- [0024] c) 상기 배지로부터 상기 생산자 세포를 분리하여, 상기 배지로부터 상기 재조합 바이러스 벡터 미립을 회수하는 단계
- [0025] 를 포함하는 재조합 슈도타입 바이러스 벡터 미립을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0026] 다른 일면에 있어서, 상기 방법은 재조합 벡터에 의한 세포의 형질도입이 유발되는 조건 하에서 본 발명의 방법에 따라 제조된 벡터 미립을 세포에 접촉시키는 단계를 포함한다. 상기 세포는 구체적으로 조혈 줄기 세포(hematopoietic stem cell) 또는 인간 CD34⁺ 세포를 포함하는 인간 세포일 수 있다. 다른 일면에 있어서, 상기 세포는 줄기 세포의 다중 유효성(pluripotency)에 실질적인 손실을 가하지 않고 세포 증식을 자극하도록 처리된다. 다른 일면에서, 상기 세포는 생체내 또는 시험관내 형질도입된다. 다른 일면에 있어서, 상기 형질도입된 세포는 동물 개체 내로 도입된다. 바람직한 일면에 있어서, 상기 동물 개체는 인간 개체이다.
- [0027] 본 발명에 포함되는 생체의 유전자 요법의 대표적인 적용 예로는, 그의 CD34⁺ 세포가 골수 또는 말초 혈액으로부터 분리될 수 있으며, 제이식되기 이전에 유전자를 발현시키는 렌티벡터에 의해 생체의 형질도입될 수 있는 만성 육아성 질환(chronic granulatus disease; CGD)을 가지는 환자가 있다. 중증의 복합 면역결핍증(SCID) 환자의 경우, 본 발명자들은 상기 환자에게서 결여된 유전자, 예컨대 인터류킨(Interleukin) 수용체의 공통 감마 사슬을 코딩하는 유전자를 발현시키는 본 발명의 벡터 구조체를 이용해 유사한 접근법을 구상하였다. HIV 감염의 유전적 치료를 위하여, 본 발명자들은 항바이러스 유전자의 도입을 통해 세포로 하여금 HIV 바이러스에 대해 내성을 갖게 하는 세포내 면역화(immunization)를 구상하였다. HIV에 대한 세포내 면역화의 일면에 있어서, 본 발명의 벡터의 표적은 조혈 모세포, 말초 혈액 CD4⁺ T 세포, 및 단핵세포를 포함한다. 당업자라면, 기타 바이러스 감염에 대해서도 유사한 세포내 면역화 방법이 사용될 수 있음을 인지할 것이다. 암의 면역요법의 경우, 수지상 돌기 세포와 같은 항원 제시 세포 또는 종양 세포는 본 발명의 렌티벡터로써 유전자 조작될 것이다. 암 요법의 경우, 본 발명의 렌티벡터 구조체에 사용될 수 있는 몇몇 트랜스 유전자는 암/종양 세포 및/또는 TNF와 같은 유전자의 증식을 저해, 소멸, 및/또는 억제하거나, 나아가 암/종양 세포 및/또는 TNF와 같은 유전자의 사멸(apoptosis)을 매개할 수 있는 것들이다.
- [0028] 본원의 벡터 미립은 또한 혈액 또는 특정 기관 내로의 직접 주사에 의해 생체내 사용될 수 있다. 예컨대, 일면에 있어서, 아교 세포 유래의 신경 성장 인자(GDNF)를 발현시키는 렌티바이러스의 뇌내 주사는 파킨슨병(Parkinsons disease)의 치료에 사용될 수 있다. 다른 일면이 있어서, 혈우병 A의 교정을 위한 것으로서, 응집 인자 VIII를 발현시키는 렌티벡터의 정맥내 주사가 고려된다. 또 다른 일면에서, 뒤센느 근위축증(Duchenne Muscular Dystrophy)의 치료를 위한 것으로서, 디스트로핀(dystrophin) 유전자를 발현시키는 본 발명의 렌티벡터의 정맥내 또는 근육내 주사가 고려된다.
- [0029] 따라서, 당업자라면, 유전자 요법의 견지에서 본 발명의 벡터 구조체 및 미립의 광대한 용도를 이해할 것이다.
- [0030] 본원에 사용된 바와 같이, 본 명세서 및 청구의 범위에서 "포함"이라는 용어와 관련하여 사용되는 경우, "단수"로 표현된 용어는 하나 이상을 의미할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "또 다른"이란 용어는 적어도 둘

이상을 의미할 수 있다.

[0031] 본 발명의 기타 대상, 특징, 및 장점은 이하의 상세한 설명을 통해 보다 명확해질 것이다. 그러나, 이하의 상세한 설명 및 특정 실시예들은, 본 발명의 바람직한 일면을 제시한 것으로서 단지 예시를 위한 것이며, 따라서 당업자라면 본 발명의 사상 및 범위 내에서 본원의 상세한 설명으로부터 다양한 변경 및 변형이 이루어질 수 있음이 자명한 바임을 이해할 것이다.

[0032] **상세한 설명**

[0033] 본 발명자들은 MLV-A GP의 세포질 테일(TR)에 융합된 GALV 또는 RD114 GP의 막관통 세포외 도메인을 코딩하는 키메라 GP를 제작하였다. 놀랍게도, 이들 GALV/TR 및 RD114/TR GP 키메라로써 슈도타입화된 SIV 유래의 벡터는 어버이 GP로 코딩된 벡터에 비하여 유의하게 높은 역치를 갖는다. 부가적으로, RD114/TR-슈도타입화된 벡터는 효과적으로 농축되며, 인간 및 마카크 원숭이 혈청에 대하여, 강화에 의해 유발되는 불활성화에 대하여 내성이다. 그러므로, 변형된 RD114 GP-슈도타입화된 렌티바이러스 벡터는 생체내 유전자 운반 용도에 대하여 특히 유용한 가치가 있다. 나아가, 기타 레트로바이러스 GP 또는 VSV-G로써 슈도타입화된 벡터에 비하여, RD114/TR-슈도타입화된 벡터는 인간 및 마카크 원숭이의 주요 혈액 림프구 및 CD34⁺ 세포의 증가된 형질도입을 나타낸다.

[0034] 나아가, 그들의 막관통 도메인 및/또는 세포질 테일 내에 변형을 가지는 RD114 GP 돌연변이는 MLV, SIV 또는 HIV-1 바이러스 코어 미립 중 하나에 의한 슈도타입 형성을 조절할 수 있다. 본 발명자들은 레트로바이러스 코어 프로테아제에 적합한 절단 부위가 RD114 GP의 세포질 테일 내에 존재해야 만이 유효한 슈도타입 형성이 가능함을 입증한다. 상기 절단 부위와 MLV 프로테아제의 적합성은 슈도타입화된 비리온의 감염성은 변화시키나, MLV 코어에 대한 GP 혼입은 변화시키지 않으며, 슈도타입화된 렌티바이러스 코어의 GP 혼입 및 감염성 모두를 조건화한다. 그러므로, 렌티바이러스 코어에 대한 혼입을 제한하는 GP의 세포질 테일에 간직된 결정인자가, 슈도타입화된 비리온의 GP 혼입 및 감염을 가능하게 하는 바이러스 프로테아제에 의해 제거되어야 하는, 신규한 바이러스 어셈블리 경로가 존재한다.

[0035] **1. RD114 GP의 세포질 테일은 세포-세포 및 바이러스-세포의 방추원성을 조절한다.**

[0036] 타입 C 및 타입 D 포유류 레트로바이러스 GP의 경우, 세포질 테일은 바이러스 어셈블리 및 방추원성을 조절하는 두 과정 모두에서 중추적인 역할을 한다. 여러 연구 결과들이, 단백질 위치선정(localization), 세포 표면 밀도, 세포-세포 융합, 이종(heterologous) 또는 동종(homologous) 바이러스 코어와의 상호작용/혼입, 및 비리온의 감염성에 대한 그의 영향을 입증하고 있다. 이들 GP의 세포질 테일은 티로신 세포내 이입 신호-YXXL-(5)를 간직하는 카르복시-말단 펩타이드(R)를 함유하는 구조적 모티브로서, 바이러스 프로테아제에 의한 그의 절단은 GP의 특성을 강하게 조절한다. 천연 형태의 GP에서, 절단 전, R 펩타이드는 i) 세포의 세포내 이입 기구의 어답틴(adaptin) 복합체, ii) 비리온 내에서 발견되는 성숙한 GP의 카르복시 말단(도 1A에서의 세포질 테일의 도메인 T), 및 iii) 비리온 내부 단백질과 상호작용하는 것으로 여겨지고 있다(1, 8, 13, 14, 17, 19, 43). RD114 당단백질의 돌연변이의 특정화(본원)는 그의 세포질 테일에 의해 운반되는 관련 신호의 존재를 암시한다. 따라서, YXXL 모티브가 점 돌연변이에 의해 붕괴된 RDΔYXXL 돌연변이 GP는 가장 유력하게는 증가된 세포 표면 발현을 통해 증가된 세포-세포 융합을 초래하며, 이는 개별적인 중앙-레트로바이러스 및 렌티바이러스 당단백질(1, 8, 13)을 이용한 다른 연구에 의해 제안된 바 있다. 그러나, RDRless, RDP_{rMLV}, RDP_{rSIV_{RQAG}}, RDP_{rHIV} 및 RDΔYXXL 돌연변이 GP의 특정화를 통해 추론된 바와 같이, 세포-세포 방추원성 및/또는 세포-표면 발현을 증가시킨 돌연변이가 바이러스 혼입 및/또는 바이러스 감염성을 필연적으로 향상시키지 않을 수도 있다. 나아가, 본원의 데이터는 슈도타입화된 벡터의 감염성이 변형된 RD114 GP의 세포질 테일과 바이러스 코어의 타입 사이의 적합성에 따라 좌우됨을 나타낸다.

[0037] 기타 타입 C 및 D 포유류 레트로바이러스 GP에서 얻어진 여러 유전적 증거들, 비절단된 세포 형태의 세포질 테일이 GP 방추원성의 고유한 음성 조절자로서 작용함을 확인시켜 주고 있으며(2, 14, 17, 30, 33, 43), 비리온 어셈블리 동안 상기 매트릭스 단백질의 파트너로서 작용함을 나타내고 있다(2, 3). RD114 당단백질의 CT 돌연변이로부터 얻어진 결과는, 후자 GP가 타입 C 및 D 당단백질과 유사한 방식으로 그의 세포질 테일에 의해 조절됨을 나타낸다. 실제로, 아직까지 그 메커니즘은 밝혀진 바 없으나, 세포질 테일의 절단은 다수의 타입 C 및 D 당단백질에 대해 융합 잠재력을 활성화하는 데 필수적인 것으로 확인되었다(2, 14, 30, 33). CT 절단의 결여는 방추원 당단백질의 결핍을 초래한다. 또한, 절단 위치 내의 정지 코돈의 삽입을 통해 활성화된 조기 절단은 합포체 형성을 크게 증대시킨다(2, 30, 33). 나아가, 본원 데이터는, 감염성 부여를 위해, RD114 GP의 카르복시 말단이 비리온 어셈블리 동안 또는 이후 절단되어야 함을 직접적으로 확인시켜준다(도 5). 나아가, 성숙한 세

포질 테일(도 1B의 도메인 T) 또는 R 펩타이드를 형성하는 영역 중 하나에서의 돌연변이는, 가장 유력하게는 상기 구조의 파괴 및/또는 세포질 테일의 통합의 결과로서, 세포-세포 융합의 조절을 변화시킨다(14, 17, 43). 세포질 테일 내에 여러 돌연변이를 간직하는 RD114 GP 돌연변이와 유사하게, 예컨대, RDPPrMLV, RDPPrSIV_{ROAG} 및 RDPPrHIV 돌연변이는, 그들의 돌연변이된 세포질 테일에 의한 융합 저해 조절 기능의 손실로 인하여, 강화된 세포독성을 가질 수 있다.

[0038] **2. 렌티바이러스 코어에 의한 신규한 슈도타입 형성 경로.**

[0039] RD114 GP의 세포질 테일의 변형은, 렌티바이러스 코어와는 대조적으로, MLV 코어 상의 RD114 GP 키메라의 혼입에 대해서는 거의 영향을 주지 않는다(도 4). 이는 중앙-레트로바이러스 코어가 GP 혼입에 대하여 렌티바이러스 코어보다 혼입에 대해 관대함을 시사하거나, 대안적으로 GP에 의해 간직되는 비적합성 결정인자가 렌티바이러스 코어에 제한되어 있음을 시사하기도 한다. 그러나, 슈도타입화된 MLV 벡터 미립의 감염성은 RD114 GP 키메라의 세포질 테일 내에 혼입된 절단 부위의 타입에 의해 크게 영향을 받았다(도 3). RD114 GP 절단 부위의 MLV 절단 부위로의 대체는 감염성에 영향을 주지 않는 반면, 렌티바이러스 절단 부위의 삽입은 감염성을 현저히 감소시켰다. MLV 코어 미립 상에 혼입되는 경우 이들 후자 돌연변이의 TM 단백질의 세포질 테일의 불완전한 프로세싱과 일관되게(도 5a), 후자 벡터 슈도타입의 불충분한 감염성은 혼입된 GP 키메라의 융합 잠재능의 활성화 결여에 기인하는 것으로 나타났다. MLV GP의 경우, 바이러스 프로테아제의 자체 절단 부위의 돌연변이를 통해 달성된 세포질 테일의 절단 폐기는, 감염성이 없는 정상 수준의 GP가 혼입된 돌연변이를 초래한다(33).

[0040] 흥미롭게도, 야생형 RD114 GP로써 슈도타입화된 SIV 벡터의 낮은 감염성은 단지 그의 세포질 테일의 절단 부위와 렌티바이러스 코어 프로테아제의 비적합성에 의해서 만든 설명될 수 없다. 실제로, 본원의 데이터에 따르면, MLV-A GP와는 대조적으로, 비변형된 RD114 당단백질의 세포질 테일이 상기 렌티바이러스 코어와의 최적의 상호작용을 허락하지 않을 수 있으며, 이는 후자 GP의 유효한 혼입을 방해함을 시사한다(도 4). RD114 GP 키메라의 특성을 연구하면, 이러한 음성 상호작용에 대한 분자적 기본원리를 발견할 수 있다. 실제로, RD114 당단백질의 세포질 테일의 혼입-가능한 MLV-A GP의 세포질 테일로의 대체는, 바이러스 혼입을 10배까지 증가시키며(도 4), 이는 RD114 GP의 세포질 테일이 렌티바이러스 코어에 대한 비적합성 결정인자를 함유함을 입증한다. 흥미롭게도, 적합성은 세포질 테일의 절단 부위의 특이성에 변화를 유발함으로써 복원될 수 있었다. 하나의 가능성은 그러한 변화가, 예컨대, SIV 매트릭스 단백질과의 입체적 비적합성을 감소시킴으로써, SIV 코어와의 최적의 상호작용으로 귀결되는 세포질 테일의 구조적 변형을 유발할 수 있다는 것이다. 본원의 데이터는 또한 상기 세포질 테일의 절단이 GP 혼입과 연관되어 있을 수 있다는 대안적이고 비배타적인 가능성을 시사한다. RD114 GP 절단 부위를, 상기 슈도타입화-가능한 MLV-A GP의 세포질 테일(돌연변이 RDPPrMLV) 또는 SIV Gag 단백질(돌연변이 RDPPrSIV_{ROAG}) 중 하나로부터 유래된 절단 부위로 대체한 결과, RDPPrSIV_{ARLM} GP 돌연변이를 제외하고는, 바이러스 역치 및 SIV 코어 미립 상의 혼입 모두가 향상되었다. 최근의 관련 연구에서, Cannon 등은 상기 비변형된 GALV GP가 HIV-1 코어에 대한 혼입에서 배제되었음을 발견하였다(4). R 펩타이드의 트런케이션(truncation) 및 GALV CT 또는 그 절단 부위를 MLV-A 유래의 해당 서열로 대체한 경우, GP 혼입 및 바이러스 역치(4)가 증가되었으며, 이는 개별적인 타입의 레트로바이러스 당단백질을 이용해 얻은 본원의 데이터와 잘 일치한다. 총괄적으로, 따라서 이들 데이터는 슈도타입화된 렌티바이러스 벡터의 감염성이 상기 슈도타입화된 당단백질의 CT와 바이러스 코어의 적합성의 결과이며, 바이러스 코어 프로테아제에 의한 절단을 통해 조절될 수 있음을 시사한다. 이러한 가정은 상기 세포질 테일의 절단에 대한 직접적인 평가에 의해 확인되어야 하나, 본 발명자들은 상기 세포질 테일의 절단과 비허용성 코어에 대한 GP 혼입 사이의 관련 가능성에 대하여 관찰하였다. 렌티바이러스가 발아(budding)를 개시하는 것으로 밝혀진 바 있는(25) 원형질막 지질 래프트(raft)에서의 중앙-레트로바이러스 당단백질의 위치선정에도 불구하고(29), 이들 비절단된 GP의 세포질 테일은 매트릭스 단백질의 네트워크에 적합하지 않을 수 있다. 그러므로, 바이러스 어셈블리 영역 부근의 몇몇 활성 렌티바이러스 프로테아제의 존재는, 그들의 CT에 의해 간직되는 절단 부위와의 적합성에 따라 좌우되는 방식으로 이들 GP의 세포질 테일을 절단할 수 있다. 이는 R 펩타이드의 제거로 귀결될 수 있으며, 이는 렌티바이러스 코어에 대한 혼입을 방해한 부적합성 결정인자의 소거를 초래한다. 그리하여, 테일-부착된(tailored) GP는 가능한 경우 수동 혼입 메커니즘에 따라 렌티바이러스 미립 상에 혼입될 수 있다.

[0041] **3. 바이러스 벡터**

[0042] 많은 유형의 바이러스가 벡터에 대한 기본을 형성한다. 바이러스 감염은 숙주 세포 내로의 바이러스 게놈의 도입을 수반한다. 그러한 특성이 바이러스계 벡터 내의 유전자 전달 비히클로서의 용도를 위하여 함께 선택된다. 사용되는 바이러스는 흔히 이미 트랜스펙션 세포에 대한 많은 필요한 특징 및 항체를 가지는 병원성 바이러스로

부터 유래된다. 그러나, 모든 바이러스가 세포 주기의 모든 단계에서 모든 유형의 세포를 성공적으로 트랜스펙션하지는 않을 것이다. 따라서, 바이러스 벡터의 발생 시, 바이러스 게놈은 종종 변형되어, 외부 유전자 구조체(트랜스 유전자) 또는 기타 핵산의 도입을 위한 그들의 능력 및 유효성을 증대시킨다. 동시에, 질병을 유발하는 능력을 감소 또는 제거하도록 변형될 수 있다.

[0043] 렌티바이러스는 핵공(nucleopore)을 통한 능동 도입을 가능하게 하는 사전-통합 복합체의 친핵성으로 인해 미분열 세포를 트랜스펙션할 수 있는 레트로바이러스의 서브그룹이다. 이와 상응하여, 인간 면역결핍 바이러스 타입 1(HIV-1)으로부터 유래되는 렌티바이러스 벡터는 시험관내 및 생체내 비유사분열 세포 내로의 트랜스 유전자의 유효한 전달, 통합 및 장기간 발현을 매개할 수 있다(Naldini *et al.*, 1996a; Naldini *et al.*, 1996b; Blomer *et al.*, 1997). 예컨대, HIV계 벡터는 사이토카인 자극의 부재 하에 인간 CD34⁺ 조혈 세포를 유효하게 형질도입 시킬 수 있으며(Akkina *et al.*, 1996; Sutton *et al.*, 1998; Uchida *et al.*, 1998; Miyoshi *et al.*, 1999; Case *et al.*, 1999), 이들 세포는 NOD/SCID 마우스 내에서 장기간 융합할 수 있다(Miyoshi *et al.*, 1999). 나아가, 이들의 주요 수령체 유래의 골수는 형질도입된 세포를 가지는 2차 마우스 내에서 생존할 수 있으며, 이는 아마도 가장 성실한 줄기 세포인 매우 원시적인 조혈 전구체의 렌티벡터-매개의 유전적 변형을 시사한다. 기타 현재 활용 가능한 유전자 전달 시스템 중 어느 것도 그러한 능력은 갖지 못하기 때문에, 렌티바이러스 벡터는 이전에는 조혈작용 및 유사 현상의 연구, 및 인간 줄기 세포 (HCL)의 유전적 변형을 통한 선천성 질환 및 후천성 질환의 유전자 요법에 대하여 이전에는 탐구되지 않았던 원리를 제공한다.

[0044] 이러한 중요한 능력은 유의한 생체 안전성 문제에 봉착한다(Akkina *et al.*, 1996; Sutton *et al.*, 1998; Uchida *et al.*, 1998). 렌티바이러스 벡터 모액의 생산 과정 동안 복제-가능한 재조합(RCR)의 부수적 발생은, 렌티바이러스 벡터가 인간 유전자 요법용으로 고려되기 이전에 해결되어야 할 가장 주요한 문제 중 하나이다. 레트로바이러스 게놈에 있어서, 필수적인 모든 시스-작용 요소를 함유하는 단일 RNA 분자는 모든 코딩 서열을 운반한다. 따라서, 벡터 생산 시스템의 생체 안전성은, 가능한 한 많은 독립적 단위로 그의 다양한 성분들을 코딩하는 서열을 분포킴으로써 RCR을 재창출하는 데 요구되는 교차(crossover) 횟수를 최소화하는 경우 가장 잘 달성된다. 렌티벡터 미립은 숙주 생산자 세포, 예컨대 293 인간 배아 신장 세포 내에서 비리온 포장 요소 및 벡터 게놈을 공발현시킴으로써 제작된다. HIV-1계 벡터의 경우, 비리온의 코어 및 효소 성분들은 HIV-1로부터 유래되는 반면, 외피 단백질은 이중 바이러스, 가장 흔하게는 VSV로부터 유래된다. 전체 유전자 세트가 바이러스 유전자 화물의 운반을 담당하나, 발병에 필수적인 병독성 인자를 코딩하는 HIV의 게놈 복합성은 실질적으로 임상적으로 허용 가능한 벡터 시스템의 개발을 지원한다.

[0045] 현재의 다양한 감독화 포장 시스템은 통상 HIV-1의 9개 유전자 중 단지 3개만을 포함한다: *gag* - 비리온의 주요 구조 단백질 코딩, *pol* - 레트로바이러스-특이성 효소 담당, 및 *rev* - 유효한 *gag* 및 *pol* 발현에 필수적인 전사 후 조절자 코딩(Du11, *et al.*, 1998). 이처럼 광범위하게 삭제된 포장 시스템으로부터는, 게놈 부분의 60%가 완전히 제거되었기 때문에, 어버이 바이러스가 재구성될 수 없다. HIV계 포장 시스템, Gag/Pol, Rev, VSV G 및 벡터 중 하나는 4개의 개별적인 DNA 단위체로부터 유래된다. 또한, 벡터와 헬퍼 서열 사이의 중첩은 수십 뉴클레오타이드로 감소되어, 동종 재조합에 대한 기회가 감소되어 왔다.

[0046] HIV 타입 1(HIV-1)계 벡터 미립은 소위 생산자 세포, 예컨대 293T 인간 배아 신장 세포 내에서 비리온 포장 요소 및 벡터 게놈을 공발현시킴으로써 제작할 수 있다. 이들 세포는 다수의 플라스미드로써 일시적으로 트랜스펙션될 수 있다. 통상적으로, 3개 내지 4개의 플라스미드가 사용되나, 그 개수는 렌티바이러스 성분이 개별적인 단위체로 파괴되는 정도에 따라 크게 좌우될 수 있다. 일반적으로, 하나의 플라스미드가 HIV-1로부터 유래되는 비리온의 코어 및 효소 성분을 코딩한다. 이 플라스미드를 포장 플라스미드라 칭한다. 또 다른 플라스미드는, 고도의 안정성 및 광범위한 항성으로 인하여, 상기 외피 단백질(들), 가장 통상적으로는 소포성 구내염 바이러스의 G 단백질(VSV G)을 코딩한다. 이 플라스미드를 외피 발현 플라스미드라 칭한다. 또 다른 플라스미드는 표적 세포로 운반될 게놈, 즉, 벡터 자체를 코딩하며, 이를 운반 벡터라 칭한다. ml당 수백만 형질도입 단위(TU/ml)의 역치를 가지는 재조합 바이러스는 이러한 기술 및 그의 변이에 의해 제작될 수 있다. 초원심분리 후, 대략 10⁹ TU/ml의 농축된 모액이 얻어질 수 있다.

[0047] 벡터 자체는 단지 표적 세포로 운반되는 유전자 물질이다. 이는 통상적으로 캡슐화, 역전사, 핵 도입, 및 통합에 필요한 시스-작용 요소에 의하여 플랭킹된 트랜스 유전자 카세트를 포함한다. 중앙-레트로바이러스 벡터에 대하여 앞서 실시한 바와 같이, 렌티바이러스 벡터는 표적 세포로 운반 시, 바이러스의 긴 말단 반복부(LTR)의 전사 역량을 손실하여 "자가-불활성화(self-inactivating)"된다(Zufferey, *et al.* 1998). 이러한 변형은 나아가 복제 가능한 재조합(RCR)의 발생 위험 및 프로모터 간섭과 관련된 문제를 감소시킨다.

[0048] 4. 바이러스 벡터의 슈도타입화

[0049] 레트로바이러스에 대한 단백질 혼입은 동종 바이러스 당단백질에 대해 특이적이지 않다. 주요 조직-적합성 복합체 클래스 I(MHC-I) 및 MHC-II 분자, 유착 분자, 공-자극 분자 및 보완된 조절 단백질을 포함하는, 40종 이상의 상이한 숙주 세포 유래의 단백질이 HIV-1 바이러스 미립의 외부에서 동정되었다⁴⁸. 나아가, 많은 이종 바이러스 당단백질이 레트로바이러스 미립 내로 혼입될 수 있으며, 감염성을 매개할 수 있다⁴⁹. 슈도타입화이라 불리는 이러한 과정은, 레트로바이러스 벡터로 하여금 광범위한 세포 및 조직을 형질도입시키도록 한다. VSV-G 당단백질을 이용한 렌티바이러스 벡터의 제작은 벡터의 항성을 확장시키는 이종 당단백질의 능력을 예증한다². 그러나, 이종 바이러스 코어를 이용한 주어진 당단백질(GP)의 공발현이 필수적으로 고도의 감염성 바이러스 미립을 발생시키지는 않을 것이다^{8,14,15,50}.

[0050] *env* 유전자는 레트로바이러스를 포함하는 임의의 바이러스로부터 유래될 수 있다. 레트로바이러스 유래의 *env* 유전자의 예로는, 비제한적으로, 몰로니(Moloney) 설치류 백혈병 바이러스(MoMuLV 또는 MMLV), 하베이(Harvey) 설치류 육종 바이러스(HaMuSV 또는 HSV), 설치류 유방 종양 바이러스(MuMTV 또는 MMTV), 기본 원숭이 백혈병 바이러스(GaLV 또는 GALV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 및 로우스(Rous) 육종 바이러스(RSV)가 포함된다. 소포성 구내염 바이러스(VSV) 단백질 G(VSV G)와 같은 기타 *env* 유전자, 간염 바이러스 및 인플루엔자의 유전자도 사용될 수 있다. VSV G 단백질은 재조합 바이러스에 대해 광범위한 숙주 범위를 가지므로 바람직한 *env* 유전자 인 반면, VSV G는 숙주 세포, 예컨대 포장 세포에 대해서는 유해할 수 있다. 따라서, VSV G의 것과 같은 유전자가 사용되는 경우, 유도 가능한 프로모터 시스템은 VSV G 발현이 요구되지 않는 경우 VSV G 발현이 숙주 독성을 최소화하도록 조절될 수 있도록 사용될 수 있다. 예컨대, Gossen & Bujard(1992)의 테트라사이클린-조절된 유전자 발현 시스템은 테트라사이클린이 운반된 세포로부터 철회되는 경우 VSV G의 유도 가능한 발현을 제공하도록 사용될 수 있다. 따라서, tet/VP16 트랜스 활성화자(trans-activator)는 제1 벡터 상에 존재하며, VSV G 코딩 서열은 또 다른 벡터 상의 tet 조절자 서열에 의하여 제거되는 프로모터의 다운스트림으로부터 클로닝된다.

[0051] 바이러스 *env* 핵산 서열을 제공하는 벡터는 조절 서열, 예컨대, 프로모터 또는 인핸서(enhancer)와 유효하게 결합된다. 상기 조절 서열은, 예컨대 EF1a, PGK, 몰로니 설치류 백혈병의 바이러스 프로모터-인핸서 요소, 인간 사이토메갈로바이러스의 인핸서, 백시니아 P7.5 프로모터 등(추가적 예는 하기 표 1 및 2 참조)을 포함하는 임의의 진핵생물 프로모터 또는 인핸서일 수 있다. 일부의 경우, 몰로니 설치류 백혈병 바이러스의 프로모터-인핸서 요소와 같은 프로모터-인핸서 요소는 LTR 서열 내에 또는 그에 인접하게 위치한다. 바람직하게는, 조절 서열은 벡터를 구성하고 있는 렌티바이러스에 대해 내성이 없는 것이다. 따라서, 벡터가 SIV로부터 만들어지는 경우, SIV LTR 내에서 발견되는 SIV 조절 서열은 SIV로부터 기원하지 않은 조절 요소에 의하여 복제될 것이다.

[0052] 또한, 특정 세포-타입의 수용체에 대하여 표적화하는 특정 리간드 또는 외피 단백질과 항체의 결합에 의하여 재조합 바이러스를 추가로 표적화할 수 있다. 예컨대 벡터는, 바이러스 벡터 내로 관심 서열(조절 영역 포함)을 삽입하면, 특정 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드를 코딩하는 또 다른 유전자와 함께, 표적-특이성이 된다. 레트로바이러스 벡터는 예컨대 당지질 또는 단백질의 삽입에 의하여 표적-특이성으로 만들어질 수 있다. 표적화는 종종 표적 레트로바이러스 벡터에 대한 항체 또는 재조합 항체-타입 분자, 예컨대 단일 사슬 항체의 항원-결합 부위를 이용함으로써 달성된다.

[0053] 2가지 유형의 메커니즘이 바이러스 미립 상에서의 동종 및 이종 바이러스 또는 세포 당단백질의 어셈블리를 유발하는 것으로 생각된다. GP 혼입의 수동적 모델은 슈도타입화된 당단백질과 바이러스 코어 사이의 비의무적 상호작용을 수반하며, 전자는 바이러스 발아 부위에 충분히 풍부하며, 그의 세포질 테일은 바이러스 어셈블리 또는 비리온 형태에 직접적으로 적합한 결정인자를 함유하지 않는다⁴⁹. 이러한 측면에서, FPV, LCMV 및 VSV의 세포질 테일과 같은 짧은 세포질 테일을 함유하는 이종 GP(도 2)는 수동 메커니즘을 통해 렌티바이러스 미립 상에 혼입되는 것으로 여겨진다. 한편, GP 혼입의 능동 모델에서, 슈도타입화된 당단백질의 세포질 테일과 비리온 코어 성분 사이의 상호작용이 바이러스 미립의 어셈블리를 규정한다. 적어도 렌티바이러스⁵²⁻⁵⁵에 대하여, 바이러스 어셈블리에 있어서의 그러한 중대한 상호작용 역할을 뒷받침하는 광대한 증거가 문헌^{39,49}에 제시되어 있다.

[0054] 최근의 연구에서, 본 발명자들은, 타입 C 및 D 포유류 레트로바이러스의 당단백질을 이용한 렌티바이러스 코어

미립의 슈도타입화가 어셈블리의 대체 경로를 수반함을 제한한 바 있다¹⁴. GALV 및 RD114 바이러스와 같이 이들 레트로바이러스의 GP는 렌티바이러스 코어에 대한 혼입을 제한하는 결정인자를 함유하는 것으로 확인된 바 있다^{8,14}. 약 30-40개 아미노산 길이의 비교적 짧은 타입 C/D 포유류 레트로바이러스 GP의 세포질 테일은, 당단백질의 융합 잠재능을 활성화하는 데 있어 동종 바이러스 코어 프로테아제에 의한 절단이 요구되는 MLV의 경우 R이라 일컬어지는 15-20개 아미노산 길이의 카르복시-말단 펩타이드를 함유한다⁵⁶⁻⁵⁸. 바이러스 프로테아제에 의한 R 펩타이드의 절단이 결여된 동종의 타입 C/D 바이러스 코어를 이용한 슈도타입화는 슈도타입화된 비리온의 감염성은 변화시키나, GP 혼입은 변화시키지 않는다. 반면, 절단 부위와 렌티바이러스 프로테아제의 적합성은 슈도타입화된 렌티바이러스 코어 미립의 감염성 및 GP 혼입 모두에 영향을 준다¹⁴. 따라서, 렌티바이러스 코어에 대한 이들 GP의 가능한 혼입 경로는 비리온 어셈블리 부위에서의 활성화 코어 프로테아제에 의한 R 펩타이드의 절단을 수반할 수 있으며, 이는 슈도타입화를 손상시키는 세포질 테일 결정인자의 제거를 가져온다. 이러한 연구 결과를 근거로 하여, 본 발명자들은 GALV8 및 RD114로부터 유래된 키메라 GP로써 슈도타입화된 유효한 SIV 유래의 벡터를 제작하였다(도 2). GALV/TR 및 RD114/TR이라 일컬어지는 이들 돌연변이 당단백질(도 2)은 각각 HIV-1 및 SIV 프로테아제에 적합한 MLV-AGP의 세포질 테일을 함유한다. 이는 이들이 렌티바이러스 미립에 대하여 유효하게 혼입되는 특성에 기인한 것으로 여겨진다(도 2C).

[0055] **5. 영장류 혈청 내에서의 렌티바이러스 벡터 슈도타입의 안정성.**

[0056] VSV-G-슈도타입화된 렌티바이러스 벡터는 여러 세포 유형을 생체내 또는 시험관내 형질도입시키는 데 유용한 것으로 입증된 바 있다³⁻⁷. 그러나, 여전히 인간²⁴ 및 비인간 영장류 강화에 대한 그들의 높은 감수성(도 4)은 생체내 전신 투여에 대한 그들의 유용성을 저해할 수 있다. VSV-G 슈도타입과 대조적으로, 레트로바이러스 당단백질을 이용해 제작한 벡터는 인간 및 마카크 원숭이 혈청 내에서 안정하였으며, RD114/TR-슈도타입화된 SIV 벡터는 인간 혈청에 대하여 항상 내성이며, 이는 후자 벡터가 전신 유전자 전달에 특히 적합할 수 있음을 시사한다(도 4). 강화 감수성을 결정하는 데에는 여러 인자들이 기여하며, 이들 인자는 i) 상이한 개체 유래의 혈청, ii) 생산자 세포의 타입^{34,36}, iii) 당단백질 내의 α(1-3) 갈락토오스당 에피토프의 존재⁵⁹⁻⁶¹, 또는 iv) 슈도타입화된 GP의 타입^{34,36,62}에 따라 좌우된다. 인간 세포에 의해 생산된 레트로바이러스는 통상 VSV-G-슈도타입화된 벡터²⁴를 제외하고는, 인간 혈청^{34,36} 내에서 내성이다. 그러나, 최근의 연구에서, MLV GP로 코팅되고 인간 세포에 의하여 생산된 중앙-레트로바이러스 벡터는, 인간과 멀어지는 방향으로의 진화와 상관된 방식으로, 비-인간 구세계 영장류 유래의 혈청 내에서 보충제 불활성화에 대하여 차별적으로 감수성인 것으로 확인된 바 있다⁶³. 마카크 원숭이 혈청에 대한 감수성은 99% 이상의 벡터 분해를 초래하였다⁶³. 따라서, 중앙-레트로바이러스 벡터를 이용해 얻은 후자의 결과와 명확히 불일치한다는 점에서, 본 발명자들은 레트로바이러스 GP로써 슈도타입화된 렌티바이러스가 마카크 원숭이 혈청 내에서 비교적 안정적이라는 사실을 확인하였다(도 4B). 혈청에 대한 반응을 조절할 수 있으며, 중앙-레트로바이러스와 렌티바이러스 미립 사이의 모순을 설명할 수 있는 인자는, HIV 및 SIV4에 대하여 보고된 바와 같이^{48,64}, CD46, CD55, 및 CD59 강화 저해 분자의 렌티바이러스 미립 내로의 혼입일 수 있다.

[0057] **6. 슈도타입화된 SIV 벡터를 이용한 주요 세포의 형질도입.**

[0058] VSV-G-슈도타입화된 렌티바이러스 벡터의 광범위한 향성은 세포 타입-특이성 유전자 전달이 요구되는 특정 유전자의 운반 용도에 적합하지 않을 수 있다. 일부 막-외피 바이러스로부터 유래된 당단백질의 천연 향성의 장점을 취하거나, 또는 대안적으로 혼입-가능한 GP의 숙주 범위(예컨대, MLV, GALV/TR 또는 FPV-HA)를 조작하면^{65,66} 보다 선택적인 향성을 달성할 수 있다. 예컨대, 에볼라 바이러스 또는 인플루엔자 바이러스와 같이, 폐 감염을 초래하며 기도 상피를 통해 감염되는 바이러스로부터 유래되는 표면 당단백질의 사용은, 유전자 요법 및 인간 기도에 유용할 수 있는 것으로 보고 바 있다¹⁰. 그럼에도 불구하고, 렌티바이러스 벡터 슈도타입은 슈도타입화된 당단백질이 유래된 어버이 바이러스의 숙주 범위를 항상 유지할 수 없음을 유의해야 한다. 예컨대, 향신경성 리사바이러스인 몰콜라 바이러스의 당단백질은 HIV-1 벡터를 유효하게 슈도타입화함에도 불구하고¹², 상기 슈도타입화된 벡터는 어버이 바이러스의 특이적인 향신경성을 재현하지 못한다⁹.

[0059] 최근 연구 보고에서, RD114 GP로써 슈도타입화된 중앙-레트로바이러스 벡터가 인간 및 개 CD34⁺ 세포를 유효하

게 형질도입시키는 것이 확인된 바 있다. 형질도입된 세포는 형질도입되지 않은 세포와 유사한 효율을 가지고 NOD/SCID 마우스 및 개 내에서 생존하며, 복수 계통의 발현을 나타내었다¹⁶⁻¹⁸. 이러한 연구 결과들은, 인간 CD34⁺ 세포 내에서 "유전자 운반에 대한 주요 차단체가 수용체 수준이며, 표적 세포의 무활동에 기인하지 않음"을 시사한다¹⁸. 본 발명자들은 MLV-A, GALV/TR, RD114/TR, 및 VSV-G 당단백질로써 슈도타입화된 렌티바이러스 벡터를 이용해 설정한 이러한 가설을 테스트하고자 하였다. 이전의 연구 결과와는 대조적으로, 본 발명자들은, 레트로벡틴 또는 기질 세포의 부재 하에 단지 최소의 사이토카인만을 처리하여, 바이러스/수용체 상호작용 및/또는 형질도입에 영향을 줄 수 있는 인자의 영향을 최소화하는 감염 조건, 즉 반복 감염이 없는 조건을 사용하였다. 따라서, MLV 벡터로 하여금 CD34⁺ 세포의 형질도입을 유발하지 않도록 하는 사이토카인을 처리한 조건 하에 1회의 짧은 바이러스/세포 노출에 의하여 인간 CD34⁺ 세포를 형질도입시켰다²⁶. 이러한 차선의 조건으로 인하여, 최대 수준의 유전자 운반은 비교적 낮았으나, 이는 CD34⁺ 세포의 형질도입에 있어 슈도타입화된 GP의 특이적인 영향을 감지할 수 있는 비교를 가능하게 한다. 이러한 조건에 가장 좋은 당단백질은 VSV-G 및 GALV/TR GP이었다(도 5a). VSV-G에 비하여, MLV-A 및 RD114/TR GP로써 슈도타입화된 벡터를 이용하는 경우, 훨씬 낮은 형질도입 수준이 달성되었다. 이러한 결과는 상이한 GP에 대한 CD34⁺ 세포의 수용체 발현 패턴에 있어서의 차이를 반영할 수 있으며, 중앙-레트로바이러스 벡터에 대하여 보고된 이전의 결과¹⁸와 모순되는 것으로 생각된다. 그러나, 이전의 연구 결과¹⁶⁻¹⁸와 일관되게, RD114/TR GP 및 레트로벡틴의 조합 사용은 인간 세포의 형질도입을 크게 증가시켰으며, 따라서 RD114/TR-슈도타입화된 렌티바이러스 벡터는 VSV-G로써 슈도타입화된 것들을 능가한다(도 5). 감염을 증대시키는 CH-296 레트로벡틴 단편은, $\alpha_{4/5}\beta^1$ 인테그린에 대한 부착, 및 바이러스 당단백질, 고도 친화성 헤파린 II 도메인을 통해⁴² 두 세포 표면 모두에 결합하는 CH-296의 특성으로 인하여, 레트로바이러스 미립 및 표적 세포의 공-위치선정을 수반할 수 있다⁴³. 세포 자멸사의 저해 및 세포 분열의 자극을 포함하는 대안적인 방법이 제안되었음에도 불구하고⁶⁷, 본원의 결과는 CH-296의 차별적 효과가 렌티바이러스 코어 미립을 슈도타입화하는 데 사용된 당단백질의 타입에 따라 다르게 검출되었기 때문에 이전의 메커니즘과 일치한다. 헤파린 설페이트 프로테오글리칸과 같은 세포의 매트릭스의 단백질이 감염의 초기 단계에 주된 역할을 담당하며, 아마도 처음에 막 융합^{69,70}을 시발하도록 제공된 바이러스 수용체 자체보다는 바이러스/세포 부착⁶⁸을 매개하는 데 보다 중요할 것이다. 세포의 매트릭스 단백질에 대한 결합에 차별적으로 영향을 주는 모티브가 여러 외피 바이러스의 당단백질 내에서 발견되었다^{71,72}. 그들은 RD114 당단백질 내에서 특히 유효할 수 있으며, CH-296 매개의 세포 부착을 자극할 수 있다.

[0060] RD114/TR-슈도타입화된 SIV 벡터는, 레트로벡틴의 부재 하에, 인간 및 마카크 원숭이 PBL를 매우 효과적으로 형질도입시켰다(도 6). 실제로, 이들 세포 내에서, VSV-G 또는 MLV-A GP로써 슈도타입화된 벡터 및 RD114/TR GP로 코팅된 벡터를 이용해 측정된 형질도입 효율에 있어서는 현저한 차이가 있었다. 이러한 불일치의 원인은 이들 GP에 대한 수용체의 발현 차이에서 기인할 수 있다. 대안적으로, 이들 결과는 수용체 밀도 및/또는 초기 바이러스/수용체 상호작용 매개변수에 있어서의 차이를 필수적으로 포함하지 않을 수 있다. 여러 연구 결과들이, 형질도입 효율은 수용체의 발현 수준과 상관이 없으며^{17,73}, 오히려 수용체 클러스터링(cluster), 막 융합 메커니즘, 융합 부위, 비코팅 및 바이러스 미립의 비코팅 부위 및 핵으로부터의 이동과 같은 결합 후 사건이 중요한 것으로 보고하고 있다^{74,75}. 그러므로, SIV 벡터를 이용해 PBL를 형질도입시키는 경우에는, RD114 수용체가 VSV-G 또는 MLV-A 수용체보다 유효한 양식으로 결합 후 사건을 조절한다고 정리할 수 있다.

[0061] 세포는 공극의 용도에 따라 생체내 또는 시험관내 형질도입될 수 있다. 심지어 인간 유전자 요법, 예컨대 인간 줄기 세포의 유전자 요법 분야에서조차, 줄기 세포를 생체내 형질도입시킬 수 있으며, 대안적으로 시험관내에서 형질도입시킨 뒤, 그 형질도입된 줄기 세포를 인간 개체 내로 삽입할 수도 있다. 일면에 있어서, 인간 줄기 세포는, 당업계에 공지된 방법을 이용해 인간, 예컨대, 인간 환자로부터 절제하여, 상술한 바와 같이 형질도입시킬 수 있다. 이어서, 그 형질도입된 줄기 세포를 동일하거나 상이한 인간 내로 재도입한다.

[0062] 인간 개체가 벡터의 개체 내로의 도입에 의하여 직접 치료되는 경우, 치료는 통상 벡터의 정맥내 투여에 의하여 실시된다. 세포, 예컨대 CD34⁺ 세포, 수지상 돌기 세포, 말초 혈액 세포 또는 중앙 세포가 생체의 형질도입되

는 경우, 벡터 미립은 일반적으로 10^5 세포당 1×10^5 내지 50×10^5 형질도입 단위의 바이러스 용량으로 대략 1회 내지 50회의 다수 감염(MOI) 투여를 통해 세포와 함께 배양된다. 이 경로는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 및 50 MOI에 해당하는 벡터 투여를 포함한다. 통상적으로, 벡터의 양은 HeLa 형질도입 단위(TU)로 표시될 수 있다. 기타 벡터 투여 경로는 동맥내, 내시경(endoscopically), 병소내(intralesionally), 경피(percutaneously), 피하내(subcutaneously), 근육내, 경막내(intrathecally), 안구내(intraorbitally), 피내(intradermally), 복막내(intraperitoneally), 경기관(transtracheally), 상피(subcuticularly), 줄기내(intrastemal) 주사, 흡입 또는 경비 분무, 기관내 경로 등이 포함된다. 본 발명의 벡터를 이용하는 중앙/압 요법과 관련된 일면에 있어서, 발현 벡터는 중앙 또는 중앙 맥관 구조(vasculature) 내로의 직접 주사에 의하여 전달될 수 있다.

[0063] **7. 숙주 세포**

[0064] 본원에 사용된 바와 같이, "세포", 세포주", 및 "세포 배양주"란 용어는 교환하여 사용될 수 있다. 이들 용어는 또한 모두 임의의 모든 후속 세대인 그들의 자손체를 포괄한다. 모든 자손체는, 고의적 또는 비고의적 돌연변이로 인해 동일하지 않을 수 있다. 이중 핵산 서열의 발현 측면에서, "숙주 세포"는 원핵생물 또는 진핵생물 세포를 일컫으며, 벡터의 복제 및/또는 본 발명의 벡터에 의하여 코딩된 이중 핵산의 발현이 가능한 임의의 형질도입 가능한 유기체를 포함한다. 숙주 세포는 벡터에 대한 수령체일 수 있으며, 벡터에 대한 수령체로서 사용될 수 있다. 숙주 세포는 외인성 핵산이 숙주 세포 내로 운반되거나 또는 도입되는 과정을 일컫는 "트랜스펙션" 또는 "형질변환"될 수 있다. 형질변환된 세포는 주요 개체 세포 및 그의 자손체를 포괄한다. 본원에 사용된 바와 같이, "유전자 조작" 및 "제조합" 세포 또는 숙주 세포는, 예컨대, 본 발명의 렌티벡터와 같이 치료에 유효한 구조체를 함유하는 외인성 핵산 서열이 도입된 세포를 일컫는다. 그러므로, 제조합 세포는 제조합을 통해 도입된 핵산을 함유하지 않는 천연 세포와는 구별된다.

[0065] 특정 일면에 있어서, RNA 또는 단백질성 서열은 동일한 숙주 세포 내에서 기타 선택된 RNA 및 단백질성 서열과 함께 공발현될 수 있다. 공-발현은 숙주 세포에 2종 이상의 개별적인 제조합 벡터를 공-트랜스펙션시킴으로써 달성될 수 있다. 대안적으로, 단일 제조합 벡터는 RNA에 대한 복수의 개별적인 코딩 영역을 포함하도록 제작될 수 있으며, 이는 단일 벡터를 트랜스펙션시킨 숙주 세포 내에서 발현시킬 수 있다.

[0066] 숙주 세포는 원핵생물 또는 진핵생물로부터 유래될 수 있으며, 이는 벡터의 복제 또는 벡터-코딩된 핵산 서열의 일부 또는 전체의 발현 중 어떠한 결과를 원하는가에 따라 좌우된다. 다수의 세포주 및 세포 배양주가 숙주 세포 용도로 활용 가능하며, 이들은 살아있는 세포 배양주 및 유전 물질에 대한 보관 기관인 American Type Culture Collection(ATCC)를 통해 입수할 수 있다. 본 발명에 사용된 숙주 세포의 몇몇 예는, 비제한적으로, 바이러스 포장 세포, 바이러스 생산자 세포, 293T 세포, 인간 조혈 모세포, 인간 조혈 줄기 세포, CD34⁺ 세포, CD4⁺ 세포 등을 포함한다.

[0067] **A. 조직 및 세포**

[0068] 당업자라면, 본 발명이 어떠한 하나의 특정 세포 타입으로 제한되지 않으며, 본 발명의 방법 및 렌티바이러스가 다양한 세포 타입의 트랜스 유전자를 발현시키는 데 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 사용 가능한 몇몇 세포 타입의 예로는, 뉴런, 폐세포, 근육세포, 간세포, 췌장세포, 내피세포, 심장세포, 피부세포, 골수기질 세포, 귀 및 안구 세포와 같은 말단 차별화된 세포가 포함된다. 나아가, 줄기 세포 및 모세포(progenitor cell), 예컨대 췌장관 세포, 신경 전구체, 및 중배엽 줄기 세포 역시 사용 가능하다. 그러나, 그 중에서도 보다 바람직한 본 발명의 렌티벡터는 인간 생체 안전성 요건을 충족하면서도 인간 모세포 내에서 고도의 트랜스 유전자 발현 수준을 허용하는 매우 바람직한 특징을 갖는다.

[0069] 바이러스 미립을 생산하는 경우에는, 렌티바이러스 Gag 및 Pol 유전자의 발현에 적합한 임의의 세포, 또는 그러한 발현을 지지하도록 조작될 수 있는 임의의 세포를 사용할 수 있다. 예컨대, 293T 세포, TE 671 및 HT1080 세포와 같은 생산자 세포가 사용될 수 있다.

[0070] 물론, 주지한 바와 같이, 본 발명의 렌티벡터는 골수, 말초 혈액 또는 체대혈(umbilical cord blood)로부터 얻어진 인간의 조혈 모세포 또는 조혈 줄기 세포의 형질도입 또는 CD4⁺ T 세포, 말초 혈액 B 또는 T 림프구 세포, 및 말초 혈액 단핵 세포, 수지상 돌기 세포, 및 단핵구 세포의 형질도입에 특히 유용할 것이다. 특히 바람직한 표적은 CD34⁺ 세포이다. 조직은 핵산 전달 조성물 및/또는 부가의 제제로 형질변환되거나 접촉될 숙주 세포 또는 세포들을 포함할 수 있다. 그러한 조직은 유기체의 일부이거나 유기체로부터 분리될 수 있다. 특정 일면에

있어서, 조직 및 그의 구성성분 세포는, 비제한적으로, 혈액(예컨대, 조혈 세포(예를 들어, 인간의 조혈 모세포, 인간의 조혈 줄기 세포, CD34⁺ 세포, CD4⁺ 세포), 림프구 및 기타 혈액 계통의 세포), 골수, 뇌, 줄기 세포, 혈관, 간, 폐, 골, 유방, 연골조직(cartilage), 자궁경부(cervix), 직장, 각막, 배아, 자궁내막(endometrium), 내피, 상피, 식도, 안면(facia), 섬유아세포, 여포(follicular), 신경절 세포, 아교 세포, 슬잔(goblet) 세포, 신장, 림프절, 근육, 뉴런, 난소, 췌장, 말초 혈액, 전립선, 피부, 소장, 비장, 고환을 포함할 수 있다.

[0071] **B. 유기체**

[0072] 특정 일면에 있어서, 숙주 세포 또는 조직은 적어도 하나의 유기체 내에 포함되어 있을 수 있다. 특정 일면에 있어서, 유기체는, 인간, 영장류 또는 설치류일 수 있다. 다른 일면에 있어서, 당업자라면 이해할 수 있는 바와 같이, 그러한 유기체는 임의의 진핵생물 또는 심지어는 원핵생물(예컨대, 유박테리아, 미생물)일 수 있다. 본 발명의 일부 렌티벡터에는 원핵생물 및 진핵생물 세포 모두에서 복제 및/또는 발현되도록 하는 조절 서열이 사용될 수 있다. 당업자라면, 상기한 모든 숙주 세포를 배양하여, 이들을 유지하고 벡터 복제를 허용하는 조건을 알 수 있을 것이다. 또한, 본 발명의 렌티벡터의 대규모 생산뿐 아니라, 렌티벡터에 의하여 코딩된 핵산, 및 유전자 요법에 사용될 치료제 유전자 또는 동일 기원의 폴리펩타이드, 단백질, 또는 펩타이드의 생산을 가능하게 하는 기술 및 조건을 이해하며 알고 있을 것이다.

[0073] **C. 주사 가능한 조성물 및 약학적 제형**

[0074] 본 발명의 렌티바이러스 벡터 조성물을 이용하여 유전자-요법을 달성하기 위해서는, 일반적으로, 이를 필요로 하는 세포와 치료제 유전자를 포함하는 렌티바이러스 벡터를 접촉시켜야 할 것이다. 세포는 그러한 유전자 요법을 필요로 하는 인간과 같은 유기체 내에 존재할 것이다. 투여 경로로는 질병의 위치 및 성질에 따라 가변적이며, 예컨대, 정맥내, 동맥내, 피내, 경피, 근육내, 비강내, 피하, 경피 주사, 도관내, 복막내, 종양내, 살포, 및 위장세척(lavage)이 포함된다. 세포는 또한 종종 렌티벡터에 생체의 노출된 이후 재삽입된 유기체로부터 분리될 수도 있다.

[0075] 본 발명의 렌티바이러스 핵산 구조체의 주사는, 발현 구조체가 주사에 요구되는 바늘의 특정 게이지를 통과할 수 있는 한, 용액 주사에 사용되는 주사기 또는 임의의 방법에 의하여 전달될 수 있다. 용액 홀딩을 위한 앰플 체임버를 규정하는 노즐 및 상기 노즐로부터 전달 부위로 상기 용액을 밀어 주입하기 위한 에너지 기구가 구비된 신규한 무바늘 주사 시스템이 최근 보고된 바 있다(U.S. 특허 제5,846,233호). 또한, 임의의 깊이로 정확히 소정량의 용액을 다수회 주사하는 것이 가능한 유전자 요법용 주사기 시스템도 보고된 바 있다(U.S. 특허 제 5,846, 225호). 유리된 염기 또는 약리학적으로 허용 가능한 염으로서의 핵산 용액이, 하이드록시프로필셀룰로오스와 같은 상청액과 적절히 혼합된 수용액으로서 제조될 수 있다. 분산액 또한 글리세롤, 액상 폴리에틸렌 글리콜, 및 그의 혼합물, 및 오일 용액으로서 제조될 수 있다. 통상의 보관 및 사용 조건 하에서, 이들 제제는 미생물의 생장을 억제하는 방부제를 함유한다. 주사용으로 적합한 약학적 형태는 주사 가능한 살균 용액 또는 분산액의 즉석 조제를 위한 살균 수용액 또는 분산액 및 살균 분말(U.S. 특허 제5,466,468호)을 포함한다. 모든 경우, 이들 형태는 살균되어야 하며, 용이하게 주사할 수 있는 크기로 유체화되어야 한다. 이들은 또한 제조 및 보관 조건 하에서 안정적이어야 하며, 박테리아 및 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 캐리어는 예컨대, 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액상 폴리에틸렌 글리콜, 등), 이들의 적절한 혼합물, 및/또는 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산액 매질일 수 있다. 계면활성제의 사용을 통해, 레시틴과 같은 코팅, 분산액에 요구되는 입경 및 적절한 유동성을 유지시킬 수 있다. 다양한 항균제 및 항진균제, 예컨대, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티레오살 등을 통해 미생물 작용을 방지할 수 있다. 대부분의 경우, 당 또는 염화나트륨과 같은 등장제(isotonic agent)를 포함하는 것이 바람직할 것이다. 흡수를 지연시키는 제제, 예컨대 알루미늄 노모스테아레이트 및 젤라틴을 사용하면, 주사 가능한 조성물의 장기간 흡수는 달성할 수 있다.

[0076] 수용액 내 비경구 투여의 경우, 예컨대 용액은 필요한 경우 적절히 완충되며, 액상 희석제는 먼저 충분한 식염수 또는 글루코오스로 1차 등장화된다. 이러한 특정한 수용액은 정맥내, 동맥내, 근육내, 피하, 종양내, 및 복막내 투여용으로 특히 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 수계 살균 매질은 당업계에 공지되어 있다. 예컨대, 1회 용량은 1 ml의 등장 NaCl 용액 내에 용해되거나, 1000 ml의 하이퍼모클라이시스(hypodermoclysis) 유체에 첨가하거나, 소정의 주입 부위에 주사될 수 있다(예컨대, "Remington's Phamaceutical Sciences" 15판, 1035-1038쪽 및 1570-1580쪽 참조). 치료되는 개체의 상태에 따라, 필요 용량을 다소 변화시킬 수 있을 것이다. 임의의 사건 발생 시에는 투여 전문가가 개개인에 적합한 용량을 결정할 것

이다. 나아가, 인간 투여의 경우, 이들 제제는 FDA Office of Biologics standards에 의해 요구되는 살균성, 발열원성(pyrogenicity), 전반적인 안전성 및 순도 기준에 충족되어야 한다.

[0077] 주사 가능한 살균 용액은, 요구되는 경우 상술한 기타 성분과 함께, 요구량의 적절한 용매 내에 활성 화합물을 혼입한 뒤, 여과 살균함으로써 제조한다. 일반적으로, 분산액은 기본적인 분산액 매질 및 상술한 것들 중 요구되는 기타 성분들을 함유하는 살균 비히클 내로 살균된 다양한 활성 성분들을 혼입시킴으로써 제조된다. 주사 가능한 살균 용액의 제조를 위한 살균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은, 미리 살균-여과된 용액으로부터 활성 성분에 임의의 바람직한 추가 성분의 분말을 수득하는 진공 건조 및 동결 건조 기법이다.

[0078] 본원에 개시한 조성물은 중성 또는 염의 형태로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염은 산 부가염을 포함하며, 예컨대, 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산과 같은 유기산 등과 함께 형성된다. 또한, 카르복시기와 함께 형성된 염은 예컨대 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘, 또는 수산화철과 같은 무기산, 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기산으로부터 유도될 수 있다. 조제 시, 용액은 단위 투여 제형에 적합한 방식으로 치료에 유효한 양으로 투여될 것이다. 제형은 주사 가능한 용액, 약물 방출 캡슐 등과 같은 다양한 단위 투여 형태로 용이하게 투여된다.

[0079] 본원에 사용된 바와 같이, "캐리어"는 임의의 모든 용매, 분산액 매질, 비히클, 코팅, 희석제, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제, 버퍼, 캐리어 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 약학적 활성 물질에 대한 그러한 매질 및 제제의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 상기 활성 물질에 적합하지 않은 경우를 제외하고는, 통상적인 임의의 매질 또는 제제가 치료제 조성물에 사용 가능하다. 강화 활성 물질 역시 상기 조성물에 혼입될 수 있다.

[0080] "약학적으로 허용 가능한" 또는 "약리학적으로 허용 가능한"이란 용어는 인간에게 투여되는 경우 알레르기 반응 또는 그와 유사한 원치 않는 반응을 발생시키지 않는 분자 및 조성물을 일컫는다. 활성 성분으로서 단백질을 함유하는 수계 조성물 제제는 당업계에 공지되어 있다. 통상적으로, 그러한 조성물은 주사 가능한 액상 용액 또는 현탁액으로서 제조되며, 주사 직전에 용액 또는 현탁액 용해에 적합한 고형물 형태로도 제조될 수 있다.

[0081] 세포에 적용되는 경우, "접촉" 및 "노출"이란 용어는 치료제 렌티바이러스 벡터가 표적 세포로 전달되도록 하는 과정을 기술하는 용어로 사용된다.

[0082] 불연속적인 접근 가능한 고형 종양의 유전자-요법의 경우, 종양내 또는 종양 맥관 구조 내로의 주사가 특히 고려된다. 국소, 국부, 또는 전신 투여도 적합하다. 4 cm 이상의 종양의 경우, 투여되는 부피는 약 4-10 ml(바람직하게는, 10 ml)일 것이고, 4 cm 미만의 종양의 경우에는 약 1-3 ml의 부피가 사용될 것이다(바람직하게는, 3 ml). 1회분 용량을 전달하는 다수회 주사는 약 0.1 내지 약 0.5 ml 부피를 포함한다. 바이러스 미립은 대략 1 cm 간격을 두고 종양에 다수회 주사액을 투여함으로써 접촉시키는 것이 유리할 수 있다. 전신 투여는 혈액학적 악성종과 같은 증상에 바람직하다.

[0083] 적절한 경우에는 연속 투여를 적용할 수도 있다. 그러한 경우에는, 주사기 또는 카테터를 통한 전달이 바람직하다. 그러한 연속 살수는 치료를 개시한 후 약 1-2시간 내지 약 2-6시간, 약 6-12시간, 약 12-24시간, 약 1-2일, 약 1-2주 이상 동안 발생할 수 있다. 일반적으로, 연속 살수용 치료제 조성물의 용량은, 살수가 발생하는 시간 동안 조절되는, 1회 또는 다수회 주사에 의하여 제공된 양과 동등할 것이다.

[0084] 치료 처방은 매우 가변적일 수 있으며, 흔히 질병의 유형 및 질병 조직의 위치, 환자의 건강상태 및 연령과 같은 인자들에 따라 결정된다. 임상적은 본 발명의 렌티바이러스 벡터를 기본으로 하는 치료제 제형에 대한 기지의 효능 및 독성(존재하는 경우)을 근거로 하여 이를 결정할 수 있도록 최선의 연구를 할 것이다.

[0085] 치료에는 다양한 "단위 용량"이 포함될 수 있다. 단위 용량은 본 발명의 렌티바이러스 벡터를 포함하는 소정량의 치료제 조성물을 함유하는 것으로 정의된다. 투여될 용량, 및 특정 경로 및 제형은 임상 분야에 속하는 기술이다. 단위 용량은 반드시 1회 주사로서 투여될 필요는 없으며, 지정된 기간에 걸쳐 연속 주입을 포함할 수 있다. 본 발명의 단위 용량은, HeLa 또는 293과 같은 세포주에 대한 벡터의 적정에 의하여 규정된 바와 같이, 통상 렌티벡터의 형질도입 단위(T.U.)로 제시될 수 있다. 단위 용량은 $10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}$ T.U. 이상의 범위이다.

[0086] 8. 핵산

[0087] A. 트랜스 유전자 및 질병 치료

[0088] 본 발명의 일면은 치료제 유전자, 특히 상술한 선천성 또는 후천성 질환과 같은 조혈성 및 림프-조혈성 질환에 대한 요법을 제공하는 유전자를 코딩하는 핵산의 운반에 관한 것이다. 일면에 있어서, 상기 핵산은 그러한 유전자의 전체 길이, 실질적인 전체 길이, 또는 기능이 동등한 형태를 코딩한다. 이러한 유전자를 트랜스 유전자라 한다.

[0089] 본 발명의 렌티백터는 용도에 따라 요구되는 임의의 트랜스 유전자를 전달하는 데 이용될 수 있을 것으로 여겨진다. 조혈 모세포로 전달하고자 하는 경우에는, 통상적으로, 그러한 세포에 바람직한 기능을 부여하는 다음과 같은 트랜스 유전자를 선택할 것이다: 예컨대, 글로빈 유전자, 조혈 성장 인자, 예컨대 에리트로포이에틴 (erythropoietin; EPO), 인터류킨(예컨대, 인터류킨-1(IL-1), 인터류킨-2(IL-2), 인터류킨-3(IL-3), 인터류킨-6(IL-6), 인터류킨-12(IL-12) 등) 및 콜로니-자극 인자(예컨대, 과립구(granulocyte) 콜로니-자극 인자, 과립구/마크로파지 콜로니-자극 인자, 또는 줄기-세포 콜로니-자극 인자), 혈소판-특이성 인테그린 α IIb β , 다중-약물 내성 유전자, 만성 육아종 질환(CGD)을 가지는 환자에게 결여된 gp91 또는 gp47 유전자, 인간 면역결핍 바이러스와 같은 병원체의 감염에 대하여 세포를 내성화하는 항바이러스 유전자, 혈유병 환자에게서 돌연변이된 혈액 응집 인자 VIII 또는 IX를 코딩하는 유전자, T 세포 항원 수용체, B 세포 항원 수용체(면역글로불린), 인터류킨 수용체의 공통 γ 사슬, 및 T 및 B 세포 항원 수용체의 단독 조합물 또는 ScFv, 종양 회저 인자(TNF), IL-2, IL-12, 감마 인터페론, CTLA4, B7 등과 같은 단일 사슬 항체와의 조합물과 같은 T 세포-매개의 면역 반응에 관여하는 리간드, 및 멜라나(Melana), MAGE 유전자(예컨대, MAGE-1, MAGE-3), P198, P1A, gp100 등과 같은 종양 세포 내에서 발현되는 유전자.

[0090] 본 발명의 주요 원리는 가능한 많은 이유로, 원하는 트랜스 유전자를 조혈 세포로 전달하는 백터를 제조하는 것일 것이다. 이는 물론 비제한적으로, 화학요법 또는 면역억제요법 또는 감염의 결과로 초래될 수 있는 골수억제 (myelosuppression) 및 호중성 백혈구 감소증(neutropenia), AIDS, 유전적 질환 등을 포함한다.

[0091] 조혈 세포의 유전적 질환의 예로는, 낫 세포 빈혈증, 탈라세미아(thalassemias), 혈색소병증(hemaglobinopathy), 글란즈만 혈소판 무력증(Glanzmann thrombasthenia), 리소좀 축적증(lysosomal storage disorder)(예컨대, 파브리병, 가우셔병, 니만-피크병, 및 위스코트-알드리치 증후군), 중증 복합 면역결핍 증후군(SCID), 및 분비된 단백질, 예컨대, 응집 인자 VIII 및/또는 IX의 전신 생산의 결여에 기인하는 질병이 포함된다. 예컨대, 글로빈 유전자, 조혈 성장 인자, 에리트로포이에틴 (EPO), 인터류킨(특히, 인터류킨-1, 인터류킨-2, 인터류킨-3, 인터류킨-6, 인터류킨-12 등) 및 콜로니-자극 인자(예컨대, 과립구 콜로니-자극 인자, 과립구/마크로파지 콜로니-자극 인자, 또는 줄기-세포 콜로니-자극 인자), 혈소판-특이성 인테그린 α IIb β , 다중-약물 내성 유전자, 만성 육아종 질환(CGD)을 가지는 환자에게 결여된 gp91 또는 gp47 유전자, 인간 면역결핍 바이러스와 같은 병원체의 감염에 대하여 세포를 내성화하는 항바이러스 유전자, 혈유병 환자에게서 돌연변이된 혈액 응집 인자 VIII 또는 IX를 코딩하는 유전자, T 세포 항원 수용체, B 세포 항원 수용체(면역글로불린), 인터류킨 수용체의 공통 γ 사슬, 및 T 및 B 세포 항원 수용체의 단독 조합물 또는 단일 사슬 항체(ScFv), IL-2, IL-12, TNF, 감마 인터페론, CTLA4, B7 등과 같은 단일 사슬 항체와의 조합물과 같은 T 세포-매개의 면역 반응에 관여하는 리간드, 및 멜라나, MAGE 유전자(예컨대, MAGE-1, MAGE-3), P198, P1A, gp100 등과 같은 종양 세포 내에서 발현되는 유전자와 같은 트랜스 유전자를 도입하는 것이 바람직하다.

[0092] 암의 예로는, 예컨대 골수, 림프 또는 적혈구 계통 또는 그의 전구 세포에서 발생하는 조혈 모세포의 암들이 있다. 골수 질환의 예로는, 비제한적으로, 급성 전구-골수 백혈병(APML), 급성 골수 백혈병(AML) 및 만성 골수 백혈병(CML)이 포함된다. 본 발명의 렌티백터를 이용해 치료될 수 있는 림프 악성종으로는, 비제한적으로, B-계통 ALL 및 T-계통 ALL을 포함하는 급성 림프모구 백혈병(ALL), 만성 림프구 백혈병(CLL), 전구-림프구 백혈병(PLL), 모발 세포 백혈병(HLL) 및 왈덴스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia; WM)이 포함된다. 본 발명의 렌티바이러스 백터를 이용해 치료할 수 있는 후보 질환으로서 고려되는 악성 림프종의 다른 형태로는, 비제한적으로 비-훗킨 림프종 및 그의 변종, 말초 T-세포 림프종, 성인 T-세포 백혈병/림프종(ATL), 피부 T-세포 림프종(CTCL), 거대 과립 림프구 백혈병(LGF) 및 훗킨병이 포함된다.

[0093] 따라서, 본 발명의 일면에 있어서, 조혈성 및 림프-조혈성 질환의 치료에는 조혈 모세포에 대한 치료제 핵산 발현 구조체를 포함하는 본 발명의 렌티바이러스 백터의 투여가 수반된다. 조혈성 및 림프-조혈성 질환의 치료용 의약을 제조하기 위한 치료제 핵산 발현 구조체를 포함하는 본 발명의 렌티바이러스 백터의 용도 또한 본 발명의 범위 내에 포함된다. 조혈 세포는 상기 구조체를 흡수해, 상기 핵산에 의해 코딩되는 치료제 폴리펩타이드를 발현시킴으로써, 세포에 정상 표현형을 복원시키는 것으로 여겨진다.

- [0094] 핵산은 당업계에 공지된 임의의 기술에 의하여 제조될 수 있다. 비제한적인 합성 핵산, 특히 합성 올리고뉴클레오타이드의 예로는, 포스포트리에스테르, 포스포이트, 또는 포스포라미다이트 화학을 이용한 시험관내 화학적 합성, 및 EP 266,032에 제시된 바와 같은 고체상 기법, 또는 Froehler 등에 의하여 1986년에 제시되었으며 U.S. 특허 제5,705,629호에 제시된 테옥시뉴클레오사이드 H-포스포네이트 중간체를 통해 만들어진 핵산이 포함된다. 효소를 이용해 생산된 핵산의 비제한적인 예로는, PCR™(예컨대, U.S. 특허 제4,683,202호 및 U.S. 특허 제4,682,195호 참조)과 같은 증폭 반응 또는 U.S. 특허 제5,645,897호에 제시된 올리고뉴클레오타이드의 합성을 통해 효소에 의하여 제조된 것들이 있다. 생물학적으로 생산된 핵산의 비제한적인 예로는 생세포 내에서 생산된 재조합 핵산이 포함된다(예컨대, Sambrook *et al.* 2000 참조).
- [0095] 핵산은 폴리아크릴아미드 겔, 세슘 클로라이드 원심분리 구배, 또는 당업계에 공지된 임의의 기타 수단을 통해 정제될 수 있다(예컨대, Sambrook *et al.* 2000 참조).
- [0096] "핵산"이란 용어는 일반적으로 적어도 하나의 핵염기(nucleobase), 예컨대, DNA에서 발견되는 천연 퓨린 또는 피리미딘 염기(예컨대, 아데닌 "A", 구아닌 "G", 티민 "T", 및 사이토신 "C") 또는 RNA에서 발견되는 것들(예컨대 A, G, 우라실 "U", 및 C)를 포함하는 DNA, RNA 또는 그의 유도체 또는 모방체의 적어도 한 분자 또는 가닥을 일컫는다. "핵산"이란 용어는 "올리고뉴클레오타이드" 및 "폴리뉴클레오타이드"란 용어를 포괄한다. "올리고뉴클레오타이드"란 용어는 약 3개 내지 약 100개 핵염기 길이의 적어도 하나의 분자를 일컫는다. "폴리뉴클레오타이드"란 용어는 약 100개 이상의 핵염기 길이의 적어도 하나의 분자를 일컫는다. 이들 정의는 일반적으로는 적어도 하나의 단일-가닥 분자를 의미하나, 특정 일면에서는, 상기 적어도 하나의 단일 가닥 분자와 부분적으로, 실질적으로 또는 완전히 상보적인 적어도 하나의 추가적인 가닥을 포괄한다. 따라서, 핵산은 그 분자의 가닥을 포함하는 특정 서열의 하나 이상의 상보 가닥(들) 또는 "상보체(들)"를 포함하는 적어도 하나의 이중 가닥 분자 또는 적어도 하나의 삼중 가닥 분자를 포괄할 수 있다.
- [0097] 특정 일면에 있어서, "유전자"란 용어는 전사되는 핵산을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, "유전자 단편"은 유전자의 핵산 단편이다. 일면에 있어서, 상기 유전자는 전사에 관여하는 조절 서열, 또는 메시지 생산체 또는 조성을 포함한다. 특정 일면에 있어서, 상기 유전자는 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 코딩하는 전사된 서열을 포함한다. 다른 일면에 있어서, 상기 유전자는 조절성 및 림프-조혈성 질환에서 결여되거나 돌연변이된 유전자의 폴리펩타이드 또는 펩타이드-코딩 서열을 코딩하거나, 핵산을 포함한다. 본원에 기술된 전문용어와 일치하여, "분리된 유전자"는 기타 천연 유전자, 조절 서열, 폴리펩타이드 또는 펩타이드 코딩 서열 등과 같은 기타 서열이 실질적으로 분리 제거된, 전사된 핵산(들), 조절 서열, 코딩 서열 등을 포함할 수 있다. 이러한 측면에서, "유전자"란 용어는 단순히 전사되는 뉴클레오타이드 서열 및 그의 상보체를 포함하는 핵산을 일컫는 의미로서 사용된다. 특정 일면에 있어서, 상기 전사된 뉴클레오타이드 서열은 적어도 하나의 기능성 단백질, 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드 코딩 단위체를 포함한다. 당업자가 이해하는 바와 같이, "유전자"란 기능적 용어는 게놈 서열, RNA 또는 cDNA 서열, 또는 보다 작게 제작된 핵산 단편, 비제한적으로 유전자의 비전사된 프로모터 또는 인핸서 부위를 포함하는 유전자의 비전사 부분의 핵산 단편을 포괄한다. 상기 보다 작게 제작된 유전자 핵산 단편은 발현될 수 있으며, 핵산 조작 기술, 단백질, 폴리펩타이드, 도메인, 펩타이드, 융합 단백질, 및/또는 돌연변이 등을 이용하여 발현되도록 개조될 수 있다. 따라서, "트런케이티드(truncated) 유전자"란 인접한 핵산 잔기의 스트레치를 유실한 핵산 서열을 일컫는다.
- [0098] 특정 핵산 서열을 기본으로 하여 임의의 길이의 다양한 핵산 단편이 설계될 수 있다. 서열에 대하여 번호 값을 지정함으로써, 예컨대, 첫 번째 잔기는 1번으로, 두 번째 잔기는 2번 등의 형식으로 지정함으로써, 모든 핵산 단편을 규정하는 알고리즘을 창출할 수 있다:
- [0099] **n 내지 n + y**
- [0100] 여기서, n은 1에서 서열의 최종 번호까지의 정수이고, y는 핵산 단편 길이에서 1을 뺀 값이며, 이때 n + y는 서열의 최종 번호를 초과하지 않는다. 따라서, 10량체의 경우, 핵산 단편은 염기 1 내지 10, 2 내지 11, 3 내지 12... 등에 해당한다. 15량체의 경우, 핵산 단편은 염기 1 내지 15, 2 내지 16, 3 내지 17... 등에 해당한다. 20량체의 경우, 핵산 단편은 염기 1 내지 20, 2 내지 21, 3 내지 22... 등에 해당한다.
- [0101] 본 발명의 핵산(들)은, 서열 자체의 길이에 관계없이, 비제한적으로, 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 제한 효소 부위, 다중 클로닝 부위, 코딩 단편 등을 포함하는 기타 핵산 서열과 조합되어, 하나 이상의 핵산 구조체(들)를 창출할 수 있다. 핵산 구조체들 사이에서 전체 길이는 현저히 가변적일 수 있다. 따라서, 거의 모든 길이의 핵산 단편이 사용될 수 있으며, 바람직한 것은 총길이가 의도하는 재조합 핵산 프로토콜에의 용이한 사

용 및 제조를 제한하지 않는 길이다.

[0102] "벡터"란 용어는 그것이 복제될 수 있는 세포 내로의 유입을 위하여 핵산 서열이 삽입될 수 있는 캐리어 핵산 분자를 일컫는다. 본 발명의 벡터는 본원에서 제시한 바를 근거로 하는 렌티바이러스이다. 본 발명의 벡터에 의하여 운반되는 핵산 분자는 치료제 유전자를 코딩하며, 유전자 요법의 실시에 사용될 것이다. 당업자라면, 표준 재조합 기술(예컨대, Maniatis *et al.*, 1988 및 Ausubel *et al.*, 1994)을 통해 치료제 벡터와 같은 구조체를 용이하게 제작할 수 있을 것이다.

[0103] "발현 벡터"란 용어는 전사될 수 있는 RNA를 코딩하는 핵산을 포함하는 임의의 유형의 유전자 구조체를 일컫는다. 일부의 경우, RNA 분자는 이어서 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드로 번역된다. 다른 경우, 예컨대, 안티센스 분자 또는 리보자임이 생산되는 경우, 이들 서열은 번역되지 않는다. 발현 벡터는 특정 숙주 세포 내에서 유효하게 결합된 코딩 서열의 전사 및 가능한 경우 번역에 필요한 핵산 서열을 의미하는 다양한 "조절 서열"을 함유할 수 있다. 전사 및 번역을 관할하는 조절 서열 외에도, 벡터 및 발현 벡터는 기타 기능을 제공하는 이하에 상술하는 바와 같은 핵산 서열을 함유할 수 있다.

[0104] **B. 다중 클로닝 부위**

[0105] 본 발명의 벡터는, 다중 제한 효소 부위를 함유하는 핵산 영역인 다중 클로닝 부위(MCS)를 포함할 수 있으며, 이들 중 어느 것은 벡터를 분해하는 표준 재조합 기술(예컨대, Carbonelli *et al.*, 1999, Levenson *et al.*, 1998, 및 Cocea, 1997 참조)과 관련하여 사용될 수 있다. "제한 효소 분해"란, 핵산 분자 내의 특정 위치에만 작용하는 효소를 이용해 핵산 분자를 촉매적으로 절단하는 것을 의미한다. 이러한 제한 효소의 대부분은 상업적으로 입수 가능하다. 제한 효소의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 종종, 벡터는, 외인성 서열을 벡터에 결합시킬 수 있는 MCS 내부를 절단하는 제한 효소를 이용해 선형화 또는 단편화된다. "결찰(Ligation)"이란, 서로 인접하여 있을 수도 있고 그렇지 않을 수도 있는, 2개의 핵산 단편 사이에 포스포다이에스테르 결합이 형성되는 과정을 의미한다. 제한 효소 및 결찰 반응에 관련된 기술은 재조합 기술 분야에 공지되어 있다.

[0106] **C. 스플라이싱 부위**

[0107] 대부분의 전사된 진핵생물 RNA 분자는 RNA 스플라이싱을 진행함으로써, 1차 전사체로부터인트론을 제거한다. 게놈 진핵생물 서열을 함유하는 벡터는, 단백질 발현에 대한 전사체의 적절한 프로세싱을 확보하기 위하여 도너 및/또는 억셉터 스플라이싱 부위를 요할 수 있다(예컨대, Chandler *et al.*, 1997 참조).

[0108] **D. 종결 신호**

[0109] 본 발명의 벡터 또는 구조체는 일반적으로 적어도 하나의 종결 신호를 포함할 것이다. "종결 신호" 또는 "종결자(terminator)"는 RNA 전사체의 특이적인 종결에 관여하는 DNA 서열로 구성된다. 따라서, 특정 일면에 있어서, RNA 전사체의 생산을 중단시키는 종결 신호가 고려된다. 종결자는 생체내에서 바람직한 메시지 수준을 달성하기 위해 필요할 수 있다.

[0110] 진핵생물 시스템에서, 종결자 영역 역시 새로운 전사체의 부위-특이성 절단을 허용해 폴리아데닐화 부위에 노출되도록 하는 특정 DNA 서열을 포함한다. 이는 약 200개의 A 잔기(폴리아)를 전사체의 3' 말단에 첨가하는 특정화된 내생 폴리머라제를 신호화한다. 이러한 폴리A 테일로 변형된 RNA 분자는 보다 안정성이며, 보다 효과적으로 번역된다. 따라서, 진핵생물과 관련된 다른 일면에 있어서, 그러한 종결자는 RNA 절단에 대한 신호를 포함하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직한 것은, 그러한 종결자 신호가 메시지의 폴리아데닐화를 촉진하는 것이다. 상기 종결자 및/또는 폴리아데닐화 부위 요소는 메시지 수준을 증대시키고, 카세트로부터 기타 서열 내로의 관독을 최소화하기 위하여 제공될 수 있다.

[0111] 본 발명의 용도로 고려되는 종결자는, 비제한적으로, 예컨대 소의 성장 호르몬 종결자 또는 바이러스 종결 서열, 예컨대 유전자의 종결 서열을 포함하는 이상에 개시한 것들 또는 당업계에 공지된 임의의 전사 종결자, 예컨대 SV40 종결자를 포함한다. 특정 일면에 있어서, 상기 종결 신호는 서열 트랜스제이션에 기인한 것들과 같은 전사 가능한 또는 번역 가능한 서열의 결여일 수 있다.

[0112] **E. 폴리아데닐화 신호**

[0113] 진핵생물 유전자 발현에 있어서는, 통상 전사체의 적절한 폴리아데닐화를 구현하기 위하여 폴리아데닐화 신호가 포함된다. 폴리아데닐화 신호의 성질은 본 발명의 성공적인 실시에서 결정적으로 중요한 것으로 여겨지는 않으며, 임의의 서열이 사용될 수 있다. 그러한 서열의 몇 가지 예로는, 다양한 표적 세포 내에서 잘 작용하는 것으로 알려진 SV40 폴리아데닐화 신호 또는 소의 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호가 포함된다. 폴리아데닐화는

전사체의 안정성을 증가시키거나, 세포질 운반을 용이하게 할 수 있다.

[0114] **F. 복제 오리진(Origin)**

[0115] 숙주 세포 내에서 본 발명의 벡터를 증식시키기 위하여, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 하나 이상의 복제 오리진 부위(흔히 "ori"라 칭함)를 함유할 수 있다. 대안적으로, 숙주 세포가 효모인 경우에는, 자발적 복제 서열(ARS)을 이용할 수 있다.

[0116] **G. 선택 가능 및 선별 가능 마커**

[0117] 본 발명의 특정 일면에 있어서, 본 발명의 렌티벡터로써 형질도입된 세포는 발현 벡터 내에 마커를 포함시킴으로써 시험관내 또는 생체내 동정될 수 있다. 그러한 마커는 발현 벡터를 함유하는 세포의 용이한 동정을 가능하게 하는 동정 가능한 변화를 형질도입된 세포에 제공할 것이다. 일반적으로, 선택 가능 마커는 선택을 가능하게 하는 특성을 부여하는 것이다. 양성 선택 가능 마커는 그 마커의 존재가 그의 선택을 가능하게 하는 것이고, 음성 선택 가능 마커는 그 마커의 존재가 그의 선택을 방해하는 것이다. 양성 선택 가능 마커의 예로는 약물 내성 마커가 있다.

[0118] 통상적으로, 약물 선택 마커 보조체의 포함은 형질변환체의 클로닝 및 동정을 조력하며, 네오마이신, 푸로마이신, 하이그로마이신, DHFR, GPT, 제오신, 및 히스티딘돌에 대한 내성을 부여하는 유전자 구조체가 유용한 선택 가능 마커들이다. 조건 이행을 기본으로 하는 형질변환체의 식별을 가능하게 하는 표현형을 부여하는 마커 외에도, 비색계(colorimetric) 분석을 기본으로 하는 GFP와 같은 선별 가능 마커를 포함하는 기타 유형의 마커도 고려된다. 대안적으로, 헤르페스 단일 바이러스 티미딘 키나제(tk) 또는 클로르암페니콜 아세틸라제(CAT)와 같은 선별 가능 효소가 사용될 수 있다. 당업자라면, FACS 분석과 관련하여 가능한 면역학적 마커의 이용 방법을 알고 있을 것이다. 유전자 산물을 코딩하는 핵산과 동시에 발현될 수 있는 한, 사용되는 마커는 중요하지 않은 것으로 여겨진다. 선택 가능 및 선별 가능 마커의 다른 예들은 당업계에 공지되어 있다.

[0119] **9. 프로모터 및 인핸서**

[0120] "프로모터"는 전사 개시 및 속도가 조절되는 핵산 서열 영역인 조절 서열이다. 이들 프로모터는, RNA 폴리머라제 및 기타 전사 인자와 같은 조절 단백질 및 분자가 결합하여 핵산 서열의 특이적인 전사를 개시할 수 있는 유전자 요소를 함유할 수 있다. "유효하게 배치된", "유효하게 결합된", "조절 하에" 및 "전사 조절 하에"란 용어는, 프로모터가 서열의 전사 개시 및 발현을 조절하는 핵산 서열과 관련하여 올바른 작용 위치 및/또는 배향으로 배치됨을 의미한다.

[0121] 프로모터는 일반적으로 RNA 합성을 위한 시작 부위를 지정하는 기능을 담당하는 서열을 포함한다. 이러한 서열로서 가장 잘 알려진 것으로는 TATA 박스가 있으나, 일부 프로모터, 예컨대, 포유류 말단 데옥시뉴클레오타이드 트랜스퍼라제 유전자에 대한 프로모터, 및 SV40 후기 유전자에 대한 프로모터에는 TATA 박스가 결여되어 있으며, 자체 시작 부위와 중첩되는 불연속 요소는 개시 위치를 고정시킨다. 부가적인 프로모터 요소가 전사 개시 빈도를 조절한다. 통상, 다수의 프로모터가 시작 부위의 업스트림에 기능성 요소를 함유하는 것으로 밝혀진 바 있으나, 이들은 시작 부위 업스트림의 30-110bp 영역 내에 위치한다. 코딩 서열을 프로모터의 "조절 하에" 유지시키기 위하여, 하나는 선택된 프로모터의 "다운스트림"(즉, 3')의 전사 리딩 프레임(reading frame)의 전사 개시 부위의 5' 말단에 위치한다. "업스트림" 프로모터는 DNA의 전사를 촉진하며, 코딩된 RNA의 발현을 촉진한다.

[0122] 흔히 프로모터 요소들 사이의 간격은 탄력적이어서, 요소들이 서로 이동하거나 전도된 경우에도 프로모터 기능이 보존된다. tk 프로모터에서, 프로모터 요소들 사이의 간격은 활성이 감퇴하기 시작하기 전까지 50bp까지 증가될 수 있다. 프로모터에 따라, 개별 요소들은 전사를 활성화하기 위하여 상호 협력하여 기능할 수도 있고 서로 독립적으로 기능할 수도 있다. 프로모터는, 핵산 서열의 전사 활성화에 관여하는 시스-작용 조절 서열을 의미하는 "인핸서"와 함께 사용될 수도 있고, 그렇지 않을 수도 있다.

[0123] 프로모터는, 코딩 구획 및/또는 엑손의 업스트림에 위치하는 5' 비코딩 서열을 분리함으로써 얻을 수 있으므로, 이는 핵산 서열과 자연적으로 회합하는 것 중 하나일 수 있다. 그러한 프로모터를 "나생" 프로모터라 칭할 수 있다. 마찬가지로, 인핸서는 그 서열의 다운스트림 또는 업스트림 중 하나에 위치하는 핵산 서열과 회합하는 것 중 하나일 수 있다. 대안적으로, 몇몇 장점은, 천연 환경에서 핵산 서열과 정상적으로 회합하지 않는 프로모터를 일컫는, 이중 프로모터 또는 재조합의 조절 하에 코딩 핵산 단편을 배치시킴으로써 획득될 수 있다. 재조합 또는 이중 인핸서는 천연 환경에서 핵산 서열과 정상적으로 회합하지 않는 인핸서를 일컫는다. 그러한 프로모터 또는 인핸서는 기타 유전자의 프로모터 또는 인핸서, 임의의 기타 바이러스, 또는 원핵생물 또는 진핵생

물 세포로부터 분리된 프로모터 또는 인핸서, 및 비천연 프로모터 또는 인핸서, 즉 상이한 전사 조절 영역의 요소 및/또는 발현을 변화시키는 돌연변이를 함유하는 프로모터 또는 인핸서를 포함할 수 있다. 예컨대, 재조합 DNA 제작에 가장 보편적으로 사용되는 프로모터는 β-락타마제(페니실리나제(penicillinase)), 락토오스, 및 트립토판(trp) 프로모터 시스템을 포함한다. 프로모터 및 인핸서의 핵산 서열을 합성 생산하는 것 외에도, 서열들은 본원에 개시한 조성물과 관련하여 PCR™을 포함하는 핵산 증폭 및/또는 재조합 클로닝 기술을 이용해 생산할 수 있다(U.S. 특허 제4,683,202호 및 제5,928,906호 참조). 나아가, 미토콘드리아, 염록체 등과 같은 비핵 세포기관(organelle) 내에서 서열의 전사 및/또는 발현을 관할하는 조절 서열도 사용될 수 있다. 프로모터, 인핸서 및 기타 로커스(locus) 또는 전사 제어/조절 요소를 포함하는 조절 서열을 "전사 카세트"라 칭하기도 한다.

[0124] 물론, 발현을 위해 선택된 세포기관, 세포 타입, 조직, 기관, 또는 유기체 내에서 DNA 단편의 발현을 효과적으로 관할하는 프로모터 및/또는 인핸서를 이용하는 것이 중요할 것이다. 분자생물학 분야에서, 단백질 발현을 위한 프로모터, 인핸서, 및 세포 타입 조합체의 사용은 전반적으로 알려져 있다(예컨대 Sambrook *et al.*, 2000 참조). 사용되는 프로모터는, 도입된 DNA 단편의 고도의 발현 수준을 유도하는 적합한 조건 하에서 구조적, 조직-특이성, 유도 가능 및/또는 유용할 수 있으므로, 재조합 단백질 및/또는 펩타이드의 대규모 생산과 같은 용도 또는 유전자 요법에 유용하다. 프로모터는 이종 또는 내생 프로모터일 수 있다.

[0125] 다른 일면에 있어서, T3, T7 또는 SP6 세포질 발현 시스템의 사용도 가능하다. 진핵생물 세포는, 전달 복합체 또는 부가적인 유전자 발현 구조체 중 하나로서 적절한 박테리아 폴리머라제가 제공되는 경우, 몇몇 박테리아 프로모터로부터 세포질 전사를 지지할 수 있다.

[0126] 표 1은 RNA 발현을 위하여 본 발명에 사용될 수 있는 요소/프로모터를 비제한적 예시한 것이다. 표 2는 특정 자극에 대한 반응으로서 활성화될 수 있는 핵산 서열의 영역인 유도 가능 요소를 비제한적으로 예시한 것이다.

표 1 프로모터 및/또는 인핸서	
프로모터/인핸서	참고문헌
Immunoglobulin Heavy Chain	Banciji <i>et al.</i> , 1983; Gilles <i>et al.</i> , 1983; Grosschedl <i>et al.</i> , 1985; Atchinson <i>et al.</i> , 1986, 1987; Imler <i>et al.</i> , 1987; Weinberger <i>et al.</i> , 1984; Kiledjian <i>et al.</i> , 1988; Porton <i>et al.</i> , 1990
Immunoglobulin Light Chain	Queen <i>et al.</i> , 1983; Picard <i>et al.</i> , 1984
T-Cell Receptor	Luria <i>et al.</i> , 1987; Winoto <i>et al.</i> , 1989; Redondo <i>et al.</i> , 1990
HLA DQ α and/or DQ β	Sullivan <i>et al.</i> , 1987
β-Interferon	Goodbourn <i>et al.</i> , 1986; Fujita <i>et al.</i> , 1987; Goodbourn <i>et al.</i> , 1988
Interleukin-2	Greene <i>et al.</i> , 1989
Interleukin-2 Receptor	Greene <i>et al.</i> , 1989; Lin <i>et al.</i> , 1990
MHC Class II 5	Koch <i>et al.</i> , 1989
MHC Class II IIIA-Dra	Sherman <i>et al.</i> , 1989
β-Actin	Kawamoto <i>et al.</i> , 1988; Ng <i>et al.</i> , 1989
Muscle Creatine Kinase (MCK)	Jaynes <i>et al.</i> , 1988; Horlick <i>et al.</i> , 1989; Johnson <i>et al.</i> , 1989
Precalbumin (Transferrin)	Costa <i>et al.</i> , 1988
Elastase I	Ornitz <i>et al.</i> , 1987
Metallothionein (MTII)	Karin <i>et al.</i> , 1987; Culotta <i>et al.</i> , 1989
Collagenase	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987
Albumin	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Tronche <i>et al.</i> , 1989, 1990
α-Fetoprotein	Godbout <i>et al.</i> , 1988; Campere <i>et al.</i> , 1989

[0127]

표 1 프로모터 및/또는 인핸서	
프로모터/인핸서	참고문헌
γ-Globin	Bodine <i>et al.</i> , 1987; Percz-Stable <i>et al.</i> , 1990
β-Globin	Trudel <i>et al.</i> , 1987
c-fos	Cohen <i>et al.</i> , 1987
c-HA-ras	Triesman, 1986; Deschamps <i>et al.</i> , 1985
Insulin	Edlund <i>et al.</i> , 1985
Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)	Hirsh <i>et al.</i> , 1990
α ₁ -Antitrypsin	Latimer <i>et al.</i> , 1990
H2B (TH2B) Histone	Hwang <i>et al.</i> , 1990
Mouse and/or Type I Collagen	Ripe <i>et al.</i> , 1989
Glucose-Regulated Proteins (GRP94 and GRP78)	Chang <i>et al.</i> , 1989
Rat Growth Hormone	Larsen <i>et al.</i> , 1986
Human Serum Amyloid A (SAA)	Edbrooke <i>et al.</i> , 1989
Troponin I (TN I)	Yutzey <i>et al.</i> , 1989
Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	Pech <i>et al.</i> , 1989
Duchenne Muscular Dystrophy	Klanut <i>et al.</i> , 1990
SV40	Banerji <i>et al.</i> , 1981; Moreau <i>et al.</i> , 1981; Sleight <i>et al.</i> , 1985; Firak <i>et al.</i> , 1986; Herr <i>et al.</i> , 1986; Imbra <i>et al.</i> , 1986; Kadesch <i>et al.</i> , 1986; Wang <i>et al.</i> , 1986; Ondek <i>et al.</i> , 1987; Kuhl <i>et al.</i> , 1987; Schaffner <i>et al.</i> , 1988
Polyoma	Swartzendruber <i>et al.</i> , 1975; Vasseur <i>et al.</i> , 1980; Katinka <i>et al.</i> , 1980, 1981; Tyndell <i>et al.</i> , 1981; Dandolo <i>et al.</i> , 1983; de Villiers <i>et al.</i> , 1984; Hen <i>et al.</i> , 1986; Satake <i>et al.</i> , 1988; Campbell and/or Villarreal, 1988
Retroviruses	Kriegler <i>et al.</i> , 1982, 1983; Levinson <i>et al.</i> , 1982; Kriegler <i>et al.</i> , 1983, 1984a, b, 1988; Bosze <i>et al.</i> , 1986; Miksicek <i>et al.</i> , 1986; Celander <i>et al.</i> , 1987; Thiesen <i>et al.</i> , 1988; Celander <i>et al.</i> , 1988; Chol <i>et al.</i> , 1988; Reisman <i>et al.</i> , 1989
Papilloma Virus	Campo <i>et al.</i> , 1983; Lusky <i>et al.</i> , 1983; Spandidos and/or Wilkie, 1983; Spalholz <i>et al.</i> , 1985; Lusky <i>et al.</i> , 1986; Cripe <i>et al.</i> , 1987; Gloss <i>et al.</i> , 1987; Hirochika <i>et al.</i> , 1987; Stephens <i>et al.</i> , 1987

[0128]

표 1 프로모터 및/또는 인핸서	
프로모터/인핸서	참고문헌
Hepatitis B Virus	Bulla <i>et al.</i> , 1986; Jameel <i>et al.</i> , 1986; Shaul <i>et al.</i> , 1987; Spandau <i>et al.</i> , 1988; Vannice <i>et al.</i> , 1988
Human Immunodeficiency Virus	Muesing <i>et al.</i> , 1987; Hauber <i>et al.</i> , 1988; Jakobovits <i>et al.</i> , 1988; Fong <i>et al.</i> , 1988; Takebe <i>et al.</i> , 1988; Rosen <i>et al.</i> , 1988; Berkhout <i>et al.</i> , 1989; Laspia <i>et al.</i> , 1989; Sharp <i>et al.</i> , 1989; Braddock <i>et al.</i> , 1989
CD11b	Hickstein <i>et al.</i> , 1992
Gibbon Ape Leukemia Virus	Holbrook <i>et al.</i> , 1987; Quinn <i>et al.</i> , 1989

[0129]

표 2 유발성 요소		
요소	유발인자	참고문헌
MT II	Phorbol Ester (TFA) Heavy metals	Palmiter <i>et al.</i> , 1982; Haslinger <i>et al.</i> , 1985; Scarle <i>et al.</i> , 1985; Stuart <i>et al.</i> , 1985; Imagawa <i>et al.</i> , 1987; Karin <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987b; McNeall <i>et al.</i> , 1989
MMTV (mouse mammary tumor virus)	Glucocorticoids	Huang <i>et al.</i> , 1981; Lee <i>et al.</i> , 1981; Majors <i>et al.</i> , 1983; Chandler <i>et al.</i> , 1983; Lee <i>et al.</i> , 1984; Ponta <i>et al.</i> , 1985; Sakai <i>et al.</i> , 1988
β -Interferon	Poly(rf)x Poly(rc)	Tavernier <i>et al.</i> , 1983
Adenovirus 5 E2	E1A	Imperiale <i>et al.</i> , 1984
Collagenase	Phorbol Ester (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987a
Stromelysin	Phorbol Ester (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
SV40	Phorbol Ester (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
Murine MX Gene	Interferon, Newcastle Disease Virus	Hug <i>et al.</i> , 1988
GRP78 Gene	A23187	Resendez <i>et al.</i> , 1988
α -2-Macroglobulin	IL-6	Kunz <i>et al.</i> , 1989
Vimentin	Serum	Rittling <i>et al.</i> , 1989
MHC Class I Gene H-2xb	Interferon	Blanar <i>et al.</i> , 1989
HSP70	E1A, SV40 Large T	Taylor <i>et al.</i> , 1989, 1990a, 1990b

[0130]

표 2 유발성 요소		
요소	유발인자	참고문헌
	Antigen	
Proliferin	Phorbol Ester-TPA	Mordacq <i>et al.</i> , 1989
Tumor Necrosis Factor	PMA	Hensel <i>et al.</i> , 1989
Thyroid Stimulating Hormone α Gene	Thyroid Hormone	Chatterjee <i>et al.</i> , 1989

[0131]

[0132]

조직-특이성 프로모터 또는 요소의 동정 방법, 및 그들의 활성을 특정화하는 분석 방법은 당업계에 공지되어 있다. 이러한 부위의 비제한적 예로는, 인간 LIMK2 유전자(Nomoto *et al.*, 1999), 소마토스타틴 수용체 2 유전자(Kraus *et al.*, 1998), 설치류 부고환 레티노산 결합 유전자(Lareyre *et al.*, 1999), 인간 CD4(Zhao-Emonet *et al.*, 1998), 마우스 알파 2(XI) 콜라겐(Tsumaki, *et al.*, 1998), D1A 도파민 수용체 유전자(Lee, *et al.*, 1997), 인슐린형 성장 인자 II(Wu *et al.*, 1997), 및 인간 혈소판 내피 세포 유착 분자-1(Almendro *et al.*, 1996)이 포함된다.

[0133]

본 발명의 렌티바이러스 벡터는 먼저, 조절된 진핵생물 프로모터의 조절 하에 치료제 유전자로써 세포를 형질변환시키도록 설계된다. gp91-phox 프로모터가 바람직하기는 하나, 표 1 및 표 2에 예시한 기타 프로모터 및 조절 신호 요소도 사용 가능하다. 나아가, 임의의 프로모터/인핸서 조합체(진핵생물 프로모터 데이터 베이스(EPDB)에 따라)를 사용해, 본 발명의 렌티바이러스 벡터와 관련하여 사용된 관심의 치료제 유전자를 코딩하는 구조적 유전자의 발현을 유도할 수도 있다. 대안적으로, 암 유전자 요법 또는 종양의 표적화를 위한 조직-특이성 프로모터를 암 치료, 특히 혈액암의 치료를 위하여 본 발명의 렌티바이러스 벡터와 함께 사용할 수 있다.

[0134]

통상적으로, 진핵생물 세포 내의 단백질 코딩 유전자의 전사를 조절하는 프로모터 및 인핸서는 다중 유전자 요소로 구성된다. 세포 기구는 상이한 유전자로 하여금 개별적인, 흔히 복합체 패턴으로 전사를 조절하도록 하는 각각의 요소에 의해 운반되는 조절 정보를 수집 및 통합할 수 있다. 프로모터 및 인핸서 요소의 활성화 및 억

제는, gp91-phox 프로모터에 대하여 도 1B에 개시된 것 및 Luo 및 Skalnik(1996) J. Biol. Chem. 271: 18203-210, 및 Luo and Skalnik (1996) J. Biol. Chem. 271: 23445-23451에 개시된 것들과 같은 적절한 전사 활성화자 또는 억제자(repressor)를 이들 요소와 접촉시킴으로써 달성될 수 있다. gp91-phox 프로모터와 관련하여, 발현 카세트의 전사 및 발현 조절에 있어서 인터페론-감마의 활성화는, 상호작용하는 프로모터 또는 인핸서 요소 및 인자가 본 발명의 원리를 활용할 수 있는 방법의 일례이다.

[0135] 인핸서는 본래, 동일한 DNA 분자 상의 이격된 위치에 존재하는 프로모터로부터 전사를 증진시키는 유전자 요소로서 검출되었다. 장거리에 걸쳐 작용하는 이러한 능력은, 원핵생물 전사 조절에 대한 고전적 연구에서는 거의 전례가 없는 것이다. 이후의 연구를 통해, 인핸서 활성을 가지는 DNA 영역이 프로모터와 같이 조직화된다는 사실이 확인되었다. 즉, 이들은 다수의 개별 요소로 구성되며, 이들 각각은 하나 이상의 전사 단백질에 결합한다. 예컨대, 도 1B에 제시된 gp91-phox 프로모터의 조절에 대한 모델을 참조한다. 본 발명에 사용될 수 있는 인핸서의 예로는, 하기 문헌에 제시된 바와 같은 DNA아제 HyperSensitive 요소 및 그들의 동족체가 있다: Lien LL, Lee Y, Orkin SH, (1997) "Regulation of the myeloid-cell-expressed humangp91-phox gene as studied by transfer of yeast artificial chromosome clones into embryonic stem cells: suppression of a variegated cellular pattern of expression requires a full complement of distant cis elements", Mol Cell Biol. 17 (4): 2279-90. 이들 인핸서 요소의 조절 하에, 유전자 발현은 보다 높고(인핸서 활성 HS에 기인) 보다 덜 가변적일 수 있다(HS의 사일렌더(silencer) 활성화에 기인).

[0136] gp91-phox HS 요소의 유사체는 기타 프로모터-인핸서 시스템 내에서 활성화이다. 이에 대해서는 예컨대 하기 문헌을 참조한다: May C, Rivella S, Callegari J, Heller G, Gaensler KM, Luzzatto L, Sadelain M, (2000) Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expression lentivirus-encoded human beta-globin. Nature 406 (6791): 82-6. 상기 문헌에서 유사한 베타-글로빈 HS 요소는 베타-글로빈 cDNA의 발현을 유도하는 베타-글로빈 프로모터 업스트림의 렌티벡터 내에 포함된다.

[0137] 프로모터 및 인핸서는 세포 내에서 전사를 활성화하는 동일한 공통 기능을 갖는다. 이들은 흔히 중첩 및 인접되어 있으며, 매우 유사한 모듈의 기관을 갖는 것으로 보여진다. 종합해 보면, 이러한 연구 결과는 인핸서 및 프로모터가 동일한 실체이며, 이들 서열에 결합되는 전사 활성화자 단백질이 근본적으로 동일한 방식으로 세포의 전사 기구와 상호작용할 수 있음을 시사한다. 인핸서와 프로모터 사이의 근본적으로 분리된 조작이 있다. 인핸서 영역은 전체로서 일정 거리를 두고 전사를 자극할 수 있어야 하며, 이는 프로모터 영역 또는 그 성분 요소의 정확한 조절을 필요로 하지 않는다. 한편, 프로모터는 특정 부위에서 특정 배향으로 RNA 합성의 개시를 지시하는 하나 이상의 요소를 가져야 하는 반면, 인핸서는 이러한 특이성이 없다. 이러한 조작성 분리와는 별도로, 인핸서 및 프로모터는 매우 유사한 실체이다. 그러므로, 전사 및 발현을 조절하는 요소의 구조체는 증대된 활성화 및 배향의 조절 수단을 제공하도록 배열된 다양한 요소들로 구성된다.

[0138] 유용한 것으로 판명된 신호로는 폴리아데닐화 신호(hGH, BGH, SV40)가 있다. 내부 리보솜 결합 부위(IRES) 요소는 다중 유전자, 또는 폴리스스트로닉(polycistronic) 메시지를 창출하는 데 사용된다. IRES 요소는 5'-메틸화된 캡-의존성 번역의 리보솜 스캐닝 모델을 우회하여, 내부 영역에서 번역을 시작할 수 있다(Pelletier 및 Sonenberg, 1988). 피코르나바이러스 부류의 두 멤버로부터 유래된 IRES 요소(소아마비(polio) 및 뇌심근염(encephalomyocarditis))(Pelletier 및 Sonenberg, 1988) 및 포유류 메시지 유래의 IRES(Macejak 및 Sarnow, 1991)가 제시된 바 있다. IRES 요소는 이중 오픈 리딩 프레임에 연결될 수 있다. 다중 오픈 리딩 프레임은 함께 전사될 수 있으며, 각각 IRES에 의하여 분리되어, 폴리스스트로닉 메시지를 창출한다. 각각의 오픈 리딩 프레임은 IRES 요소를 통해 유효한 번역을 위해 리보솜에 접근 가능하다. 다중 유전자는 단일 메시지를 전사하는 단일 프로모터/인핸서를 이용하여 효과적으로 발현될 수 있다.

[0139] 유전자의 업스트림에 위치하는 경우, 프로모터는 유전자의 발현을 유발하는 DNA 요소로서 이해될 것이다. 본 발명의 렌티바이러스 벡터로써 형질도입된 대부분의 트랜스 유전자는 프로모터 요소의 업스트림에 기능적으로 배치된다.

[0140] 코딩 서열의 유효한 번역에도 특정한 개시 신호가 요구될 수 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 또는 인접 서열을 포함한다. ATG 개시 코돈을 포함하는 외인성 번역 조절 신호가 제공될 필요가 있을 수 있다. 당업자는 필요한 신호를 용이하게 결정해 제공할 수 있을 것이다. 개시 코돈은 전체 삼입물의 번역을 가능하게 하는 원하는 코딩 서열의 리딩 프레임을 가지는 "프레임 내"에 존재해야 한다. 외인성 번역 조절 신호 및 개시 코돈은 천연적인 것일 수도 있고 합성된 것일 수도 있다. 발현 효율은 적절한 전사 인핸서 요소를 포함시킴으로써 증대시킬 수 있다.

- [0141] 10. 서열 목록의 간단한 설명
- [0142] SEQ ID NO: 1은 []의 뉴클레오타이드 서열을 제공한다.
- [0143] SEQ ID NO: 2는 []의 아미노산 서열을 제공한다.
- [0144] SEQ ID NO: 3은 []의 뉴클레오타이드 서열을 제공한다.
- [0145] SEQ ID NO: 4는 []의 아미노산 서열을 제공한다.

실시예

[0165] 이하의 실시예는 본 발명의 바람직한 일면들을 예시하기 위하여 것으로서 포함된다. 당업자라면, 이하의 실시예들에 개시된 기술이 본 발명의 실시예에 능숙한 본 발명자에 의하여 발견된 기술을 나타내며, 따라서 이들은 본 발명의 바람직한 방식을 구성하는 것으로 간주될 수 있음을 이해해야 한다. 그러나, 당업자는, 본원의 개시에서, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고, 비슷하거나 유사한 결과를 달성하면서, 개시된 특정한 일면에 대하여 다양한 변화가 이루어질 수 있음을 이해해야 한다.

A. 실시예 1-10에 사용된 물질 및 방법

1. 세포

[0168] 293T 인간 배아 신장 세포주(ATCC CRL-1573) 및 TE671 인간 횡문근육종 세포주(ATCC CRL-8805)를 10% 태아 소혈청(FCS)을 강화한 DMEM(Life Technologies, France) 내에서 배양하였다.

[0169] 상술한 바와 같이²⁶⁻²⁸, 동원된 혈액 및 골수 샘플로부터 각각 인간 및 사이노몰구스 마카크 원숭이 (*Macaca fascicularis*) CD34⁺ 세포를 얻었다. Ficoll-Paque(Pharmacia, Sweden) 구매 원심분리 후, CD34⁺ 세포를 회수하여, 항-CD34 M450 Dynabeads(Dynal, Norway)를 이용해 정제하였다. CD34⁺ 세포의 순도는 95% 이상이었다.

[0170] 인간 및 사이노몰구스 마카크 원숭이 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를, 상술한 바와 같이²⁹, Ficoll-Hypaque/Percoll 구매(Pharmacia, Sweden)를 이용해, 건강한 도너의 신선한 혈액으로부터 분리하였다. 37°C에서 하룻밤 동안 고정시키고, 상기 PBMC 분획으로부터 말초 혈액 림프구(PBL)를 강화하여, 부착된 단핵세포를 제거하고, CD3 마커 발현에 대하여 모니터링하였다(75-85% - CD3⁺).

2. 항체

[0172] 항-RD114 GP(ViroMed Biosafety Labs, USA)는, RD114 gp70 외피 당단백질(SU)에 대항하여 증가된 염소의 항혈청으로서, 웨스턴 블롯에는 1/5,000배 희석하여 사용하였다. 항-SIV CA(NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, USA)는 SIVmac251 p27 캡시드 단백질(CA)에 대항하여 증가된 마우스 단일클론성 항체(2F12)로서, 웨스턴 블롯에는 1/500배 희석하여 사용하였다. 항-MLV CA(ViroMed Biosafety Labs, USA)는 라우셔(Raush) 백혈병 바이러스(RLV) p30 캡시드 단백질(CA)에 대항하여 증가된 염소의 항혈청으로서, 웨스턴 블롯에는 1/10,000배 희석하여 사용하였다.

3. 포장 및 운반 벡터 구조체

[0174] pSIV-12 포장 플라스미드(도 1)는 pSIV8²⁵의 유도체로서, hCMV 프로모터 및 HIV-1 *rev* 유전자 발현 단위의 조절 하에 SIVmac251 *gag-pol* 유전자를 발현시키며, 상기 *rev*의 2개의 엑손은 3-하이드록시-3-메틸글루타릴 조효소 A 리덕타제(HMG) 프로모터, HMG 인트론 I, 및 SV40 폴리아데닐화 서열의 조절 하에 존재하며 융합되어 있다. pSIV-T1⁺ 플라스미드³⁰는, CMV 프로모터의 조절 하에 증강된 녹색 형광성 단백질(GFP) 마커 유전자를 발현시키는 포장-가능한 SIVmac251계 벡터를 코딩한다(도 1).

[0175] pSIV-T1⁺ 플라스미드는, CMV 프로모터의 조절 하에 증강된 녹색 형광성 단백질(GFP) 마커 유전자를 발현시키는 포장-가능한 SIVmac251계 벡터를 코딩한다. CMV-GFP 내부 전사 단위를 함유하는 MLV계 벡터를 코딩하는 pTG13077 플라스미드 및 pTG5349 설치류 백혈병 바이러스(MLV) 포장 플라스미드는 Transgene SA(Strasbourg, France)에 의해 제공되었다.

[0176] **4. 바이러스 당단백질 발현 구조체**

[0177] 플라스미드 phCMV-G³¹, EboV-GP(V. Volchikov 제공), phCMV-HA³², phCMV-10A1³³, 및 phCMV-GALV³³은 각각 소포성 구내염 바이러스(VSV) G 단백질, 에볼라 바이러스(EboV)의 자이르 균주의 당단백질, 가금류 전염병 바이러스(FPV) H7-HA 헤마글루티닌, MLV-10A1, 및 기본 원숭이 백혈병 바이러스(GALV) 외피 당단백질을 각각 코딩한다. 모든 당단백질은 동일한 시스-작용 신호의 조절 하에 발현되었다: CMV 프로모터, 토끼 β-글로빈 인트론 II, 및 폴리아데닐화 서열(도 1).

[0178] phCMV-G는 고양이 내생 바이러스 RD114(GenbankX87829³⁴) 및 양향성 MLV(MLV-A³⁵)의 4070A 균주로부터 유래된 당단백질을 발현시키는 골격으로서 사용되었다. RD114 바이러스 외피 당단백질(RD114 GP)을 발현시키는 phCMV-RD114 발현 벡터, 및 phCMV-GALV 구조체는, MLV-A GP 세포질 테일을 운반하는 RD114/TR (도 2b) 및 GALV/TR^{8,13,15} 키메라 당단백질을 발현시키도록, 추가 변형시켰다.

[0179] RD114 바이러스 외피 당단백질(RD114 GP)을 발현시키는 phCMV-RD 발현 벡터는 추가 변형시켜, RD114 GP 막관통 도메인(TMD) 및/또는 세포질 테일(CT) 내에 변형을 갖는 일련의 돌연변이를 제작하였다. 이후의 모든 구조체는 PCR-매개된 및 올리고뉴클레오타이드 부위-유도된 돌연변이(세부 사항 및 서열은 요청 시 입수 가능함)에 의해 제작하여, phCMV-RD 플라스미드 내에 클로닝하였다. 돌연변이 RD114 GP의 카르복시 말단부의 아미노산 서열은 도 7에 제시한다.

[0180] **5. 합포체 평가**

[0181] 융합 평가에 사용된 HeLa 세포는 HIV-1 긴 말단 반복부(LTR)의 조절 하의 β-갈락토시다제 유전자(LacZ) 중 하나의 안정된 트랜스펙션체(transfectant)로서, 그의 발현은 Tat-의존성(HeLaCD4LTRlacZ 세포)이거나, 또는 상술한 바와 같이(9), HIV-1의 Tat 단백질(HeLa-Tat 세포)을 구조적으로 발현시킨다. 외피-매개의 융합은 필수적으로 상술한 바와 같이(9,16) 정량하였다. 이러한 평가에 있어서, β-갈락토시다제의 HIV-1 LTR-유도된 발현은, 외피 발현 세포와 수용체 함유 저해제 세포의 융합 시, Tat 단백질에 의하여 트랜스 활성화된다. 트랜스펙션에 앞서 24시간 전에, 5x10⁴ HeLaCD4LTRlacZ 세포를 12웰 플레이트에 시딩(seeding)하였다. 1 μg의 플라스미드를 이용해 제조자의 지시에 따라 칼슘-포스페이트 트랜스펙션 프로토콜(Clontech, France)을 이용해, 바이러스 당단백질 발현 구조체를 상기 HeLa 세포 내로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 후 24시간 뒤, 10⁵ 저해제 HeLa-Tat 세포를 36시간 내지 48시간 동안 바이러스 당단백질 발현 세포와 공배양하였다. 상술한 바와 같이(9,16), 0.5%(중량/부피) 글루타라알데하이드의 PBS 용액(포스페이트 버퍼 식염수)으로 고정하고, PBS로 세척한 뒤, 5-브로모-4-클로로-3-요오돌릴-β-D-갈락토피라노사이드(X-Gal) 용액 내에서 배양해 염색하여, 세포-세포 융합을 측정하였다. 외피 발현 및 Tat 함유 저해제 세포 사이의 융합체를 포함하는 블루 합포체를, 합포체당 핵의 개수에 관계없이 계수하였다.

[0182] **6. 레트로바이러스 벡터의 제조**

[0183] 상술한 바와 같이²⁵, 293T 세포의 일시적 트랜스펙션에 의하여 슈도타입화된 SIV 유래의 벡터를 제작하였다. pSIV-T1⁺ 벡터 구조체(8.1 μg), pSIV-12 포장 구조체 (8.1 μg), 및 바이러스 당단백질-발현 구조체(2.7 μg)를 이용해 10 cm 플레이트 내에 하루 전에 시딩된 293T 세포를 공트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 16시간 후 배지(12 ml/플레이트)를 교체하고, 24시간 경과 후 상청액을 수확하였다. 26 ml 초원심분리 튜브 내에서 70Ti Beckman 로터(rotor) 내에서 4℃ 하에 32,000 rpm의 속도로 1시간 동안 교반시켜 상기 비리온을 펠릿화하여, 벡터 미립을 농축시켰다. 바이러스 펠릿을, 바이러스 상청액의 초기 부피의 1/100에 해당하는 양의 1% 소 혈청 알부민(BSA)이 강화한 무혈청 DMEM 내에 재현탁한 뒤, 분액하여, -80℃에 보관하였다.

[0184] pTG5349 MLV 포장 구조체(8.1 μg), pTG13077 MLV 벡터 구조체(8.1 μg), 및 당단백질-발현 구조체(2.7 μg)의 일시적 트랜스펙션에 의하여 유사한 방식으로 슈도타입화된 MLV 유래의 벡터를 제작하였다. 플라스미드 DNA는 제조자의 지시에 따라 칼슘-포스페이트 트랜스펙션 프로토콜(Clontech, France)을 이용해, 10 cm 플레이트에 하루 전에 시딩한 2.5x10⁶ 293T 세포 내로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 후 16시간 뒤 배지(8 ml/플레이트)를 교체하고, 24시간 경과 후 상청액을 수확하여 0.45 μm 기공 크기의 막으로 통해 여과시켰다.

[0185] **7. 당단백질의 면역블롯 및 바이러스 혼입**

[0186] 바이러스 생산자 세포를, 1% 트리톤-X100, 0.05%±SDS(소듐 도데실-설페이트), 5 mg/ml 소듐 데옥시콜레이트,

150 mM NaCl, 및 1 mM PMSF를 함유하는 20 mM 트리스-HCl 버퍼(pH 6.5) 내에서 용해시켰다. 용해물을 64°C에서 10분간 배양한 뒤, 13,000xg의 속도도 5분간 원심분리하여, 핵을 펠릿화하였다. 이어서, 추가 분석에 사용할 때까지, 상청액을 -80°C에서 동결시켰다. SW41 Beckman 로터(25,000 rpm, 2.5시간, 4°C)를 이용해 바이러스 상청(8 ml)을 1.5 ml의 20% 수크로오스 쿠션 중에서 초원심분리하여 정제된 바이러스 샘플을 얻었다. 바이러스 펠릿을 100 μ l의 PBS 내에 현탁하여 -80°C에서 동결시켰다.

[0187] 샘플(30 μ g의 세포 용해물 또는 20 μ l의 정제된 바이러스)을, 6% SDS, 30% β -메르캅토-에탄올, 10% 글리세롤, 및 0.06% 브로모페놀 블루를 함유하는 375 mM 트리스-HCl (pH 6.8) 버퍼 내에 5:1(vol:vol)의 비로 혼합하고, 5분간 끓인 후, 9% SDS-PAGE 상에서 전개시켰다. 상기 단백질을 니트로셀룰로오스 필터로 옮긴 후, 10% 분유 및 0.1% TWEEN을 함유하는 TBS(트리스-염기 식염수, pH 7.4) 내에서 면역염색을 실시하였다. 블롯을 관련 항체로 탐침하고, 증강된 화학발광 키트(Amersham Life Science)를 이용해, 각각의 주요 항체종(DAKO, UK)에 대항하여 증대된 HRP-접합된 Ig(면역글로불린)를 이용해 발색시켰다.

[0188] **8. 대사적 표지(metabolic labeling) 및 면역침전**

[0189] 상이한 중앙-레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터 성분으로써 트랜스팩션시킨 후 12시간 뒤, 바이러스 생산자 세포를, 시스테인 및 메티오닌을 함유하지 않는 배지 내에서 1시간 동안 결핍시키고, 37°C 하에 ml당 100 μ l Ci의 ³⁵S-시스테인 및 ³⁵S-메티오닌(ICN) 및 2%의 투석된 태아 소 혈청을 함유하고, 시스테인 및 메티오닌을 함유하지 않는 3 ml DMEM 내에서 16시간 동안 표지하였다. 상술한 바와 같이(9), 염소 항-PD114 SU 혈청을 이용해 세포를 용해시킨 뒤, 면역침전시켰다.

[0190] TM GP 서브유닛의 세포질 테일의 프로세싱을 분석하기 위하여, 상기 바이러스 생산자 세포의 상청액을 수확하여 0.45 m 기공 크기의 막을 통해 여과시켰다. 상기 상청액을, SW41 Beckman 로터를 이용해 30,000 rpm의 속도도 2.5시간 동안 2 ml 20% 수크로오스 쿠션 중에서 초원심분리하였다. 150 ml 용해용 버퍼 (50 mM 트리스-HCl(pH 7.5), 15 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1% 트리톤 X-100, 0.5% 소듐 데옥시콜레이트)를 첨가해 펠릿을 용해시켰다. 상기 용해물의 1/5은 보존시켜, 전기영동시킨 뒤, 웨스턴-블로딩에 의하여 상기 바이러스 단백질 함유물에 대해 조제 분석하고, 나머지 용해물은 항-RD114 SU 항체를 이용해 면역침전시켰다. 면역침전물을, 환원 조건 하에 소듐 도데실 설페이트(SDS) - 12% 폴리아크릴아미드 겔 내에서 전기영동시켜, 공-면역침전된 TM GP 서브유닛을 SU로부터 분리하였다.

[0191] **9. 감염 평가**

[0192] 상술한 바와 같이²⁵, 표적 세포 TE671을 이용하여 형질도입 효율 및 감염 역치의 측정을 실시하였다. 상술한 바와 같이³⁶, 이를 바이러스 제제와 신선한 혈청의 1:1 혼합물(v/v) 중에서 37°C 하에 1시간 동안 배양한 후 생존 바이러스 미립을 적정하여, 인간 또는 마카크 원숭이 혈청 내에서 벡터 슈도타입의 안정성을 조사하였다. 포인트당 대략 5x10⁴ GFP 감염성 단위의 슈도타입화된 벡터가 사용되었다. 건강한 혈액 도너로부터 혈청을 수확하여, ³⁶ 상술한 바와 같이 조건화하였다. 비리온의 안정성은 영장류 혈청으로 처리된 바이러스 대 태아 소 혈청으로 처리된 바이러스 감염물의 퍼센트로서 측정하였다. 가열-불활성화된 혈청(56°C, 1시간)을 대조군으로서 사용하였다.

[0193] TE671 표적 세포를, 형질도입시키기 1일 전에 6웰 플레이트 내에 웰당 3x10⁵ 세포의 밀도로 시딩하였다. 벡터 제제의 일련의 희석액을 6 μ l/ml의 폴리브렌의 존재 하에 상기 세포에 첨가하고, 상기 배양주를 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 이어서, 상기 벡터-함유 배지를 정상 배지로 교체하고, 세포를 37°C에서 72시간 동안 배양하였다. GFP-양성 세포의 퍼센트로서 나타내진 형질도입 효율을 FACS 분석을 통해 측정된 뒤, 트립신 내에서 상기 형질도입된 세포를 분리하고, PBS 내에 재현탁하였다. 하기 식을 이용해 감염률 단위(i.u.)/ml로서 제공된 감염률 역치를 산출하였다:

[0194]
$$\text{역치} = \%inf \times (3 \times 10^5 / 100) \times d$$

[0195] 상기 식에서, "d"는 바이러스의 희석배수이고, "%inf"는 1% 및 5%의 GFP-양성 표적 세포 사이에 형질도입된 바이러스 상청액의 희석액을 이용해 FACS 분석하여 측정된 GFP-양성 세포의 퍼센트이다.

[0196] **10. 주요 세포의 형질도입**

[0197] CD34⁺ 세포를, 정제된 12웰 플레이트 내에서 10 ng/ml의 트롬보포이에틴(TPO; Peptotech Inc, London, UK)을 함유하며 항생제가 강화된 2 ml의 StemSpan SFEM 배지(StemCell Technologies, Meylan, France) 중에서 2x10⁶ 세포/웰의 밀도로 하룻밤 동안 배양하였다. 이어서, 사전-활성화된 CD34⁺ 세포를 96웰 플레이트(10⁴/웰) 내에 시딩하고, TPO 및 6 μg/ml의 폴리브렌을 함유하는 총부피 200 μl의 StemSpan 배지 내에서 슈도타입화된 벡터로써 형질도입했다. TE671 표적 세포를 이용해 측정된 다양한 다중 감염을 상기 표적 세포에 가하여, 0.5 내지 60개의 감염성 미립/표적 세포의 범위값을 얻었다. 8 μg의 레트로벡틴/웰의 밀도로 2시간 동안 사전 코팅된 96웰 플레이트 내에서 상기와 동일한 프로토콜을 이용해, 레트로벡틴-코팅된 웰(CH-296; Takara Shuzo, Japan) 내에서 형질도입을 실시하였다. 16시간 후, CD34⁺ 세포를 세척하고, 10% 태아 소 혈청(Life Technologies, France), 항생제, 및 10 ng/ml의 Flt3-L, TPO, 및 줄기 세포 인자(SCF)가 강화된 400 μl의 StemSpan 배지 내에서 3일 동안 현탁하였다. 감염 후 5일 뒤, GFP 발현을 분석하였다.

[0198] 상술한 바와 같이, 1 μg의 항-CD3(HIT3a, Pharmingen) 및 항-CD28(CD28.2, Pharmingen) 항체를 2x10⁶ 인간 PBL²⁹를 함유하는 1 ml의 배지에 첨가하거나, 5 ng/ml의 콘카나발린 A 및 10 ng/ml의 IL2를 2x10⁶ 마카크 원숭이 PBL³⁷에 첨가하여, 감염 24시간 전에 인간 및 마카크 원숭이 PBL를 사전 활성화시켰다. 형질도입을 위하여, 6 μg/ml의 폴리브렌이 강화된 총부피 1 ml의 PBL 배지 내에서 37°C 하에 4시간 동안 10⁵ 활성화된 PBL을 슈도타입화된 벡터와 혼합하였다. 감염 후, 세포를 PBS로 세척한 뒤, IL2가 강화된 RPMI-1640(Life Technologies, France) 내에서 37°C 하에 5일간 배양하여, FACS 분석을 통해 형질도입 효율을 측정하였다.

[0199] **B. 실시예 1-10**

[0200] **실시예 1: 상이한 바이러스 당단백질의 SIV 벡터 슈도타입화 능력**

[0201] 본 발명자들은 원숭이 면역결핍 바이러스(SIVmac251)로부터 유래된 렌티바이러스 벡터를 슈도타입화하는 바이러스 당단백질(GPs)의 패널을 조사하였다. 이들 당단백질은 고양이 내생 레트로바이러스 RD114, 양향성 설치류 백혈병 바이러스(MLV-A), MLV-10A1, 및 기본 원숭이 백혈병 바이러스(GALV)의 Env GP와 같은 타입 C 포유류 레트로바이러스, 또는 가금류 전염병 바이러스(FPV 헤마글루티닌-FPV-HA), 림프구 맥락 수막염 바이러스(LCMV), 에볼라 바이러스 (EboV), 및 소포성 구내염 바이러스(VSV) GP와 같은 막-외피 바이러스로부터 유래되었다.

[0202] GP 마커 유전자를 함유하는 SIV계 운반 벡터, 상이한 GP, 및 SIV 바이러스 코어 단백질을 코딩하는 3개의 플라즈미드로써 트랜스фек션된 293T 세포 내에서의 일시적 발현을 통해 슈도타입화된 SIV 벡터를 조작하였다(도 1). TE671 인간 횡문근육종 세포의 감염 평가 결과, VSV, LCMV, MLV-A, 및 MLV-10A1의 GP를 이용해 제작된 벡터에 대하여 10⁵ i.u./ml 이상의 역치가 얻어진 것으로 나타났다(도 2a). 한편, EboV 및 FPV의 GP로 조작된 SIV 벡터는 5x10³ i.u./ml 미만의 낮은 역치를 나타내었다. GALV 및 RD114의 GP를 이용해 제작된 SIV 벡터는 10⁴ 내지 5x10⁴ i.u./ml의 중간 수준의 역치를 나타내었다. 슈도타입화된 벡터의 감염률에 있어서의 이러한 상대적인 차이는 293T 세포와 같은 기타 표적 세포에서도 재현되었으며(데이터는 제시하지 않음), 이는 TE671 세포에 대한 감염 역치의 측정값이 SIV 코어를 슈도타입화하는 상이한 GP의 능력을 반영함을 시사한다.

[0203] FPV, GALV 및 RD114의 GP를 이용해 제작한 SIV 벡터에서 얻어진 감염 역치는 놀랍게도, 동일한 당단백질로써 슈도타입화된 MLV 벡터에서 얻어진 값에 비해 낮았다^{21,34,38}. 렌티바이러스 코어 미립의 발아는 바이러스 당단백질의 발현에 의존하지 않기 때문에³⁹, 이는 상기 비리온이 그들의 GP를 효과적으로 혼입시키지 못했거나, 대안적으로, 그들이 GP 어셈블리 후 생산자 세포로부터 유출될 수 없었음을 시사한다. 실제로, 벡터-생산자 세포 발현 FPV-HA를 뉴라미니다제(neuraminidase)로 처리한 경우, HA-슈도타입화된 벡터의 감염률은 100배까지 크게 증가하였다(도 2a). 이러한 증가는 생산자 세포 상청액 내에서의 바이러스 미립의 생산이 50배 증가된 것과 상관이 있다(데이터는 제시하지 않음). 이는 시알산 함유 세포 표면 분자^{40,41}에 대한 결합으로 인해 보유되는 세포 표면으로부터의 뉴라미다제에 의해 매개되는 비리온의 방출에 의해 유발되는 것으로 여겨진다. 그러나, 후자 당단백질로써 슈도타입화된 MLV 벡터의 역치가 전반적으로 높았으므로^{21,34}, 비리온 유출에 있어서의 이러한 결합이 GALV 및 RD114 GP를 이용해 제작된 SIV 벡터의 감염성 결여를 설명할 수는 없다. 이는 오히려 렌티바이러스 코어에 대한 GP 혼입의 결함을 시사한다. 이전의 연구에서, 포유류 타입 C 레트로바이러스의 세포질 테일이 영장

류 렌티바이러스를 이용한 슈도타입의 형성 및/또는 감염률을 조절하는 요소를 함유한다고 보고된 바 있다^{8,13-15}. MLV-A GP는 렌티바이러스 벡터를 효과적으로 슈도타입화하므로(도 2a), 본 발명자들은, 세포질 테일이 렌티바이러스 미립에 대한 최적의 GP 혼입에 요구되는 모든 요소를 함유해야 한다고 가정하였다. 실제로, RD114(도 2b) 및 GALV GP의 세포질 테일을 MLV-A GP의 세포질 테일로 대체한 결과, RD114에 대하여 도 2C에 나타낸 바나, GALV GP에 대한 이전의 보고에서와 같이^{8,13,15}, 렌티바이러스 코어에 대한 당단백질의 혼입이 크게 증가되었다. GALV/TR 및 RD114/TR라 일컬어지는 이러한 키메라 GALV 및 RD114 GP는 수용체-간접 분석에 대한 평가에서와 같이(데이터는 제시하지 않음), 초기 당단백질의 숙주 범위를 유지하였으며, SIV 벡터에 대하여 25배 증가된 역치를 나타내었다(도 2a).

[0204] **실시예 2: 슈도타입화된 SIV계 벡터 모액의 특정화**

[0205] 본 발명자들은 SIV 벡터 미립을 효과적으로 슈도타입화하는 변형된 또는 변형되지 않은 바이러스 당단백질로 코팅된 벡터의 특성을 특정화하고자 하였다. SIV 벡터 슈도타입을 초원심분리를 통해 농축하고, 1% BSA를 함유하는 저장용 버퍼 내에 재현탁한 뒤, 분액하여, 감염을 평가하기 전까지 -80℃에 보관하였다. MLV-10A1 GP로 코팅된 벡터는 농축 전에는 적당한 역치를 나타내었으나, 효과적으로 농축될 수 없었기 때문에(데이터는 제시하지 않음), 이후의 분석에는 사용하지 않았다. 한편, FPV-HA, VSV-G 또는 GALV/TR, RD114/TR, MLV-A 및 LCMV 당단백질로써 슈도타입화된 벡터는 매우 효과적으로 농축되었으며, 물리적 미립을 100배 농축한 후 감염성 미립의 평균 80% 이상이 회수되었다(데이터는 제시하지 않음). FPV-HA 및 LCMV 당단백질로써 슈도타입화된 벡터는 본원에서 테스트한 주요 조혈 세포들을 형질도입시키지 못했기 때문에(즉, PBL 및 CD34⁺ 세포; 데이터는 제시하지 않음), 이들에 대해서는 추가 분석을 실시하지 않았다. 나머지 당단백질들(즉, MLV-A, GALV/TR, RD114/TR 및 VSV-G)로써 슈도타입화된 벡터의 농축된 모액의 감염 역치는, TE671 표적 세포를 이용해 측정하였으며, GALV/TR GP를 이용해 얻어진 최소 감염성 슈도타입에 대한 5x10⁶에서, VSV-G를 이용해 얻어진 최대 감염성 슈도타입에 대한 1x10⁸ 범위 이내였다(도 3A). 기타 인간 부착 세포주의 경우에도 벡터 슈도타입들 사이의 역치에 있어 유사한 차이가 검출되었다(데이터는 제시하지 않음). 이는 고도 허용성 TE671 세포를 이용해 측정된 역치가 슈도타입화된 벡터의 특이적인 감염률에 대한 평가값을 반영하였음을 시사한다. 중요한 점은, 감염성 미립의 개수가 물리적 미립의 존재와 상관 관계가 있다는 점이다. 도 3B에 나타낸 바와 같이, 주어진 슈도타입화된 벡터 제제 내에서, 최고의 역치를 나타낸 벡터 슈도타입(VSV-G 및 MLV-A 또는 RD114/TR GP)에 대하여, 유사한 양의 비리온-회합된 캡시드 단백질이 검출되었다. GALV/TR GP로써 슈도타입화된 비리온에 대해서도, 그들의 낮은 역치와 일치되게, 적은 양의 물리적 미립이 재현 가능한 수준으로 검출되었다(도 3A). 그러나, 2개의 독립적 벡터 제제를 비교한 경우, 필적하는 감염 역치에도 불구하고, 비리온-회합된 캡시드 단백질의 절대량에 있어 유의한 차이가 감지되었다(데이터는 제시하지 않음). 따라서, 벡터 모액의 양적 차이에 기인하는 인위적 간섭을 최소화하기 위하여, 이후 각각의 평가 실험은 동시에 제작된 슈도타입화된 벡터를 이용해 실시하였다. 나아가, 비리온-회합된 캡시드 단백질의 검출은 감염성 미립의 유효한 지시제가 아닌 것으로 나타나, 결과의 비교가 불가능하였기 때문에, TE671 세포에 대해 측정된 역치를 이용해 상기 슈도타입화된 벡터 모액의 표준화(normalization)를 실시하였다.

[0206] **실시예 3: 영양류 혈청 내에서의 벡터 슈도타입의 안정성**

[0207] 생체내 유전자 전달에 적합한 벡터는 37℃에서 안정해야 하며, 영양류 혈청 내에서 고도의 감염성을 유지해야 한다. 그러므로, 37℃ 대 4℃에서 1시간 동안 배양된 바이러스 미립의 역치를 비교하여, 벡터 슈도타입의 안정성을 측정하였다. RD114/TR GP 또는 VSV-G로써 슈도타입화된 렌티바이러스 벡터는 37℃에서 안정적이었으며, 37℃에서 배양 후 벡터 미립의 85% 이상이 감염성을 유지하였다(데이터는 제시하지 않음). 비교 시, MLV-A 및 GALV/TR GP로써 슈도타입화된 벡터는 37℃ 배양 후 75% 이상의 감염성을 손실하였으며(데이터는 제시하지 않음), 이는 렌티바이러스 코어 미립 내로 혼입된 후자의 GP가 온도-감수성이었음을 시사한다.

[0208] 인간 및 사이노물구스 마카크 원숭이 혈청 내에서의 슈도타입화된 벡터의 안정성을 평가하였다. 동량의 슈도타입화된 감염성 미립을 신선한 영양류 혈청과 50/50(v/v)의 비로 혼합한 뒤, 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 가열-불활성화된 영양류 혈청 및 태아 소 혈청(FCS)을 대조군으로서 사용하였다. 새로운 또는 가열-불활성화된 영양류 혈청 내에서 배양한 후, FCS-배양된 비리온의 감염률(100%)을 기준으로 잔류 감염률의 퍼센트로서 나타낸 결과를 도 4에 나타낸다. VSV-G-슈도타입화된 벡터는 인간 및 마카크 원숭이 혈청 모두에 의해 불활성화되었으며, 이는 바이러스 미립의 90% 이상의 분해를 초래하였다. 레트로바이러스 당단백질로써 슈도타입화된 벡터는 인간 혈청 내에서 유의하게 큰 내성을 나타내었으나, 그 내성의 수준은 테스트된 혈청 샘플 및 레트로바이

러스 GP의 타입에 따라 가변적이었다. MLV-A 당단백질로써 슈도타입화된 벡터는 인간 혈청 내에서는 안정적이었으나, 마카크 원숭이 혈청에서는 불활성화에 대하여 상대적으로 감수성이었다. GALV/TR GP로 코팅된 벡터는 인간 및 마카크 원숭이 혈청 내에서 가변적인 수준의 안정성을 나타내었다. 한편, RD114/TR GP로써 슈도타입화된 렌티바이러스 벡터는 테스트된 모든 인간 혈청 내에서 완전한 안정성을 나타내었으며(도 4A), 마카크 원숭이 혈청 내에서는 양호한 안정성을 나타내었다(도 4B).

[0209] 실시예 4: 인간 및 마카크 원숭이의 주요 조혈 세포의 형질도입

[0210] 본 발명자들은 이어서 상이한 벡터 슈도타입들에 대하여, CD34⁺ 세포 및 PBL와 같은 주요 조혈 세포를 형질도입시키는 그들의 능력에 대하여 비교하였다. 동원 혈액으로부터 유래된 인간 CD34⁺ 세포를, TPO가 강화된 무혈청 배지 내에서 하룻밤 동안 사전-활성화한 뒤, MLV-A, GALV/TR, RD114/TR 또는 VSV-G 당단백질로써 슈도타입화된 SIV 벡터를 16시간 동안 1회 접촉시켜 형질도입시켰다. TE671 세포에 대하여 평가된 감염 역치를 이용해 측정 한 바와 같이, 다양한 다중 감염(MOI)을 이용해 CD34⁺ 세포를 형질도입시켰다. CH-296 레트로벡틴 단편의 존재 하에 또는 부재 하에 나란히 형질도입 실험을 실시하였다⁴²⁻⁴⁴. 감염 후, 세포들을 저농도의 TPO, SCF 및 Flt3-L의 존재 하에 5일 동안 배양하였다. 흐름 세포측정에 의하여 GFP 발현을 용이하게 검출한 뒤, 형질도입 효율에 대한 MOI 및 슈도타입화된 GP의 영향을 평가하였다(도 5a). 레트로벡틴 부재 하의 형질도입의 경우, GF^P 세포의 퍼센트는 초기에는 MOI에 대한 직접 함수로서 증가하였고, 곡선은 2에서 20 사이의 MOI에서 수평이 되어, 25% GF^P 세포의 최대값에 도달하였다. 이러한 중간정도의 형질도입 효율은 특히 표적 세포를 비리온과 함께 1회 단기 배양한 차선의 감염 프로토콜에 기인하는 것으로 여겨진다. 이러한 실험 조건에서, 가장 효과적인 벡터는 VSV-G 당단백질로써 슈도타입화된 것들이었으나(평균 GF^P 세포: 24.75%±3.23%; n=5), 그럼에도, 2 이하의 MOI에서, SIV 벡터로써 슈도타입화된 GALV/TR 및 MLV-A GP로써 슈도타입화된 SIV 벡터는 VSV-G-슈도타입화된 벡터보다 높은 형질도입 효율을 나타내었다(도 5a에 삽입도 참조). 그러나, 테스트된 가장 효율적인 MOI에서, MLV-A, GALV/TR, 및 RD114/TR 당단백질로써 제작된 벡터는 VSV-G-슈도타입보다 5 내지 12배 낮은 형질도입 효율을 나타내었다(도 5a). GALV/TR GP로써 제작된 벡터는 상대적으로 낮은 역치(도 3A)로 인하여, 높은 MOI에서의 형질도입 효율을 평가할 수 없었다. 레트로벡틴-코팅된 플레이트 상에서 CD34⁺ 세포의 감염을 실시한 경우에는, 다른 결과가 얻었다(도 5a). 이러한 조건 하에서, VSV-G-슈도타입화된 벡터는 레트로벡틴의 부재 하에서보다 높거나 그와 동일한 최대 형질도입 효율을 유지하였으며(24.56%±3.27% GFP 세포; n=5), 이는 다른 연구 결과들⁴⁵과 일치한다. 한편, RD114/TR-슈도타입화된 벡터는 10배 증가된 형질도입 효율을 나타내어, 65% 이하의 GF^P 세포에 도달하였으며(평균: 51.30%±8.74%; n=5), 이는 RD114/TR GP와 레트로벡틴의 조합 사용이 감염을 상승적으로 증대시킴을 시사한다. 레트로벡틴 역시 GALV/TR 및 MLV-A GP로써 슈도타입화된 벡터의 형질도입 효율을 증대시켰으나, RD114/TR GP로써 슈도타입화된 벡터에 비해서는 상당히 낮았다(도 5a).

[0211] 이어서, 본 발명자들은, 슈도타입화된 벡터를 가지는 골수로부터 유래된 형질도입된 마카크 원숭이 CD34⁺ 세포를 형질도입시켰다(도 5b). 레트로벡틴의 부재 하에서 최상의 슈도타입화된 GP는 VSV-G이었으며, 이는 GFP⁺ 세포를 26%까지 형질도입시켰다(21.7%±3.51%; n=5). GALV/TR 및 MLV-A GP로써 슈도타입화된 SIV 벡터는 마카크 원숭이 CD34⁺ 세포를 덜 효과적으로 형질도입시켰다(최대 형질도입 효율: 3% GFP⁺ 세포). VSV-G로써 슈도타입화된 벡터에 비하여, RD114/TR GP-슈도타입화된 벡터는 약 2배 낮은 효율의 형질도입을 발생시켰다(10.12%±1.26%; n=4). 레트로벡틴의 존재 하에서도, VSV-G-슈도타입화된 벡터에 의한 형질도입 효율은 개선되지 않았다(도 5b). 그러나, 레트로벡틴은 인간 CD34⁺ 세포의 형질도입과 유사한 방식으로 MLV-A 및 RD114/TR GP로써 슈도타입화된 렌티바이러스 벡터에 의하여 마카크 원숭이 CD34⁺ 세포의 형질도입을 증대시켰다. 이러한 조건 하에서, RD114/TR-슈도타입화된 벡터에 의해서는 30%에 달하는 GFP⁺ 세포의 최대 형질도입 수준(24.23%±4.15%; n=5)을 얻을 수 없었다(도 5b).

[0212] 이어서, 본 발명자들은 인간 및 마카크 원숭이 PBL 내에서 슈도타입화된 SIV 벡터의 형질도입 효율을 측정하였다. 신선한 혈액으로부터 분리한 PBL을 레트로벡틴의 부재 하에 상기 벡터와 함께 4시간 동안 배양하였다. 이전에 보고된 바와 같이^{26,29,46}, 렌티바이러스 벡터의 형질도입을 위해, 가용성 항-CD3 및 항-CD28 항체를 이용해 PBL을 24시간 동안 사전활성화가 필요하였다. CD3⁺ 세포의 자극 및 생존에 유리한 이러한 실험 조건의 결과로

서, PBL의 형질도입을 T 세포에 적용하였다. 감염 5일 후 GFP 발현을 측정된 결과(도 6), PBL의 형질도입은 MOI 의존적인 것으로 나타났다. 낮은 MOI에서, GFP⁺ 세포의 퍼센트는, 수평이 될 때까지 상이한 벡터 슈도타입 화원에 대하여 일정하게 증가하였다. 수평 상태에 도달하는 데 요구된 MOI는 벡터 슈도타입에 따라 가변적이었다. 형질도입의 수평 상태는 VSV-G, MLV-AGP, 또는 GALV/TR GP로써 슈도타입화된 렌티바이러스 벡터에 대하여 세포당 5 미만의 감염성 미립의 MOI에 신속하게 도달하였다(도 6a). 한편, RD114/TR GP-슈도타입화된 비리온을 이용한 경우의 수평 상태에 도달하는 데 필요한 임계 MOI는 세포당 약 5-10의 감염성 미립이었다(도 6a). 흥미롭게도, 최대 형질도입 수준 역시 테스트한 벡터 슈도타입에 따라 가변적이었다. 단지, VSV-G-슈도타입화된 벡터만이 최대 10-23%의 T 세포를 형질도입시켰다(평균: 16.87%±6.53%; n=4). 이러한 다소 낮은 형질도입 수준은, 이전의 연구에서 사용한 SIV-T1+ 벡터와 동일한 조작 및 설계의 VSV-G-슈도타입화된 HIV-1 유래의 벡터에서 얻어진 본 발명자들의 이전 결과²⁶와 일치된다. 한편, RD114/TR 키메라 GP로써 슈도타입화된 벡터를 이용한 경우에는 50-70%에 달하는 훨씬 높은 형질도입 수준이 달성되었다(55.04%±11.74%; n=4). 기타 슈도타입화된 벡터를 이용한 경우에 얻어진 최대 형질도입 효율은 상술한 바와 같이 낮게 유지되었으며, GALV/TR 키메라 GP로 코팅된 벡터는, 낮은 역치로 인해 2 이상의 MOI를 평가하지 못했다. 또한, 일부 벡터 체계의 경우, MLV-A GP 또는 GALV/TR GP-슈도타입화된 SIV 벡터의 높은 MOI가 인간 PBL의 형질도입에 사용된 경우 형질도입 효율이 감소하는 것으로 확인되었다(도 6a). 이러한 효과는, 최근 연구 보고에서 제안된 바와 같이^{44,47}, 과량의 결합 미립 또는 바이러스 미립 유래의 가용성 GP "셰드(shed)"에 의하여 유발되는 수용체 결합에 대한 경쟁에 기인하는 것으로 여겨진다.

[0213] 마카크 원숭이 PBL의 형질도입의 경우에도 유사한 결과가 얻어졌다. 감염 수평 상태에 도달하는 데 필요한 임계 MOI는 인간 PBL에 필요한 것보다 높은 것으로 나타났으며, 최대 형질도입 수준은 인간 PBL를 이용한 경우에 얻어진 것보다 낮았다(도 6b). GALV/TR 또는 MLV-A GP로써 슈도타입화된 벡터 미립을 이용해 얻은 형질도입 효율은 매우 낮게 유지되었으며(4-12% 미만 - GFP⁺ 세포), 1 이상의 MOI에서 감소하는 것으로 관찰되었다. 이러한 후자 GP 또는 VSV-G로써 슈도타입화된 벡터(15.32%±10.06%; n=4)에 비하여, RD114/TR GP-슈도타입화된 벡터에 의한 PBL의 형질도입이 용이하였다. 40%에 달하는 GFP⁺ 세포가 형질도입될 수 있었으나(26.86%±8.07%; n=4), 보다 높은 형질도입 수준은 본 실험에 적용한 것들보다 높은 MOI를 이용하는 경우 기대할 수 있을 것으로 여겨진다.

[0214] 조합해 볼 때, 이상의 결과들은, RD114/TR GP-슈도타입화된 SIV 벡터가, 장기간 자극된 CD34⁺ 세포의 최적의 형질도입에는 레트로벡틴 CH-296 단편이 필요하나, RD114/TR 당단백질로써 슈도타입화된 SIV 벡터에 의한 영장류 CD34⁺ 세포 및 PBL의 형질도입을 발생시키는 데는 특히 효과적임을 시사한다.

[0215] **실시예 5: RD114 GP 세포질-테일 돌연변이의 설계**

[0216] 세포내 코어 미립의 형태에 의해 측정된 바와 같이, 고양이 내생 바이러스 RD114는 타입 C 포유류 레트로바이러스이다(32). 그러나, 그의 GP는 원숭이 타입 D 레트로바이러스의 GP의 전형으로서(28), 동일한 세포 표면 수용체, RDR를 공유하며(31,38), TM 서브유닛 내에 MPMV(Mason-Pfizer 원숭이 바이러스)의 GP와 유의한 상동성을 갖는다(도 7). 이전의 연구에서, 본 발명자들은, RD114 고양이 내생 바이러스 당단백질이 렌티바이러스 코어에 의한 유효한 슈도타입 형성을 일으키지 않는다고 보고한 바 있다(35). 본원에서, 본 발명자들은 SIV(원숭이 면역결핍 바이러스)로부터 유래된 렌티바이러스 벡터에 의한 슈도타입 형성을 제한하는 RD114 GP의 결정인자를 연구하고자 하였다.

[0217] 최근의 연구에서, 포유류 타입 C 레트로바이러스의 막관통 도메인 및/또는 세포질 테일이 HIV-1 벡터에 의한 슈도타입의 형성 및/또는 감염을 조절하는 요소를 간직하는 것으로 보고된 바 있다(4, 34, 36). 그러한 요소들이 바이러스 미립의 감염성을 상이한 수준에서 영향을 줄 수도 있다: i) 바이러스 어셈블리에 필요한 GP 및 바이러스 코어의 세포내 공-위치선정, ii) GP 혼입을 조건화하는 바이러스 코어 단백질과 GP의 상호작용, 및 iii) 비리온 발아 동안 또는 발아 직후, 레트로바이러스 프로테아제에 의한 세포질 테일의 절단을 통한 GP 방추원성의 활성화(6, 39). 따라서, MLV-A의 GP 역시 SIV 바이러스 코어를 효과적으로 슈도타입화하므로(24,35), 본 발명자들은, RD114 GP에 의해 운반되는 것과는 대조적으로, 이것이 SIV 벡터 슈도타입의 어셈블리 및/또는 감염성을 최적으로 조절하는 요소를 함유해야 한다고 생각하였다. 따라서, RD114 GP가 렌티바이러스 코어 미립을 슈도타입화하는 능력을 제한하는 결정인자를 규명하기 위하여, 본 발명자들은, 막관통 도메인(TMD) 및/또는 그의 세포질 테일(CT)로부터 유래된 서브-영역이 MLV-A GP로부터 유래된 그들의 대응부로 대체된 RD114 GP 돌연변이 패널

을 제작하였다(도 7B). MLV CT 자체의 중요성을 규명하기 위하여 돌연변이 RD/TR를 제작하였다. 돌연변이 RD/MTR 및 RD/eMTR는 MLV CT 외에도 MLV TMD를 운반하였다. RDRless GP는 RD114 GP의 트런케이티드체로서, CT의 추정되는 절단 부위에 해당하는 위치에 정지 코돈을 삽입해 제작하였다(이하 참조). 돌연변이 RDRPrMLV는 추정의 RD114 CT 절단 부위를 MLV GP의 것으로 대체한 것을 함유한다. 기타 돌연변이, RDRPrSIV_{ARLM}, RDRPrSIV_{RQAG} 및 RDRPrHIV의 세포질 테일은, 각각 SIVmac251 또는 HIV-1의 Gag 단백질에서 발견되는 절단 부위로부터 유래된 SIVmac 또는 HIV-1 코어 프로테아제에 대한 기질을 함유하였다. 끝으로, GP 위치선정, 세포-표면 발현 및/또는 방추원성에 영향을 줄 수 있는, RD114 CT에 의하여 운반되는 추정의 티로신 세포내 이입 모티브의 중요성을 평가하기 위하여, 돌연변이 RD Δ YXXL를 설계하였다. 이러한 모티브의 영향은 기타 레트로바이러스 GP에 대해 잘 정립되어 있다(1, 13, 19).

[0218] 모든 GP 돌연변이의 제조는 CMV 프로모터의 조절 하에 동일한 발현 벡터를 이용해 달성하였다. 293 생산자 세포를, 바이러스 코어 단백질, 운반 벡터, 및 상이한 GP 중 하나와 같은 벡터 미립을 코딩하는 플라스미드와 공-트랜스펙션시켰다. 항-RD114 SU 항체를 이용해 세포 용해물을 면역-블로딩하여 모니터링한 바, 코어 단백질 또는 GP의 양에 있어 변화가 검출되지 않았다(데이터는 제시하지 않음).

[0219] **실시예 6: RD114 GP 세포질 테일의 변형은 세포-세포 방추원성을 변화시킨다.**

[0220] GP-발현 세포의 배양주는 합포체 형성을 나타내었으며, 이러한 작용은 세포질 테일 내에 도입된 돌연변이 타입에 따라 좌우되는 것으로 밝혀졌다(도 8). 야생형 MLV-A GP에 비하여, 비변형된 RD114 GP 자체의 발현이 유의한 합포체 형성을 유발하였다. 이러한 효과는, MLV-A로 치환한 경우(돌연변이 RD/TR, RD/MTR, 및 RD/eMTR), 트랜스펙션된 세포 내의 합포체 개수가 야생형 MLV-A GP에서 검출된 수준으로 유의하게 감소된 것으로 볼 때, RD114 CT에 의한 GP 방추원성의 비효율적 조절에 의하여 초래되는 것으로 여겨진다(도 8). 기타 RD114 키메라 GP는 다양한 합포체 수준을 유도하였다. 최대 세포변성(cytopathic) 효과는 RDRPrHIV 및 RDRless 돌연변이에서 확인되었다. 비변형된 RD114 GP보다 큰 방추원성을 나타내는 돌연변이 RDRPrSIV_{ARLM}을 제외하고, 기타 키메라(RD Δ YXXL, RDRPrMLV, 및 RDRPrSIV_{RQAG})는 야생형 RD114 GP에 의해 얻어지는 것보다 높은 수준으로 합포체 형성을 유발하였다(도 8). 변화된 세포-세포 방추원성은 본질적으로 RD114 GP의 변형과 관련이 있으며, 트랜스펙션된 세포 내에 존재하는 기타 바이러스 성분과의 상호작용에 의해서 영향을 받지 않았다. 실제로, 세포가 중앙-레트로바이러스 또는 렌티바이러스 코어 단백질을 발현하였는지의 여부와 관계없이, 동일한 합포체 수준이 검출되었다(데이터는 제시하지 않음). 상이한 RD114 GP 키메라의 경우에는, GP 발현에 있어서는 어떠한 변화도 관찰할 수 없었으므로, 이러한 결과는 세포-세포 방추원성의 조절에 있어서의 RD114 GP 세포질 테일의 역할을 확인시켜 주었다. 이러한 CT 매개의 융합은 MLV 및 MPMV와 같은 기타 포유류 타입 C 및 D 레트로바이러스 GP의 역할을 암시하였다(2, 30, 33). RD114 당단백질의 세포질 테일의 서열 변형은 MLV-A GP의 인스타(instar)에서 그의 융합 저해 특성을 가장 유사하게 변화시켰다(14, 17, 43). 따라서, 바이러스 미립의 형성에 대해 반대 생산될 수 있는 RD114 GP의 변형에 의한 세포변성 효과를 최소화하기 위하여, 생산자 세포의 상청액 내의 비리온을 트랜스펙션 직후, 즉 36시간 후에 수확하였다.

[0221] **실시예 7: RD114 GP 세포질 테일의 변형은 렌티바이러스 또는 중앙-레트로바이러스 벡터의 슈도타입화를 변화시킨다.**

[0222] 야생형 RD114 GP, MLV-A GP, 및 VSV-G와 비교하여, RD114 GP 돌연변이가 SIVmac251계 또는 MLV계 벡터를 슈도타입화하는 능력을 측정하였다. TE671 표적 세포를 이용하여 상이한 GP의 존재 하에 제작한 벡터의 감염성을 평가하였다(도 9). 본원의 이전 결과와 일관되게, 비변형된 RD114 GP는, MLV계 벡터를 잘 슈도타입화하였으나(6), 렌티바이러스계 벡터는 효과적으로 슈도타입화하지 못하였다(35). RD Δ YXXL GP 돌연변이를 이용해 제작한 SIV 및 MLV 벡터는 비변형된 RD114 GP로써 슈도타입화된 벡터보다 3-4배 낮은 역치를 가졌다(도 9). 방추원이 낮은 돌연변이 RDRless를 이용해 제작한 벡터의 방추원성 역시 야생형 RD114 GP를 이용해 제작한 것들보다 낮았으나, 본 발명자들은, 이 돌연변이에 의하여 발휘되는 특히 강력한 세포변성 작용(도 8)이 벡터 미립의 최적의 형성을 불가능하게 하지 않음을 배제할 수 없었다. 중요한 점은, RD/TR 및 RD/MTR 키메라 GP가 SIV계 벡터를 잘 슈도타입화한다는 것이다. RD/TR 돌연변이의 경우, 이는 10^6 i.u./ml 이상의 감염률 역치를 초래하며, 이는 야생형 RD114 GP를 이용한 경우 얻어진 것보다 25배에 달하는 값이며, 높지 않은 경우, MLV-A GP 또는 VSV-G로써 슈도타입화된 SIV 벡터를 이용한 경우 얻어진 감염률 역치와 동일한 범위이다(도 9B). 한편, 동일한 키메라 GP를 이용해 제작한 MLV 유래의 벡터는, 역치가 이미 높은 야생형 RD114 GP로써 슈도타입화된 벡터에 비하여 단지 2배 이하의 감염률을 나타내었다(도 9A). 상기 세포질 테일은, 슈도타입화된 렌티바이러스 벡터의 감염성 증가를 유발하는 이들 RD114 GP 키메라 내의 변형된 최소 도메인이므로, 이상의 데이터는 TMD가 아닌 MLV-A의

CT가 SIV 벡터에 의한 슈도타입화를 촉진하는 성분을 함유함을 시사한다. 그 밖의 RD114 GP 키메라의 연구를 통해(도 7B), 이 성분이 그의 세포질 테일 내의 추정의 절단 부위를 포함하는 영역 내에 존재한다는 사실을 확인하였다.

[0223] 소위 MLV에 대한 R 펩타이드라 불리는 포유류 타입 C 및 D 레트로바이러스 TM 단백질의 C 말단으로부터의 바이러스 프로테아제 매개의 제거가 그들의 융합 기능부를 활성화하는 데 필수적인 것으로 보고된 바 있다(2, 30, 33). TM 단백질의 카르복시 말단 프로세싱은 비리온의 발아 후의 기간 동안 발생한다. 지금까지, RD114 GP에 대해서는, 세포질 테일의 절단 및 후속의 방추원성의 활성화에 대해 보고된 바가 없었다. 본원의 결과는, 수용체 결합 시 당단백질의 전체적인 융합 활성을 촉진하기 위해서는, RD114 TM의 프로세싱이 요구될 수 있음을 암시한다. 실제로, 조기 정지 코돈(돌연변이 RDRless)의 삽입에 의한 RD111 GP의 트런케이션은 타입 C 또는 D 포유류 레트로바이러스 중 하나의 R-트런케이티드 GP 돌연변이와 유사한 표현형인(2, 10, 30, 33), 고도의 세포-세포 방추원성의 활성화를 초래한다(도 8). 나아가, 여러 타입 C 및 타입 D 포유류 레트로바이러스 GP의 CT를 통한 RD114 GP의 세포질 테일의 세포 정렬을 통해, 레트로바이러스 프로테아제 절단 부위를 가장 유사하게 형성하는 RD114 GP의 세포질 테일 내에 8개 아미노산 길이의 서열 -VHAMVLAQ-의 위치가 지정된다(도 7A). 흥미롭게도, 이 서열을, MLV CT(돌연변이 RDP_rMLV) 또는 SIV Gag 단백질(돌연변이 RDP_rSIV_{ARLM} 및 RDP_rSIV_{RQAG})로부터 유래된 절단 부위로 대체한 결과, SIV 벡터 슈도타입의 감염률이 7배까지 증가되었다(도 9B). 마찬가지로, HIV-1 Gag 단백질로부터 유래된 절단 부위의 삽입(돌연변이 RDP_rHIV)은 HIV-1계 벡터를 이용한 슈도타입 형성을 선택적으로 증가시켰으나(데이터는 제시하지 않음), SIV 유래의 벡터를 이용한 경우에 대해서는 증가시키지 못했다(도 9B). 따라서, 이러한 결과는, 이들 8개 아미노산 서열이 렌티바이러스 벡터에 의한 슈도타입 형성을 조절하는 필수 성분을 함유함을 시사한다.

[0224] 후자의 RD114 GP 키메라가 MLV 벡터 미립을 슈도타입화하는 데 사용된 경우, 매우 상이한 결과가 얻어졌다(도 9A). RDP_rMLV 돌연변이로써 슈도타입화된 MLV 벡터는 야생형 RD114 GP를 이용해 형성한 바이러스 슈도타입화된에 비하여 유사하거나 다소 증가된 감염률을 나타내었음에도, 렌티바이러스 절단 부위(RDP_rSIV_{ARLM}, RDP_rSIV_{RQAG} 및 RDP_rHIV)를 함유하는 RD114 키메라 GP는 MLV-슈도타입화된 벡터의 감염률을 20배까지 현저히 감소시켰다(도 9A). 따라서, RD114 키메라는 이들이 렌티바이러스 또는 중앙-레트로바이러스 코어 중 하나에 회합한 경우 상이하게 행동하였다. 그러므로, 이상의 결과는, 특정 코어/CT 상호작용이 바이러스 타입-특이적 방식으로 세포질 테일의 프로세싱 및/또는 GP 혼입을 조절할 수 있음을 강력히 시사한다.

[0225] **실시예 8: RD114 GP 세포질 테일의 변형은 바이러스 혼입을 변화시킨다.**

[0226] 이어서, 본 발명자들은 RD114 당단백질의 변형이 바이러스 미립에 대한 그의 혼입에 영향을 주는지의 여부를 측정하고자 하였다. 본 실험은, 지나치게 광범위한 방식으로 합포체 형성을 유발하지 않은 GP 돌연변이, RDP_rMLV, RDP_rSI_{VARLM}, RDP_rSIV_{RQAG}, 및 RD/TR의 서브세트에 대한 비변형된 RD114 GP와 비교하여 실시하였다(도 8). 실제로, 기타 돌연변이(RDP_rHIV 및 RDRless)의 고도의 세포-세포 방추원 활성화는 생산자 세포 상층액 내의 세포 잔해를 방출시킴으로써 다량의 정제된 비리온 체제를 손상시켰다(데이터는 제시하지 않음). RD114 GP 키메라를 이용해 SIV 또는 MLV 코어 중 하나를 운반하는 바이러스 미립을 제작하여, 20% 수크로오스 쿠션을 통해 초원심분리하여 정제하였다. 바이러스 코어 단백질 및 당단백질의 검출 및 정제는, 항-CA 또는 항-RD114 GP 항체를 이용해 정제된 비리온을 면역블로팅하여, 바이러스 미립 상의 RD114 GP 키메라의 밀도를 측정함으로써 실시하였다(도 4). 바이러스 코어의 부재 하에 단지 당단백질만을 발현시킨 생산자 세포로부터 초원심분리하여 얻은 상층액의 펠릿 내에서는 GP가 전혀 검출되지 않았으며(도 4), 따라서 이는 정제된 비리온의 경우 얻어진 신호의 특이성을 입증한다. 야생형 RD114 GP에 비하여, RDP_rSIV_{ARLM} GP 돌연변이는 그의 GP에 의하여 부여되는 증가된 감염성에도 불구하고, SIV 코어 미립에 대해 동등하게 잘 혼입되었다(도 9B). 반면, SIV 벡터 미립에 대한 RDP_rMLV, RDP_rSIV_{RQAG}, 및 RD/TR 키메라 GP의 혼입은 3-10배 증가하였으며(도 4), 이는 이들의 돌연변이 GP의 경우에 얻어진 크게 증대된 역치와 일치한다(도 9B). 따라서, 이상의 결과는, RDP_rSIV_{ARLM} GP 돌연변이의 경우 절대적인 상관 관계가 배제될지라도 SIV 코어 미립에 대한 RD114 GP 키메라의 혼입 및 슈도타입화된 벡터의 감염률 역치가 상관 관계를 가짐을 시사한다.

[0227] MLV 코어 미립에 대한 동일한 GP 키메라의 혼입에 대하여 대조적인 결과가 얻어졌다. RD/TR GP 키메라의 혼입은 2배까지 약하게 증가되었으며(도 4), 이는 이러한 특정 돌연변이를 이용해 얻은 다소 증대된 바이러스 역치와 일치한다(도 9A). 그러나, 비변형된 RD114 GP에 비하여, 슈도타입화된 MLV 벡터에 대한 후자의 두 GP 키메라의 역치가 현저히 감소했음에도 불구하고(도 9A), RDP_rMLV, RDP_rSIV_{ARLM}, 및 RDP_rSIV_{RQAG} 돌연변이는 MLV 미

립에 대하여 유사한 밀도를 나타내었다(도 4). 그러므로, 슈도타입화된 MLV 코어에 대하여, GP 혼입과 감염성 사이에 어떠한 상관 관계도 증명될 수 없었다.

[0228] **실시예 9: RD114 GP 세포질 테일의 변형은 바이러스 코어-의존적 방식으로 그의 절단을 변화시킨다.**

[0229] 이어서, 본 발명자들은 RD114 GP 키메라의 세포질 테일이 슈도타입화된 MLV 또는 SIV 바이러스 코어 미립 내에서 절단되는지의 여부를 조사하였다. 2가지 타입의 슈도타입 비리온 중 하나를 생산하는 트랜스팩션된 세포를, ³⁵S-메티오닌 및 ³⁵S-시스테인을 이용해 방사능-표시하였다. 20% 수크로오스 쿠션 상에서 정제된 비리온-생산자 세포 또는 비리온의 용해물을 항-RD114 SU 항체와 함께 배양하였다. 당단백질의 면역-침전 후, 상기 샘플들을 환원 및 변성시키고, 면역침전된 GP 복합체에 대하여 TM 단백질을 해리시킨 뒤, SDS-PAGE를 통해 정제하였다(도 5). 비리온-생산자 세포의 용해물은, 기대한 바와 같이 유사한 양의 SU 및 TM 당단백질을 나타내었다. 모든 돌연변이 TM 당단백질은 겔 상에서 동일한 전기영동 이동도를 나타냈으며(도 5a 및 5b), 이는 상이한 TM 종의 CT의 대부분이 생산자 세포의 내부에서 절단되지 않았음을 의미한다. 이러한 결과는 또한 돌연변이 RD114 GP의 세포-세포 방추원성의 조절이 그들의 TM 단백질의 프로세싱에 대하여 의존적이지 않으며(도 8), 오히려 그들의 세포질 테일의 구조 또는 형태의 변화와 본질적으로 관련이 있음을 나타낸다.

[0230] 상이한 RD114 GP 키메라들이 SU 및 TM 서브유닛 모두에 대하여 정제된 MLV 바이러스 코어에 대해 유사한 강도를 나타내었다(도5A). 이러한 결과는, 그들 세포질 테일의 변형이 종양-레트로바이러스 코어에 대한 그들의 혼입에 영향을 주지 않음을 뒷받침한다(도 4). 그러나, 혼입된 TM 당단백질의 프로세싱은 RD114 키메라의 타입에 의존적인 방식으로 검출되었다. 실제로, 세포 용해물 내의 TM 단백질의 크기에 비하여, 비변형된 RD114 GP 및 키메라 RDP_rMLV 및 RD/TR 키메라의 TM 서브유닛이 대략 2kDa 짧았다(도 5). 이러한 관찰 결과는, 바이러스 코어 프로테아제에 의한 RD114 GP의 TM 프로세싱에 대한 유전적 증거를 직접적으로 확인시켜 주었다. 반면, 렌티바이러스 프로테아제-특이적 절단 부위를 함유하는(도 7B) RDP_rSIV_{ARLM} 및 RDP_rSIV_{ROAG} GP 돌연변이에 대하여, 단지 프로세싱되지 않은 TM만이 MLV 코어 상에서 검출되었다(도 5a). 이러한 결과는 후자의 RD114 키메라 GP로써 슈도타입화된 MLV 벡터의 현저히 감소된 감염성과 일치하였으며(도 9A), 이는 비리온 감염에 있어 RD114 GP 세포질 테일 절단이 요구됨을 의미한다.

[0231] MLV 코어와 대조적으로, 다양한 양의 SU 및 TM 당단백질이 SIV 코어 미립 상에서 검출되었으며(도5B), 이는 비리온 내로의 차별적인 GP의 혼입의 결과와 일치한다(도 4). SIV 미립 상에 용이하게 혼입된 RDP_rSIV_{ROAG} 및 RD/TR GP 돌연변이의 경우에는, TM 단백질이 관찰되지 않았다(도 5b). 후자의 RD114 GP 키메라 세포질 테일의 유효한 프로세싱이 검출되었으며, 이는 SIV 벡터 슈도타입의 감염성 결과와 일치한다(도 9B). 비변형된 RD114 GP 및 RDP_rMLV 및 RDP_rSIV_{ARLM} 돌연변이 GP의 TM 단백질은 정상적인 겔 노출 조건 하에서 용이하게 검출되지 않았으며, 이는 혼입의 결과와 일치한다(도 9B). 겔의 과다 노출 결과, 후자 GP의 TM 단백질이 프로세싱되었음이 확인되었다(데이터는 제시하지 않음). 이러한 결과는, 후자 GP를 이용해 제작한 SIV 벡터 미립에 대하여 얻어진 낮은 감염 수준을 설명해준다(도 9B).

[0232] **실시예 10: RD114 GP 세포질 테일의 변형은 지질 래프트 내에서의 GP 위치선정에 영향을 주지 않는다.**

[0233] 최근, 렌티바이러스는 지질 래프트를 선택적으로 어셈블리 및 발아시킬 수 있는 것으로 보고된 바 있다(18, 25, 26). 그러므로, 슈도타입화된 SIV 미립에 대한 RD114 GP 돌연변이의 차별적인 혼입을 설명할 수 있는 하나의 가능성은, RD114 GP 세포질 테일의 변형의 결과로서 바이러스 어셈블리 부위에서의 바이러스 코어 성분 및 당단백질의 공-위치선정의 변화일 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 RD114 GP가 지질 래프트에 국한될 수 있는지의 여부와 세포질 테일의 변형이 세포의 위치선정을 변화시킬 수 있는지의 여부를 조사하였다. 지질 래프트는 저온에서 비이온성 세제에 대해 내성이며, 가용성 막의 벌크로부터 수크로오스 구배 원심분리에 의해 물리적으로 분리될 수 있다. 상이한 GP 돌연변이를 트랜스팩션시킨 세포의 막을 상기 조건 하에서 분획하고, 웨스턴 블롯 분석을 통해 막 분획의 GP 함량을 분석하였다(도 6). 트랜스팩션된 세포 용해물의 세제-내성 분획에서 야생형 RD114 GP 및 세포질 테일 돌연변이가 관찰되었으며, 이는 모든 GP가 래프트에 대해 표적화됨을 의미한다.

[0234] 본원에 개시된 모든 조성물 및/또는 방법은 본원 개시의 범위 내에서 과도한 실험 없이 실시 및 구현될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 바람직한 일면을 토대로 설명되었으나, 당업자, 본 발명의 개념, 사상, 및 범위를 벗어나지 않고, 본원에 개시한 이러한 조성물 및/또는 방법, 및 상기 방법의 단계 또는 단계의 순서에 있어 변화가 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 보다 구체적으로, 본원에 개시된 제제들에 대하여, 화학적 및 물리적으로 관련된 일부 제제들이 대체될 수 있으며, 그러한 변화 시에도 동일하거나 유사한 결과가 달성될 수 있음은 자명한 바일 것이다. 당업자라면, 그러한 모든 유사한 대체 및 변형이 첨부된 청구의 범위에 한정된 본

발명의 사상, 범위, 및 개념을 내에 포함됨을 이해할 것이다.

- [0235] **참고문헌**
- [0236] 이하의 참고 문헌들은, 본원에 제시된 연구 내용들에 대한 예시적 절차 또는 기타 세부 사항을 제공하는 범위에서 본원에 참고로 인용된다.
- [0237] U.S. 특허 제4,682,195호
- [0238] U.S. 특허 제4,683,202호
- [0239] U.S. 특허 제5,466,468호
- [0240] U.S. 특허 제5,645,897호
- [0241] U.S. 특허 5,686,279호
- [0242] U.S. 특허 제5,705,629호
- [0243] U.S. 특허 제5,846,225호
- [0244] U.S. 특허 제5,846,233호
- [0245] U.S. 특허 제5,925,565호
- [0246] U.S. 특허 제5,928,906호
- [0247] U.S. 특허 제5,935,819호
- [0248] U.S. 특허 제5,994,136호
- [0249] U.S. 특허 제6,013,516호
- [0250] U.S. 특허 제6,136,597호
- [0251] EP 266,032
- [0252] **윗첨자 번호로 표시된 참고문헌**
- [0253] 1. Negre D, Duisit G, Mangeot P-E, Moullier P, Darlix J-L, Cosset F-L. Lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIV). In: Trono D, ed. Current Topics in Microbiology and Immunology. Vol. 261; 2002: 53-74
- [0254] 2. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science. 1996; 272: 263-267
- [0255] 3. Blomer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentiviral vector. J. Virol. 1997; 71: 6641-6649
- [0256] 4. Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. Nat Genet. 1997; 17: 314-317
- [0257] 5. Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93: 11382-11388
- [0258] 6. Park F. Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling *in vivo*. Nat Genet. 2000; 24: 49-52
- [0259] 7. Takahashi M, Miyoshi H, Verma IM, Gage FH. Rescue from photoreceptor degeneration in the rd mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer. J. Virol. 1999; 73: 7812-7816
- [0260] 8. Christodoulopoulos I, Cannon P. Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors. J. Virol. 2001; 75: 4129-4138

- [0261] 9. Desmaris N, Bosch A, Salaun C, Petit C, Prevost MC, Tordo N, Perrin P, Schwartz O, deRocquigny H, Heard JM. Production and neurotropism of lentivirus vectors pseudotyped withlyssavirus envelope glycoproteins. *Mol Ther.* 2001; 4: 149-156
- [0262] 10. Kobinger GP, Weiner DJ, Yu QC, Wilson JM. Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia *in vivo*. *Nat Biotechnol.* 2001; 19: 225-230
- [0263] 11. Lewis BC, Chinnasamy N, Morgan RA, Varmus HE. Development of an Avian Leukosis-Sarcoma Virus Subgroup A Pseudotyped Lentiviral Vector. *J. Virol.* 2001; 75: 9339-9344
- [0264] 12. Mochizuki H, Schwartz JP, Tanaka K, Brady RO, Reiser J. High-Titer Human Immunodeficiency Virus Type 1-Based Vector Systems for Gene Delivery into Nondividing Cells. *J. Virol.* 1998; 72: 8873-8883
- [0265] 13. Salmon P, N gre D, Trono D, Cosset F-L. A chimeric GALV-derived envelope glycoprotein harboring the cytoplasmic tail of MLV envelope efficiently pseudotypes HIV-1 vectors. *J Gen Med.* 2000; 2 (sup): 23
- [0266] 14. Sandrin V, Boson B, Cosset F-L. Insertion of lentiviral protease substrates in the cytoplasmic tail of the feline endogenous virus RD114 glycoprotein enhances viral incorporation and infectivity of pseudotyped lentiviral vectors. in preparation. 2001
- [0267] 15. Stitz J, Buchholz C, Engelstadter M, Uckert W, Bloemer U, Schmitt I, Cichutek K. Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology.* 2000; 273: 16-20
- [0268] 16. Gatlin J, Melkus MW, Padgett A, Kelly PF, Garcia JV. Engraftment of NOD/SCID Mice with Human CD34+ Cells Transduced by Concentrated Oncoretroviral Vector Particles Pseudotyped with the Feline Endogenous Retrovirus(RD114) Envelope Protein. *J. Virol.* 2001; 75: 9995-9999
- [0269] 17. Goerner M, Horn PA, Peterson L, Kurre P, Storb R, Rasko JE, Kiem HP. Sustained multilineage gene persistence and expression in dogs transplanted with CD34 (+) marrow cells transduced by RD114-pseudotype oncoretrovirus vectors. *Blood.* 2001; 98: 2065-2070
- [0270] 18. Kelly P, Vandergriff J, Nathwani A, Nienhuis A, Vanin E. Highly efficient gene transfer into cord blood nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency repopulating cells by oncoretroviral vector particles pseudotyped with the feline endogenous retrovirus(RD114) envelope protein. *Blood.* 2000; 96: 1206-1214
- [0271] 19. Marandin A, Dubart A, Pflumio F, Cosset F-L, Cordette V, Chapel-Fernandes S, Coulombel L, Vainchenker W, Louache F. Retroviral-mediated gene transfer into human CD34+/38-primitive cells capable of reconstituting long-term cultures *in vitro* and in nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice *in vivo*. *Human Gene Ther.* 1998; 9: 1497-1511
- [0272] 20. Movassagh M, Desmyter C, Baillou C, Chapel-Fernandes S, Guigon M, Klatzmann D, Lemoine FM. High-level gene transfer to cord blood progenitors using gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors and an improved clinically applicable protocol. *Hum Gene Ther.* 1998; 9: 225-234
- [0273] 21. Porter CD, Collins MKL, Tailor CS, Parker MH, Cosset F-L, Weiss RA, Takeuchi Y. Comparison of efficiency of infection of human gene therapy target cells via four different retroviral receptors. *Human Gene Therapy.* 1996; 7: 913-919
- [0274] 22. Peng KW, Pham L, Ye H, Zufferey R, Trono D, Cosset F-L, Russell SJ. Organ distribution of gene expression after intravenous infusion of targeted and untargeted lentiviral vectors. *Gene Therapy.* 2001; 8: 1456-1463
- [0275] 23. Seganti L, Superti F, Girmenia C, Melucci L, Orsi N. Study of receptors for vesicular stomatitis virus in vertebrate and invertebrate cells. *Microbiologica.* 1986; 9: 259-267

- [0276] 24. DePolo NJ, Reed JD, Sheridan PL, Townsend K, Sauter SL, Jolly DJ, Dubensky TW. VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol Ther.* 2000; 2: 218-222
- [0277] 25. Negre D, Mangeot P, Duisit G, Blanchard S, Vidalain P, Leissner P, Winter A, Rabourdin-Combe C, Mehtali M, Moullier P, Darlix J-L, Cosset F-L. Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther.* 2000; 7: 1613-1623
- [0278] 26. Salmon P, Kindler V, Ducrey O, Chapuis B, Zubler RH, Trono D. High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors. *Blood.* 2000; 96: 3392-3398
- [0279] 27. Salmon P, Arrighi JF, Piguet V, Chapuis B, Zubler RH, Trono D, Kindler V. Transduction of CD34+ cells with lentiviral vectors enables the production of large quantities of transgene-expressing immature and mature dendritic cells. *J Gene Med.* 2001; 3: 311-320
- [0280] 28. Thiebot H, Louache F, Vaslin B, Revel Td, Neildez O, Larghero J, Vainchenker W, Dormont D, Grand RL. Early and persistent bone marrow hematopoiesis defect in simian/human immunodeficiency virus-infected macaques despite efficient reduction of viremia by highly active antiretroviral therapy during primary infection. *J. Virol.* 2001; 75: 11594-11602
- [0281] 29. Maurice M, Verhoeyen E, Salmon P, Trono D, Russell SJ, Cosset F-L. Efficient gene transfer into human primary blood lymphocytes by surface-engineered lentiviral vectors that display a T cell-activating polypeptide. *Blood.* 2002; 99: in press
- [0282] 30. Mangeot P-E, Negre D, Dubois B, Winter AJ, Leissner P, Methali M, Kaiserlian D, Cosset F-L, Darlix J-L. Development of minimal lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for the gene transfer in human dendritic cells. *J. Virol.* 2000; 74: 8307-8315
- [0283] 31. Yee JK, Friedmann T, Burns JC. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.* 1994; 43: 99-112
- [0284] 32. Hatziioannou T, Valsesia-Wittmann S, Russell S, Cosset F-L. Incorporation of fowl plague virus hemagglutinin into murine leukemia virus particles and analysis of the infectivity of the pseudotyped retroviruses. *J. Virol.* 1998; 72: 5313-5317
- [0285] 33. Collins MKL, Weiss RA, Takeuchi Y, Cosset F-L. Expression systems. PCT/GB96/02061. WO 97/08330. 1996
- [0286] 34. Cosset F-L, Takeuchi Y, Battini J, Weiss R, Collins M. High titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J. Virol.* 1995; 69: 7430-7436
- [0287] 35. Ott D, Friedrich R, Rein A. Sequence analysis of amphotropic and 10A1 murine leukemia virus: close relationship to mink cell focus forming viruses. *J. Virol.* 1990; 64: 757-766
- [0288] 36. Takeuchi Y, Cosset FL, Lachmann PJ, Okada H, Weiss RA, Collins MKL. Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and producer cell. *J. Virol.* 1994; 68: 8001-8007
- [0289] 37. Matheux F, Lauret E, Rousseau V, Larghero J, Boson B, Vaslin B, Cheret A, DeMaeyer E, Dormont D, LeGrand R. Simian immunodeficiency virus resistance of macaques infused with interferon beta-engineered lymphocytes. *J Gen Virol.* 2000; 81: 2741-2750
- [0290] 38. Hatziioannou T, Delahaye E, Martin F, Russell SJ, Cosset F-L. Retroviral display of functional binding domains fused to the amino-terminus of influenza haemagglutinin. *Human Gene Therapy.* 1999; 10: 1533-1544

- [0291] 39. Freed EO. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*. 1998; 251: 1-15
- [0292] 40. Bosch V, Kramer B, Pfeiffer T, Starck L, Steinhauer DA. Inhibition of release of lentivirus particles with incorporated human influenza virus haemagglutinin by binding to sialic acid-containing cellular receptors. *J Gen Virol*. 2001; 82: 2485-2494
- [0293] 41. Wagner R, Wolff T, Herwig A, Pleschka S, Klenk HD. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J. Virol*. 2000; 74: 6316-6323
- [0294] 42. Carstanjen D, Dutt P, Moritz T. Heparin inhibits retrovirus binding to fibronectin as well as retrovirus gene transfer on fibronectin fragments. *J. Virol*. 2001; 75: 6218-6222
- [0295] 43. Moritz T, Dutt P, Xiao X, Carstanjen D, Vik T, Hanenberg H, Williams DA. Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments. *Blood*. 1996; 88: 855-862
- [0296] 44. Relander T, Brun A, Hawley RG, Karlsson S, Richter J. Retroviral transduction of human CD34+ cells on fibronectin fragment CH-296 is inhibited by high concentrations of vector containing medium. *J Gene Med*. 2001; 3: 207-218
- [0297] 45. Haas DL, Case SS, Crooks GM, Kohn DB. Critical factors influencing stable transduction of human CD34 (+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Mol Ther*. 2000; 2: 71-80
- [0298] 46. Dardalhon V, Herpers B, Noraz N, Pflumio F, Guetard D, Leveau C, Dubart-kupperschmitt A, Chameau P, Taylor N. Lentivirus-mediated gene transfer in primary T cells is enhanced by a central DNA flap. *Gene therapy*. 2001; 8: 190-198
- [0299] 47. Slingsby JH, Baban D, Sutton J, Esapa M, Price T, Kingsman SM, Kingsman AJ, Slade A. Analysis of 4070A envelope levels in retroviral preparations and effect on target cell transduction efficiency. *Hum Gene Ther*. 2000; 11: 1439-1451
- [0300] 48. Ott DE. Cellular proteins in HIV virions. *Rev Med Virol*. 1997; 7: 167-180
- [0301] 49. Swanstrom R, Wills JW. Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, eds. *Retroviruses*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997: 263-334
- [0302] 50. Takeuchi Y, Simpson G, Vile R, Weiss R, Collins M. Retroviral pseudotypes produced by rescue of moloney murine leukemia virus vector by C-type, but not D-type, retroviruses. *Virology*. 1992a; 186: 792-794
- [0303] 51. Pickl WF, Pimentel-Muinos FX, Seed B. Lipid rafts and pseudotyping. *J. Virol*. 2001; 75: 7175-7183
- [0304] 52. Cosson P. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *The Embo J*. 1996; 15: 5783-5788
- [0305] 53. Murakami T, Freed EO. Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J. Virol*. 2000; 74: 3548-3554
- [0306] 54. Vincent MJ, Melsen LR, Martin AS, Compans RW. Intracellular interaction of simian immunodeficiency virus Gag and Env proteins. *J. Virol*. 1999; 73: 8138-8144
- [0307] 55. Wyma DJ, Kotova A, Aiken C. Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55 (Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol*. 2000; 74: 9381-9387
- [0308] 56. Brody BA, Rhee SS, Hunter E. Postassembly cleavage of a retroviral glycoprotein cytoplasmic domain removes a necessary incorporation signal and activates fusion activity. *J. Virol*. 1994; 68:

4620-4627

- [0309] 57. Ragheb JA, Anderson WF. pH-independent murine leukemia virus ecotropic envelope-mediated cell fusion: Implications for the role of the R peptide and p12ETM in viral entry. *J. Virol.* 1994; 68: 3220-3231
- [0310] 58. Rein A, Mirro J, Haynes JG, Ernst SM, Nagashima K. Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus env protein. *J. Virol.* 1994; 68: 1773-1781
- [0311] 59. Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CL, Macher BA. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem.* 1988; 263: 17755-17762
- [0312] 60. Rother RP, Fodor WL, Springhorn JP, Birks CW, Setter E, Sandrin MS, Squinto SP, Rollins SA. A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti-alpha-galactosyl natural antibody. *J Exp Med.* 1995; 182: 1345-1355
- [0313] 61. Takeuchi Y, Porter C, Strahan K, Preece A, Gustafsson K, Cosset F-L, Weiss R, Collins M. Sensitisation of cells and retroviruses to human serum by alpha(1-3) galactosyltransferase. *Nature.* 1996; 379: 85-88
- [0314] 62. Takeuchi Y, Liang SH, Bieniasz PD, Jager U, Porter CD, Friedman T, McClure MO, Weiss RA. Sensitization of rhabdo-, lenti-, and spumaviruses to human serum by galactosyl (alpha 1-3) galactosylation. *J. Virol.* 1997; 71: 6174-6178
- [0315] 63. DePolo NJ, Harkleroad CE, Bodner M, Watt AT, Anderson CG, Greengard JS, Murthy KK, Jr TWD, Jolly DJ. The resistance of retroviral vectors produced from human cells to serum inactivation *in vivo* and *in vitro* is primate species dependent. *J. Virol.* 1999; 73: 6708-6714
- [0316] 64. Montefiori DC, Cornell RJ, Zhou JY, Zhou JT, Hirsch VM, Johnson PR. Complement control proteins, CD46, CD55, and CD59, as common surface constituents of human and simian immunodeficiency viruses and possible targets for vaccine protection. *Virology.* 1994; 205: 82-92
- [0317] 65. Lavillette D, Russell SJ, Cosset F-L. Retargeting gene delivery by surface-engineered retroviral vector particles. *Current Opinion in Biotechnology.* 2001; 12: 461-466
- [0318] 66. Russell SJ, Cosset F-L. Modifying the Host Range Properties of Retroviral Vectors. *Journal of Gene Medicine.* 1999; 1: 300-311
- [0319] 67. Donahue RE, Sorrentino BP, Hawley RG, An DS, Chen IS, Wersto RP. Fibronectin fragment CH-296 inhibits apoptosis and enhances *ex vivo* gene transfer by murine retrovirus and human lentivirus vectors independent of viral tropism in nonhuman primate CD34+ cells. *Mol Ther.* 2001; 3: 359-367
- [0320] 68. Pizzato M, Marlow SA, Blair ED, Takeuchi Y. Initial binding of murine leukemia virus particles to cells does not require specific Env-receptor interaction. *J. Virol.* 1999; 73: 8599-8611
- [0321] 69. Barnett AL, Cunningham JM. Receptor binding transforms the surface subunit of the mammalian C-type retrovirus envelope protein from an inhibitor to an activator of fusion. *J. Virol.* 2001; 75: 9096-9105
- [0322] 70. Lavillette D, Ruggieri A, Boson B, Maurice M, Cosset F-L. Structural inter-relations between subdomains of the SU that regulate receptor-mediated transition between the fusion-inhibited and fusion-active conformations of the MLV glycoprotein. submitted. 2002
- [0323] 71. Jinno-Oue A, Oue M, Ruscetti SK. A unique heparin-binding domain in the envelope protein of the neuropathogenic PVC-211 murine leukemia virus may contribute to its brain capillary endothelial cell tropism. *J. Virol.* 2001; 75: 12439-12445
- [0324] 72. Klimstra WB, Heidner HW, Johnston RE. The furin protease cleavage recognition sequence of

Sindbis virus PE2 can mediate virion attachment to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 1999; 73: 6299-6306

- [0325] 73. Uckert W, Willimsky G, Pedersen FS, Blankenstein T, Pedersen L. RNA levels of human retrovirus receptors Pit1 and Pit2 do not correlate with infectibility by three retroviral vector pseudotypes. *Hum Gene Ther.* 1998; 9: 2619-2627
- [0326] 74. Lavillette D, Boson B, Russell S, Cosset F-L. Membrane fusion by murine leukemia viruses is activated in cis or in trans by interactions of the receptor-binding domain with a conserved disulfide loop at the carboxy-terminus of the surface glycoproteins. *J of Virol.* 2001; 75: 3685-3695
- [0327] 75. Rodrigues P, Heard JM. Modulation of Phosphate Uptake and Amphotropic Murine Leukemia Virus Entry by Posttranslational Modifications of PIT-2. *J. Virol.* 1999: 3789-3799
- [0328] **괄호 안에 번호로 표시된 참고문헌**
- [0329] 1. Berlioz-Torrent, C., B. L. Shacklett, L. Erdtmann, L. Delamarre, I. Bouchaert, P. Sonigo, M. C. Dokhelar, and R. Benarous 1999. Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins *J. Virol.* 73: 1350-1361.
- [0330] 2. Brody, B. A., S. S. Rhee, and E. Hunter 1994. Postassembly cleavage of a retroviral glycoprotein cytoplasmic domain removes a necessary incorporation signal and activates fusion activity *J. Virol.* 68: 4620-4627.
- [0331] 3. Brody, B. A., S. S. Rhee, M. A. Sommerfelt, and E. Hunter 1992. A viral protease-mediated cleavage of the transmembrane glycoprotein of Mason-Pfizer monkey virus can be suppressed by mutations within the matrix protein *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 3443-7.
- [0332] 4. Christodoulopoulos, I., and P. Cannon 2001. Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors *J. Virol.* 75: 4129-38.
- [0333] 5. Collawn, J. F., A. Lai, D. Domingo, M. Fitch, S. Hatton, and I. S. Trowbridge 1993. YTRF is the conserved internalization signal of the transferrin receptor, and a second YTRF signal at position 31-34 enhances endocytosis *J Biol Chem.* 268: 21686-21692.
- [0334] 6. Cosset, F.-L., Y. Takeuchi, J. Battini, R. Weiss, and M. Collins 1995. High titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum *J. Virol.* 69: 7430-7436.
- [0335] 7. Cosson, P. 1996. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1 *The Embo J.* 15: 5783-5788.
- [0336] 8. Delamarre, L., C. Pique, A. R. Rosenberg, V. Blot, M. P. Grange, I. L. Blanc, and M. C. Dokhelar 1999. The Y-S-L-I tyrosine-based motif in the cytoplasmic domain of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope is essential for cell-to-cell transmission. *J. Virol.* 73: 9659-9663.
- [0337] 9. Denesvre, C., C. Carrington, A. Corbin, Y. Takeuchi, F.-L. Cosset, T. Schulz, M. Sitbon, and P. Sonigo 1996. TM domain swapping of murine leukemia virus and human T-cell leukemia virus envelopes confers different infectious abilities despite similar incorporation into virions *J. Virol.* 70: 4380-4386.
- [0338] 10. Fielding, A., S. Chapel-Fernandes, M. Chadwick, F. Bullough, F.-L. Cosset, and S. Russell 2000. A hyperfusogenic Gibbon ape leukemia virus envelope glycoprotein: targeting of a cytotoxic gene by ligand display *Human Gene Therapy.* 11: 817-826.
- [0339] 11. Freed, E. O. 1998. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle *Virology.* 251: 1-15.
- [0340] 12. Freed, E. O., and M. A. Martin 1995. Virion incorporation of envelope glycoproteins with long

but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix J. Virol. 69: 1984-1989.

- [0341] 13. Grange, M., V. Blot, L. Delamarre, I. Bouchaert, A. Rocca, A. Dautry-Varsat, and M. Dokhelar 2000. Identification of two intracellular mechanisms leading to reduced expression of oncoretrovirus envelope glycoproteins at the cell surface J. Virol. 74: 11734-11743.
- [0342] 14. Januszski, M. M., P. M. Cannon, D. Chen, Y. Rozenberg, and W. F. Anderson 1997. Functional analysis of the cytoplasmic tail of Moloney murine leukemia virus envelope protein J. Virol. 71: 3613-9.
- [0343] 15. Kiernan, R. E., and E. O. Freed 1998. Cleavage of the murine leukemia virus transmembrane env protein by human immunodeficiency virus type 1 protease: transdominant inhibition by matrix mutations J. Virol. 72: 9621-7.
- [0344] 16. Kim, F. J., I. Seiliez, C. Denesvre, D. Lavillette, F.-L. Cosset, and M. Sitbon 2000. Definition of an amino-terminal domain of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope surface unit which extends the fusogenic range of an ecotropic murine leukemia virus Journal of Biological Chemistry. 275: 23417-20.
- [0345] 17. Li, M., C. Yang, and R. W. Compans 2001. Mutations in the cytoplasmic tail of murine leukemia virus envelope protein suppress fusion inhibition by R peptide J. Virol. 75: 2337-44.
- [0346] 18. Lindwasser, O. W., and M. D. Resh 2001. Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains J. Virol. 75: 7913-24.
- [0347] 19. Lodge, R., L. Delamarre, J. P. Lalonde, J. Alvarado, D. A. Sanders, M. C. Dokhelar, E. A. Cohen, and G. Lemay 1997. Two distinct oncornaviruses harbor an intracytoplasmic tyrosine-based basolateral targeting signal in their viral envelope glycoprotein J. Virol. 71: 5696-702.
- [0348] 20. Mangeot, P.-E., D. Negre, B. Dubois, A. J. Winter, P. Leissner, M. Methali, D. Kaiserlian, F.-L. Cosset, and J.-L. Darlix 2000. Development of minimal lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus(SIVmac251) and their use for the gene transfer in human dendritic cells J. Virol. 74: 8307-8315.
- [0349] 21. Murakami, T., and E. O. Freed 2000. Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail J. Virol. 74: 3548-54.
- [0350] 22. Naldini, L., U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma, and D. Trono 1996. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector Science. 272: 263-267.
- [0351] 23. Negre, D., G. Duisit, P.-E. Mangeot, P. Moullier, J.-L. Darlix, and F.-L. Cosset 2002. Lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIV), p. 53-74. In D. Trono(ed.), Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 261.
- [0352] 24. Negre, D., P. Mangeot, G. Duisit, S. Blanchard, P. Vidalain, P. Leissner, A. Winter, C. Rabourdin-Combe, M. Mehtali, P. Moullier, J.-L. Darlix, and F.-L. Cosset 2000. Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus(SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells Gene Ther. 7: 1613-1623.
- [0353] 25. Nguyen, D. H., and J. E. Hildreth 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts J. Virol. 74: 3264-72.
- [0354] 26. Ono, A., and E. O. Freed 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release PNAS. 98: 13925-13930.
- [0355] 27. Ott, D., R. Friedrich, and A. Rein 1990. Sequence analysis of amphotropic and10A1 murine

leukemia virus: close relationship to mink cell focus forming viruses. *J. Virol.* 64: 757-766.

- [0356] 28. Overbaugh, J., A. D. Miller, and M. V. Eiden 2001. Receptors and Entry Cofactors for Retroviruses Include Single and Multiple Transmembrane-Spanning Proteins as well as Newly Described Glycophosphatidylinositol-Anchored and Secreted Proteins *Microbiol Mol Biol Rev.* 65: 371-89.
- [0357] 29. Pickl, W. F., F. X. Pimentel-Muinos, and B. Seed 2001. Lipid rafts and pseudotyping *J. Virol.* 75: 7175-83.
- [0358] 30. Ragheb, J. A., and W. F. Anderson 1994. pH-independent murine leukemia virus ecotropic envelope-mediated cell fusion: Implications for the role of the R peptide and p12ETM in viral entry. *J. Virol.* 68: 3220-3231.
- [0359] 31. Rasko, J. E., J. L. Battini, R. J. Gottschalk, I. Mazo, and A. D. Miller 1999. The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 2129-2134.
- [0360] 32. Reeves, R. H., and S. J. O'Brien 1984. Molecular genetic characterisation of the RD114 gene family of endogenous feline retroviral sequences *J. Virol.* 52: 164-171.
- [0361] 33. Rein, A., J. Mirro, J. G. Haynes, S. M. Ernst, and K. Nagashima 1994. Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus env protein *J. Virol.* 68: 1773-1781.
- [0362] 34. Salmon, P., D. Negre, D. Trono, and F.-L. Cosset 2000. A chimeric GALV-derived envelope glycoprotein harboring the cytoplasmic tail of MLV envelope efficiently pseudotypes HIV-1 vectors *J Gen Med.* 2 (sup): 23.
- [0363] 35. Sandrin, V., B. Boson, P. Salmon, W. Gay, D. Negre, R. L. Grand, D. Trono, and F.-L. Cosset 2002. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34⁺ cells derived from human and non-human primates *Blood.* in press.
- [0364] 36. Stitz, J., C. Buchholz, M. Engelstadter, W. Uckert, U. Bloemer, I. Schmitt, and K. Cichutek 2000. Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1 *Virology.* 273: 16-20.
- [0365] 37. Swanstrom, R., and J. W. Wills 1997. Synthesis, assembly, and processing of viral proteins, p. 263-334. In J. M. Coffin, S. H. Hughes, and H. E. Varmus (eds), *Retroviruses.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- [0366] 38. Taylor, C. S., A. Nouri, Y. Zhao, Y. Takeuchi, and D. Kabat 1999. A sodium-dependent neutral-amino-acid transporter mediates infections of feline and baboon endogenous retroviruses and simian type D retroviruses *J. Virol.* 73: 4470-4474.
- [0367] 39. Takeuchi, Y., F. L. Cosset, P. J. Lachmann, H. Okada, R. A. Weiss, and M. K. L. Collins 1994. Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and producer cell *J. Virol.* 68: 8001-8007.
- [0368] 40. Takeuchi, Y., R. G. Vile, G. Simpson, B. O'Hara, M. K. L. Collins, and R. A. Weiss 1992b. Feline leukemia virus subgroup B uses the same cell surface receptor as gibbon ape leukemia virus *J. Virol.* 66: 1219-1222.
- [0369] 41. Vincent, M. J., L. R. Melsen, A. S. Martin, and R. W. Compans 1999. Intracellular interaction of simian immunodeficiency virus Gag and Env proteins *J. Virol.* 73: 8138-44.
- [0370] 42. Wyma, D. J., A. Kotov, and C. Aiken 2000. Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55 (Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles *J. Virol.* 74: 9381-7.
- [0371] 43. Yang, C., and R. W. Compans 1997. Analysis of the murine leukemia virus R peptide: delineation

of the molecular determinants which are important for its fusion inhibition activity *J. Virol.* 71: 8490-8496.

- [0372] Yee, J. K., T. Friedmann, and J. C. Burns 1994. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range *Methods Cell Biol.* 43: 99-112.
- [0373] **기타 참고문헌**
- [0374] Akkina, Walton, Chen, Li, Planelles, Chen, "High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G," *J. Virol.*, 70: 2581-2585, 1996.
- [0375] Almendro et al., "Cloning of the human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 promoter and its tissue-specific expression. Structural and functional characterization," *J. Immunol.*, 157 (12): 5411-5421, 1996.
- [0376] An, Wersto, Agricola, Metzger, Lu, Amado, Chen, Donahue, "Marking and gene expression by a lentivirus vector in transplanted human and nonhuman primate CD34 (+) cells," *J. Virol.*, 74: 1286-1295, 2000.
- [0377] Angel, Bauman, Stein, Dellus, Rahmsdorf, and Herrlich, "12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate Induction of the Human Collagenase Gene is Mediated by an Inducible Enhancer Element Located in the 5' Flanking Region," *Mol. Cell. Biol.*, 7: 2256, 1987a.
- [0378] Angel, Imagawa, Chiu, Stein, Imbra, Rahmsdorf, Jonat, Herrlich, and Karin, "Phorbol Ester-Inducible Genes Contain a Common cis Element Recognized by a TPA-Modulated Trans-acting Factor," *Cell*, 49: 729, 1987b
- [0379] Arrighi, Hauser, Chapuis, Zubler, Kindler, "Long-term culture of human CD34 (+) progenitors with FLT3-ligand, thrombopoietin, and stem cell factor induces extensive amplification of a CD34 (-) CD14 (-) and CD34 (-) CD14 (+) dendritic cell precursor," *Blood*, 93: 2244-2252, 1999.
- [0380] Atchison and Perry, "Tandem Kappa Immunoglobulin Promoters are Equally Active in the Presence of the Kappa Enhancer: Implications for Model of Enhancer Function," *Cell*, 46: 253, 1986.
- [0381] Atchison and Perry, "The Role of the Kappa Enhancer and its Binding Factor NF-kappa B in the Developmental Regulation of Kappa Gene Transcription," *Cell*, 48: 121, 1987.
- [0382] Banerji et al., "Expression of a Beta-Globin Gene is Enhanced by Remote SV40 DNA Sequences," *Cell*, 27: 299, 1981.
- [0383] Banerji, Olson, and Schaffner, "A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy-chain genes," *Cell*, 35: 729, 1983.
- [0384] Berkhout, Silverman, and Jeang, "Tat Trans-activates the Human Immunodeficiency Virus Through a Nascent RNA Target," *Cell*, 59: 273, 1989.
- [0385] Bhatia, Bonnet, Kapp, Wang, Murdoch, Dick, "Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture," *J. Exp. Med.*, 186: 619-624, 1997.
- [0386] Blonar, Baldwin, Flavell, and Sharp, "A gamma-interferon-induced factor that binds the interferon response sequence of the MHC class I gene, H-2Kb," *EMBO J.*, 8: 1139, 1989.
- [0387] Blomer, Naldini, Kafri, Trono, Verma, Gage, "Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector," *J. Virol.*, 71: 6641-6649, 1997.
- [0388] Bodine and Ley, "An enhancer element lies 3' to the human a gamma globin gene," *EMBO J.*, 6: 2997, 1987.
- [0389] Boshart, Weber, Jahn, Dorsch-Hasler, Fleckenstein, and Schaffner, "A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus," *Cell*, 41: 521, 1985.
- [0390] Bosze, Thiesen, and Charnay, "A transcriptional enhancer with specificity for erythroid cells is

located in the long terminal repeat of the friend murine leukemivirus," EMBO J, 5: 1615, 1986.

- [0391] Braddock, Chambers, Wilson, Esnouf, Adams, Kingsman, and Kingsman, "HIV-I Tat activates presynthesized RNA in the nucleus," Cell, 58: 269, 1989.
- [0392] Bray, Prasad, Dubay, Hunter, Jeang, Rekosh, Hammarskjold, "A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent," Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 1256-60, 1994.
- [0393] Brown, Tiley, Cullen, "Efficient polyadenylation within the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat requires flanking U3-specific sequences," J. Virol., 65: 3340-3343, 1991.
- [0394] Bulla and Siddiqui, "The hepatitis B virus enhancer modulates transcription of the hepatitis B virus surface-antigen gene from an internal location," J. Virol., 62: 1437, 1986.
- [0395] Campbell and Villarreal, "Functional analysis of the individual enhancer core sequences of polyoma virus: cell-specific uncoupling of DNA replication from transcription," Mol. Cell. Biol., 8: 1993, 1988.
- [0396] Campere and Tilghman, "Postnatal repression of the alpha-fetoprotein gene is enhancer independent," Genes and Dev., 3: 537, 1989.
- [0397] Campo, Spandidos, Lang, Wilkie, "Transcriptional control signals in the genome of bovine papilloma virus type1," Nature, 303: 77, 1983.
- [0398] Carbonelliet al., "A plasmid vector for isolation of strong promoters in E. coli," FEMS Microbiol Lett. 177 (1): 75-82, 1999.
- [0399] Case, Price, Jordan, Yu, Wang, Bauer, Haas, Xu, Stripecke, Naldini, Kohn, Crooks, "Stable transduction of quiescent CD34 (+) CD38 (-) human hematopoietic cells by HIV-1 based lentiviralvectors," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 2988-2993, 1999.
- [0400] Celander and Haseltine, "Glucocorticoid Regulation of Murine Leukemia Virus Transcription Elements is Specified by Determinants Within the Viral Enhancer Region," J. Virology, 61: 269, 1987.
- [0401] Celander, Hsu, and Haseltine, "Regulatory Elements Within the Murine Leukemia Virus Enhancer Regions Mediate Glucocorticoid Responsiveness," J. Virology. 62: 1314, 1988.
- [0402] Chandler, Maler, and Yamamoto, "DNA Sequences Bound Specifically by Glucocorticoid Receptor *in vitro* Render a Heterologous Promoter Hormone Responsive *in vivo*," Cell, 33: 489, 1983.
- [0403] Chandler et al., "RNA splicing specificity determined by the coordinated action of RNA recognition motifs in SR proteins," Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 (8): 3596-3601, 1997.
- [0404] Chang, Erwin, and Lee, "Glucose-regulated Protein (GRP94 and GRP78) Genes Share Common Regulatory Domains and are Coordinately Regulated by Common Trans-acting Factors," Mol. Cell. Biol., 9: 2153, 1989.
- [0405] Chameau, Mirambeau, Roux, Paulous, Buc, Clavel, "HIV-1 reverse transcription: a termination step at the center of the genome," J. Mol. Biol. 241: 651-662, 1994.
- [0406] Chatterjee, Lee, Rentoumis, and Jameson, "Negative Regulation of the Thyroid-Stimulating Hormone Alpha Gene by Thyroid Hormone: Receptor Interaction Adjacent to the TATA Box," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86: 9114, 1989.
- [0407] Chen and Okayama, "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA," Mol. Cell. Biol. 7: 2745-2752, 1987
- [0408] Cherrington and Ganem, "Regulation of polyadenylation in human immunodeficiency virus (HIV): contributions of promoter proximity and upstream sequences," EMBO. J., 11: 1513-1524, 1992.
- [0409] Choi, Chen, Kriegler, and Roninson, "An altered pattern of cross-resistance in multi-drug-resistant

human cells results from spontaneous mutations in the *mdr-1* (β -glycoprotein) gene," *Cell*, 53: 519, 1988.

- [0410] Cocea, "Duplication of a region in the multiple cloning site of a plasmid vector to enhance cloning-mediated addition of restriction sites to a DNA fragment," *Biotechniques*, 23: 814-816, 1997.
- [0411] Cohen, Walter, and Levinson, "A Repetitive Sequence Element 3' of the Human *c-Ha-ras1* Gene Has Enhancer Activity," *J. Cell. Physiol.*, 5: 75, 1987.
- [0412] Corbeau, et al., *PNAS (U.S.A.)* 93 (24): 14070-14075, 1996.
- [0413] Costa, Lai, Grayson, and Darnell, "The Cell-Specific Enhancer of the Mouse *Transthyretin*(Prealbumin) Gene Binds a Common Factor at One Site and a Liver-Specific Factor (s) at Two Other Sites," *Mol. Cell. Biol.*, 8: 81, 1988.
- [0414] Cripe, Haugen, Turk, Tabatabai, Schmid, Durst, Gissmann, Roman, and Turek, "Transcriptional Regulation of the Human Papilloma Virus-16 E6-E7 Promoter by a Keratinocyte-Dependent Enhancer, and by Viral E2 Trans-activator and Repressor Gene Products: Implications for Cervical Carcinogenesis," *EMBO J.*, 6: 3745, 1987.
- [0415] Culotta and Hamer, "Fine Mapping of a Mouse *Metallothionein* Gene Metal-Response Element," *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1376, 1989.
- [0416] Dandolo, Blangy, and Kamen, "Regulation of Polyoma Virus Transcription in Murine Embryonal Carcinoma Cells," *J. Virology*, 47: 55, 1983.
- [0417] Das, Klaver, Klasens, van Wamel, "A conserved hairpin motif in the R-U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is essential for replication," *J. Virol.* 71: 2346-2356.
- [0418] Dao, Hannum, Kohn, Nolta, "FLT3 ligand preserves the ability of human CD34+ progenitors to sustain long-term hematopoiesis in immune-deficient mice after ex vivo retroviral-mediated transduction," *Blood*, 89: 446-456, 1997.
- [0419] *Dao, Hashino, Kato, Nolta, "Adhesion to fibronectin maintains regenerative capacity during ex vivo, culture and transduction of human hematopoietic stem and progenitor cells," *Blood*, 92: 4612-4621, 1998.
- [0420] Deschamps, Meijlink, and Verma, "Identification of a Transcriptional Enhancer Element Upstream From the Proto-Oncogene *Fos*," *Science*, 230: 1174, 1985.
- [0421] De Villiers, Schaffner, Tyndall, Lupton, and Kamen, "Polyoma Virus DNA Replication Requires an Enhancer," *Nature*, 312: 242, 1984.
- [0422] DeZazzo, Kilpatrick, Imperiale, "Involvement of long terminal repeat U3 sequences overlapping the transcription control region in human immunodeficiency virus type 1 mRNA 3' end formation," *Mol. Cell. Biol.*, 11: 1624-1630, 1991.
- [0423] Donello, Loeb, Hope, "Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite post transcriptional regulatory element," *J. Virol.*, 72: 5085-5092, 1998.
- [0424] Dorrell, Gan, Pereira, Hawley, Dick, "Expansion of human cord blood CD34 (+) CD38 (-) cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function," *Blood*, 95: 102-110, 2000.
- [0425] Dull, Zufferey, Kelly, Mandel, Nguyen, Trono, Naldini, "A third generation lentivirus vector with a conditional packaging system," *J. Virol.*, 72: 8463-8471, 1998.
- [0426] Edbrooke, Burt, Cheshire, and Woo, "Identification of cis-acting sequences responsible for phorbol ester induction of human serum amyloid a gene expression via a nuclear-factor-kappa-like transcription factor," *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1908, 1989.

- [0427] Edlund, Walker, Barr, and Rutter, "Cell-specific expression of the rat insulin gene: evidence for role of two distinct 5' flanking elements," *Science*, 230: 912, 1985.
- [0428] Fechheimer, Boylan, Parker, Sisken, Patel and Zimmer, "Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8463-8467, 1987
- [0429] Feng and Holland, "HIV-I Tat Trans-Activation Requires the Loop Sequence Within Tar," *Nature*, 334: 6178, 1988.
- [0430] Firak and Subramanian, "Minimal Transcription Enhancer of Simian Virus 40 is a 74-Base-Pair Sequence that Has Interacting Domains," *Mol. Cell. Biol.*, 6: 3667, 1986.
- [0431] Foeking and Hofstetter, "Powerful and Versatile Enhancer-Promoter Unit for Mammalian Expression Vectors," *Gene*, 45(1): 101-105, 1986.
- [0432] Froehler, Ng, Matteucci, "Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates," *Nuc. Acids Res.* 14: 5399-407, 1986.
- [0433] Fujita, Shibuya, Hotta, Yamanishi, and Taniguchi, "Interferon-Beta Gene Regulation: Tandemly Repeated Sequences of a Synthetic 6-bp Oligomer Function as a Virus-Inducible Enhancer," *Cell*, 49: 357, 1987.
- [0434] Gilles, Morris, Oi, and Tonegawa, "A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy-chain gene," *Cell*, 33: 717, 1983.
- [0435] Gilmartin, Fleming, Oetjen, "Activation of HIV-1 pre-mRNA 3' processing *in vitro* requires both an upstream element and TAR," *EMBO. J.*, 11: 4419-4428, 1992.
- [0436] Gloss, Bernard, Seedorf, and Klock, "The Upstream Regulatory Region of the Human Papilloma Virus-16 Contains an E2 Protein-Independent Enhancer Which is Specific for Cervical Carcinoma Cells and Regulated by Glucocorticoid Hormones," *EMBO J.*, 6: 3735, 1987.
- [0437] Godbout, Ingram, and Tilghman, "Fine-Structure Mapping of the Three Mouse Alpha-Fetoprotein Gene Enhancers," *Mol. Cell. Biol.*, 8: 1169, 1988.
- [0438] Goodbourn, Burstein, and Maniatis, "The Human Beta-Interferon Gene Enhancer is Under Negative Control," *Cell*, 45: 601, 1986.
- [0439] Goodbourn and Maniatis, "Overlapping Positive and Negative Regulatory Domains of the Human -Interferon Gene," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 1447, 1988.
- [0440] Gopal, "Gene transfer method for transient gene expression, stable transformation, and cotransformation of suspension cell cultures," *Mol. Cell. Biol.* 5: 1188-1190, 1985.
- [0441] Gossen and Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 5547-5551, 1992.
- [0442] Graham and Van Der Eb, "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA," *Virology* 52: 456-467, 1973
- [0443] Greco and Dachs, "Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future prospectives," *J. Cell. Phys.* 187: 22-36, 2001.
- [0444] Greene, Bohnlein, and Ballard, "HIV-1, and Normal T-Cell Growth: Transcriptional Strategies and Surprises," *Immunology Today*, 10: 272, 1989.
- [0445] Grosschedl and Baltimore, "Cell-Type Specificity of Immunoglobulin Gene Expression is Regulated by at Least Three DNA Sequence Elements," *Cell*, 41: 885, 1985.
- [0446] Haslinger and Karin, "Upstream Promoter Element of the Human Metallothionein-II Gene Can Act Like an Enhancer Element," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 8572, 1985.
- [0447] Hauber and Cullen, "Mutational Analysis of the Trans-Activation-Responsive Region of the Human Immunodeficiency Virus Type I Long Terminal Repeat," *J. Virology*, 62: 673, 1988.

- [0448] Hen, Borrelli, Fromental, Sassone-Corsi, and Chambon, "A Mutated Polyoma Virus Enhancer Which is Active in Undifferentiated Embryonal Carcinoma Cells is not Repressed by Adenovirus-2E1A Products," *Nature*, 321: 249, 1986.
- [0449] Hensel, Meichle, Pfizenmaier, and Kronke, "PMA-Responsive 5' Flanking Sequences of the Human TNF Gene," *Lymphokine Res.*, 8: 347, 1989.
- [0450] Herr and Clarke, "The SV40 Enhancer is Composed of Multiple Functional Elements That Can Compensate for One Another," *Cell*, 45: 461, 1986.
- [0451] Hirochika, Browker, and Chow, "Enhancers and Trans-Acting E2 Transcriptional Factors of Papilloma Viruses," *J. Virol.*, 61: 2599, 1987.
- [0452] Hirsch, Gauler, Deagostini-Bauzin, Bally-Cuif, and Gordis, "Identification of Positive and Negative Regulatory Elements Governing Cell-Type-Specific Expression of the Neural-Cell-Adhesion-Molecule Gene," *Mol. Cell. Biol.*, 10: 1959, 1990.
- [0453] Holbrook, Gulino, and Ruscetti, "cis-Acting Transcriptional Regulatory Sequences in the Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV) Long Terminal Repeat," *Virology*, 157: 211, 1987.
- [0454] Horlick and Benfield, "The upstream muscle-specific enhancer of the rat muscle creatine kinase gene is composed of multiple elements," *Mol. Cell. Biol.*, 9: 2396, 1989.
- [0455] Huang, Ostrowski, Berard, and Hagar, "Glucocorticoid regulation of the ha-musv p21 gene conferred by sequences from mouse mammary tumor virus," *Cell*, 27: 245, 1981.
- [0456] Hug, Costas, Staeheli, Aebi, and Weissmann, "Organization of the Murine Mx Gene and Characterization of its Interferon-and Virus-Inducible Promoter," *Mol. Cell. Biol.*, 8: 3065, 1988.
- [0457] Hwang, Lim, and Chae, "Characterization of the S-Phase-Specific Transcription Regulatory Elements in a DNA-Replication-Independent Testis-Specific H2B (TH2B) Histone Gene," *Mol. Cell. Biol.*, 10: 585, 1990.
- [0458] Imagawa, Chiu, and Karin, "Transcription Factor AP-2 Mediates Induction by Two Different Signal-Transduction Pathways: Protein Kinase C and cAMP," *Cell*, 51: 251, 1987.
- [0459] Imbra and Karin, "Phorbol Ester Induces the Transcriptional Stimulatory Activity of the SV40 Enhancer," *Nature*, 323: 555, 1986.
- [0460] Imler, Lemaire, Wasvlyk, and Waslyk, "Negative Regulation Contributes to Tissue Specificity of the Immunoglobulin Heavy-Chain Enhancer," *Mol. Cell. Biol.*, 7: 2558, 1987.
- [0461] Imperial and Nevins, "Adenovirus 5 E2 Transcription Unit: an E1A-Inducible Promoter with an Essential Element that Functions Independently of Position or Orientation," *Mol. Cell. Biol.*, 4: 875, 1984.
- [0462] Jakobovits, Smith, Jakobovits, and Capon, "A Discrete Element 3' of Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) and HIV-2mRNA Initiation Sites Mediates Transcriptional Activation by an HIV Trans-Activator," *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2555, 1988.
- [0463] Jameel and Siddiqui, "The Human Hepatitis B Virus Enhancer Requires Transacting Cellular Factor (s) for Activity," *Mol. Cell. Biol.*, 6: 710, 1986.
- [0464] Jaynes, Joluison, Buskin, Gartside, and Hauschka, "The Muscle Creatine Kinase Gene is Regulated by Multiple Upstream Elements, Including a Muscle-Specific Enhancer," *Mol. Cell. Biol.*, 8: 62, 1988.
- [0465] Johnson, Wold, and Hauschka, "Muscle creatine kinase sequence elements regulating skeletal and cardiac muscle expression in transgenic mice," *Mol. Cell. Biol.*, 9: 3393, 1989.
- [0466] Kadesch and Berg, "Effects of the Position of the Simian Virus 40 Enhancer on Expression of Multiple Transcription Units in a Single Plasmid," *Mol. Cell. Biol.*, 6: 2593, 1986.
- [0467] Kafri, et al., "Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral

vectors," *Nat. Genetics*, 17: 314-317, 1997.

- [0468] Karin, Haslinger, Heguy, Dietlin, and Cooke, "Metal-Responsive Elements Act as Positive Modulators of Human Metallothionein-IIA Enhancer Activity," *Mol. Cell. Biol.*, 7: 606, 1987.
- [0469] Katinka, Yaniv, Vasseur, and Blangy, "Expression of Polyoma Early Functions in Mouse Embryonal Carcinoma Cells Depends on Sequence Rearrangements in the Beginning of the Late Region," *Cell*, 20: 393, 1980.
- [0470] Kawamoto, Makino, Niw, Sugiyama, Kimura, Anemura, Nakata, and Kakunaga, "Identification of the Human Beta-Actin Enhancer and its Binding Factor," *Mol. Cell. Biol.*, 8: 267, 1988.
- [0471] Kiledjian, Su, Kadesch, "Identification and characterization of two functional domains within the murine heavy-chain enhancer," *Mol. Cell. Biol.*, 8: 145, 1988.
- [0472] Klages, Zufferey, Trono, "A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors," *Mol. Ther.* 2: 170-176, 2000.
- [0473] Klamut, Gangopadhyay, Worton, and Ray, "Molecular and Functional Analysis of the Muscle-Specific Promoter Region of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene," *Mol. Cell. Biol.*, 10: 193, 1990.
- [0474] Klein et al., "High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells," *Nature*, 327: 70-73, 1987.
- [0475] Koch, Benoist, and Mathis, "Anatomy of a new β -cell-specific enhancer," *Mol. Cell. Biol.*, 9: 303, 1989.
- [0476] Kohn, Nolta, Weinthal, Bahner, Yu, Lilley, Crooks, "Toward gene therapy for Gaucher disease," *Hum. Gene Ther.*, 2: 101-105, 1991.
- [0477] Kotsopoulou, Kim, Kingsman, Kingsman, Mitrophanous, "A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1(HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene," *J. Virol.* 74: 4839-52, 2000.
- [0478] Kraus et al., "Alternative promoter usage and tissue specific expression of the mouse somatostatin receptor 2 gene," *FEBS Lett.*, 428 (3): 165-170, 1998.
- [0479] Kriegler and Botchan, "A retrovirus LTR contains a new type of eukaryotic regulatory element," In: *Eukaryotic Viral Vectors*, Gluzman (ed.), Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.
- [0480] Kriegler et al., "Promoter substitution and enhancer augmentation increases the penetrance of the sv40 a gene to levels comparable to that of the harvey murine sarcoma virus ras gene in morphologic transformation," In *Gene Expression*, Alaxl Liss (Ed.), Hamer and Rosenberg, New York, 1983.
- [0481] Kriegler et al., "Viral Integration and Early Gene Expression Both Affect the Efficiency of SV40 Transformation of Murine Cells: Biochemical and Biological Characterization of an SV40Retrovirus," In: *Cancer Cells 2/Oncogenes and Viral Genes*, Van de Woude et al. (eds), Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1984.
- [0482] Kriegler, Perez, Defay, Albert and Liu, "A Novel Form of TNF/Cachectin Is a Cell-Surface Cytotoxic Transmembrane Protein: Ramifications for the Complex Physiology of TNF," *Cell*, 53: 45, 1988.
- [0483] Kuhl, De La Fuente, Chaturvedi, Parinool, Ryals, Meyer, and Weissman, "Reversible Silencing of Enhancers by Sequences Derived From the Human IFN- α Promoter," *Cell*, 50: 1057, 1987.
- [0484] Kunz, Zimmerman, Heisig, and Heinrich, "Identification of the Promoter Sequences Involved in the Interleukin-6-Dependent Expression of the Rat Alpha-2-Macroglobulin Gene," *Nucl. Acids Res.*, 17: 1121, 1989.
- [0485] Lareyre et al., "A 5-kilobase pair promoter fragment of the murine epididymal retinoic acid-binding protein gene drives the tissue-specific, cell-specific, and androgen-regulated expression of a foreign

gene in the epididymis of transgenic mice," *J Biol Chem.*, 274 (12): 8282-8290, 1999.

- [0486] Larsen, Harney, and Moore, "Repression mediates cell-type-specific expression of the rat growth hormone gene," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83: 8283, 1986.
- [0487] Laspia, Rice, and Mathews, "HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation," *Cell*, 59: 283, 1989.
- [0488] Latimer, Berger, and Baumann, "Highly conserved upstream regions of the alpha₁-antitrypsin gene in two mouse species govern liver-specific expression by different mechanisms," *Mol. Cell. Biol.*, 10: 760, 1990.
- [0489] Lee, Mulligan, Berg, and Ringold, "Glucocorticoids Regulate Expression of Dihydrofolate Reductase cDNA in Mouse Mammary Tumor Virus Chimaeric Plasmids," *Nature*, 294: 228, 1981.
- [0490] Lee et al., "Activation of beta₃-adrenoceptors by exogenous dopamine to lower glucose uptake into rat adipocytes," *J Auton Nerv Syst.* 74 (2-3): 86-90, 1997.
- [0491] Levenson et al., "Internal ribosomal entry site-containing retroviral vectors with green fluorescent protein and drug resistance markers," *Human Gene Therapy*, 9: 1233-1236, 1998.
- [0492] Levinson, Khoury, VanDeWoude, and Gruss, "Activation of SV40 Genome by 72-Base-Pair Tandem Repeats of Moloney Sarcoma Virus," *Nature*, 295: 79, 1982.
- [0493] Lewis and Emerman, "Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus," *J. Virol.*, 68: 510-516, 1994.
- [0494] Lin, Cross, Halden, Dragos, Toledano, and Leonard, "Delineation of an enhancer like positive regulatory element in the interleukin-2 receptor. alpha-chain gene," *Mol. Cell. Biol.*, 10: 850, 1990.
- [0495] Luria, Gross, Horowitz, and Givol, "Promoter Enhancer Elements in the Rearranged Alpha-Chain Gene of the Human T-Cell Receptor," *EMBO J.*, 6: 3307, 1987.
- [0496] Lusky, Berg, Weiher, and Botchan, "Bovine Papilloma Virus Contains an Activator of Gene Expression at the Distal End of the Early Transcription Unit," *Mol. Cell. Biol.* 3: 1108, 1983.
- [0497] Lusky and Botchan, "Transient Replication of Bovine Papilloma Virus Type 1 Plasmids: cis and trans Requirements," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83: 3609, 1986.
- [0498] Majors and Varmus, "A Small Region of the Mouse Mammary Tumor Virus Long Terminal Repeat Confers Glucocorticoid Hormone Regulation on a Linked Heterologous Gene," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 5866, 1983.
- [0499] Marthas et al. *J. Virol.*, 67: 6047-6055, 1993.
- [0500] Mazurier, Moreau-Gaudry, Maguer-Satta, Salesse, Pigeonnier-Lagarde, Ged, Belloc, Lacombe, Mahon, Reiffers, de Verneuil, "Rapid analysis and efficient selection of human transduced primitive hematopoietic cells using the humanized S65T green fluorescent protein," *Gene Ther.*, 5: 556-562, 1998.
- [0501] McNeall, Sanchez, Gray, Chesterman, and Sleight, "Hyperinducible Gene Expression From a Metallothionein Promoter Containing Additional Metal-Responsive Elements," *Gene*, 76: 81, 1989.
- [0502] Miksicek, Heber, Schmid, Danesch, Posseckert, Beato, and Schutz, "Glucocorticoid Responsiveness of the Transcriptional Enhancer of Moloney Murine Sarcoma Virus," *Cell*, 46: 203, 1986.
- [0503] Miyoshi, Smith, Mosier, Verma, Torbett, "Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors," *Science*, 283: 682-686, 1999.
- [0504] Mizushima and Nagata, "pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector," *Nucleic Acids Res.*, 18: 5322, 1990.
- [0505] Mordacq and Linzer, "Co-localization of Elements Required for Phorbol Ester Stimulation and

Glucocorticoid Repression of Proliferin Gene Expression," *Genes and Dev.*, 3: 760, 1989.

- [0506] Moreau, Hen, Wasylyk, Everett, Gaub, and Chambon, "The SV40 base-repair repeat has a striking effect on gene expression both in sv40 and other chimeric recombinants," *Nucl. Acids Res.*, 9: 6047, 1981.
- [0507] Muesing et al., *Cell*, 48: 691, 1987.
- [0508] Naldini, Blomer, Gallay, Ory, Mulligan, Gage, Verma, Trono, "7 vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector," *Science*, 272: 263-267, 1996a.
- [0509] Naldini, Blomer, Gage, Trono, Verma, "Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11382-11388, 1996b.
- [0510] Naldini, "Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells," *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 457-463, 1998.
- [0511] Ng, Gunning, Liu, Leavitt, and Kedes, "Regulation of the Human Beta-Actin Promoter by Upstream and Intron Domains," *Nuc. Acids. Res.*, 17: 601, 1989.
- [0512] Nomoto et al., "Cloning and characterization of the alternative promoter regions of the human LIMK2 gene responsible for alternative transcripts with tissue-specific expression," *Gene*, 236 (2): 259-271, 1999.
- [0513] Omitz, Hammer, Davison, Brinster, and Palmiter, "Promoter and enhancer elements from the rat elastase i gene function independently of each other and of heterologous enhancers," *Mol. Cell. Biol.* 7: 3466, 1987.
- [0514] Ondek, Sheppard, and Herr, "Discrete Elements Within the SV40 Enhancer Region Display Different Cell-Specific Enhancer Activities," *EMBO J.*, 6: 1017, 1987.
- [0515] Ory et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 11400-11406, 1996.
- [0516] Palmiter, Chen, and Brinster, "Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring," *Cell*, 29: 701, 1982.
- [0517] Pech, Rao, Robbins, and Aaronson, "Functional identification of regulatory elements within the promoter region of platelet-derived growth factor2," *Mol. Cell. Biol.*, 9: 396, 1989.
- [0518] Perez-Stable and Constantini, "Roles of fetal γ -globin promoter elements and the adult β -globin 3' enhancer in the stage-specific expression of globin genes," *Mol. Cell. Biol.*, 10: 1116, 1990.
- [0519] Piacibello, Sanavio, Severino, Dane, Gammaitoni, Fagioli, Perissinotto, Cavalloni, Kollet Lapidot, Aglietta, "Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34 (+) cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells," *Blood*, 93: 3736-3749, 1999.
- [0520] Picard and Schaffner, "A Lymphocyte-Specific Enhancer in the Mouse Immunoglobulin Kappa Gene," *Nature*, 307: 83, 1984.
- [0521] Pinkert, Omitz, Brinster, and Palmiter, "An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice," *Genes and Dev.*, 1: 268, 1987.
- [0522] Ponta, Kennedy, Skroch, Hynes, and Groner, "Hormonal Response Region in the Mouse Mammary Tumor Virus Long Terminal Repeat Can Be Dissociated From the Proviral Promoter and Has Enhancer Properties," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 1020, 1985.
- [0523] Porton, Zaller, Lieberson, and Eckhardt, "Immunoglobulin heavy-chain enhancer is required to maintain transfected. gamma. 2a gene expression in a pre-b-cellline," *Mol. Cell. Biol.*, 10: 1076, 1990.
- [0524] Potter et al., "Enhancer-dependent expression of human k immunoglobulin genes introduced into mouse

pre-Blymphocytes by electroporation," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 7161-7165, 1984.

- [0525] Queen and Baltimore, "Immunoglobulin Gene Transcription is Activated by Downstream Sequence Elements," Cell, 35: 741, 1983.
- [0526] Quinn, Farina, Gardner, Krutzsch, and Levens, "Multiple components are required for sequence recognition of the apl site in the gibbon ape leukemia virus enhancer," Mol. Cell. Biol., 9: 4713, 1989.
- [0527] Redondo, Hata, Brocklehurst, and Krangel, "A T-Cell-Specific Transcriptional Enhancer Within the Human T-Cell Receptor. delta. Locus," Science, 247: 1225, 1990.
- [0528] Resendez Jr., Wooden, and Lee, "Identification of highly conserved regulatory domains and protein-binding sites in the promoters of the rat and human genes encoding the stress-inducible 78-kilodalton glucose-regulated protein," Mol. Cell. Biol., 8: 4579, 1988.
- [0529] Reisman and Rotter, "Induced Expression From the Moloney Murine Leukemia Virus Long Terminal Repeat During Differentiation of Human Myeloid Cells is Mediated Through its Transcriptional Enhancer," Mol. Cell. Biol., 9: 3571, 1989.
- [0530] Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., pages 1035-1038 and 1570-1580.
- [0531] Ripe, Lorenzen, Brenner, and Breindl, "Regulatory elements in the 5' flanking region and the first intron contribute to transcriptional control of the mouse alpha-1-type collagen gene," Mol. Cell. Biol., 9: 2224, 1989.
- [0532] Rippe, Brenner and Leffert, "DNA-mediated gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture," Mol. Cell Biol., 10: 689-695, 1990.
- [0533] Rittling, Coutinho, Amarm, and Kolbe, "AP-1/jun-binding Sites Mediate Serum Inducibility of the Human Vimentin Promoter," Nuc. Acids Res., 17: 1619, 1989.
- [0534] Roe, Reynolds, Yu, Brown, "Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis," Embo. J., 12: 2099-2108, 1993.
- [0535] Rosen, Sodroski, and Haseltine, "The location of cis-acting regulatory sequences in the human t-cell lymphotropic virus type III(HTLV-111/LAV) long terminal repeat," Cell, 41: 813, 1988.
- [0536] Sakai, Helms, Carlstedt-Duke, Gustafsson, Rottman, and Yamamoto, "Hormone-Mediated Repression: A Negative Glucocorticoid-Response Element From the Bovine Prolactin Gene," Genes and Dev., 2: 1144, 1988.
- [0537] Sambrook, Fritsch, Maniatis, In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2 rev. ed., Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1 (77): 19-17. 29, 1989.
- [0538] Satake, Furukawa, and Ito, "Biological activities of oligonucleotides spanning the f9 point mutation within the enhancer region of polyoma virus DNA," J. Virology, 62: 970, 1988.
- [0539] Scharfmann, Axelrod, Verma, "Long-term *in vivo* expression of retrovirus-mediated gene transfer in mouse fibroblast implants," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 4626-4630, 1991.
- [0540] Schaffner, Schirm, Muller-Baden, Wever, and Schaffner, "Redundancy of Information in Enhancers as a Principle of Mammalian Transcription Control," J. Mol. Biol., 201: 81, 1988.
- [0541] Schmid, Uittenbogaart, Keld, Giorgi, "A rapid method for measuring apoptosis and dual-colorimmunofluorescence by single laser flow cytometry," J. Immunol. Methods, 170: 145-157, 1994.
- [0542] Searle, Stuart, and Palmiter, "Building a metal-responsive promoter with synthetic regulatory elements," Mol. Cell. Biol., 5: 1480, 1985.
- [0543] Sharp and Marciniak, "HIV Tar: an RNA Enhancer?" Cell, 59: 229, 1989.

- [0544] Shaul and Ben-Levy, "Multiple Nuclear Proteins in Liver Cells are Bound to Hepatitis B Virus Enhancer Element and its Upstream Sequences," *EMBO J.*, 6: 1913, 1987.
- [0545] Sherman, Basta, Moore, Brown, and Ting, "Class II Box Consensus Sequences in the HLA-DR. alpha. Gene: Transcriptional Function and Interaction with Nuclear Proteins," *Mol. Cell. Biol.*, 9: 50, 1989.
- [0546] Sleigh and Lockett, "SV40 Enhancer Activation During Retinoic-Acid-Induced Differentiation of F9 Embryonal Carcinoma Cells," *J. EMBO*, 4: 3831, 1985.
- [0547] Spalholz, Yang, and Howley, "Transactivation of a Bovine Papilloma Virus Transcriptional Regulatory Element by the E2 Gene Product," *Cell*, 42: 183, 1985.
- [0548] Spandau and Lee, "Trans-Activation of Viral Enhancers by the Hepatitis B Virus X Protein," *J. Virology*, 62: 427, 1988.
- [0549] Spandidos and Wilkie, "Host-Specificities of Papilloma Virus, Moloney Murine Sarcoma Virus and Simian Virus 40 Enhancer Sequences," *EMBO J.*, 2: 1193, 1983.
- [0550] Stephens and Hentschel, "The Bovine Papilloma Virus Genome and its Uses as a Eukaryotic Vector," *Biochem. J.*, 248: 1, 1987.
- [0551] Stuart, Searle, and Palmiter, "Identification of Multiple Metal Regulatory Elements in Mouse Metallothionein-I Promoter by Assaying Synthetic Sequences," *Nature*, 317: 828, 1985.
- [0552] Sullivan and Peterlin, "Transcriptional Enhancers in the HLA-DQ Subregion," *Mol. Cell. Biol.*, 7: 3315, 1987.
- [0553] Sutton, Reitsma, Uchida, Brown, "Transduction of human progenitor hematopoietic stem cells by human immunodeficiency virus type 1-based vectors is cell cycle dependent," *J. Virol.*, 73: 3649-3660, 1999.
- [0554] Sutton, Wu, Rigg, Bohnlein, Brown, "Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells," *J. Virol.*, 72: 5781-5788, 1998.
- [0555] Swartzendruber and Lehman, "Neoplastic Differentiation: Interaction of Simian Virus 40 and Polyoma Virus with Murine Teratocarcinoma Cells," *J. Cell. Physiology*, 85: 179, 1975.
- [0556] Takebe, Seiki, Fujisawa, Hoy, Yokota, Arai, Yoshida, and Arai, "SR. alpha. Promoter: An Efficient and Versatile Mammalian cDNA Expression System Composed of the Simian Virus 40 Early Promoter and the RU5 Segment of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Long Terminal Repeat," *Mol. Cell. Biol.*, 8: 466, 1988.
- [0557] Taylor and Kingston, "E1A Trans-Activation of Human HSP70 Gene Promoter Substitution Mutants is Independent of the Composition of Upstream and TATA Elements," *Mol. Cell. Biol.*, 10: 176, 1990.
- [0558] Taylor and Kingston, "Factor Substitution in a Human HSP70 Gene Promoter: TATA-Dependent and TATA-Independent Interactions," *Mol. Cell. Biol.*, 10: 165, 1990.
- [0559] Taylor, Solomon, Weiner, Paucha, Bradley, and Kingston, "Stimulation of the Human Heat-Shock Protein 70 Promoter *in vitro* by Simian Virus 40 Large T Antigen," *J. Biol. Chem.*, 264: 15160, 1989.
- [0560] Tavernier, Gheysen, Duerinck, Can Der Heyden, and Fiers, "Deletion Mapping of the Inducible Promoter of Human IFN-beta Gene," *Nature*, 301: 634, 1983.
- [0561] Thiesen, Bosze, Henry, and Charnay, "A DNA Element Responsible for the Different Tissue Specificities of Friend and Moloney Retroviral Enhancers," *J. Virology*, 62: 614, 1988.
- [0562] Tronche, Rollier, Bach, Weiss, and Yaniv, "The Rat Albumin Promoter: Cooperation with Upstream Elements is Required When Binding of APF/HNF 1 to the Proximal Element is Partially Impaired by Mutation or Bacterial Methylation," *Mol. Cell. Biol.*, 9: 4759, 1989.
- [0563] Tronche, Rollier, Herbomel, Bach, Cereghini, Weiss, and Yaniv, "Anatomy of the Rat Albumin Promoter," *Mol. Biol. Med.*, 7: 173, 1990.

- [0564] Trudel and Constantini, "A 3' Enhancer Contributes to the Stage-Specific Expression of the human Beta-Globin Gene," *Genes and Dev.*, 6: 954, 1987.
- [0565] Tsumaki et al., "Modular arrangement of cartilage- and neural tissue-specific cis-elements in the mouse alpha2 (XI) collagen promoter," *J Biol Chem.* 273 (36): 22861-22864, 1998.
- [0566] Tur-Kaspa, Teicher, Levine, Skoultchi and Shafritz, "Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes," *Mol. Cell Biol.*, 6: 716-718, 1986.
- [0567] Tyndall, La Mantia, Thacker, Favalaro, and Kamen, "A Region of the Polyoma Virus Genome Between the Replication Origin and Late Protein-Coding Sequences is Required in cis for Both Early Gene Expression and Viral DNA Replication," *Nuc. Acids. Res.*, 9: 6231, 1981.
- [0568] Uchida, Sutton; Frieria, He, Reitsma, Chang, Veres, Scollay, Weissman, "HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 11939-11944, 1998.
- [0569] Ueda, Tsuji, Yoshino, Ebihara, Yagasaki, Hisakawa, Mitsui, Manabe, Tanaka, Kobayashi, Ito, Yasukawa, Nakahata, "Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor," *J. Clin. Invest.*, 105: 1013-1021, 2000.
- [0570] Unutmaz, Kewal, Ramani, Marmon, Littman, "Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes," *J Exp. Med.*, 189: 1735-1746, 1999.
- [0571] Valsamakis, Schek, Alwine, "Elements upstream of the AAUAAA within the human immunodeficiency virus polyadenylation signal are required for efficient polyadenylation *in vitro*," *Mol. Cell Biol.*, 12: 3699-3705, 1992.
- [0572] Valsamakis, Zeichner, Carswell, Alwine, "The human immunodeficiency virus type 1 polyadenylation signal: a 3' long terminal repeat element upstream of the AAUAAA necessary for efficient polyadenylation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2108-2112, 1991.
- [0573] Vannice and Levinson, "Properties of the Human Hepatitis B Virus Enhancer: Position Effects and Cell-Type Nonspecificity," *J. Virology*, 62: 1305, 1988.
- [0574] Vasseur, Kress, Montreau, and Blangy, "Isolation and Characterization of Polyoma Virus Mutants Able to Develop in Multipotential Murine Embryonal Carcinoma Cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 1068, 1980.
- [0575] Wang and Calame, "SV40 enhancer-binding factors are required at the establishment but not the maintenance step of enhancer-dependent transcriptional activation," *Cell*, 47: 241, 1986.
- [0576] Watanabe et al., "Gene transfection of mouse primordial germ cells *in vitro* and analysis of their survival and growth control," *Experimental Cell Research*, 230: 76-83, 1997.
- [0577] Weber, De Villiers, and Schaffner, "An SV40' Enhancer Trap' Incorporates Exogenous Enhancers or Generates Enhancers From its Own Sequences," *Cell*, 36: 983, 1984.
- [0578] Weinberger, Jat, and Sharp, "Localization of a Repressive Sequence Contributing to B-cell Specificity in the Immunoglobulin Heavy-Chain Enhancer," *Mol. Cell. Biol.*, 8: 988, 1984.
- [0579] Winoto and Baltimore, "αβ-lineage-specific Expression of the α T-Cell Receptor Gene by Nearby Silencers," *Cell*, 59: 649, 1989.
- [0580] Wu et al., "Promoter-dependent tissue-specific expressive nature of imprinting gene, insulin-like growth factor II, in human tissues," *Biochem Biophys Res Commun.* 233(1): 221-226, 1997.
- [0581] Wu, Wakefield, Liu, Xiao, Kralovics, Prchal, Kappes, "Development of a novel trans-lentiviral vector that affords predictable safety," *Mol. Ther.* 2: 47-55, 2000.
- [0582] Yang, Burkholder, Roberts, Martinell and McCabe, "*In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian

somatic cells by particle bombardment," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 9568-9572, 1990.

- [0583] Yutzey, Kline, and Konieczny, "An Internal Regulatory Element Controls Troponin I Gene Expression," Mol. Cell. Biol., 9: 1397, 1989.
- [0584] Zennou, Petit, Guetard, Nerhbass, Mantagnier, Charneau, "HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap," Cell 101: 173-185, 2000.
- [0585] Zhao-Emonet et al., "The equine herpes virus 4 thymidine kinase is a better suicide gene than the human herpes virus 1 thymidine kinase," Gene Ther. 6 (9): 1638-1642, 1999.
- [0586] Zufferey, Nagy, Mandel, Naldini, Trono, "Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*," Nat. Biotechnol., 15: 871-875, 1997.
- [0587] Zufferey, Dull, Mandel, Bukovsky, Quiroz, Naldini, Trono, "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery," J. Virol., 72: 9873-9880, 1998.
- [0588] Zufferey, Donello, Trono, Hope, "Woodchuck hepatitis virus post transcriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors," J. Virol, 73: 2886-2892, 1999.
- [0589] Zufferey and Trono, Current Protocols in Neuroscience: unit 4. 21: "High-titer production of lentiviral vectors," John Wiley & Sons, New York, 2000.

도면의 간단한 설명

- [0146] 이하의 도면은 본 명세서의 일부를 형성하며, 본 발명의 특정한 면을 보다 명확히 예증하기 위하여 포함된다. 본원에 개시된 특정 일면들의 상세한 설명과 관련하여 첨부된 도면을 참조함으로써 본 발명을 보다 잘 이해할 수 있을 것이다.
- [0147] 도 1A. SIVmac251 유래의 벡터 제작. SIVmac의 감염성 분자 클론의 게놈(SIVmac251).
- [0148] 도 1B. SIVmac251은 운반 벡터를 함유하는 구조체 및 포장 기능부를 코딩하는 구조체를 유도하는 데 사용되었다. 또한, 다양한 바이러스 당단백질(GP)을 발현시키는 발현 구조체를 설계하였다. 상기 검은색 박스는 상기 바이러스 유전자를 나타낸다. 흰색 박스는 시스-작용 서열을 나타낸다. LTR, 긴 말단 반복부(긴 말단 반복부); CMV, 인간 사이토메갈로바이러스 매개의 초기 프로모터(cytomegalovirus immediate-early promoter); PBS, 프라이머 결합 부위; MSD, 주된 스플라이싱 도너 부위(주요 splice donor site); T, 포장 서열; RRE, Rev-반응성 요소; PHMG, 3-하이드록시-3-메틸글루타릴 조효소 A 리덕타제(HMG) 프로모터; 폴리A, 폴리아데닐화 부위; SD, 스플라이싱 도너 부위; SA, 스플라이싱 억셉터 부위; SV40, 원숭이 바이러스 40 초기 프로모터. 벡터 미립은 상기 포장 기능부, 바이러스 당단백질 및 운반 벡터를 함유하는 플라스미드의 293T 세포 내로의 공트랜스펙션을 통해 제조하였다. 일시적 발현 기간 동안 트랜스펙션된 세포의 상청액을 수집한 뒤, 초원심분리를 통해 농축하여, 표적 세포 형질도입에 사용하였다.
- [0149] 도 2a. 상이한 바이러스 당단백질로써 슈도타입화된 SIVmac 유래의 벡터의 감염 역치. 레트로바이러스 또는 비-레트로바이러스(별표) 기원의 표지된 GP를 이용해 GFP 마커 유전자를 함유하는 벡터를 제작하였다. EboV, 에볼라 바이러스; FPV-HA, 가금류 전염병 바이러스의 헤마글루티닌; GALV, 기본 원숭이 백혈병 바이러스; MLV-A, 양향성(amphotropic) 설치류 백혈병 바이러스; LCMV, 림프구 맥락 수막염(choriomeningitis) 바이러스; VSV, 소포성 구내염 바이러스. TE671 표적 세포에 비농축 벡터 제제의 희석액을 감염시키고, 감염 후 3일 뒤에 GFP-양성 세포의 퍼센트를 측정하였다. 감염 역치를 GFP i.u./ml 단위로 산출하였다. 중복 실험에서, FPV-HA를 발현시키는 벡터 생산자 세포에 2U의 클로스트리듐 페르프링겐스(*Clostridium perfringens*) 뉴라미니다제(neuraminidase)(Sigma-Aldrich, France)를 24시간 동안 처리하여, 생산자 세포의 표면으로부터 HA-슈도타입화된 미립의 방출을 유도하였다(FPV-HA + NA).
- [0150] 도 2b. RD114 당단백질의 세포질 도메인이 MLV-A GP의 세포질 도메인으로 대체된 RD114/TR 키메라 GP의 개략도. 3개의 위상적 도메인, 즉 외부 도메인, 막관통 도메인, 및 세포질 테일 도메인을 나타낸다. GALV/TR 키메라 GP를 유사한 방식으로 변형시켰다.
- [0151] 도 2C. 항-RD114 SU 및 항-CA 항체를 이용해 20% 수크로오스 쿠션 중에서 펠릿화된 SIV 벡터 미립의 면역블록을 통해 비리온 내의 RD114 및 RD114/TR GP의 혼입을 평가하였다. 분자 중량 마커의 위치를 나타낸다(kDa).

- [0152] 도 3A. 슈도타입화된 SIV계 벡터 모액의 특정화. 소정의 GP로써 슈도타입화되고 초원심분리를 통해 농축된 SIVmac계 벡터 모액의 감염 역치. TE671 표적 세포에 대해 실시한 9회의 개별 실험으로부터 얻어진 평균 역치 \pm SD를 나타낸다.
- [0153] 도 3B. (B) 항-SIV-CA(캡시드) 항체를 이용해 대표적인 정제 벡터 모액을 면역블로딩하여 물리적 미립을 검출하였다.
- [0154] 도 4A. 인간 혈청 내에서의 슈도타입화된 SIV-벡터 비리온의 안정성. 감염성의 슈도타입화된 SIV-벡터 미립 (50 μ l 현탁액 버퍼 내의 50,000 GFP i.u.)을 50 μ l의 신선한(대시 표시된 막대) 또는 가열-불활성화된(검은색 막대) 인간 혈청과 혼합하였다. 참조군으로서, 비리온을 50 μ l의 가열-불활성화된 태아 소 혈청(FCS)과 혼합하였다. 비리온/혈청 혼합물을 37°C에서 1시간 동안 배양한 뒤, 이를 이용해 TE671 표적 세포를 형질도입시켰다. 수치는 FCS(%) 내에서 배양된 동일한 비리온의 역치에 대한 영장류 혈청 내에서 배양된 비리온의 역치 퍼센트를 나타낸다. 3개의 상이한 개별 도너의 혈청을 이용해 실시한 실험의 결과를 나타낸다. 인간 혈청 #659를 이용해 3회의 중복 실험을 실시하고, 그 결과를 평균값 \pm SD로서 나타냈다.
- [0155] 도 4B. 마카크 원숭이 혈청 내에서의 슈도타입화된 SIV-벡터 비리온의 안정성. 감염성의 슈도타입화된 SIV-벡터 미립(50 μ l 현탁액 버퍼 내의 50,000 GFP)을 50 μ l의 신선한(대시 표시된 막대) 또는 가열-불활성화된(검은색 막대) 마카크 원숭이 혈청과 혼합하였다. 참조군으로서, 비리온을 50 μ l의 가열-불활성화된 태아 소 혈청(FCS)과 혼합하였다. 비리온/혈청 혼합물을 37°C에서 1시간 동안 배양한 뒤, 이를 이용해 TE671 표적 세포를 형질도입시켰다. 수치는 FCS(%) 내에서 배양된 동일한 비리온의 역치에 대한 영장류 혈청 내에서 배양된 비리온의 역치 퍼센트를 나타낸다. 3개의 상이한 개별 도너의 혈청으로 실시한 실험의 결과를 나타낸다. 인간 혈청 #659를 이용해 3회의 중복 실험을 실시하고, 그 결과를 평균값 \pm SD로서 나타냈다.
- [0156] 도 5a. 인간 및 마카크 원숭이 CD34⁺ 세포의 형질도입. 인간 동원 혈액으로부터 유래된 CD34⁺ 세포를 TPO와 함께 하룻밤 배양하여 사전-자극한 뒤, VSV-G(삼각형), MLV-A GP(검은색 원), GALV/TR GP(흰색 원) 또는 RD114/TR GP(검은색 사각형)로써 슈도타입화된 SIV-벡터를 이용해 다양한 복수 감염(MOI)을 통해 형질도입시켰다. 각각의 CD34⁺ 세포 샘플에 대하여, 플레이트 상에 코팅된 CH-296 레트로벡틴 폴리펩타이드의 존재 또는 부재 하에, 형질도입을 2회 중복 실시하였다. 감염 후, 세포를 PBS로 세척한 뒤, Flt3-L, TPO, 및 SCF의 존재 하에 3일 동안 배양하여, 형질도입 효율을 평가하였다. 대표적인 실험의 용량-반응 곡선은 동일한 CD34⁺ 세포의 배치, 및 상이한 슈도타입화된 벡터의 모액 및 도너로부터 유래된 CD34⁺ 세포를 이용해 실시한 적어도 4회 실험의 최대 형질도입 효율의 통계학적 분석 결과를 나타낸다.
- [0157] 도 5b. 인간 및 마카크 원숭이 CD34⁺ 세포의 형질도입. 사이노몰구스(cynomolgus) 마카크 원숭이 골수로부터 유래된 CD34⁺ 세포를 TPO와 함께 하룻밤 배양하여 사전-자극한 뒤, VSV-G(삼각형), MLV-A GP(검은색 원), GALV/TR GP(흰색 원) 또는 RD114/TR GP(검은색 사각형)로써 슈도타입화된 SIV-벡터를 이용해 다양한 복수 감염(MOI)을 통해 형질도입시켰다. 각각의 CD34⁺ 세포 샘플에 대하여, 플레이트 상에 코팅된 CH-296 레트로벡틴 폴리펩타이드의 존재 또는 부재 하에, 형질도입을 2회 중복 실시하였다. 감염 후, 세포를 PBS로 세척한 뒤, Flt3-L, TPO, 및 SCF의 존재 하에 3일 동안 배양하여, 형질도입 효율을 평가하였다. 대표적인 실험의 용량-반응 곡선은 동일한 CD34⁺ 세포의 배치, 및 상이한 슈도타입화된 벡터의 모액 및 도너로부터 유래된 CD34⁺ 세포를 이용해 실시한 적어도 4회 실험의 최대 형질도입 효율의 통계학적 분석 결과를 나타낸다.
- [0158] 도 6a. 인간 말초 혈액 림프구의 형질도입. 인간 기원의 말초 혈액 림프구(PBL)를 소정의 SIV-벡터 슈도타입을 이용해 다양한 복수 감염(MOI)을 통해 형질도입시켰다. 인간 PBL를 가용성 항-CD3 및 항-CD28 항체를 이용해 24시간 동안 활성화하였다. 마카크 원숭이 PBL를 감염 전 2일 동안 콘카나발린 A 및 rhIL2를 이용해 활성화하였다. 활성화된 PBL를 VSV-G(삼각형), MLV-A GP(검은색 원), GALV/TR GP(흰색 원) 또는 RD114/TR GP(검은색 사각형)로써 슈도타입화된 SIV 벡터를 세포에 감염시켰다. 감염된 세포를 PBS로 세척한 뒤, PBL 배지 내에서 배양하고, 감염 후 5일 뒤에 형질도입 효율을 평가하였다. 상이한 도너 유래의 PBL을 이용해 실시한 실험의 결과, 및 상이한 슈도타입화된 벡터의 모액 및 도너로부터 유래된 PBL 세포를 이용해 실시한 적어도 4회 실험의 최대 형질도입 효율의 통계학적 분석 결과를 나타낸다.
- [0159] 도 6b. 마카크 원숭이 말초 혈액 림프구의 형질도입. 사이노몰구스 마카크 원숭이 기원의 말초 혈액 림프구(PBL)를 소정의 SIV-벡터 슈도타입을 이용해 다양한 복수 감염(MOI)을 통해 형질도입시켰다. 인간 PBL를 가용

성 항-CD3 및 항-CD28 항체를 이용해 24시간 동안 활성화하였다. 마카크 원숭이 PBL를 감염 전 2일 동안 콘카 나발린 A 및 rhIL2를 이용해 활성화하였다. 활성화된 PBL를 VSV-G(삼각형), MLV-A GP(검은색 원), GALV/TR GP(흰색 원) 또는 RD114/TR GP(검은색 사각형)로써 슈도타입화된 SIV 벡터를 세포에 감염시켰다. 감염된 세포를 PBS로 세척한 뒤, PBL 배지 내에서 배양하고, 감염 후 5일 뒤에 형질도입 효율을 평가하였다. 상이한 도너 유래의 PBL을 이용해 실시한 실험의 결과, 및 상이한 슈도타입화된 벡터의 모액 및 도너로부터 유래된 PBL 세포를 이용해 실시한 적어도 4회 실험의 최대 형질도입 효율의 통계학적 분석 결과를 나타낸다.

[0160] 도 7A. RD114 GP 세포질-테일 돌연변이. RD114 GP TM 서브유닛과 타입 C(MLV-A) 또는 타입 D(메이슨-프리지 원숭이 바이러스(Mason-Pfizer monkey virus; MPMV)) 포유류 레트로바이러스 Env 당단백질의 TM의 배열. (:)은 RD114의 아미노산과 비교하여, MLV-A 및 MPMV TM 내의 동일한 아미노산을 나타낸다. 지방족 잔기 I, L 또는 V; 양전하를 띠는 잔기 K 또는 R; 및 음전하를 띠는 잔기 D 또는 E와 같은 보존된 아미노산을 강조 표시하였다. 상이한 GP의 막관통 도메인(M)은 박스 표시하였다. 세포질 테일은 2개의 구획으로 형성된다: 바이러스 코어 프로테아제에 의해 GP 카르복시-말단(R)의 제거 후 비리온에서 발견된 성숙한 GP의 테일(T). 프로테아제 절단 부위(박스 표시) 및 YXXL 세포내 이입 모티프(밑줄 표시)는 상이한 GP에 나타난다.

[0161] 도 7B. RD114 GP 내에서 변형된 카르복시-말단의 서열은 각각의 돌연변이에 대하여 밑줄 표시하였다. 단지 상이한 키메라 GP의 막관통 도메인만을 박스 표시하였다. (*)는 RDRless 키메라 GP 내에 삽입된 조기 정지 코돈의 위치를 나타낸다. (')는 바이러스 코어 프로테아제에 의해 매개되는 절단 위치를 나타낸다.

[0162] 도 8. 합포체 평가 결과. 2 cm² 웰 내에 시딩된 트랜스펙션된 세포 내의 합포체의 개수를 계수하여 측정된 GP 키메라의 세포-세포 방추원성. 트랜스펙션된 세포(GP 비함유)를 이용해, 합포체(substracted here)의 바탕 개수를 측정하였다. 데이터는 3회의 독립된 실험의 결과를 나타낸다.

[0163] 도 9A. 벡터 슈도타입의 감염성. 소정의 GP 돌연변이로써 슈도타입화된 MLV 벡터의 감염성(GFP i.u./ml 단위). 그래프는 4회의 독립된 실험의 평균±SD를 나타낸다. MLV-A GP 또는 VSV-G로써 슈도타입화된 벡터를 이용해 얻은 결과 또한 비교를 위하여 나타낸다.

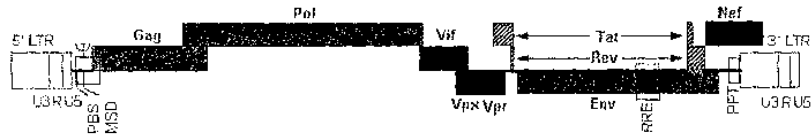
[0164] 도 9B. 벡터 슈도타입의 감염성. 소정의 GP 돌연변이로써 슈도타입화된 SIV 벡터의 감염성(GFP i.u./ml 단위). 그래프는 4회의 독립된 실험의 평균±SD를 나타낸다. MLV-A GP 또는 VSV-G로써 슈도타입화된 벡터를 이용해 얻은 결과 또한 비교를 위하여 나타낸다.

도면

도면1

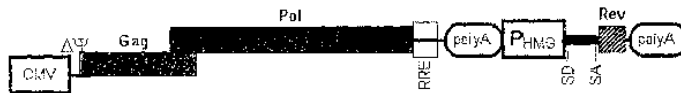
A:

SIVmac251 (어버이 렌티바이러스 게놈)

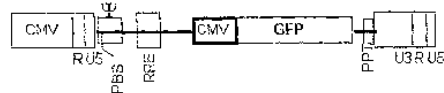


B:

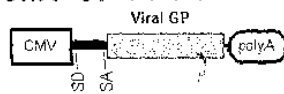
pSIV-12 (SIVmac Gag-Pol 발현 구조체)



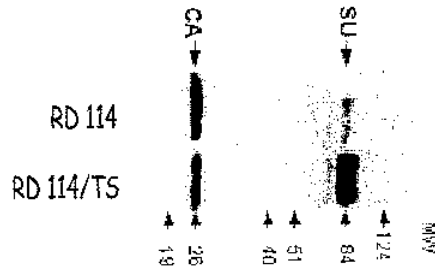
pSIV-T1+ (SIVmac 운반체 벡터 구조체)



phCMV-GP (바이러스 GP 발현 구조체)

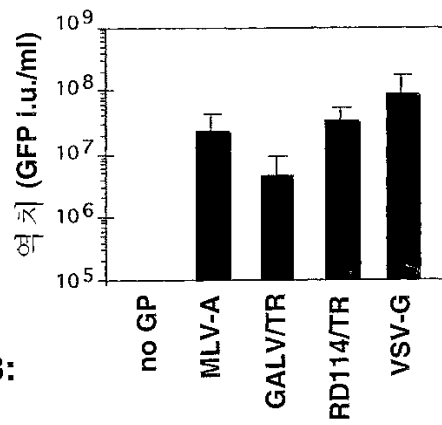


도면2c



도면3

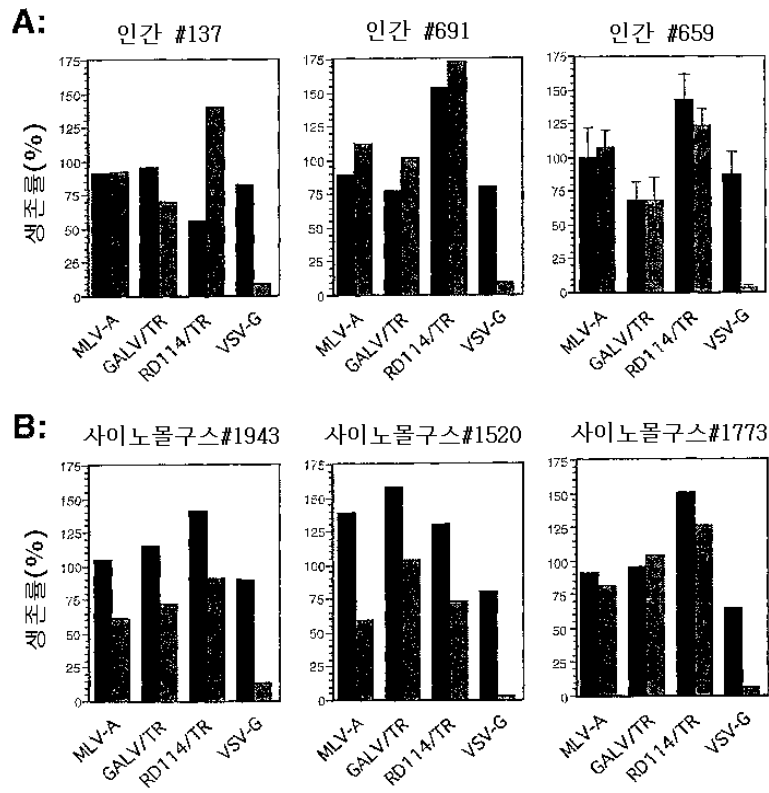
A:



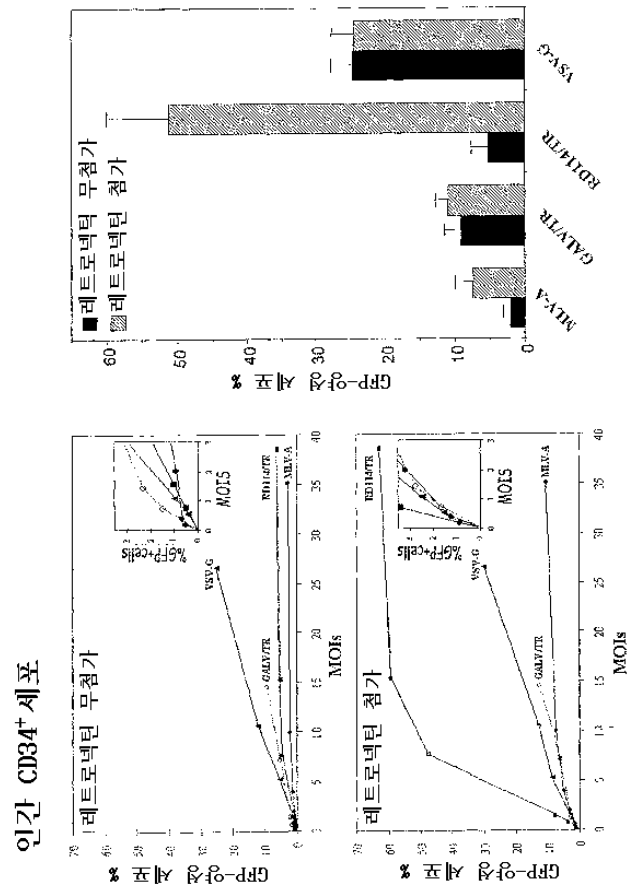
B:



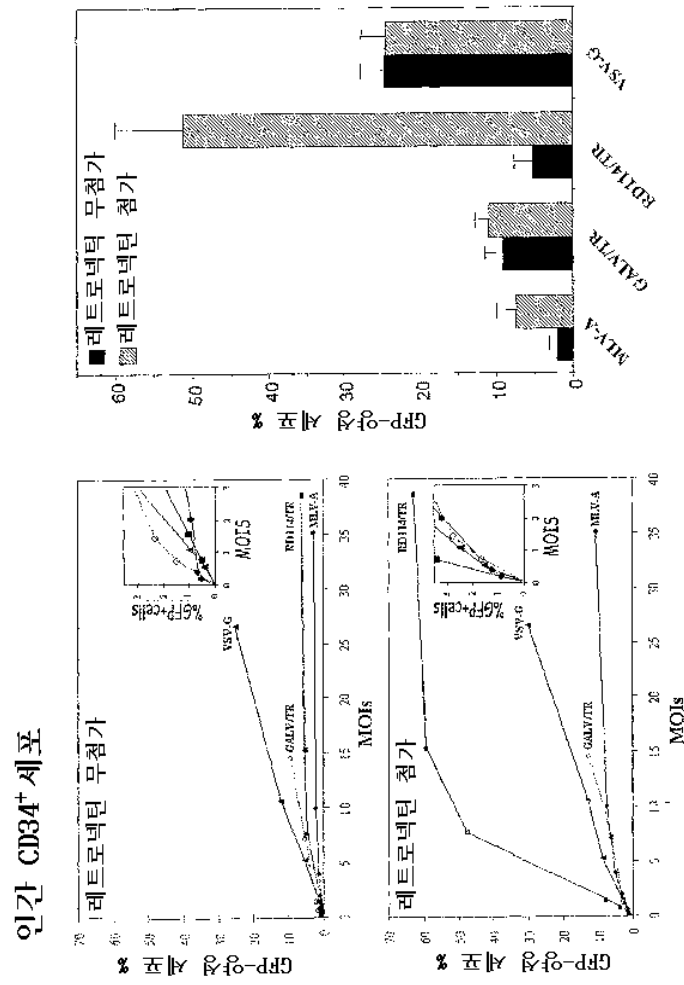
도면4



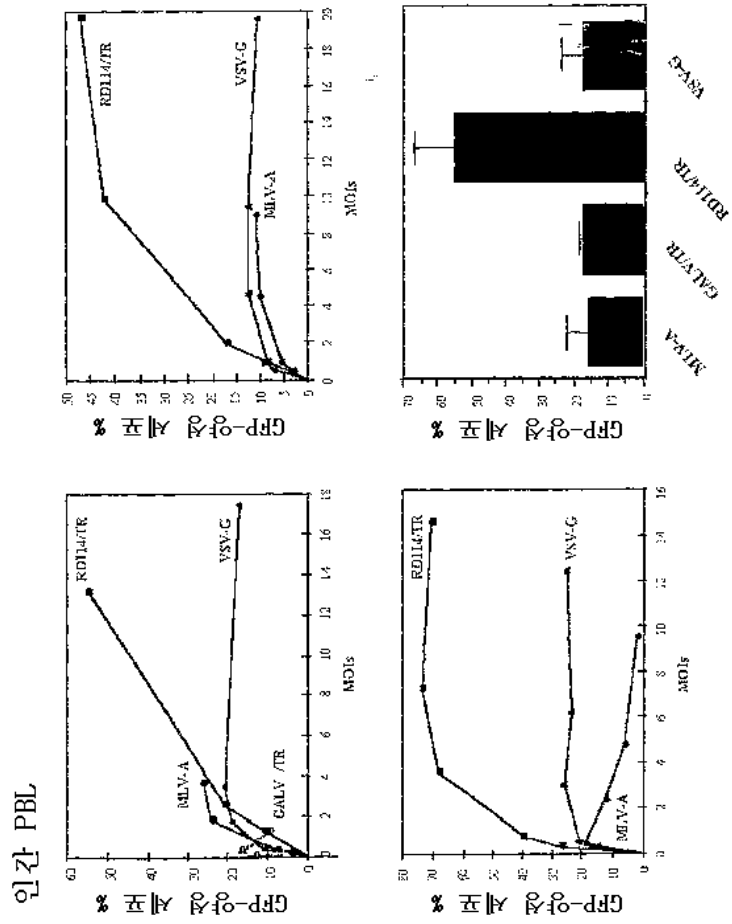
도면5a



도면5b

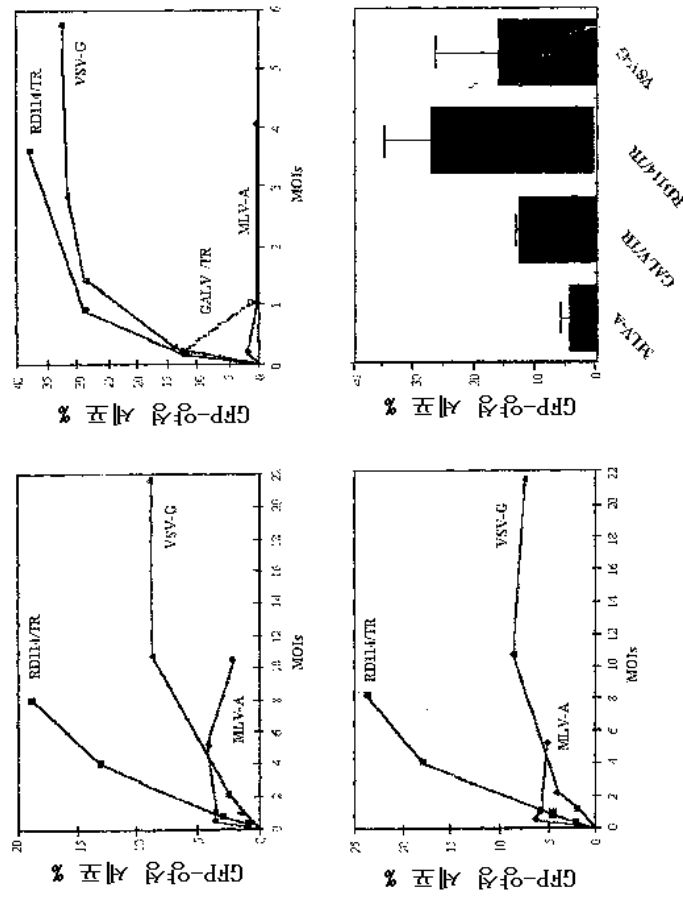


도면6a

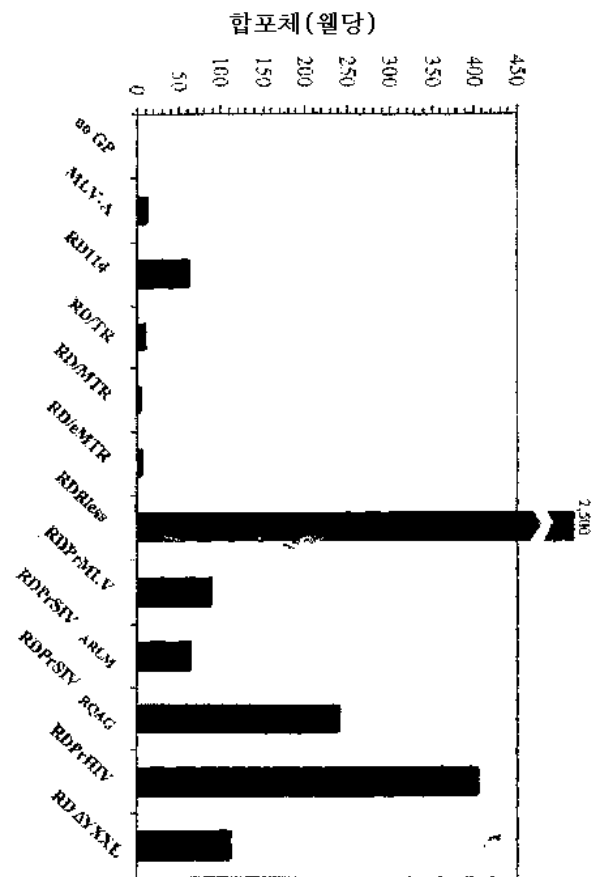


도면6b

사이노물구스 PBL

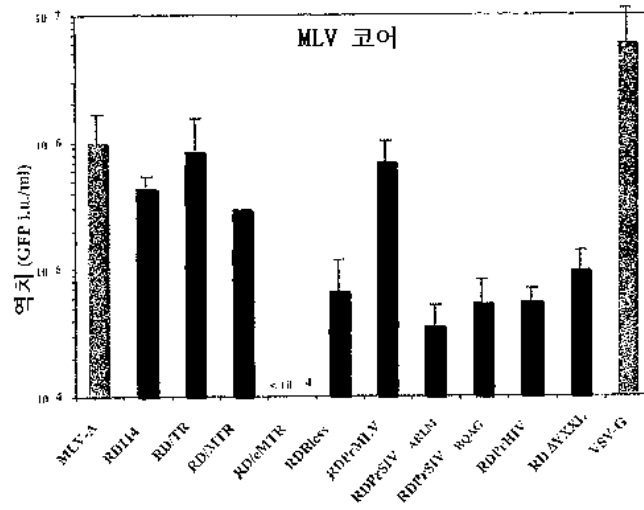


도면8

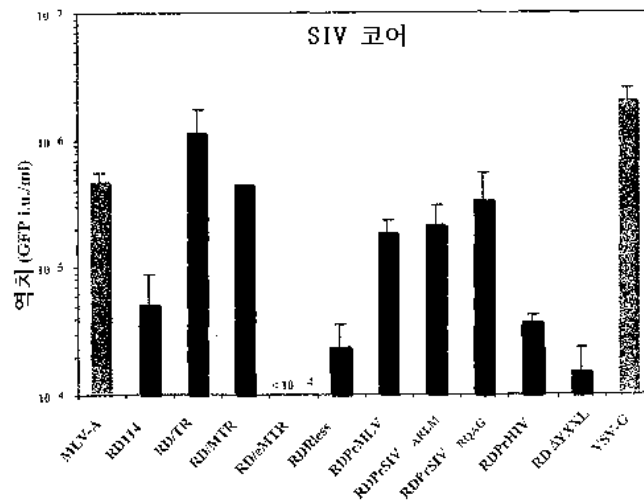


도면9

A:



B:



서열목록

<110> TRONO, DIDIER
 COSSET, Francois-Loic
 SANDRIN, Virginia
 BOSON, Bertrand
 NEGRE, Didier

<120> IMPROVED CHIMERIC GLYCOPROTEINS AND PSEUDOTYPED LENTIVIRAL VECTORS

<130> CLFR:016W0

<140> UNKNOWN

<141> 2003-04-25

<150> 60/375,654

<151> 2002-26-04

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1689

<212> DNA

<213> Chimaera sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1689)

<400> 1

atg aaa ctc cca aca gga atg gtc att tta tgt agc cta ata ata gtt 48
 Met Lys Leu Pro Thr Gly Met Val Ile Leu Cys Ser Leu Ile Ile Val
 1 5 10 15

cgg gca ggg ttt gac gac ccc cgc aag gct atc gca tta gta caa aaa 96
 Arg Ala Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Ala Leu Val Gln Lys
 20 25 30

caa cat ggt aaa cca tgc gaa tgc agc gga ggg cag gta tcc gag gcc 144
 Gln His Gly Lys Pro Cys Glu Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Ala
 35 40 45

cca ccg aac tcc atc caa cag gta act tgc cca ggc aag acg gcc tac 192
 Pro Pro Asn Ser Ile Gln Gln Val Thr Cys Pro Gly Lys Thr Ala Tyr
 50 55 60

tta atg acc aac caa aaa tgg aaa tgc aga gtc act cca aaa atc tca 240
 Leu Met Thr Asn Gln Lys Trp Lys Cys Arg Val Thr Pro Lys Ile Ser
 65 70 75 80

cct agc ggg gga gaa ctc cag aac tgc ccc tgt aac act ttc cag gac 288
 Pro Ser Gly Gly Glu Leu Gln Asn Cys Pro Cys Asn Thr Phe Gln Asp
 85 90 95

tcg atg cac agt tct tgt tat act gaa tac cgg caa tgc agg cga att 336
 Ser Met His Ser Ser Cys Tyr Thr Glu Tyr Arg Gln Cys Arg Arg Ile

100	105	110	
aat aag aca tac tac acg gcc acc ttg ctt aaa ata cgg tct ggg agc			384
Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lye Ile Arg Ser Gly Ser			
115	120	125	
ctc aac gag gta cag ata tta caa aac ccc aat cag ctc cta cag tcc			432
Leu Asn Glu Val Gln Ile Leu Gln Asn Pro Asn Gln Leu Leu Gln Ser			
130	135	140	
cct tgt agg ggc tct ata aat cag ccc gtt tgc tgg agt gcc aca gcc			480
Pro Cys Arg Gly Ser Ile Asn Gln Pro Val Cys Trp Ser Ala Thr Ala			
145	150	155	160
ccc atc cat atc tcc gat ggt gga gga ccc ctc gat act aag aga gtg			528
Pro Ile His Ile Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Lys Arg Val			
165	170	175	
tgg aca gtc caa aaa agg cta gaa caa att cat aag gct atg act cct			576
Trp Thr Val Gln Lys Arg Leu Glu Gln Ile His Lys Ala Met Thr Pro			
180	185	190	
gaa ctt caa tac cac ccc tta gcc ctg ccc aaa gtc aga gat gac ctt			624
Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Leu Pro Lys Val Arg Asp Asp Leu			
195	200	205	
agc ctt gat gca cgg act ttt gat atc ctg aat acc act ttt agg tta			672
Ser Leu Asp Ala Arg Thr Phe Asp Ile Leu Asn Thr Thr Phe Arg Leu			
210	215	220	
ctc cag atg tcc aat ttt agc ctt gcc caa gat tgt tgg ctc tgt tta			720
Leu Gln Met Ser Asn Phe Ser Leu Ala Gln Asp Cys Trp Leu Cys Leu			
225	230	235	240
aaa cta ggt acc cct acc cct ctt gcg ata ccc act ccc tct tta acc			768
Lys Leu Gly Thr Pro Thr Pro Leu Ala Ile Pro Thr Pro Ser Leu Thr			
245	250	255	
tac tcc cta gca gac tcc cta gcg aat gcc tcc tgt cag att ata cct			816
Tyr Ser Leu Ala Asp Ser Leu Ala Asn Ala Ser Cys Gln Ile Ile Pro			
260	265	270	
ccc ctc ttg gtt caa ccg atg cag ttc tcc aac tcg tcc tgt tta tct			864
Pro Leu Leu Val Gln Pro Met Gln Phe Ser Asn Ser Ser Cys Leu Ser			
275	280	285	

tcc cct ttc att aac gat acg gaa caa ata gac tta ggt gca gtc acc 912
 Ser Pro Phe Ile Asn Asp Thr Glu Gln Ile Asp Leu Gly Ala Val Thr
 290 295 300

ttt act aac tgc acc tct gta gcc aat gtc agt agt cct tta tgt gcc 960
 Phe Thr Asn Cys Thr Ser Val Ala Asn Val Ser Ser Pro Leu Cys Ala
 305 310 315 320

cta aac ggg tca gtc ttc ctc tgt gga aat aac atg gca tac acc tat 1008
 Leu Asn Gly Ser Val Phe Leu Cys Gly Asn Asn Met Ala Tyr Thr Tyr
 325 330 335

tta ccc caa aac tgg acc aga ctt tgc gtc caa gcc tcc ctc ctc ccc 1056
 Leu Pro Gln Asn Trp Thr Arg Leu Cys Val Gln Ala Ser Leu Leu Pro
 340 345 350

gac att gac atc aac ccg ggg gat gag cca gtc ccc att cct gcc att 1104
 Asp Ile Asp Ile Asn Pro Gly Asp Glu Pro Val Pro Ile Pro Ala Ile
 355 360 365

gat cat tat ata cat aga cct aaa cga gct gta cag ttc atc cct tta 1152
 Asp His Tyr Ile His Arg Pro Lys Arg Ala Val Gln Phe Ile Pro Leu
 370 375 380

cta gct gga ctg gga atc acc gca gca ttc acc acc gga gct aca ggc 1200
 Leu Ala Gly Leu Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr Thr Gly Ala Thr Gly
 385 390 395 400

cta ggt gtc tcc gtc acc cag tat aca aaa tta tcc cat cag tta ata 1248
 Leu Gly Val Ser Val Thr Gln Tyr Thr Lys Leu Ser His Gln Leu Ile
 405 410 415

tct gat gtc caa gtc tta tcc ggt acc ata caa gat tta caa gac cag 1296
 Ser Asp Val Gln Val Leu Ser Gly Thr Ile Gln Asp Leu Gln Asp Gln
 420 425 430

gta gac tcg tta gct gaa gta gtt ctc caa aat agg agg gga ctg gac 1344
 Val Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp
 435 440 445

cta cta acg gca gaa caa gga gga att tgt tta gcc tta caa gaa aaa 1392
 Leu Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys Leu Ala Leu Gln Glu Lys
 450 455 460

tgc tgt ttt tat gct aac aag tca gga att gtg aga aac aaa ata aga 1440
 Cys Cys Phe Tyr Ala Asn Lys Ser Gly Ile Val Arg Asn Lys Ile Arg
 465 470 475 480

acc cta caa gaa gaa tta caa aaa cgc agg gaa agc ctg gca acc aac 1488
 Thr Leu Gln Glu Glu Leu Gln Lys Arg Arg Glu Ser Leu Ala Thr Asn
 485 490 495

cct ctc tgg acc ggg ctg cag ggc ttt ctt ccg tac ctc cta cct ctc 1536
 Pro Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Phe Leu Pro Tyr Leu Leu Pro Leu
 500 505 510

ctg gga ccc cta ctc acc ctc cta ctc ata cta acc att ggg cca tgc 1584
 Leu Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Ile Leu Thr Ile Gly Pro Cys
 515 520 525

gtt ttc aat cga tta gtt caa ttt gtt aaa gac agg atc tca gta gtc 1632
 Val Phe Asn Arg Leu Val Gln Phe Val Lys Asp Arg Ile Ser Val Val
 530 535 540

cag gct tta gtc ctg act caa caa tac cac cag cta aaa cca cta gaa 1680
 Gln Ala Leu Val Leu Thr Gln Gln Tyr His Gln Leu Lys Pro Leu Glu
 545 550 555 560

tac gag cca 1689
 Tyr Glu Pro

- <210> 2
- <211> 563
- <212> PRT
- <213> Chimaera sp.

<400> 2
 Met Lys Leu Pro Thr Gly Met Val Ile Leu Cys Ser Leu Ile Ile Val
 1 5 10 15

Arg Ala Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Ala Leu Val Gln Lys
 20 25 30

Gln His Gly Lys Pro Cys Glu Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Ala
 35 40 45

Pro Pro Asn Ser Ile Gln Gln Val Thr Cys Pro Gly Lys Thr Ala Tyr
 50 55 60

Leu Met Thr Asn Gln Lys Trp Lys Cys Arg Val Thr Pro Lys Ile Ser
 65 70 75 80

Pro Ser Gly Gly Glu Leu Gln Asn Cys Pro Cys Asn Thr Phe Gln Asp
 85 90 95

Ser Met His Ser Ser Cys Tyr Thr Glu Tyr Arg Gln Cys Arg Arg Ile
 100 105 110

Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Ser
 115 120 125

Leu Asn Glu Val Gln Ile Leu Gln Asn Pro Asn Gln Leu Leu Gln Ser
 130 135 140

Pro Cys Arg Gly Ser Ile Asn Gln Pro Val Cys Trp Ser Ala Thr Ala
 145 150 155 160

Pro Ile His Ile Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Lys Arg Val
 165 170 175

Trp Thr Val Gln Lys Arg Leu Glu Gln Ile His Lys Ala Met Thr Pro
 180 185 190

Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Leu Pro Lys Val Arg Asp Asp Leu
 195 200 205

Ser Leu Asp Ala Arg Thr Phe Asp Ile Leu Asn Thr Thr Phe Arg Leu
 210 215 220

Leu Gln Met Ser Asn Phe Ser Leu Ala Gln Asp Cys Trp Leu Cys Leu
 225 230 235 240

Lys Leu Gly Thr Pro Thr Pro Leu Ala Ile Pro Thr Pro Ser Leu Thr
 245 250 255

Tyr Ser Leu Ala Asp Ser Leu Ala Asn Ala Ser Cys Gln Ile Ile Pro

Thr Leu Gln Glu Glu Leu Gln Lys Arg Arg Glu Ser Leu Ala Thr Asn
 485 490 495

Pro Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Phe Leu Pro Tyr Leu Leu Pro Leu
 500 505 510

Leu Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Ile Leu Thr Ile Gly Pro Cys
 515 520 525

Val Phe Asn Arg Leu Val Gln Phe Val Lys Asp Arg Ile Ser Val Val
 530 535 540

Gln Ala Leu Val Leu Thr Gln Gln Tyr His Gln Leu Lys Pro Leu Glu
 545 550 555 560

Tyr Glu Pro

<210> 3
 <211> 2058
 <212> DNA
 <213> Chimaera sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (2058)

<400> 3
 atg gta ttg ctg cct ggg tcc atg ctt ctc acc tca aac ctg cac cac 48
 Met Val Leu Leu Pro Gly Ser Met Leu Leu Thr Ser Asn Leu His His
 1 5 10 15

ctt cgg cac cag atg agt cct ggg agc tgg aaa aga ctg atc atc ctc 96
 Leu Arg His Gln Met Ser Pro Gly Ser Trp Lys Arg Leu Ile Ile Leu
 20 25 30

tta agc tgc gta ttc ggc ggc ggc ggg acg agt ctg caa aat aag aac 144
 Leu Ser Cys Val Phe Gly Gly Gly Thr Ser Leu Gln Asn Lys Asn
 35 40 45

ccc cac cag ccc atg acc ctc act tgg cag gta ctg tcc caa act gga 192
 Pro His Gln Pro Met Thr Leu Thr Trp Gln Val Leu Ser Gln Thr Gly
 50 55 60

gac gtt gtc tgg gat aca aag gca gtc cag ccc cct tgg act tgg tgg 240
 Asp Val Val Trp Asp Thr Lys Ala Val Gln Pro Pro Trp Thr Trp Trp
 65 70 75 80

ccc aca ctt aaa cct gat gta tgt gcc ttg gcg gct agt ctt gag tcc 288
 Pro Thr Leu Lys Pro Asp Val Cys Ala Leu Ala Ala Ser Leu Glu Ser
 85 90 95

tgg gat atc ccg gga acc gat gtc tcg tcc tct aaa cga gtc aga cct 336
 Trp Asp Ile Pro Gly Thr Asp Val Ser Ser Ser Lys Arg Val Arg Pro
 100 105 110

ccg gac tca gac tat act gcc gct tat aag caa atc acc tgg gga gcc 384
 Pro Asp Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Thr Trp Gly Ala
 115 120 125

ata ggg tgc agc tac cct cgg gct agg act aga atg gca agc tct acc 432
 Ile Gly Cys Ser Tyr Pro Arg Ala Arg Thr Arg Met Ala Ser Ser Thr
 130 135 140

ttc tac gta tgt ccc cgg gat ggc cgg acc ctt tca gaa gct aga agg 480
 Phe Tyr Val Cys Pro Arg Asp Gly Arg Thr Leu Ser Glu Ala Arg Arg
 145 150 155 160

tgc ggg ggg cta gaa tcc cta tac tgt aaa gaa tgg gat tgt gag acc 528
 Cys Gly Gly Leu Glu Ser Leu Tyr Cys Lys Glu Trp Asp Cys Glu Thr
 165 170 175

acg ggg acc ggt tat tgg cta tct aaa tcc tca aaa gac ctc ata act 576
 Thr Gly Thr Gly Tyr Trp Leu Ser Lys Ser Ser Lys Asp Leu Ile Thr
 180 185 190

gta aaa tgg gac caa aat agc gaa tgg act caa aaa ttt caa cag tgt 624
 Val Lys Trp Asp Gln Asn Ser Glu Trp Thr Gln Lys Phe Gln Gln Cys
 195 200 205

cac cag acc ggc tgg tgt aac ccc ctt aaa ata gat ttc aca gac aaa 672
 His Gln Thr Gly Trp Cys Asn Pro Leu Lys Ile Asp Phe Thr Asp Lys
 210 215 220

gga aaa tta tcc aag gac tgg ata acg gga aaa acc tgg gga tta aga 720
 Gly lys Leu Ser Lys Asp Trp Ile Thr Gly Lys Thr Trp Gly Leu Arg
 225 230 235 240

ttc tat gtg tct gga cat cca ggc gta cag ttc acc att cgc tta aaa 768

Phe Tyr Val Ser Gly His Pro Gly Val Gln Phe Thr Ile Arg Leu Lys
 245 250 255

atc acc aac atg cca gct gtg gca gta ggt cct gac ctc gtc ctt gtg 816
 lle Thr Asn Met Pro Ala Val Ala Val Gly Pro Asp Leu Val Leu Val
 260 265 270

gaa caa gga cct cct aga acg tcc ctc gct ctc cca cct cct ctt ccc 864
 Glu Gln Gly Pro Pro Arg Thr Ser Leu Ala Leu Pro Pro Pro Leu Pro
 275 280 285

cca agg gaa gcg cca ccg cca tct ctc ccc gac tct aac tcc aca gcc 912
 Pro Arg Glu Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Asp Ser Asn Ser Thr Ala
 290 295 300

ctg gcg act agt gca caa act ccc acg gtg aga aaa aca att gtt acc 960
 Leu Ala Thr Ser Ala Gln Thr Pro Thr Val Arg Lys Thr Ile Val Thr
 305 310 315 320

cta aac act ccg cct ccc acc aca ggc gac aga ctt ttt gat ctt gtg 1008
 Leu Asn Thr Pro Pro Pro Thr Thr Gly Asp Arg Leu Phe Asp Leu Val
 325 330 335

cag ggg gcc ttc cta acc tta aat gct acc aac cca ggg gcc act gag 1056
 Gln Gly Ala Phe Leu Thr Leu Asn Ala Thr Asn Pro Gly Ala Thr Glu
 340 345 350

tct tgc tgg ctt tgt ttg gcc atg ggc ccc cct tat tat gaa gca ata 1104
 Ser Cys Trp Leu Cys Leu Ala Met Gly Pro Pro Tyr Tyr Glu Ala Ile
 355 360 365

gcc tca tca gga gag gtc gcc tac tcc acc gac ctt gac cgg tgc cgc 1152
 Ala Ser Ser Gly Glu Val Ala Tyr Ser Thr Asp Leu Asp Arg Cys Arg
 370 375 380

tgg ggg acc caa gga aag ctc acc ctc act gag gtc tca gga cac ggg 1200
 Trp Gly Thr Gln Gly Lys Leu Thr Leu Thr Glu Val Ser Gly His Gly
 385 390 395 400

ttg tgc ata gga aag gtg ccc ttt acc cat cag cat ctc tgc aat cag 1248
 Leu Cys Ile Gly Lys Val Pro Phe Thr His Gln His Leu Cys Asn Gln
 405 410 415

acc cta tcc atc aat tcc tcc gga gac cat cag tat ctg ctc ccc tcc 1296
 Thr Leu Ser Ile Asn Ser Ser Gly Asp His Gln Tyr Leu Leu Pro Ser

420	425	430	
aac cat agc tgg tgg gct tgc agc act ggc ctc acc cct tgc ctc tcc			1344
Asn His Ser Trp Trp Ala Cys Ser Thr Gly Leu Thr Pro Cys Leu Ser			
435	440	445	
acc tca gtt ttt aat cag act aga gat ttc tgt atc cag gtc cag ctg			1392
Thr Ser Val Phe Asn Gln Thr Arg Asp Phe Cys Ile Gln Val Gln Leu			
450	455	460	
att cct cgc atc tat tac tat cct gaa gaa gtt ttg tta cag gcc tat			1440
Ile Pro Arg Ile Tyr Tyr Tyr Pro Glu Glu Val Leu Leu Gln Ala Tyr			
465	470	475	480
gac aat tct cac ccc agg act aaa aga gag gct gtc tca ctt acc cta			1488
Asp Asn Ser His Pro Arg Thr Lys Arg Glu Ala Val Ser Leu Thr Leu			
485	490	495	
gct gtt tta ctg ggg ttg gga atc acg gcg gga ata ggt act ggt tca			1536
Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ile Gly Thr Gly Ser			
500	505	510	
act gcc tta att aaa gga cct ata gac ctc cag caa ggc ctg aca agc			1584
Thr Ala Leu Ile Lys Gly Pro Ile Asp Leu Gln Gln Gly Leu Thr Ser			
515	520	525	
ctc cag atc gcc ata gat gct gac ctc cgg gcc ctc caa gac tca gtc			1632
Leu Gln Ile Ala Ile Asp Ala Asp Leu Arg Ala Leu Gln Asp Ser Val			
530	535	540	
agc aag tta gag gac tca ctg act tcc ctg tcc gag gta gtg ctc caa			1680
Ser Lys Leu Glu Asp Ser Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val Val Leu Gln			
545	550	555	560
aat agg aga ggc ctt gac ttg ctg ttt cta aaa gaa ggt ggc ctc tgt			1728
Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Leu Lys Glu Gly Gly Leu Cys			
565	570	575	
gcg gcc cta aag gaa gag tgc tgt ttt tac ata gac cac tca ggt gca			1776
Ala Ala Leu Lys Glu Glu Cys Cys Phe Tyr Ile Asp His Ser Gly Ala			
580	585	590	
gta cgg gac tcc atg aaa aaa ctc aaa gaa aaa ctg gat aaa aga cag			1824
Val Arg Asp Ser Met Lys Lys Leu Lys Glu Lys Leu Asp Lys Arg Gln			

Pro Thr Leu Lys Pro Asp Val Cys Ala Leu Ala Ala Ser Leu Glu Ser
 85 90 95

Trp Asp Ile Pro Gly Thr Asp Val Ser Ser Ser Lys Arg Val Arg Pro
 100 105 110

Pro Asp Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Thr Trp Gly Ala
 115 120 125

Ile Gly Cys Ser Tyr Pro Arg Ala Arg Thr Arg Met Ala Ser Ser Thr
 130 135 140

Phe Tyr Val Cys Pro Arg Asp Gly Arg Thr Leu Ser Glu Ala Arg Arg
 145 150 155 160

Cys Gly Gly Leu Glu Ser Leu Tyr Cys Lys Glu Trp Asp Cys Glu Thr
 165 170 175

Thr Gly Thr Gly Tyr Trp Leu Ser Lys Ser Ser Lys Asp Leu Ile Thr
 180 185 190

Val Lys Trp Asp Gln Asn Ser Glu Trp Thr Gln Lys Phe Gln Gln Cys
 195 200 205

His Gln Thr Gly Trp Cys Asn Pro Leu Lys Ile Asp Phe Thr Asp Lys
 210 215 220

Gly Lys Leu Ser Lys Asp Trp Ile Thr Gly Lys Thr Trp Gly Leu Arg
 225 230 235 240

Phe Tyr Val Ser Gly His Pro Gly Val Gln Phe Thr Ile Arg Leu Lys
 245 250 255

Ile Thr Asn Met Pro Ala Val Ala Val Gly Pro Asp Leu Val Leu Val
 260 265 270

Glu Gln Gly Pro Pro Arg Thr Ser Leu Ala Leu Pro Pro Pro Leu Pro
 275 280 285

Pro Arg Glu Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Asp Ser Asn Ser Thr Ala
 290 295 300

Leu Ala Thr Ser Ala Gln Thr Pro Thr Val Arg Lys Thr Ile Val Thr
 305 310 315 320

Leu Asn Thr Pro Pro Pro Thr Thr Gly Asp Arg Leu Phe Asp Leu Val
 325 330 335

Gln Gly Ala Phe Leu Thr Leu Asn Ala Thr Asn Pro Gly Ala Thr Glu
 340 345 350

Ser Cys Trp Leu Cys Leu Ala Met Gly Pro Pro Tyr Tyr Glu Ala Ile
 355 360 365

Ala Ser Ser Gly Glu Val Ala Tyr Ser Thr Asp Leu Asp Arg Cys Arg
 370 375 380

Trp Gly Thr Gln Gly Lys Leu Thr Leu Thr Glu Val Ser Gly His Gly
 385 390 395 400

Leu Cys Ile Gly Lys Val Pro Phe Thr His Gln His Leu Cys Asn Gln
 405 410 415

Thr Leu Ser Ile Asn Ser Ser Gly Asp His Gln Tyr Leu Leu Pro Ser
 420 425 430

Asn His Ser Trp Trp Ala Cys Ser Thr Gly Leu Thr Pro Cys Leu Ser
 435 440 445

Thr Ser Val Phe Asn Gln Thr Arg Asp Phe Cys Ile Gln Val Gln Leu
 450 455 460

Ile Pro Arg Ile Tyr Tyr Tyr Pro Glu Glu Val Leu Leu Gln Ala Tyr
 465 470 475 480

Asp Asn Ser His Pro Arg Thr Lys Arg Glu Ala Val Ser Leu Thr Leu
 485 490 495

Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ile Gly Thr Gly Ser
 500 505 510

Thr Ala Leu Ile Lys Gly Pro Ile Asp Leu Gln Gln Gly Leu Thr Ser

