



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0043709
(43) 공개일자 2017년04월24일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 15/86</i> (2006.01) <i>A61K 35/28</i> (2015.01)
 <i>C07K 14/475</i> (2006.01) <i>C12N 5/0775</i> (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 15/86</i> (2013.01)
 <i>A61K 35/28</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-0142816
 (22) 출원일자 2015년10월13일
 심사청구일자 2015년10월13일</p> | <p>(71) 출원인
 연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)</p> <p>(72) 발명자
 최동훈
 서울특별시 강남구 선릉로 206 103동 1601호 (대치동, 동부센트레빌)</p> <p>배성호
 경기도 용인시 기흥구 보정로 30 131동 1701호 (보정동, 동아솔레스티아파트)</p> <p>박진실
 경기도 시흥시 두문로71번길 4 (신천동)</p> <p>(74) 대리인
 윤대웅, 공병욱</p> |
|--|---|

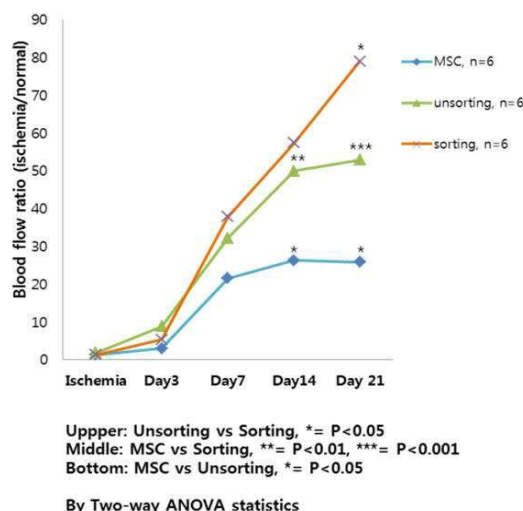
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **녹색형광단백질 발현 유전자를 이용한 줄기세포 선별방법 및 이를 이용하여 선별된 줄기세포를 포함하는 세포 치료제**

(57) 요약

본 발명은 외인성(exogenous) 대상 유전자를 포함하는 세포를 선별하기 위한 선별 벡터 및 이를 이용한 세포 선별 방법에 관한 것이다. 본 발명의 선별벡터(pEF1/HisC:VEGF:EGFP)는 VEGF 및 EGFP 유전자를 포함하며, 각각 유전자의 발현은 EF 프로모터 및 CMV 프로모터에 의해 독립적으로 조절된다. 본 발명에서 선별된 VEGF-형질도입된 MSCs 는 혈관내피성장인자의 발현이 증가되어 신생혈관의 생성을 유도함으로써 허혈성 하지 치료효과를 향상시킨다. 본 발명의 선별벡터를 이용한 세포선별 시스템은 전형적인 세포-기반 유전자 전달과 비교하여 다음과 같은 이점이 있다: 저농도의 세포에서도 유전자 전달 효율이 높다; 단기간에 많은 양의 혈관신생 인자가 요구되는 중증 허혈성 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다; 타겟 유전자 또는 기반세포의 교체가 용이하여 세포-기반 유전자치료를 이용하는 다양한 질병에 적용될 수 있다.

대표도 - 도9b



(52) CPC특허분류

C07K 14/475 (2013.01)

C12N 5/0662 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A2A01002731

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업

연구과제명 생착유도 유전자와 유전자도입세포 선택 유전자를 이용한 심장질환 특이 생체 적합성 강화
세포 치료제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교

연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

외인성(exogenous) 대상 유전자를 포함하는 세포를 선별하기 위한 선별 벡터에 있어서, 상기 선별 벡터는 대상 유전자인 VEGF (vascular endothelial growth factor)-인코딩 뉴클레오타이드 서열 및 검출가능한 표지(detectable label)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 VEGF 및 검출가능한 표지의 발현은 서로 다른 프로모터에 의해 독립적으로 조절되는 것을 특징으로 하는 선별 벡터.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 선별 벡터는 플라스미드인 것을 특징으로 하는 선별 벡터.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 프로모터는 동물세포에서 작동하는(operable) 프로모터로서, CMV(Cytomegalovirus) 프로모터, EF1(elongation factor-1) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40(Simian Virus 40) 프로모터, SV40E1 프로모터, HSV(Herpes simplex virus)의 tk 프로모터, RSV(Respiratory syncytial virus) 프로모터, EF1(elongation factor-1 alpha) 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2(interleukin-2) 유전자의 프로모터, 인간 IFN(interferon) 유전자의 프로모터, 인간 IL-4(interleukin-4) 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터 또는 인간 GM-CSF(Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) 유전자의 프로모터인 것을 특징으로 하는 선별 벡터.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 검출가능한 표지(detectable label)는 GFP (green fluorescence protein) 단백질인 것을 특징으로 하는 선별 벡터.

청구항 5

(a) 동물세포에서 작동가능한 프로모터 및 (b) 상기 프로모터에 작동적으로 결합된(operatively linked to) VEGF (vascular endothelial growth factor)-인코딩 뉴클레오타이드 서열 및 검출가능한 표지(detectable label)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 VEGF 및 검출가능한 표지는 서로 다른 프로모터에 의해 독립적으로 조절되는 것을 특징으로 하는 선별 벡터가 도입된 세포.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 세포는 줄기세포인 것을 특징으로 하는 선별 벡터.

청구항 7

(a) 제 5 항 세포의 억제학적 유효량; 및 (b) 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 허혈성 질환(ischemic disease) 치료용 억제학적 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 허혈성 질환은 하지동맥 허혈성 질환, 사지말단부 허혈성 질환, 허혈성 뇌혈관 질환, 허혈성 심장질환, 심근경색 및 협심증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

다음 단계를 포함하며 외인성(exogenous) 대상 유전자를 포함하는 세포를 선별하는 방법:

- (a) 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 선별 벡터를 이용하여 외인성(exogenous) 대상 유전자를 대상 세포에 형질도입 시키는 단계;
- (b) 상기 단계 (a)의 세포를 배양액에서 배양하는 단계; 및
- (c) 상기 선별 벡터에서 발현되는 검출가능한 표지로서, 상기 외인성 대상 유전자를 포함하는 세포를 선별하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 녹색형광단백질(Green Fluorescence Protein, GFP) 발현 유전자를 이용한 줄기세포 선별방법 및 이를 이용하여 선별된 줄기세포를 포함하는 세포치료제에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 녹색 형광물질 유전자를 이용하여 유전자 도입된 세포를 선별함으로써 세포치료의 효율을 증가시키는 방법으로, 녹색 형광물질을 발현할 수 있는 유전자를 세포에 발현시킨 후 해당 세포를 유세포 분리하여 유전자가 도입된 세포만을 세포치료에 이용함으로써, 도입 유전자가 탑재된 세포의 비율을 높임으로써 세포치료 시 유전자 도입 효율을 극대화 하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 일반적으로 현재 세포치료제는 중간엽 줄기세포를 이용한 치료가 대부분이나 그 치료효과가 크지 않아 세포 치료제의 개선이 요구된다. 세포치료제를 개선하는 방법으로는 배양방법을 다양화 하거나 특정 표지 단백질을 발현하는 세포만을 분리하는 방법으로 시도되고 있으나 세포치료제 효과 개선을 위한 특정 유전자 발현을 위해서는 외부에서 도입된 유전자 발현을 통한 세포 치료제 개선이 요구되는 실정이다. 세포치료에 활용되는 줄기세포의 경우 유전자 도입 효율이 낮아 유전자 도입 시 전체 세포 중 10%-30%의 세포만이 유전자가 도입되는 낮은 효율을 보이고 있다.

[0004] 본 발명자들은 상술한 문제점을 해결하기 위한 방법으로서 대상 유전자가 도입된 세포만을 선별, 사용할 수 있는 본 발명의 방법을 개발하였으며, 이를 우선적으로 말초동맥질환에 적용하였다.

[0005] 말초동맥질환(peripheral artery disease, PAD)은 하지의 혈관이 좁아지는 질병으로서, 수십년에 걸쳐 발병이 증가되어 전 세계적으로 주요한 질병이 되었다(1). 말초동맥질환 중 가장 심각한 최종 단계는 중증하지허혈(critical limb ischemia)이며, 이는 심혈관 질환과 함께 파행성 보행 또는 하지절단 위험성이 있다. 말초동맥질환의 발병이 증가하면서, 혈관신생에 효과를 나타내는 치료방법이 개발되어 왔다. 치료적 혈관신생(Therapeutic angiogenesis)은 새로운 혈관 형성을 촉진하는 것으로서 허혈성 질환을 치료하는데 있어 유용하다. 혈관 형성에는 두 가지 메커니즘이 있다: 혈관형성(vasculogenesis) 및 혈관신생(angiogenesis). 내피 전구세포(endothelial progenitor cell)로부터 새로운 혈관을 형성하는 혈관형성과 달리, 혈관신생은 이미 존재하고 있던 혈관으로부터의 새로운 혈관의 형성 또는 성장 과정을 뜻한다(2). 따라서, 혈관신생인자에 의해 유도된 혈관신생은 국소적으로 혈액 공급이 충분하지 않은 허혈성 조직의 회복에 있어 중요한 역할을 한다. 치료적 혈관신생에 있어 중요한 두 가지 주요 요소가 있다. 유전자 전달 및 세포 전달이다.

[0006] 유전자 전달 기술은 바이러스성 또는 비바이러스성 벡터를 이용하여 타겟 세포에 유전자를 도입하는 방법이다. 바이러스성 벡터는 유전자도입에 있어 높은 효율성을 가지지만 독성 및 면역반응 등 심각한 안정성 문제가 있다(4). 한편, 플라스미드 DNA 복합체를 이용하는 비-바이러스성 벡터는 효율성이 떨어진다는(5). 다양한 혈관

신생 유전자가 허혈성 질환치료를 위한 유전자 전달에 이용되며, 특히 혈관내피성장인자(VEGF)는 혈관 형성의 유력한 성장인자 중 하나이다(6). 인 비보에서 허혈성 조직의 유전자 전달 효율을 높이기 위한 연구가 이루어져 왔으나, 비바이러스성 벡터는 타겟 세포 또는 조직으로 유전자를 도입하는 효율이 낮았다(7-9). 특히, VEGF 유전자 치료는 허혈성 조직에서 혈액관류(blood perfusion)를 회복하는데 있어 좋지 않은 결과를 나타내었으며(10), 이에 보다 효율적인 접근법이 요구된다.

[0007] 한편, 줄기세포를 이용하는 세포치료는 다양한 질병의 치료에 적용되어 왔다(11). 줄기세포 중, 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)는 윤리적 문제가 있음에도 적용이 용이해 세포 치료에 가장 널리 사용된다. 특히, 중간엽 줄기세포는 혈관신생을 촉진시키는 다양한 촉진비인자(paracrine factor)를 분비한다(12-14). 하지만 이들의 분비 레벨은 허혈성 질환을 치료하는데 충분하지 않다. 또한, 세포 전달에 있어 고려해야 할 것은 허혈성 조직으로의 낮은 이식률 뿐만 아니라, 세포의 크기 및 세포의 양도 고려해야 한다. 그러나, MSC와 함께 외인성 VEGF를 처리하는 경우 허혈성 조직에서 MSC의 이식률 또는 생존률이 증가했다는 연구 결과가 있다(15).

[0008] 현재까지는 세포-기반 유전자 치료가 허혈성 부위에서 혈관신생 과정을 촉진하는 가장 효율적인 전략이다. 마찬가지로, 유전자 조작된 MSC는 조직 회복과 관련된 특이 유전자의 발현을 증가시킴으로써 높은 치료효율을 나타낸다(16, 17). 특히, VEGF 유전자는 허혈성 질병을 치료하기 위해 MSC를 조작하는데 이용된다(18). 그러나, 세포-기반 유전자 치료법의 높은 효율성에도 불구하고 여전히 도입된 유전자의 효과에 대한 문제가 남아있다. 따라서, 허혈성 질환을 치료하기 위한 보다 효율적인 치료법의 연구가 필요하다.

[0009] 세포 선별은 비-바이러스성 벡터를 이용하여 도입 유전자의 효과를 증가시키는데 이용될 수 있는 방법이다. 자동-형광 단백질(Auto-fluorescence protein)은 포유동물 세포에서 유전자 도입 효율을 모니터링하는데 사용되는 일반적인 도구이다. GFP (Green fluorescence protein)는 세포 또는 조직의 고정 없이 형광 검출 가능한 마커 유전자로서, 인 비보에서 세포의 추적 가능성이 가능하다(19, 20). 현재까지는 2가지 다른 유전자-선별 마커 유전자를 가지는 대상 유전자-의 발현을 위한 동시-도입(co-transfection)으로 세포를 선별하였다(21). 이론적으로 두 개의 유전자는 대상 유전자의 효과를 얻기 위해 단일 세포 내에서 동시 발현되지만, 실제로는 플라스미드 벡터 시스템에서 프로모터에 가까운 유전자가 우세하게 발현된다(22). 한편, 단일 세포에서 세포 선별을 위해 대상 유전자(gene of interest) 및 마커 유전자를 포함하는지 확인하여야 한다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 2개 유전자, 즉 마커유전자인 EGFP 및 대상 유전자인 VEGF를 발현하는 선별 플라스미드 벡터를 구축하였다. 단백질 융합(fusion)을 피하고, 각각의 단백질을 독립적으로 발현시키기 위하여, 플라스미드 벡터에 각각의 유전자에 대한 프로모터 서열을 삽입하였다. 본 발명은 선별 플라스미드 벡터를 이용하여 VEGF-EGFP-도입된 MSC를 분리함으로써 도입된 VEGF 유전자의 치료적 효과를 높일 수 있는 결합된 세포-기반 유전자 치료법으로 디자인되었다. 본 발명자들은 하지허혈 마우스 모델에서 이러한 선별 플라스미드 벡터가 일반적인 세포-기반 유전자치료와 비교하여 혈액 관류를 개선하는데 효율적인지 연구하였다. 또한, 분리시스템을 가진 선별 플라스미드 벡터를 통하여, 인 비보에서 낮은 용량의 세포만을 이용하여 도입된 VEGF 유전자의 효과를 극대화할 수 있다.

[0012] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명자들은 줄기세포 치료제의 효과를 증대시키기 위한 유전자 도입 세포의 선별방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 유전자가 도입된 세포만을 분리하기 위해 선별마커인 녹색 형광 유전자(green fluorescence protein, GFP)를 이용하는, 2개의 유전자인 VEGF 및 EGFP 와 이들의 발현을 각각 조절하는 프로모터를 포함하는 선별 벡터(selection vector)를 제작하였으며, 상기 벡터를 이용하여 유전자 도입된 세포만을 선별, 사용함으로써 세포 치료효과를 극대화시킬 수 있음을 확인하였다.

- [0015] 따라서 본 발명의 목적은 외인성(exogenous) 대상 유전자를 포함하는 세포를 선별하기 위한 선별 벡터를 제공하는 데 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 선별 벡터가 도입된 세포를 제공하는 데 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 선별 벡터가 도입된 세포를 포함하는 허혈성 질환 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 선별 벡터를 이용하여 외인성(exogenous) 대상 유전자를 포함하는 세포를 선별하는 방법을 제공하는데 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0021] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 외인성(exogenous) 대상 유전자를 포함하는 세포를 선별하기 위한 선별 벡터에 있어서, 상기 선별 벡터는 대상유전자인 VEGF (vascular endothelial growth factor)-인코딩 뉴클레오타이드 서열 및 검출가능한 표지(detectable label)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 VEGF 및 검출가능한 표지의 발현은 서로 다른 프로모터에 의해 독립적으로 조절되는 것을 특징으로 하는 선별 벡터를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 동물세포에서 작동가능한 프로모터 및 (b) 상기 프로모터에 작동적으로 결합된(operatively linked to) VEGF (vascular endothelial growth factor)-인코딩 뉴클레오타이드 서열 및 검출가능한 표지(detectable label)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 VEGF 및 검출가능한 표지는 서로 다른 프로모터에 의해 독립적으로 조절되는 선별 벡터가 도입된 세포를 제공한다.
- [0024] 본 발명자들은 줄기세포 치료제의 효과를 증대시키기 위한 유전자 도입 세포의 선별방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 유전자가 도입된 세포만을 분리하기 위해 선별마커인 녹색 형광 유전자(green fluorescence protein, GFP)를 이용함과 동시에, 2개의 유전자인 VEGF 및 EGFP 와 이들의 발현을 각각 조절하는 프로모터를 포함하는 선별 벡터(selection vector)를 제작하였으며, 상기 벡터를 이용하여 유전자 도입된 세포만을 선별, 사용함으로써 세포 치료효과를 극대화시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0025] 최근에 발표된 세포기반 유전자 치료는 허혈로 인한 손상부위에 혈관을 신생함으로써 그 효능이 입증되고 있다. 그럼에도 불구하고, 심혈관 질환과 함께 파행성 보행이나 사지절단과 같은 심한 합병증은 여전히 해결해야 할 문제로 남아있다. 본 발명에서는 기존의 세포기반 유전자 치료제의 효과를 향상시키기 위하여 선별 시스템을 도입하였고, 특이적 플라스미드 벡터를 이용하는 단순하면서 효율적인 방법을 확립하였다. 특이적 플라스미드 벡터 방법은 pEF1/HisC벡터에 타겟 유전자로 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF)의 코딩서열과 함께 CMV 프로모터와 선별 마커 유전자로 향상된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescence protein; EGFP)을 복제(cloning)하여 특이적 플라스미드 벡터를 제작하였다.
- [0026] 본 발명의 선별벡터는 VEGF (vascular endothelial growth factor)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 서열은 서열목록 제1서열로 표시된다.
- [0027] 본 발명에서 사용하는 VEGF-인코딩 뉴클레오타이드 서열은 상기 서열목록 제1서열에 대하여 실질적인 동일성(substantial identity) 또는 실질적인 유사성(substantial similarity)을 나타내는 유전자 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 VEGF 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 나타내는 유전자 서열을 의미한다. 상기의 실질적인 유사성은, 하나 이상의 염기의 결손 또는 삽입과 같은 VEGF 서열의 변화가 선별 플라스미드 벡터와의 상동성재조합을 최소화하는 본 발명의 목적에 영향을 미치지 않는 변화를 총칭한다. 따라서, 본 발명의 VEGF 서열은 예시된 서열목록 제1서열에 한정되지 않으며, 본 발명이 목적하는 최종 생성물의 활성화에 실질적으로 영향을 주지 않는 한 본 발명의 권리범위에 포함된다고 해석된다.
- [0028] 본 발명의 선별벡터는 검출가능한 표지(detectable label)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 상기 검

출가능한 표지(detectable label)는 리포터 유전자에 의해 발현되는 시그널로서, 선별 벡터가 도입된 세포를 확인할 수 있도록 시그널을 발생시키는 단백질로는, GFP (green fluorescence protein), 루시페라아제 및 β -글루쿠로니다아제) 등이 있다. 한편, 본 발명에서 사용된 GFP의 서열은 서열목록 제2서열로 표시된다.

- [0029] 본 발명의 검출가능한 표지가 발산하는 시그널은 형광시그널을 감지할 수 있는 형광현미경, 공초점 형광현미경, 분광광도계, 형광측정기, CCD 카메라, 실시간 생체 세포 관찰용 현미경(Delta Vision), 라이카 형광실체현미경(Leica MZ10F), 라이카 도립현미경(Leica DMI3000B), 형광입체현미경, 플루오르세인 현미경 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된 장비에 의해서 감지될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 선별벡터는 플라스미드 벡터이다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포는 동물세포이며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 세포는 줄기세포이다. 상기 줄기세포는 배아줄기세포, 배아생식세포, 배아중양세포, 성체줄기세포 및 유도만능줄기세포이며, 보다 바람직하게는 다능성 줄기세포인 중간엽 줄기세포이다.
- [0032] 본 발명의 선별벡터는 동물세포에서 작동하는(operable) 프로모터를 포함한다. 예컨대, 상기 프로모터는 CMV(Cytomegalovirus) 프로모터, EF1(elongation factor-1) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40(Simian Virus 40) 프로모터, SV40E1 프로모터, HSV(Herpes simplex virus)의 tk 프로모터, RSV(Respiratory syncytial virus) 프로모터, EF1(elongation factor-1 alpha) 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2(interleukin-2) 유전자의 프로모터, 인간 IFN(interferon) 유전자의 프로모터, 인간 IL-4(interleukin-4) 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터 또는 인간 GM-CSF(Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) 유전자의 프로모터이다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, VEGF 발현 뉴클레오타이드 서열 및 검출가능한 표지 발현 뉴클레오타이드 서열은 각각 서로 다른 프로모터에 의해 독립적으로 조절되며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, VEGF 발현은 서열목록 제 3 서열의 EF1 프로모터 서열에 의해 조절되고, 검출가능한 표지(예컨대, EGFP)는 서열목록 제 4 서열의 CMV 프로모터 서열에 의해 조절된다.
- [0033] 본 발명에서 이용되는 선별 벡터에서 VEGF 및 검출가능한 표지의 서열은 각각의 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 본 명세서에서, 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0034] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 선별벡터는 선택표지로서 항생제 내성 유전자를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 항생제 내성 유전자는 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베나실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있고, 바람직하게는 네오마이신 내성 유전자이다. 상기의 선택표지는 별도의 프로모터 또는 IRES(internal ribosome entry site)에 의해 연결된 발현 시스템에 의해서도 발현될 수 있으며, 본 발명에서 이용될 수 있는 IRES는 몇 종의 바이러스 및 세포의 RNAs에서 발견되는 조절 서열이다(McBratney et. al. *Current Opinion in Cell Biology* 5:961(1993)).
- [0035] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 선별벡터는 5' → 3' 방향으로 선택표지-코딩 뉴클레오타이드 서열, CMV 프로모터, 검출가능한 표지(detectable label)-인코딩 뉴클레오타이드 서열, VEGF (vascular endothelial growth factor)-인코딩 뉴클레오타이드 서열 및 EF-1 프로모터 서열을 포함한다(도 참조).
- [0036] 본 발명의 세포는 (a) 동물세포에서 작동가능한 프로모터 및 (b) 상기 프로모터에 작동적으로 결합된(operatively linked to) VEGF (vascular endothelial growth factor)-인코딩 뉴클레오타이드 서열 및 검출가능한 표지(detectable label)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터가 도입되어 있다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상기 선별 벡터가 도입된 세포의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 허혈성 질환(ischemic disease) 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 약제학적 조성물은 상술한 본 발명의 선별벡터가 도입된 세포를 포함하는 것으로서, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.
- [0040] 본 발명자들은 VEGF와 EGFP가 탑재된 특이적 플라스미드벡터 (pEF1/HisC:VEGF:EGFP)는 심근세포 (H9C2 cell) 및 중간엽 줄기세포 (Mesenchymal stem cells; MSC)에서 균일하게 발현됨을 생체 외에서 (in vitro)에서 확인

하였다. 두 가지 유전자 (VEGF and EGFP)를 발현하는 중간엽 줄기세포는 유세포 분석기를 통해 선별하였고, 분류된 중간엽 줄기 세포(유전자 도입)는 하지허혈성 마우스에 주입하였다. 하지허혈 유도 후 21일 제 (세포 이식 후 20일제), 중간엽 줄기세포 대조군 또는 분류하지 않은 중간엽 줄기세포(유전자 도입)군과 분류된 중간엽 줄기세포 군을 비교 시 분류된 중간엽 줄기세포 군에서 현저하게 혈류가 개선되는 결과를 보였다. 이로 인해 본 발명의 선별 시스템인 플라스미드벡터는 중간엽 줄기세포에서 혈관내피성장인자의 발현을 증가시켜 신생 혈관의 생성을 유도하여 허혈성 하지 치료효과를 향상 시켰다.

[0041] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "치료"는 1) 아직 허혈성 질환을 보유하고 있다고 진단되지 않았으나, 이러한 경향이 있는 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간에서 질병 또는 장애가 발생하는 것의 예방, 2) 허혈성 질환의 억제, 즉 발전의 억제, 및 3) 허혈성 질환의 경감을 의미한다. 구체적으로, 상기 약제학적 조성물을 치료학적으로 유효한 양으로 허혈성 질환의 치료가 필요한 대상(subject)의 손상부위에 투여할 경우 VEGF 유전자의 치료적 효과를 극대화시킬 수 있다. 한편, 상기 투여 대상은 인간을 포함하는 포유동물일 수 있다.

[0042] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0043] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0044] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 예컨대 0.001-1000 mg/kg이다. 그러나, 유효 성분의 실제 투여량은 분화 및 증식하고자 하는 신경세포의 양, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등 여러 관련 인자를 고려하여 결정할 수 있으며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 형태로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0045] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0046] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 허혈성 질환은 하지동맥 허혈성 질환, 사지말단부 허혈성 질환, 허혈성 뇌혈관 질환, 허혈성 심장질환, 심근경색 또는 협심증이다.

[0048] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 외인성(exogenous) 대상 유전자를 포함하는 세포를 선별하는 방법을 제공한다:

[0049] (a) 본 발명의 선별 벡터를 이용하여 외인성(exogenous) 대상 유전자를 대상 세포에 형질도입 시키는 단계;

[0050] (b) 상기 단계 (a)의 세포를 배양액에서 배양하는 단계; 및

[0051] (c) 상기 선별 벡터에서 발현되는 검출가능한 표지로서, 상기 외인성 대상 유전자를 포함하는 세포를 선별하는 단계.

[0052] 본 발명의 방법은 상술한 선별벡터를 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다. 본 발명의 방법을 각각의 단계 별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:

[0054] 단계 (a): 외인성(exogenous) 대상 유전자의 형질도입

- [0055] 우선 선별 벡터를 이용하여 외인성(exogenous) 대상 유전자를 대상 세포에 형질도입 시킨다.
- [0056] 본 발명의 방법에 따르면, 상기 벡터는 외인성(exogenous) 대상 유전자를 포함하는 세포를 선별하기 위한 선별 벡터에 있어서, 상기 선별 벡터는 대상유전자인 VEGF (vascular endothelial growth factor)-인코딩 뉴클레오타이드 서열 및 검출가능한 표지(detectable label)-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 VEGF 및 검출가능한 표지의 발현은 서로 다른 프로모터에 의해 독립적으로 조절되는 것을 특징으로 하는 선별 벡터이다.
- [0057] 상기 벡터의 세포로의 도입은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다. 예를 들어, 미세 주입법 (Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479(1980); 및 Harland와 Weintraub, *J. Cell Biol.* 101:1094-1099(1985)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973); 및 Chen과 Okayama, *Mol. Cell. Biol.* 7:2745-2752(1987)), 전기 천공법 (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982); 및 Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718(1986)), 리포좀-매개 형질도입법 (Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980); Nicolau 및 Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190(1982); 및 Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176(1987)), DEAE-덱스트란 처리법 (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)) 방법에 의해 벡터를 세포내로 이입시킬 수 있다. 한편 본 발명에서는 pDNA 및 비-바이러스성 벡터 복합체(예컨대, PAM-ABP)를 일정 중량비로 혼합하여 serum free 배지 하의 세포에 처리함으로써 형질도입을 실시하였다.
- [0058] 상기의 벡터가 형질도입된 세포는 VEGF 유전자와 검출가능한 표지(예컨대, EGFP)를 동시에 발현하게 된다.

[0060] 단계 (b): 세포배양

[0061] 이어, 상기 단계 (a)의 세포를 배양액에서 배양한다.

[0062] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 pDNA 및 비-바이러스성 벡터 복합체를 세포에 첨가하고 4시간 배양한 후, 세포를 PBS로 2회 세척하고 완전 배지에서 24시간 배양한다.

[0064] 단계 (c): 세포선별

[0065] 상기 선별 벡터에서 발현되는 검출가능한 표지로서, 외인성 대상 유전자를 포함하는 세포를 선별한다.

[0066] 본 발명의 선별 벡터는 적합한 리포터 유전자(예컨대, GFP 유전자)를 포함한다. 상기 VEGF 서열이 도입된 세포는 GFP를 동시에 발현하므로, GFP 발현량을 측정하고, 이를 통해 외인성 VEGF 발현 벡터가 도입된 세포를 선별할 수 있다. 선별 벡터가 도입된 세포의 선별은 형광현미경, 면역블로팅(Immunoblotting), 형광 활성 세포 분리(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 중합효소연쇄반응 또는 유세포분석기(Flow cytometry)가 모두 이용가능하며 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 형질도입된 세포에서 GFP의 발현을 유세포분석기를 통하여 확인함으로써, 대상 세포를 선별할 수 있다.

발명의 효과

[0068] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

- [0069] (a) 본 발명은 외인성(exogenous) 대상 유전자를 포함하는 세포를 선별하기 위한 선별 벡터 및 이를 이용한 세포 선별 방법에 관한 것이다.
- [0070] (b) 본 발명의 선별벡터(pEF1/HisC:VEGF:EGFP)는 VEGF 및 EGFP 유전자를 포함하며, 각각 유전자의 발현은 EF 프로모터 및 CMV 프로모터에 의해 독립적으로 조절된다.
- [0071] (c) 본 발명에서 선별된 VEGF-형질도입된 MSCs 는 혈관내피성장인자의 발현이 증가되어 신생혈관의 생성을 유도함으로써 허혈성 하지 치료효과를 향상시킨다.
- [0072] (d) 본 발명의 선별벡터를 이용한 세포선별 시스템은 전형적인 세포-기반 유전자 전달과 비교하여 다음과 같은 이점이 있다: 저농도의 세포에서도 유전자 전달 효율이 높다; 단기간에 많은 양의 혈관신생 인자가 요구되는 중증 허혈성 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다; 타겟 유전자 또는 기반세포의 교체가 용이하여 세포-기반

유전자치료를 이용하는 다양한 질병에 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0074]

도 1은 인 비보 스터디의 실험 디자인을 모식적으로 나타낸 것이다. BALB/c 마우스를 3 그룹으로 나누었다. day 1에, 하지허혈 마우스에 VEGF-EGFP-MSC를 주입하고, day 3에 희생시켜 세포 분포를 관찰하였다. day 7에 인간 VEGF 발현을 확인하고, day 21에 혈액 관류 관찰 및 조직분석을 실시하였다.

도 2a는 2개 프로모터를 가지고 2개 유전자를 발현하는 선별 플라스미드 벡터(pEF1/HisC:VEGF:EGFP) 구축과정의 모식도를 나타낸다. A. pEF1/HisC (AmpR, ampicillin resistance) 백본 벡터는 파란색으로 나타내었으며, EcoRI 및 XbaI의 제한효소구역에는 VEGF (노란색) 코딩 서열이 있다. 벡터 크기가 감소되고, EGFP 유전자(녹색)와 CMV 프로모터는 AseI 및 MluI로 잘라내어 pEF1/HisC:VEGF에 역으로 삽입하였다. B. 1% 아가로스 겔에서 전기영동을 수행하는 효소절단분석법(Enzyme cutting assay)을 이용하여 최종 선별 플라스미드 벡터를 확인하였다.

도 2b는 본 발명의 선별 벡터 구조를 나타낸다.

도 3a-3b는 심장근육세포(H9C2)에 pEF1/HisC:VEGF/non-viral carrier 복합체를 형질도입시키고 24시간 후 VEGF mRNA 발현을 나타낸 것이다. 3a. 1% 아가로스 겔에서 전기영동시킨 VEGF PCR 생성물의 크기(376bp)를 나타낸다. 3b. 정량적 RT-PCR (qRT-PCR)에 의한 VEGF의 순차적 분석결과로서, VEGF 유전자의 양에 따라(0.5, 1, 2 및 4 μ g) VEGF mRNA 레벨이 증가함을 보여준다.

도 4a-4b는 심장근육세포(H9C2)에 pEF1/HisC:VEGF:EGFP/non-viral carrier 복합체를 형질도입시키고 24시간 후 VEGF 및 EGFP 발현 레벨을 나타낸 것이다. 4a. 실시간 qRT-PCR 에 의한 VEGF의 순차적 분석결과로서, VEGF 유전자의 농도에 따라(0.5, 1, 2 및 4 μ g) VEGF mRNA 레벨이 증가함을 보여준다. 현미경 이미지는 40배이고, 선별 플라스미드 벡터(pEF1/HisC:VEGF:EGFP)를 0.5 μ g (C-D) 및 4 μ g (E-F) 형질도입시킨 심장근육세포(H9C2)에서의 EGFP 발현을 보여준다. 4b. 완전한 선별 플라스미드 벡터 0.5 μ g을 형질도입시키고 48시간 후 심장근육세포의 배양 상층액에서 VEGF 단백질 레벨을 측정하였다. ELISA 분석결과는 대조군인 DMEM 또는 심장근육세포 배양액과 비교하여 배양 상층액의 VEGF 단백질 발현이 증가하였음을 보여준다.

도 5는 동시형질도입된 MSC의 FACS 분석결과이다. 중간엽줄기세포 (mesenchymal stem cells, MSCs)를 pEGFP-C1 (2 μ g), pAmCyan1-N1 (2 μ g), 또는 pEGFP-C1 및 pAmCyan1-N1 (1:1 ratio)로 형질도입 시켰다. EGFP/FITC는 488 nm에서 측정하였으며 AmCyanfor 405 nm 레이저 필터를 사용하였다. 형광 양성 세포는 4분면법(quadrants)으로 분류하였으며, 각각 비형질도입 세포(하부 왼쪽), AmCyan1(상부 왼쪽), EGFP (하부 오른쪽) 및 AmCyan1 및 EGFP (상부 오른쪽) 감염세포를 나타낸다. 동시-형질도입 세포는 3가지 형태로 형광을 나타내었다. EGFP 양성 세포 단독, AmCyan1 양성 세포 단독, 또는 EGFP 및 AmCyan1 양성세포이다.

도 6a-6c는 FACS 에 의한 세포 분리의 최적 조건 및 인 비보 적용 시의 과정을 나타낸 것이다. 선별 플라스미드/비바이러스성 캐리어 복합체로 형질도입시킨 중간엽 줄기세포를 트립신-EDTA를 이용하여 수거하였다. 6a. 비바이러스성 벡터의 형질도입 효율은 22.9%이며, GFP-양성 세포(VEGF 포함)를 분리하여 97.5%로 정제하였다. 6b. 36시간 배양 후 분리된 세포에서의 GFP 발현을 나타낸다. 6c. 인 비보 적용 시의 순서를 나타낸다. 모든 그룹에 동일한 세포수(2×10^5 개 세포)를 주입하였다: MSCs 자체, 비분리 및 분리.

도 7a-7b는 허혈성 하지(비복근, gastrocnemius muscle)의 파라핀 블록 상의 이식된 MSCs의 분포를 나타낸다. 허혈을 유도시킨 후 3일 째에(또는 선별 플라스미드 벡터를 형질도입시킨 MSC 를 주입한 후 2일 후), 하지 허혈성 마우스에서 허혈성 하지를 분리하였다. EGFP 유전자 발현은 VEGF 유전자를 포함하고 있는 이식된 MSCs의 분포를 나타낸다.

도 8a-8b는 항-VEGF 항체를 이용한 면역조직분석법을 통하여 인 비보 허혈성 하지에서 과발현된 VEGF를 나타낸다. 항-VEGF 항체는 마우스 및 인간 VEGF-165에 결합한다. 마우스 VEGF는 낮은 발현 레벨의 MSC 자체를 검출한다. 반면, VEGF의 과발현은 분리된 그룹에서 동정되었다.

도 9a-9b는 허혈을 유도시키고 21일까지 허혈성 하지의 혈액관류를 나타낸다. 9a. 수술 후 0, 3, 7, 14, 및 21일째의 LDPI (Laser Doppler Perfusion Imaging) 이미지를 나타낸다. 9b. MSC 자체, 비분리 그룹 및 분리 그룹에서, 허혈성 하지에서의 혈액관류 회복속도를 측정하였다. 전체 36 마리, 그룹 당 6마리를 분석하였다.

데이터는 Two-way ANOVA 분석법으로 나타내었다. 3 그룹 간 P-values가 0.05 이하임을 보여준다.

도 10a-10c는 허혈 유도 후 21일째(또는 처치 후 20일째), 허혈성 하지의 조직학적 분석 결과 및 하지 salvage score를 나타낸다. 10a. 하지 근육의 괴사 부위를 H&E 염색으로 측정하였다(배율 X400). 비분리 그룹 또는 MSC 자체(대조군)를 처치한 그룹과 비교하여, 분리시스템에 의해 선별된 플라스미드 벡터를 처리한 그룹에서 괴사 부위가 감소되었다. 10b. 섬유화(Fibrosis) 부위는 Masson's trichrome 염색법을 이용하여 측정하였다(배율 X400). MSC 자체를 처치한 대조군은 섬유증이 현저히 나타났으나, 분리 그룹에서는 현저히 감소되었다. 10c. Limb salvage score는 하지 괴사 삼각도 또는 절단(amputation)에 기반하여 분석하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험재료 및 실험방법

1. 선별 플라스미드 벡터의 구축: pEF1/HisC:VEGF:EGFP

pEF1/HisC:VEGF:EGFP 벡터는 인간 VEGF-165 및 EGFP cDNA를 pEF1/HisC 벡터로 클로닝 함으로써 구축하였다. pEpo-SV-VEGF 내 인간 VEGF-165 cDNA를 PCR 증폭하였다. PCR 주형의 연장에는 EcoRI 서열-태깅된 forward 프라이머 및 XbaI 서열-태깅된 reverse 프라이머를 이용하였다. PCR 반응 사이클은 28 사이클(94℃, 30 sec; 55℃, 30 sec; 72℃, 1 min)이며, 연장반응은 72℃에서 10 min 진행하였다. 0.8% 아가로스 젤의 PCR 생성물 중 VEGF 밴드를 분리하여, 제한효소를 처리하였다; EcoRI(1830) 및 XbaI(1869)는 pEF1/HisC 벡터 상에 존재한다. 인간 VEGF-165 cDNA를 수득한 후, 상기 cDNA를 pEF1/HisC 벡터의 EcoRI/XbaI 부위에 삽입하였다. 변형된 플라스미드를 DH5a competent 세포에 형질감염시켰다. 클론 벡터는 EcoRI 및 XbaI 처리하여 확인하였고, 추가적으로 시퀀싱(Cosmogenetech)을 통하여 재확인하였다. 클로닝된 pEF1/HisC-VEGF 벡터 크기가 커서(6.6kb) 1.6kb 길이의 EGFP를 서브클로닝하기 어렵기 때문에, pEF1/HisC 벡터에 PvuII 제한효소를 처리하여(2152, 3248, 4317) 벡터 크기를 감소시켰다. PvuII 처리된 pEF1/HisC:VEGF는 blunt 말단을 가졌기 때문에 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)를 처리하여 self-ligation을 방지하였다. EGFP cDNA는 pEGFP-C1에 AseI 및 MluI를 처리하여 수득하였고, 이어 pfu 폴리머라아제를 이용하여 sticky 말단을 채웠다. EGFP cDNA를 pEF1/HisC-VEGF 벡터의 pvuII 부위(2152 및 4317 사이)에 삽입하였다. EGFP 서브클로닝 벡터는 EcoRI 및 NdeI 처리하여 확인하였다.

2. 비-바이러스성 carrier/pEF1/HisC:VEGF:EGFP 복합체를 이용한 인 비트로 형질도입

동시-형질도입 분석을 위하여, 중간엽 줄기세포 1.8×10^5 를 60 mm 디쉬에 분주한 후, 10% FBS 및 1% pen/strep을 포함하는 저농도 글루코스 DMEM에서 24시간 배양하였다. 단일 형질도입 그룹을 위한 플라스미드 양은 전체 2 μ g 및 4 μ g로, 동시 형질도입 그룹을 위한 양은 전체 2 μ g (pEGFP-C1) 및 2 μ g (pAmCyan1-N1)로 고정하였다. pDNA 및 비-바이러스성 벡터 복합체; PAM-ABP를 1:5의 중량비로 혼합하였고, 세포는 serum free DMEM 배지 하에서 상온에서 30분간 배양하였다. 상기 복합체를 세포에 첨가하고 4시간 배양한 후, 세포를 PBS로 2회 세척하고 완전 배지에서 24시간 배양하였다. EGFP 형질도입된 MSC를 형광현미경으로 검출하였고, 동시형질감염은 FACS로 분석하였다.

PEI-DA/pEF1/HisC:VEGF:EGFP 형질도입된 세포로부터 VEGF 유전자 발현을 측정하기 위하여, H9C2 세포를 60 mm 디쉬에 1.8×10^5 로 분주하고 10% FBS 및 1% pen/strep을 포함하는 고농도 글루코스 DMEM에서 배양하였다. 순차 분석은 pEF1/HisC:VEGF:EGFP (0.5 μ g, 1 μ g, 2 μ g 및 4 μ g)와 PEI-DA의 중량 1:4로 수행하였다. pDNA/PEI-DA 복합체의 배양 및 형질도입 시간은 동시형질도입 분석과정과 동일하다.

3. qRT-PCR 및 실시간 qRT-PCR

[0087] Rneasy mini kit (QIAGEN)를 이용하여 pEF1/HisC:VEGF:EGFP 형질도입된 세포에서 RNA를 추출하였다. cDNA는 Promega RT 시약의 프로토콜에 따라 합성하였다. PCR 분석은 amfiEco kit (GenDEPOT)로 수행하였다. 인간 VEGF-165 및 GAPDH 프라이머는 표 1과 같다. cDNA 를 94℃에서 3 min 처리 후, 변성 94℃, 30sec, 어닐링 53℃, 30 sec 및, 연장 72℃, 1 min 단계를 28 사이클 수행하였다. 최종 PCR 생성물은 1% 아가로스젤에서 확인하였다.

[0088] 실시간 qRT-PCR 분석은 LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 수행하였다. 멜팅 커브(melting curve)는 97℃까지 5℃ 마다 지속적으로 측정하였다.

표 1

-	Forward	Reverse
VEGF (클로닝)	5' -TTTGAATTCATGAACCTTTCTGCTGTCTTGG-3'	5' -TTTCTAGAGATCTGGATCCTCTTCATTC-3'
hVEGF165 (실시간 qRT-PCR)	5' -ATCTGCATGGTGATGTTGGA-3'	5' -GGGCAGAATCATCACGAAGT-3'
rat GAPDH (실시간 qRT-PCR)	5' -GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3'	5' -AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'
EGFP (클로닝)	5' -GTAGGTGTCATTCTATTCTGGGG-3'	5' -AACCGTATTACCGCCTTTGA-3'

[0092] 4. FACS (Fluorescence-activated cell sorting)

[0093] pEGFP-C1 및 pAmCyan1-N1를 동시 형질도입 분석에 이용하였다. 단일 pEGFP-C1 또는 단일 pAmCyan1-N1, 또는 동시 형질도입된 세포를 수거하여 분석하였다. 동시 형질도입 효율은 BD FACSVerser™ flow cytometer를 이용하여 측정하였다. 각 샘플에서 데이터는 FITC (488 nm) 및 AmCyan (405 nm) 형광 파라미터로 분석하였다. 데이터 분석에는 BD FACSuite™ software를 이용하였다. VEGF-EGFP 형질도입된 MSC의 선별에는 BD FACSAria™ III (BD Biosciences)를 이용하였다. 데이터는 FACSDiva™ software (BD Biosciences)를 이용하여 분석하였고, FITC 필터 (488nm)를 사용하여 GFP를 측정하였다.

[0095] 5. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

[0096] PEI-DA/pEF1/HisC:VEGF:EGFP 형질도입된 세포에서 VEGF 단백질의 정량적 레벨을 측정하기 위하여, H9C2 세포를 60 mm 디쉬에 1.8x10⁵로 분주하고 10% FBS 및 1% pen/strep를 포함하는 고농도 글루코스 DMEM에서 24시간 배양하였다. pEF1/HisC:VEGF:EGFP (0.5 µg) 와 PEI-DA의 중량비 1:4를 이용하였다. 배양 및 형질감염 시간은 이전과 동일하다. 배양 48시간 후 세포 배양 상층액을 수거하여, 상층액 3 ml를 1000 rpm에서 3분간 원심분리한 뒤, 1 ml를 이용하여 ELISA 분석을 수행하였다. 음성 대조군으로 Serum-free 고농도 글루코스 DMEM을 이용하였고, H9C2 세포 배양 상층액을 비교 단백질로 이용하였다. RnD System을 이용하여 제조사의 지시에 따라 인간 VEGF immunoassay Quantikine ELISA를 수행하였다. 샘플의 광학적 농도는 450 nm에서 측정하였다. 배양 상층액의 단백질 농도는 BCA 분석 키트로 측정하였다(Pierce, Iselin, NJ, USA). 3회 실시하여 평균 및 표준편차 값을 산출하였다.

[0097]

[0098] 6. 골수 유래 MSC 의 분리 및 배양

[0099] 모든 동물실험은 연세대학교 의과대학, 연세 생의학 연구소, 동물실험위원회의 승인하에 수행되었다. 4주령 웅성 스프라그-다워리 래트 (100± 5 g)의 골수 중간엽 세포를 이용하였다. 세포를 1,600 rpm에서 5분간 원심분리하여 완전배지에 재혼탁 시킨 후, Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences)를 이용하여 분리하고 1,600 rpm 에서 30 분간 농도구배 원심분리 하였다. 원심분리 후, 단핵 골수세포를 PBS로 세척하고 2000rpm에서 5분 원심분리한 뒤, 배양 pwjq시에 분주하였다. primary culture 3일 째 및 5일 째에, 적혈구 및 비-부착 세포들을 제거하고, 새로운 배지를 첨가하였다. MSC의 특징은 세포 표면 마커인 CD90 및 CD45 를 이용하여 FACS로 분석하였다. 세포는 트립신-EDTA 용액 (0.25%, Sigma Aldrich, USA)으로 계대배양 하였으며, passage 6-7 째에 본 연구에 이용하였다.

[0101] 7. 하지 허혈성 마우스 모델 (세포 이식 포함)

[0102] BALB/c 마우스는 중증 허혈부위가 있으며 C57BL/6 마우스와 비교하여 혈류 회복이 느리다(2). 따라서, 본 발명의 세포 선별 기술을 이용하여 하지 허혈이 있는 BALB/c 마우스에서 혈액 관류가 개선된다면, 이는 치료 효과가 입증되는 것이다. 8-주령 웅성 BALB/c 마우스를 졸레틸 (30 mg/kg) 및 림퐁(20 mg/kg)으로 마취시킨 후 하지 허혈 부위를 수술하였다. 7.0 프롤렌(prolene)을 이용하여 심부대퇴동맥(profunda femoral artery)에서 슬와동맥(popliteal artery) 말단 및 표피대퇴동맥(superficial femoral artery) 및 복벽동맥(epigastric artery) 까지 왼쪽 다리를 잘라내었고, 이어 전체 대퇴동맥을 절단하였다. 피부 절개는 7.0 프롤렌 실을 이용하여 봉합하였다. 선행문헌에 따라(1), 허혈유도 후 즉각적인 MSC 처리는 허혈성 하지를 회복시키지 못하는 것으로 보인다. 따라서 하지허혈 유도 후 24 시간째에 세포를 주입하였다. 31-gauge 인슐린 바늘(BD Ultra-Fine™)을 이용하여 MSC 자체 (2×10^5 개/ 150 μ l PBS), 비분리/VEGF-EGFP-MSCs (2×10^5 개/ 150 μ l PBS) 또는 분리/VEGF-EGFP-MSCs (2×10^5 개/ 150 μ l PBS)를 허혈성 비복근(gastrocnemius) 및 경골근(tibialis muscle)의 4 부위에 주입하였다. 마우스는 3그룹으로 분리하였다: MSCs 자체 그룹(하지 허혈 및 MSC 주입, n=6), 비분리 그룹(하지허혈 및 분리하지 않은 PAM-ABP/pEF1/HisC:VEGF:EGFP-MSCs 주입, n=6), 및 분리그룹(하지 혈 및 분리된 PAM-ABP/pEF1/HisC:VEGF:EGFP-MSCs 주입, n=6). 마우스는 세포 분포분석(n=9; 3 per group) 및 조직 분석(n=9; 3 per group)을 위해 하지 허혈유도 후 3일, 7일 및 21일 째에 희생시켰다(도 1).

[0104] 인 비보 이식을 위하여, MSC를 100 mm 디쉬에 8×10^5 로 분주하고 10% FBS 및 1% pen/strep를 포함하는 저농도 글루코스 DMEM에서 24시간 배양하였다. pDNA (6 μ g) 및 PAM-ABP (30 μ g) 복합체를 1:5 중량비로 준비하였다. 세포를 수거하여 FACS 버퍼로 세척하였다. 1600 rpm에서 3분간 원심분리한 후, 상층액을 제거한 세포를 300 μ l FACS 버퍼에 재혼탁시켰다. MSC의 비-바이러스성 형질도입 효율이 최대 20%인 이전 결과를 고려하여, 100 mm 5개 디쉬의 세포를 conical tube에 모아 분리작업을 수행하였다. 세포 분리를 위하여, 게이트는 고 레벨의 녹색형광을 포함하는 형광 데이터를 분석하도록 디자인되었고, 세포 잔여물을 제외시키고 형질도입된 세포만을 선별하도록 디자인되었다. 이어 세포에 레이저 빔을 투과시켰다. 동등한 세포 조건을 형성하기 위하여 비분리된 세포 또한 레이저 빔 처리하였다. 모든 그룹(MSC, 비분리 및 분리)은 동량의 세포(2×10^5)가 적용되었다.

[0105] 8. LDPI (Laser Doppler Perfusion Imaging)를 통한 혈액 관류분석

[0107] 하지의 혈액관류는 laser Doppler perfusion imager (Moor Instruments, Devon, UK)를 이용하여, 수술 전 및 수술 후 day 0, 3, 7, 14, 및 21일 째에 측정하였다. 마우스 하지 표면을 스캔함으로써 허혈성 및 정상 하지의 혈액관류 레벨을 분석하였다. 혈액관류를 정량화하기 전 ROI (region of interest)를 선택하였다. 빛과 온도 조건의 변화로 인하여, 혈액관류 변화는 region-based thresholding를 이용하여 정상 하지(오른쪽)에 대한 허혈성 하지(왼쪽)의 비율로서 계산하였다.

[0108] 9. 면역조직화학분석(IHC)

[0110] 허혈성 비복근 조직을 10% formalin으로 24-48시간동안 고정시킨 후 파라핀화하였다. 파라핀 블록을 3 μ m 두께로 절단하여 65°C에서 60분간 건조시켰다. 조직 절편에서 파라핀을 제거하고 자일렌 및 에탄올로 탈수시킨 뒤, 탈이온수로 세척하였다. 절편을 서로 다른 항원 회수 용액으로 전처리하고 최적 항원 회복을 결정하였다.

[0111] 조직절편을 항원회복 없이 처리하였다. 내생성 페록시다아제(Duksan Hydrogen peroxide 3059)의 불활성을 위하여 3% 하이드로젠 페록시다아제를 10분간 처리하고, TBS로 2회 세척하였다. 이어, 비특이적 결합을 막기 위하여 절편을 5% BSA로 1시간 처리하였다.

[0112] 각 절편에 1차 항원으로 처리하였다: anti-VEGF, rabbit monoclonal antibody, 희석 1 :100 (ab52917, abcam), 1시간 상온처리 후 4°C overnight. HRP 포지된 폴리머- 항 labelled polymer- anti rabbit (DAKO k4003)를 2차 항체로 이용함. 20 분간 상온 처리. DAB (DAKO k-3468)을 1-3 분간 적용한 후, 절편을 탈이온수로 세척하였다. 핵 염색을 위하여 헤마톡실린을 사용하였다. 최종적으로 절편을 탈수시키고 커버슬립 위에 두

었다.

[0113] 면역 염색된 절편을 cellSens, Olympus BX53 microscope with 20x objective (200x 배율)를 이용하여 디지털 화하였다. 전체 비복근에서 VEGF 발현 구역은 3부위로 측정되었으며, 데이터는 image J software로 정량화하였다.

[0115] 10. 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 및 Masson' s trichrome (MT)

[0116] H&E 및 MT 염색을 위하여 면역조직화학 염색과 동일한 절차로 슬라이드를 준비하였다. H&E duatro을 위하여, 조직 절편을 헤마톡실린에 7분간 침지시킨 후 tap water로 세척하였다. 이어 절편을 0.5% 암모니아 수로 15회 블루잉(bluing)하고 에오신-플록신 용액으로 3분간 염색한 뒤 tap water로 세척하였다. 마지막으로 절편을 에탄올로 탈수시키고 자일렌에서 세척한 뒤 커버슬립에 고정하였다.

[0117] H&E 염색된 절편은 standard cellSens, Olympus BX53 microscope with 4x objective (40x 배율)을 이용하여 200 x 배율로 관찰하였다. 비복근 내 염증 또는 변성 부위는 그룹 당 6개 조직 절편 중 3개에서 관찰되었다.

[0118] MT 염색을 위하여, 조직절편을 Bouin' s 용액에 56℃, 1시간동안 고정시키고 tap water로 5-10분간 세척하여 피크르산(picric acid)을 제거하였다. 이어 절편을 Weigert' s iron hymatoxylin working 용액에서 10분간 처리하고 tap water로 10분간 세척한 뒤 탈이온수로 세척하였다. 이어 Biebrich scarlet-acid fuchsin 용액에서 10 분간 염색하였다. 상기 절편을 아닐린 블루 용액에 5분간 두고 탈이온수로 세척한 후, 1% 아세트산 용액을 이용하여 differentiation 하였다. 마지막으로 절편을 에탄올로 탈수하고 자일렌으로 세척하여 수지성(resinous) 마운팅 배지에 두었다.

[0119] Masson' s trichrome 염색된 절편은 standard cellSens, Olympus BX53 microscope with 4x objective (40x 배율)을 이용하여 200x 배율로 관찰하였다. 비복근 내 섬유화 부위는 무작위적으로 선택된 구역에서 image J software를 이용하여 정량화되었다.

[0121] 11. 통계 분석

[0122] 모든 데이터는 GraphPad Prism 5 software를 이용하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 두 그룹간의 차이는 paired t-test로 분석하였고, 세 그룹간의 차이는 two-way ANOVA로 비교하였다. 그룹 간 0.05 이하의 P-values를 나타낼 때 통계적으로 유의적인 것으로 판단하였다.

[0124] **실험결과**

[0125] 1. 2개 유전자를 발현하는 선별 플라스미드 벡터의 구축

[0126] 본 발명에서는 pEF1/HisC:VEGF:EGFP 벡터를 구축하기 위하여 인간 VEGF-165 cDNA 를 pEF1/HisC 벡터 내에 삽입하였다. pEpo-SV-VEGF로부터의 인간 VEGF-165 cDNA는 본 발명자들의 이전 연구결과에 개시되어 있다(26). CMV 프로모터와 EGFP cDNA를 함께 클로닝하여, EF 프로모터에 의해 유도되는 VEGF 단백질에 대하여 독립적으로 EGFP 단백질을 생성하도록 하였다. 최종적인 pEF1/HisC:VEGF:EGFP 는 제한효소 EcoRI 및 NdeI로 처리하여 확인하였다(6234bp, 도 2). 1개의 프로모터에 의해 발현되는 2개의 타겟 유전자(VEGF 및 GFP)를 가지는 재조합 벡터는 이전 연구에서 사용되었다(27, 28). 그러나, Rucker et al.는 1개 플라스미드 벡터 내에서 1개 프로모터로 조절되는 각 유전자의 발현레벨은 상대적으로 동등하지 않다고 하였다(29). 결과적으로, 전체 단백질 발현 및 단백질 복합체 발현은 안분 비례적이지 dsk다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 본 발명자들은 EGFP 유전자는 CMV 프로모터에 의해 조절되고 VEGF 유전자는 EF1 프로모터에 의해 조절되는 2개 프로모터를 가진 선별 플라스미드 벡터를 고안하였다.

[0128] 2. 인 비트로에서 2개 프로모터에 의해 조절되는 VEGF 및 EGFP의 과발현

[0129] 인 비트로에서 EF 프로모터에 의한 인간 VEGF-165 유전자 발현조절을 확인하기 위하여, H9C2 세포를 pEF/HisC:VEGF/non-viral carrier 복합체로 형질도입시켰다. 반정량적 RT-PCR을 수행하여 VEGF 유전자 발현

을 확인하였다. 도 3B에서와 같이, H9C2 세포에서 순차적 VEGF mRNA 발현이 관찰되었다.

[0130] VEGF PCR 생성물 크기는 376bp였다(도 3A). 최종 선별 벡터 pEF1/HisC:VEGF:EGFP 를 확인하기 위하여, 실시간 qRT-PCR를 이용하여 VEGF 유전자 발현을 순차적으로 분석하였다. EGFP는 자동 형광 단백질이므로, EGFP (0.5 μ g 및 4 μ g) 발현을 형광 현미경(Olympus) 하에서 확인하였다. 순차적인 VEGF mRNA 발현은 플라스미드 농도에 따라 나타났다(도 4A). VEGF 단백질 농도 측정을 위해 ELISA를 수행하였다. pEF1/HisC:VEGF:EGFP (0.5 μ g) 형질도입된 H9C2 세포 배양 상층액에서, 음성 대조군인 DMEM 또는 세포 배양액과 비교하여 VEGF 단백질 발현이 현저히 증가하였다(up to 2000 pg/mL)(도 4B). 많은 연구에서 MSC가 VEGF를 basal level로 분비함을 알 수 있는데(30), 따라서 본 발명자들은 선별플라스미드 벡터에 의한 VEGF mRNA 또는 단백질 레벨을 확인하기 위하여 H9C2 세포를 이용하였다. 또한, facial 양친매성 담즙산-변형된 폴리에틸렌이민데옥시콜린산; PEI-DA를 비바이러스성 형질도입 시약으로 이용하였다. 플라스미드 DNA에 대한 폴리머; PEI-DA의 최적 중량비는 1:4로 하였다(26).

[0132] 3. pEGFP-C1 및 pAmCyan1-N1p를 이용한 중간엽 줄기세포의 동시 형질도입

[0133] VEGF 발현 벡터 (pEF1/HisC:VEGF)를 최종 선별벡터로 구축됨과 동시에 MSC 로 VEGF 및 EGFP를 동시에 형질도입할 수 있는 벡터로서 구축되었다. 단일 세포로 2개의 유전자가 동등하게 형질도입되는지 확인하기 위하여, 2개 형광 유전자; pEGFP-C1 및 Anemoniamajano cyan 형광단백질 (pAmCyan1-N1)을 이용하였다. PAM-ABP는 생물학적 환원가능한 덴드리머-타입 아르기닌-부착된 폴리머 분자의 컨주게이션 형태로서, 비-바이러스성 형질도입 시약으로 작용한다(31). PEI-DA와 비교하여, 상기 폴리머는 MSC에 약 20-25% 효율로 플라스미드 DNA를 보다 효율적으로 형질도입시킨다. Yong-Wook Won et al에 따라, 외재성 유전자를 중량비 5로 현저히 증가시켰으며, 본 발명자들은 MSC에서 이러한 비-바이러스성 캐리어에 대한 최적 플라스미드 비율을 이용하였다. FACS를 이용하여 동시형질도입 효율을 측정하였다. 도 5D는 단일 유전자(EGFP: 2.09% 또는 AmCyan1: 2.74%) 및 2개 유전자(3.30%)의 세포 흡수율을 나타낸다. 동시 형질도입이 2개 유전자가 단일 세포내에 동시에 존재함을 의미하지만, 일부 세포는 단일 유전자만을 발현할 수 있으며, 이는 2개 유전자가 동등하게 세포 내로 형질도입되지 않았음을 의미한다. 결과적으로, 포유류 세포에서 2개 유전자를 발현하는 선별 플라스미드 벡터는 세포 선별에 유용하게 사용될 수 있다.

[0134]

[0135] 4. 인 비보에서 FACS 시스템에 의한 VEGF-EGFP 형질도입된-MSC 의 선별

[0136] 형질도입된 MSC 선별 조건을 최적화하기 위하여, FACS를 이용하여 MSC에서 비-바이러스성 캐리어의 형질도입 효율을 측정하였다. 도 6A는 VEGF-EGFP 형질도입된 MSC의 형질도입 효율이 22.9%이며, 세포의 순도가 97.5%임을 보여준다. 상기 결과는 비바이러스를 이용한 MSC로의 유전자 전달방법을 이용하는 경우 형질도입 효율이 최소 5% 또는 그 이하이며, 최대 20-25% 라는 이전 연구결과와 일치한다(32, 33). 이러한 결과에 기반하여, 세포 선별의 조건을 결정하였다. 인 비보 실험 그룹은 3 그룹으로 분류하였다: MSCs 자체, 비분리(unsorting) 및 분리(sorting). MSC (100 mm 디쉬 당)에서 비바이러스성 캐리어에 의한 형질도입 효율이 약 20% 이므로, VEGF-EGFP 형질도입된 MSC의 5개 100 mm 디쉬에서 세포를 수거하여 사용하였으며, 100% 형질도입된 MSC로 이루어진 분리 그룹을 위해 VEGF-EGFP 형질도입 MSC를 선별하였다. VEGF-EGFP 형질도입된 MSC의 1개 100 mm 디쉬를 비분리 그룹으로 하였고, 비형질도입된 MSC의 1개 100 mm 디쉬를 MSC 그룹으로 하였다. 전체 세포의 양은 동일하게 2×10^5 개로 하였다. 세포 분리 시스템의 모식도는 도 6C와 같다. 본 발명자들은 적어도 1×10^6 개 세포 또는 그 이상을 이용하는 기존의 다른 연구에서와는 달리(38-40), 소량의 세포(2×10^5 개)를 하지 허혈 마우스에 주입하였다. 세포 선별 조건을 최적화하는 과정에서, 분리된 세포 (VEGF-EGFP transfected MSCs)들은 3일간 배양하였고, 부착된 세포에서 EGFP 발현을 관찰하였다(도 6B).

[0138] 5. 허혈성 하지에서 VEGF-EGFP 형질도입된 MSCs 의 위치

[0139] 허혈성 하지 마우스에서 VEGF-EGFP 형질도입된 MSC의 위치를 분석하기 위하여, 세포 처리 후 2일 제(하지 허혈 유도 후 3일제)에 허혈성 하지의 비복근을 수거하였다. 세포위치는 cellSens, Olympus BX53 형광현미경을 이용하여 관찰하였다. 낮은 배율에서는 비분리 및 분리 그룹에서 비복근의 MSC 주입 부위 근처에서 EGFP 발현 구역이 관찰되었다. EGFP 및 VEGF가 1개의 플라스미드 벡터에 클로닝됨에 따라, EGFP는 VEGF의 지시자로 작용

한다. 이와 동일하게, 분리 그룹은 비분리 그룹과 비교하여 VEGF 양성 MSC의 구역에서 현저한 증가를 나타내었다(약 2.8배)(도 7A 및 7B).

[0140] MSCs 및 비-형질도입 MSC를 관찰하기 위하여, 4', 6-디아미디노-2-페닐인돌 디하이드로클로라이드(DAPI) 염색을 수행하였다. 그러나 DAPI는 살아있는 세포의 세포막을 통과하지 못하므로(41), 고농도 용액에서는 독성을 가질 것이다. Castanheira et al에 따라, DAPI가 DNA에 비공유결합하기 위해 이식된 세포의 표지된 DNA로부터 분리될 수 있다(42).

[0142] 6. VEGF-EGFP 형질도입된 MSC가 이식된 허혈성 하지에서 인간 VEGF-165의 증가

[0143] 이어, VEGF-EGFP 형질도입된 MSC가 이식된 허혈성 하지에서 인간 VEGF-165의 발현을 분석하기 위하여 항 VEGF 항체(ab52917, abcam)를 이용한 면역조직화학 염색을 실시하였다. 도 8A 및 8B는 허혈 유도 후 7일째에, 분리그룹에서 VEGF 발현이 intact MSC 그룹과 비교하여 2.5 배 더 높고, 비분리 그룹과 비교하여 1.5배 더 높은 것을 나타낸다. 항-VEGF 항체는 마우스와 인간 VEGF에 모두 결합한다. 따라서, 마우스 VEGF는 intact MSC 그룹 뿐만 아니라 비분리 및 분리 그룹에서도 검출된다. 그러나, 인간 VEGF-165에 보다 특이적인 항체를 이용하는 추가 분석을 통하여 분리 그룹에서 VEGF 과발현을 분석하였다. 선행연구에서는 혈관신생을 비롯한 VEGF의 다양한 효과가 밝혀졌다(15, 26, 43). 또한 본 발명자들은 VEGF가 특이 수용체(Flk-1 및 Flt-1)를 가진 골격근의 세포사멸을 억제하는 기능이 있음을 밝혔다. 하지 허혈 유도 7일째에 마우스에서 VEGF 발현에 따른 Flk-1 및 Flt-1 발현이 관찰되었다(44). 따라서, VEGF 과발현은 Flk-1 및 Flt-1의 발현에 영향을 준다. 상기 수용체는 허혈성 골격근에 대한 방어기작과 관련된다.

[0145] 7. 세포 선별 그룹의 허혈성 하지에서의 혈액 관류 향상(sorting group)

[0146] 허혈성 하지가 세포 선별 시스템에 의해 치유되어 혈액 관류가 증가하는지 측정하기 위하여 laser Doppler perfusion imager를 이용하였다. 허혈성 및 정상 하지에서 허혈 유도 전 및 후(day 0)에 혈액 관류를 측정하였고, 수술 후 day 3, 7, 14 및 21일째에 측정하였다. 수술 후 day 0에서, 모든 그룹에서 혈액관류가 완전히 막힌 것으로 나타났다. 7일째까지 비분리 및 분리 그룹은 혈액관류가 향상되었고, 반면 intact MSC 그룹은 여전히 허혈성 하지의 혈액관류가 이루어지지 않았다. 21일째에는, 분리 그룹의 허혈성 하지(왼쪽)에서 정상 하지(오른쪽)보다 혈액관류가 현저히 증가하였고, 비분리 그룹에서는 회복이 더디게 나타났으며, intact MSC 그룹에서 가장 낮은 회복력을 나타내었다(도 9A; 상부). 또한, intact MSC 및 비분리 그룹에서는 말초동맥질환의 일반적인 합병증인 절단 및 파행(claudication) 증후가 나타났으며, 반면 분리 그룹에서는 이러한 증상이 나타나지 않았다(도 9A; 하부). 14일 및 21일째에 intact MSC 및 비분리, 또는 분리 그룹에서의 혈액관류가 현저히 다른 것으로 나타났다. 또한, 비분리 및 분리 그룹간의 차이는 21일째에 현저히 나타났다(도 9B). 이러한 결과는 분리 시스템을 거친 세포 선별에 의해 허혈성 하지에서 혈액관류가 현저히 증가하였음을 나타낸다. 또한, 선별 플라스미드 벡터를 이용함으로써 하지 허혈손상에서 일반적인 합병증을 예방할 수 있음을 알 수 있다.

[0148] 8. 세포 선별 그룹 허혈성 하지에서의 괴사 및 섬유화 부분의 감소(sorting group)

[0149] 조직학적 분석을 위하여, 수술 후 21일째에 허혈성 비복근을 수거하였다. 절편을 Masson's trichrome으로 염색하고, 분리 그룹의 비복근에서 섬유화 부위 감소를 확인하였다. 도 10A 및 10B는 비분리 그룹과 비교하여 분리 그룹에서 섬유화 부분이 감소하였으며, 반면 MSC 그룹에서는 높게 나타났다(4.5배). 또한, 분리 그룹은 근육 쇠퇴를 방지하였으나, intact MSC 그룹의 근육 조직은 종종 근괴사 부위가 나타났다. 21일째에는 intact MSCs 그룹 마우스의 2/3 및 비분리 그룹의 절반에서 종종 하지 절단이 나타났고(도 10C.), 이로써 각 그룹간 손상되지 않은 하지 근육을 이용한 섬유화 및 괴사 분석에서는 유의적인 차이점이 없었다.

[0151] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0153] **참조문헌**

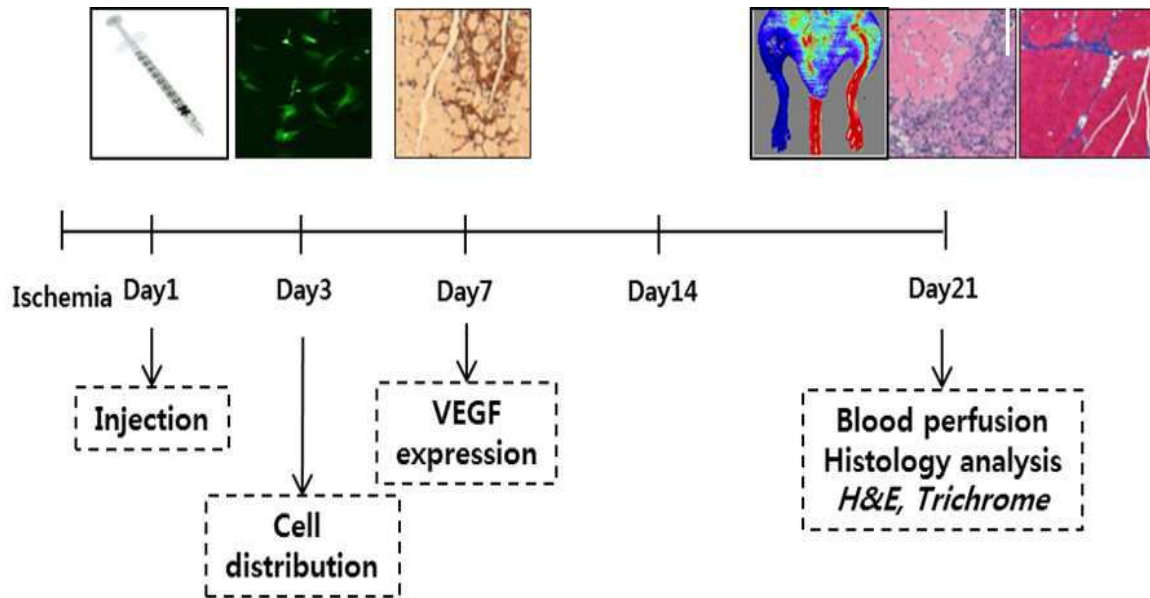
- [0154] 1. Fowkes FGR, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, Norman PE, Sampson UKA, Williams LJ, Mensah GA and Criqui MH. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *The Lancet*. 2013;382:1329-1340.
- [0155] 2. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer treatment and research*. 2004;117:3-32.
- [0156] 3. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF and Isner JM. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *The Journal of clinical investigation*. 1994;93:662-70.
- [0157] 4. Mays LE, Vandenberghe LH, Xiao R, Bell P, Nam HJ, Agbandje-McKenna M and Wilson JM. Adeno-associated virus capsid structure drives CD4-dependent CD8+ T cell response to vector encoded proteins. *Journal of immunology*. 2009;182:6051-60.
- [0158] 5. Nguyen DN, Green JJ, Chan JM, Langer R and Anderson DG. Polymeric materials for gene delivery and DNA vaccination. *Advanced Materials*. 2009;21:847-867.
- [0159] 6. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ and Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000;407:242-8.
- [0160] 7. Lu QL, Bou-Gharios G and Partridge TA. Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory. *Gene therapy*. 2003;10:131-42.
- [0161] 8. Helbling-Leclerc A, Scherman D and Wils P. Cellular uptake of cationic lipid/DNA complexes by cultured myoblasts and myotubes. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1418:165-75.
- [0162] 9. Lemieux P, Guerin N, Paradis G, Proulx R, Chistyakova L, Kabanov A and Alakhov V. A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene therapy*. 2000;7:986-91.
- [0163] 10. Stewart DJ, Kutryk MJ, Fitchett D, Freeman M, Camack N, Su Y, Della Siega A, Bilodeau L, Burton JR, Proulx G, Radhakrishnan S and Investigators NT. VEGF gene therapy fails to improve perfusion of ischemic myocardium in patients with advanced coronary disease: results of the NORTHERN trial. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2009;17:1109-15.
- [0164] 11. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L and Shi YF. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta pharmacologica Sinica*. 2013;34:747-54.
- [0165] 12. Al-Khaldi A, Al-Sabti H, Galipeau J and Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: Improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Annals of Thoracic Surgery*. 2003;75:204-209.
- [0166] 13. Al-Khaldi A, Eliopoulos N, Martineau D, Lejeune L, Lachapelle K and Galipeau J. Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. *Gene therapy*. 2003;10:621-629.
- [0167] 14. Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A, Frommhold D, Apel A, Mattern J, Salnikov AV, Moldenhauer G, Wagner W, Diehlmann A, Saffrich R, Schubert M, Ho AD, Giese N, Buchler MW, Friess H, Buchler P and Herr I. VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *British journal of cancer*. 2008;99:622-31.
- [0168] 15. Pons J, Huang Y, Arakawa-Hoyt J, Washko D, Takagawa J, Ye J, Grossman W and Su H. VEGF improves survival of mesenchymal stem cells in infarcted hearts. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;376:419-22.

- [0169] 16. Melly L, Boccardo S, Eckstein F, Banfi A and Marsano A. Cell and gene therapy approaches for cardiac vascularization. *Cells*. 2012;1:961-75.
- [0170] 17. Melly LF, Marsano A, Frobert A, Boccardo S, Helmrich U, Heberer M, Eckstein FS, Carrel TP, Giraud MN, Tevæarai HT and Banfi A. Controlled angiogenesis in the heart by cell-based expression of specific vascular endothelial growth factor levels. *Human gene therapy methods*. 2012;23:346-56.
- [0171] 18. Deuse T, Peter C, Fedak PW, Doyle T, Reichenspurner H, Zimmermann WH, Eschenhagen T, Stein W, Wu JC, Robbins RC and Schrepfer S. Hepatocyte growth factor or vascular endothelial growth factor gene transfer maximizes mesenchymal stem cell-based myocardial salvage after acute myocardial infarction. *Circulation*. 2009;120:S247-54.
- [0172] 19. Zhang G, Gurtu V and Kain SR. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996;227:707-711.
- [0173] 20. Soboleski MR, Oaks J and Halford WP. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. *FASEB Journal*. 2005;19:440-442.
- [0174] 21. Kim H, Kim MS, Wee G, Lee CI, Kim H and Kim JS. Magnetic separation and antibiotics selection enable enrichment of cells with ZFN/TALEN-induced mutations. *PloS one*. 2013;8:e56476.
- [0175] 22. Johnston K, Clements A, Venkataramani RN, Trievel RC and Marmorstein R. Coexpression of proteins in bacteria using T7-based expression plasmids: expression of heteromeric cell-cycle and transcriptional regulatory complexes. *Protein expression and purification*. 2000;20:435-43.
- [0176] 23. Byun HM, Suh D, Jeong Y, Wee HS, Kim JM, Kim WK, Ko JJ, Kim JS, Lee YB and Oh YK. Plasmid vectors harboring cellular promoters can induce prolonged gene expression in hematopoietic and mesenchymal progenitor cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;332:518-23.
- [0177] 24. Kim S, Kim GJ, Miyoshi H, Moon SH, Ahn SE, Lee JH, Lee HJ, Cha KY and Chung HM. Efficiency of the elongation factor-1 α promoter in mammalian embryonic stem cells using lentiviral gene delivery systems. *Stem cells and development*. 2007;16:537-45.
- [0178] 25. Wen S, Zhang H, Li Y, Wang N, Zhang W, Yang K, Wu N, Chen X, Deng F, Liao Z, Zhang J, Zhang Q, Yan Z, Liu W, Zhang Z, Ye J, Deng Y, Zhou G, Luu HH, Haydon RC, Shi LL, He TC and Wei G. Characterization of constitutive promoters for piggyBac transposon-mediated stable transgene expression in mesenchymal stem cells (MSCs). *PloS one*. 2014;9:e94397.
- [0179] 26. Moon HH, Joo MK, Mok H, Lee M, Hwang KC, Kim SW, Jeong JH, Choi D and Kim SH. MSC-based VEGF gene therapy in rat myocardial infarction model using facial amphipathic bile acid-conjugated polyethyleneimine. *Biomaterials*. 2014;35:1744-54.
- [0180] 27. Cho YH, Park H, Ch ES, Kim WJ, Kang BS, Park BY, Kim YJ, Lee YI, Chang SI and Park K. A novel way of therapeutic angiogenesis using an adeno-associated virus-mediated angiogenin gene transfer. *Experimental and Molecular Medicine*. 2007;39:412-418.
- [0181] 28. Liu ZH, Meng GW, Wang BW, Liu CL, Zhou YM and Wang Y. Research on human placenta-derived mesenchymal stem cells transfected with pIRES2-EGFP-VEGF165 using liposome. *Afr J Biotechnol*. 2011;10:7727-7735.
- [0182] 29. Rucker P, Torti FM and Torti SV. Recombinant ferritin: modulation of subunit stoichiometry in bacterial expression systems. *Protein engineering*. 1997;10:967-73.
- [0183] 30. Boomsma RA and Geenen DL. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PloS one*. 2012;7:e35685.
- [0184] 31. Won YW, McGinn AN, Lee M, Nam K, Bull DA and Kim SW. Post-translational regulation of a hypoxia-responsive VEGF plasmid for the treatment of myocardial ischemia. *Biomaterials*. 2013;34:6229-38.

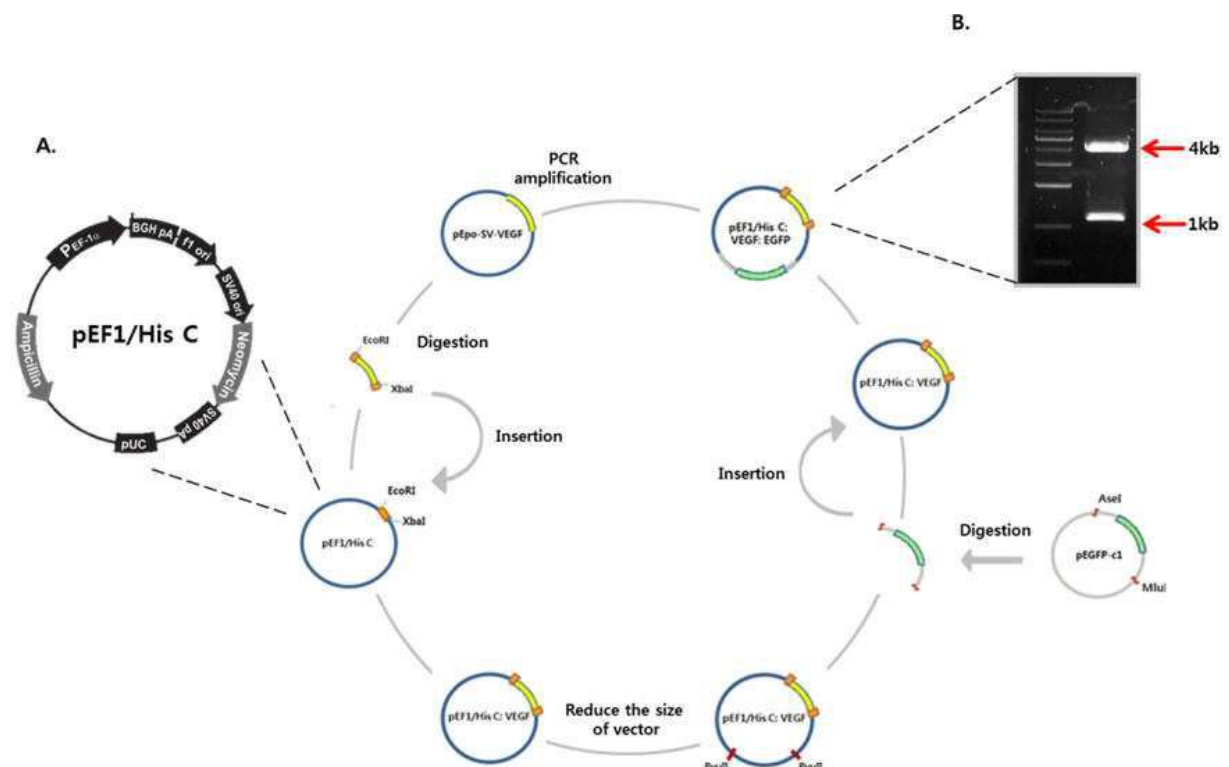
- [0185] 32. Madeira C, Mendes RD, Ribeiro SC, Boura JS, Aires-Barros MR, da Silva CL and Cabral JMS. Nonviral Gene Delivery to Mesenchymal Stem Cells Using Cationic Liposomes for Gene and Cell Therapy. *J Biomed Biotechnol*. 2010.
- [0186] 33. Abdul Halim NS, Fakiruddin KS, Ali SA and Yahaya BH. A comparative study of non-viral gene delivery techniques to human adipose-derived mesenchymal stem cell. *International journal of molecular sciences*. 2014;15:15044-60.
- [0187] 34. Janowski M, Lyczek A, Engels C, Xu J, Lukomska B, Bulte JW and Walczak P. Cell size and velocity of injection are major determinants of the safety of intracarotid stem cell transplantation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2013;33:921-7.
- [0188] 35. Ishikawa K. Intracoronary Injection of Large Stem Cells: Size Matters. *Circulation: Cardiovascular Interventions*. 2015;8.
- [0189] 36. Yavagal DR, Lin B, Raval AP, Garza PS, Dong C, Zhao W, Rangel EB, McNiece I, Rundek T, Sacco RL, Perez-Pinzon M and Hare JM. Efficacy and dose-dependent safety of intra-arterial delivery of mesenchymal stem cells in a rodent stroke model. *PloS one*. 2014;9:e93735.
- [0190] 37. Murphy MB, Moncivais K and Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & molecular medicine*. 2013;45:e54.
- [0191] 38. Lian Q, Zhang Y, Zhang J, Zhang HK, Wu X, Zhang Y, Lam FF, Kang S, Xia JC, Lai WH, Au KW, Chow YY, Siu CW, Lee CN and Tse HF. Functional mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice. *Circulation*. 2010;121:1113-23.
- [0192] 39. Yang F, Cho SW, Son SM, Bogatyrev SR, Singh D, Green JJ, Mei Y, Park S, Bhang SH, Kim BS, Langer R and Anderson DG. Genetic engineering of human stem cells for enhanced angiogenesis using biodegradable polymeric nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107:3317-22.
- [0193] 40. Rahman MM, Subramani J, Ghosh M, Denninger JK, Takeda K, Fong G-H, Carlson ME and Shapiro LH. CD13 Promotes Mesenchymal Stem Cell-mediated regeneration of ischemic muscle. *Frontiers in Physiology*. 2014;4.
- [0194] 41. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*. 1995;70:220-33.
- [0195] 42. Castanheira P, Torquetti LT, Magalhas DR, Nehemy MB and Goes AM. DAPI diffusion after intravitreal injection of mesenchymal stem cells in the injured retina of rats. *Cell transplantation*. 2009;18:423-31.
- [0196] 43. Yuan L, Wu MJ, Sun HY, Xiong J, Zhang Y, Liu CY, Fu LL, Liu DM, Liu HQ and Mei CL. VEGF-modified human embryonic mesenchymal stem cell implantation enhances protection against cisplatin-induced acute kidney injury. *American journal of physiology Renal physiology*. 2011;300:F207-18.
- [0197] 44. Germani A, Di Carlo A, Mangoni A, Straino S, Giacinti C, Turrini P, Biglioli P and Capogrossi MC. Vascular endothelial growth factor modulates skeletal myoblast function. *The American journal of pathology*. 2003;163:1417-28.

도면

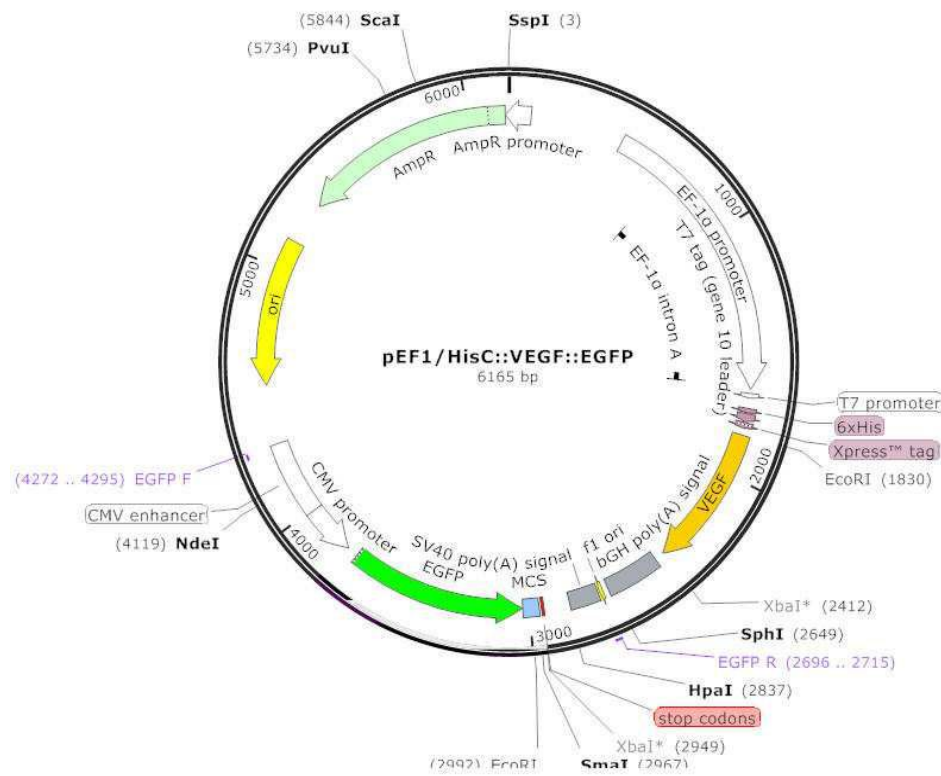
도면1



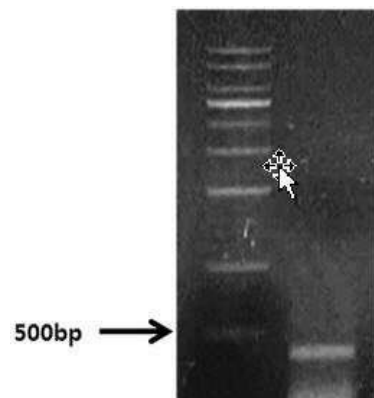
도면2a



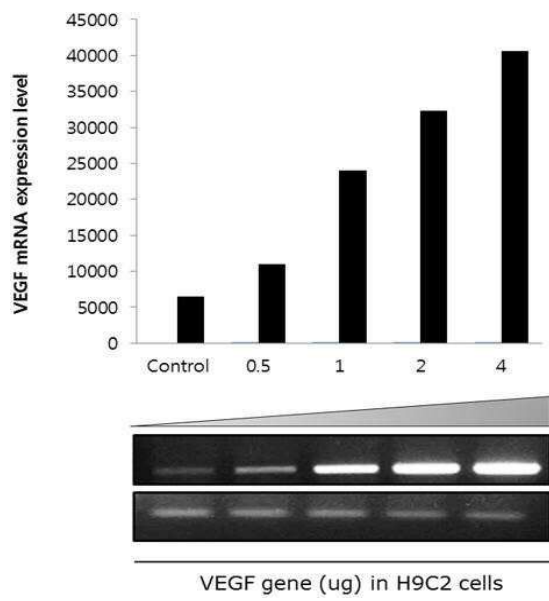
도면2b



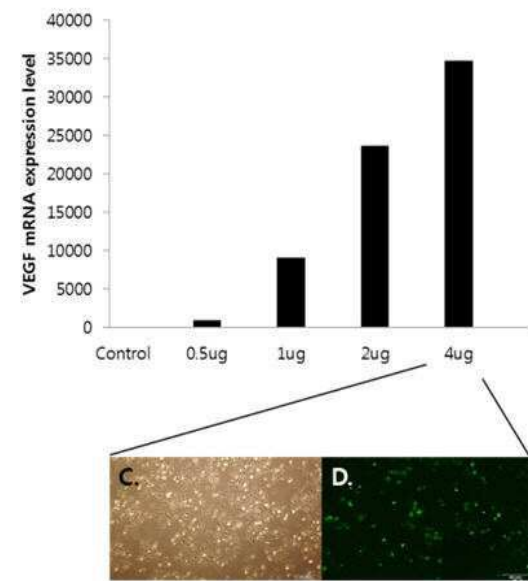
도면3a



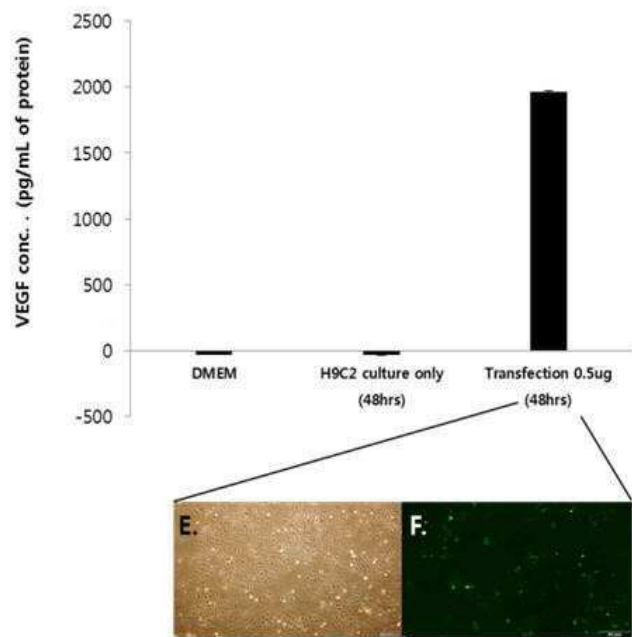
도면3b



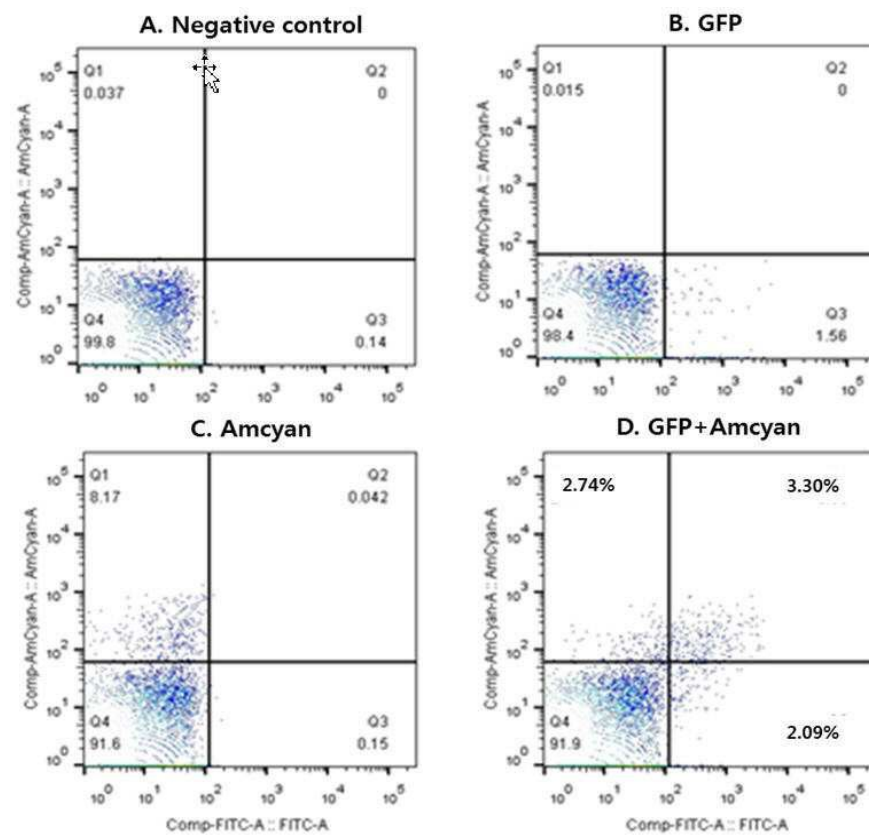
도면4a



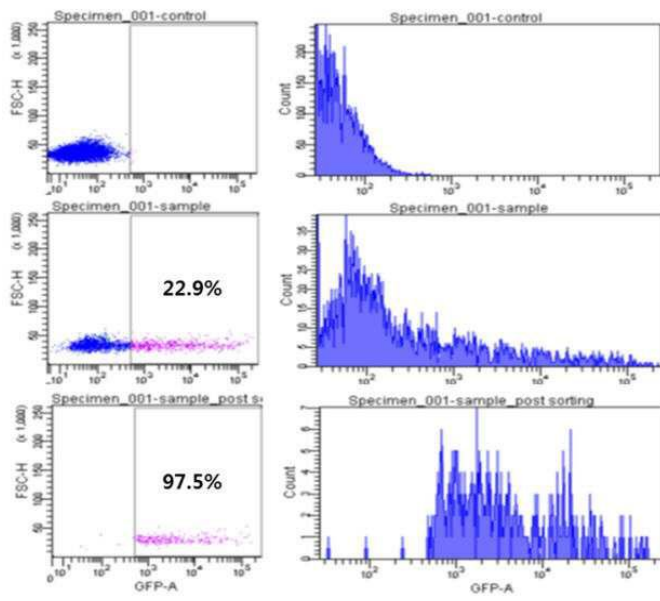
도면4b



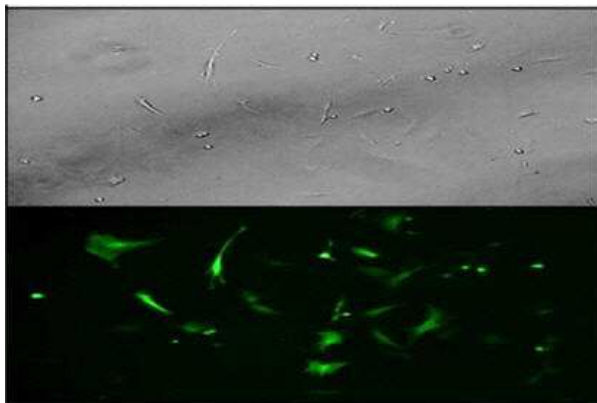
도면5



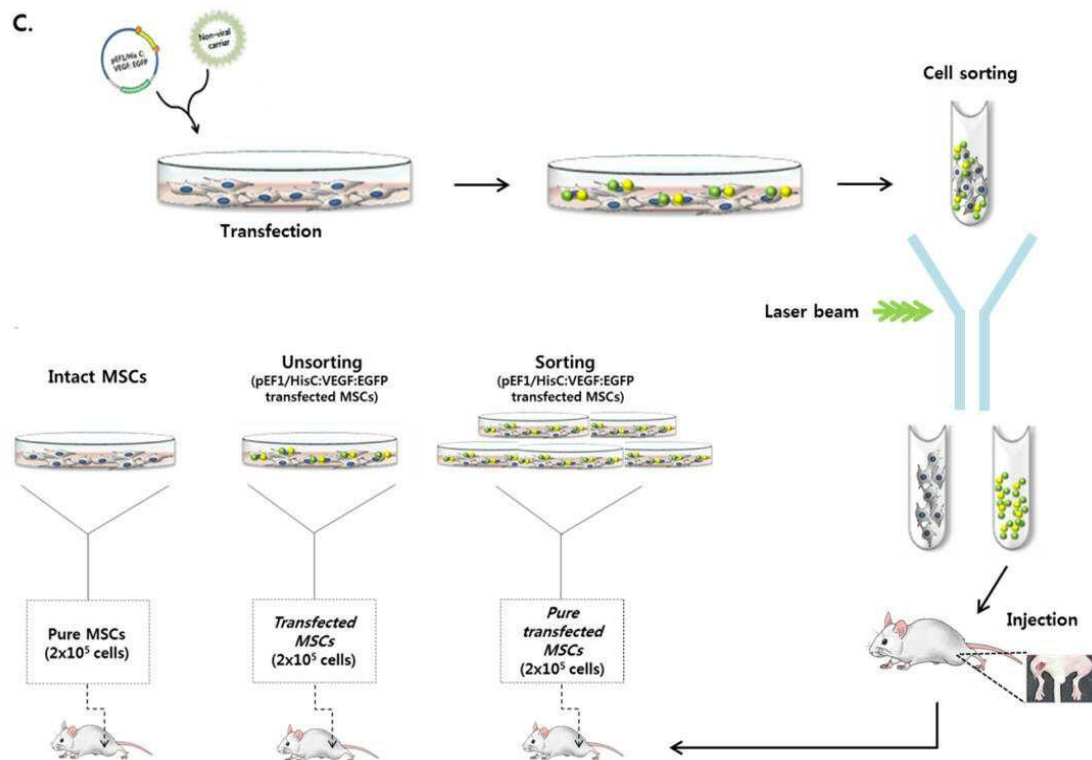
도면6a



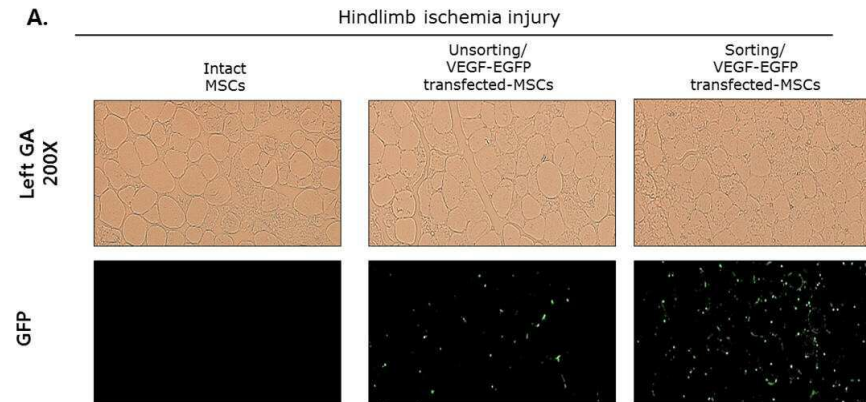
도면6b



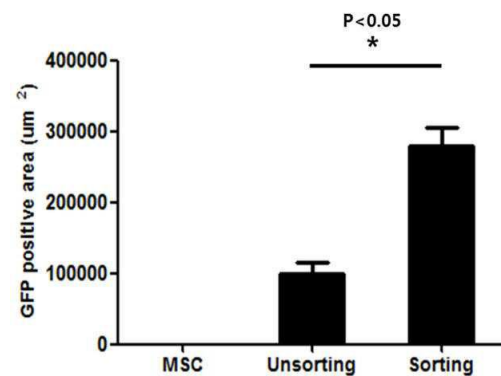
도면6c



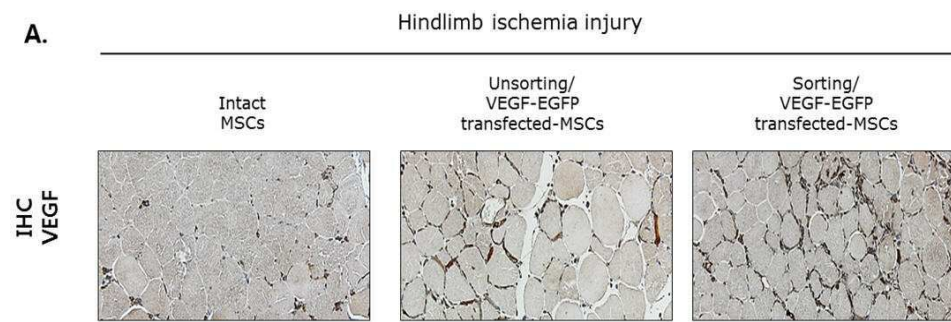
도면7a



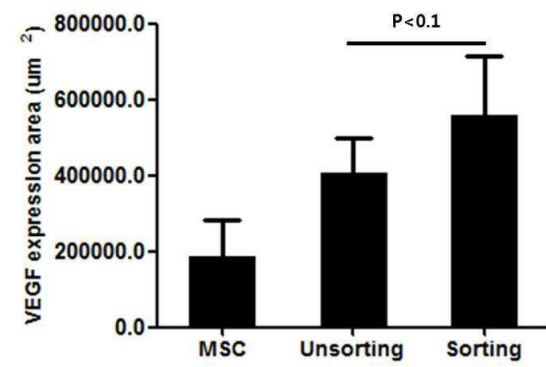
도면7b



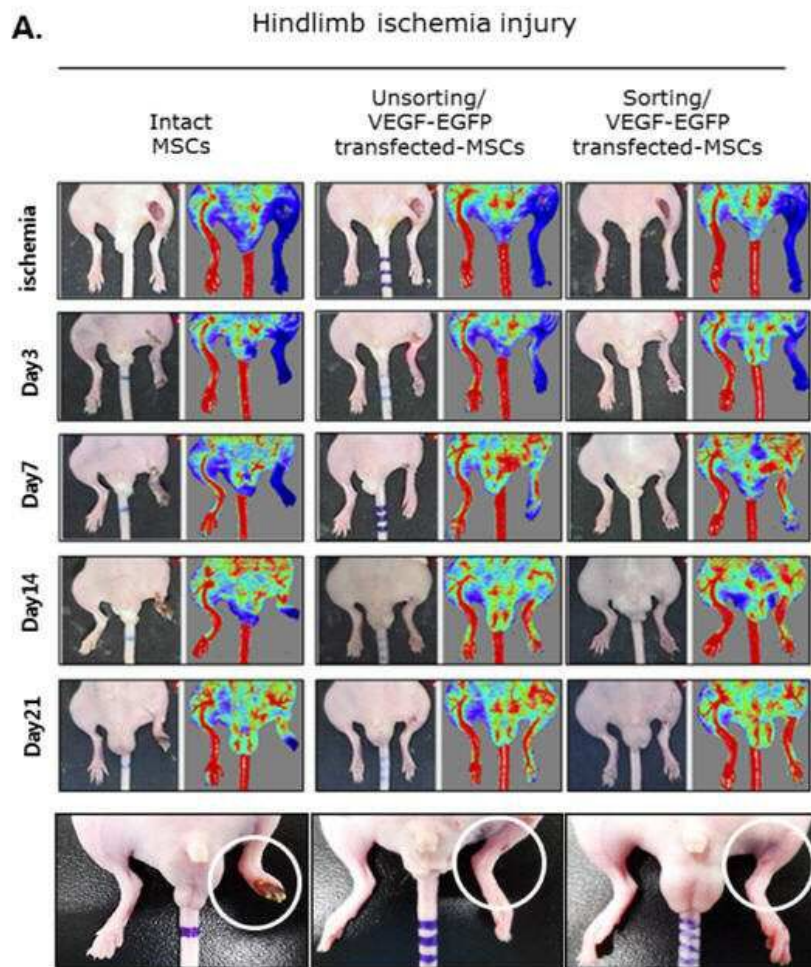
도면8a



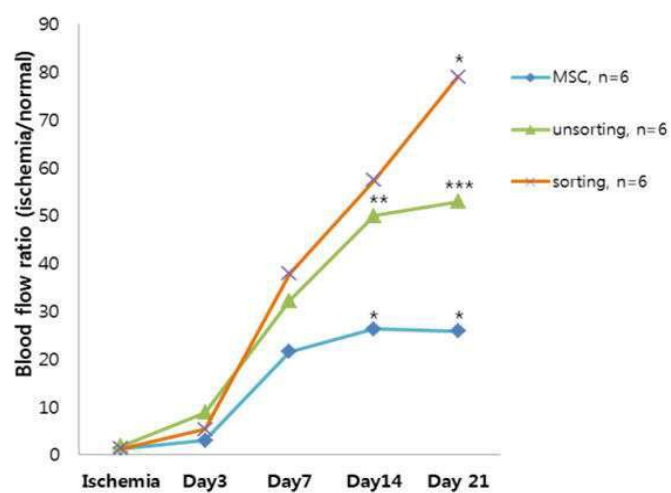
도면8b



도면9a



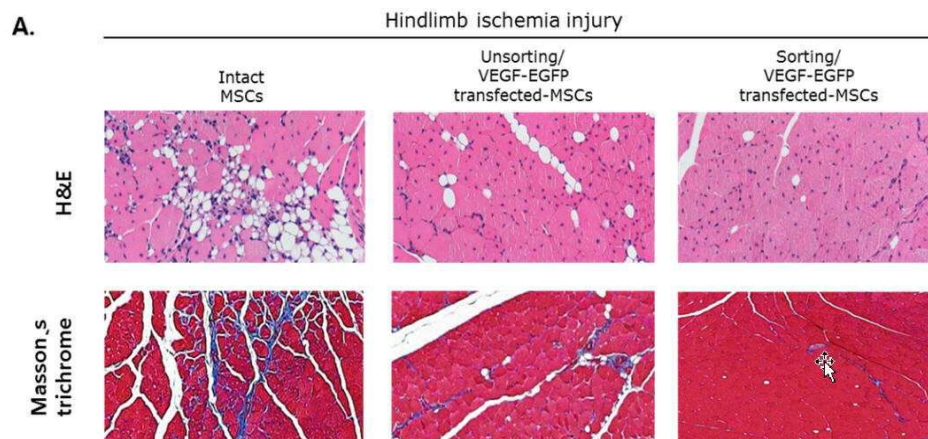
도면9b



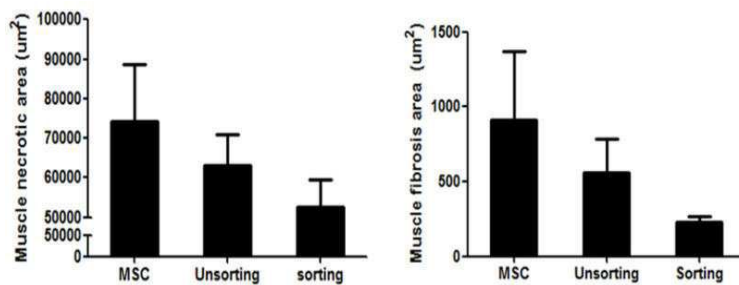
Upper: Unsorting vs Sorting, * = $P < 0.05$
 Middle: MSC vs Sorting, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$
 Bottom: MSC vs Unsorting, * = $P < 0.05$

By Two-way ANOVA statistics

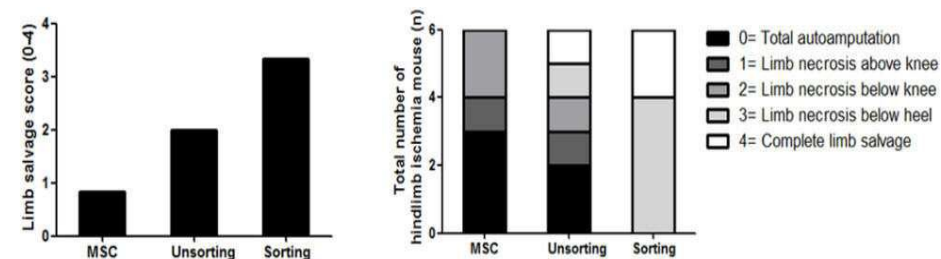
도면10a



도면10b



도면10c



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY
- <120> A method for selecting stem cells using green fluorescence protein-expressing gene and cell therapeutics comprising thereof
- <130> PN150438
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 608
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> VEGF gene

<400> 1

gaattcatga actttctgct gtcttgggtg catlggagcc ttgccttgct gctctacctc	60
cacatgccca agtgggtccca ggctgcaccc atggcagaag gaggagggca gaatcatcac	120
gaagtgggtga agttcatgga tgtctatcag cgcagctact gccatccaat cgagaccctg	180
gtggacatct tccaggagta ccctgatgag atcgagtaca tcttcaagcc atcctgtgtg	240
cccctgatgc gatgcggggg ctgctgcaat gacgagggcc tggagtgtgt gcccactgag	300
gagtccaaca tcacatgca gattatgcgg atcaaaccct accaaggcca gcacatagga	360
gagatgagct tcttacagca caacaaatgt gaatgcagac caaagaaaga tagagcaaga	420
caagaaaatc cctgtgggcc ttgctcagag cggagaaagc atttgtttgt acaagatccg	480
cagacgtgta aatgttcctg caaaaacaca gactcgcgtt gcaaggcgag gcagcttgag	540
ttaaacgaac gtacttgcag atgtgacaag ccgaggcggt gatctagaga atgaagagga	600
tccagatc	608

<210> 2

<211> 1638

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFP gene

<400> 2

taatagtaat caattacggg gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca	60
taacttacgg taaatggccc gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca	120
ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg	180
gagtatttac ggtaaacctgc ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtacg	240
ccccctattg acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc	300
ttatgggact ttctacttg gcagiacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg	360
atgcggtttt ggcagtacat caatgggcgt ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca	420
agtctccacc ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt	480
ccaaaatgtc gtaacaactc cgccccattg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg	540
gaggtctata taagcagagc tggtttagtg aaccgtcaga tccgctagcg ctaccggtcg	600
ccacatggt gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccac ctaggtcgagc	660
tggacggcga cgtaaacggc cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgccca	720

cctacggcaa gctgacctg aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc gtgccctggc	780
ccaccctcgt gaccacctg acctacggcg tgcagtgtt cagccgtac cccgaccaca	840
tgaagcagca cgacttcttc aagtccgcca tgcgcgaagg ctacgtccag gagcgacca	900
tccttctcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc gagggcgaca	960
ccctggtgaa ccgcatcgag ctgaaggga tgcatttaa ggaggacggc aacatcctgg	1020
ggcacaagct ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga	1080
agaacggcat caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc	1140
tcgccgacca ctaccagcag aacaccccca tcggcgacgg ccccgctgtg ctgcccgaca	1200
accactacct gagcaccag tccgccctga gcaaagacc caacgagaag cgcatcaca	1260
tggctcctgt ggagtctgt accgccgccc ggatcactct cggcatggac gagctgtaca	1320
agtccggact cagatctcga gctcaagctt cgaattctgc agtcgacgg accgcggggc	1380
cgggatccac cggatctaga taactgatca taatcagcca taccacattt gtagaggttt	1440
tacttgcttt aaaaaacctc ccacacctcc cctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa	1500
ttgttgtgt taacttgttt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca	1560
caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggttg tccaaactca	1620
tcaatgtatc ttaacgcg	1638
<210> 3	
<211> 1172	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> EF-1 alpha promoter	
<400> 3	
gtgcccgta gtggcagag cgcacatcgc ccacagtcgc cgagaagttg gggggagggg	60
tcggcaattg aaccggtgcc tagagaaggt ggcgcggggt aaactgggaa agtgatgtcg	120
tgtagtggt ccgccttttt cccgaggggt ggggagaacc gtatataagt gcagtagtcg	180
ccgtgaacgt tctttttcgc aacgggtttg ccgccagaac acaggttaagt gccgtgtgtg	240
gttcccgagg gcttggcctc tttaggggtt atggccttg cgtgccttga attacttcca	300
cctggctgca gtacgtgatt cttgatcccg agcttcgggt tggaagtggg tgggagagtt	360
cgaggccttg cgcttaagga gcccttcgc ctctgtcttg agttgaggcc tggcctgggc	420
gctggggcgc ccgctgcca atctggtggc accttcgcgc ctgtctcgt gctttcgata	480
agttcttagc catttaaaat ttttgatgac ctgtcgcgac gcttttttc tggcaagata	540

gtcttgtaaa tgcgggcca gatctgcaca ctggtatttc ggTTTTTggg gccgcgggcg 600
 gcgacggggc ccgtgcgtcc cagcgcacat gtccggcgag gcggggcctg cgagcgcggc 660
 caccgagaat cggacggggg tagtctcaag ctggccggcc tgctctggtg cctggcctcg 720
 cgccgccgtg tatcgcctcc ccctgggcgg caaggtctggc ccggtcggca ccagttgcgt 780
 gagcggaag atggccgctt cccggccctg ctgcaggag ctcaaatgg aggacgcggc 840
 gtcgggaga gcgggcgggt gagtcacca cacaaggaa aaggccttt ccgtctcag 900
 ccgtcgcttc atgtgactcc acggagtacc gggcgccgtc caggcacctc gattagtct 960

cgagcttttg gactacgtc tctttaggtt ggggggaggg gttttatgcg atggagtctc 1020
 cccacactga gtgggtggag actgaagtta ggccagcttg gcacttgatg taattctcct 1080
 tggaaatttg cctttttgag ttggatctt ggttcattct caagcctcag acagtggttc 1140
 aaagtttttt tcttccattt caggtgtcgt ga 1172

<210> 4

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CMV promoter

<400> 4

gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctg gtttagtgaa 60
 ccgtcagatc 70