



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년03월07일
 (11) 등록번호 10-1713407
 (24) 등록일자 2017년02월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C12N 5/09 (2010.01) *C12N 7/00* (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-0044519
 (22) 출원일자 2015년03월30일
 심사청구일자 2015년03월30일
 (65) 공개번호 10-2015-0113908
 (43) 공개일자 2015년10월08일
 (30) 우선권주장
 1020140037835 2014년03월31일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌
 I Peter 등. Gene Therapy. Vol. 10, No. 7, 페이지 530-539 (2003.)*
 Bao Y et al., Prostate. Vol.64(4), pp.401-407. (2005. 9.)
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
 (72) 발명자
송재진
 서울시 서대문구 성산로 250 연세대 의과대학 암연구소 러들로 교수동 330호
김주항
 서울특별시 양천구 목동동로 339, C-1207호 (목동, 목동트윈빌)
강수진
 서울시 서대문구 연세로 50 연세의료원 암센터 4층 암연구소
 (74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 2 항

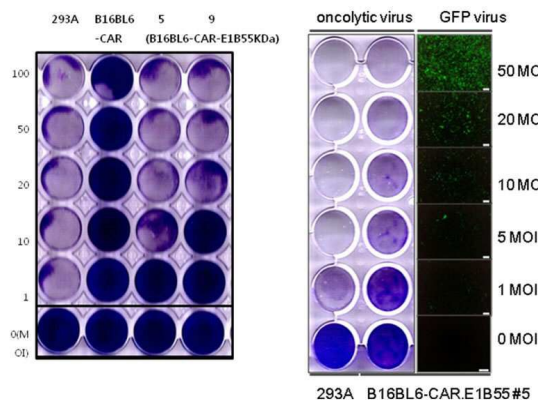
심사관 : 신원혜

(54) 발명의 명칭 **아데노바이러스 감염 및 복제가 가능한 흑색종 세포주**

(57) 요약

본 발명은 아데노바이러스 감염 및 복제가 가능한 흑색종 마우스 세포주에 관한 것이다. 본 발명에 따른 흑색종 세포주는 아데노바이러스를 이용한 암 유전자 치료 마우스 모델로서의 기준이 될 것으로 기대된다.

대표도 - 도15



(52) CPC특허분류

C12N 5/0693 (2013.01)

C12N 7/00 (2013.01)

C12N 2710/10111 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10035562

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 연세대학교

연구사업명 지식경제부 산업원천기술개발

연구과제명 면역치료내성 극복형 항암 핵산치료제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2010.04.01 ~ 2015.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

CAR(Coxsackievirus and Adenovirus Receptor)와 E1B55kD를 동시에 발현하며, 아데노바이러스 감염 및 복제가 가능한 흑색종 마우스 세포주.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

B16BL6/CAR-E1B55KD로 명명된 흑색종 세포주[KCLRF-BP-00313].

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 아데노바이러스 감염 및 복제가 가능한 흑색종 마우스 세포주에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 마우스 세포주에 대해서 아데노바이러스의 복제는 거의 일어나지 않는 것으로 알려져 있다[비특허문헌 1,2]. 현재 아데노바이러스를 이용한 유전자 치료에 사용되는 대부분의 연구들은 면역결핍된 마우스에 사람의 종양세포를 이종 이식하는 형태로 이루어지고 있다[비특허문헌 3]. 이러한 접근방식은 면역결핍된 마우스는 숙주의 면역 반응을 대표하지 못하며 아데노바이러스 투여 시 이미 존재하는 면역성이 결여되어 있거나 혹은 면역유전자를 탑재하는 아데노바이러스 벡터의 효력을 검증할 수 없다는 근본적인 단점이 존재한다.

[0003] 이에 대한 대안으로 최근에는 시리아 햄스터를 이용한 동물 종양 모델이 종양 아데노바이러스(oncolytic adenovirus) 벡터를 이용한 유전자 치료 관련 연구에 사용되고 있다[비특허문헌 3~5].

[0004] 그러나 현재까지 확립된 햄스터 세포주가 많음에도 불구하고 햄스터 특이적인 시약(reagent)들의 개발이 많이 부족한 실정이다. 그 결과, 면역능이 있는 마우스모델을 이용하여 사람의 아데노바이러스 벡터 시험하는 것이 현재까지 확립되고 있지 못하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) Blair, G.E. et al., Virus Res 14 (1989) 339-346
- (비특허문헌 0002) Ying, B et al., Cancer Gene Ther 16 (2009) 625-637
- (비특허문헌 0003) Thomas, M.A. et al., Methods Mol Med 130 (2007) 169-183
- (비특허문헌 0004) Dhar, D. et al., Methods Mol Biol 797 (2012) 53-63
- (비특허문헌 0005) Wold, W.S. et al., Adv Cancer Res 115 (2012) 69-92.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 연구 노력한 결과, 아데노바이러스에 대한 감염능을 높임과 동시에 바이러스의 복제능을 부여하는데 필수적인 역할을 하는 유전자들의 동정과 동시발현 기술을 이용하여 흑색종 마우스 세포주를 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0007] 따라서, 본 발명은 아데노바이러스 감염 및 복제가 가능한 흑색종 세포주를 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서, 본 발명은 아데노바이러스 감염 및 복제가 가능한 흑색종 세포주를 제공한다.

발명의 효과

- [0009] 본 발명은 재조합된 마우스 흑색종 세포를 사용하여 면역능이 있는 흑색종 마우스 모델에서 사람의 종양 아데노바이러스(oncolytic adenovirus)가 효과적으로 감염 및 복제가 증가하는 것을 관찰하고 실험적으로 이를 증명하였다. 이를 위하여 먼저 흑색종 세포주에 인간 유래의 CAR (Coxsackievirus and adenovirus receptor)와 아데노바이러스의 E1B55kD를 도입시켜 새로운 형태의 세포주를 제작하고 GFP 발현하는 아데노바이러스에 의해 감염율이 증가하고 종양살상형 아데노바이러스를 사용하여 바이러스 생산이 증가한 것을 확인하여 복제 향상을 확인하였다.
- [0010] 본 발명과 같이, 흑색종 세포주에 CAR와 E1B55KD의 도입에 의한 감염율과 복제율이 획기적으로 증가한 것은 간암, 폐암, 췌장암 및 유방암 등을 비롯한 다른 암종에 적용 확대할 수 있는 길이 열리게 된 것이다. 이는 지금까지 아데노바이러스를 이용한 유전자 치료에서 *in vivo* 모델에 주로 사용되어온 면역결핍 마우스를 대체할 수 있으므로 면역관련 유전자를 탑재한 아데노바이러스의 면역증강요소에 의한 항종양 효과 등을 매우 real하게 측정할 수 있다. 또한, 본 발명은 아데노바이러스를 이용한 암 유전자 치료 마우스모델로서의 기준이 될 것이며 multi-targets 유전자들의 효능확인 결과는 임상적용 가능성을 동물모델에서 정확히 예측하게 되는 첫 시발점이 될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 클로닝된 CAR의 pDrive 도입 후 염기서열 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 pDrive 클로닝 벡터 및 293A로부터 CAR 유전자가 증폭된 것이 pDrive 클로닝벡터에 삽입된 것을 제한효소로 잘라 CAR 유전자(화살표)가 삽입된 것을 나타낸 것이다
- 도 3은 pcDNA3.1 hygro의 HindIII/BamHI 부위에 CAR가 도입된 것을 확인한 것이고(좌), pcDNA3.1 hygro에 제한효소 HindIII/BamHI으로 double digestion하여 CAR 유전자가 도입된 것을 확인한 것이다(우).
- 도 4는 CAR의 발현을 웨스턴 블랏팅으로 확인한 것이다[1~6:CAR가 발현되는 세포주 클론들을 선별하여 발현 수준을 조사].
- 도 5는 마우스 흑색종 세포주인 B16F10와 B16F10-CAR에서 각각 아데노바이러스의 감염율을 확인한 것이다.
- 도 6은 마우스 흑색종 세포주인 B16BL6와 B16BL6-CAR에서 각각 아데노바이러스의 감염율을 확인한 것이다.
- 도 7은 pIRES-CAR 벡터를 나타낸 것이다.
- 도 8은 pIRES-CAR 벡터의 서브클로닝(Subcloning) 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 클로닝된 CAR의 pIRES 도입 후 염기서열 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 pIRES-CAR에 E1B55kDa가 삽입된 것을 PCR로 확인한 것이다

도 11은 pIRES-CAR에 삽입된 E1B55kD 염기서열 분석 결과를 나타낸 것이다

도 12는 CAR와 E1B55KD PCR 산물이 제한효소 절단 후 pIRES에 삽입된 모식도이다.

도 13은 CAR와 E1B55kD가 동시에 발현되는 B16BL6 세포주 및 CAR만 발현되는 세포주의 바이러스 복제를 확인한 것이다.

도 14는 CAR와 E1B55kD가 동시에 발현되는 B16BL6 세포주에서 E1B55kD의 발현을 웨스턴 블랏팅으로 확인한 것이다.

도 15는 바이러스 복제에 의한 세포용혈 현상을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 아데노바이러스 감염 및 복제가 가능한 흑색종 마우스 세포주에 관한 것이다.
- [0013] 상기 흑색종 마우스 세포주는 CAR와 E1B55kD를 동시에 발현하는 것에 그 특징이 있다.
- [0014] 본 발명에 따른 흑색종 마우스 세포주를 B16BL6/CAR-E1B55KD로 명명하였으며, 이를 한국세포주연구재단에 2014년 3월 27일자로 기탁하여 기탁번호 KCLRF-BP-00313를 부여받았다.
- [0015] 본 발명자들은 인간 아데노바이러스가 마우스 세포로의 감염능이 현저히 떨어지는 점을 감안하여, 감염능 및 복제율이 향상된 마우스 종양 세포주를 개발하였다.
- [0016] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0017] **실시예 1: B16BL6/CAR-E1B55KD 흑색종 세포주[KCLRF-BP00313] 제조**
- [0018] 인간 아데노바이러스는 마우스 세포로의 감염능이 현저히 떨어진다는 점이다[Virus Res. 14: 339 by Blair et al., 1989]. 이에 감염능이 향상된 마우스 세포주를 제작하기 위하여 CAR(Coxsackievirus and adenovirus receptor)를 발현하는 pcDNA3.1 hygro 구조체를 제작하였다.
- [0019] 293A(Life technologies : R705-07)로부터 RNA를 추출하고 역전사 효소(reverse transcriptase)를 사용하여 cDNA를 제작하였다.
- [0020] CAR[서열번호 1]에 대한 프라이머(센스 프라이머: 5'-atggc gctcc tgctg tgcttc-3' [서열번호 6], 안티센스 프라이머: 5'-ctata ctata gacc atccttg-3' [서열번호 7])를 사용하여 PCR을 실시하였다.
- [0021] <PCR 조건>
- [0022] 예열: 95℃ 5 min,
- [0023] 변성: 95℃ 30sec, 어닐링: 55℃ 30sec, 신장: 72℃ 1min 30 sec-> 34 cycles
- [0024] 최종 신장: 72℃ 5min.
- [0025] PCR 산물[서열번호 2]을 Qiagen 클로닝 벡터인 pDrive(Qiagen, Valencia, CA, USA) 클로닝 벡터에 연결하였다 (도 2).
- [0026] 그 다음 pcDNA3.1 hygro(Invitrogen, USA)에 서브클로닝은 5'-HindIII, 3'-BamHI으로 실시하여 pcDNA3.1 hygro/CAR 구조체를 얻었다(도 3). CAR의 발현을 웨스턴 블랏팅으로 확인하고[도 4], 마우스 흑색종 세포주인 B16F10-CAR와 B16BL6-CAR 각각에서 B16F10과 B16BL6 보다 아데노바이러스의 감염율이 향상되었다(도 5 및 도 6).
- [0027] CAR와 E1B55kDa를 동시에 발현하는 구조체(construct)의 제작은 pIRES 벡터(Clontech, USA)를 이용하였다.
- [0028] CAR의 pIRES로의 도입은 앞서 언급한 cDNA를 주형(template)으로 하여 5'에 NheI, 3'에 EcoRI 부위를 넣은 프라이머를 제작하였다. 센스 프라이머: 5'-ATA GCT AGC ATG GCG CTC CTG CTG TGC TT 3' [서열번호 8], 안티센스

프라이머: 5'-GCG CGA ATT CCT ATA CTA TAG ACC CAT CC 3' [서열번호 9]으로 앞의 PCR 조건과 동일하게 실시하였다. 생성된 PCR 산물[서열번호 3]과 pIRES 벡터를 NheI, EcoRI로 잘라 연결하여 pIRES-CAR 벡터를 제작하였다 [도 7]. 클로닝 결과는 도 8과 같으며, CAR 유전자가 레인 3과 6에서 제대로 서브클로닝됨을 알 수 있었다. 도 9는 pIRES에 들어간 CAR DNA 염기서열을 분석한 것이다.

- [0029] 상기 벡터와 별도로 E1B55KD를 클로닝하였다.
- [0030] pBSKII-3484(Strategene)에 포함되어 있는 E1B55KDa 이용하였다.
- [0031] E1B55KDa 역시 제한효소 부위(enzyme site)를 넣은 프라이머를 가지고 PCR을 실시하였다. 5'에는 SalI, 3'에는 NotI 인식염기서열을 삽입하였다. 즉, 센스 프라이머는 5' ACT GTC GAC ATG GAG CGA AGA AAC CCA TC 3' [서열번호 10]이고, 안티센스 프라이머는 5' ATA GCG GCC GCT CAA TCT GTA TCT TCA TCG 3' [서열번호 11]을 사용하여 앞서 사용한 PCR 조건과 동일하게 PCR을 실시한 후, PCR 산물[서열번호 5]과 pIRES-CAR 벡터를 SalI, NotI로 잘라 연결하였다 (pIRES-CAR-E1B55KD)[도 12]. 서브클로닝(Subcloning) 결과는 기술한 PCR 프라이머를 사용하여 PCR하여 삽입 여부를 확인하였다. 도 10에서 보듯이 1번을 제외한 나머지 전부 삽입된 것을 관찰하였다. 여기서, P는 pcDNA3-E1B55kd로서 양성 대조군(positive control)을 의미한다.
- [0032] 도 12는 CAR와 E1B55KD의 PCR 산물을 제한효소로 잘라 pIRES에 삽입한 모식도를 나타낸다.
- [0033] CAR와 E1B55kd가 동시에 발현되는 B16BL6 세포주는 G418로 선별한 클론들 중에서 바이러스 생성량이 많은 클론 5번 세포주를 사용하여 복제율 증가실험을 실시하였다. 이 경우, CAR만 발현되는 B16BL6 세포주에 비해 약 100배 가량 바이러스 복제가 증가되는 것을 바이러스 감염 2일 후에 배지 및 세포 내에 있는 감염능이 있는 바이러스의 titration을 조사함으로써 확인하였다(도 13). B16BL6 세포주에서 E1B55kd가 발현되는 것을 E1B55kd에 대한 E1B55KD 단백질의 N-말단에서 유래한 25 mer 길이의 합성펩타이드 MERRNPSEKGVPAFGSGHASVESGC [서열번호 12]로부터 E1B55kd에 대한 다클론항체(polyclonal antibody)를 제작하여 발현되는 것을 웨스턴 실험으로 확인하였다 (도 14).
- [0034] 뿐만 아니라 바이러스 복제에 의한 세포용혈 현상이 CAR와 E1B55kd가 동시에 발현되고 있는 세포주에서 매우 효과적으로 일어나고 있음을 관찰하였다 (세포주 #5번과 #9, 특히 #5번 세포주에서, 도 15의 좌측 도면). 이러한 현상은 우선적으로 아데노바이러스가 CAR가 발현되는 B16BL6에 매우 효과적으로 감염이 증가된 결과라는 것을 의미한다. 이의 확인을 위하여 GFP를 발현하는 종양선택적 복제가능 아데노바이러스(oncolytic adenovirus)를 MOI별로 감염시킨 후 2일이 지난 후에 B16BL6-CAR-E1B55KD에서의 감염율과 세포 용혈 현상을 조사하였다. 그 결과 MOI가 증가할수록 감염율은 증가하였으며 세포 용혈도 MOI가 증가할수록 증가하였다 (도 15의 우측 도면).
- [0035] 상기 #5번 세포주를 한국세포주연구재단에 2014년 3월 27일자로 기탁하여 기탁번호 KCLRF-BP-00313를 부여받았다.

수탁번호

- [0036] 기탁기관명 : 한국세포주연구재단
- 수탁번호 : KCLRFBP00313
- 수탁일자 : 20140327

도면

도면1a

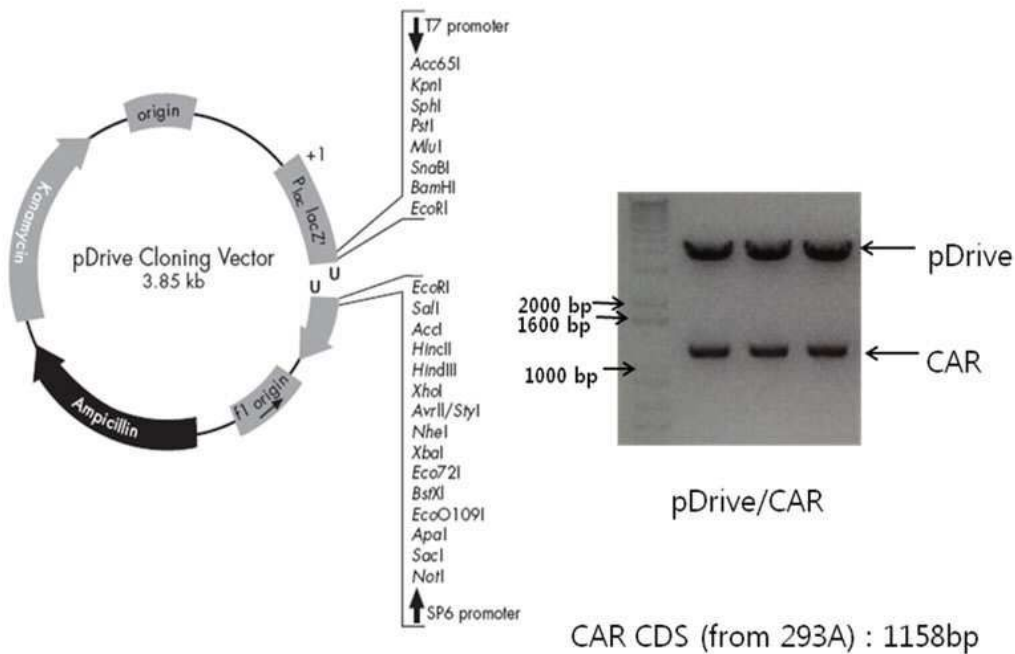
pDrive-CAR를 M13 forward와 reverse primer로 읽어 100 % homology 확인함

CAR sequence	ATGGCGCTCCTGCTGTGCTTCGTGCTCCTGTGCGGAGTAGTGGATTCGCCAGAAG
PCR CAR	ATGGCGCTCCTGCTGTGCTTCGTGCTCCTGTGCGGAGTAGTGGATTCGCCAGAAG
CAR sequence	TTTGAGTATCACTACTCCTGAAGAGATGATTGAAAAAGCCAAAGGGGAAACTGCCTATCT
PCR CAR	TTTGAGTATCACTACTCCTGAAGAGATGATTGAAAAAGCCAAAGGGGAAACTGCCTATCT
CAR sequence	GCCGTGCAAATTTACGCTTAGTCCCGAAGACCAGGGACCGCTGGACATCGAGTGGCTGA
PCR CAR	GCCGTGCAAATTTACGCTTAGTCCCGAAGACCAGGGACCGCTGGACATCGAGTGGCTGA
CAR sequence	TATCACCAGCTGATAATCAGAAGGTGGATCAAGTGATTATTTTATATCTGGAGACAAAATT
PCR CAR	TATCACCAGCTGATAATCAGAAGGTGGATCAAGTGATTATTTTATATCTGGAGACAAAATT
CAR sequence	TATGATGACTACTATCCAGATCTGAAAGGCCGAGTACATTTTACGAGTAATGATCTCAAATC
PCR CAR	TATGATGACTACTATCCAGATCTGAAAGGCCGAGTACATTTTACGAGTAATGATCTCAAATC
CAR sequence	TGGTGATGCATCAATAAATGTAACGAATTTCAACTGTCTAGATATGGCACATATCAGTGCA
PCR CAR	TGGTGATGCATCAATAAATGTAACGAATTTCAACTGTCTAGATATGGCACATATCAGTGCA
CAR sequence	AAGTGAAAAAGCTCCTGGTGTGCAAATAAGAAGATTCATCTGGTAGTTCTTGTTAAGCC
PCR CAR	AAGTGAAAAAGCTCCTGGTGTGCAAATAAGAAGATTCATCTGGTAGTTCTTGTTAAGCC
CAR sequence	AAGTGAAAAAGCTCCTGGTGTGCAAATAAGAAGATTCATCTGGTAGTTCTTGTTAAGCC
PCR CAR	AAGTGAAAAAGCTCCTGGTGTGCAAATAAGAAGATTCATCTGGTAGTTCTTGTTAAGCC
CAR sequence	TTCAGGTGCGAGATGTTACGTTGATGGATCTGAAGAAATTGGAAGTGACTTTAAGATAAAA
PCR CAR	TTCAGGTGCGAGATGTTACGTTGATGGATCTGAAGAAATTGGAAGTGACTTTAAGATAAAA
CAR sequence	TGTGAACCAAAGAAGGTTCACTTCCATTACAGTATGAGTGGCAAATTTGCTGACTCA
PCR CAR	TGTGAACCAAAGAAGGTTCACTTCCATTACAGTATGAGTGGCAAATTTGCTGACTCA
CAR sequence	CAGAAAATGCCCACTTCATGGTTAGCAGAAATGACTTCATCTGTATATCTGTAAAAAATGC
PCR CAR	CAGAAAATGCCCACTTCATGGTTAGCAGAAATGACTTCATCTGTATATCTGTAAAAAATGC
CAR sequence	CTCTTCTGAGTACTCTGGGACATACAGCTGTACAGTACAGAAACAGAGTGGGCTCTGATCA
PCR CAR	CTCTTCTGAGTACTCTGGGACATACAGCTGTACAGTACAGAAACAGAGTGGGCTCTGATCA

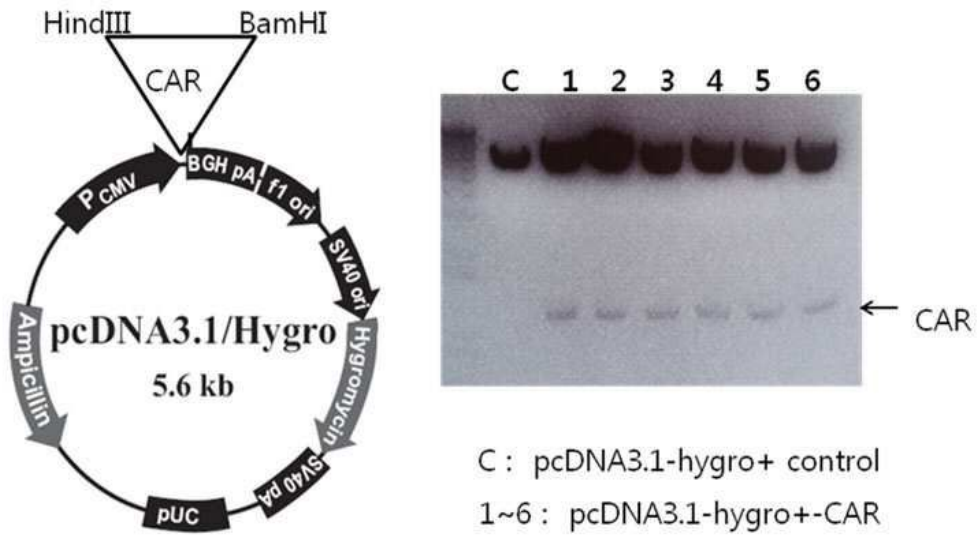
도면1b

CAR sequence	GTGCCTGTTGCGTCTAAACGTTGTCCCTCCTTCAAATAAAGCTGGACTAATTGCAGGAGC
PCR CAR	GTGCCTGTTGCGTCTAAACGTTGTCCCTCCTTCAAATAAAGCTGGACTAATTGCAGGAGC
CAR sequence	CATTATAGGAACTTTGCTTGCTCTAGCGCTCATTGGTCTTATCATCTTTTGCTGTCGTA
PCR CAR	CATTATAGGAACTTTGCTTGCTCTAGCGCTCATTGGTCTTATCATCTTTTGCTGTCGTA
CAR sequence	AGCGCAGAGAAGAAAAATGAAAAGGAAGTTCATCACGATATCAGGGAAGATGTGCCAC
PCR CAR	AGCGCAGAGAAGAAAAATGAAAAGGAAGTTCATCACGATATCAGGGAAGATGTGCCAC
CAR sequence	CTCCAAAGAGCCGTACGTCCACTGCCAGAAGCTACATCGGCAGTAATCATTATCCCTGG
PCR CAR	CTCCAAAGAGCCGTACGTCCACTGCCAGAAGCTACATCGGCAGTAATCATTATCCCTGG
CAR sequence	GGTCCATGTCTCCTTCCAACATGGAAGGATATCCAAGACTCAGTATAACCAAGTACCAA
PCR CAR	GGTCCATGTCTCCTTCCAACATGGAAGGATATCCAAGACTCAGTATAACCAAGTACCAA
CAR sequence	GTGAAGACTTTGAACGCACTCCTCAGAGTCCGACTCTCCACCTGCTAAGGTAGCTGCC
PCR CAR	GTGAAGACTTTGAACGCACTCCTCAGAGTCCGACTCTCCACCTGCTAAGGTAGCTGCC
CAR sequence	CCTAATCTAAGTCGAATGGGTGCGATTCTGTGATGATCCAGCACAGAGCAAGGATGGG
PCR CAR	CCTAATCTAAGTCGAATGGGTGCGATTCTGTGATGATCCAGCACAGAGCAAGGATGGG
CAR sequence	TCTATAGTATAG
PCR CAR	TCTATAGTATAG

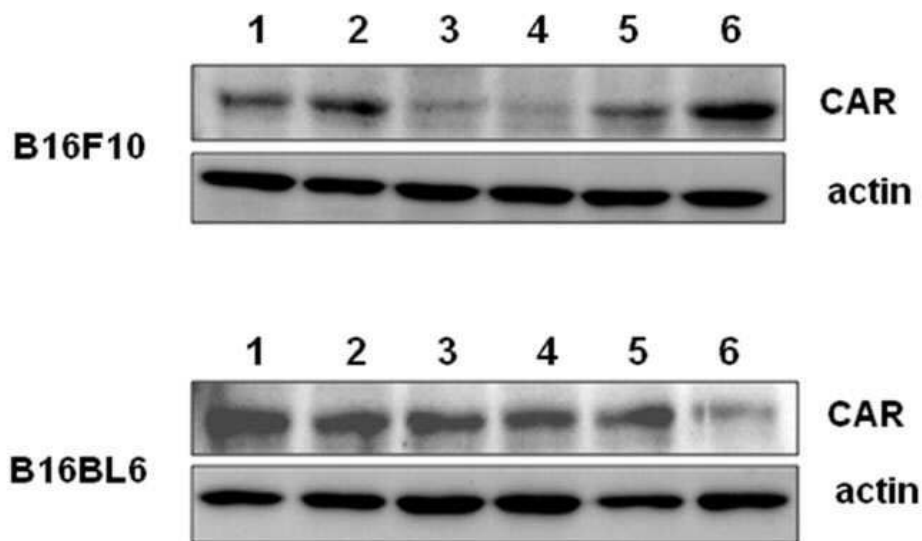
도면2



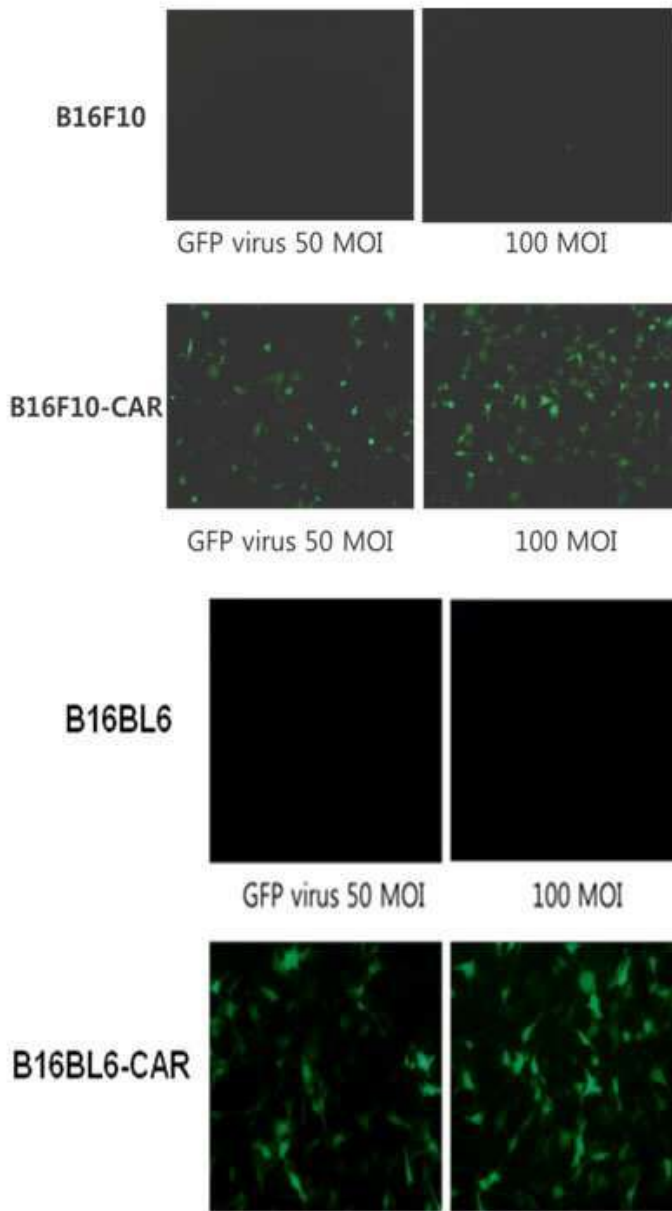
도면3



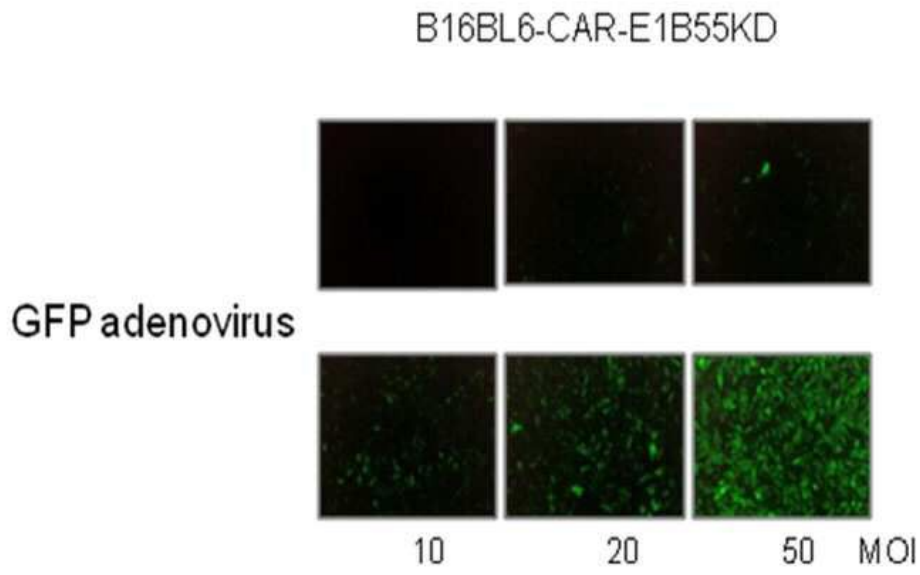
도면4



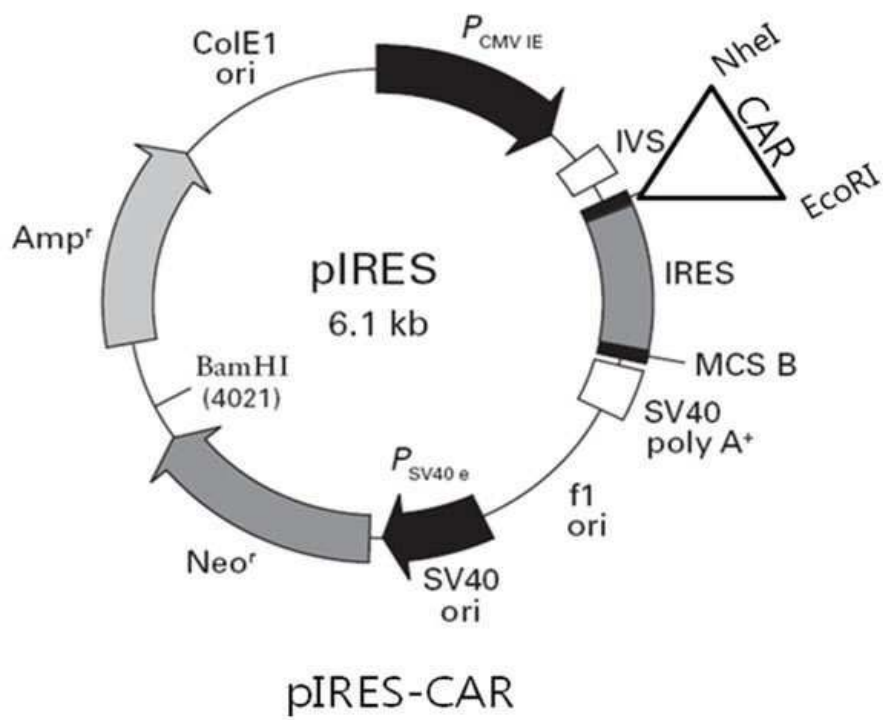
도면5



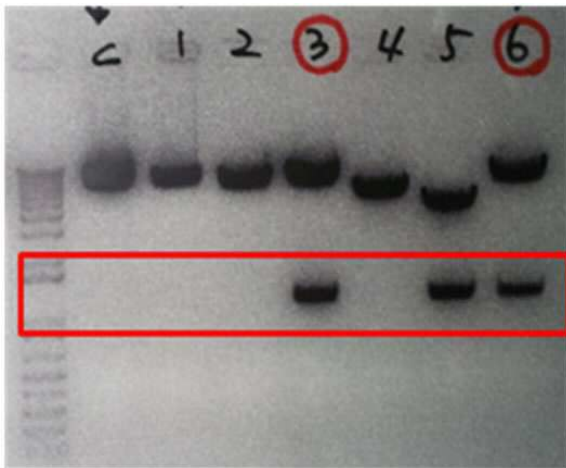
도면6



도면7



도면8



도면9a

pIRES-CAR를 PCR용 primer로 읽었으며 CAR의 시작과 끝에 결합하는 primer로 읽었기 때문에
처음과 끝부분이 완전히 읽혀지지 않음

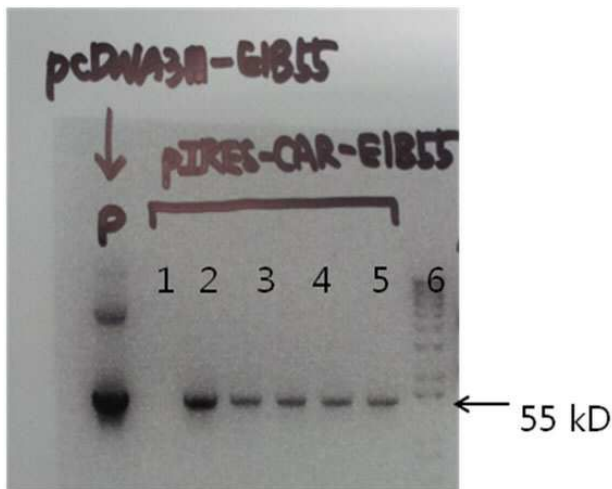
```

CAR sequence  ATGGCGCTCCTGCTGTGCTTCGTGCTCCTGTGCGGAGTAGTGATTTGCGCAGAAG
                |||
pIRES CAR      -----GCGGGCAC-TGTGCCGGATAGTGGATT-CGCCAGAAG
                |||
CAR sequence  TTTGAGTATCACTACTCCTGAAGAGATGATTGAAAAAGCCAAAGGGGAAACTGCCTATCT
                |||
pIRES CAR      TTTGAGTATCACTACTCCTGAAGAGATGATTGAAAAAGCCAAAGGGGAAACTGCCTATCT
                |||
CAR sequence  GCCGTGCAAATTTACGCTTAGTCCCGAAGACCAGGGACCGCTGGACATCGAGTGGCTGA
                |||
pIRES CAR      GCCGTGCAAATTTACGCTTAGTCCCGAAGACCAGGGACCGCTGGACATCGAGTGGCTGA
                |||
CAR sequence  TATCACCAGCTGATAATCAGAAGGTGGATCAAGTGATTATTTATATTCTGGAGACAAAATT
                |||
pIRES CAR      TATCACCAGCTGATAATCAGAAGGTGGATCAAGTGATTATTTATATTCTGGAGACAAAATT
                |||
CAR sequence  TATGATGACTACTATCCAGATCTGAAAGGCCGAGTACATTTACGAGTAATGATCTCAAATC
                |||
pIRES CAR      TATGATGACTACTATCCAGATCTGAAAGGCCGAGTACATTTACGAGTAATGATCTCAAATC
                |||
CAR sequence  TGGTGATGCATCAATAAATGTAACGAATTTACAACGTGTCAGATATTGGCACATATCAGTGCA
                |||
pIRES CAR      TGGTGATGCATCAATAAATGTAACGAATTTACAACGTGTCAGATATTGGCACATATCAGTGCA
                |||
CAR sequence  AAGTGAAAAAAGCTCCTGGTGTGGCAAATAAGAAGATTCATCTGGTAGTTCTTGTTAAGCC
                |||
pIRES CAR      AAGTGAAAAAAGCTCCTGGTGTGGCAAATAAGAAGATTCATCTGGTAGTTCTTGTTAAGCC
                |||
CAR sequence  AAGTGAAAAAAGCTCCTGGTGTGGCAAATAAGAAGATTCATCTGGTAGTTCTTGTTAAGCC
                |||
pIRES CAR      AAGTGAAAAAAGCTCCTGGTGTGGCAAATAAGAAGATTCATCTGGTAGTTCTTGTTAAGCC
                |||
CAR sequence  TTCAGGTGCGAGATGTTACGTTGATGGATCTGAAGAAATTGGAAGTGACTTTAAGATAAAA
                |||
pIRES CAR      TTCAGGTGCGAGATGTTACGTTGATGGATCTGAAGAAATTGGAAGTGACTTTAAGATAAAA
                |||
CAR sequence  TGTGAACCAAAAAGAAGGTTCACTTCCATTACAGTATGAGTGGCAAAAATTGTCTGACTCA
                |||
pIRES CAR      TGTGAACCAAAAAGAAGGTTCACTTCCATTACAGTATGAGTGGCAAAAATTGTCTGACTCA
                |||
CAR sequence  CAGAAAATGCCCACTTCATGGTTAGCAGAAATGACTTCATCTGTTATATCTGTAAAAAATGC
                |||
pIRES CAR      CAGAAAATGCCCACTTCATGGTTAGCAGAAATGACTTCATCTGTTATATCTGTAAAAAATGC
                |||
CAR sequence  CTCTTCTGAGTACTCTGGGACATACAGCTGTACAGTCAGAAACAGAGTGGGCTCTGATCA
                |||
pIRES CAR      CTCTTCTGAGTACTCTGGGACATACAGCTGTACAGTCAGAAACAGAGTGGGCTCTGATCA
                |||
CAR sequence  GTGCCTGTTGCGTCTAAACGTTGTCCCTCCTTCAAATAAAGCTGGACTAATTGCAGGAGC
                |||
pIRES CAR      GTGCCTGTTGCGTCTAAACGTTGTCCCTCCTTCAAATAAAGCTGGACTAATTGCAGGAGC
                |||
    
```

도면9b

CAR sequence	CATTATAGGAACCTT TGCTTG CTCTAG CGCTCATTG GTCTTATCAT CTTTGG CTG TCG TAAAA
piRES CAR	CATTATAGGAACCTT TGCTTG CTCTAG CGCTCATT GGTCTTATCAT CTTTGG CTG TCG TAAAA
CAR sequence	AGCGCAGAGAAGAAAAATGAAAAGGAAGTTCAT CACGATATCAGG GAAGATGTGCCAC
piRES CAR	AGCGCAGAGAAGAAAAATGAAAAGGAAGTTCAT CACGATATCAGGGAAGATGTGCCAC
CAR sequence	CTCCAAAGAGCCGTACGTCCA CTG CCA GAAGCTACATCG GCAGTAATCATT CATCCCTGG
piRES CAR	TTCCAAAGAGCCGTACGTCCA CTG CCA GAAGCTACATCG GCAGTAATCATT CATCCCTGG
CAR sequence	GGTCCATGTCTCCTT CCAA CATGGAAG GATATT CCAAGA CT CAG TATAA CCAAG TACCAA
piRES CAR	GGTCCATGTCTCCTT CCAACATGGAAGGATATT CCAAGACTCAG TATAACCAAGTACCAA
CAR sequence	GTGAAGACTTTGAACGCACTCCTCAGAGTCGACTCTCCCA CCTGCTAAGGTAGCTGCC
piRES CAR	GTGAAGACTTTGAACGCACTCCTCAGAGTCGACTCTCCCA CCTGCTAAGGTAGCTGCC
CAR sequence	CCTAATCTAAGTCGAATGGGTGCGATT CCTGTGATGATTCCAGCAGAGCAAGGATGGG
piRES CAR	CCTAATCTAAGTCGAATGGGTGCGATT CCTGTGATGAT CCAGCACCAGGCCATT
CAR sequence	TCTATAGTATAG
piRES CAR	-----

도면10



도면11a

[K15]- 55kD -universal primer인 T7 (forward)과 BGH (reverse) 사용한 결과 100 % 확인

```

E1B55KD      ATGGAGCGAAGAAACCCATCTGAGCGGGGGGTACCTGCTGGATTTCTGGCCATGCATCT
PCR E1B55KD  ATGGAGCGAAGAAACCCATCTGAGCGGGGGGTACCTGCTGGATTTCTGGCCATGCATCT

E1B55KD      GTGGAGAGCGGTTGTGAGACACAAGAATCGCCTGCTACTGTTGTCTTCCGTCCGCCCGGC
PCR E1B55KD  GTGGAGAGCGGTTGTGAGACACAAGAATCGCCTGCTACTGTTGTCTTCCGTCCGCCCGGC

E1B55KD      GATAATACCGACGGAGGAGCAGCAGCAGCAGCAGGAGGAAGCCAGGCCGGCGGCAGGA
PCR E1B55KD  GATAATACCGACGGAGGAGCAGCAGCAGCAGCAGGAGGAAGCCAGGCCGGCGGCAGGA

E1B55KD      GCAGAGCCCATGGAACCCGAGAGCCGGCCTGACCCTCGGGAATGAATGTTGTACAGGTG
PCR E1B55KD  GCAGAGCCCATGGAACCCGAGAGCCGGCCTGACCCTCGGGAATGAATGTTGTACAGGTG

E1B55KD      GCTGAACTGTATCCAGAACTGAGACGCATTTTGACAATTACAGAGGATGGCAGGGGCTA
PCR E1B55KD  GCTGAACTGTATCCAGAACTGAGACGCATTTTGACAATTACAGAGGATGGCAGGGGCTA

E1B55KD      AAGGGGGTAAAGAGGGAGCGGGGGGCTTGTGAGGCTACAGAGGAGGCTAGGAATCTAGCT
PCR E1B55KD  AAGGGGGTAAAGAGGGAGCGGGGGGCTTGTGAGGCTACAGAGGAGGCTAGGAATCTAGCT

E1B55KD      TTTAGCTTAATGACCAGACACCGTCCTGAGTGATTACTTTTTCAACAGATCAAGGATAAT
PCR E1B55KD  TTTAGCTTAATGACCAGACACCGTCCTGAGTGATTACTTTTTCAACAGATCAAGGATAAT

E1B55KD      TTTAGCTTAATGACCAGACACCGTCCTGAGTGATTACTTTTTCAACAGATCAAGGATAAT
PCR E1B55KD  TTTAGCTTAATGACCAGACACCGTCCTGAGTGATTACTTTTTCAACAGATCAAGGATAAT

E1B55KD      TGGCCTAATGAGCTTGATCTGCTGGCGCAGAAGTATCCATAGAGCAGCTGACCACTTAC
PCR E1B55KD  TGGCCTAATGAGCTTGATCTGCTGGCGCAGAAGTATCCATAGAGCAGCTGACCACTTAC

E1B55KD      TGGCTGCAGCCAGGGGATGATTTGAGGAGGCTATTAGGGTATATGCAAAGGTGGCACTT
PCR E1B55KD  TGGCTGCAGCCAGGGGATGATTTGAGGAGGCTATTAGGGTATATGCAAAGGTGGCACTT

E1B55KD      AGGCCAGATTGCAAGTACAAGATCAGCAAACCTGTAAATATCAGGAATTGTTGCTACATT
PCR E1B55KD  AGGCCAGATTGCAAGTACAAGATCAGCAAACCTGTAAATATCAGGAATTGTTGCTACATT

E1B55KD      TCTGGGAACGGGGCCGAGGTGGAGATAGATACGGAGGATAGGGTGGCCTTTAGATGTAGC
PCR E1B55KD  TCTGGGAACGGGGCCGAGGTGGAGATAGATACGGAGGATAGGGTGGCCTTTAGATGTAGC

E1B55KD      ATGATAAATATGTGGCCGGGGGTGCTTGGCATGGACGGGGTGGTTATTATGAATGTAAGG
PCR E1B55KD  ATGATAAATATGTGGCCGGGGGTGCTTGGCATGGACGGGGTGGTTATTATGAATGTAAGG

E1B55KD      TTTACTGGCCCCAATTTAGCGGTACGGTTTTCTGGCCAATACCAACCTTATCCTACAC
PCR E1B55KD  TTTACTGGCCCCAATTTAGCGGTACGGTTTTCTGGCCAATACCAACCTTATCCTACAC
    
```

도면11b

```

E1B55KD      GGTGTAAGCTTCTATGGGTTTAAACAATACCTGTGTGGAAGCCTGGACCGATGTAAGGGTT
PCR E1B55KD  GGTGTAAGCTTCTATGGGTTTAAACAATACCTGTGTGGAAGCCTGGACCGATGTAAGGGTT

E1B55KD      CGGGGCTGTGCCTTTTACTGCTGCTGGAAGGGGGTGGTGTGTGCGCCCAAAGCAGGGCT
PCR E1B55KD  CGGGGCTGTGCCTTTTACTGCTGCTGGAAGGGGGTGGTGTGTGCGCCCAAAGCAGGGCT

E1B55KD      TCAATTAAGAAATGCCTCTTTGAAAGGTGTACCTTGGGTATCCTGTCTGAGGGTAACTCC
PCR E1B55KD  TCAATTAAGAAATGCCTCTTTGAAAGGTGTACCTTGGGTATCCTGTCTGAGGGTAACTCC

E1B55KD      AGGGTGCGCCACAATGTGGCCTCCGACTGTGGTTGCTTCATGCTAGTGAAAAGCGTGGCT
PCR E1B55KD  AGGGTGCGCCACAATGTGGCCTCCGACTGTGGTTGCTTCATGCTAGTGAAAAGCGTGGCT

E1B55KD      GTGATTAAGCATAACATGGTATGTGGCAACTGCGAGGACAGGGCCTCTCAGATGCTGACC
PCR E1B55KD  GTGATTAAGCATAACATGGTATGTGGCAACTGCGAGGACAGGGCCTCTCAGATGCTGACC

E1B55KD      TGCTCGGACGGCAACTGTCACCTGCTGAAGACCATTACGTAGCCAGCCACTCTCGCAAG
PCR E1B55KD  TGCTCGGACGGCAACTGTCACCTGCTGAAGACCATTACGTAGCCAGCCACTCTCGCAAG

E1B55KD      GCCTGGCCAGTGTGAGCATAACATACTGACCCGCTGTTCCCTTGCAATTTGGGTAACAGG
PCR E1B55KD  GCCTGGCCAGTGTGAGCATAACATACTGACCCGCTGTTCCCTTGCAATTTGGGTAACAGG

E1B55KD      AGGGGGGTGTTCTACCTTACCAATGCAATTTGAGTCACACTAAGATATTGCTTGAGCCC
PCR E1B55KD  AGGGGGGTGTTCTACCTTACCAATGCAATTTGAGTCACACTAAGATATTGCTTGAGCCC

E1B55KD      GAGAGCATGTCCAAGGTGAACCTGAACGGGGTGTGACATGACCATGAAGATCTGGAAG
PCR E1B55KD  GAGAGCATGTCCAAGGTGAACCTGAACGGGGTGTGACATGACCATGAAGATCTGGAAG

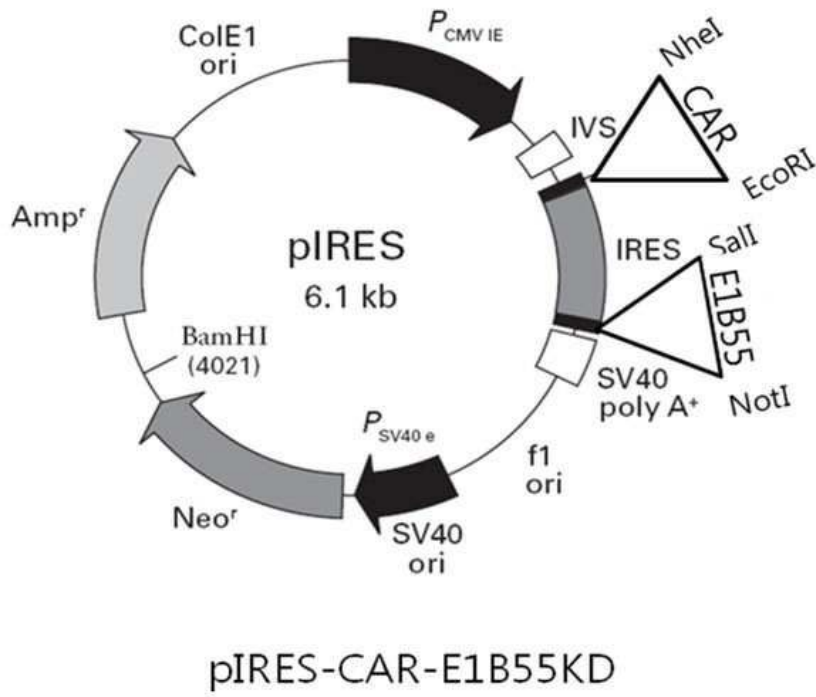
E1B55KD      GTGCTGAGGTACGATGAGACCCGCACCAGGTGCAGACCCTGCGAGTGTGGCGGTAAACAT
PCR E1B55KD  GTGCTGAGGTACGATGAGACCCGCACCAGGTGCAGACCCTGCGAGTGTGGCGGTAAACAT

E1B55KD      GTGCTGAGGTACGATGAGACCCGCACCAGGTGCAGACCCTGCGAGTGTGGCGGTAAACAT
PCR E1B55KD  GTGCTGAGGTACGATGAGACCCGCACCAGGTGCAGACCCTGCGAGTGTGGCGGTAAACAT

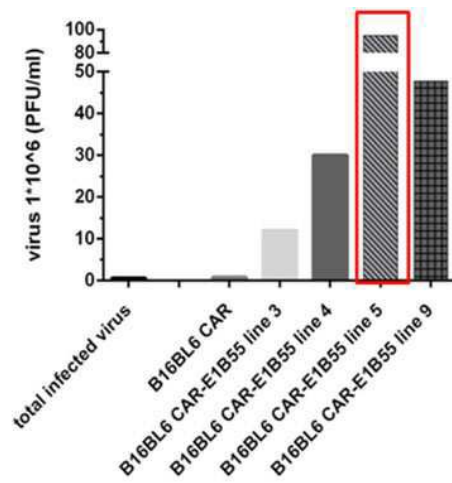
E1B55KD      ATTAGGAACCAGCCTGTGATGCTGGATGTGACCGAGGAGCTGAGGCCCGATCAC TTGGTG
PCR E1B55KD  ATTAGGAACCAGCCTGTGATGCTGGATGTGACCGAGGAGCTGAGGCCCGATCAC TTGGTG

E1B55KD      CTGGCCTGCACCCGCGCTGAGTTTGGCTCTAGCGATGAAGATACAGATTGA
PCR E1B55KD  CTGGCCTGCACCCGCGCTGAGTTTGGCTCTAGCGATGAAGATACAGATTGA
    
```


도면12

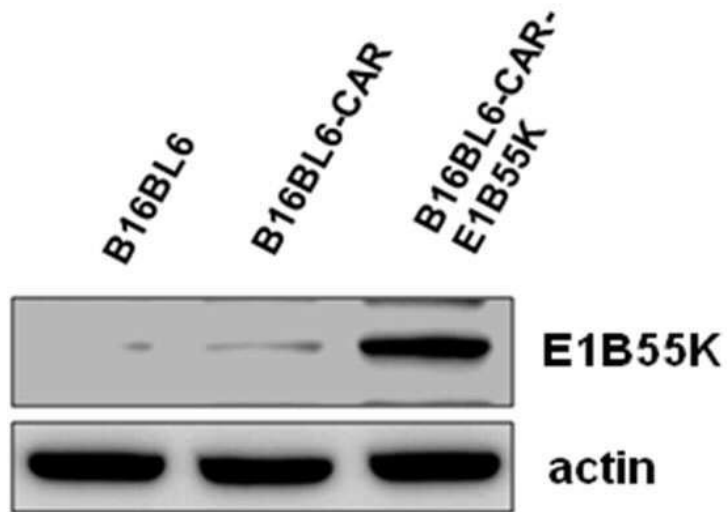


도면13

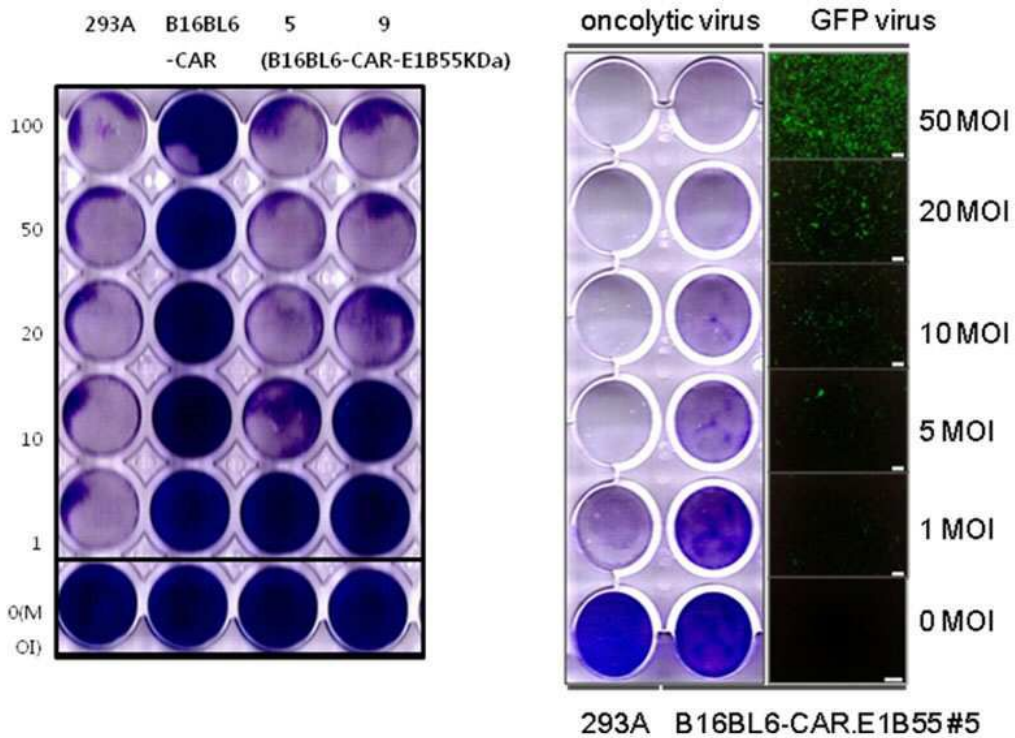


	total infected virus	B16BL6 CAR	B16BL6 CAR-E1B55 line 3	B16BL6 CAR-E1B55 line 4	B16BL6 CAR-E1B55 line 5	B16BL6 CAR-E1B55 line 9
virus (1*10 ⁶ PFU/ml, total 3ml)	0.6	0.756	11.97	30	95.1	47.7

도면14



도면15



서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Melanoma cell line capable of adenoviral infection and replication
- <130> P15U18C0335
- <150> KR 10-2014-0037835

<151> 2014-03-31
 <160> 12
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 1098
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens
 <400> 1

atggcgctcc tgetgtgett cgtgctcctg tgcggagtag tggatttcgc cagaagtttg 60
 agtatcacta ctctgaaga gatgattgaa aaagccaaag gggaaactgc ctatctgccg 120

tgcaaattta cgettagtcc cgaagaccag ggaccgctgg acatcgagtg getgatatca 180
 ccagctgata atcagaaggt ggatcaagtg attatitit atctctggaga caaaatttat 240
 gatgactact atccagatct gaaaggccga gtacatttta cgagtaatga tctcaaactt 300
 ggtgatgcat caataaatgt aacgaattta caactgtcag atattggcac atatcagtgc 360
 aaagtgaaaa aagctcctgg tgttgcaaat aagaagattc atctggtagt tcttgtaag 420
 ccttcaggtg cgagatgta cgttgatgga tctgaagaaa ttggaagtga cttaagata 480
 aaatgtgaac caaagaagg ttcacttcca ttacagtatg agtggcaaaa attgtctgac 540

tcacagaaaa tgcccacttc atggtagca gaaatgactt catctgttat atctgtaaaa 600
 aatgcctctt ctgagtactc tgggacatac agctgtacag tcagaaacag agtgggctct 660
 gatcagtgcc tgttgcgtct aaacgttgc cctccttcaa ataaagctgg actaattgca 720
 ggagccatta taggaacttt gcttgcctta gcgctcattg gtcttatcat cttttgctgt 780
 cgtaaaaagc gcagagaaga aaaatatgaa aaggaagttc atcacgatat cagggaagat 840
 gtgccacctc caaagagccg tacgtccact gccagaagct acatcggcag taatcattca 900
 tccttggggt ccatgtctcc ttccaacatg gaaggatatt ccaagactca gtataaccaa 960

gtaccaagtg aagactttga acgcactcct cagagtccga ctctcccacc tgctaaggta 1020
 gctgccctta atctaagtcg aatgggtgcg attcctgtga tgattccagc acagagcaag 1080
 gatgggtcta tagtatag 1098

<210> 2
 <211> 1103
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR-CAR

<400> 2

atggcgctcc tgctgtgctt cgtgtcctcg tgcggagtag tggatttcgc cagaagtttg 60
 agtatcacta ctctgaaga gatgattgaa aaagccaaag gggaaactgc ctatctgccg 120
 tgcaaattta cgcttagtcc cgaagaccag ggaccgctgg acatcgagtg gctgatatca 180

 ccagctgata atcagaaggt ggatcaagtg attattttat attctggaga caaaatttat 240
 gatgactact atccagatct gaaaggccga gtacatttta cgagtaatga tetcaaatct 300
 ggtgatgcat caataaatgt aacgaattta cactgtcag atattggcac atacagtgc 360
 aaagtgaaaa aagctcctgg tgttgcaaat aagaagattc atctgtagt tcttgtaag 420
 ccttcagggt cgagatgta cgttgatgga tctgaagaaa ttggaagtga cttaagata 480
 aaatgtgaac caaagaagg ttcacttcca ttacagtatg agtggcaaaa attgtctgac 540
 tcacagaaaa tgcccacttc atggtagca gaaatgactt catctgttat atctgtaaaa 600

 aatgcctctt ctgagtactc tgggacatac agctgtacag tcagaaacag agtgggctct 660
 gatcagtgcc tgttgctct aaacgttgc cctcctcaa ataaagctgg actaattgca 720
 ggagccatta taggaacttt gcttgcctca gcgctcattg gtcttatcat cttttgctgt 780
 cgtaaaaagc gcagagaaga aaaatgaa aaggaagttc atcacgatat caggaagat 840
 gtgccacctc caaagagccg tacgtccact gccagaagct acatcggcag taatcattca 900
 tccctggggt ceatgtctcc ttccaacatg gaaggatatt ccaagactca gtataaccaa 960
 gtaccaagtg aagacttga acgcactcct cagagtccga ctctcccacc tgctaaggta 1020

 gctgccccta atctaagtcg aatgggtgcg attcctgtga tgattccagc acagagcaag 1080
 gatgggtcta tagtatagta tag 1103

<210> 3

<211> 1122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pIRES-CAR

<400> 3

atagctagca tggcgtcct gctgtgcttc gtgtcctgt gcggagtagt ggatttcgcc 60
 agaagtttga gtatcactac tcctgaagag atgattgaaa aagccaaagg ggaaactgcc 120
 tatctgccgt gcaaatttac gcttagtccc gaagaccagg gaccgctgga catcgagtgg 180
 ctgatatcac cagctgataa tcagaaggtg gatcaagtga ttattttata ttctggagac 240

 aaaatttatg atgactacta tccagatctg aaaggccgag tacattttac gagtaatgat 300

ctcaaatctg gtgatgcatc aataaatgta acgaatttac aactgtcaga tattggcaca 360
tatcagtgca aagtgaaaa agctcctggt gttgcaata agaagattca tctggtagtt 420
cttgttaagc cttcaggtgc gagatgttac gttgatggat ctgaagaaat tgggaagtgc 480
tttaagataa aatgtgaacc aaaagaaggt tcacttccat tacagtatga gtggcaaaaa 540
ttgtctgact cacagaaaat gccacttca tggttagcag aatgacttc atctgttata 600
tctgtaaaaa atgcctcttc tgagtactct gggacataca gctgtacagt cagaaacaga 660

gtgggctctg atcagtgcct gttgcgtcta aacgttgtcc ctccttcaa taaagctgga 720
ctaattgcag gagcattat aggaactttg cttgctctag cgctcattgg tcttatcacc 780
ttttgctgtc gtaaaaagcg cagagaagaa aaatatgaaa aggaagttca tcacgatatac 840
aggaagatg tgccacctcc aaagagccgt acgtccactg ccagaagcta catcggcagt 900
aatcattcat ccttggggtc catgtctcct tccaacatgg aaggatattc caagactcag 960
tataaccaag taccaagtga agactttgaa cgcactctc agagtccgac tctcccacct 1020
gctaaggtag ctgccctaa tctaagtcga atgggtgcga ttctgtgat gattccagca 1080

cagagcaagg atgggtctat agtatagtat aggaattcgc gc 1122

<210> 4
<211> 1491
<212> DNA
<213> adenovirus
<400> 4

atggagcgaa gaaacccatc tgagcggggg gtacctgctg gattttctgg ccatgcatct 60
gtggagagcg gttgtgagac acaagaatcg cctgctactg ttgtcttccg tccgcccggc 120
gataataccg acggaggagc agcagcagca gcaggaggaa gccaggcggc ggcggcagga 180
gcagagccca tggaaccga gagccggcct ggaccctcgg gaatgaatgt tgtacaggtg 240
gctgaactgt atccagaact gagacgcatt ttgacaatta cagaggatgg gcaggggcta 300

aagggggtaa agaggagcg gggggcttgt gaggctacag aggaggctag gaatctagct 360
tttagcttaa tgaccagaca ccgtcctgag tgtattactt ttcaacagat caaggataat 420
tgcgctaagt agcttgatct gctggcgcag aagtattcca tagagcagct gaccacttac 480
tggtgcagc caggggatga ttttgaggag gctattaggg tatatgcaa ggtggcactt 540
aggccagatt gcaagtaca gatcagcaa cttgtaata tcaggaattg ttgctacatt 600
tctgggaacg gggccgaggt ggagatagat acggaggata ggggtggcctt tagatgtagc 660
atgataaata tgtggccggg ggtgcttggc atggacgggg tggttattat gaatgtaagg 720

tttactggcc ccaattttag cggtacgggt ttcttgcca ataccaacct tatcctacac 780
 ggtgtaagct tctatgggtt taacaatacc tgtgtggaag cctggaccga tgaagggtt 840
 cgggctgtg ccttttactg ctgctggaag ggggtggtgt gtcgcccac aagcagggt 900
 tcaattaaga aatgcctctt tgaaagggtt accttgggta tcctgtctga ggtaactcc 960
 aggtgccc acaatgtggc ctccgactgt ggttgcttca tgctagtga aagcgtggct 1020
 gtgattaagc ataacatggt atgtggcaac tgcgaggaca gggcctctca gatgctgacc 1080
 tgctcggacg gcaactgtca cctgctgaag accattcacg tagccagcca ctctcgaag 1140

gcctggccag tgtttgagca taacatactg acccgctgtt ccttgcattt ggtaacagg 1200
 aggggggtgt tctacctta ccaatgcaat ttgagtcaca ctaagatatt gcttgagccc 1260
 gagagcatgt ccaaggtgaa cctgaacggg gtgtttgaca tgaccatgaa gatctggaag 1320
 gtgctgaggt acgatgagac ccgaccagg tgcagaccct gcgagtgtgg cgtaaacat 1380
 attaggaacc agcctgtgat gctggatgtg accgaggagc tgaggcccga tcaacttggtg 1440
 ctggcctgca cccgcctga gtttgctct agcgtgaag atacagattg a 1491

- <210> 5
- <211> 1511
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR- E1B55KD

<400> 5

actgtcgaca tggagcgaag aaaccatct gagcgggggg tacctgctgg attttctggc 60
 catgcatctg tggagagcgg ttgtgagaca caagaatcg cgtctactgt tgtcttccgt 120
 ccgccggcg ataataccga cggaggagca gcagcagcag caggaggaag ccaggcggcg 180
 gcggcaggag cagagcccat ggaacccgag agccggcctg gaccctcggg aatgaatgtt 240
 gtacaggtgg ctgaactgta tccagaactg agacgcattt tgacaattac agaggatggg 300
 caggggctaa agggggtaaa gagggagcgg ggggcttgtg aggctacaga ggaggctagg 360

aatctagctt ttagcttaat gaccagacac cgtcctgagt gtattacttt tcaacagatc 420
 aaggataatt gcgctaata gcttgatctg ctggcgcaga agtattccat agagcagctg 480
 accacttact ggctgcagcc aggggatgat tttgaggagg ctattagggt atatgcaaag 540
 gtggcactta ggccagattg caagtacaag atcagcaaac ttgtaaatat caggaattgt 600
 tgctacattt ctgggaacgg ggccgaggtg gagatagata cggaggatag ggtggccttt 660
 agatgtagca tgataaatat gtggccgggg gtgcttggca tggacggggt ggttattatg 720

aatgtaaggt ttactggccc caattttagc ggtacggttt tcctggccaa taccaacctt 780

atcctacacg gtgtaagctt ctatgggttt aacaatacct gtgtggaagc ctggaccgat 840

gtaagggttc ggggctgtgc cttttactgc tgetggaagg ggggtggtgtg tegccccaaa 900

agcagggtt caattaagaa atgcctcttt gaaaggtgta ccttgggtat cctgtctgag 960

ggtaactcca gggtagcga caatgtggcc tccgactgtg gttgtctcat gctagtgaaa 1020

agcgtggctg tgattaagca taacatggta tgtggcaact gcgaggacag ggcctctcag 1080

atgctgacct gctcggacgg caactgtcac ctgctgaaga ccattcacgt agccagccac 1140

tctcgcaagg cctggccagt gtttgagcat aacatactga cccgctgttc cttgcatttg 1200

ggtaacagga ggggggtggt cctaccttac caatgcaatt tgagtcacac taagatattg 1260

cttgagccc agagcatgtc caaggtgaac ctgaacgggg tgtttgacat gaccatgaag 1320

atctggaagg tgetgagta cgatgagacc cgcaccaggt gcagacctg cgagtgtggc 1380

ggtaaacata ttaggaacca gcctgtgat ctggatgtga ccgaggagct gaggcccgat 1440

cacttgggtc tggcctgcac ccgctgag tttggctcta gcgatgaaga tacagattga 1500

gcggccgcta t 1511

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer

<400> 6

atggcgtcc tgetgtgctt c 21

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer

<400> 7

ctatactata gaccatcct tg 22

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer
 <400> 8
 atagctagca tggcgctcct gctgtgctt 29

<210> 9
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antisense primer
 <400> 9
 gcggaattc ctatactata gacctatcc 29

<210> 10
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense primer
 <400> 10
 actgtcgaca tggagcgaag aaacctatc 29

<210> 11
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> antisense primer
 <400> 11
 atagcggccg ctcaatctgt atcttcatcg 30

<210> 12
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> E1B55KD N-terminal
 <400> 12

Met Glu Arg Arg Asn Pro Ser Glu Arg Gly Val Pro Ala Gly Phe Ser
 1 5 10 15
 Gly His Ala Ser Val Glu Ser Gly Cys

20

25