(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 10 월 8 일 (08.10.2015)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2015/152609 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 15/113 (2010.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/003175

(22) 국제출원일: 2015 년 3 월 31 일 (31.03.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2014-0037835 2014 년 3 월 31 일 (31.03.2014) KR
10-2015-0044507 2015 년 3 월 30 일 (30.03.2015) KR

(71) 출원인: **연세대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY)** [KR/KR]; 120-743 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).

(72) 발명자: **송재진 (SONG, Jae Jin)**; 120-749 서울시 서대문구 연세로 50 연세대학교 의과대학 암연구소 러들로 교수동 330 호, Seoul (KR). **김주항 (KIM, Joo Hang)**; 158-728 서울시 양천구 목동동로 339, C-1207 호 (목동, 목동트윈빌), Seoul (KR). **김소영 (KIM, So Young)**; 120-749 서울시 서대문구 연세로 50 연세대 의과대학 암센터 암연구소, Seoul (KR). **강수진 (KANG, Sujin)**; 120-749 서울시 서대문구 연세로 50 연세의료원 암센터 4 층 암연구소, Seoul (KR). **강동욱 (KANG, Dongxu)**; 120-749 서울시 서대문구 연세로 50 의과대학 암연구소, Seoul (KR).

(74) 대리인: **특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM)**; 135-936 서울시 강남구 역삼로 3 길 11 광성빌딩 신관 5 층, Seoul (KR).

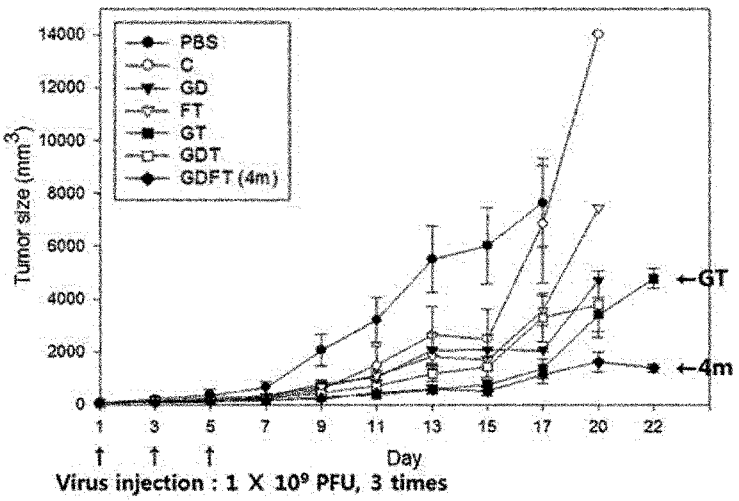
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: ANTITUMOR COMPOSITION CONTAINING GM-CSF GENE, DECORIN GENE, SHRNA INHIBITING TGF-B2 EXPRESSION, AND SHRNA INHIBITING FOXP3 EXPRESSION

(54) **발명의 명칭** : GM-CSF 유전자; 데코린 유전자; TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA; 및 FoxP3 발현을 억제하는 shRNA를 포함하는 항종양 조성물



(57) **Abstract**: The present invention relates to an antitumor composition containing: a GM-CSF gene; and an shRNA inhibiting TGF-β2 expression, and an antitumor composition containing: a GM-CSF gene; a decorin gene; an shRNA inhibiting TGF-β2 expression; and an shRNA inhibiting FoxP3 expression.

(57) **요약서**: 본 발명은 GM-CSF 유전자 및 TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA 를 포함하는 항종양 조성물 및 GM-CSF 유전자; 데코린 유전자; TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA; 및 FoxP3 발현을 억제하는 shRNA 를 포함하는 항종양 조성물에 관한 것이다.

WO 2015/152609 A1

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: GM-CSF 유전자; 데코린 유전자; TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA; 및 FoxP3 발현을 억제하는 shRNA를 포함하는 항종양 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 GM-CSF 유전자 및 TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA를 포함하는 항종양 조성물 및 GM-CSF 유전자; 데코린 유전자; TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA; 및 FoxP3 발현을 억제하는 shRNA를 포함하는 항종양 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF, Granulocyte-macrophage stimulating factor)는 다양한 방법으로 작용하는데, 우선 자연살상세포나 수지상세포(dendritic cell)와 같은 항원전달세포 등을 불러 모으는 역할을 한다. 또한, GM-CSF는 종양 근처에서 수지상세포를 자극하여 공동촉진 분자(costimulatory molecule)의 발현을 증가시켜 CD4+ 및 CD8+ T 세포들이 면역반응을 강화시켜 주는 역할을 하며, 수지상세포의 분화를 촉진시키는 기능 외에 일차 단핵구(primary monocyte)에서 MHC class II를 구성하는 분자들의 발현조절에도 관여하는 것으로 알려져 있다[J. Immunol. 171: 2374 by Hornell et al., 2003. Regulation of the class II MHC pathway in primary human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor]. 뿐만 아니라 종양 내에서 GM-CSF를 발현시키면 종양 주변으로 APC가 모이게 되고 종양 항원을 효과적으로 처리하여 항암면역반응을 강하게 유도하는 것으로 알려져 있다[Cancer Immunol. Immunother. 53: 17 by Pan et al., 2004 In situ recruitment of antigen-presenting cells by intratumoral GM-CSF gene delivery].

[3] 그러나, TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA을 GM-CSF와 함께 사용하여 항종양 치료에 적용한 연구에 대해서는 아직까지 보고된 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[4] 이에, 본 발명자들은 질병유발의 원인이 되는 단백질인 TGF-β2 종양 관련 유전자에 작용하는 shRNA 방식의 RNA 간섭을 이용하여 TGF-β2 발현을 억제하여 면역내성을 유발하는 요소를 제한하고 동시에 GM-CSF에 의한 면역증강반응을 유도하여 항종양 효과의 향상을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[5] 따라서, 본 발명은 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자; 및 TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2)을 포함하는 GM-CSF 및 shTGF-β2

공동 발현용 유전자 전달체 및 이를 포함하는 항종양 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

[6] 본 발명은 또한, 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자; 데코린(decorin) 유전자, TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2) 및 FoxP3 발현을 억제하는 shRNA(shFoxP3)을 포함하는 GM-CSF, 데코린, shTGF-β2 및 shFoxP3 공동 발현용 유전자 전달체 및 이를 포함하는 항종양 조성물을 제공하는데 다른 목적이 있다.

과제 해결 수단

[7] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서,

[8] 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자; 및 TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2)을 포함하는 GM-CSF 및 shTGF-β2 공동 발현용 유전자 전달체를 제공한다.

[9] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 다른 수단으로서,

[10] 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자; 데코린(decorin) 유전자, TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2) 및 FoxP3 발현을 억제하는 shRNA(shFoxP3)을 포함하는 GM-CSF, 데코린, shTGF-β2 및 shFoxP3 공동 발현용 유전자 전달체를 제공한다.

[11] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서,

[12] 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자; 및 TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2)을 포함하는 항종양 조성물을 제공한다.

[13] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서,

[14] 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자; 데코린(decorin) 유전자, TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2) 및 FoxP3 발현을 억제하는 shRNA(shFoxP3)을 포함하는 항종양 조성물을 제공한다.

[15]

발명의 효과

[16] 본 발명은 질병유발의 원인이 되는 단백질인 TGF-β2 종양 관련 유전자에 작용하는 shRNA 방식의 RNA 간섭을 이용하여 TGF-β2 발현을 억제하여 면역내성을 유발하는 요소를 제한하고 동시에 GM-CSF에 의한 면역증강반응을 유도함으로써 항종양 효과를 향상시켰다.

[17] 특히, 본 발명은 GM-CSF와 데코린(Decorin)을 동시에 발현하고 TGF-β2와 FoxP3의 발현을 동시에 억제시킴으로써 항종양 효과를 현저히 향상시켰다.

[18] 즉, 본 발명에 의해 GM-CSF 유전자 및 TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA를 포함하는 항종양 조성물; 및 GM-CSF 유전자, 데코린 유전자, TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA 및 FoxP3 발현을 억제하는 shRNA을 포함하는 항종양 조성물이 제공된다. 특히, 대부분의 암세포에서 전달효율성이 뛰어난 아데노바이러스에 표적성을 부여함으로써 모든 암에 적용 가능하다.

[19]

도면의 간단한 설명

[20] 도 1은 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스 벡터[(a) 제조예 7, (b) 제조예 10]를 나타낸 것이다.

[21] 도 2는 dl324 BstBI 벡터와 pCA14-mGM-CSF와의 상동재조합 제작과정(a)을 나타낸 것이고, 암세포 감염 후 mGM-CSF의 분비양(b)을 나타낸 것이다.

[22] 도 3은 dl324 BstBI 벡터와 pCA14-hGM-CSF와의 상동재조합을 확인한 것이다.

[23] 도 4a, 도 4b 및 도 4c는 pVAX1-3484-ΔE1B-E1R의 제작과정을 나타낸 것이다.

[24] 도 5는 셔틀벡터 pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R의 클로닝을 확인한 것이다.

[25] 도 6은 셔틀벡터 pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R을 나타낸 것이다.

[26] 도 7은 pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R-mGMCSF은 SmaI로 잘라 마우스 GM-CSF 유전자의 도입을 확인한 것이다[레인 1: 대조군(pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R, 레인 2: pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-mGMCSF-E1R).

[27] 도 8의 (a)는 HindIII 패턴을 확인한 것이며, (b)는 Pac I 패턴을 확인한 것이다.

[28] 도 9는 인간 GM-CSF를 발현하는 종양선택적 복제가능 아데노바이러스의 제작과정을 나타낸 것이다.

[29] 도 10은 pBSKII-3484 벡터(a), pCA14-3484 벡터(b), pCA14-CMV-3484 벡터(c)와 pCA14-CMV-3484-ΔE1B55 벡터(d)를 나타낸 것이다.

[30] 도 11은 E3 셔틀 벡터인 pSP72ΔE3/si-negative 벡터를 나타낸 것이다.

[31] 도 12는 HindIII 패턴을 확인한 것이다.

[32] 도 13의 (a)는 pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R를 나타낸 것이고, (b)는 E1 상동재조합용 pVAX 셔틀벡터 완성을 제한효소 패턴으로 확인한 것이다.

[33] 도 13의 (a)는 pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R를 나타낸 것이고, (b)는 E1 상동재조합용 pVAX 셔틀벡터 완성을 제한효소 패턴으로 확인한 것이다[C: dl324-BstBI-ΔE3-H1-shmTGF-β2: 8010 5324 4947 4597 2937 2440 2081 1627 75, 레인 1~3: dl324-BstBI-ΔE3-H1-shmTGF-β2 상동재조합 후보: 8010 5324 4947 4597 2937 2884 2440 2081 1627 75].

[34] 도 14는 인간 데코린 발현을 ELISA로 확인한 것이다.

[35] 도 15a는 마우스 데코린 발현하는 종양선택적 복제가능 아데노바이러스의 상동재조합을 나타낸 것이다.

[36] 도 15b는 마우스 데코린 발현을 ELISA로 확인한 것이다.

[37] 도 16은 FoxP3 shRNA가 셔틀 벡터로 서브클로닝(subcloning)하는 과정의 모식도이다.

[38] 도 17은 FoxP3 shRNA가 셔틀 벡터로 서브클로닝(subcloning)됨을 나타낸 것이다[화살표: shGFP 대신 shFoxP3가 들어감. 맨 왼쪽의 두 번째 밴드에 비해 더 작아진 shFoxP3 사이즈가 삽입되었음을 의미. SphI/KpnI 사용 시 결과].

[39] 도 18은 인간 FoxP3 shRNA를 발현하는 셔틀벡터 플라스미드에 의한 FoxP3 발현 억제능을 웨스턴 블랏팅으로 확인한 것이다.

[40] 도 19는 dl324-IX 아데노바이러스 백본과 인간 FoxP3 shRNA를 발현하는 셔틀벡터와의 상동재조합한 모식도이다.

[41] 도 20은 실제로 재조합이 용이한 박테리아에서 상동재조합된 콜로니의 선별을 위하여, (a)는 아데노바이러스의 E3 부위 PCR 결과를 나타낸 것이고, (b)는 아데노바이러스의 IX 유전자 부위 PCR 결과를 나타낸 것이며, (c)는 (a)와 (b)에서 확인한 클론에서 HindIII 패턴 확인하여 9번 클론을 확인하고 (d)는 상동재조합된 아데노바이러스 게놈(genomic) DNA의 트랜스펙션(transfection) 가능 여부를 확인하는 PacI 절단 후 단편(fragment) DNA가 발현한 결과를 나타낸 것이다.

[42] 도 21은 마우스 FoxP3 포함하는 dl324-IX-E3-U6-FoxP3의 HindIII 절단 패턴(digestion pattern)으로 최종 재조합된 콜로니 선별을 확인한 것이다. 오른쪽은 PacI로 확인한 것이다.

[43] 도 22는 인간 FoxP3 shRNA를 발현하는 아데노바이러스에 의한 FoxP3 발현 억제능을 웨스턴 블랏팅으로 확인한 것이다.

[44] 도 23은 마우스 FoxP3 shRNA를 발현하는 아데노바이러스에 의한 FoxP3 발현 억제능을 웨스턴 블랏팅으로 확인한 것이다.

[45] 도 24 및 도 25는 pSP72△E3/U6-shFoxP3+H1-shTGFβ2 셔틀벡터 제작과정을 나타낸 것이다.

[46] 도 26a는 마우스 FoxP3와 TGF-β2의 shRNA를 발현하는 종양선택적 복제가능 아데노바이러스의 상동재조합을 나타낸 것이다.

[47] 도 26b는 사람의 A375에서 pSP72△E3/U6-shFoxP3+H1-shTGFβ2 셔틀벡터 형태로의 트랜스펙션 시 FoxP3 및 TGFβ2의 감소 효과를 실시간 PCR로 확인한 것이다.

[48] 도 27은 MCS(multi cloning site) A에는 GM-CSF 유전자를 삽입하고, MCS B에는 데코린 유전자를 삽입한 pIRES 벡터를 나타낸 것이다.

[49] 도 28은 pIRES/mGM-CSF-mDCN으로 서브클로닝을 HindIII로 확인한 것이다

[50] 도 29는 Oncolytic 셔틀벡터로의 클로닝을 나타낸 것이다

[51] 도 30은 pVAX1-3484-CMVp-△E1B-IRES-mGMCSF-mDCN 발현을 확인한 것이다.

[52] 도 31은 마우스 GM-CSF 및 마우스 데코린을 동시에 발현하는 아데노바이러스로의 상동재조합을 HindIII 및 PacI로 확인한 것이다.

[53] 도 32a 및 도 32b는 마우스 GM-CSF 및 마우스 데코린 발현을 ELISA로 확인한 것이다.

[54] 도 33은 pIRES-hGM-CSF로의 인간 데코린 유전자의 서브클로닝을 확인한 것이다.

[55] 도 34는 pCA14-3484-CMV-△E1B-hGMCSF-IRES-hDCN에서 유전자 삽입

여부를 확인한 것이다.

[56] 도 35a는 마우스 GM-CSF 및 마우스 데코린을 동시에 발현하는 아데노바이러스로의 상동재조합 모식도이다.

[57] 도 35b는 사람의 GM-CSF 및 데코린을 동시에 발현하는 플라스미드 형태의 셔틀벡터를 트랜스펙션하여 발현을 ELISA로 확인한 것이다.

[58] 도 36은 pVAX1-3484-CMV-△E1B-hGMCSF 제작을 위한 서브클로닝을 확인한 것이다.

[59] 도 37a는 dl324-BstBI와 셔틀벡터인 pSP72△E3-H1-shmTGF-β2 간의 1차 상동재조합 과정을 나타낸 것이다.

[60] 도 37b는 dl324-3484-CMVp-△E1B-mGMCSF-△E3-H1-shmTGFβ2 제작과정을 나타낸 것이다.

[61] 도 38은 dl324-BstB1-△E3-H1-shmTGFβ2와 pVAX1-3484-CMVp-△E1B-mGMCSF의 상동 재조합을 HindIII 및 PacI로 확인한 것이다.

[62] 도 39는 pVAX1-3484-hGMCSF 상동 재조합 과정을 나타낸 것이다.

[63] 도 40은 HindIII 패턴으로 상동 재조합된 DNA를 확인한 것이다.

[64] 도 41은 dl324-CMV-△E1B-mGMCSF-IRES-mDCN-△E3-H1-shmTGFβ2 바이러스 상동재조합을 HindIII 및 PacI로 확인한 것이다.

[65] 도 42a는 dl324△E3에 shmFoxP3와 shmTGFβ2를 상동재조합한 샘플들의 HindIII 패턴을 나타낸 것이다.

[66] 도 42b는 dl324△E3에 shhFoxP3와 shhTGFβ2를 상동재조합한 샘플들의 HindIII 패턴을 나타낸 것이다.

[67] 도 43a 및 도 43b는 dl324-3484-CMVp-△E1B-GMCSF-IRES-DCN-U6-shFoxP3-H1-shTGFβ2 제작과정을 나타낸 것이다.

[68] 도 44는 pCA14-3484-CMVp-△E1B-mGM-CSF-IRES-mDCN의 제작과정을 나타낸 것이다.

[69] 도 45는 pCA14-3484-CMVp-△E1B-mGM-CSF-IRES-mDCN을 트랜스펙션하였을 때 GM-CSF 및 데코린의 발현 여부를 ELISA로 확인한 것이다.

[70] 도 46a는 dl324-BstBI-△E3-U6-mFoxP3-H1-shmTGFβ2와 pCA14-3484-CMV-△E1B-mGMCSF-IRES-mDCN 간의 상동재조합 모식도 및 상동재조합으로 얻은 아데노바이러스에서 마우스세포주에 감염 시 마우스 TGFβ2의 mRNA 및 FoxP3의 mRNA 감소를 나타낸 것이다.

[71] 도 46b는 dl324-BstBI-△E3-U6-mFoxP3-H1-shmTGFβ2와 pCA14-3484-CMV-△E1B-mGMCSF-IRES-mDCN 간의 상동재조합으로 dl324-3484-CMVp-△E1B-mGMCSF-IRES-mDCN-U6-shFoxP3-H1-shTGFβ2 생성된 것을 HindIII (위 그림) 및 PacI (아래 그림)로 확인한 것이다 (마크표시:

상동재조합된 클론들).

[72] 도 47은 dl324-3484-CMVp-△E1B-GMCSF-IRES-DCN-U6-shFoxP3-H1-shTGFβ2의 상동재조합을 HindIII 및 PacI로 확인한 것이다.

[73] 도 48은 인간 흑색종 세포에서 FoxP3 또는 TGF-β2 mRNA 발현 억제를 실시간-PCR로 확인한 것이다.

[74] 도 49는 인간 GM-CSF 및 인간 데코린의 발현 여부를 ELISA로 확인한 것이다.

[75] 도 50은 마우스 GM-CSF 및 마우스 데코린의 발현 여부를 ELISA로 확인한 것이다.

[76] 도 51은 마우스 흑색종 세포에서 FoxP3 또는 TGF-β2 mRNA 발현 억제를 실시간-PCR로 확인한 것이다.

[77] 도 52는 항종양 효과를 나타낸 그래프이다.

[78] 도 53은 마우스 생존율을 확인한 것이다.

[79] 도 54는 항종양 효과를 나타낸 그래프이다.

[80] 도 55는 누드마우스에서 사람 유래 아데노바이러스에 의한 항종양 효과를 나타낸 것이다.

[81] 도 56은 누드마우스에서 사람 유래 아데노바이러스에 의한 면역활성 효과 확인한 것이다.

[82] 도 57은 C57BL/6 마우스에서 마우스 유래 아데노바이러스에 의한 면역활성 효과 확인한 것이다.

[83] 도 58은 *In vitro*에서 마우스 유래 아데노바이러스에 의한 면역활성 효과 확인한 것이다.

[84] 도 59는 마우스 유래 아데노바이러스에 의한 면역증강 효력 확인을 위한 조직화학적 검사를 결과이다.

[85] 도 60은 1~4종 유전자를 발현하는 아데노바이러스에 의한 항종양 효과를 확인한 것이다.

[86]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[87] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명은 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자; 및 TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2)을 포함하는 GM-CSF 및 shTGF-β2 공동 발현용 유전자 전달체를 제공한다.

[88] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명은 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자; 데코린(decorin) 유전자, TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2) 및 FoxP3 발현을 억제하는 shRNA(shFoxP3)을 포함하는 GM-CSF, 데코린, shTGF-β2 및 shFoxP3 공동 발현용 유전자 전달체를 제공한다.

[89] 본 발명자들은 종양 특이적 면역활성과 종양의 면역원성을 증가시킴으로써 항종양 활성이 극대화된 유전자 항종양 조성물을 개발하고자 예의 연구

노력하였다. 그 결과, GM-CSF 및 shTGF-β2를 공동 발현하는 유전자 전달체를 이용하여 대상세포에 형질도입시킬 경우, 질병유발의 원인이 되는 단백질인 TGF-β2 종양 관련 유전자에 작용하는 shRNA 방식의 RNA 간섭을 이용하여 TGF-β2 발현을 억제하여 면역내성을 유발하는 요소를 제한하고 동시에 GM-CSF에 의한 면역증강반응을 유도함으로써 항종양 효과가 향상되는 것을 확인하였다.

[90] GM-CSF, 데코린, shTGF-β2 및 shFoxP3 공동 발현용 유전자 전달체를 이용하여 대상세포에 형질도입시킬 경우, 각각의 유전자를 발현하는 경우 보다 특히 GM-CSF, shTGF-β2 발현하는 경우보다 항종양 효과가 더욱 뛰어남을 확인하였다.

[91] 본 명세서에서, 용어 "과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)"은 실시예에 예시된 GM-CSF뿐만 아니라, 면역증강반응을 유도하는 GM-CSF의 모든 유사체(homologues)를 포함한다.

[92] 마우스 GM-CSF 유전자는 Cancer Gene Therapy (2006) 13, 1061-1071에 나타낸 바와 같이, 서열번호 1로 표시된다.

[93] 인간 GM-CSF 유전자는 진뱅크 M11220에 나타낸 바와 같이, 서열번호 2로 표시된다.

[94] 본 명세서에서, 용어 "TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2)"는 국내 특허 공개 제2013-0088792호로 개시된 것을 사용하였으며, 상기 shRNA는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시된다.

[95] 본 명세서에서, 용어 "데코린(Decorin)"은 실시예에 예시된 데코린뿐만 아니라, 유전자 전달 효율을 증가시킬 수 있는 데코린의 모든 유사체(homologues)를 포함한다.

[96] 본 발명에서 유전자 전달 효율을 개선하는 데코린(decorin: DCN)은 SLRP (small leucine rich proteoglycan) 부류에 속하는 단백질로서 10-12개의 루이신 리치 리피트 (leucine rich repeat)로 구성되어 있으며, 코어 부위는 아치(arch) 형태로 되어 있어 세포외기질에 존재하는 여러 종류의 성장인자 또는 데코린 수용체와 결합이 용이한 구조로 형성되어 있다(Krusius T, Ruoslahti E., Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, 83(20):7683-7687; Day AA, et al., Biochem J, 1987, 248(3):801-805; Fisher LW, Termine JD, Young MF., J Biol Chem, 1989, 264(8):4571-4576). 데코린은 종양 성장인자 (TGF)-β의 활성을 억제시킴으로써 콜라겐의 섬유화를 막고 세포외기질의 구성(matrix assembly)에 관여하고, 종양 세포 성장을 억제하여 종양의 형성과 성장에 천연 길항제 (antagonist)로 작용한다고 알려져 있다 (Iozzo RV., Crit Rev Biochem Mol Biol, 1997, 32(2):141-174; Isaka Y, et al., Nat Med , 1996, 2(4):418-423). 또한, 데코린은 성장인자나 금속이온과 같은 세포외기질의 구성 성분과 반응하여 MMP-1(matrix metalloproteinase-1)과 MMP-2 등의 발현을 촉진시켜 세포외기질을 분해시킨다 (Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E., Nature, 1990, 346(6281):281-284; Vogel KG, Paulsson M,

Heinegard D., Biochem J, 1984, 223(3):587-597; Danielson KG, et al., J Cell Biol, 1997, 136(3) :729-743).

[97] 마우스 데코린 유전자는 진뱅크 BC138564로 나타낸 바와 같이 서열번호 5로 표시된다.

[98] 인간 데코린 유전자는 진뱅크 BT019800로 나타낸 바와 같이 서열번호 6으로 표시된다.

[99] 본 명세서에서, 용어 "FoxP3 발현을 억제하는 shRNA(shFoxP3)"은 하기 서열을 표적서열로 할 수 있다.

[100] 마우스 표적서열: 5'- TAT GCG ACC CCC TTT CAC C - 3' [서열번호 7]

[101] 인간 표적서열 : 5'- CAT GCG ACC CCC TTT CAC C -3' [서열번호 8]

[102] 본 발명에서 FoxP3 발현을 억제하는 shRNA는 FoxP3 유전자의 일부에 상보적인 서열을 가지고, FoxP3 유전자의 mRNA를 분해하거나, 번역을 억제할 수 있다. 상보성이 80-90%인 경우에는 mRNA의 번역을 억제할 수 있고, 100%인 경우에는 mRNA를 분해시킬 수 있다.

[103] 따라서, 본 발명에서 FoxP3 발현을 억제하는 shRNA는 마우스 mRNA의 1005~1023째 뉴클레오타이드에, 그리고 인간의 경우에도 동일한 부위인 인간 mRNA의 1005~1023번째 뉴클레오타이드에 대한 상보적인 서열에 대하여 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 100% 상동성을 갖는 염기서열을 포함할 수 있다.

[104] 한 양태로서, 마우스 shRNA는 서열번호 7(표적서열)에 나타낸 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어지고, 인간 shRNA는 서열번호 8(표적서열)에 나타낸 염기서열과 그의 상보적인 염기서열로 이루어질 수 있다. 상기 각각의 염기서열과 그의 상보적인 염기서열은 9 bp의 루프 영역에 의해 회문적으로(palindrom) 연결되어 헤어핀 구조를 형성하는 것일 수 있다.

[105] 상기 shFoxP3의 구체적인 예로는 하기 서열을 포함할 수 있다:

[106] 서열번호 7의 마우스 표적서열로 하는 shRNA: 5'- GAT CCG TAT GCG ACC CCC TTT CAC CTT CAA GAG AGG TGA AAG GGG GTC GCA TAT TTT TTG GAA A-3' [서열번호 9]

[107] 서열번호 8의 인간 표적서열로 하는 shRNA: 5'- GAT CCG CAT GCG ACC CCC TTT CAC CTT CAA GAG AGG TGA AAG GGG GTC GCA TGT TTT TTG GAA A-3' 서열번호 10].

[108] RNAi에 의해 FoxP3의 발현을 억제하는 물질로서는, 3'말단에 돌출부를 가지는 짧은 헤어핀 구조로 구성된 shRNA(short hairpin RNA)를 사용할 수도 있다.

[109] RNAi에 의해 FoxP3의 발현을 억제하는 물질은, 인공적으로 화학 합성하여도 좋고, 센스 가닥 및 안티센스 가닥의 DNA 서열을 역방향으로 연결한 헤어핀 구조의 DNA를 T7 RNA 폴리머라제에 의해 실험실 조건(in vitro)에서 RNA를 합성하여 제작하여도 무방하다. 실험실 조건에서 합성하는 경우, T7 RNA 폴리머라제 및 T7 프로모터를 이용하여, 주형 DNA로부터 안티센스 및 센스

RNA를 합성할 수 있다. 이들을 실험실 조건에서 어닐링한 후, 세포에 도입하면 RNAi가 유발되어, FoxP3 mRNA의 분해를 유도한다. 세포에의 도입은 예를 들면, 인산칼슘법, 또는 각종 트랜스펙션 시약(예를 들면, oligofectamine, lipofectamine 및 lipofection 등)을 이용한 방법에 의해 행할 수 있다.

[110] RNAi에 의해 FoxP3의 발현을 억제하는 물질로서는, shRNA 또는 상기 DNA을 포함하는 발현벡터를 이용하여도 좋고, 상기 발현벡터를 함유하는 세포를 이용하여도 좋다. 상기 발현벡터나 세포의 종류는 특별히 한정되지 않으나, 이미 의약으로서 사용되고 있는 발현벡터나 세포가 바람직하다.

[111] 본 발명에서는 서열번호 7 또는 서열번호 8로 표시되는 염기서열을 표적서열로 하는 shRNA를 이용할 수 있다.

[112] 따라서, 본 발명은 상기 shRNA 발현용 재조합 발현벡터를 포함한다.

[113] 본 발명의 재조합 벡터는 당해 분야에 공지된 재조합 DNA 방법에 의해 구성될 수 있다.

[114] 본 발명에서 shRNA를 전달하기에 유용한 바이러스 (또는 바이러스 벡터)로는 아데노바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노부속바이러스 등이 있으며, 종양에서와 같이 한시적인 발현 유도가 필요한 이유로 아데노바이러스가 바람직하다.

[115] 아데노바이러스에 상기 shRNA를 도입하기 위하여, shRNA 서열을 근거로 하여 하기 DNA를 제작할 수 있다.

[116] <마우스 표적서열에 대한 DNA>

[117] 탑 스트랜드: 5'- GATCC GTATGCGACCCCCTTTCACC TTCAAGAGA GGTGA AAGGGGGTCGCATATTTTTTGGAAA - 3' [서열번호 11]

[118] 바텀 스트랜드: 5'- AGCTT TTCCAAAAAATATGCGACCCCCTTTCACC TCTCTTGAA GGTGAAAGGGGGTCGCATACG - 3' [서열번호 12]

[119] <인간 표적서열에 대한 DNA>

[120] 탑 스트랜드: 5'- GATCCGCATGCGACCCCCTTTCACC TTCAAGAGA GGTGAAAGGGGGTCGCATGTTTTTTGGAAA - 3' [서열번호 13]

[121] 바텀 스트랜드: 5'-AGCTT TTCCAAAAAACATGCGACCCCCTTTCACC TCTCTTGAA GGTGAAAGGGGGTCGCATGCG - 3' [서열번호 14]

[122] 또한, 본 발명에서 shRNA를 전달하기에 유용한 비바이러스 벡터로는 전술한 바이러스 벡터를 제외한 통상적으로 유전자 요법에 사용되는 모든 벡터를 의미하며, 그러한 예로는 진핵세포에서 발현 가능한 다양한 플라스미드 및 리포좀 등이 있다.

[123] 한편, 본 발명에서 FoxP3 발현을 억제하는 shRNA는 전달된 세포에서 적절히 전사되기 위하여 적어도 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 것이 바람직하다. 상기 프로모터는 진핵세포에서 기능할 수 있는 프로모터라면 어떤 것이든지 무방하나, U6 프로모터가 RNA 중합효소 III로서 small size RNA를 생성하는데 유리한 이유로 특히 바람직하다. FoxP3 발현을 억제하는 shRNA의 효율적인

전사를 위하여 필요에 따라 리더 서열, 폴리아데닐화 서열, 프로모터, 인핸서(enhancer), 업스트림(upstream) 활성화 서열, 시그날 펩타이드 서열 및 전사 종결인자를 비롯한 조절서열을 추가로 포함할 수도 있다.

[124] 여기서, 이용된 용어 "작동 가능하게 연결된"이란 핵산 서열간의 결합이 기능적으로 연관되어 있는 것을 의미한다. 임의의 핵산서열이 작동 가능하게 연결된 경우는 임의의 핵산서열이 다른 핵산서열과 기능적으로 관련성을 가지도록 위치해 있는 경우이다. 본 발명에 있어서, 임의의 전사 조절서열이 shRNA의 전사에 영향을 미치는 경우, 상기 전사 조절서열이 상기 shRNA와 작동 가능하게 연결되어 있다고 말한다.

[125]

[126] 본 발명의 유전자 전달체를 제조하기 위해, GM-CSF 유전자 및 shTGF-β2; 또는 GM-CSF 유전자; 데코린 유전자, shTGF-β2 및 shFoxP3은 적합한 발현 구조체(expression construct) 내에 존재하는 것이 바람직하다. 상기 발현 구조체에서, 상기 유전자들은 프로모터에 작동적으로 결합되는 것이 바람직하다. 본 명세서에서, 용어 "작동적으로 결합된"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다. 본 발명에 있어서, 본 발명의 상기 목적 유전자들에 결합된 프로모터는, 바람직하게는 동물세포, 보다 바람직하게는 포유동물 세포에서 작동하여 데코린 유전자의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, CMV(cytomegalo virus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, β-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터 및 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[127] 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 발현 구조체는 폴리아네닐화 서열을 포함한다 (예: 소성장 호르몬 터미네이터 및 SV40 유래 폴리 아데닐화 서열).

[128] 본 발명의 유전자 전달체는 다양한 형태로 제작할 수 있는데, 이는 (i) 네이키드(naked) 재조합 DNA 분자, (ii) 플라스미드, (iii) 바이러스 벡터, 그리고, (iv) 상기 네이키드 재조합 DNA 분자 또는 플라스미드를 내포하는 리포좀 또는 니오좀의 형태로 제작할 수 있다.

[129] GM-CSF 유전자 및 shTGF-β2; 또는 GM-CSF 유전자; 데코린 유전자, shTGF-β2 및 shFoxP3은 통상적인 유전자 치료에 이용되는 모든 유전자 전달체에 적용될 수 있으며, 바람직하게는 플라스미드, 아데노바이러스(Lockett LJ, et al., Clin. Cancer Res. 3:2075-2080(1997)), 아데노부속 바이러스(Adeno-associated viruses:

AAV, Lashford LS., et al., Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations Ed. A. Meager, 1999), 레트로바이러스(Gunzburg WH, et al., Retroviral vectors. Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations Ed. A. Meager, 1999), 렌티바이러스(Wang G. et al., J. Clin. Invest. 104(11):R55-62(1999)), 헤르페스 심플렉스 바이러스(Chamber R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:1411-1415(1995)), 백시니아 바이러스(Puhlmann M. et al., Human Gene Therapy 10:649-657(1999)), 리포좀(Methods in Molecular Biology, Vol 199, S.C. Basu and M. Basu (Eds.), Human Press 2002) 또는 니오좀에 적용될 수 있다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 유전자 전달체는 GM-CSF 유전자 및 shTGF-β2; 또는 GM-CSF 유전자; 데코린 유전자, shTGF-β2 및 shFoxP3을 아데노바이러스에 적용하여 제조된다.

[130] i. 아데노바이러스

[131] 아데노바이러스는 중간 정도의 지놈 크기, 조작의 편의성, 높은 타이터, 광범위한 타깃세포 및 우수한 감염성 때문에 유전자 전달 벡터로서 많이 이용되고 있다. 지놈의 양 말단은 100-200 bp의 ITR (inverted terminal repeat)를 포함하며, 이는 DNA 복제 및 패키징에 필수적인 시스 엘리먼트이다. 지놈의 E1 영역 (E1A 및 E1B)은 전사 및 숙주 세포 유전자의 전사를 조절하는 단백질을 코딩한다. E2 영역 (E2A 및 E2B)은 바이러스 DNA 복제에 관여하는 단백질을 코딩한다. 현재 개발된 아데노바이러스 벡터 중에서, E1 영역이 결여된 복제 불능 아데노바이러스가 많이 이용되고 있다. 한편, E3 영역은 통상적인 아데노바이러스 벡터에서 제거되어 외래 유전자가 삽입되는 자리를 제공한다(Thimmappaya, B. et al., Cell, 31:543-551(1982); 및 Riordan, J. R. et al., Science, 245:1066-1073(1989)).

[132] 따라서, 본 발명의, GM-CSF 유전자 및 TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA은 결실된 E1 영역(E1A 영역 및/또는 E1B 영역, 바람직하게는 E1B 영역) 또는 E3 영역에 삽입되는 것이 바람직하다. 본 명세서에서 바이러스 지놈 서열과 관련하여 사용되는 용어,"결실"은 해당 서열이 완전히 결실된 것뿐만 아니라, 부분적으로 결실된 것도 포함하는 의미를 가진다.

[133] 또한, 아데노바이러스는 야생형 지놈의 약 105%까지 패킹할 수 있기 때문에, 약 2 kb를 추가적으로 패키징할 수 있다(Ghosh-Choudhury et al., EMBO J., 6:1733-1739(1987)). 따라서, 아데노바이러스에 삽입되는 상술한 외래 서열은 아데노바이러스의 지놈에 추가적으로 결합시킬 수도 있다. 아데노바이러스는 42개의 상이한 혈청형 및 A-F의 서브그룹을 갖는다. 이 중에서, 서브그룹 C에 속하는 아데노바이러스 타입 5가 본 발명의 아데노바이러스 벡터를 얻기 위한 가장 바람직한 출발물질이다. 아데노바이러스 타입 5에 대한 생화학적 및 유전적 정보는 잘 알려져 있다. 아데노바이러스에 의해 운반되는 외래 유전자는 에피좀과 동일한 방식으로 복제되며, 이에 숙주세포에 대해 유전적 독성이 매우 낮다. 따라서, 본 발명의 아데노바이러스 유전자 전달 시스템을 이용한 유전자

치료가 매우 안전할 것으로 판단된다.

[134] ii. 레트로바이러스

[135] 레트로바이러스는 자신의 유전자를 숙주의 지놈으로 삽입시키고, 대량의 외래 유전 물질을 운반할 수 있으며, 감염시킬 수 있는 세포의 스펙트럼이 넓기 때문에 유전자 전달 벡터로서 많이 이용되고 있다.

[136] 레트로바이러스 벡터를 구축하기 위하여, 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열은 레트로바이러스의 서열 대신에 레트로바이러스 지놈에 삽입되어 복제 불능의 바이러스를 생산한다. 바이리온을 생산하기 위하여, gag, pol 및 env 유전자를 포함하지만 LTR(long terminal repeat)와 Ψ서열은 없는 패키징 세포주를 구축한다(Mann et al., Cell, 33:153-159(1983)). 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열, LTR 및 Ψ서열을 포함하는 재조합 플라스미드를 상기 세포주에 이입하면, Ψ서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체의 생산을 가능하게 하며, 이 전사체는 바이러스로 패키징되고, 바이러스는 배지로 배출된다(Nicolas and Rubinstein "Retroviral vectors," In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez and Denhardt(eds.), Stoneham: Butterworth, 494-513(1988)). 재조합 레트로바이러스를 함유하는 배지를 수집하고 농축하여 유전자 전달체로 이용한다.

[137] 2세대 레트로바이러스 벡터를 이용한 유전자 전달이 발표되었다. Kasahara et al. Science, 266:1373-1376(1994))는 몰로니 뮤라인 류케미아 바이러스(MMLV)의 변이체를 제조하였고, 여기에서 EPO(erythropoietin) 서열을 엔벨로프 부위에 삽입하여 새로운 결합 특성을 갖는 키메릭 단백질을 생산하였다. 본 발명의 유전자 전달체도 이와 같은 2세대 레트로바이러스 벡터의 구축 전략에 따라 제조할 수 있다.

[138] iii. AAV 벡터

[139] 아데노부속 바이러스(AAV)는 비분열 세포을 감염시킬 수 있고, 다양한 종류의 세포에 감염할 수 있는 능력을 갖고 있기 때문에 본 발명의 유전자 전달체로 적합하다. AAV 벡터의 제조 및 용도에 대한 상세한 설명은 미국 특허 제 5,139,941 호 및 제 4,797,368 호에 상세하게 개시되어 있다.

[140] 유전자 전달체로서의 AAV에 대한 연구는 LaFace et al, Viology, 162:483486(1988), Zhou et al., Exp. Hematol. (NY), 21:928-933(1993), Walsh et al, J. Clin. Invest., 94:1440-1448(1994) 및 Flotte et al., Gene Therapy, 2:29-37(1995)에 개시되어 있다. 최근에, AAV 벡터는 낭포성 섬유증의 치료제로서 임상 I을 실시하고 있다.

[141] 전형적으로, AAV 바이러스는 두 개의 AAV 말단 리피트가 옆에 위치되어 있는 [0033] 목적의 유전자 서열을 포함하는 플라스미드(McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963-1973(1988); 및 Samulski et al., J. Virol., 63:3822-3828(1989)) 및 말단 리피트가 없는 야생형 AAV 코딩 서열을 포함하는 발현 플라스미드(McCarty et al., J. Virol., 65:2936-2945(1991))를 동시 형질전환시켜 제조된다.

[142] iv. 다른 바이러스 벡터

[143] 다른 바이러스 벡터들도 본 발명의 유전자 전달체로 이용할 수 있다. 백시니아 바이러스(Puhlmann M. et al., Human Gene Therapy 10:649-657(1999); Ridgeway, "Mammalian expression vectors," In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses. Rodriguez and Denhardt, eds. Stoneham: Butterworth, 467-492(1988); Baichwal and Sugden, "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," In: Kucherlapati R, ed. Gene transfer. New York: Plenum Press, 117-148(1986) 및 Coupar et al., Gene, 68:1-10(1988)), 렌티바이러스(Wang G. et al., J. Clin. Invest. 104(11):R55-62(1999)) 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스(Chamber R., et al., Proc.

[144] Natl. Acad. Sci USA 92:1411-1415(1995))로부터 유래된 벡터들도, 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열을 세포 내로 운반할 수 있는 운반 시스템으로 이용할 수 있다.

[145] v. 리포좀

[146] 리포좀은 수상에 분산된 인지질에 의해 자동적으로 형성된다. 외래 DNA 분자를 리포좀으로 성공적으로 세포 내로 운반한 예는 Nicolau 및 Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190(1982) 및 Nicolau et al., Methods Enzymol., 149:157-176(1987)에 개시되어 있다. 한편, 리포좀을 이용한 동물세포의 형질전환에 가장 많이 이용되는 시약으로는 리포펙타민(Lipofectamine, Gibco BRL)이 있다. 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열을 내포한 리포좀은 엔도사이토시스, 세포 표면에로의 흡착 또는 플라즈마 세포막과의 융합 등의 기전을 통해 세포와 상호작용하여 세포 내로 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열을 운반한다.

[147] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 유전자 전달체는 재조합 아데노바이러스 벡터이다.

[148] 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 아데노바이러스 벡터는 E1B 및 E3 영역이 결실된 것이고, 상기 GM-CSF 유전자는 결실된 E1B 영역에 삽입되며, 상기 TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA은 결실된 E3 영역에 삽입된다. 또한, 4종 유전자가 도입된 재조합 아데노바이러스 벡터는, 상기 GM-CSF 유전자 및 데코린 유전자는 결실된 E1B 영역에 삽입되며, 상기 shTGF-β2 및 shFoxP3은 결실된 E3 영역에 삽입된다

[149] 활성의 E1A 유전자를 포함하는 재조합 아데노바이러스는 복제 가능한 특성을 갖게 되고, E1B 영역이 결실되는 경우에는 세포 고사능을 증대시킬 수 있다. 본 명세서에서 바이러스 지놈 서열과 관련하여 사용되는 용어"결실"은 해당 서열이 완전히 결실된 것뿐만 아니라, 부분적으로 결실된 것도 포함하는 의미를 가진다. 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 변이되지 않은 E1A 유전자를 포함하거나 또는 변이된 활성의 E1A 유전자를 포함할 수 있다.

[150] 가장 바람직하게는, 본 발명의 재조합 아데노바이러스 벡터는 결실된 E1

영역에 5'에서 3'방향으로 GM-CSF 유전자, 및 결실된 E3 영역에 5'에서 3'방향으로 TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA을 포함한다(도 1의 (a)).

[151] 또한, 4종 유전자가 도입된 재조합 아데노바이러스 벡터는 결실된 E1 영역에 5'에서 3'방향으로 GM-CSF 유전자, IRES(internal ribosome entry site), 데코린 유전자, E3 영역에 5'에서 3'방향으로 shFoxP3 및 shTGF-β2를 포함한다(도 1의 (b)).

[152] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 유전자 전달체를 포함하는 항종양 조성물을 제공한다.

[153] 본 발명의 약제학적 조성물에 유효성분으로 포함되는 유전자 전달체는 상술한 본 발명의 유전자 전달체와 동일한 것이므로, 유전자 전달체에 대한 상세한 설명은 본 발명의 약제학적 조성물에도 그대로 적용된다. 따라서, 본 명세서의 불필요한 반복 기재에 의한 과도한 복잡성을 피하기 위하여 공통 사항은 그 기재를 생략한다.

[154] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 GM-CSF 유전자; 및 TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2)을 포함하는 항종양 조성물, 또는 GM-CSF 유전자; 데코린(decorin) 유전자, TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2) 및 FoxP3 발현을 억제하는 shRNA(shFoxP3)을 포함하는 항종양 조성물을 제공한다.

[155] 본 발명의 조성물에 포함되는 재조합 아데노바이러스는 상술한 바와 같이, 다양한 종양 세포에 대하여 살상 효능을 나타내므로, 본 발명의 약제학적 조성물은 종양과 관련된 다양한 질병 또는 질환, 예컨대 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 결장암 및 자궁경부암 등의 치료에 이용될 수 있다. 본 명세서에서 용어 "치료"는 (i) 종양 세포 형성의 예방; (ii) 종양 세포의 제거에 따른 종양과 관련된 질병 또는 질환의 억제; 및 (iii) 종양 세포의 제거에 따른 종양과 관련된 질병 또는 질환의 경감을 의미한다. 따라서, 본 명세서에서 용어"치료학적 유효량"은 상기한 약리학적 효과를 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

[156] 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[157] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[158] 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구 투여가 바람직하고, 예컨대 정맥내 투여, 복강내 투여, 근육내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수 있다. 난소암에서 복강 내로 투여하는 경우 및 간암에서 문맥으로 투여하는 경우에는 주입 방법으로 투여할 수 있고, 유방암의 경우에는 종양 매스에 직접 주사하여

투여할 수 있으며, 결장암의 경우에는 관장으로 직접 주사하여 투여할 수 있고, 방광암의 경우에는 카테터 내로 직접 주사하여 투여할 수 있다.

[159] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 약제학적 조성물은 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{15}$ pfu/㎖의 재조합 아데노바이러스를 포함하며, 통상적으로 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$ pfu를 이틀에 한번씩 2주 동안 주사한다.

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

[161] 본 발명의 약제학적 조성물은 단독의 요법으로 이용될 수 있으나, 다른 통상적인 화학 요법 또는 방사 요법과 함께 이용될 수도 있으며, 이러한 병행 요법을 실시하는 경우에는 보다 효과적으로 암 치료를 할 수 있다. 본 발명의 조성물과 함께 이용될 수 있는 화학 요법제는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 프로카르바진(procarbazine), 메클로레타민(mechlorethamine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 멜팔(melphalan), 클로라부실(chlorambucil), 비술판(bisulfan), 니트로소우레아(nitrosourea), 디악티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 블레오마이신(bleomycin), 플리코마이신(plicomycin), 미토마이신(mitomycin), 에토포시드(etoposide), 탁목시펜(tamoxifen), 택솔(taxol), 트랜스라티늄(transplatinum), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 빈크리스틴(vincristin), 빈블라스틴(vinblastin) 및 메토트렉세이트(methotrexate) 등을 포함한다. 본 발명의 조성물과 함께 이용될 수 있는 방사 요법은 X-선 조사 및 γ-선 조사 등이다.

[162] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 면역활성 및 면역원성을 증대시킨다.

[163] 또한, 본 발명은 상기 유전자 전달체를 도입한 아데노바이러스를 제공한다.

[164] 본 발명에서 RNAi를 위한 핵산 분자를 전달하기에 유용한 바이러스(바이러스 벡터)로는 아데노바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노부속 바이러스, 등이 있으며, 종양에서와 같이 한시적인 발현 유도가 필요한 이유로 아데노바이러스가 바람직하다.

[165]

[166] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본

발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[167]

발명의 실시를 위한 형태

[168]

[169] **참조예 1: GM-CSF 유전자 준비**

[170] 마우스 GM-CSF 유전자는 Dr. Gerald C. O'Sullivan (Cork Cancer Research Centre, Mercy University Hospital and Leslie C. Quick Jnr. Laboratory, University College Cork, Cork, Ireland)로부터 입수하였으며, 염기서열은 Cancer Gene Therapy (2006) 13, 1061-10710에 나타낸 바와 같고, 서열번호 1로 표시된다.

[171] 인간 GM-CSF 유전자는 InvivoGen로부터 입수하였으며, 염기서열은 진뱅크 M11220에 나타낸 바와 같고, 서열번호 2로 표시된다.

[172]

[173] **제조예 1: GM-CSF 발현 아데노바이러스 제작**

[174] **1) 복제불능 아데노바이러스 제작**

[175] 바이러스의 제작을 위하여 Dr O'Sullivan으로부터 기증받은 pMG-mGM-CSF의 마우스 GM-CSF 유전자로부터 Microvix사의 pCA14 벡터에 삽입하여 pCA14-mGM-CSF 셔틀벡터를 제작하였다. 이렇게 얻은 셔틀벡터는 XmnI으로 절단한 후, 복제불능바이러스 제작을 위해 BstBI으로 절단하여 단일가닥으로 전환된 아데노바이러스 backbone DNA dl324 BstBI(Heider, H et al., Biotechniques, 28(2):260-270, 2000)와 함께 대장균 BJ5183(Addgene에서 구입)에 형질전환시켜 상동 재조합을 유도함으로써 면역활성화 사이토카인을 발현하는 아데노바이러스 dl324-mGM-CSF를 제작하였다[도 2].

[176] 제작된 바이러스로부터 발현되는 사이토카인의 생성량을 측정하기 위해서 B16F10 마우스 흑색종 세포에 여러 농도의 MOI로 감염시키고 감염 후 48시간 후에 배지를 수거하여 ELISA 분석으로 분비되는 양을 측정하였다.

[177] mGM-CSF 유전자 PCR을 위하여 프라이머의 5'과 3' 양 끝단에 XhoI/ HindIII 부위를 각각 사용하였다.

[178] 센스 프라이머: ccg ctc gag atg tac agg atg caa ctc ctg tct [서열번호 15]

[179] 안티센스 프라이머: ccc aag ctt tca ttt ttg gcc tgg ttt ttt gca [서열번호 16]

[180] PCR 조건:

[181] 변성-95 ℃ 1 min, 어닐링-55 ℃ 1 min, 신장-72 ℃ 1 min -> 30 cycle

[182] 72 ℃ 5 min

[183] 마우스 GM-CSF를 발현하는 복제불능 아데노바이러스를 인간 전립선암세포에 감염시켜 24시간 후 배지를 무혈청 배지로 교체한 후 다시 24시간 배양하여 배지 내로 분비된 mGM-CSF를 ELISA로 측정하였다. 도 2는 dl324 BstBI벡터와 pCA14-mGM-CSF와의 상동재조합에 해당되는 도면(우)과 100 MOI로 감염되었을 때 24시간 동안 약 600 pg/ml의 mGM-CSF 양이 분비되고 있음(좌)을

보여주었다.

[184]

[185] 인간 GM-CSF 유전자는 pORF-hGM-CSF(InvivoGen)로부터 얻었다.

[186] 인간 GM-CSF 프라이머(센스 프라이머: 5'- TAT CTC GAG ATG TGG CTG CAG AGC CTG CTG (XhoI) [서열번호 17], 안티센스 프라이머: 5'- GGT AAG CTT TCA CTC CTG GAC TGG CTC CCA (HindIII)) [서열번호 18]을 사용하여 다음과 같은 조건의 PCR을 실시하였다.

[187] PCR 조건:

[188] 예열-95 ℃ 2분,

[189] 변성-95 ℃ 1분, 어닐링-65 ℃ 1 분, 신장-72 ℃ 1분 -> 30 cycle

[190] 72 ℃ 5 분

[191] 인간 GM-CSF 유전자를 PCR 후, gel extraction으로 DNA를 얻고, XhoI과 HindIII로 자른 후 XhoI과 HindIII로 자른 pCA14와 연결하여 pCA14-hGM-CSF를 얻었다.

[192] 인간 GM-CSF를 발현하는 복제 불능 아데노바이러스는 dl324 벡터는 BstB1으로 효소 컷팅(enzyme cutting)하고, pCA14-hGM-CSF는 XmnI으로 효소 컷팅하여 대장균 BJ5183에 형질전환(transformation)하여 상동 재조합을 진행하였다.

[193] 도 3의 레인 3은 dl324-BstB1 벡터와 pCA14-hGM-CSF의 상동재조합된 것을 보여주고 있다.

[194]

[195] 2) 복제가능 아데노바이러스 제작- dl324-3484-CMV-ΔE1B-mGM-CSF

[196] pVAX1 플라스미드(Life Technologies)를 이용한 E1 셔틀벡터를 만드는 과정은 다음과 같다.

[197] 먼저, pBSKII-3484[합성한 3484 염기DNA (inverted terminal repeats-packaging signal-mouse survivin promoter-E1A-BGH poly A-E1B 55 kDa gene cassette)가 HindIII/BamHI site로 pBSKII안에 들어간 형태임]의 [ITR-Ψ-mSurp-E1A-BGHpA] 부분을 HindIII, EcoRI을 이용하여 pVAX1 플라스미드에 클로닝하였다. 그렇게 하여 pVAX1-3484-△E1B를 얻었다. 그런 다음, pCA14의 [SV40-E1R] 부분을 EcoRI, StuI(blunt) 을 이용하여 pVAX1-3484-ΔE1B 플라스미드에 클로닝하여 pVAX1-3484-ΔE1B-E1R를 제작하였다. pVAX1-3484-ΔE1B 벡터는 EcoRI, ApaI(blunt) 이용하였다(도 4).

[198] 그 다음 pVAX1-3484-ΔE1B-E1R의 MSP(mouse surviving promoter)를 KpnI, XhoI이용하여 CMV 프로모터로 변경하였다. 도 5는 셔틀벡터 pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R 및 이의 제작과정 중간생성 plasmid construct들이 제대로 서브클로닝되는지 보여주는 제한효소에 의해 절단된 DNA 단편지도를 나타낸 것이다.

[199] pCA14-mGM-CSF에서 [CMVp-mGM-CSF] 부분을 BglII(blunt), SalI을 이용하여

자르고, pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R 셔틀벡터를 EcoRI(blunt), SalI로 자른 후에 클로닝하였다(도 6). 그 결과, pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R-mGMCSF은 SmaI로 잘라 삽입된 것을 확인하였다(도 7).

[200] dl324-BstB1 + pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R-mGMCSF

[201] dl324-BstBI 백본은 Bsp1191로 자르고 pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R-mGMCSF 셔틀 벡터는 Pme I로 잘라 선형화(linearization)시킨 후 상동 재조합하였다(도 7).

[202] 도 8의 (a)는 HindIII 패턴 확인하여 1~6 클론 모두 재조합된 것을 보이며 (b)는 Pac I로 잘리는지 재차 확인하였다.

[203] 인간 GM-CSF를 발현하는 종양선택적 복제가능 아데노바이러스 제작

[204] 인간 GM-CSF를 발현하는 기존 pCA14-hGM-CSF로부터 BglII(blunt) 후 SalI으로 잘랐다. 이것을 아가로스 겔에서 전개시켜 hGM-CSF 유전자를 빼내고 pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R을 EcoRI으로 자르고 블런팅 후 SalI으로 잘라 hGM-CSF DNA와 연결시켰다. 종양선택적 복제가능 아데노바이러스를 제작하기 위해 dl324 Δ3-백본은 Bsp1191로 자르고 셔틀벡터는 Pme I로 잘랐다. 그리고 대장균 BJ5183에 형질전환(transformation)하여 상동 재조합을 실시함으로써 아데노바이러스 dl324-3484-CMVp-ΔE1B-hGM-CSF를 제작하였다(도 9). 도 9의 레인 1~5는 상동 재조합되었다.

[205] 상동 재조합이 확인된 박테리아 클론에서 얻은 DNA는 PacI으로 절단한 다음, 293A(a subclone of the 293 human embryonic kidney cell line) 세포주에 형질전환(transfection)하여 아데노바이러스를 생산하였다. 293세포주에서 증식시킨 뒤 초원심분리에 의한 CsCl 농도구배에 의해 분리한 후 dialysis를 거쳐 얻은 순화된 아데노바이러스를 Qbiogene(Carlsbad, CA, USA)에 의해 개발된 표준 플라크 분석 키트로 역가를 산출하였다. 최종 바이러스 역가는 $6x10^{10}$~$4x10^{11}$였다.

[206]

[207] **참조예 2: TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGFβ2) 제작**

[208] 국내 출원 제2013-0010233호에 개시된 바와 같이 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(이하, shTGFβ2라 명함)을 제작하였다.

[209]

[210] **제조예 2: 마우스 shTGFβ2를 발현하는 아데노바이러스 제작**

[211] 종양 선택적 살상 복제 가능한 아데노바이러스를 만들기에 앞서 아데노바이러스의 E1A부분에 여러 유전자를 넣을 수 있는 셔틀 벡터를 제작하고자 pBSKII 플라스미드[Stratagene, USA]에 E1A와 E1B55kDa 유전자를 포함하며 다양한 효소 부위(Enzyme site)를 포함하는 pBSKII-3484 합성 유전자를 제작하였다[도 10의 (a)]. 합성된 유전자를 상동 재조합 확인을 용이하게 하기 위한 pCA14 셔틀벡터에 도입하기 위한 형태로 바꾸기 위하여 pBSKII-3484를

PCR하여 FspI로 제한효소를 처리한 뒤 블런팅(blunting) 효소로 블런트 엔드(blunt end)를 만들고 다시 *Bam*HI으로 처리하였다. pCA14[Microbix BiosystemsInc, Canada]는 *Ssp*I으로 제한효소를 이용하여 자른 후 블런팅 효소를 이용하여 블런트 엔드를 만든 후, *Bgl*II를 처리하여 동일전달 제한효소(Isoschizomer)인 *Bam*HI과 *Bgl*II 그리고 양끝의 블런트 엔드를 통해 합성된 유전자를 삽입하여 셔틀 벡터 pCA14-3484를 제작하였다[도 10의 (b)]. 그 후 CMV 프로모터 유전자를 *Kpn*I과 *Xho*I로 pCA14-3484에 삽입하여 pCA14-CMV-3484를 제작[도 10의 (c)]. 그리고 pCA14-3484-CMV에서 EcoRI과 SalI 제한효소의 의해 E1B55kDa 부분을 자르고 블런팅(blunting)한 후 다시 연결(ligation)된 pCA14-3484-CMV-ER1를 얻었다[도 10의 (d)].

[212] 1단계-dl324-BstB1-ΔE3-H1-shmTGFβ2 제작

[213] pSP72△E3/si seq(도 11)의 E3-left와 U6 프로모터 사이에 있는 Sph I과 BamHI으로 절단해 H1 프로모터와 shmTGF-β2를 삽입하여 pSP72△E3/H1-shTGF-β2를 제작하였다.

[214] IX 유전자가 없는 dl324-BstBI-를 SpeI으로 자른 후 XmnI으로 자른 pSP72△E3/H1-shmTGFβ2와 대장균 BJ5183에서 동시에 형질전환시켜 상동재조합을 유도 후 HindIII 패턴을 확인하였다. 재조합된 2번의 HindIII 패턴 후와 4번의 PacI 절단 후 패턴을 모두 확인하였다(도 12).

[215] 2 단계-dl324-BstB1-ΔE3-H1-shmTGFβ2 + pVAX1-3484-CMV-ΔE1B-E1R 상동재조합

[216] 1) pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R 제작

[217] pVAX1 벡터(도 4)에 pBSKII-3484(도 10의 (a))의 [ITR-Ψ-mouse Survivin promoter-E1A-BGHpA] 부분을 HindIII, EcoRI를 이용하여 서브클로닝하였다. pCA14(Microvix, Canada)의 [SV40-E1R] 부분을 EcoRI, StuI (blunt)을 이용하여 앞에 만들어진 벡터에 서브클로닝하였다. pVAX1-3484-ΔE1B 벡터는 EcoRI, ApaI(blunt)을 이용하였다(도 4).

[218] 그런 다음, pVAX1-3484-ΔE1B-E1R의 마우스 서바이빈(surviving) 프로모터를 KpnI, XhoI를 이용하여 CMV 프로모터로 변경하였다(도 6).

[219] dl324-BstBI-ΔE3-H1-shmTGFβ2는 BstBI로 잘라 선형화시키고 pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R은 PmeI로 잘라 선형화시켜 상동재조합하였다(도 13의 (a)). 도 13의 (b)는 E1 상동재조합용 pVAX 셔틀벡터 완성을 제한효소 패턴으로 확인하였다. 레인 C는 dl324-BstBI-△E3-H1-shmTGF-β2 viral vector DNA이고, 레인 1~3은 상동재조합 후 얻은 벡터 dl324-3484-△E3-H1-shmTGF-β2 박테리아 클론 DNA들을 HindIII와 PacI로 잘라 확인한 결과 클론 1,2,3 모두 새로이 재조합되었음을 확인하였다.

[220] 3단계-아데노바이러스 제작

[221] 상동 재조합이 확인된 박테리아 클론에서 얻은 DNA는 PacI으로 절단한 다음, 293A(a subclone of the 293 human embryonic kidney cell line) 세포주에

형질전환(transfection)하여 아데노바이러스를 생산하였다. 293세포주에서 증식시킨 뒤 초원심분리에 의한 CsCl 농도구배에 의해 분리한 후 dialysis를 거쳐 얻은 순화된 아데노바이러스를 Qbiogene(Carlsbad, CA, USA)에 의해 개발된 표준 플라크 분석 키트로 역가를 산출하였다. 최종 바이러스 역가는 $6x10^{10}$~$4x10^{11}$였다.

[222]

[223] **참조예 3: 데코린 유전자 준비**

[224] 인간 데코린 유전자는 InvivoGen (San Diego, CA, USA)로부터 입수하였으며, 진뱅크 BT019800에 나타낸 바와 같이, 서열번호 6으로 표시된다.

[225] 마우스 데코린 유전자는 InvivoGen (San Diego, CA, USA)로부터 입수하였으며, 진뱅크 BC138564에 나타낸 바와 같이, 서열번호 5로 표시된다.

[226]

[227] **제조예 3: 데코린 발현 아데노바이러스 제작**

[228] 인간 데코린(decorin)은 pORF-hDCN (InvivoGen)으로부터 얻었다.

[229] 양 끝단에 각각 XhoI/EcoRV 가지게 프라이머(센스 프라이머: 5'- TAT ctcgag ATGAAGGCCACTATCATCCTCCTTCTG (Xho I, 57.1) [서열번호 19], 안티센스 프라이머: 5'- GCG GATATC TTACTTATAGTTTCCGAGTTGAATGGCAG (EcoRV, 57.31) [서열번호 20])를 이용하여 다음과 같은 조건의 PCR을 실시하였다.

[230] PCR 조건:

[231] 예열 95℃ 5 min,

[232] 변성-95℃ 30 sec. 어닐링-58℃ 30 sec. 신장-72℃ 1 min 10 sec → 30 cycle,

[233] 72℃ 5 min

[234] 데코린을 포함하는 PCR 산물을 pCA14에 서브클로닝하였다. 상동재조합을 위하여 dl324-BsttBI은 BstBI으로 선형화시키고, 셔틀 벡터인 pCA14-인간 데코린은 XmnI으로 선형화시킨 후 대장균 BJ5183에 형질전환(transformation)시켜 상동재조합하였다.

[235] 상동 재조합하여 얻은 바이러스는 증식과정 및 정제 후 titation을 거치고 DU-145에 감염시킨 다음, 인간 데코린 발현을 ELISA로 확인하였다(도 14).

[236] 마우스 데코린은 pORF-mDCN (InvivoGen)로부터 얻었다.

[237] 마우스 데코린의 발현을 위해 defective type은 pCA14(Micorvix, Canada)를 사용하였다. 이때, 유전자 도입을 위해 프라이머(센스 : 5'- CGC GAATTC ATGAAGGCAACTCTCATCTTCTTCCTTC (EcoRI)[서열번호 21], 안티센스: 5'- GCCG GTCGAC TTACTTGTAGTTTCCAAGTTGAATGGCTT (SalI) [서열번호 22])을 사용하였다.

[238] PCR은 다음과 같이 실시하였다.

[239] PCR 조건:

[240] 예열 95℃ 5 min,

[241] 변성-95℃ 30 sec. 어닐링-58℃ 30 sec. 신장-72℃ 1 min 10 sec → 30 cycle,

[242] 72℃ 5 min

[243] 마우스 데코린을 발현하는 복제불능 아데노바이러스는 dl324-BstBI을 Bsp119로 선형화시키고 셔틀벡터인 pCA14-mDCN은 FspII으로 선형화시켜 상동재조합하였다. 그 결과 dl324-CMVp-△E1B55-mDCN을 확립하였다.

[244] 마우스 데코린을 발현하는 복제가능 아데노바이러스는 dl324-BstBI을 Bsp119로 선형화시키고 셔틀벡터인 pVAX1-3484-mDCN은 PmeI으로 선형화시켜 상동재조합하였다. 그 결과 dl324-3484-CMVp-△E1B-mDCN을 확립하였다 (도 15a). 도 15b는 데코린 유전자를 가지는 셔틀벡터를 사람의 DU-145에 트랜스펙션하거나 탑재한 복제불능 및 복제가능 아데노바이러스를 DU-145 세포에서 감염 1일 후 배지를 무혈청(serum-free) 배지로 바꾸고, 1일 동안 배양하여 배지로 나온 데코린의 양을 ELISA로 측정한 결과이다, 셔틀벡터 및 복제불능 및 복제가능 아데노바이러스 모두 데코린을 효과적으로 분비하였다.

[245] 상동재조합이 확인된 박테리아 클론에서 얻은 DNA는 PacI으로 절단한 다음, 293A(a subclone of the 293 human embryonic kidney cell line) 세포주에 형질전환(transfection)하여 아데노바이러스를 생산하였다. 293세포주에서 증식시킨 뒤 초원심분리에 의한 CsCl 농도구배에 의해 분리한 후 dialysis를 거쳐 얻은 순화된 아데노바이러스를 Qbiogene(Carlsbad, CA, USA)에 의해 개발된 표준 플라크 분석 키트로 역가를 산출하였다. 최종 바이러스 역가는 $6x10^{10}$~$4x10^{11}$였다.

[246]

[247] **참조예 4: FoxP3 발현을 억제하는 shRNA 제작**

[248] FoxP3의 사일런싱(silencing)을 유도하기 위하여, 센스 25 mer/안티센스 25 mer(9 개 염기를 가지는 루프를 가운데에 포함)에 근거한 shRNA를 제작하고 아데노바이러스에서 발현시키기 위해 셔틀벡터에 도입하고 상동 재조합(homologous recombination) 바이러스를 제작하였다.

[249] shRNA FoxP3의 특이성 검증을 위하여, 스크램블드(scrambled) shRNA를 가지는 셔틀벡터도 동시에 제작하였다. 종래 방법에 비하여 특이성과 발현억제능이 크게 향상되었다.

[250] 실험방법은 다음과 같다.

[251] shRNA 1의 세포내 발현을 유도하기 위하여,

[252] 센스: 5'-GATC CGT TCC ACA ACA TGC GAC CCT TCA AGA GAG GGT CGC ATG TTG TGG AAC TTT TTT GGA AA-3' [서열번호 23]

[253] 안티센스:5'-AGCTTTTCCAAAAAAGTTCCACAACATGCGACCCTCTCTTGA AGGGTCGCATGTTGTGGAACG-3' [서열번호 24]의 DNA 올리고뉴클레오타이드를 제작하였다.

[254] shRNA 2의 세포 내 발현을 유도하기 위하여,

[255] 센스: 5'-GAT CCG CAT GCG ACC CCC TTT CAC CTT CAA GAG AGG TGA AAG GGG GTC GCA TGT TTT TTG GAA A-3' [서열번호 25]

[256] 안티센스:5'-AGCTTTTCCAAAAAACATGCGACCCCCTTTCACCTCTCTTGAA GGTGAAAGGGGGTCGCATGCG-3' [서열번호 26]의 DNA 올리고뉴클레오타이드를 제작한 후, 인간의 shRNA 후보 1번과 2번에 대한 센스, 안티센스 두 DNA가닥을 각각 어닐링시킨 다음, pSP72△E3-U6-NC를 BamHI과 HindIII로 잘라 어닐링된 DNA 가닥(양끝단이 BamHI과 HindIII 인식부위 자연히 가지게 됨)을 연결시켜 pSP72△E3-U6-shFoxP3를 제작하였다(도 16).

[257] 도 18은 인간 FoxP3용 shRNA 1번과 2번 pSP72△E3-U6-shFoxP3을 500 ng과 1000 ng을 인간 전립선암세포인 DU145에 트랜스펙션하고 48시간 배양 후, 웨스턴 블랏을 통하여 인간 FoxP3에 대해 2개의 shRNA 스크리닝 결과 2번 타겟에 해당되는 shRNA에서 50% 이상의 사일런싱(silencing) 효과를 확인하였다.

[258] 이에 근거하여 하기 타겟을 선정하였다

[259] 인간 표적서열 : '5-CAT GCG ACC CCC TTT CAC C -3' [서열번호 8]

[260] 마우스의 경우에는 인간에서 선정한 염기서열과 같은 위치에서 상동성을 가지는 염기서열을 타겟으로 선정하였다

[261] 마우스 표적서열: 5'- TAT GCG ACC CCC TTT CAC C - 3' [서열번호 7]

[262] 웨스턴 블랏팅에 의해 선정된 서열번호 2의 염기서열을 아데노바이러스에서 발현시키기 위해 양 끝단에 BamHI과 HindIII 염기 사이트를 삽입하고 중간에 TTCAAGAGA의 9개의 염기를 가지는 루프(loop)를 가지게끔 제작하였다. 마우스의 경우에는 인간에서 선정한 염기서열과 같은 위치에서 상동성을 가지는 염기서열을 마찬가지의 방법으로 어닐링시켜 마우스 FoxP3 shRNA를 발현하는 pSP72△E3-U6-shFoxP3를 얻는다.

[263] 상기 표적서열에 대하여 25/30 +9 루프를 가지는 shRNA를 합성하고 이들의 표적서열에 대한 억제 효과를 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다.

[264] 인간 표적서열(서열번호 8)을 위한 shRNA: 5'-GATCCGCATGCGACCCCCTTTCACC TTCAAGAGA GGTGAAAGGGGGTCGCATGTTTTTTGGAAA -3' [서열번호 10]

[265] 마우스 표적서열 (서열번호 7)을 위한 shRNA: 5'-5'- GAT CCG TAT GCG ACC CCC TTT CAC CTT CAA GAG AGG TGA AAG GGG GTC GCA TAT TTT TTG GAA A-3' [서열번호 9]

[266] 앞서 설명한 웨스턴 블랏팅에 의해 선정된 서열번호 3 또는 4의 염기서열을 아데노바이러스에서 발현시키기 위해 양 끝단에 BamHI과 HindIII 염기사이트를 삽입하고 중간에 TTCAAGAGA의 9개의 염기를 가지는 루프를 가지게끔 제작하였다. 즉, 인간 shRNA의 기본 구조는 5'-25 mer-루프(4 mer)-30mer-3'으로 구성되어 있다.

[267] 이에 근거하여 아데노바이러스에 도입시키기 위한 사람의 하기 2가닥의

DNA를 제작하였다.

[268] 탑 스트랜드: 5'-GATCCGCATGCGACCCCCTTTCACC TTCAAGAGA GGTGAAAGGGGGTCGCATGTTTTTTGGAAA - 3' [서열번호 11]

[269] 바텀 스트랜드: 5'-AGCTT TTCCAAAAAACATGCGACCCCCTTTCACC TCTCTTGAA GGTGAAAGGGGGTCGCATGCG - 3' [서열번호 12]

[270] 그리고 아데노바이러스에 도입시키기 위한 마우스의 하기 2가닥의 DNA를 제작하였다. 탑 스트랜드: 5'- GATCC GTATGCGACCCCCTTTCACC TTCAAGAGA GGTGA AAGGGGGTCGCATATTTTTTGGAAA - 3' [서열번호 13]

[271] 바텀 스트랜드: 5'- AGCTT TTCCAAAAAATATGCGACCCCCTTTCACC TCTCTTGAA GGTGAAAGGGGGTCGCATACG - 3' [서열번호 14]

[272]

[273] **제조예 4: shFoxP3 발현하는 복제 불능 아데노바이러스 벡터 제작**

[274] 실시간 RT-PCR을 통하여 확인된 가장 효과적으로 발현을 억제하는 shRNA 염기서열을 센스와 안티센스 서열이 TTCAAGAGA를 사이에 두고 위치하게 하고, 양 끝에 BamHI과 HindIII 제한효소 염기서열을 가진 염기로 구성된 올리고뉴클레오티드와 상보적인 올리고뉴클레오티드를 각각 합성하여 어닐링(annealing)시킨 뒤, E3 셔틀 벡터인 pSP72△E3/si-negative 벡터[도 11, pSP72 cloning 벡터(Promega)에 아데노바이러스 E3L(26591-28588)과 E3R(30504-31057)을 삽입하고 Ambion사의 psilencer 2.1-U6 hygro에서 -EcoRI-U6 promoter + -BamHI-nonsense shRNA용 염기서열인 actaccgttgttataggtgttcaagagacacctataacaacggtagtttttttggaa-HindIII [서열번호 27]가 들어간 형태의 pSP72△E3/si-negative (scrambled)]를 제작하였다.

[275] 인간 또는 마우스의 shRNA FoxP3 도입을 위하여, 먼저 상기한 pSP72△E3/si-negative 플라스미드를 BamHI과 HindIII를 처리한 후, 인간 또는 마우스의 shRNA FoxP3를 삽입시켜 pSP72△E3-sh-human FoxP3 또는 pSP72△E3-sh-mouse FoxP3를 제작하였다[도 16, 17]. 음성 대조군 아데노바이러스로는 양끝에 BamHI과 HindIII를 가지게 하고 스크램블드(scrambled) 염기서열(actaccgttgttataggtg)과 loop(ttcaagaga) 제작하였다.

[276] 도 17은 pSP72△E3-shhFoxP3로 클로닝된 것을 BamHI/HindIII로 잘라 shFoxP3 크기의 DNA가 나온 것을 확인하였다. 도 18은 확인된 셔틀 DNA pSP72△E3-shhFoxP3 1번과 2번을 DU-145에 형질전환(transfection)시켜 세포 내 FoxP3 수준이 얼마나 감소하는지를 확인하여 2번 DNA 서열이 더 효과 있음을 확인하였다. 확인된 셔틀벡터 DNA (2번 FoxP3 shRNA를 발현)와 dl324-IX viral DNA 벡터와의 상동재조합을 보여주고 있다. 이때 셔틀벡터는 XmnI으로 잘라 선형화시키고 dl324-IX는 SpeI으로 잘라 선형화시켜 대장균 BJ5183에 형질전환(transformation)시켜 상동재조합하였다(도 19).

[277] 아데노바이러스의 E3 부위 PCR로 양성 클론(#1, 2, 4, 5, 9, 13)만을 선별한 후[도

20의 (a): dl324/IX 아데노바이러스 백본(backbone) 게놈(genomic) DNA와 pSP72-shhFoxP3 셔틀 벡터와의 상동 재조합 후 sh-hFoxP3가 포함된 클론들을 선별한 PCR 결과, 도 20의 (b): dl324/IX 아데노바이러스 백본 게놈 DNA와 pSP72-shhFoxP3 셔틀 벡터와의 상동 재조합 후 IX 유전자 유무를 통하여 도 20의 (a)에서 확인된 shhFoxP3가 포함된 클론 중에서 게놈 DNA도 포함된 클론들을 재차 선별한 PCR 결과], 도 20의 (c), (d)에서 보듯이 HindIII 절단 패턴(digestion pattern)과 PacI으로 최종 재조합체를 선별하였다.

[278] 도 20 (a)에서, dl324/IX 레인은 dl324 백본이고; 셔틀 레인은 pSP72-U6-sh-hFoxP3이다. 레인 1~13은 dl324 백본과 pSP72-shhFoxP3 간의 상동 재조합 후 박테리아 클론(bacterial clone)으로부터 얻은 플라스미드를 E3 부위 증폭시킨 결과를 보여주는 것으로 약 1 kb에 해당하는 밴드가 나타나야 positive이다. E3 부분을 PCR을 하였을 때 E3 부분이 없는 dl324 백본에서는 1 kb에 해당하는 밴드가 나타나지 않지만, E3부분에 U6 프로모터와 shhFoxP3의 sh 컨스트럭트(construct)가 삽입된 셔틀 벡터의 경우 PCR하면 1 kb의 산물(product)의 크기(size)가 나타나는 것을 통하여 상동 재조합되었는지 확인할 수 있다.

[279] 도 20의 (b)에서, dl324/IX 레인은 dl324 백본이고; 셔틀 벡터는 pSP72-U6-hFoxP3이다. 도 20의 (a)에서 확인된 shhFoxP3이 포함된 클론 중(#1, 2, 4, 5, 9, 13)에서 게놈 DNA도 포함된 클론들을 재차 선별하는 PCR 결과로 상동재조합이 되었다는 것을 확인한 도 20의 (a)에 이은 연속적인 선별 실험으로 양쪽에서 positive한 클론들이 상동 재조합이 되었음을 의미한다. IX 유전자 부분을 PCR을 하였을 때 IX 유전자를 가지고 있는 dl324 백본과 IX 유전자를 가지고 있지 않은 셔틀 벡터의 차이를 이용하여 상동 재조합이 되었는지를 확인하였다. 그 결과 #1, 2, 4, 5, 9, 13 모두 다시 선별되었다.

[280] 도 20의 (c)는 백본과 샘플과의 HindIII로 컷팅(cutting)하였을 때 달라지는 패턴의 차이에 따라 상동 재조합되었는지를 최종적으로 확인한 것이다. 각각의 DNA들 중 #9 클론만이 기존의 dl324-IX(맨 왼쪽 첫 번째 레인)과는 다른 HindIII 패턴을 보였다. 다른 클론에서 유래된 DNA는 출처를 알 수 없는 DNA였다. 이는 #9 클론유래 DNA만이 백본 아데노바이러스 DNA가 셔틀 벡터와 상동 재조합을 이루었음을 의미하며, 따라서 본 발명은 #9 클론에 기초로 하고 있다.

[281] 도 20의 (d)는 pPoly2라는 플라스미드에 PacI 부위에 삽입되어있는 Ad-dl324-IX-sh-hFoxP3을 PacI으로 절단하여 pPoly2가 제대로 절단되는지 확인함으로써 바이러스 생산에 요구되는 최종 구조체(construct)를 결정하는 실험이다. 도 20의 (c)에서 확인한 #9 클론에 속하는 DNA는 PacI으로 절단 시 약 2 kb에 해당하는 pPoly2 백본 DNA가 빠져나왔다. 확인 후, PacI 절단 후 함께 293A 세포에 트랜스펙션(transfection)하여 아데노바이러스를 생산하였다.

[282] 즉, 상기의 방법으로 제작된 E3 셔틀 벡터들을 각각 XmnI 제한 효소로 처리하여 단일가닥으로 만든 다음, SpeI 제한효소를 처리하여 단일가닥이 된

복제 불능 아데노바이러스인 dl324와 함께 대장균 BJ5183에서 동시에 형질전환시켜 유전자 상동재조합을 유도하였다. 상동 재조합된 플라스미드 DNA를 수득하여 HindIII 제한효소로 처리하여 DNA 패턴의 변화를 확인하고 최종적으로 서열 분석하여 상동재조합 유무를 확인한 후, 확인된 플라스미드들을 PacI으로 절단한 뒤 293 세포주에 형질전환하여 shRNA FoxP3을 발현하는 복제불능 아데노바이러스를 제작하였다. (복제 가능 아데노바이러스에 shRNA를 제작하는 경우에는 shRNA에 의한 억제 효과와 세포 라이시스(lysis) 효과가 혼재되어 있어 억제 효과만을 명확하게 확인하기 어렵기 때문에 복제 불능 아데노바이러스를 제작하였다). 이 아데노바이러스는 293 세포주에서 증식시켜 CsCl 변화도(gradient)로 농축하여 한계 희석배양법(limiting dilution) 또는 용균반검사(plaque assay)로 바이러스의 역가를 결정하였다. 최종 바이러스 역가는 $6x10^{10}$~$4x10^{11}$였다.

[283] 도 21은 마우스에서의 genomic DNA인 dl324-IX와 셔틀벡터인 pSP72ΔE3-U6-shFoxP3와의 상동재조합 과정으로, 생성된 DNA의 HindIII 패턴 및 PacI 컷팅을 통해 제대로 상동재조합된 마우스 FoxP3 shRNA 발현하는 바이러스성 DNA를 얻었음을 나타낸 것이다.

[284] 3) 암세포에서의 효과 확인-shRNA 발현하는 아데노바이러스에 의한 FoxP3 발현 억제 확인

[285] 인간 FoxP3의 shRNA 확인 결과, 인간 흑색종 세포 A375에서 1 moi의 아데노바이러스에서 사일런싱 효과가 나타났으며 50 MOI의 바이러스 감염 시 50% 이상의 사일런싱 효과를 보였다[도 22].

[286] 마우스 FoxP3의 shRNA 확인 결과, 마우스 흑색종 세포 B16BL6에서 1000 moi 이상의 아데노바이러스에서 50%의 사일런싱(silencing) 효과를 보였다. 인간에 비해 상대적으로 낮은 감염율 때문에 매우 많은 양의 바이러스를 감염시켜 그 효과를 확인하였다[도 23].

[287]

[288] **제조예 5: shTGFβ2와 shFoxP3 동시에 발현되는 복제불능 아데노바이러스 제작**

[289] 1) pSP72△E3/H1-shTGFβ2의 제작

[290] pSP72△E3/U6-shTGFβ2의 E3 left와 U6 프로모터 사이에 있는 Sph I과 U6 프로모터와 shTGFβ2 서열 사이의 BamHI으로 절단하여 U6 프로모터 부위를 제거하였다. 여기에 H1 프로모터 서열을 가지는 DNA 올리고뉴클레오타이드를 탑 스트랜드와 3' 말단에는 SphI과 5' 말단에는 BamHI 부위를 가지는 바텀 스트랜드 각각 제작하여 어닐링시켜 삽입하여 pSP72△E3/H1-shTGFβ2를 제작하였다(도 24)

[291] top: 5'-cgaattcatatttgcatgtcgctatgtgttctgggaaatcaccataaacgtgaaatg

[292] tctttggatttgggaatcttataagttctgtatgagaccactc g-3' [서열번호 28]

[293] bottom: 5'-gatccgagtggtctcatacagaacttataagattcccaaatccaaagacatttca

[294] cgtttatggtgatttcccagaacacatagcgacatgcaaatatgaattc gcatg-3' [서열번호 29]

[295] 제조예 4에서 제작한 pSP72△E3-H1-shFoxP3에서 HindIII 블런팅 처리 후 KpnI 처리하여 SV40 poly A 부위를 제거한 다음, 상기 pSP72△E3/H1-shTGF-β2에서 SphI 블런팅 후 KpnI 처리하여 H1 프로모터-shTGFβ2-SV40 poly A를 빼내어 HindIII (blunt)/KpnI 처리한 pSP72△E3-H1-shFoxP3와 연결시켰다. 그 결과, pSP72△E3/U6-shFoxP3-H1-shTGFβ2 셔틀벡터를 제작하였다(도 25).

[296] 제작한 벡터에서 shFoxP3, shTGF-β2가 효과적으로 단백질 발현을 억제하는지 알아보기 위하여 실험을 사람의 A375에서 셔틀 벡터 형태로의 트랜스펙션 시 FoxP3 및 TGFβ2의 감소 효과를 실시간-PCR로 확인하였다(도 26b). 바이러스의 제작을 위하여 genomic viral DNA인 dl324-BstBI-△E3-U6-shmFoxp3-H1-shmTGFβ2는 BstBI으로 사이트 컷팅하고 셔틀벡터인 pVAX1-3484-CMVp-△E1B-E1R은 PmeI으로 사이트 컷팅한 후 대장균 BJ5183에 형질도입시켜 상동재조합을 유도하였다(도 26a).

[297] 상동재조합이 확인된 박테리아 클론에서 얻은 DNA는 PacI으로 절단한 다음, 293A(a subclone of the 293 human embryonic kidney cell line) 세포주에 형질전환(transfection)하여 아데노바이러스를 생산하였다. 293세포주에서 증식시킨 뒤 초원심분리에 의한 CsCl 농도구배에 의해 분리한 후 dialysis를 거쳐 얻은 순화된 아데노바이러스를 Qbiogene(Carlsbad, CA, USA)에 의해 개발된 표준 플라크 분석 키트로 역가를 산출하였다. 최종 바이러스 역가는 $6x10^{10}$~$4x10^{11}$였다.

[298]

[299] **제조예 6: GM-CSF 및 데코린 탑재 복제 가능 아데노바이러스 제작**

[300] GM-CSF와 데코린을 동시에 발현하는 종양선택적 복제 가능 아데노바이러스를 다음과 같이 제작하였다.

[301] pIRES (Clontech)의 MCS(multi cloning site) A에는 GM-CSF 유전자를 삽입하고, MCS B에는 데코린 유전자를 삽입하였다(도 27).

[302] 인간 GM-CSF 유전자를 pIRES로 MCS A 부위로 서브클로닝하기 위하여 PCR용 프라이머를 제작하였다. 센스 스트랜드는 5'말단에 XhoI 부위를 가지는 5'-CCG CTCGAG ATGTGGCTGC AGAGCCTGCT G-3' [서열번호 30]과 안티센스 스트랜드로 5' 말단에 MluI을 가지는 5'-CCGACGCGTTCACTCCTGGACTGGCTCCCA-3' [서열번호 31]을 제작하였다. PCR 주형으로는 pORF-hGMCSF를 사용하여 초기 변성-95 ℃ 2 min 후, 변성-95℃ 1 min, 어닐링-55℃ 1 min, 신장-72 ℃ 1 min을 30회 반복하였다. 그리고 마지막으로 최종 신장-72℃ 5 min을 수행하였다.

[303] 인간 데코린 유전자를 pIRES로 MCS B 부위로 서브클로닝하기 위하여 PCR용 프라이머를 제작하였다. 센스 스트랜드는 5'말단에 XbaI 부위를 가지는 5'-GGC TCTAGA ATGAAGGCCACTATCATCC-3' [서열번호 32]과 안티센스 스트랜드로 5' 말단에 NotI을 가지는

5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTTACTTATAGTTTCCGAG-3' [서열번호 33]을 제작하였다. PCR 주형으로는 pCA14-hDCN를 사용하여 초기 변성-95 ℃ 2 min한 후, 변성-95 ℃ 1 min, 어닐링-55 ℃ 1 min, 신장-72 ℃ 1 min 30 sec을 30회 반복하였다. 그리고 마지막으로 최종 신장 72 ℃ 5 min을 수행하였다.

[304] 마우스 GM-CSF 유전자를 pIRES로 MCS A 부위로 서브클로닝하기 위하여 PCR용 프라이머를 제작하였다. 센스 스트랜드는 5'말단에 XhoI 부위를 가지는 5'-CCG CTCGAG ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCT-3' [서열번호 34]과 안티센스 스트랜드로 5' 말단에 MluI을 가지는 5'-CCGACGCGT TCATTTTTGGCCTGGTTTTTTGCA-3' [서열번호 35]을 제작하였다. PCR 주형으로는 pCA14-mGM-CSF를 사용하여 초기 변성-95 ℃ 2 min한 후, 변성-95 ℃ 1 min, 어닐링-55 ℃ 1 min, 신장-72 ℃ 1 min을 30회 반복하였다. 그리고 마지막으로 최종 신장-72 ℃ 5 min을 수행하였다.

[305] 마우스 데코린 유전자를 pIRES로 MCS B 부위로 서브클로닝하기 위하여 PCR용 프라이머를 제작하였다. 센스 스트랜드는 5'말단에 SalI 부위를 가지는 5'-gggg gtcgac ATGAAGGCAACTCTCATCTTCTTC-3' [서열번호 36]과 안티센스 스트랜드로 5' 말단에 NotI을 가지는 5'-gggg gcggccgc TTACTTGTAGTTTCCAAGTTGAATGG-3' [서열번호 37]을 제작하였다. PCR 주형으로는 pORF-mDCN를 사용하여 초기 변성-95 ℃ 2 min한 후, 변성-95 ℃ 1 min, 어닐링-55 ℃ 1 min, 신장-72 ℃ 1 min 30 sec을 30회 반복하였다. 그리고 마지막으로 최종 신장-72 ℃ 5 min을 수행하였다.

[306] 다음은 pIRES에 마우스 GM-CSF와 마우스 데코린을 삽입하는 과정을 나타낸 것이다.

[307] 도 28에서, C1은 pIRES로 대조군이며, C2는 pIRES/mGM-CSF-hDCN으로 샘플과 유사하게 pIRES 벡터에 두 개의 유전자가 클로닝되어 있지만 HindIII 패턴이 다른 대조군이고, 레인 1~4는 pIRES/mGM-CSF-mDCN으로 서브클로닝을 시도한 것 중 레인 3이 성공한 것을 HindIII로 확인한 것이다.

[308] 1) <u>pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R 제작</u>

[309] pVAX1에 pBSKII-3484의 HindIII/EcoRI 단편을 삽입한 후 여기에 다시 pCA14의 ECORI/StuI 단편을 연결시켜 pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R를 얻었다[도 4].

[310] 1) pVAX1-mart1 2) pVAX1-3484-△E1B-E1R 3) pVAX1-3484-CMV-△E1B-E1R을 PmeI/SmaI으로 잘라 확인하여 성공적으로 셔틀벡터가 제작되었음을 확인하였다[도 5].

[311] 2) <u>마우스 GM-CSF와 마우스 데코린이 삽입된 셔틀벡터 제작</u>

[312] Oncolytic 셔틀벡터로의 클로닝은 다음과 같이 수행하였다.

[313] pIRES-mGMCSF-mDCN은 BglII와 FspI으로 잘라 마우스 GM-CSF와 마우스 데코린을 얻었다. pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R은 SalI 처리 후 블런팅하고 BglII한 다음, BglII와 FspI의 단편과 연결시켰다[도 29].

[314] 서브클로닝된 것은 다음과 같이 확인하였다.

[315] PmeI으로 잘라 두 개의 DNA 크기로 확인하여 최종적으로 pVAX1-3484-CMVp-△E1B-IRES-mGMCSF-mDCN을 얻었다[도 30].

[316] 3) 마우스 GM-CSF와 마우스 데코린이 발현하는 종양선택적 복제가능 아데노바이러스 제작

[317] 바이러스 생성을 위하여 viral backbone DNA는 BstBI으로 자르고 pVAX1-3484-CMVp-△E1B-IRES-mGMCSF-mDCN을 PmeI로 선형화시켜 대장균 BJ5183에 형질전환(transformation)시켜 상동재조합 DNA를 생성하였다. 그 결과, HindIII 패턴과 PacI 절단으로 두 개 클론 모두 성공적으로 재조합된 것을 확인하였다[도 31].

[318] 바이러스 DNA를 흑색종 세포주 B16F10에 형질전환(transfection)(2 μg)하고 1일 후 배지를 무혈청 배지로 갈아준 다음, 하루 동안 배양한 후 배지 내로 방출된 마우스 GM-CSF와 마우스 데코린을 측정하였다. 그 결과, 이들 DNA로부터 마우스 GM-CSF와 마우스 데코린이 정상적으로 발현되고 있음을 ELISA로 확인할 수 있었다[도 32].

[319] 4) pIRES-인간 GM-CSF로의 인간 데코린 유전자의 서브클로닝

[320] 확인은 XbaI/NotI 절단으로 레인 2,3,4,5,7이 제대로 서브클로닝되어 pIRES-hGMCSF-IRES-hDCN이 완성되었다. 그 다음으로 pCA14-3484-CMV-△E1B와 pIRES-hGMCSF-IRES-hDCN과의 연결을 유도하였다.

[321] pIRES-hGMCSF-hDCN으로부터 BglII/FspI (blunt end)하고, pCA14-3484-CMV-△E1B (이것은 pCA14 SspI (blunt end)/EcoRI 한 후 3484 함유 플라스미드를 HindIII (blunting)/EcoRI 하여 얻음)를 pCA14의 SalI (blunting)/BglII 한 것과 연결하여 pCA14-3484-CMV-△E1B-hGM-CSF-IRES-hDCN을 얻었다. 이의 확인은 앞서 사용한 인간 데코린 프라이머(센스는 XhoI, 안티센스는 NotI을 가지는 새로운 프라이머 사용, 센스: 5'-GGC TCT AGA ATG AAG GCC ACT ATC ATC C-3' [서열번호 38]; 안티센스: 5'-ATA GTT TAG CGG CCG CTT ACT TAT AGT TTC CGA G-3' [서열번호 39])와 인간 GM-CSF 프라이머(서열번호 17 및 18)를 이용하여 PCR을 실시하여 유전자 삽입 여부를 확인하였다[도 33]. 도 34에서 보듯이 데코린과 GM-CSF 모두 제대로 유전자 삽입된 것을 확인하였다.

[322] 서브클로닝된 pCA14-3484-CMV-△E1B-hGMCSF-IRES-hDCN으로부터 인간 GM-CSF와 인간 데코린이 발현되는지를 살펴보았다. 이을 위하여 DU-145에 pIRES-hGMCSF, pIRES-hGMCSF-IRES-hDCN 및 pCA14-3484-△E1B-hGMCSF-IRES-hDCN 을 2 μg 트랜스펙션하여 하루 후에 배지를 무혈청 배지로 바꾼 다음, 다시 24시간 경과 후 배지 내의 GM-CSF와 데코린을 ELISA로 측정하였다.

[323] 그 결과, 최종 셔틀벡터에서 정상적으로 GM-CSF와 데코린이 분비되고 있음을 확인하였다(도 35b). 바이러스의 제작을 위하여 genomic viral DNA인

dl324-BstBI은 BstBI으로 사이트 컷팅하고 셔틀벡터인 pVAX1-3484-CMVp-△E1B-E1R-mGMCSF-IRES-mDCN은 PmeI으로 사이트 컷팅한 후, 대장균 BJ5183에 형질도입시켜 상동재조합을 유도하였다(도 35a).

[324] 상동재조합이 확인된 박테리아 클론에서 얻은 DNA는 PacI으로 절단한 다음, 293A(a subclone of the 293 human embryonic kidney cell line) 세포주에 형질전환(transfection)하여 아데노바이러스를 생산하였다. 293세포주에서 증식시킨 뒤 초원심분리에 의한 CsCl 농도구배에 의해 분리한 후 dialysis를 거쳐 얻은 순화된 아데노바이러스를 Qbiogene(Carlsbad, CA, USA)에 의해 개발된 표준 플라크 분석 키트로 역가를 산출하였다. 최종 바이러스 역가는 $6x10^{10}$~$4x10^{11}$였다.

[325]

[326] **제조예 7: 마우스 GM-CSF 유전자 및 마우스 shTGFβ2 탑재 아데노바이러스 제작**

[327] 1) pVAX1-3484-CMV-ΔE1B55-mGMCSF 제작

[328] 먼저, 제조예 1에서 확보한 pCA14-mGMCSF에서 CMV-mGMCSF를 부분을 BglII(blunt), SalI로 컷팅하여 얻은 후 pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R (EcoRI/SalI 후)와 연결하여 서브클로닝을 확인하였다 (도 7).

[329] 마우스 GM-CSF를 발현하는 pVAX1-3484-CMV-ΔE1B-E1R은 도 6에 나타난 바와 같으며, 인간 GM-CSF를 발현하는 pVAX1-3484-CMV-ΔE1B-E1R도 마우스와 같이 동일한 방식으로 제작하였다(도 36).

[330] 2) Ad-3484-CMV-ΔE1B-mGMCSF-ΔE3-H1-shmTGFβ2로 상동재조합

[331] dl324-BstB1-ΔE3-H1-shmTGFβ2와 pVAX1-3484-CMV-ΔE1B-mGMCSF와의 상동재조합을 확인하였다(도 37).

[332] dl324-BstBI-ΔE3-H1-shmTGFβ2는 제조예 2의 1단계에서 제작한 것으로, dl324-BstBI은 SpeI으로 선형화(사이트 컷팅)하고 셔틀 벡터인 pSP72ΔE3/shmTGFβ2는 XmnI으로 선형화시켜 대장균 BJ5183에서 1차 상동재조합을 실시하였다 (도 37a). 2차 상동재조합은 dl324-BstBI-ΔE3-H1-shmTGFβ2를 BstBI 사이트 컷팅하고, pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R-mGMCSF를 PmeI 사이트 컷팅하여 2차 상동재조합을 진행하였다 (도 37b). 그 다음 dl324-BstBI-ΔE3-H1-shmTGFβ2와 pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R-mGMCSF와의 상동재조합 결과는 도 38에 나타내었다.

[333] 인간 GM-CSF와 인간 shTGF-β2도 마우스와 상기와 동일한 방식으로 제작하였다(도 39).

[334] dl324-Δ3-U6-shhTGF-β2 백본은 Bsp1191로 효소 컷트하고 셔틀(pVAX1-3484-마우스 GM-CSF)은 Pme I로 효소 컷트하여 선형화시킨 후, 대장균 BJ5183에 형질전환시켜 상동재조합을 실행하였다.

[335] 상동재조합된 DNA의 확인은 상동재조합된 클론들로부터 플라스미드 DNA를

추출하여 HindIII로 잘라 패턴을 dl324-BstBI-ΔE3-U6-shhTGFβ2와 비교한 결과 레인 1, 3, 7, 9, 11, 12에서 성공적으로 재조합된 것을 알 수 있었다(도 40).

[336] 상동재조합이 확인된 박테리아 클론에서 얻은 DNA는 PacI으로 절단한 다음, 293A(a subclone of the 293 human embryonic kidney cell line) 세포주에 형질전환(transfection)하여 아데노바이러스를 생산하였다. 293세포주에서 증식시킨 뒤 초원심분리에 의한 CsCl 농도구배에 의해 분리한 후 dialysis를 거쳐 얻은 순화된 아데노바이러스를 Qbiogene(Carlsbad, CA, USA)에 의해 개발된 표준 플라크 분석 키트로 역가를 산출하였다. 최종 바이러스 역가는 $6x10^{10}$~$4x10^{11}$였다.

[337]

[338] **제조예 8: GM-CSF 유전자, 데코린 유전자 및 shRNA (shTGF-β2)가 탑재된 종양선택적 살상 아데노바이러스 제작**

[339] 제조예 2에서의 dl324-BstBI-ΔE3-H1-shmTGFβ2를 BstBI 사이트 컷팅하였다. 셔틀벡터는 제조예 6에서 얻은 pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R-mGMCSF-IRES-mDCN을 PmeI으로 선형화하여 대장균 BJ5183에 형질도입하여 상동재조합을 유도하였다.

[340] 도 41에서 보듯이, 상동재조합된 클론들로부터 플라스미드 DNA를 추출하여 HindIII로 잘라 패턴을 dl324-BstBI-ΔE3-H1-shmTGFβ2와 비교한 결과, 레인 2, 3, 4 성공적으로 재조합되었으며, 이를 모두 정상적으로 PacI 분할이 이루어지고 있었다.

[341] 상동 재조합이 확인된 박테리아 클론에서 얻은 DNA는 PacI으로 절단한 다음, 293A(a subclone of the 293 human embryonic kidney cell line) 세포주에 형질전환(transfection)하여 아데노바이러스를 생산하였다. 293세포주에서 증식시킨 뒤 초원심분리에 의한 CsCl 농도구배에 의해 분리한 후 dialysis를 거쳐 얻은 순화된 아데노바이러스를 Qbiogene(Carlsbad, CA, USA)에 의해 개발된 표준 플라크 분석 키트로 역가를 산출하였다. 최종 바이러스 역가는 $6x10^{10}$~$4x10^{11}$였다.

[342]

[343] **제조예 9: GM-CSF 유전자, 데코린 유전자, shRNA(shTGF-β2 + shFoxP3)가 탑재된 종양선택적 살상 아데노바이러스 제작 (마우스)**

[344] 제작은 두 단계에 걸쳐 단계적으로 제작하였다.

[345] 1 단계는 dl324-BstBI에 pSP72△E3-U6-shFoxP3-H1-shTGFβ2 셔틀벡터를 상동재조합하는 것이고, 이를 위해 dl324-BstBI은 SpeI 효소로, pSP72-△E3-U6-shmFoxP3-H1-shmTGFβ2는 XmnI로 컷팅한 후 대장균 BJ5183에 형질전환하였다(도 43의 (1)). 그 결과, 도 42a에서와 같이 레인 1,2,3,4 모두 상동재조합되었음을 알 수 있었다.

[346] 2단계는 여기에 다시 pCA14-3484-CMVp-△E1B-GMCSF-IRES-DCN 셔틀벡터를 상동재조합한다.

[347] 2단계의 마우스 GM-CSF와 마우스 데코린을 발현하는 셔틀벡터는 다음과 같이 제작하였다.

[348] 1) pCA14-3484-CMV-△E1B-mGMCSF-IRES-mDCN으로의 서브클로닝 과정

[349] pIRES-mGMCSF-mDCN으로부터 BglII/FspI (blunt end)하고, pCA14-3484-CMV-△E1B (이것은 pCA14 SspI (blunt end)/EcoRI 한 후 3484 함유 플라스미드를 HindIII (blunting)/EcoRI 하여 얻음)를 pCA14의 SalI (blunting)/Bgl II 한 것과 연결하여 pCA14-3484-CMVp-△E1B-mGMCSF-IRES-mDCN을 얻었다(도 44).

[350] pCA14-3484-CMV-△E1B-mGMCSF-IRES-mDCN 셔틀 벡터 2 μg을 마우스 흑색종세포인 B16F10에 6 웰에 형질전환(transfection)한 후 1일이 지난 다음 무혈청 배지로 바꿔주고, 다시 1일을 경과하였을 때 배지 내로 방출된 마우스 GM-CSF와 마우스 데코린을 ELISA로 측정하였다. 그 결과, 24시간 동안 약 2500 pg/ml의 마우스 GM-CSF 및 마우스 데코린이 분비되었음을 확인하였다[도 45].

[351] pCA14-3484-CMVp-△E1B-mGMCSF-IRES-mDCN는 NruI 효소로, dl324-△E3-U6-shmFoxP3-H1-shmTGFβ2는 BstBI 효소로 컷팅한 후 대장균 BJ5183에 형질전환하였다[도 43의 (2)]. 그 결과 얻은 각 박테리아 클론들로부터 HindIII 검사에 의해 50여개의 클론 DNA 중 6개가 상동재조합된 것을 확인하였고 (도 46b의 위) , 그 중 1개에서만 PacI 절단된 것을 확인할 수 있었다(도 46b의 아래).

[352] 상동재조합 후 TGF-β2의 발현양은 B16BL6 마우스 세포에서 500 moi 그리고 특히 1000 moi에서 현저히 감소하는 것을 mRNA에서 확인하였으며, FoxP3의 경우 셔틀벡터를 트랜스펙션 시 감소하는 것을 mRNA 수준에서 확인하였다(도 46a).

[353] 상동 재조합이 확인된 박테리아 클론에서 얻은 DNA는 PacI으로 절단한 다음, 293A(a subclone of the 293 human embryonic kidney cell line) 세포주에 형질전환(transfection)하여 아데노바이러스를 생산하였다. 293세포주에서 증식시킨 뒤 초원심분리에 의한 CsCl 농도구배에 의해 분리한 후 dialysis를 거쳐 얻은 순화된 아데노바이러스를 Qbiogene(Carlsbad, CA, USA)에 의해 개발된 표준 플라크 분석 키트로 역가를 산출하였다. 최종 바이러스 역가는 $6x10^{10}$~$4x10^{11}$였다.

[354]

[355] **제조예 10: GM-CSF 유전자, 데코린 유전자, shRNA(shTGF-β2 + shFoxP3)가 탑재된 종양선택적 살상 아데노바이러스 제작 (인간)-dl324-3484-CMV-E1B-hGMCSF-IRES-hDCN-U6-shhFoxP3-H1-shhTGFβ2**

[356] 제작은 제조예 9와 같이 두 단계에 걸쳐 단계적으로 제작하였다.

[357] 1 단계는 dl324-BstBI에 pSP72△E3-U6-shFoxP3-H1-shTGFβ2 셔틀벡터를 상동재조합하고, 이를 위해 dl324-BstBI은 SpeI 효소로,

pSP72-△E3-U6-shmFoxP3-H1-shmTGFβ2는 XmnI로 컷팅한 후 대장균 BJ5183에 형질전환하였다. 그 결과, 박테리아에서 뽑은 각 클론의 DNA들을 뽑아 HindIII 패턴을 분석한 결과, 샘플 1,2,3,4 모두 상동재조합된 것을 확인하였고, PacI 분할도 정상적으로 나타났다 (도 42b).

[358] 2단계는 여기에 다시 pCA14-3484-CMV-△E1B-hGMCSF-IRES-hDCN 셔틀벡터를 상동재조합한다.

[359] 2단계의 인간 GM-CSF와 인간 데코린을 발현하는 셔틀벡터는 다음과 같이 제작하였다.

[360] 1) pCA14-3484-CMV-△E1B-hGMCSF-IRES-hDCN으로의 서브클로닝 과정

[361] pIRES-hGMCSF-hDCN으로부터 BglII/FspI (blunt end)하고, pCA14-3484-CMV-△E1B (이것은 pCA14 SspI (blunt end)/EcoRI 한 후 3484 함유 플라스미드를 HindIII (blunting)/EcoRI 하여 얻음)를 pCA14의 SalI (blunting)/Bgl II 한 것과 연결하여 pCA14-3484-CMV-△E1B-hGMCSF-IRES-hDCN을 얻었다(도 44에서 마우스를 인간으로 치환).

[362] 제조예 6에서 서브클로닝한 pCA14-3484-hGMCSF-IRES-hDCN 셔틀 벡터는 NruI으로 잘라 선형화시키고, dl324-BstbI-△E3-U6-shhFoxp3-H1-shhTGF-β2 백본(도 43의 (1))은 Bsp1191로 잘라 선형화시킨 후, 대장균 BJ5183에 형질전환시켜 상동재조합을 유도하였다. HindIII 패턴과 PacI 절단에 의해 2번 클론이 제대로 상동재조합된 것을 확인하였다(도 47).

[363] 상동재조합이 확인된 박테리아 클론에서 얻은 DNA는 PacI으로 절단한 다음, 293A(a subclone of the 293 human embryonic kidney cell line) 세포주에 형질전환(transfection)하여 아데노바이러스를 생산하였다. 293세포주에서 증식시킨 뒤 초원심분리에 의한 CsCl 농도구배에 의해 분리한 후 dialysis를 거쳐 얻은 순화된 아데노바이러스를 Qbiogene(Carlsbad, CA, USA)에 의해 개발된 표준 플라크 분석 키트로 역가를 산출하였다. 최종 바이러스 역가는 $6x10^{10}$~$4x10^{11}$였다.

[364] 인간 흑색종 세포인 A375에서 인간 shFoxP3, 인간 shTGFβ2에 의한 FoxP3 또는 TGF-β2 mRNA 발현 억제를 실시간-PCR로 확인하였다 (도 48).

[365] 인간 흑색종 세포인 A375, SK-Mel28에서 인간 GM-CSF, 인간 데코린이 정상적으로 발현되는 것을 ELISA로 확인하였다 (도 49).

[366] 마우스 흑색종 세포인 B16F10에서 마우스 GM-CSF, 마우스 데코린이 정상적으로 발현되는 것을 ELISA로 확인하였다 (도 50).

[367] 마우스 흑색종 세포인 B16BL6 또는 B16F10에서 마우스 shFoxP3, 마우스 shTGF-β2에 의한 FoxP3 또는 TGF-β2 mRNA 발현 억제를 실시간-PCR로 확인하였다 (도 51).

[368]

[369] **실시예 1: 마우스에서 마우스 유전자와 shRNA 발현하는 종양선택적 아데노바이러스에 의한 항종양 효과**

[370] 마우스 흑색종 세포주[기탁번호 KCLRF-BP-00313] 1 x 10^6 cell/100 ㎕를 복벽에 주입하고 종양 크기가 60 mm^3에 이르렀을 때 이틀 간격으로 3회(1x10^9 pfu/50 ㎕), 아데노바이러스(대조군: control virus, oncolytic NC, oncolytic virus; 제조예 9의 4종:oncolytic virus 4m(GMCSF + DCN + shFoxp3 + shTGFβ2), 2종(제조예 7의 GM-CSF+shTGFβ2 , 제조예 6의 GM-CSF+데코린, 제조예 5의 shFOXP3+shTGFβ2), 제조예 8의 3종(GM-CSF+decorin+shTGFβ2)) 종양 내 주사(intratumoral injection)로 감염시켰다. 각 실험군당 6마리씩 사용하였다.

[371] 그 결과, 항종양 효과는 4개의 유전자가 들어간 제조예 9의 4m (multi)에서 항종양 효과가 가장 우세하였으며, 그 다음으로는 제조예 7의 2종에 의한 항종양 효과가 우세하였고(도 52), 생존분석 시 생존율도 다른 비교구에 비해 높았다 (도 53).

[372] 마우스 흑색종 세포주[KCLRF-BP-00313] 1 x 10^6 cell/100 ㎕의 세포를 복벽에 주입하고 종양 크기가 60 mm^3에 이르렀을 때 이틀 간격으로 4회(1x10^{10} virus particle/50 ㎕), 아데노바이러스(control oncolytic virus, 제조예 9의 oncolytic virus, 제조예 2의 shTGFβ2) 감염시켰다. 각 실험군당 6마리씩 사용하였다.

[373] 그 결과, 항종양 효과는 4개의 유전자가 들어간 제조예 9의 4m (multi) oncolytic adenovirus에서 항종양 효과가 shTGFβ2 단독 oncolytic adenovirus 처리구 보다 우수하였다 (도 54).

[374] 누드마우스에 인간 흑색종 세포 A375 1×10^7 cells/100 ㎕를 도입시켜 종양이 30~40mm^3에 도달했을 때, 제조예 10의 4m 아데노바이러스와 대조군 아데노바이러스를 각각 1x10^{10} VP/100 ㎕ 농도로 되게 이틀 간격으로 3 회 주사한 후 이틀 간격으로 종양의 크기를 측정하였다. 그 결과, 감염 시 종양의 크기가 가장 효과적으로 억제되었다 (도 55).

[375]

[376] **실시예 2: In vivo 누드마우스에서 면역활성 효과 확인(인간)**

[377] 누드마우스에 인간 흑색종 세포 A375 1×10^7 cells/100 ㎕를 도입시켜 종양이 30~40mm^3에 도달했을 때 제조예 10의 4m 아데노바이러스와 대조군 아데노바이러스를 각각 1x10^{10} VP/100 ㎕ 농도로 되게 이틀 간격으로 3회 주사하고 6일 후에 마우스의 면역장기인 비장을 적출하였다. 적출된 비장은 50 ml conical tube에 배양 배지 (10% FBS 포함 RPMI 1640 media)를 10 ml 담고 mesh에 비장을 올린 다음, 5 ml 주사기의 plunge로 갈았다. 5 ml의 배양 배지로 mesh를 씻어준 후, 1500 rpm, 5분 원심분리하여 상등액을 제거한 후. 1X RBC lysis buffer 1 ml로 세포를 resuspension한 다음 상온에서 5분간 방치하여 RBC를 제거하고 배양 배지로 채운 후 1500 rpm, 5분 동안 원심분리하여 2번 세척하였다. 상등액을 제거한 후 배양배지 1 ml에 resuspension한 후, cell count하여 96 well U bottom plate에 1×10^5 cells/50 ㎕로 각 well 마다 분주하였다. 분주된 세포를 2일 동안 배양한 후 배양배지 안에 있는 IFN-γ와 IL-12의 양을 ELISA로 측정하였다.

[378] 그 결과, IFN-γ 분비량 증가는 뚜렷하지 않은 대신 IL-12의 분비량은 제조예

10의 인간 4m 아데노바이러스에 의해 증가되었다 (도 56).

[379]

[380] **실시예 3: In vivo 면역능이 있는 C57BL/6 마우스에서 면역활성 효과 확인(마우스)**

[381] 마우스 흑색종 세포주[KCLRF-BP-00313] 7 × 10^5 cells/100 ㎕를 C57BL/6 마우스에 도입시켜 종양이 60 mm^3에 도달했을 때, 제조예 9의 4m 아데노바이러스와 대조군 아데노바이러스를 각각 1×10^9 VP/100 ㎕되게 이틀 간격으로 3 회 주사하고, 6일 후에 마우스의 면역장기인 비장을 적출하였다. 적출된 비장은 50 ml conical tube에 배양배지 (10% FBS 포함 RPMI 1640 media)를 10 ml 담고 mesh에 비장을 올린 다음, 5 ml 주사기의 plunger를 이용하여 갈아준 후 5 ml의 배양 배지로 mesh를 씻어준 후, 1500 rpm, 5분 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 1X RBC lysis buffer 1 ml로 세포를 resuspension한 다음 상온에서 5분간 방치하여 RBC를 제거하고 14 ml까지 배양 배지로 채운 후 1500 rpm, 5분 동안 원심분리하여 2회 세척하여 상등액을 제거한 후 배양배지 1 ml에 resuspension하였다. 셀 카운트하여 96 well U bottom plate에 1×10^5 cells/50 ㎕로 각 well마다 분주하고 분주된 세포를 2일 동안 배양한 후 배양 배지 안에 있는 IFN-γ와 IL-12의 양을 ELISA로 측정하였다.

[382] 그 결과, IFN-γ와 IL-12의 분비량 모두 제조예 9의 마우스 4m 아데노바이러스에 의해 증가되었다 (도 57).

[383]

[384] **실시예 4 : In vitro에서 면역활성 효과 확인(마우스)**

[385] C57BL/6 마우스로부터 비장을 분리하여 상기 실시예 3과 같은 방법으로 비장세포(splenocyte)를 얻었다. 이와는 별도로 마우스 흑색종 세포주[KCLRF-BP-00313] 2×10^5 cell로 분주하고 제조예 9의 4m 아데노바이러스 및 대조군 아데노바이러스를 각각 0, 5, 10, 50 100 MOI로 감염시키고, 이틀 후에 배지를 수거하여 배지 안으로 분비된 마우스 GM-CSF를 ELISA로 측정하였다.

[386] 50 MOI 감염으로 분비량이 포화된 시점의 배지 (제조예 9의 4m 및 대조군아데노바이러스)를 앞서 분리한 2×10^6 cell로 splenocyte가 분주된 96 well round-bottom plate에 원래 배지와 1:1로 섞어 48시간 배양한 후 여기에 다시 lipopolysaccharide (1 ㎍/ml)을 24시간 동안 처리하여 배양세포를 더욱 성숙화시켰다. 그 후 배지 내로 분비된 마우스 IL-12 또는 마우스 IFN-γ를 측정하였다.

[387] 그 결과, IFN-γ와 IL-12의 분비량 모두 제조예 9의 마우스 4m 아데노바이러스에 의해 증가되었다 (도 58).

[388]

[389] **실시예 5: 조직화학적 검사에 의한 면역증강 효과 확인**

[390] 제조예 9의 4m 아데노바이러스의 *in vivo* 면역증강 효력 실험을 진행하였다. C57BL/6 마우스에 마우스 흑색종 세포주[KCLRF-BP-00313] 7×10^5 cells/100 ㎕를

이식시킨 후, 종양 크기가 60 mm^3에 이르렀을 때 4m 아데노바이러스와 대조군 아데노바이러스를 각각 1×10^9 VP/100 ㎕되게 이틀 간격으로 3 회 주사하고 주사 후 11일째에 조직면역화학염색법을 시행하였다. 파라핀으로 처리된 조직에서 먼저 크실렌(xylene)을 처리하고 알코올의 농도를 점점 낮춤으로써 가수하였다. Permeabilization을 위해서 0.5% TritonX-100을 30분 동안 처리하였다. 세척 후 블록킹(ultra V block 사용)한 후 슬라이드를 각각 항-CD4 항체 1:200 희석), 항-CD8 항체 (1:500 희석), 항-NK1.1 항체 (1:500 희석), 항-Ad5 항체 (1:800 희석)에 4 ℃에서 12시간 처리한 후 horseradish peroxidase polymer (Thermo Scientific)로 상온에서 5 min 처리한 후 세척한 후 mounting 용액(Shandon Synthetic Mountant+ xylene = 1:1)을 처리한 후 현미경을 관찰하였다. C57BL/6 마우스 실험에서 제조예 9의 4m 아데노바이러스 감염에 의한 종양조직 조직면역 염색 결과, NK 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포가 대조군 종양조직에 비교하여 증가된 것을 확인하여 종양조직 주변의 면역증강 효과가 증가되고 있음을 나타내고 있다 (도 59).

[391] 마우스 흑색종 세포주[KCLRF-BP-00313] 1 x 10^6 cell/100 ㎕를 복벽에 주입하고 종양 크기가 60 mm^3에 이르렀을 때 이틀 간격으로 PBS 음성대조군을 포함하여 3회($1x10^9$ pfu/50 ㎕), 아데노바이러스(대조군: control virus, oncolytic NC, C; oncolytic adenovirus-mGMCSF (G); oncolytic adenovirus-mDecorin (D); oncolytic adenovirus-shmFoxP3 (F); oncolytic adenovirus-shmTGFβ2 (T); oncolytic adenovirus-mGMCSF-mDecorin (GD); oncolytic adenovirus-mGMCSF-shmTGFβ2 (GT); oncolytic adenovirus-shmFoxP3-shmTGFβ2 (FT); oncolytic adenoviurs-mGMCSF-mDecorin-shmTGFβ2 (GDT); oncolytic adenovirus-mGMCSF-mDecorin-shmTGFβ2-shmFoxP3 (GDTF, 4m)) 모두 11군을 종양 내 주사(intratumoral injection)로 감염시켰다. 각 실험군당 6마리씩 사용하였다. 그 결과, 항종양 효과는 4개의 유전자가 들어간 4m (multi, GDTF)에서 항종양 효과가 가장 우세하였으며, 그 다음으로는 mGMCSF와 shmTGF-β2가 들어간 oncolytic adenovirus (GT)에서 항종양 효과가 우세하였다(도 60).

청구범위

[청구항 1] 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자; 및 TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2)을 포함하는 GM-CSF 및 shTGF-β2 공동 발현용 유전자 전달체.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 GM-CSF 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 유전자 전달체.

[청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 shTGF-β2는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 유전자 전달체.

[청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 유전자 전달체는 플라스미드, 재조합 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스(Adenoassociated viruses: AAV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 백시니아 바이러스, 리포좀 또는 니오좀인 유전자 전달체.

[청구항 5] 제 4 항에 있어서,
상기 유전자 전달체는 재조합 아데노바이러스 벡터인 유전자 전달체.

[청구항 6] 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 유전자 전달체를 포함하는 항종양 조성물.

[청구항 7] 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자; 및 TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2)을 포함하는 항종양 조성물.

[청구항 8] 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자; 및 TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2)을 포함하는 항종양 조성물.

[청구항 9] 제 7 항에 있어서,
상기 shTGF-β2는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 항종양 조성물.

[청구항 10] 제 6 항 또는 제 7 항에 있어서,
상기 조성물은 면역활성 및 면역원성을 증대시키는 항종양 조성물.

[청구항 11] 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자; 데코린(decorin) 유전자, TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2) 및 FoxP3 발현을 억제하는 shRNA(shFoxP3)을 포함하는 GM-CSF, 데코린, shTGF-β2 및 shFoxP3 공동 발현용 유전자 전달체.

[청구항 12] 제 11 항에 있어서,
상기 GM-CSF 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는

유전자 전달체.

[청구항 13] 제 11 항에 있어서,
상기 shTGF-β2는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 유전자 전달체.

[청구항 14] 제 11 항에 있어서,
상기 데코린은 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 유전자 전달체.

[청구항 15] 제 11 항에 있어서,
상기 shFoxP3은 서열번호 9 또는 서열번호 10으로 표시되는 유전자 전달체.

[청구항 16] 제 11 항에 있어서,
상기 유전자 전달체는 플라스미드, 재조합 아데노바이러스 벡터, 아데노부속 바이러스(Adenoassociated viruses: AAV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 백시니아 바이러스, 리포좀 또는 니오좀인 유전자 전달체.

[청구항 17] 제 16 항에 있어서,
상기 유전자 전달체는 재조합 아데노바이러스 벡터인 유전자 전달체.

[청구항 18] 제 11 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항의 유전자 전달체를 포함하는 항종양 조성물.

[청구항 19] 제 10 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항의 유전자 전달체를 포함하는 항종양 조성물.

[청구항 20] 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 유전자;
데코린(decorin) 유전자, TGF-β2 발현을 억제하는 shRNA(shTGF-β2) 및 FoxP3 발현을 억제하는 shRNA(shFoxP3)을 포함하는 항종양 조성물.

[청구항 21] 제 20 항에 있어서,
상기 GM-CSF 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 항종양 조성물.

[청구항 22] 제 20 항에 있어서,
상기 shTGF-β2는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 항종양 조성물.

[청구항 23] 제 20 항에 있어서,
상기 데코린은 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 항종양 조성물.

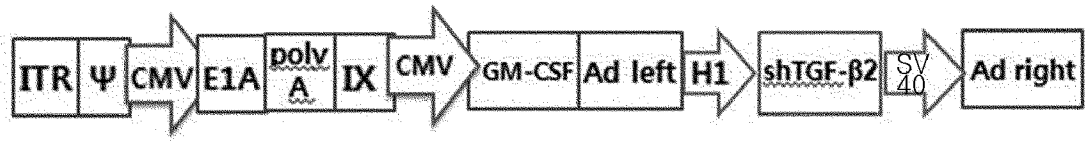
[청구항 24] 제 20 항에 있어서,
상기 shFoxP3은 서열번호 9 또는 서열번호 10으로 표시되는 항종양 조성물.

[청구항 25] 제 19 항 또는 제 20 항에 있어서,
상기 조성물은 면역활성 및 면역원성을 증대시키는 항종양 조성물.

[청구항 26] 제 1 항 또는 제 11 항의 유전자 전달체를 도입한 아데노바이러스.

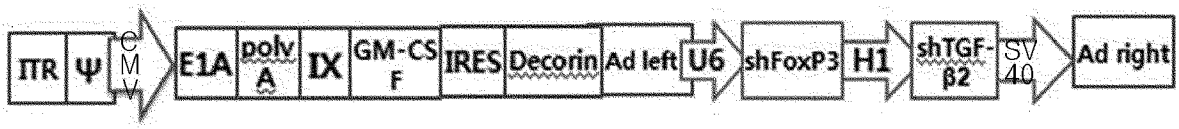
[Fig. 1]

(a)



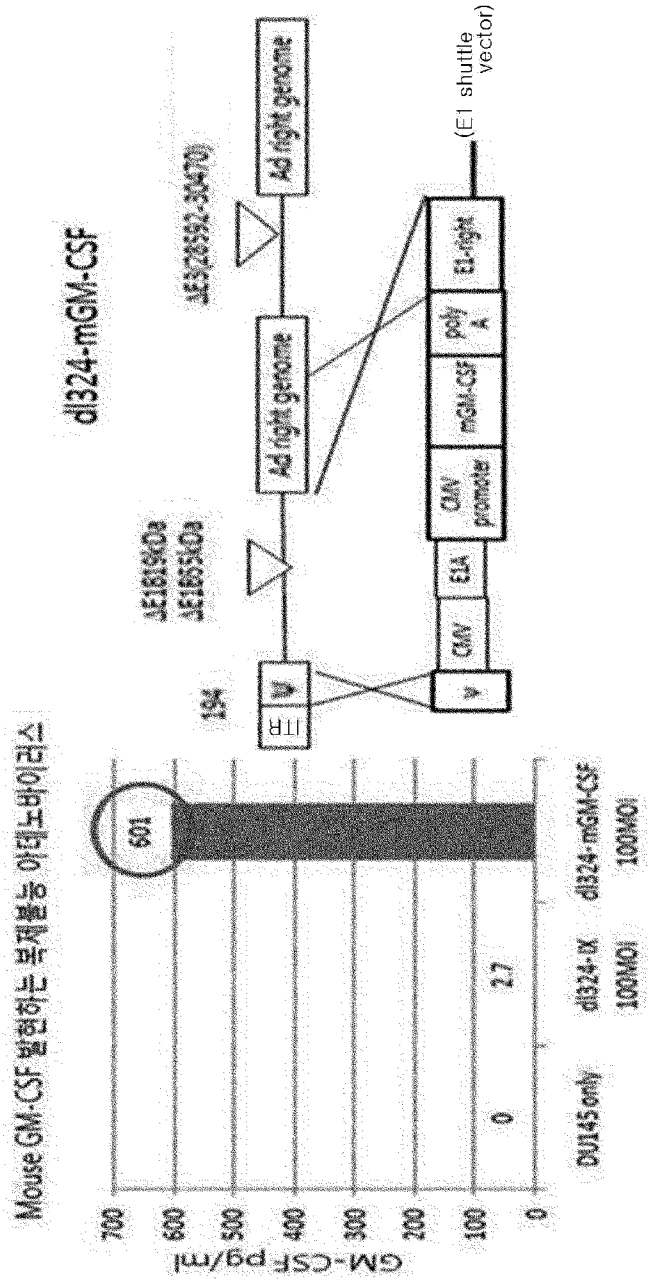
dl324-3484-ΔE1B-GMCSF-△E3-H1-shTGF-β2

(b)

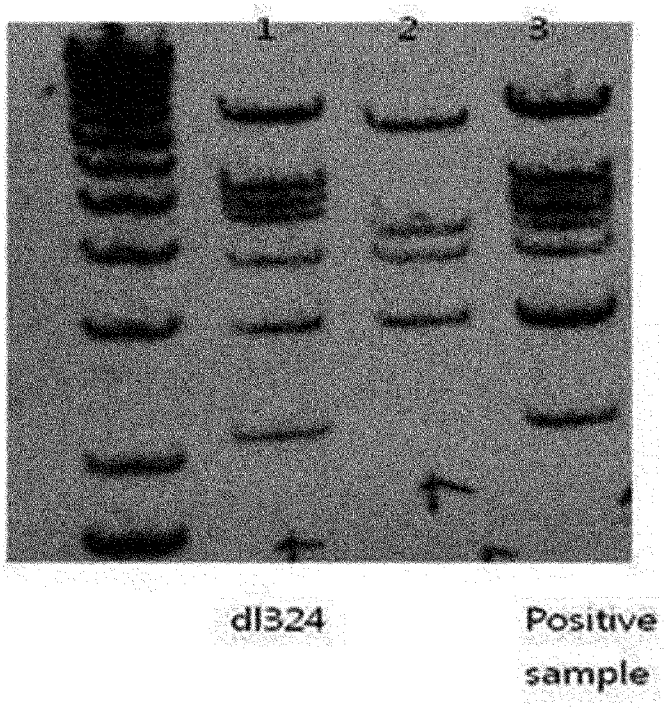


dl324-3484-ΔE1B-GMCSF-IRES-DCN-△E3-U6-shFoxP3-H1-shTGF-β2

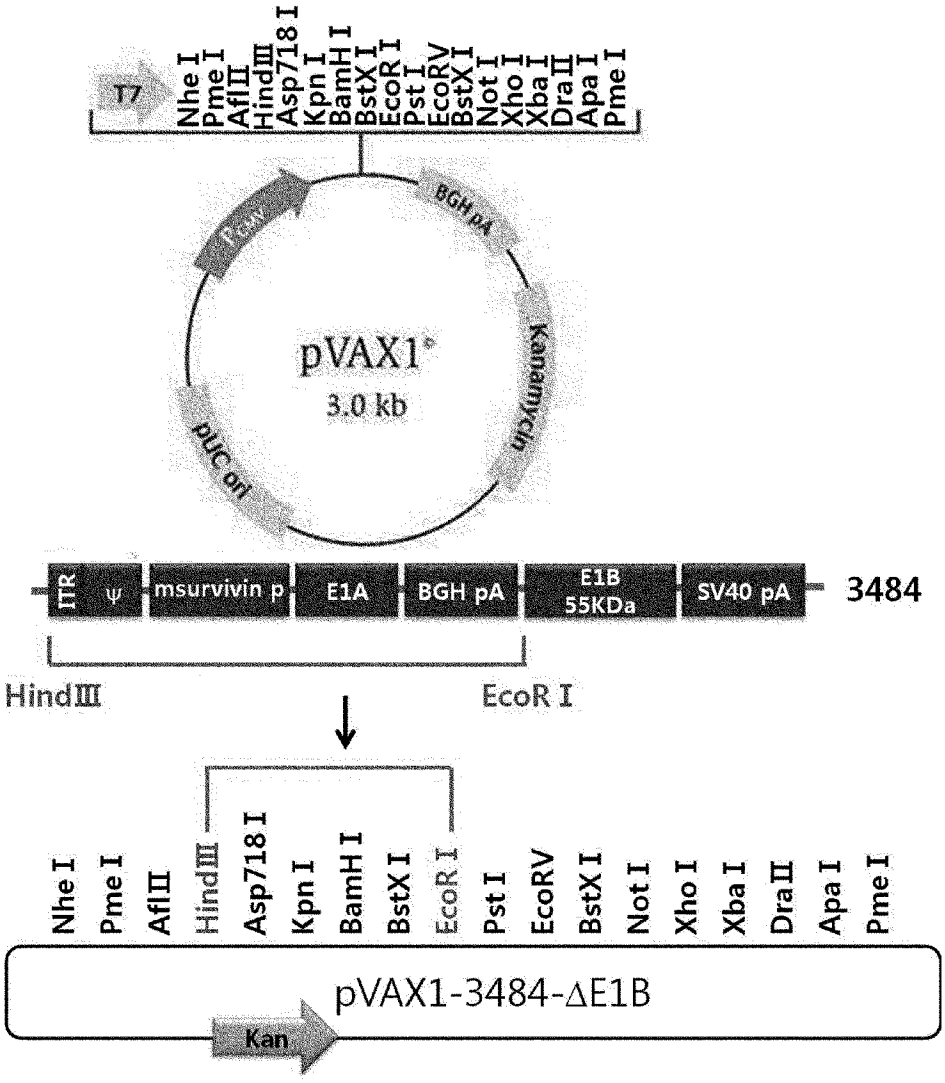
[Fig. 2]



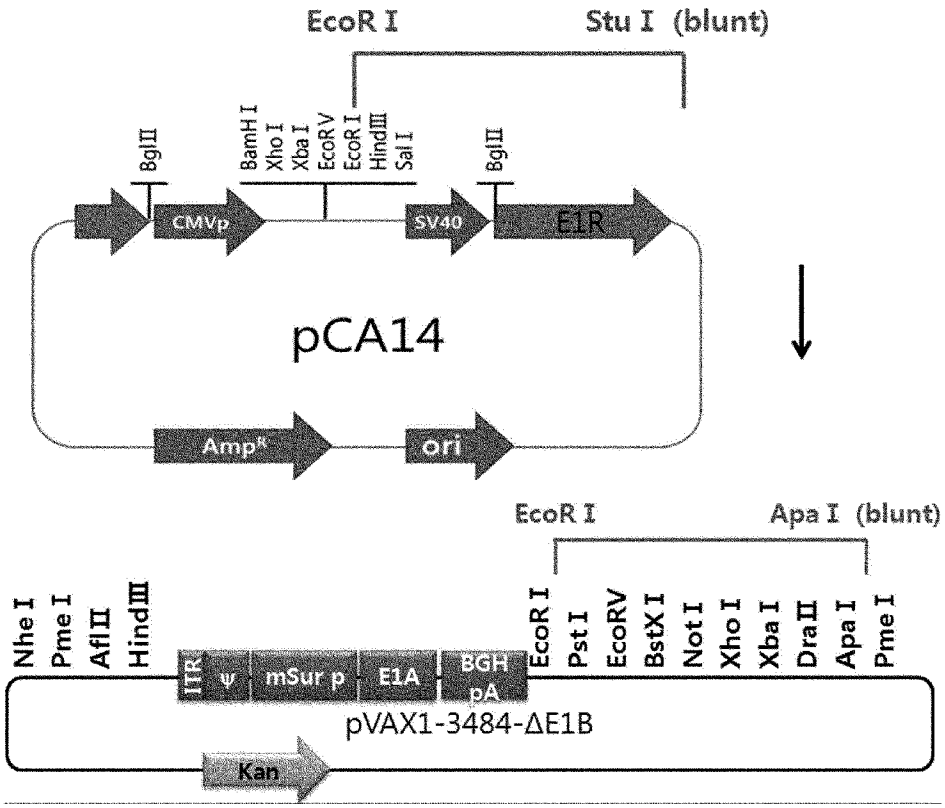
[Fig. 3]


1
2
3
dl324
Positive sample

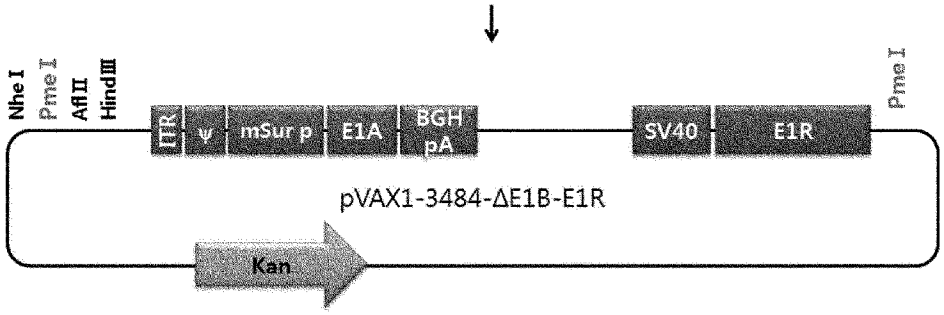
[Fig. 4a]


T7
Nhe I
Pme I
AflII
HindIII
Asp718 I
Kpn I
BamH I
BstX I
EcoR I
Pst I
EcoRV
BstX I
Not I
Xho I
Xba I
DraII
Apa I
Pme I
P CMV
BGH pA
pVAX1®
3.0 kb
Kanamycin
pUC ori
ITR
ψ
msurvivin p
E1A
BGH pA
E1B 55KDa
SV40 pA
3484
HindIII
EcoR I
Nhe I
Pme I
AflII
HindIII
Asp718 I
Kpn I
BamH I
BstX I
EcoR I
Pst I
EcoRV
BstX I
Not I
Xho I
Xba I
DraII
Apa I
Pme I
pVAX1-3484-ΔE1B
Kan

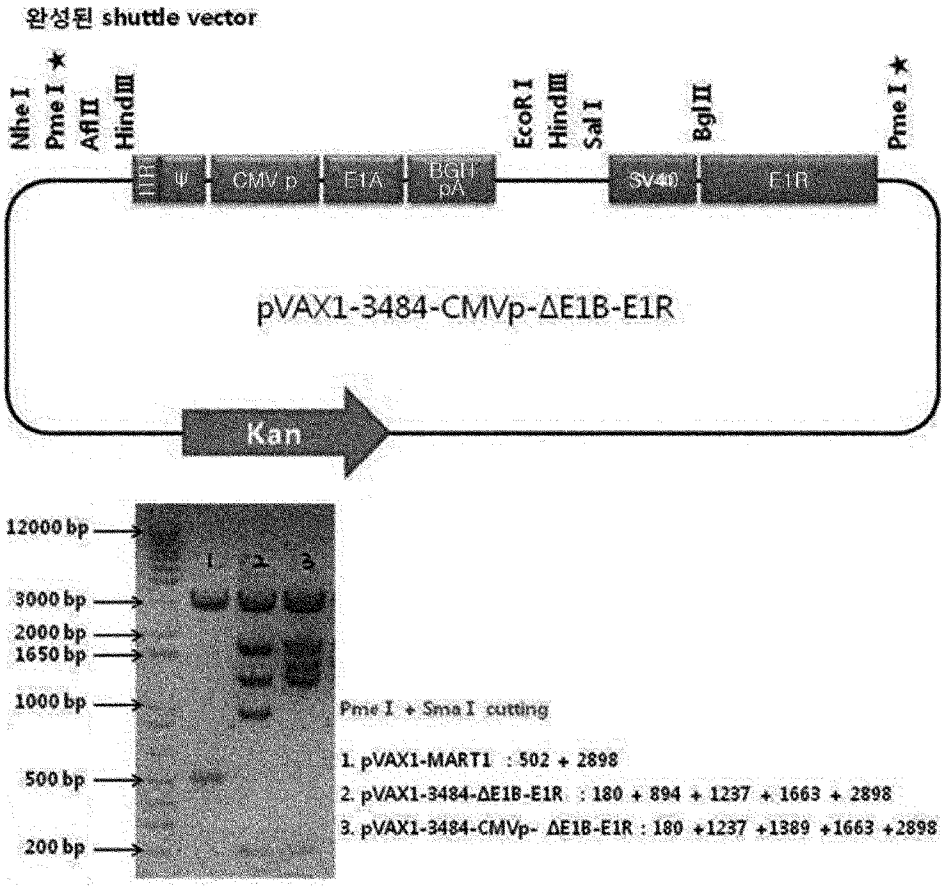
[Fig. 4b]


EcoR I
Stu I (blunt)
BglII
BamH I
Xho I
Xba I
EcoRV
EcoR I
HindIII
Sal I
BglII
CMVp
SV40
E1R
pCA14
Amp^R
ori
EcoR I
Apa I (blunt)
Nhe I
Pme I
AflII
HindIII
EcoR I
Pst I
EcoRV
BstX I
Not I
Xho I
Xba I
DraII
Apa I
Pme I
ITR
ψ
mSur p
E1A
BGH pA
pVAX1-3484-ΔE1B
Kan

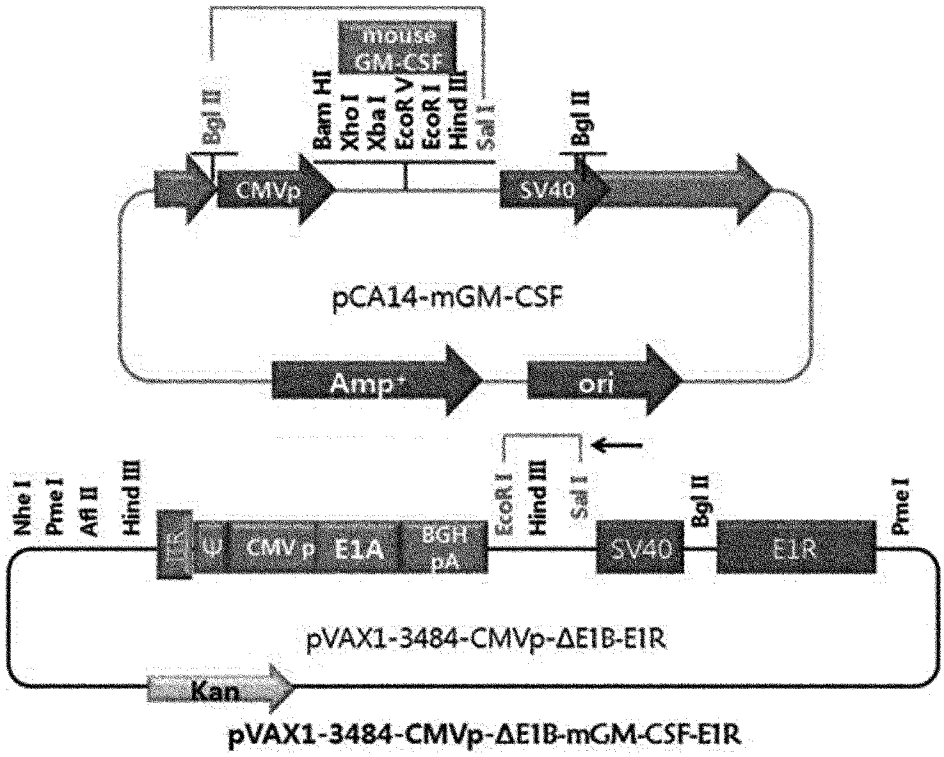
[Fig. 4c]


Nhe I
Pme I
AflII
HindIII
ITR
ψ
mSur p
E1A
BGH pA
SV40
E1R
Pme I
pVAX1-3484-ΔE1B-E1R
Kan

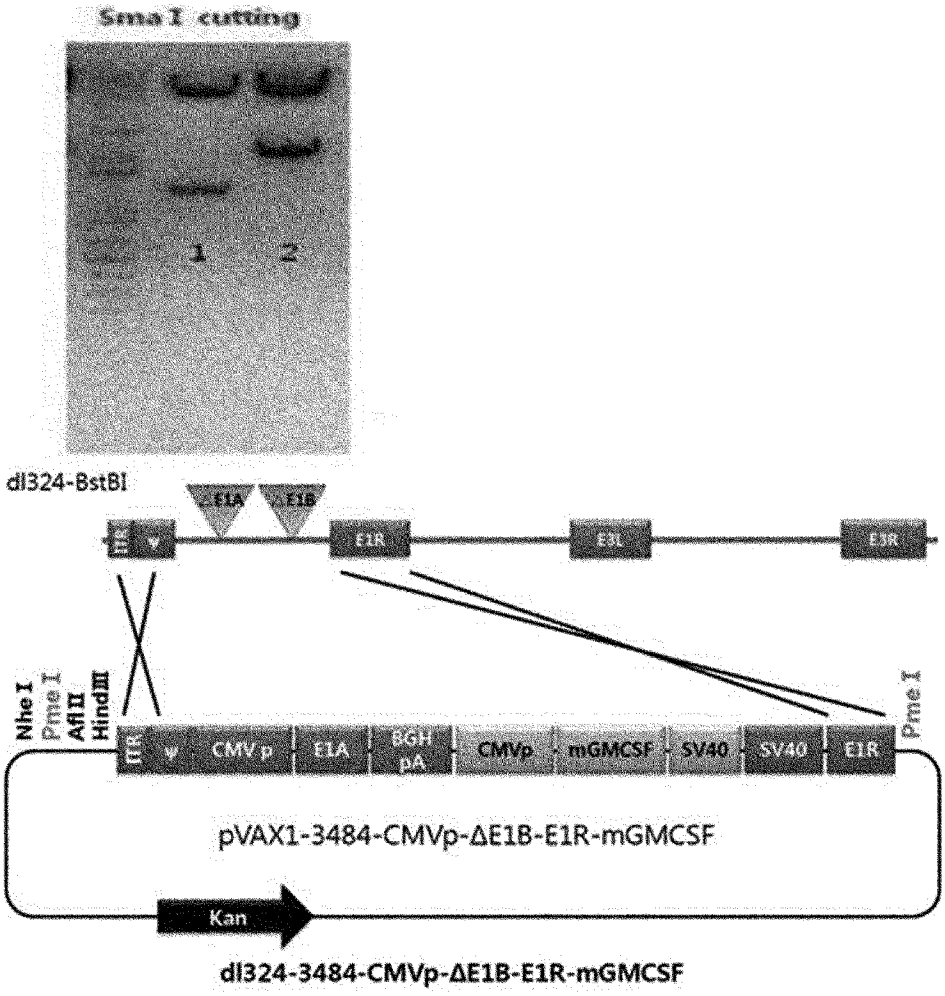
[Fig. 5]


완성된 shuttle vector
Nhe I
Pme I ★
Afl II
Hind III
EcoR I
Hind III
Sal I
Bgl II
Pme I ★
ITR
Ψ
CMV p
E1A
BGH pA
SV40
E1R
pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R
Kan
12000 bp
3000 bp
2000 bp
1650 bp
1000 bp
500 bp
200 bp
1
2
3
Pme I + Sma I cutting
1. pVAX1-MART1 : 502 + 2898
2. pVAX1-3484-ΔE1B-E1R : 180 + 894 + 1237 + 1663 + 2898
3. pVAX1-3484-CMVp- ΔE1B-E1R : 180 +1237 +1389 +1663 +2898

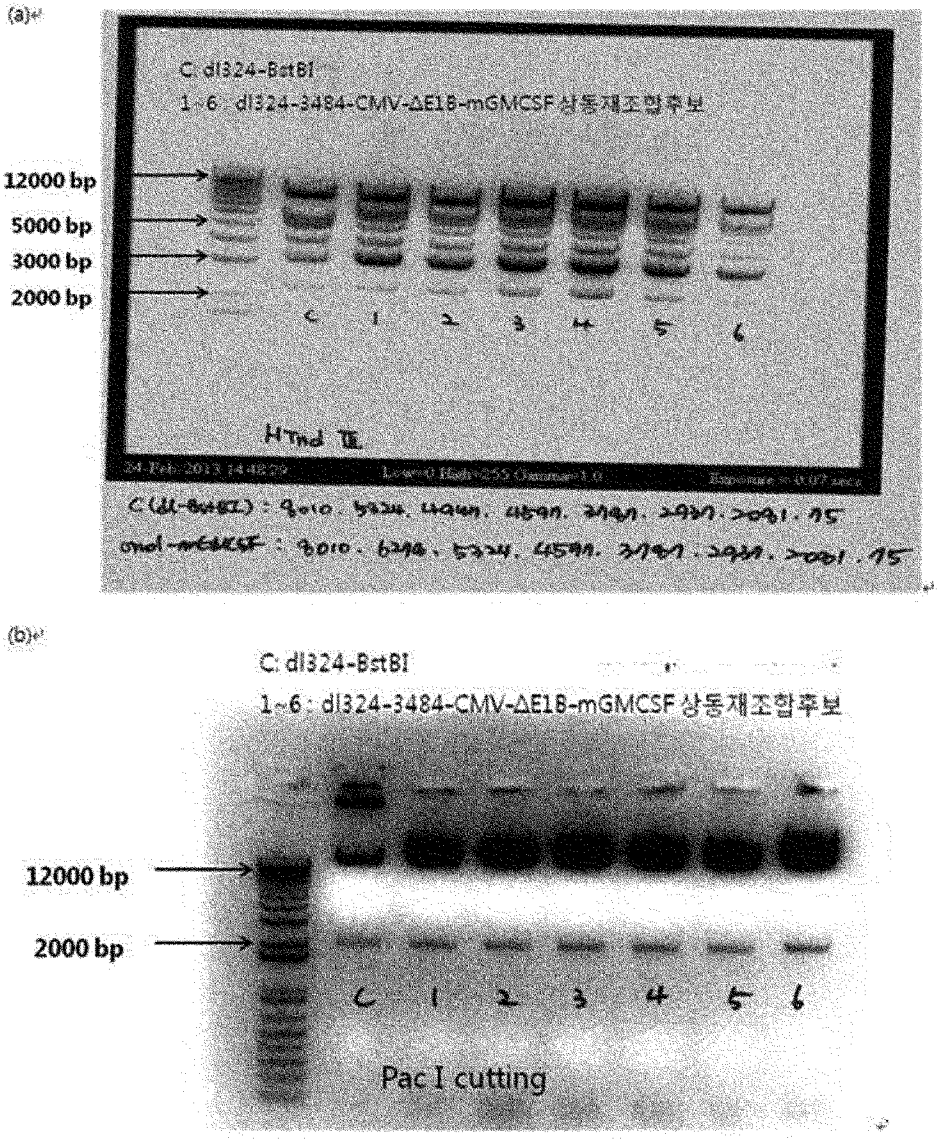
[Fig. 6]


mouse GM-CSF
Bgl II
Bam HI
Xho I
Xba I
EcoR V
EcoR I
Hind III
Sal I
Bgl II
CMVp
SV40
pCA14-mGM-CSF
Amp+
ori
Nhe I
Pme I
Afl II
Hind III
EcoR I
Hind III
Sal I
Bgl II
Pme I
ITR
Ψ
CMV p
E1A
BGH pA
SV40
E1R
pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R
Kan
pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-mGM-CSF-E1R

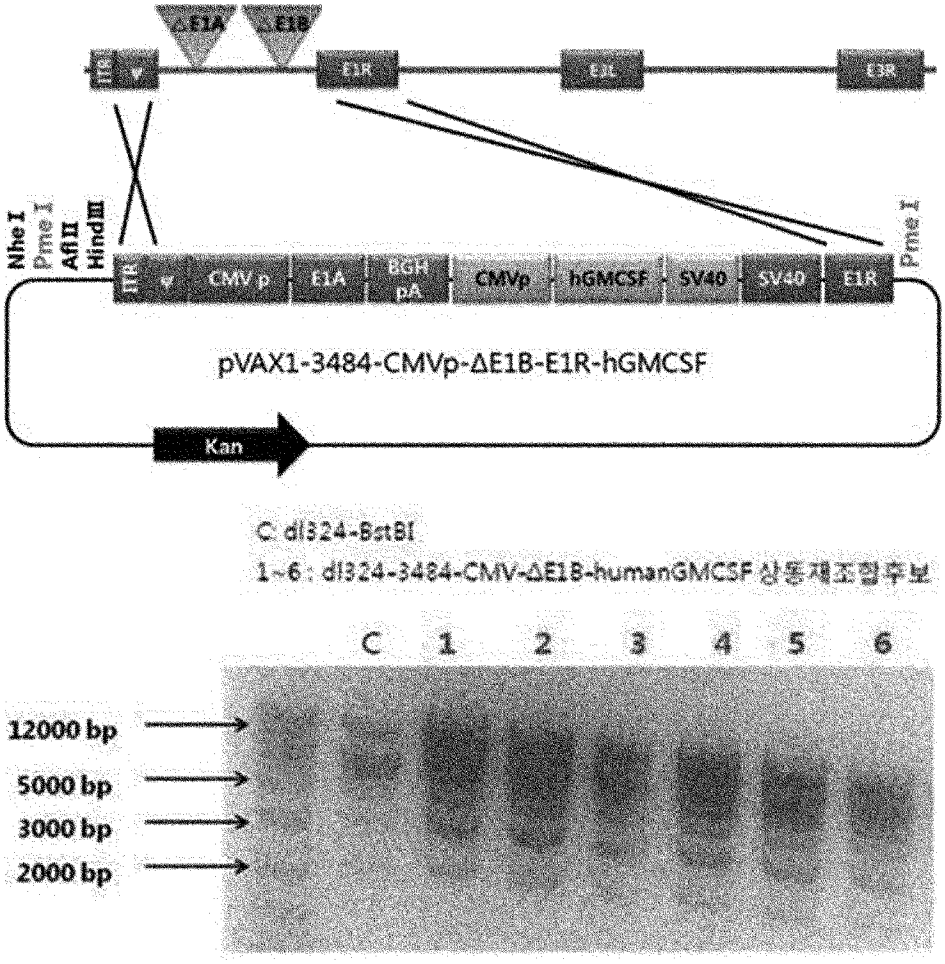
[Fig. 7]


Sma I cutting
1
2
dl324-BstBI
ΔE1A
ΔE1B
ITR
ψ
E1R
E3L
E3R
Nhe I
Pme I
Afl II
Hind III
Pme I
ITR
ψ
CMV p
E1A
BGH pA
CMVp
mGMCSF
SV40
SV40
E1R
pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R-mGMCSF
Kan
dl324-3484-CMVp-ΔE1B-E1R-mGMCSF

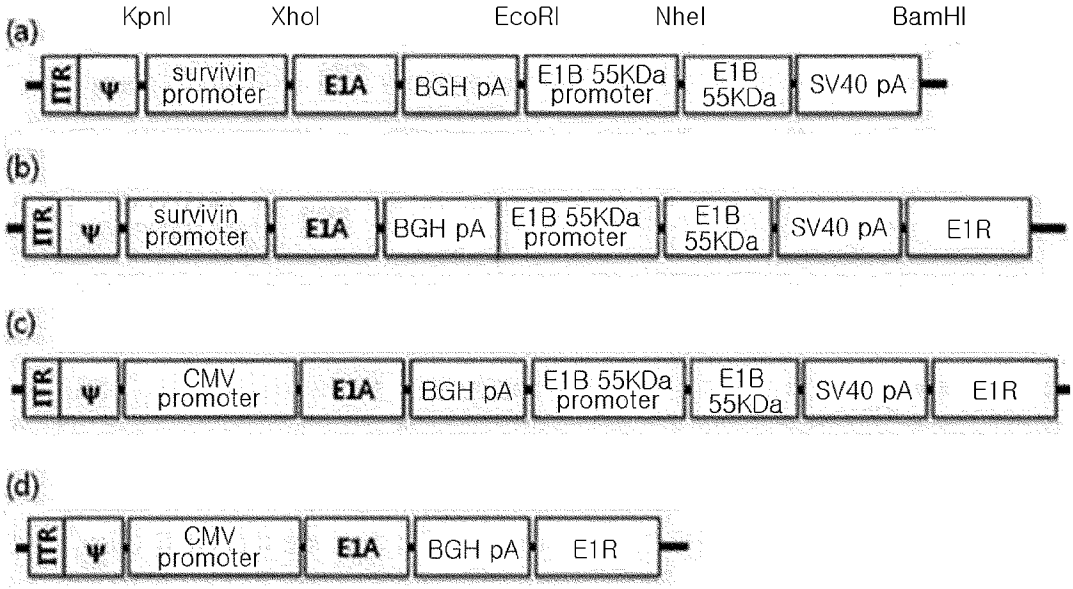
[Fig. 8]


(a)
C: dl324-BstBI
1~6 : dl324-3484-CMV-ΔE1B-mGMCSF 상동재조합후보
12000 bp
5000 bp
3000 bp
2000 bp
C 1 2 3 4 5 6
(b)
C: dl324-BstBI
1~6 : dl324-3484-CMV-ΔE1B-mGMCSF 상동재조합후보
12000 bp
2000 bp
C 1 2 3 4 5 6
Pac I cutting

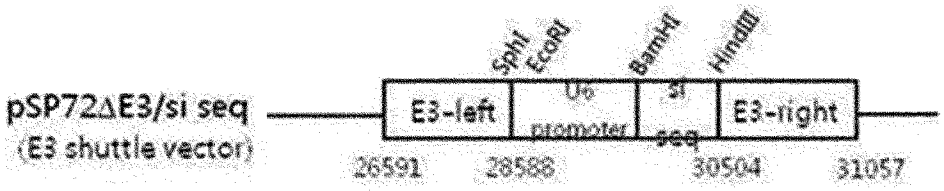
[Fig. 9]



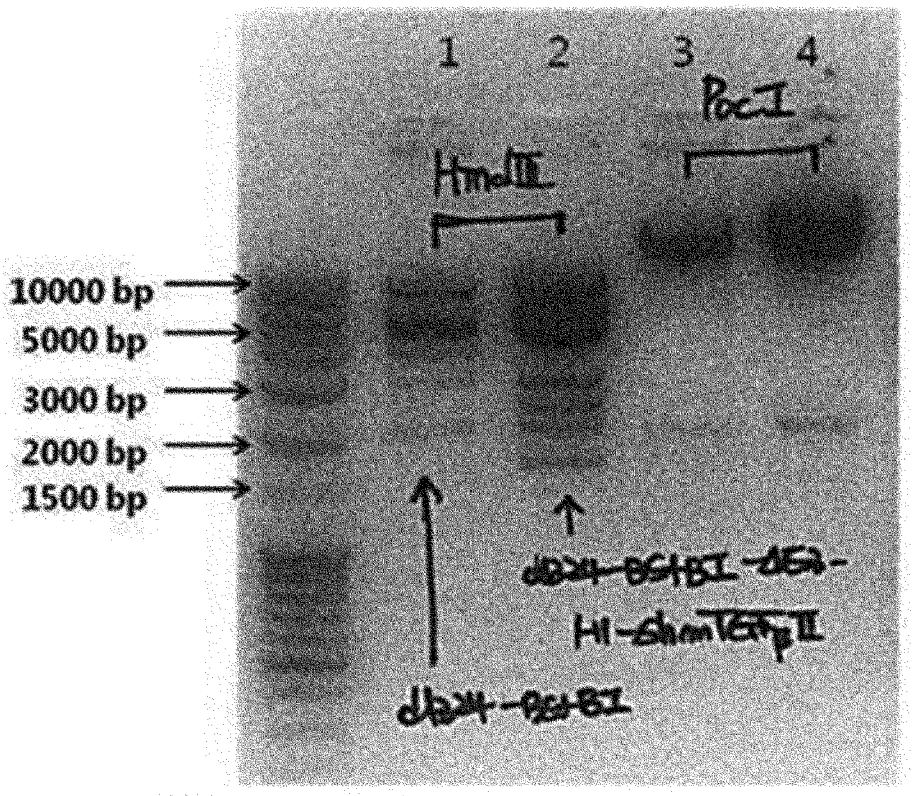
[Fig. 10]



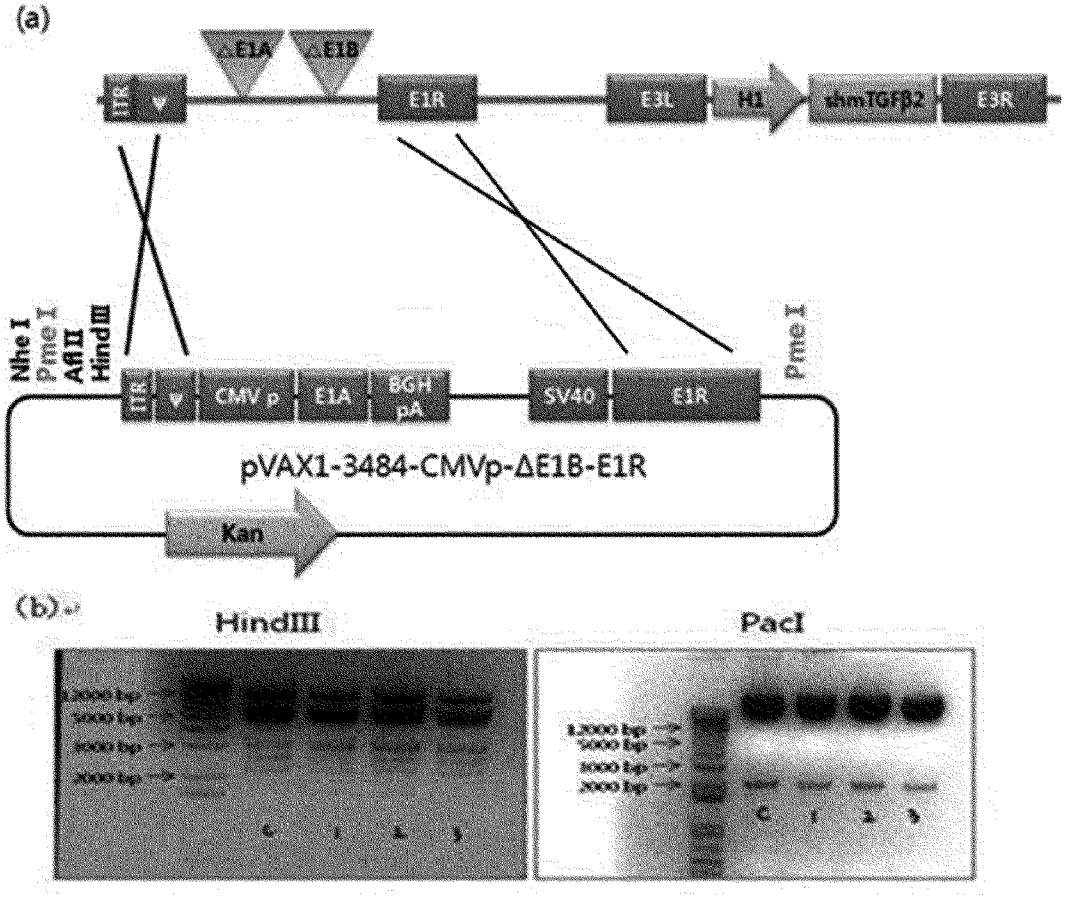
[Fig. 11]



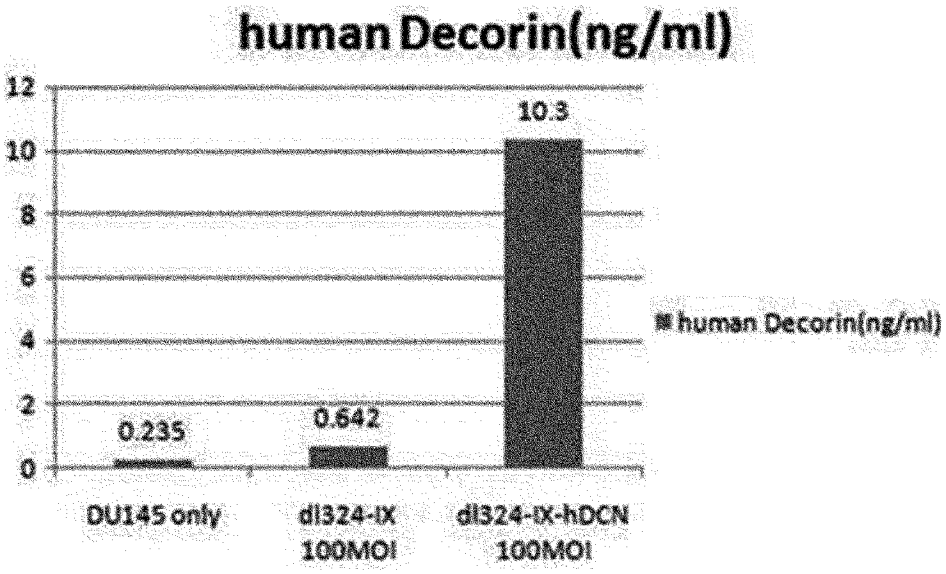
[Fig. 12]


1
2
3
4
PacI
HindIII
10000 bp
5000 bp
3000 bp
2000 bp
1500 bp
1, 3 lane : dl324-BstBI
2, 4 lane : dl324-BstBI-△E3-H1-shmTGF-β2

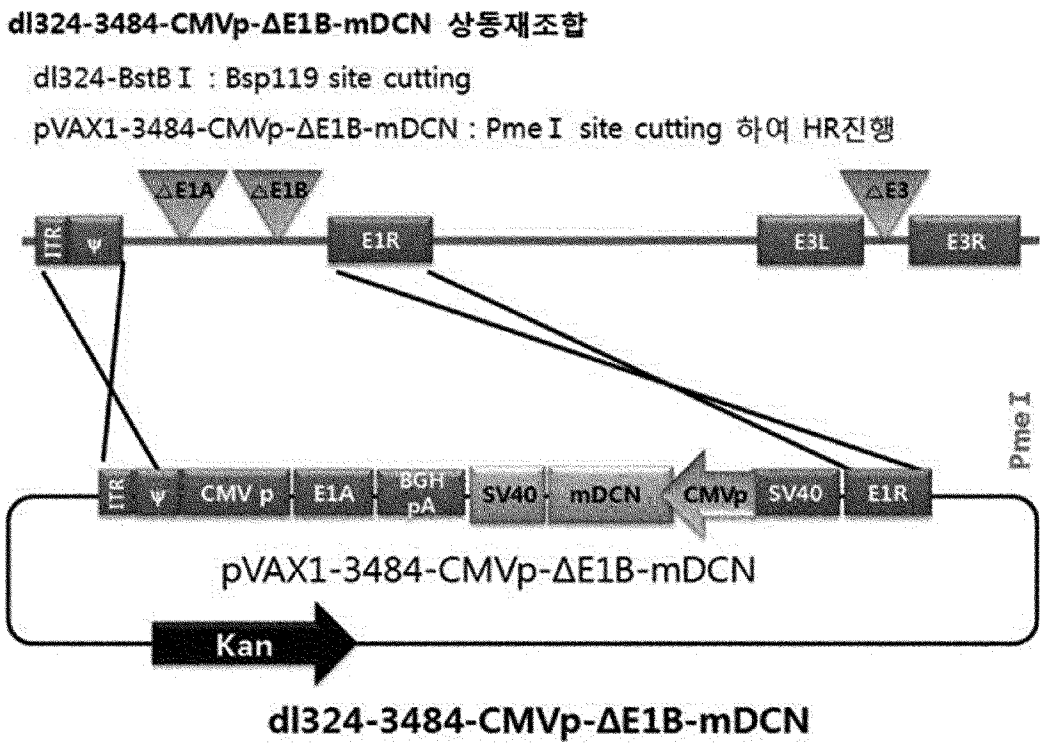
[Fig. 13]


(a)
△E1A
△E1B
ITR
Ψ
E1R
E3L
H1
shmTGFβ2
E3R
Nhe I
Pme I
AflII
HindIII
CMV p
E1A
BGH pA
SV40
pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R
Kan
(b)
HindIII
PacI

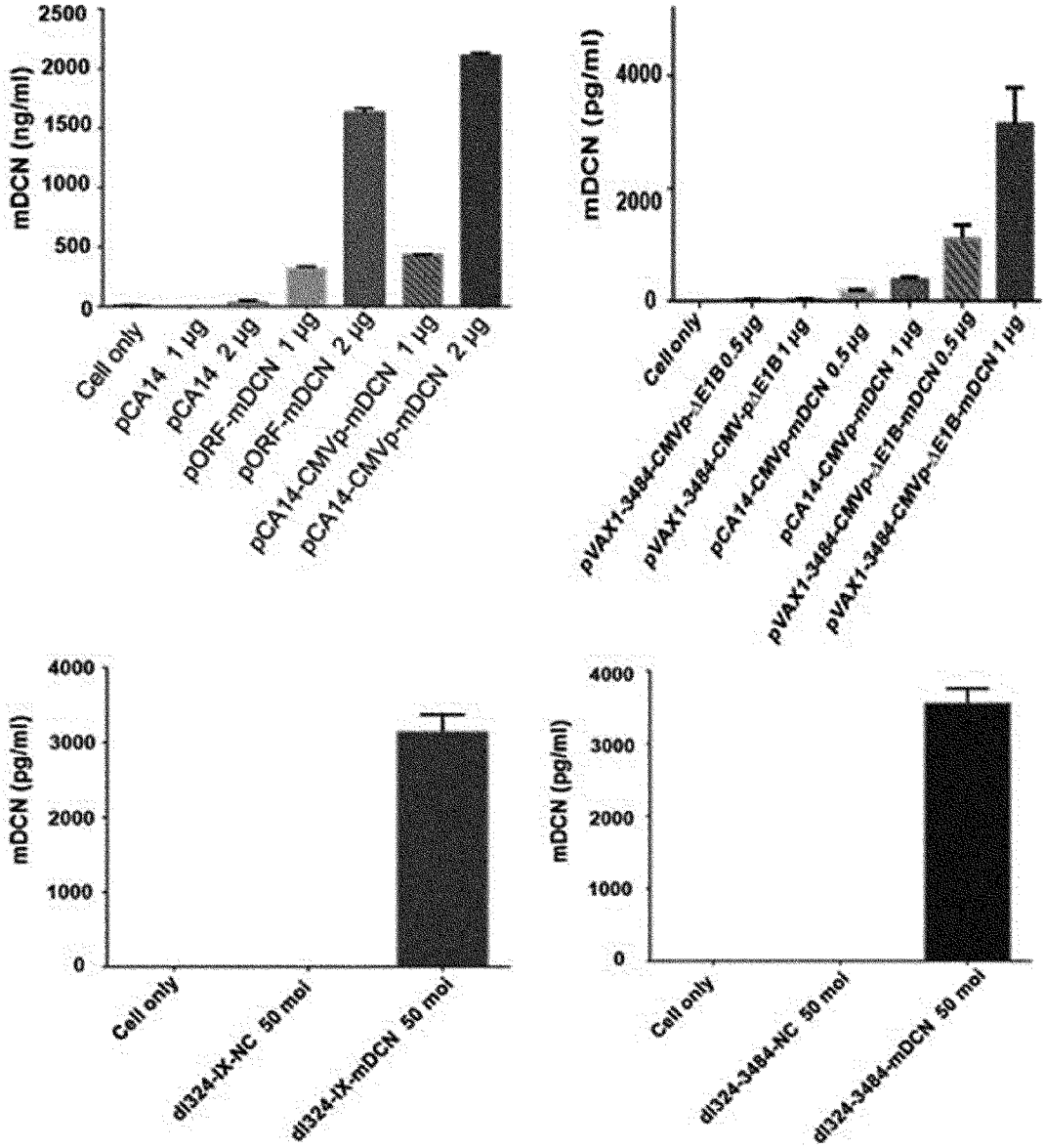
[Fig. 14]



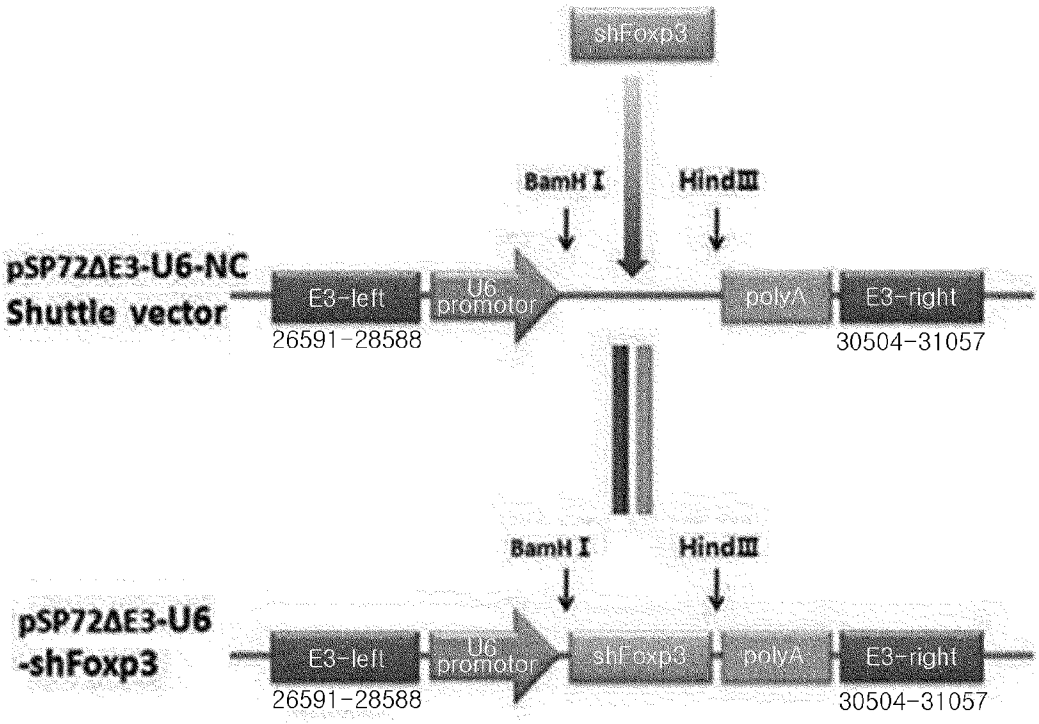
[Fig. 15a]



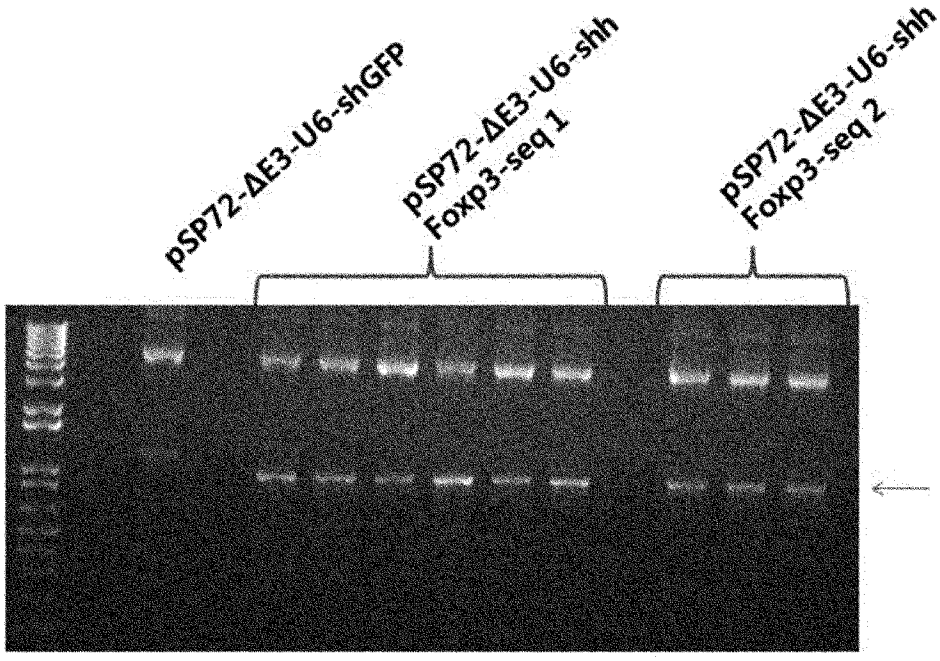
[Fig. 15b]


mDCN (ng/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
Cell only
pCA14 1 μg
pCA14 2 μg
pORF-mDCN 1 μg
pORF-mDCN 2 μg
pCA14-CMVp-mDCN 1 μg
pCA14-CMVp-mDCN 2 μg
mDCN (pg/ml)
4000
2000
0
Cell only
pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B 0.5 μg
pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B 1 μg
pCA14-CMVp-mDCN 0.5 μg
pCA14-CMVp-mDCN 1 μg
pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-mDCN 0.5 μg
pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-mDCN 1 μg
mDCN (pg/ml)
4000
3000
2000
1000
0
Cell only
dl324-IX-NC 50 moi
dl324-IX-mDCN 50 moi
mDCN (pg/ml)
4000
3000
2000
1000
0
Cell only
dl324-3484-NC 50 moi
dl324-3484-mDCN 50 moi

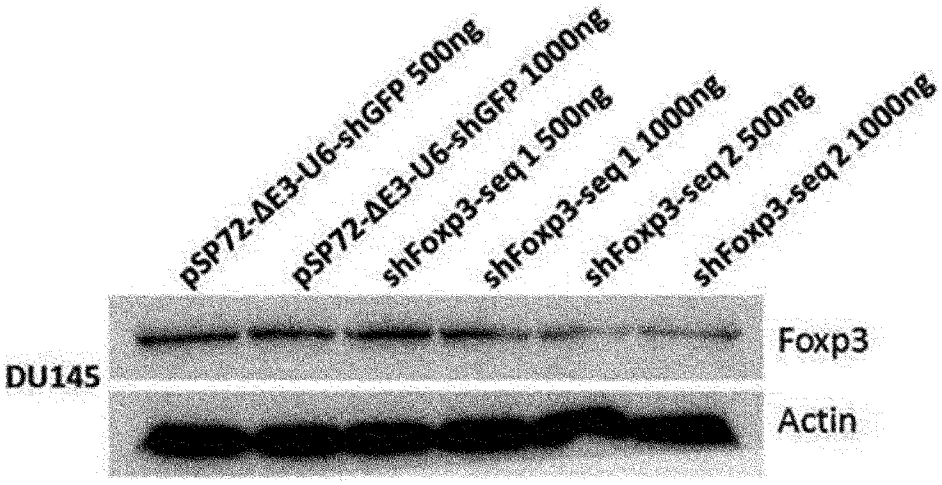
[Fig. 16]


shFoxp3
BamH I
HindIII
pSP72ΔE3-U6-NC
Shuttle vector
E3-left
U6 promotor
polyA
E3-right
26591-28588
30504-31057
BamH I
HindIII
pSP72ΔE3-U6
-shFoxp3
E3-left
U6 promotor
shFoxp3
polyA
E3-right
26591-28588
30504-31057

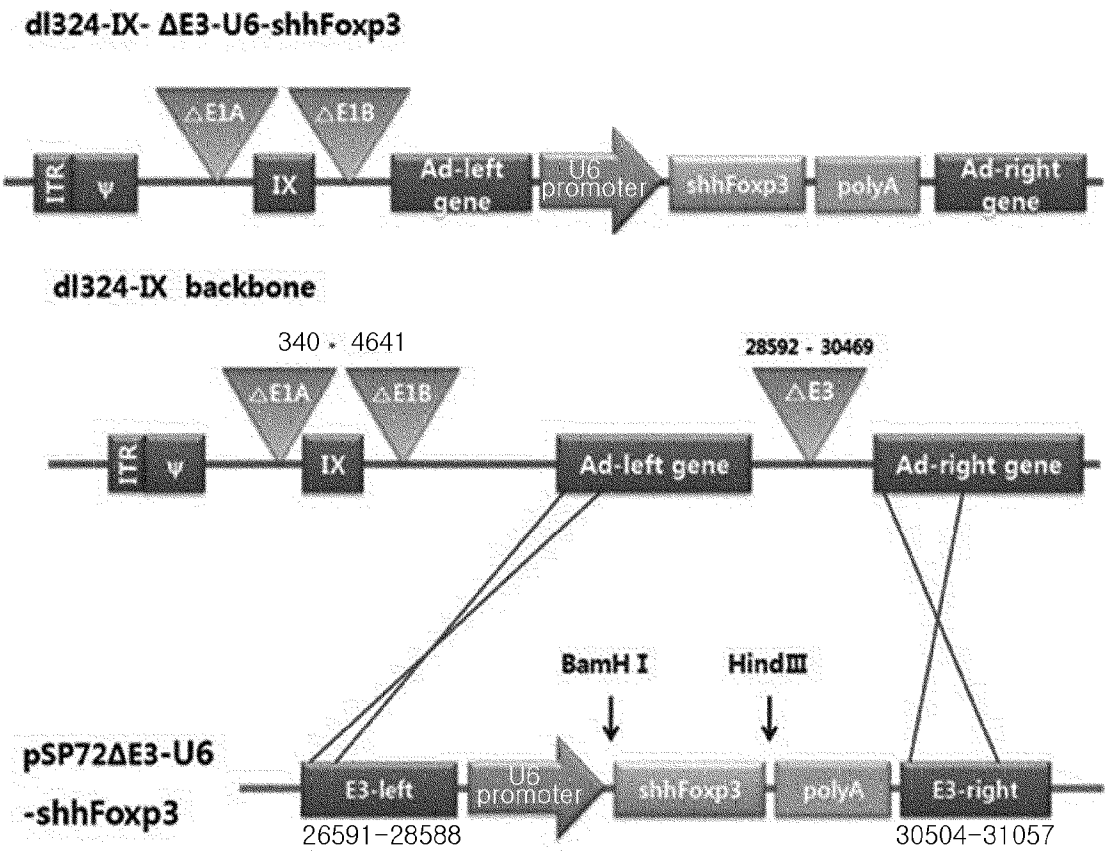
[Fig. 17]


pSP72-ΔE3-U6-shGFP
pSP72-ΔE3-U6-shh
Foxp3-seq 1
pSP72-ΔE3-U6-shh
Foxp3-seq 2

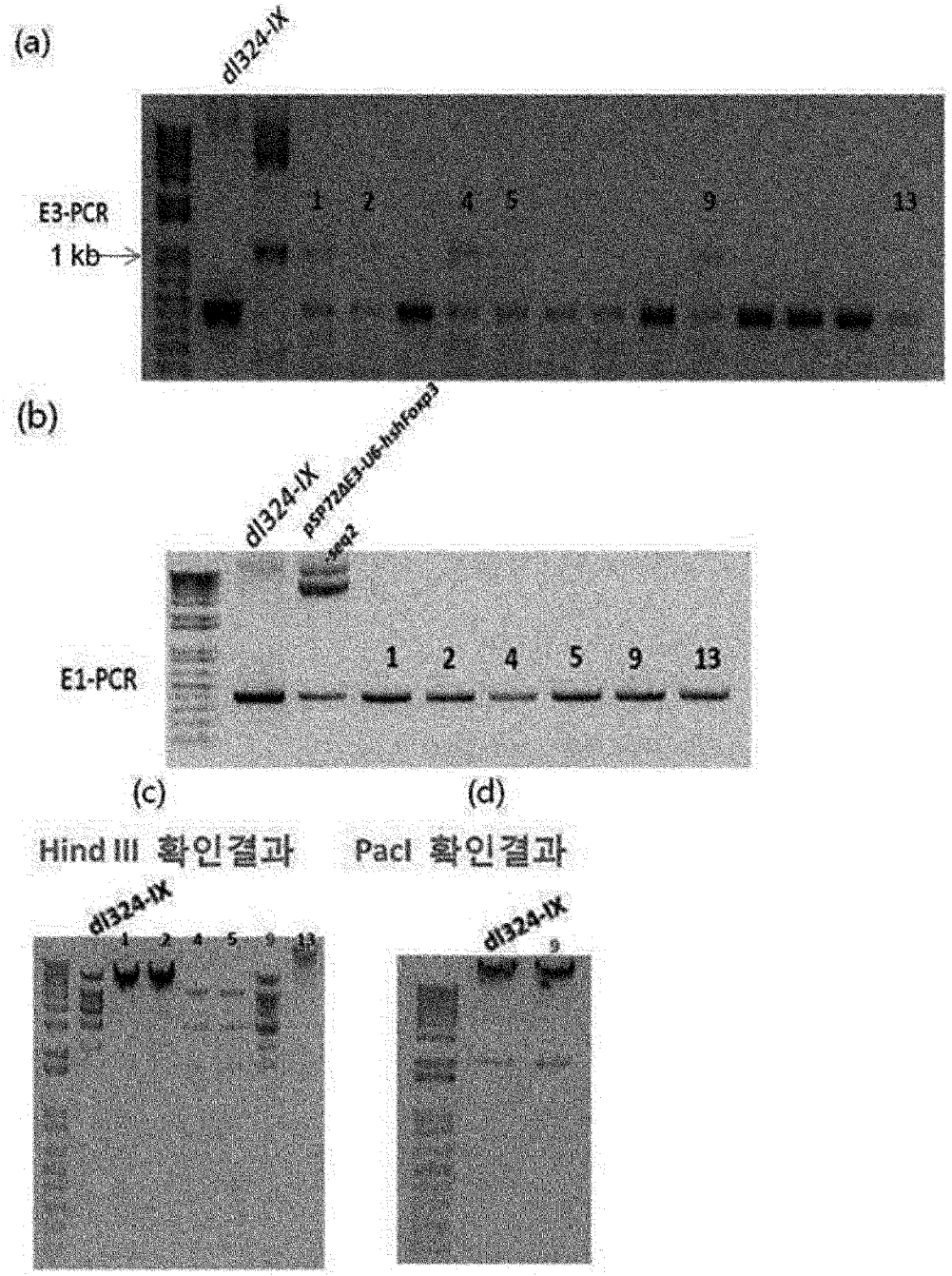
[Fig. 18]


pSP72-ΔE3-U6-shGFP 500ng
pSP72-ΔE3-U6-shGFP 1000ng
shFoxp3-seq 1 500ng
shFoxp3-seq 1 1000ng
shFoxp3-seq 2 500ng
shFoxp3-seq 2 1000ng
DU145
Foxp3
Actin

[Fig. 19]


dl324-IX- ΔE3-U6-shhFoxp3
△E1A
△E1B
ITR
ψ
IX
Ad-left gene
U6 promoter
shhFoxp3
polyA
Ad-right gene
dl324-IX backbone
340 - 4641
28592 - 30469
△E3
BamH I
HindⅢ
pSP72ΔE3-U6 -shhFoxp3
E3-left
E3-right
26591-28588
30504-31057

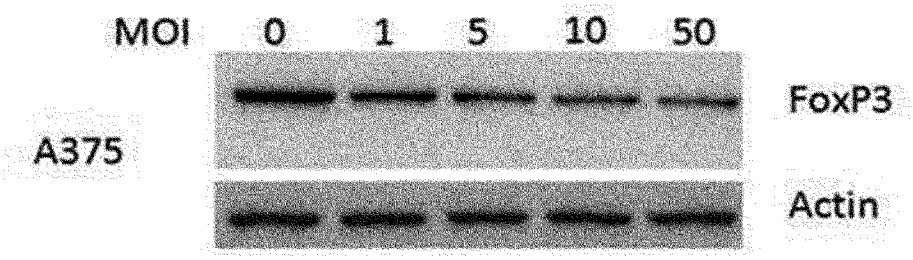
[Fig. 20]


(a)
dl324-IX
E3-PCR
1 kb
1
2
4
5
9
13
(b)
dl324-IX
pSP72ΔE3-U6-hshFoxp3
-seq2
E1-PCR
1
2
4
5
9
13
(c)
Hind III 확인결과
dl324-IX
1
2
4
5
9
13
(d)
PacI 확인결과
dl324-IX
9

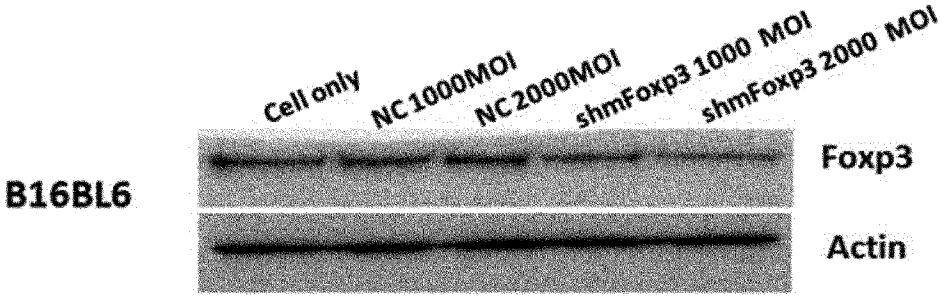
[Fig. 21]


dl324-IX + pSP72ΔE3-U6-shmFoxp3
mouse shFoxP3

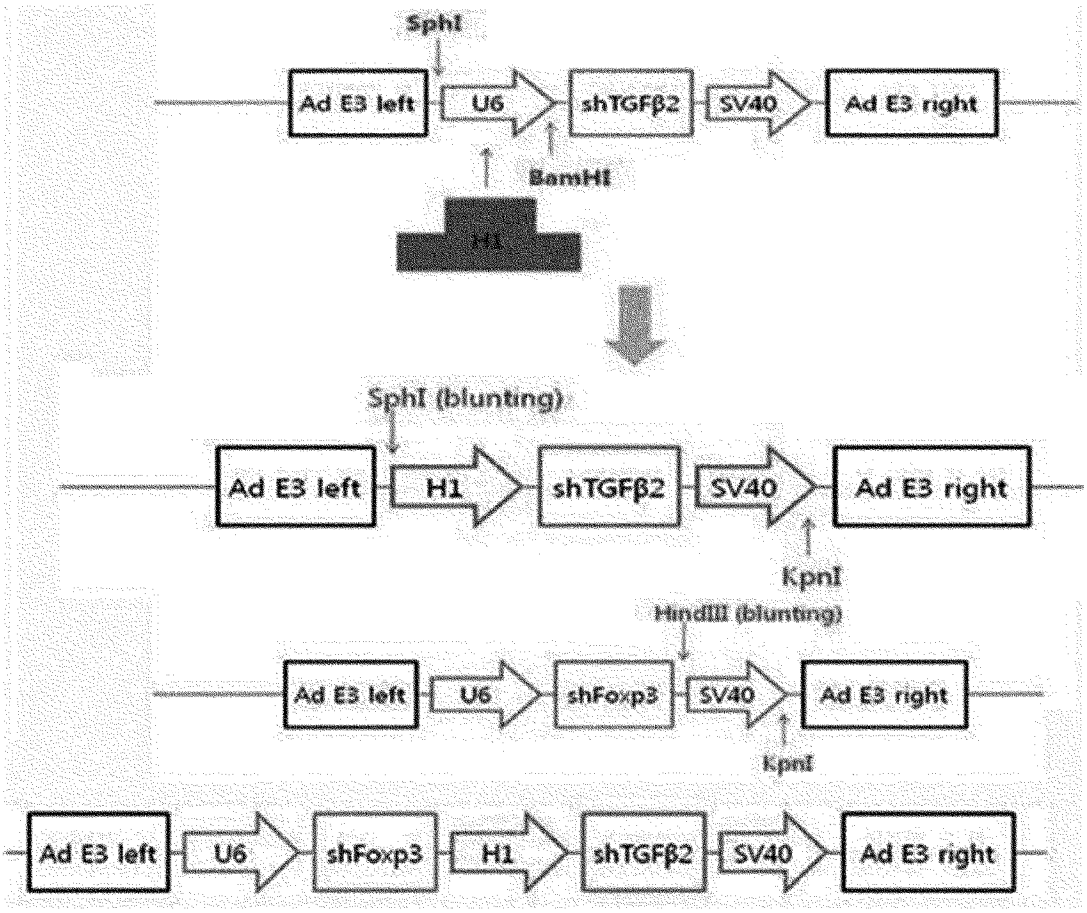
[Fig. 22]



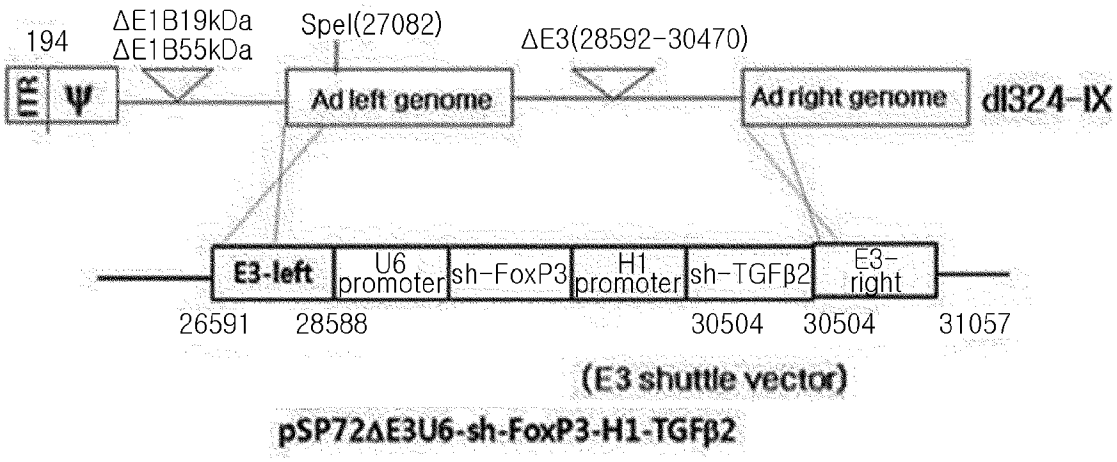
[Fig. 23]



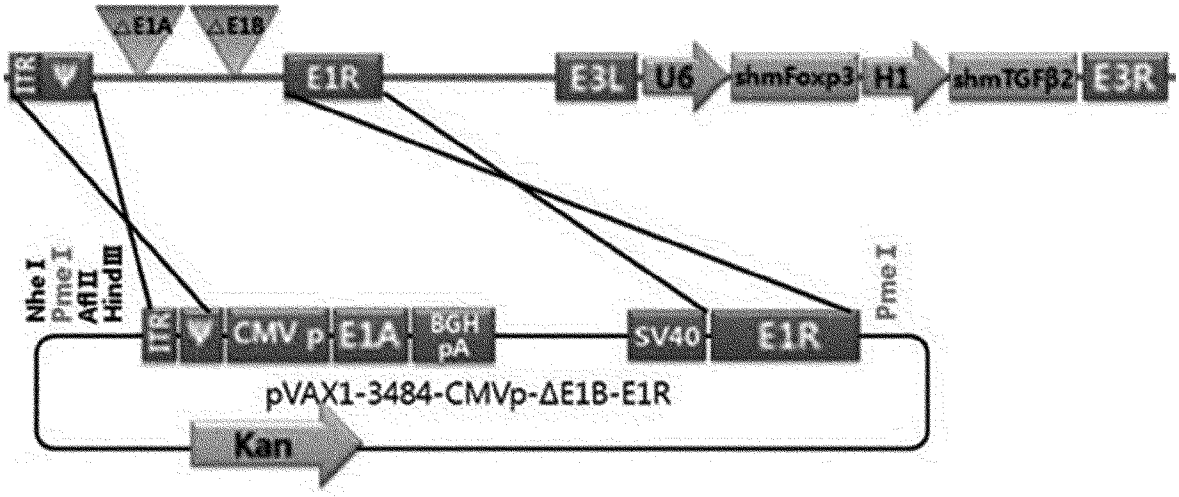
[Fig. 24]

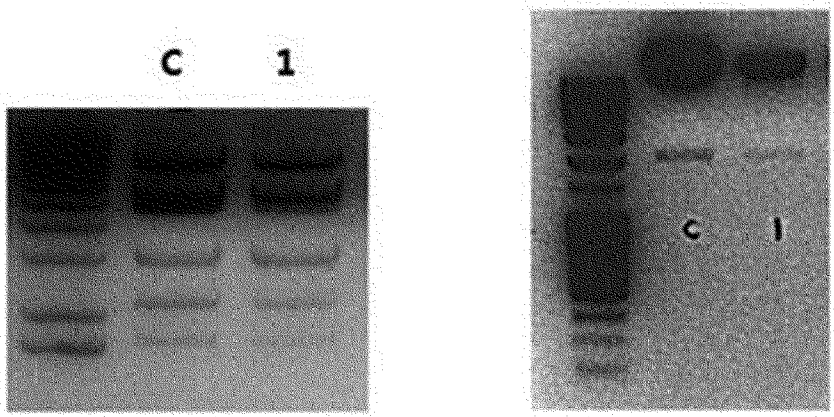


[Fig. 25]



[Fig. 26a]





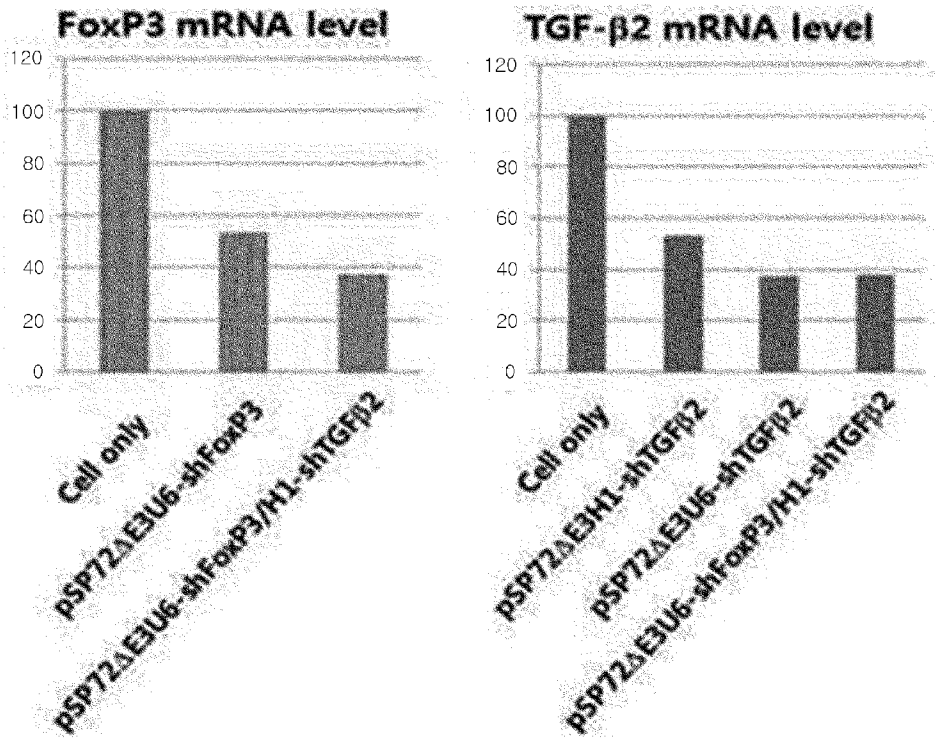
C. Control (dl324-BstB I -ΔE3-U6-shmFoxp3-H1-shmTGFβ2):

8010, 5324, 4947, 4597, 2937, 2874, 2081, 1637, 75

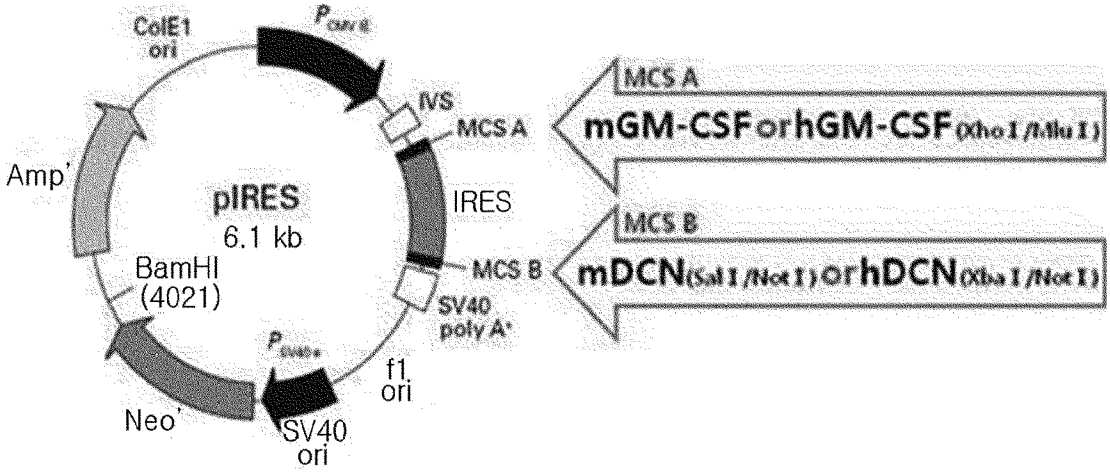
1. HR 성공한 sample :

8010, 5324, 4597, 4543, 2937, 2880, 2874, 2081, 1637, 75

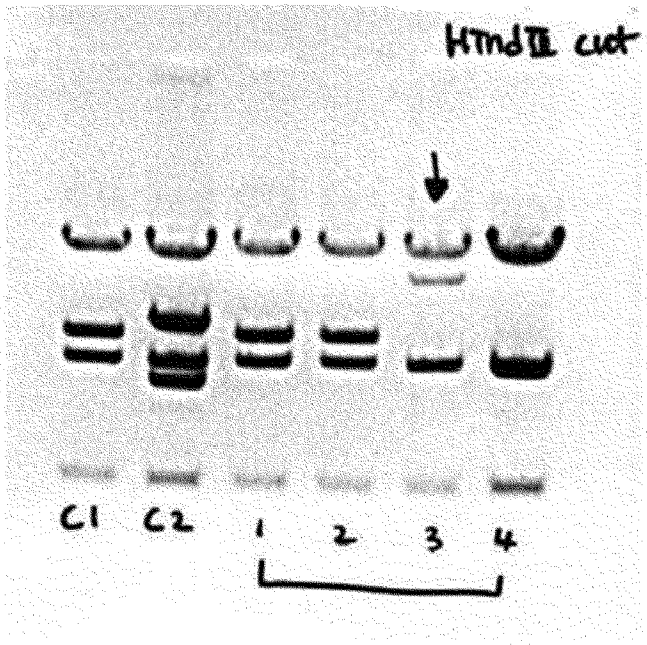
[Fig. 26b]



[Fig. 27]



[Fig. 28]

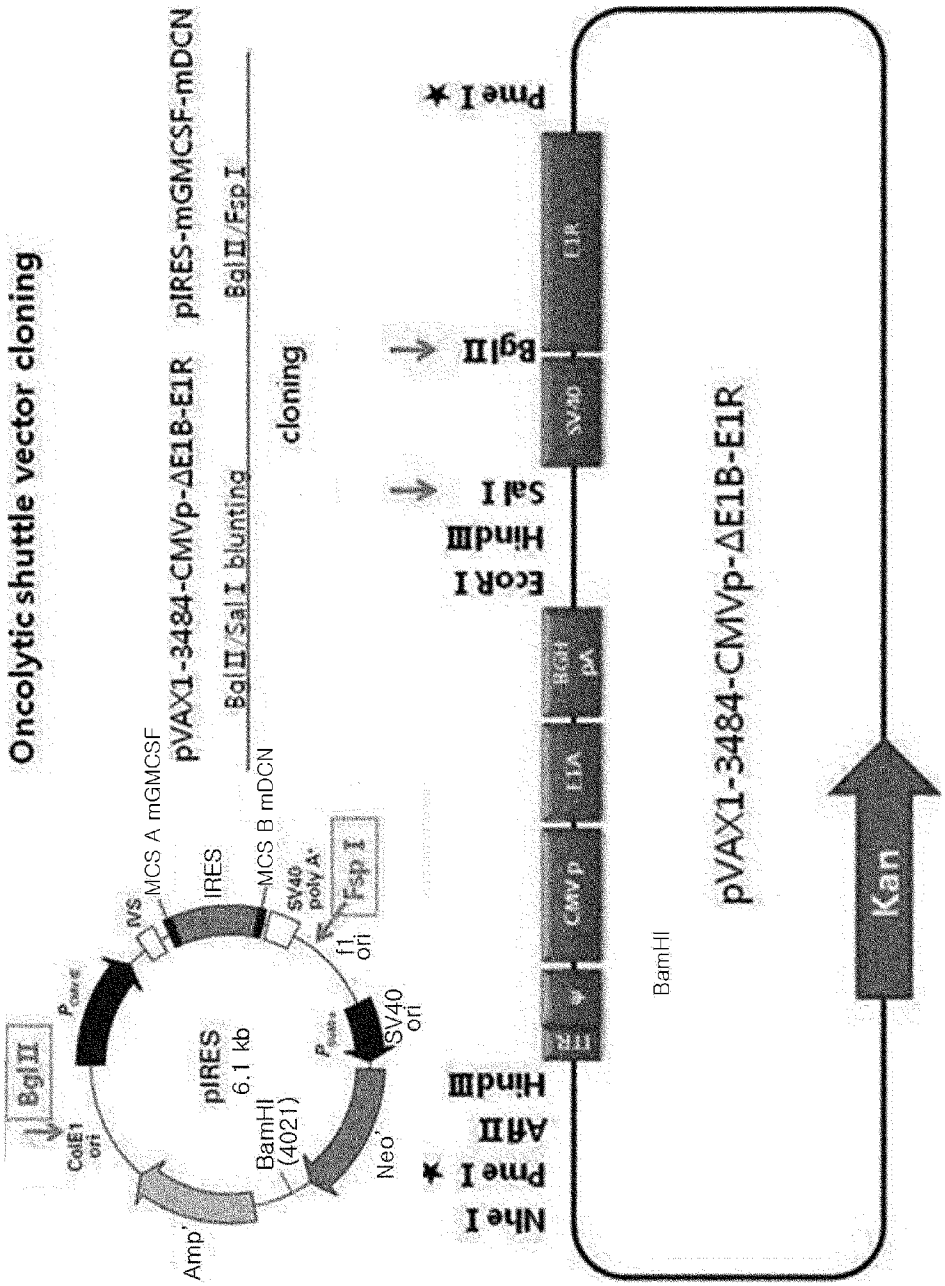


C1 : pIRES HindⅢ cut : 348 + 620 + 1322 + 3815

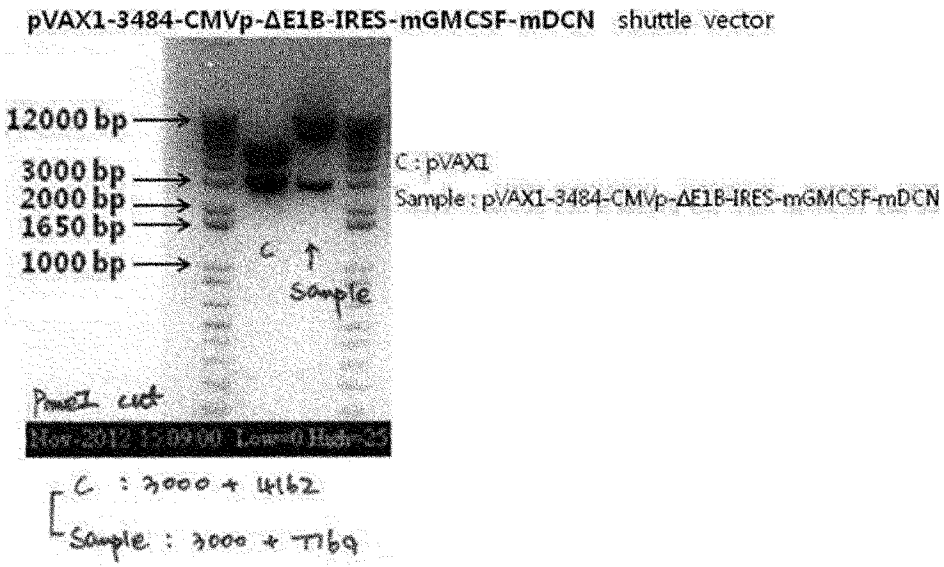
C2 : pIRES-mGMCSF-hDCN HindⅢ cut : 348 + 864 + 1051 + 1430 + 3815

3 : pIRES-mGMCSF-mDCN HindⅢ cut : 348 + 1051 + 2398 + 3815 (cloning 성공한 sample)

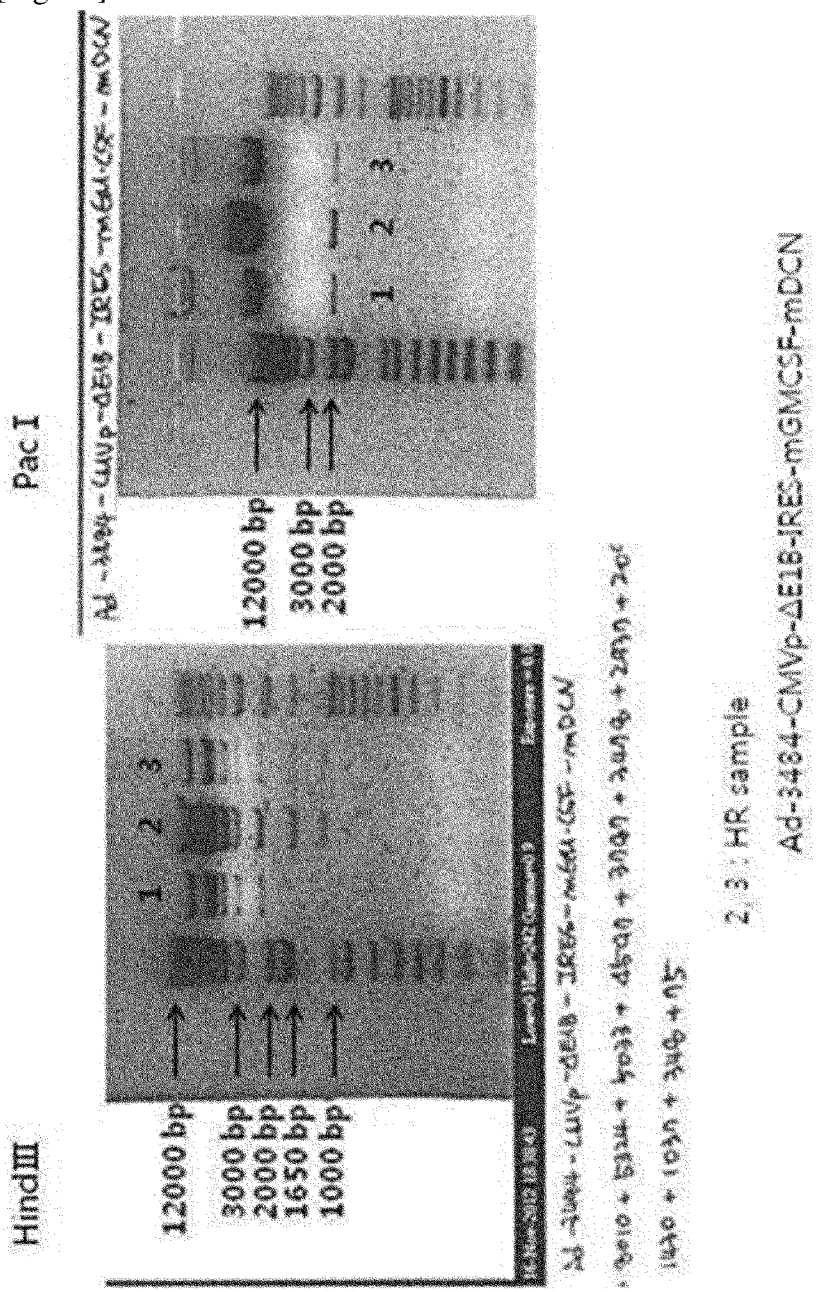
[Fig. 29]


Oncolytic shuttle vector cloning
pVAX1-3484-CMVp-ΔE18-E1R pIRES-mGMCSF-mDCN
BglII/FspI
BglII/SalI blunting
cloning
MCS A mGMCSF
IRES
MCS B mDCN
SV40 poly A'
FspI
f1 ori
SV40 ori
pIRES 6.1 kb
BamHI (4021)
Neo'
Amp'
ColE1 ori
BglII
PmeI
BglII
SalI
HindIII
EcoRI
NheI
ΔflII
HindIII
BamHI
pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-E1R
Kan

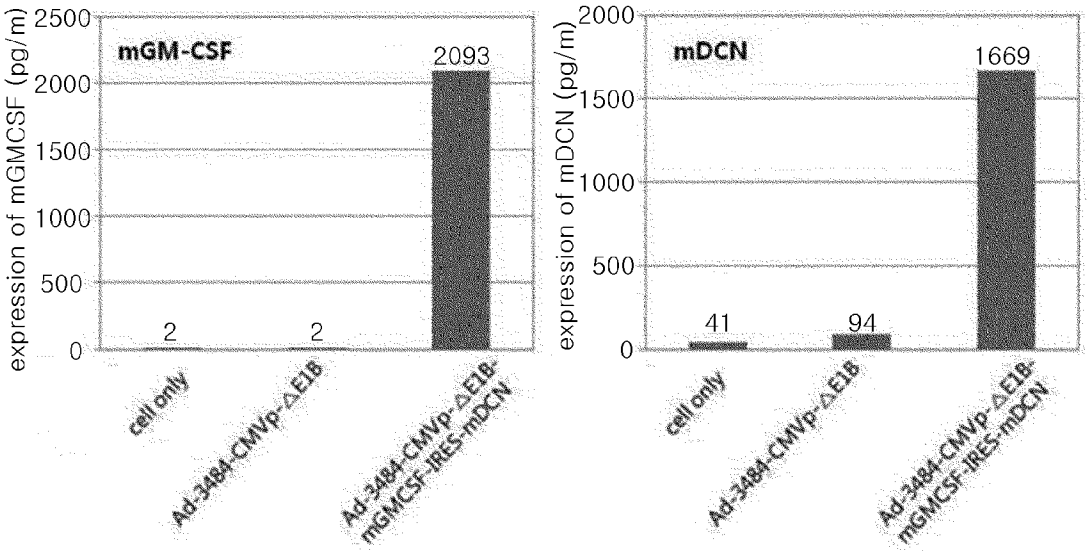
[Fig. 30]


pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-IRES-mGMCSF-mDCN shuttle vector
12000 bp
3000 bp
2000 bp
1650 bp
1000 bp
C : pVAX1
Sample : pVAX1-3484-CMVp-ΔE1B-IRES-mGMCSF-mDCN
C
Sample
PmeI cut
C : 3000 + 4162
Sample : 3000 + 7769

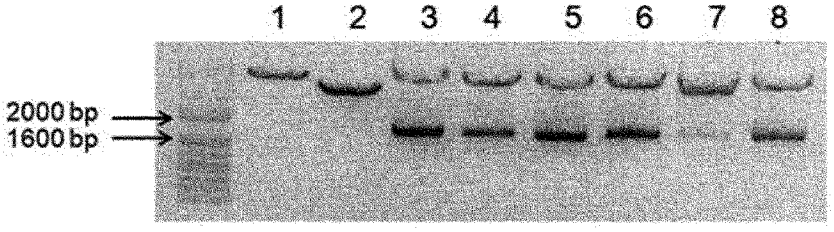
[Fig. 31]


Pac I
12000 bp
3000 bp
2000 bp
1 2 3
HindIII
12000 bp
3000 bp
2000 bp
1650 bp
1000 bp
1 2 3
2, 3 : HR sample
Ad-3484-CMVp-ΔE1B-IRES-mGMCSF-mDCN

[Fig. 32]

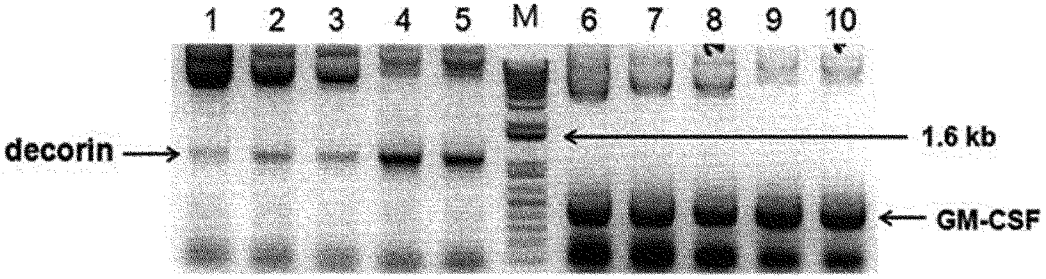

mGM-CSF
expression of mGMCSF (pg/m)
2500
2000
1500
1000
500
0
2
2
2093
cell only
Ad-3484-CMVp-ΔE1B
Ad-3484-CMVp-ΔE1B-mGMCSF-IRES-mDCN
mDCN
expression of mDCN (pg/m)
2000
1500
1000
500
0
41
94
1669
cell only
Ad-3484-CMVp-ΔE1B
Ad-3484-CMVp-ΔE1B-mGMCSF-IRES-mDCN

[Fig. 33]



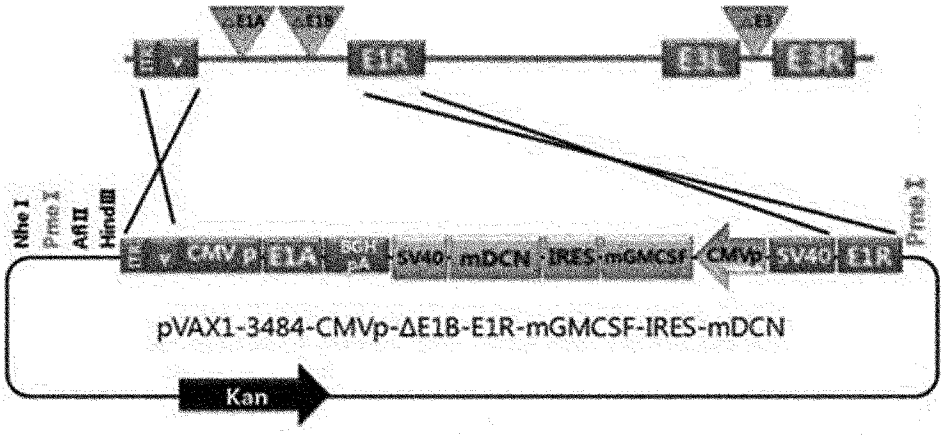
1. pIRES-hGM-CSF
2~7 pIRES-hGM-CSF-hDCN (6 lane only incorrect)
XbaI/NotI으로 확인

[Fig. 34]

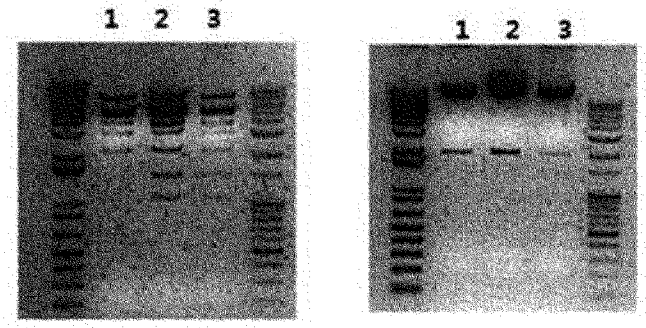


1 pIRES-hDCN
2.,3 pIRES-hGM-CSF-IRES-hDCN
4,5 pCA14-3484-CMV-ΔE1B-hGM-CSF-IRES-hDCN
6 pIRES-hGM-CSF
7,8 pIRES-hGM-CSF-IRES-hDCN
9,10 pCA14-3484-CMV-ΔE1B-hGM-CSF-IRES-hDCN

[Fig. 35a]



dl324-3484-CMVp-ΔE1B-mGMCSF-IRES-mDCN 상동재조합

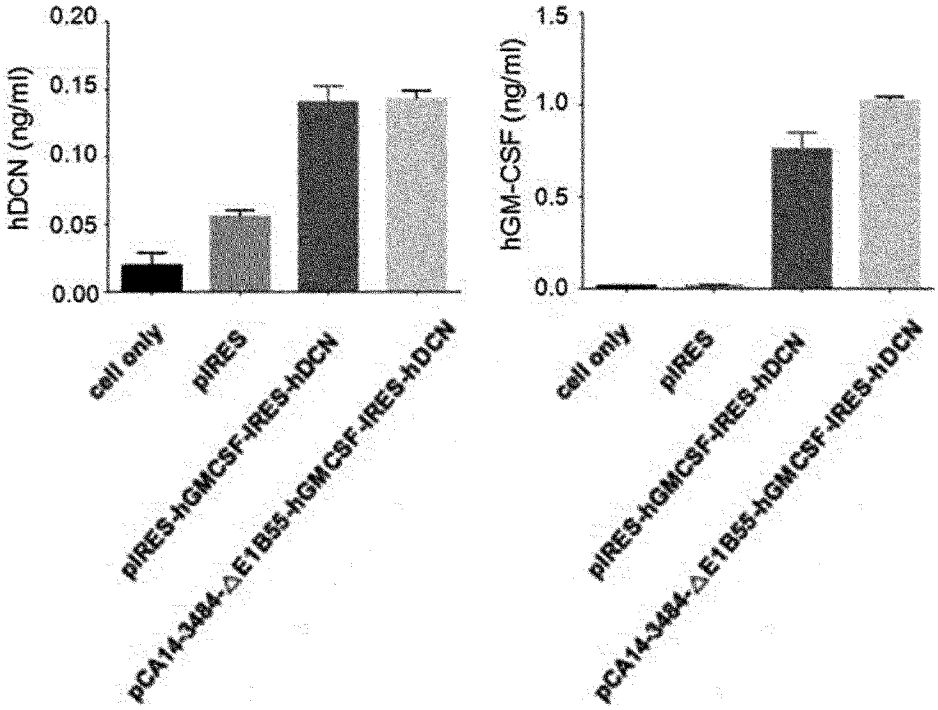


Hind Ⅲ cutting Pac Ⅰ cutting

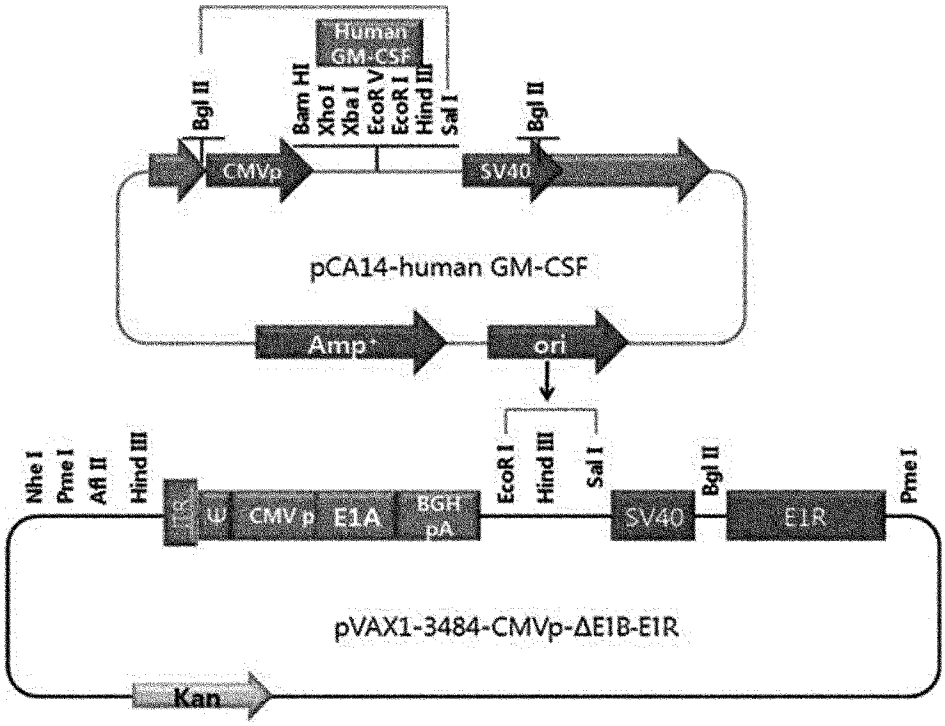
1. Control (dl324-BstB Ⅰ) : 8010, 5324, 4947, 4597, 3787, 2937, 2081, 75

2-3. HR 성공한 sample : 8010, 5324, 5033, 4597, 3787, 3478, 2937, 2081, 1430, 1037, 348, 75

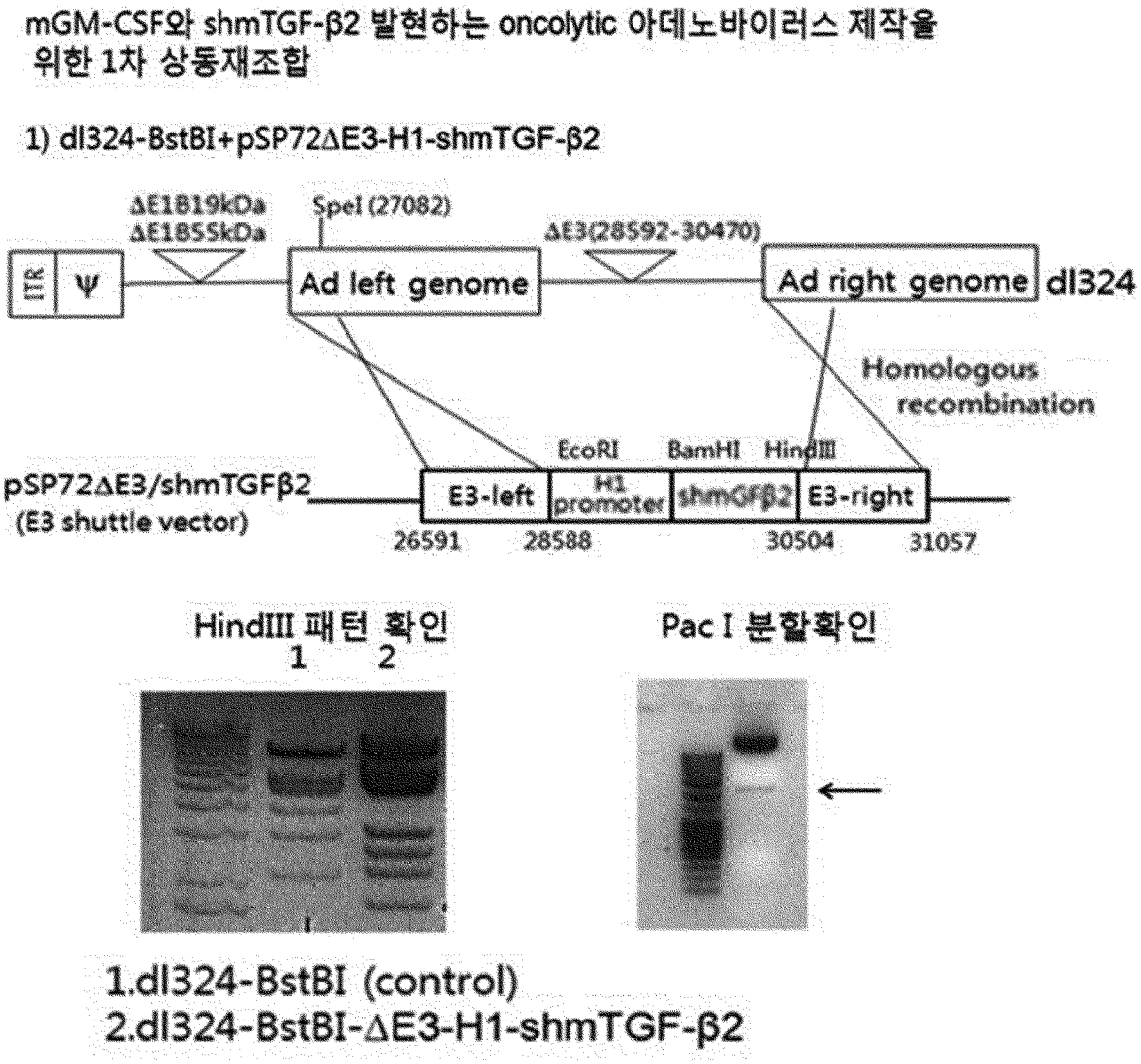
[Fig. 35b]



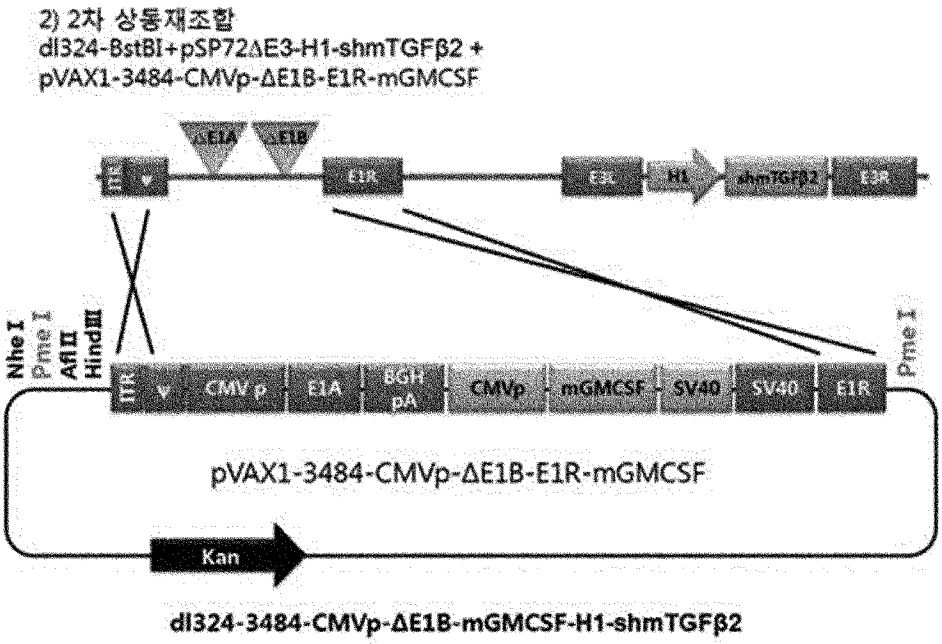
[Fig. 36]



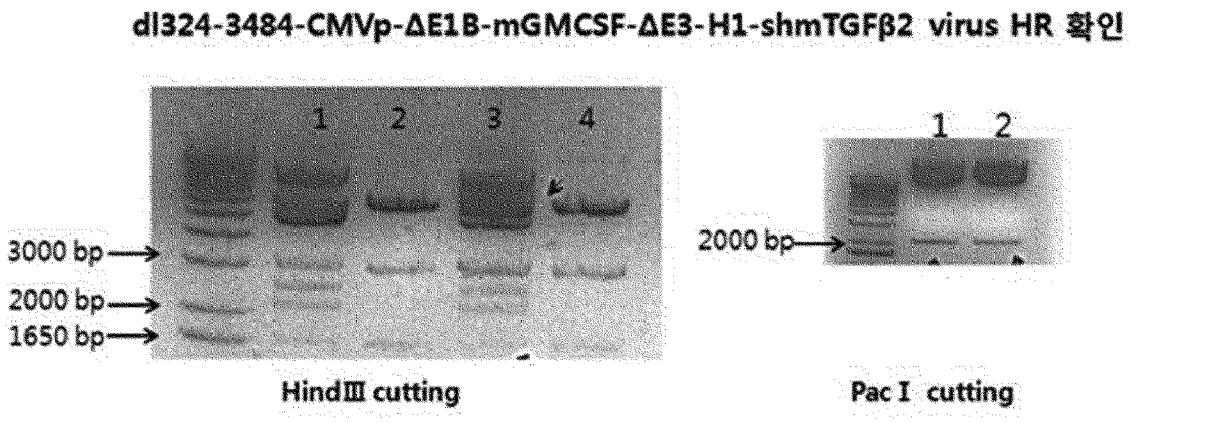
[Fig. 37a]



[Fig. 37b]



[Fig. 38]

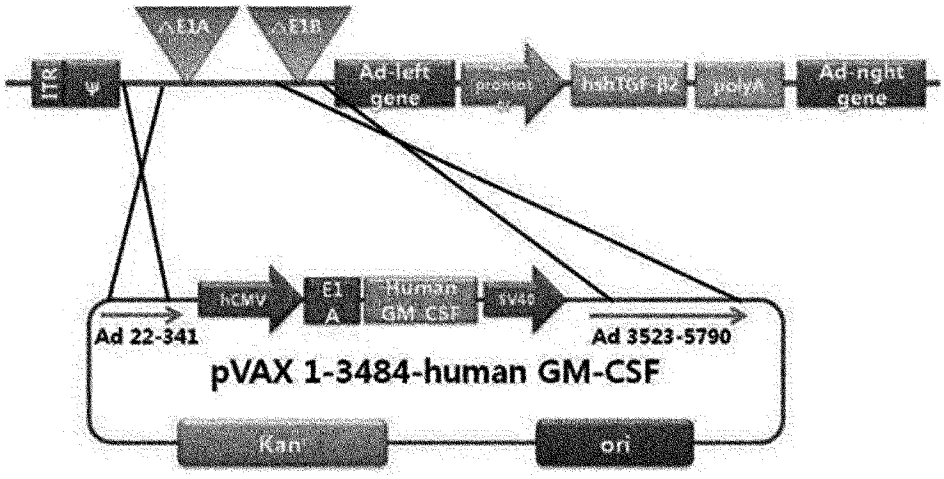


1. dl324-BstB I -ΔE3-H1-shmTGF2
(8010, 5324, 4947, 4597, 2937, 2440, 2081, 1627, 75)
2-4. Ad3484-CMVp-ΔE1B-mGMCSF-ΔE3-H1-shmTGF2
(8010, 6278, 5324, 4597, 2937, 2440, 2081, 1627, 75)
2-4 sample중 3번 성공

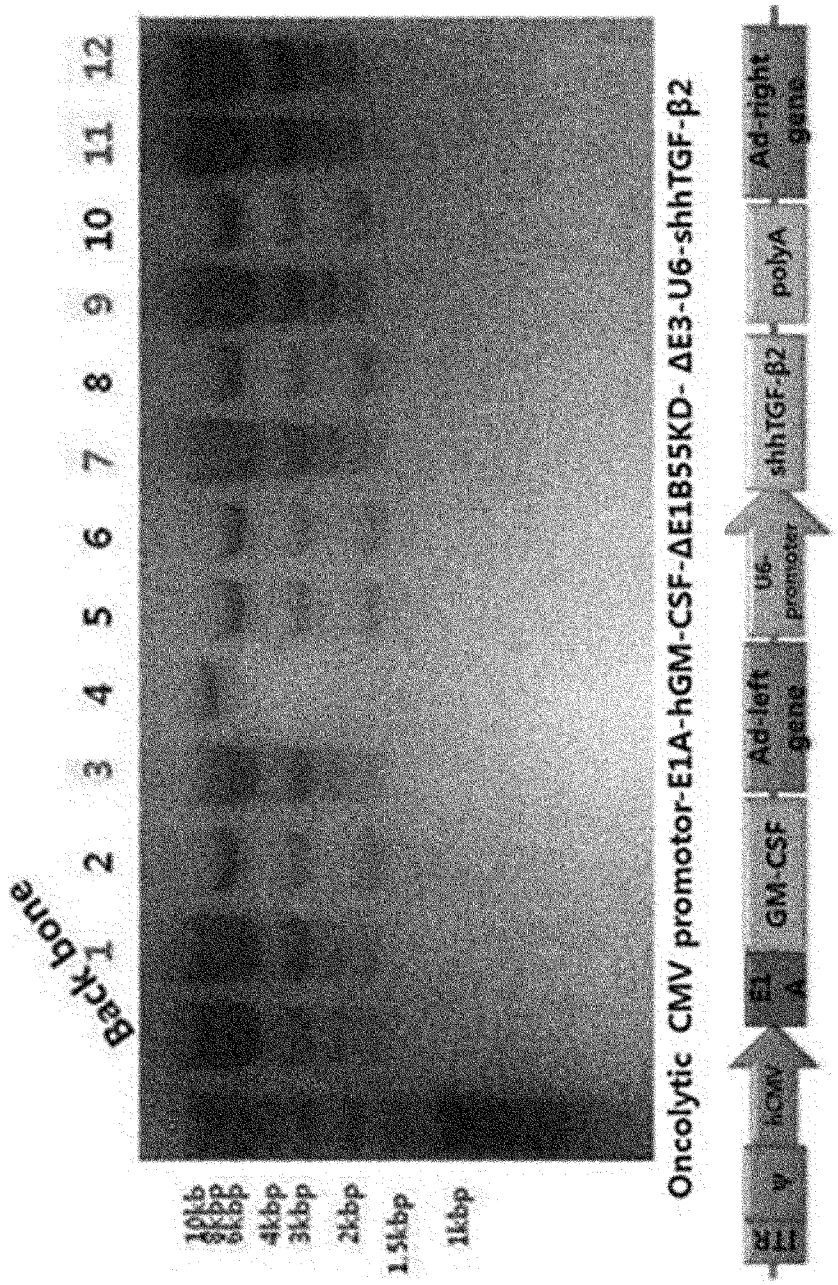
1. dl324-BstB I -ΔE3-H1-shmTGF2
2. dl324-3484-CMVp-ΔE1B-mGMCSF-ΔE3-H1-shmTGF2

화살표는 HR 성공한 DNA와 control DNA의 pattern에 차이가 있는 부분을 표시한 것

[Fig. 39]

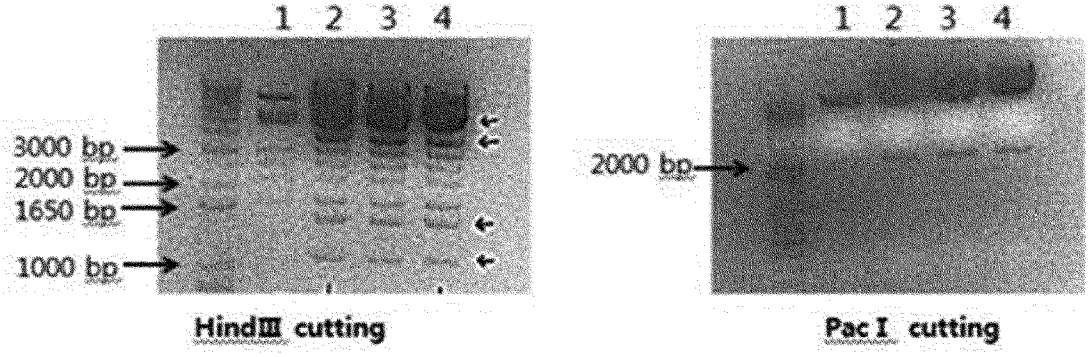

ΔE1A
ΔE1B
ITR
Ψ
Ad-left gene
shhTGF-β2
polyA
Ad-right gene
hCMV
E1 A
Human GM-CSF
SV40
Ad 22-341
Ad 3523-5790
pVAX 1-3484-human GM-CSF
Kan
ori

[Fig. 40]


Back bone
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
10kb
8kbp
6kbp
4kbp
3kbp
2kbp
1.5kbp
1kbp
Oncolytic CMV promotor-E1A-hGM-CSF-ΔE1B55KD- ΔE3-U6-shhTGF-β2
ITR
Ψ
hCMV
E1 A
GM-CSF
Ad-left gene
U6-promoter
shhTGF-β2
polyA
Ad-right gene

[Fig. 41]

dl324-3484-CMVp-ΔE1B-mGMCSF-IRES-mDCN-ΔE3-H1-shmTGFβ2 virus HR 확인

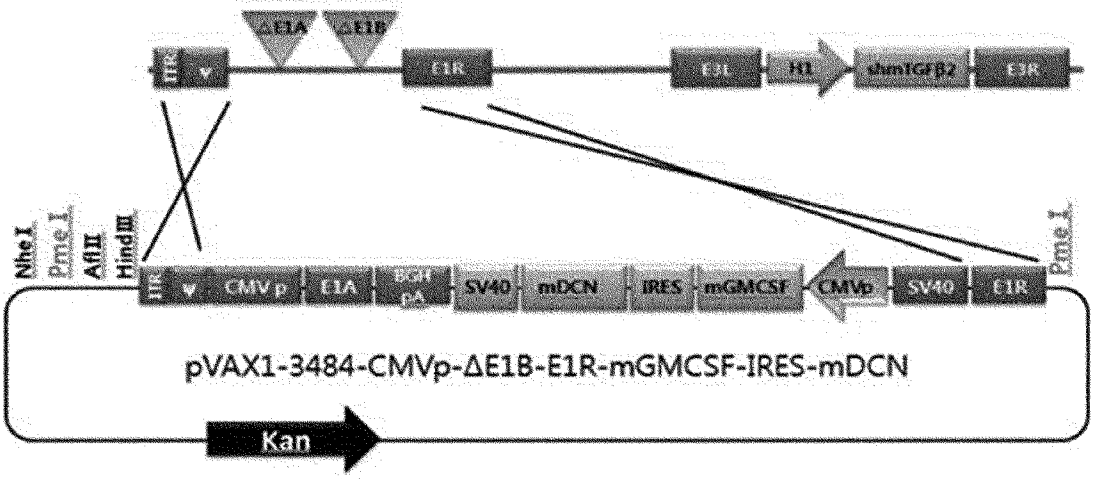


왼쪽의 1,2,3,4와 동일한 DNA를 PacI으로 자름

1. dl324-BstB I -ΔE3-H1-shmTGFβ2
(8010, 5324, 4947, 4597, 2937, 2440, 2081, 1627, 75)

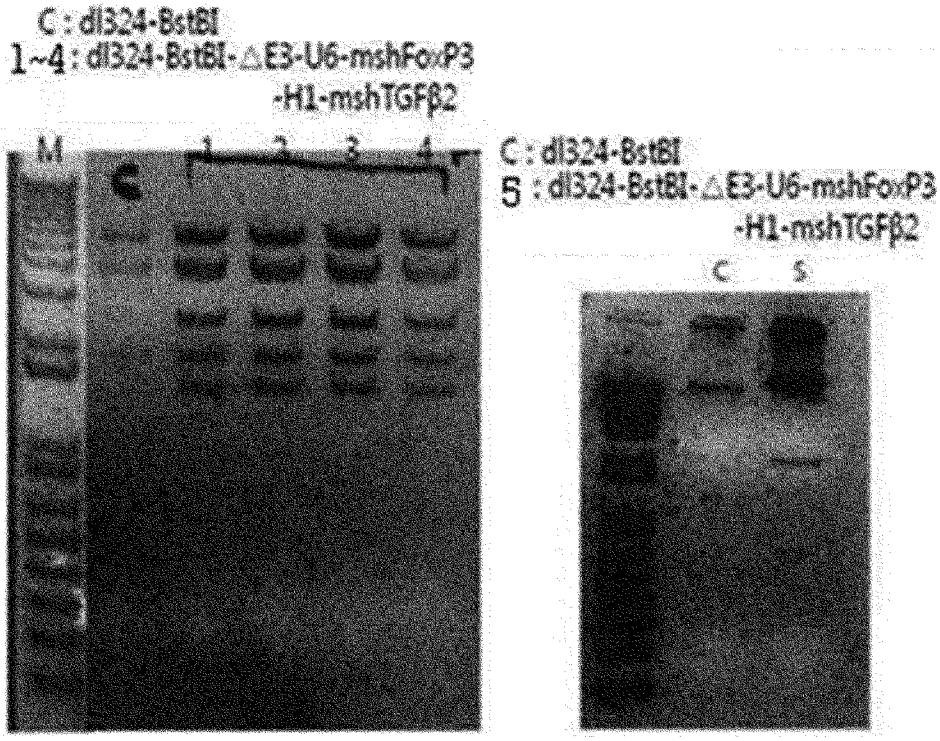
2-4. dl324-3484-CMVp-ΔE1B-mGMCSF-IRES-mDCN-ΔE3-H1-shmTGFβ2
(8010, 5324, 5033, 4597, 3478, 2937, 2440, 2081, 1627, 1430, 1057, 348, 75)

화살표는 HR 성공한 DNA와 control DNA의 pattern에 차이가 있는 부분을 표시한 것

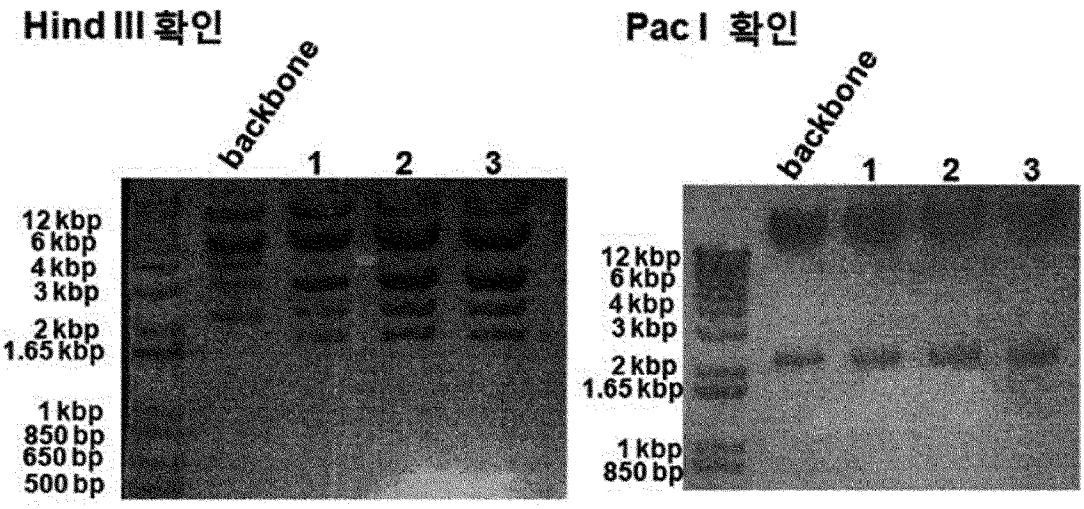


dl324-3484-CMVp-ΔE1B-mGMCSF-IRES-mDCN-ΔE3-H1-shmTGFβ2

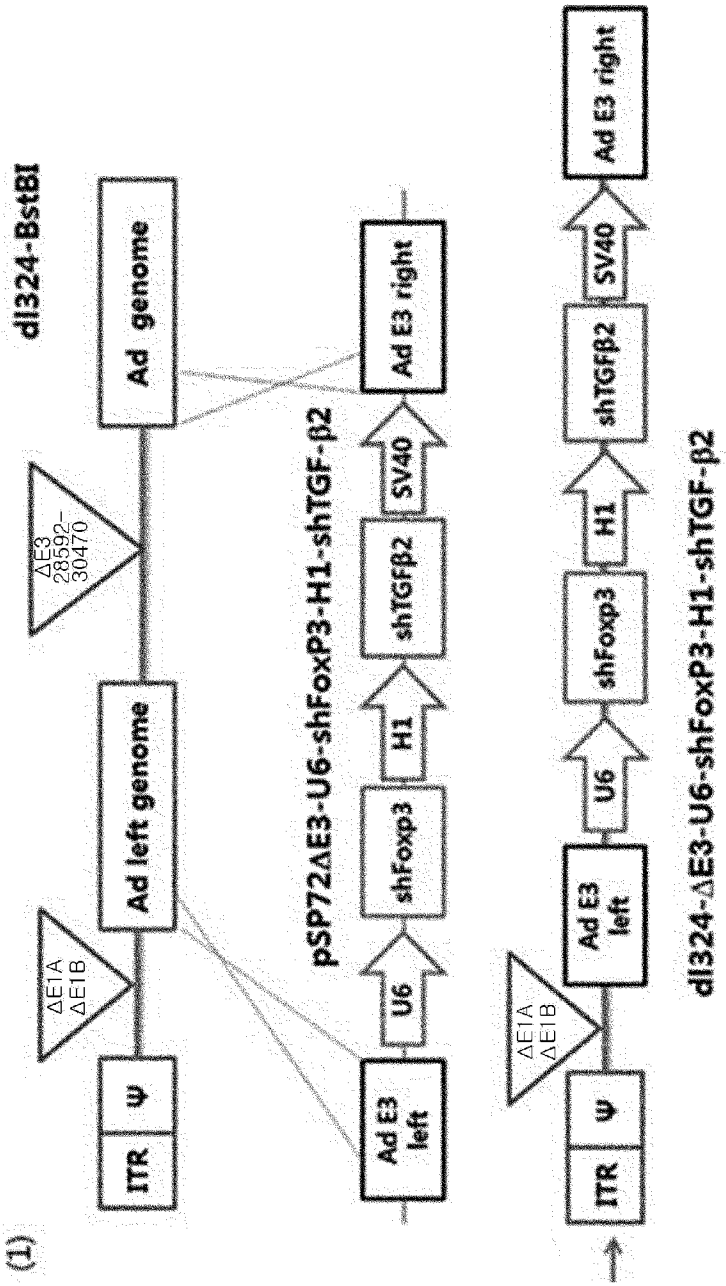
[Fig. 42a]



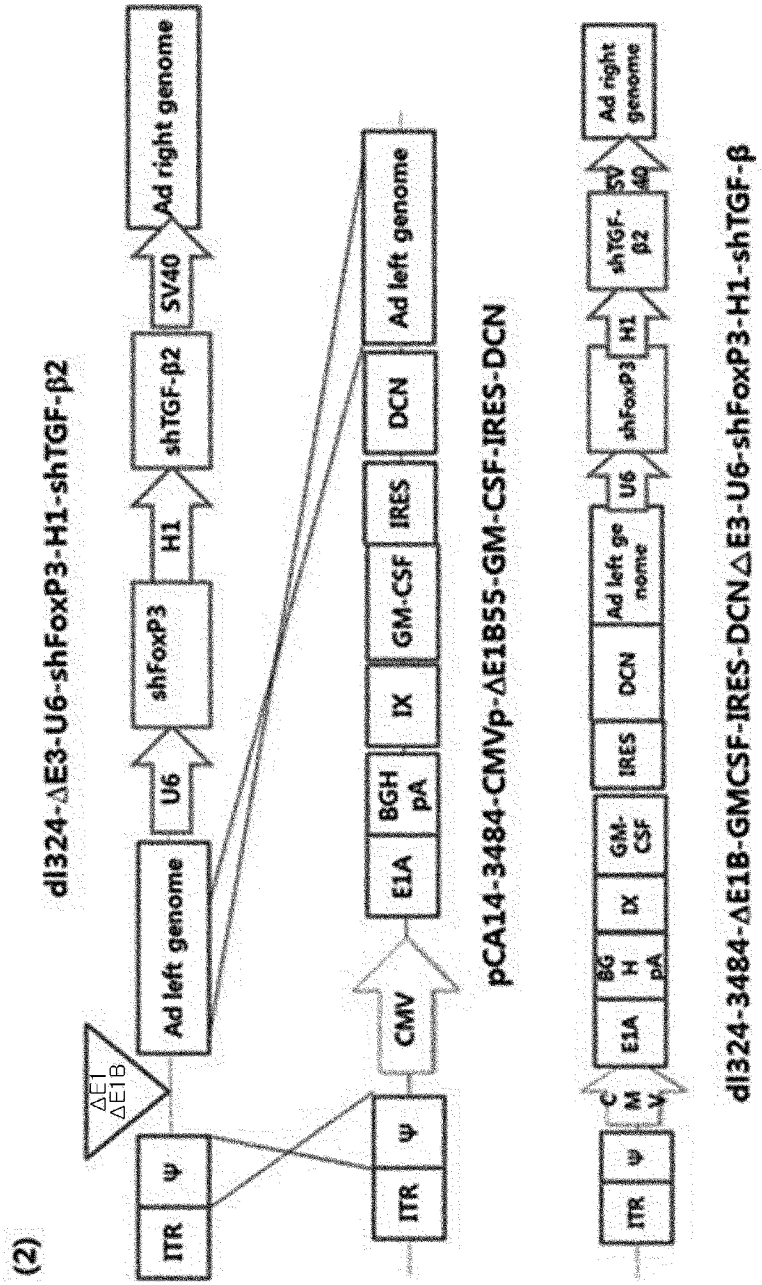
[Fig. 42b]



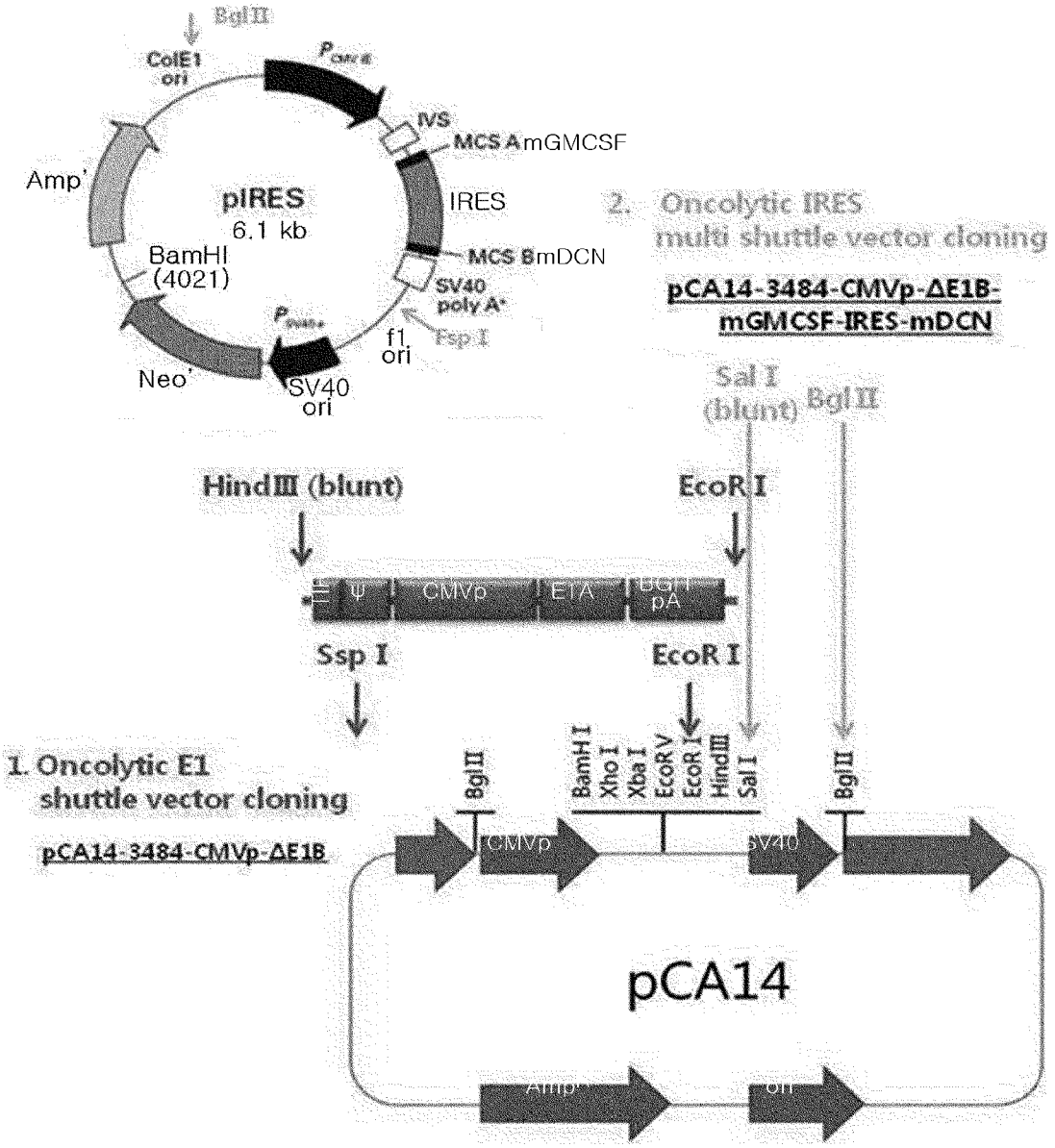
[Fig. 43a]


(1)
dl324-BstBI
ITR
Ψ
ΔE1A
ΔE1B
Ad left genome
ΔE3
28592–
30470
Ad genome
pSP72ΔE3-U6-shFoxP3-H1-shTGF-β2
Ad E3
left
U6
shFoxp3
H1
shTGFβ2
SV40
Ad E3 right
dl324-ΔE3-U6-shFoxP3-H1-shTGF-β2

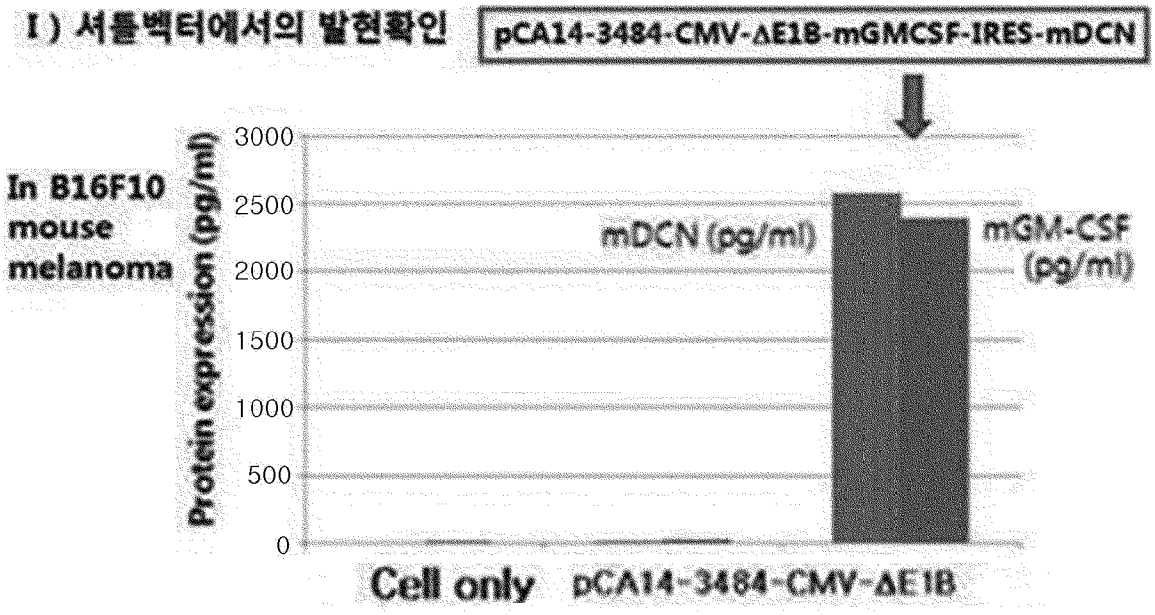
[Fig. 43b]


(2)
dl324-ΔE3-U6-shFoxP3-H1-shTGF-β2
ITR
Ψ
ΔE1
ΔE1B
Ad left genome
U6
shFoxP3
H1
shTGF-β2
SV40
Ad right genome
pCA14-3484-CMVp-ΔE1B55-GM-CSF-IRES-DCN
ITR
Ψ
CMV
E1A
BGH pA
IX
GM-CSF
IRES
DCN
Ad left genome
dl324-3484-ΔE18-GMCSF-IRES-DCNΔE3-U6-shFoxP3-H1-shTGF-β
ITR
Ψ
CMV
E1A
BGH pA
IX
GM-CSF
IRES
DCN
Ad left genome
U6
shFoxP3
H1
shTGF-β2
SV40
Ad right genome

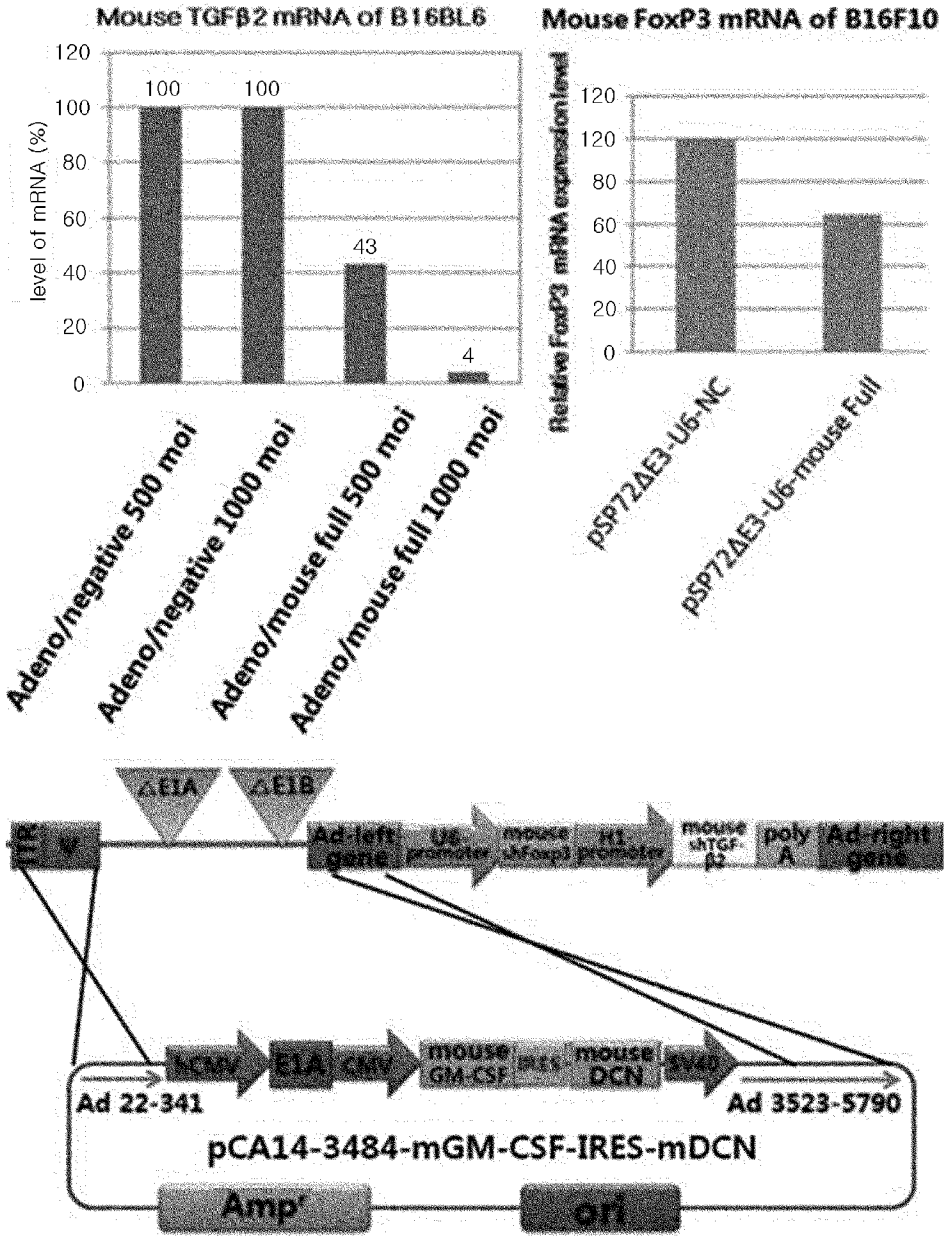
[Fig. 44]


BglII
ColE1 ori
IVS
MCS AmGMCSF
Amp'
pIRES
6.1 kb
IRES
MCS BmDCN
BamHI (4021)
SV40 poly A*
f1 ori
Fsp I
Neo'
SV40 ori
2. Oncolytic IRES multi shuttle vector cloning
pCA14-3484-CMVp-ΔE1B-mGMCSF-IRES-mDCN
Sal I (blunt)
BglII
HindIII (blunt)
EcoR I
ITR
Ψ
CMVp
E1A
SV40 pA
Ssp I
EcoR I
1. Oncolytic E1 shuttle vector cloning
pCA14-3484-CMVp-ΔE1B
BglII
BamH I
Xho I
Xba I
EcoR V
EcoR I
HindIII
Sal I
BglII
CMVp
SV40
pCA14
Amp'
ori

[Fig. 45]

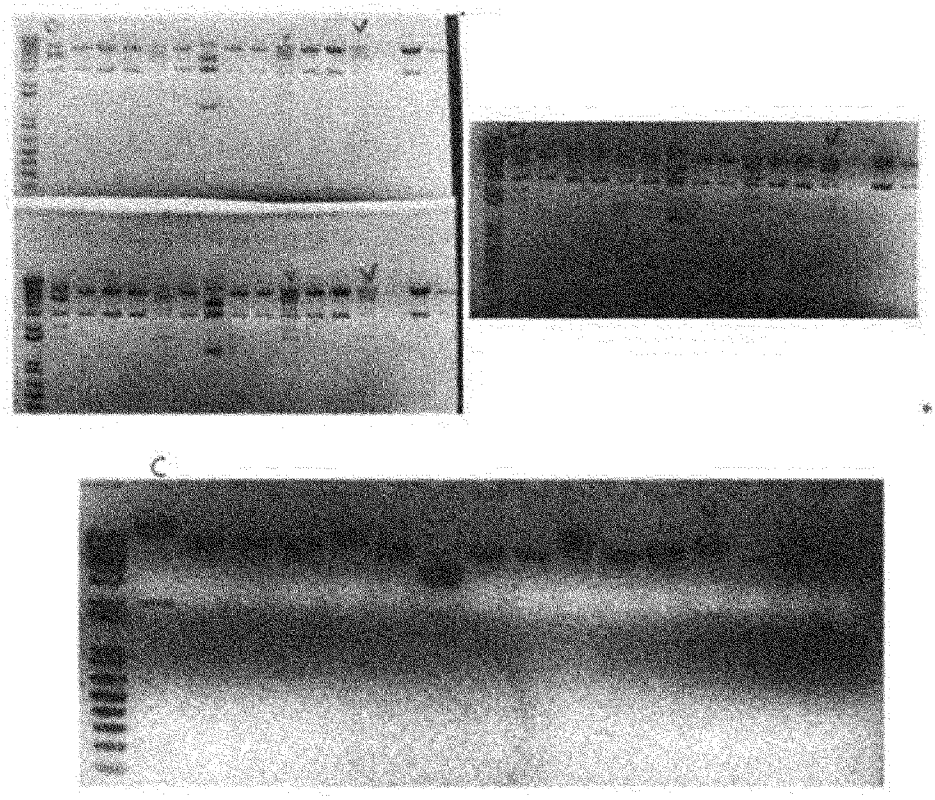

I) 셔틀벡터에서의 발현확인
pCA14-3484-CMV-ΔE1B-mGMCSF-IRES-mDCN
In B16F10 mouse melanoma
Protein expression (pg/ml)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
mDCN (pg/ml)
mGM-CSF (pg/ml)
Cell only
pCA14-3484-CMV-ΔE1B

[Fig. 46a]

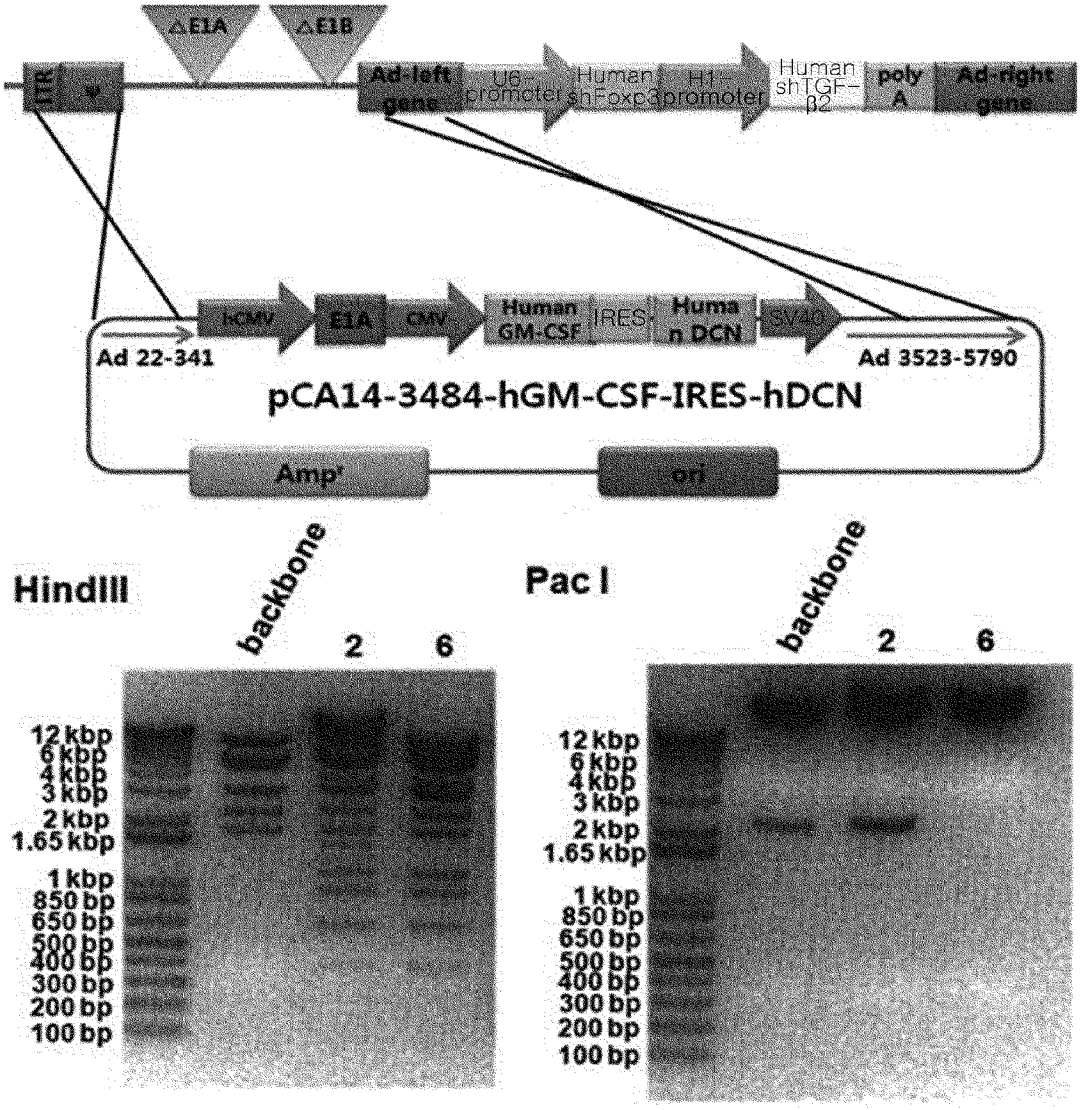

Mouse TGFβ2 mRNA of B16BL6
level of mRNA (%)
120
100
80
60
40
20
0
100
100
43
4
Adeno/negative 500 moi
Adeno/negative 1000 moi
Adeno/mouse full 500 moi
Adeno/mouse full 1000 moi
Mouse FoxP3 mRNA of B16F10
Relative FoxP3 mRNA expression level
120
120
80
60
40
20
0
pSP72ΔE3-U6-NC
pSP72ΔE3-U6-mouse Full
ΔE1A
ΔE1B
Ad-left gene
U6 promoter
mouse shFoxp3
H1 promoter
mouse shTGF-β2
poly A
Ad-right gene
hCMV
E1A
CMV
mouse GM-CSF
IRES
mouse DCN
SV40
Ad 22-341
Ad 3523-5790
pCA14-3484-mGM-CSF-IRES-mDCN
Amp'
ori

[Fig. 46b]

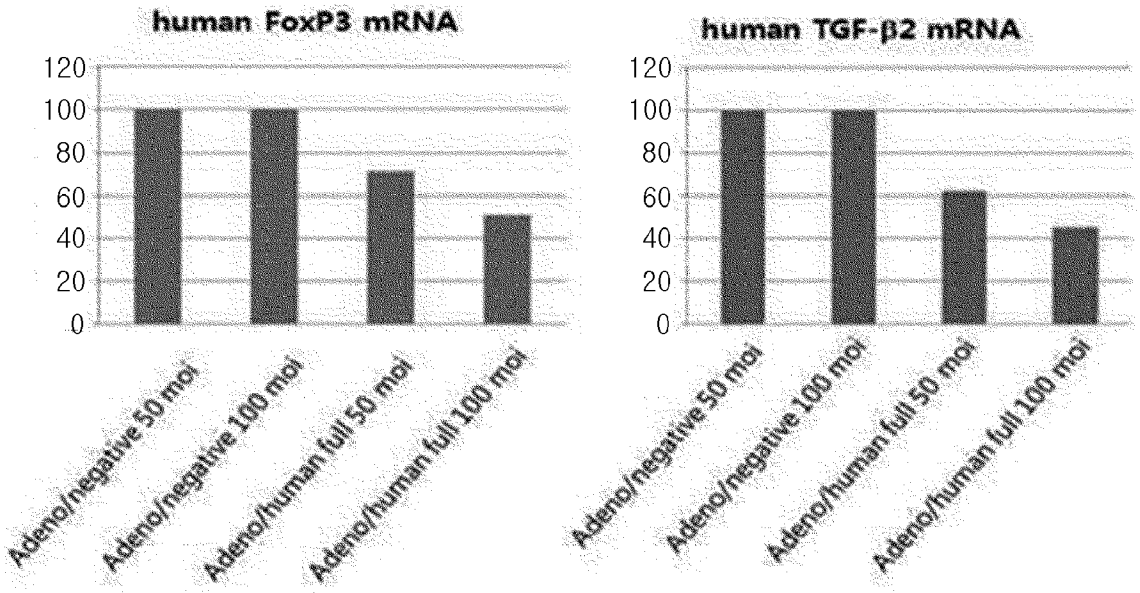
C: dl324-BstBI-ΔE3-U6-shmFoxP3-H1-shmTGFβ2
Samples : dl324-3484-CMVp-ΔE1B55-mGMCSF-IRES-mDCN-ΔE3-U6-shmFoxP3-H1-shmTGFβ2



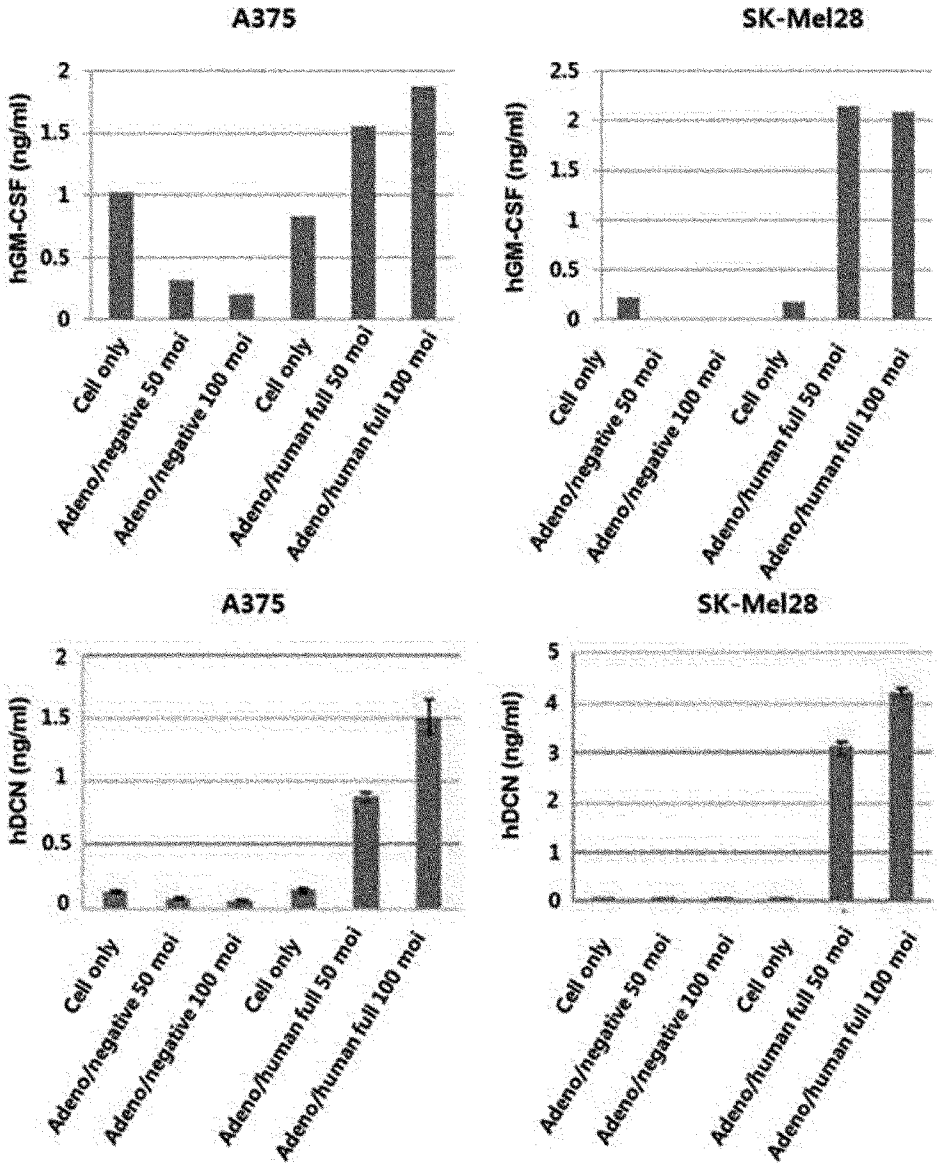
[Fig. 47]


ΔE1A
ΔE1B
ITR
Ψ
Ad-left gene
U6-promoter
Human shFoxp3
H1-promoter
Human shTGF-β2
poly A
Ad-right gene
hCMV
E1A
CMV
Human GM-CSF
IRES
Human DCN
SV40
Ad 22-341
Ad 3523-5790
pCA14-3484-hGM-CSF-IRES-hDCN
Amp'
ori
HindIII
backbone
2
6
12 kbp
6 kbp
4 kbp
3 kbp
2 kbp
1.65 kbp
1 kbp
850 bp
650 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp
Pac I
backbone
2
6
12 kbp
6 kbp
4 kbp
3 kbp
2 kbp
1.65 kbp
1 kbp
850 bp
650 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp

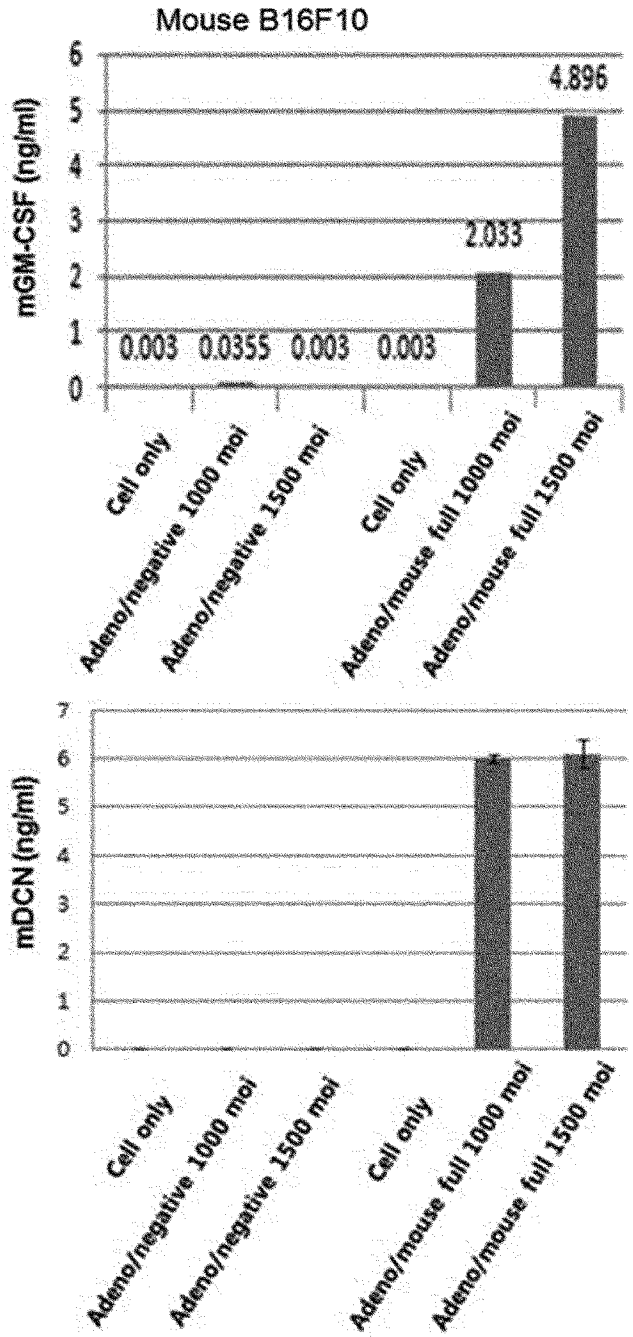
[Fig. 48]


human FoxP3 mRNA
120
100
80
60
40
20
0
Adeno/negative 50 moi
Adeno/negative 100 moi
Adeno/human full 50 moi
Adeno/human full 100 moi
human TGF-β2 mRNA
120
100
80
60
40
20
0
Adeno/negative 50 moi
Adeno/negative 100 moi
Adeno/human full 50 moi
Adeno/human full 100 moi

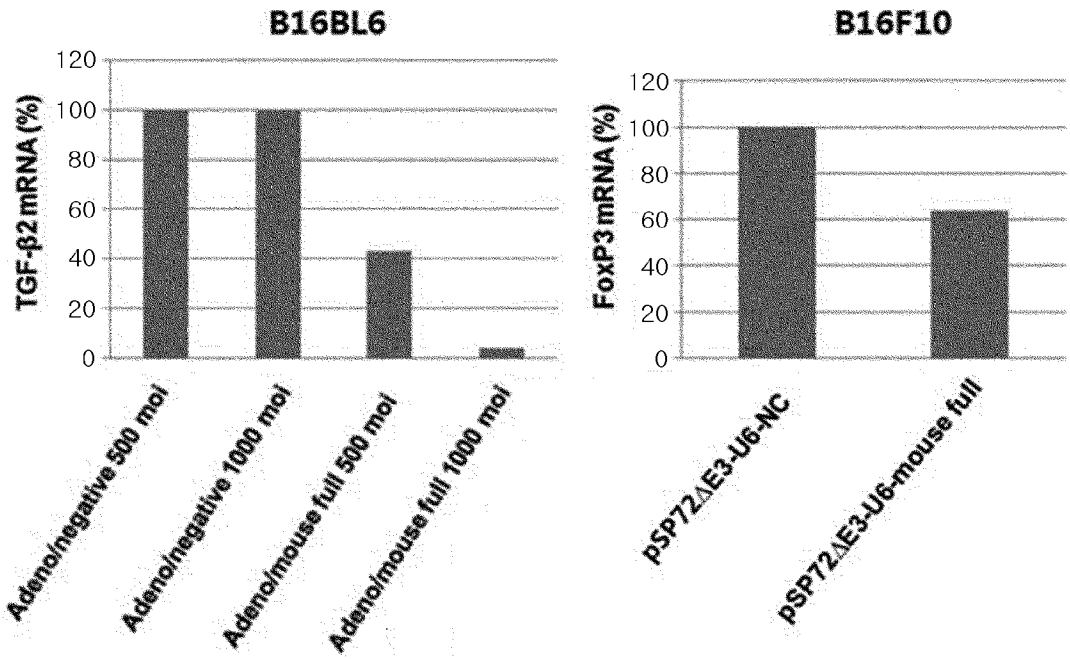
[Fig. 49]


A375
hGM-CSF (ng/ml)
2
1.5
1
0.5
0
Cell only
Adeno/negative 50 moi
Adeno/negative 100 moi
Cell only
Adeno/human full 50 moi
Adeno/human full 100 moi
SK-Mel28
hGM-CSF (ng/ml)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Cell only
Adeno/negative 50 moi
Adeno/negative 100 moi
Cell only
Adeno/human full 50 moi
Adeno/human full 100 moi
A375
hDCN (ng/ml)
2
1.5
1
0.5
0
Cell only
Adeno/negative 50 moi
Adeno/negative 100 moi
Cell only
Adeno/human full 50 moi
Adeno/human full 100 moi
SK-Mel28
hDCN (ng/ml)
5
4
3
2
1
0
Cell only
Adeno/negative 50 moi
Adeno/negative 100 moi
Cell only
Adeno/human full 50 moi
Adeno/human full 100 moi

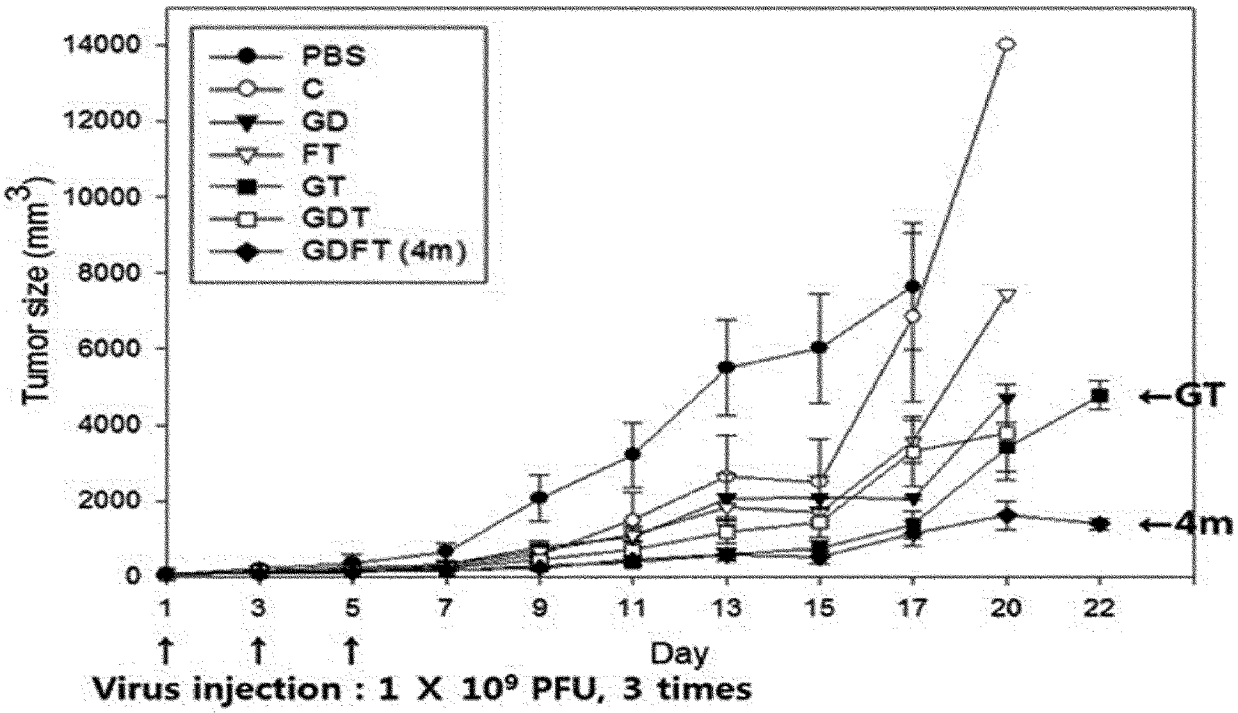
[Fig. 50]


Mouse B16F10
mGM-CSF (ng/ml)
0
1
2
3
4
5
6
0.003
0.0355
0.003
0.003
2.033
4.896
Cell only
Adeno/negative 1000 moi
Adeno/negative 1500 moi
Cell only
Adeno/mouse full 1000 moi
Adeno/mouse full 1500 moi
mDCN (ng/ml)
0
1
2
3
4
5
6
7
Cell only
Adeno/negative 1000 moi
Adeno/negative 1500 moi
Cell only
Adeno/mouse full 1000 moi
Adeno/mouse full 1500 moi

[Fig. 51]



[Fig. 52]



C : control virus

GD : GMCSF + DCN virus

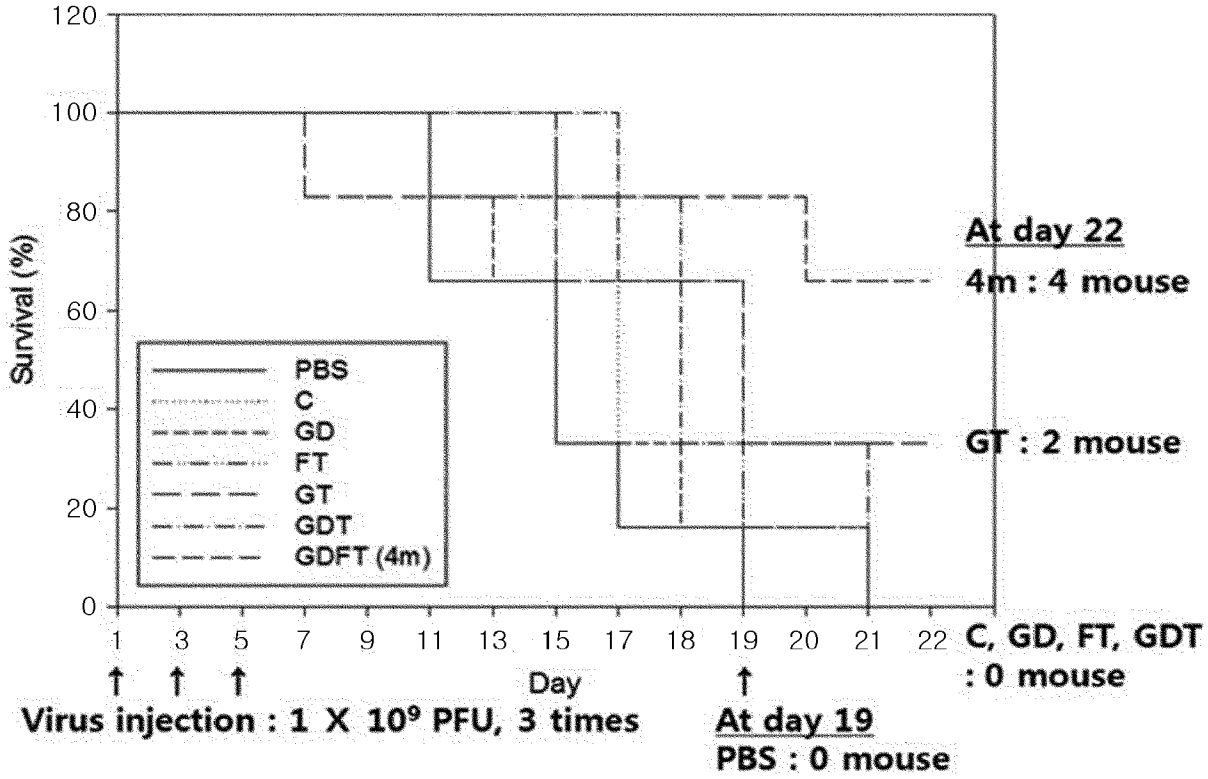
FT : shFoxp3 + shTGFb2 virus

GT : GMCSF + shTGFb2 virus

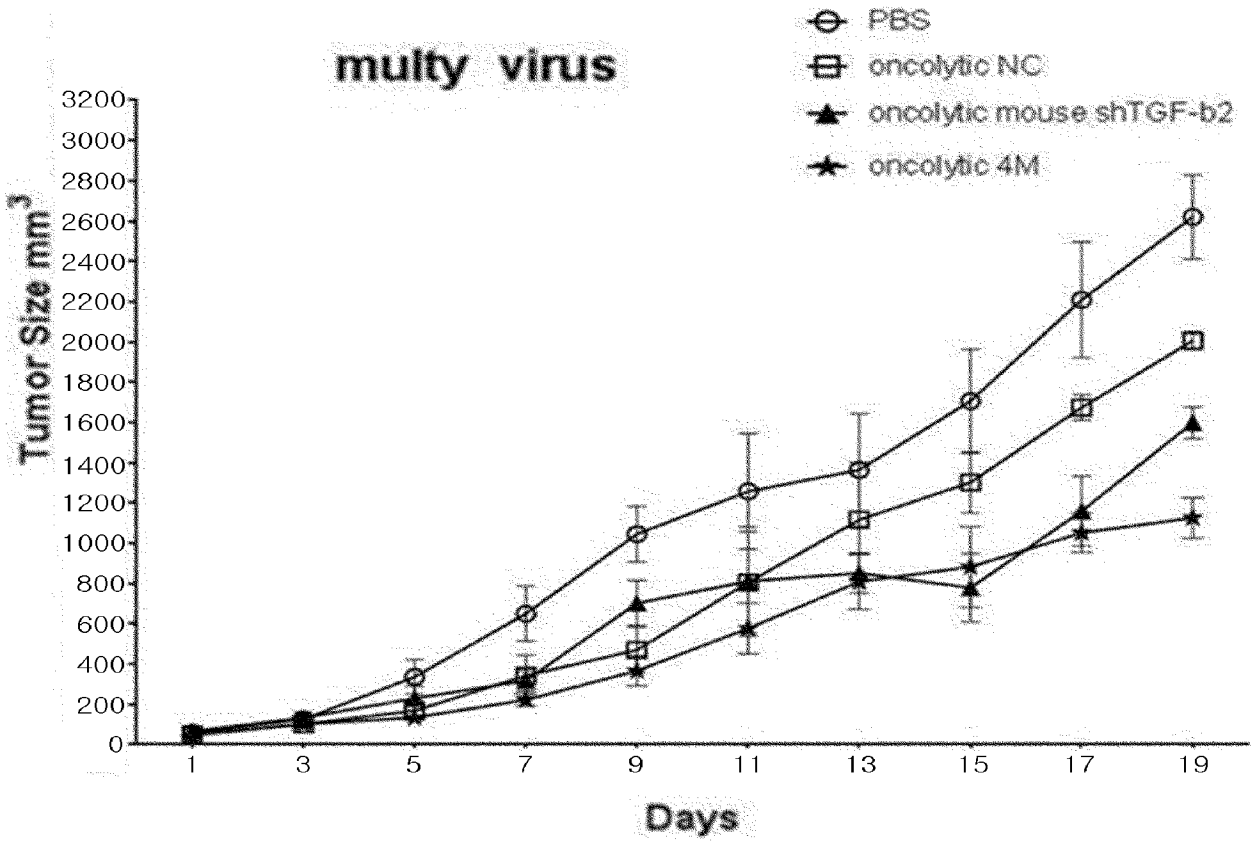
GDT : GMCSF + DCN + shTGFb2 virus

4m : GMCSF + DCN + shFoxp3 + shTGFb2 virus

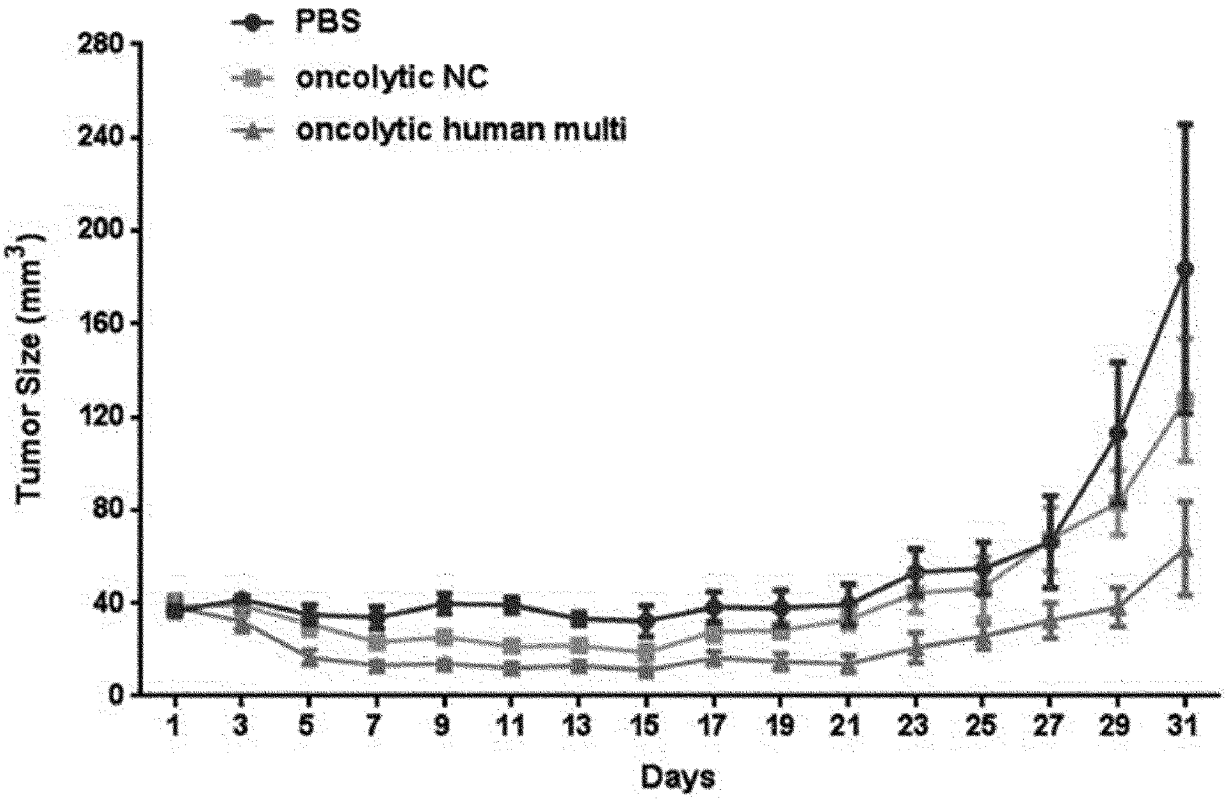
[Fig. 53]


Survival (%)
120
100
80
60
40
20
0
PBS
C
GD
FT
GT
GDT
GDFT (4m)
1 3 5 7 9 11 13 15 17 18 19 20 21 22
Day
At day 22
4m : 4 mouse
GT : 2 mouse
C, GD, FT, GDT
: 0 mouse
Virus injection : 1 X 10⁹ PFU, 3 times
At day 19
PBS : 0 mouse

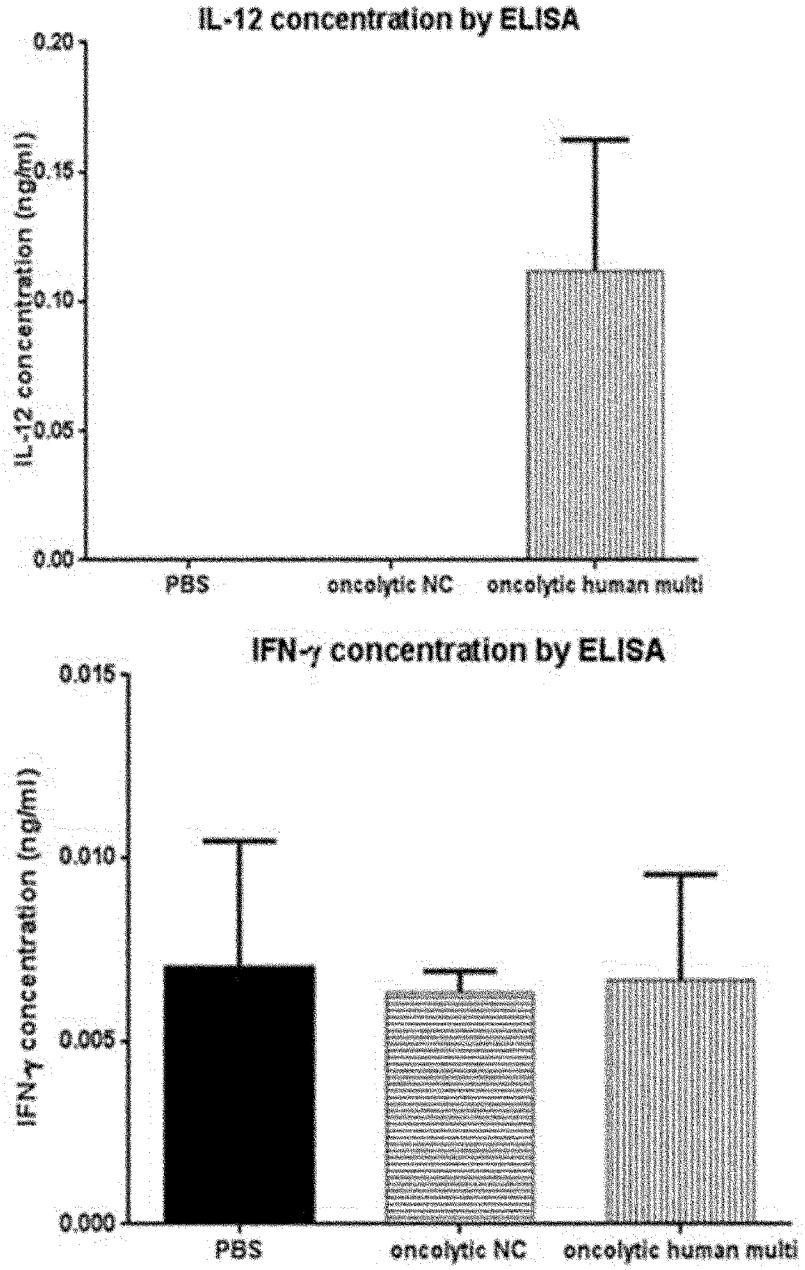
[Fig. 54]


multy virus
PBS
oncolytic NC
oncolytic mouse shTGF-b2
oncolytic 4M
Tumor Size mm³
3200
3000
2800
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19
Days

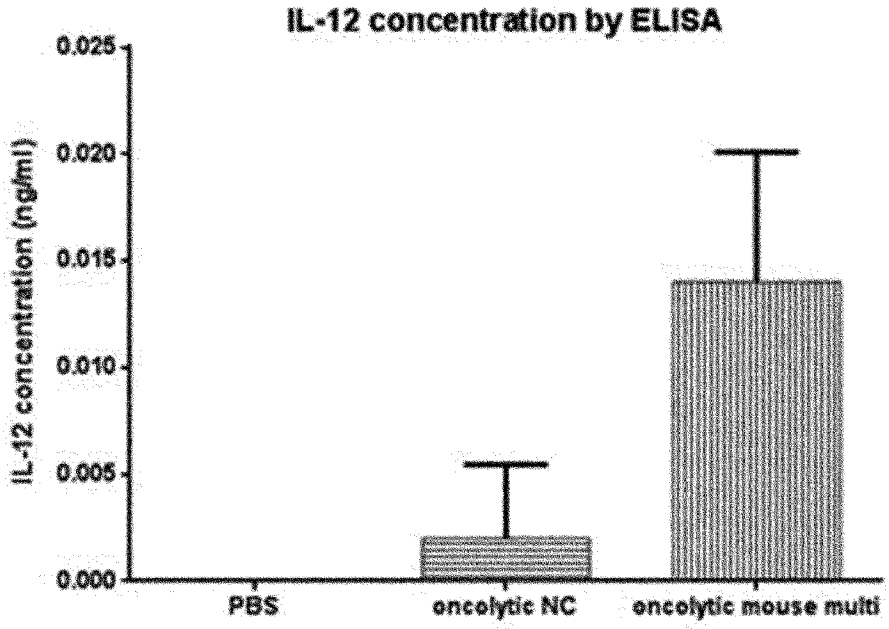
[Fig. 55]

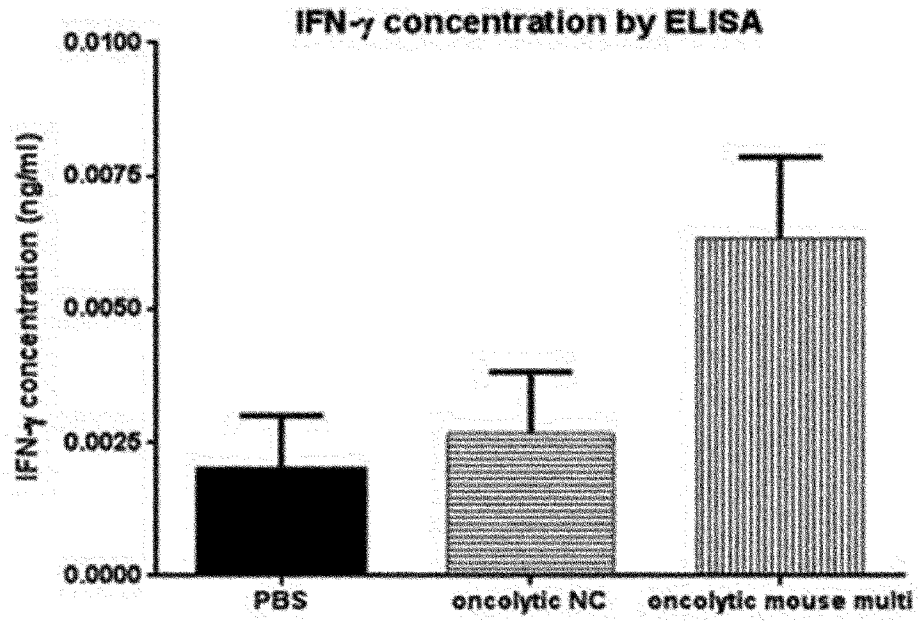

PBS
oncolytic NC
oncolytic human multi
Tumor Size (mm3)
280
240
200
160
120
80
40
0
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
31
Days

[Fig. 56]

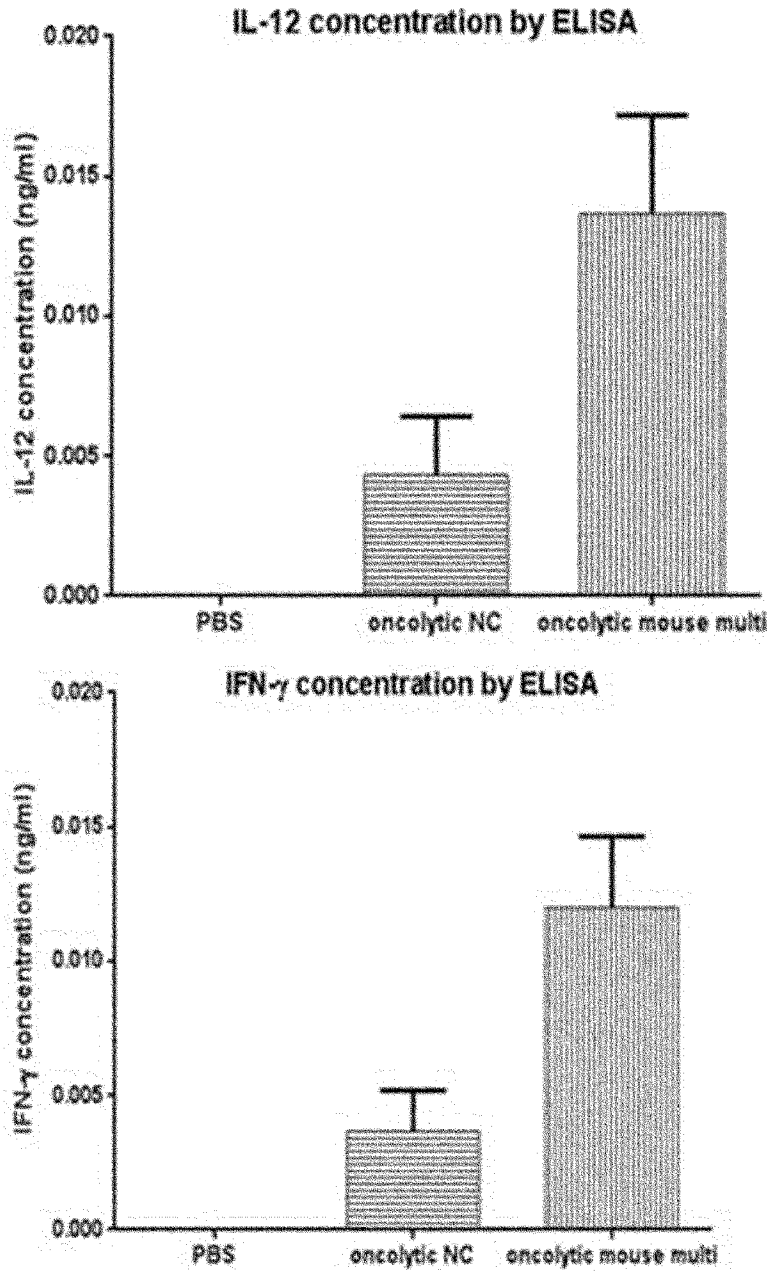

IL-12 concentration by ELISA
IL-12 concentration (ng/ml)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
PBS
oncolytic NC
oncolytic human multi
IFN-γ concentration by ELISA
IFN-γ concentration (ng/ml)
0.015
0.010
0.005
0.000
PBS
oncolytic NC
oncolytic human multi

[Fig. 57]

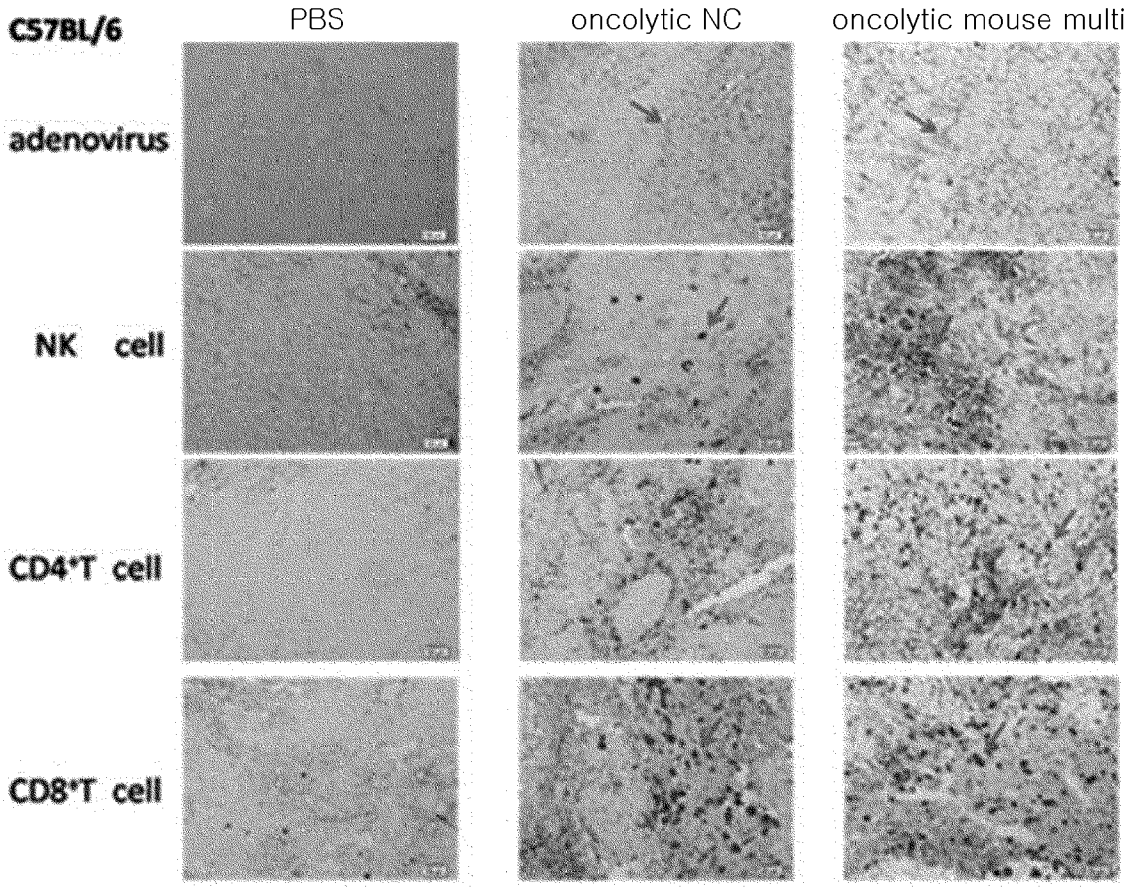

IL-12 concentration by ELISA
IL-12 concentration (ng/ml)
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
PBS
oncolytic NC
oncolytic mouse multi


IFN-γ concentration by ELISA
IFN-γ concentration (ng/ml)
0.0100
0.0075
0.0050
0.0025
0.0000
PBS
oncolytic NC
oncolytic mouse multi

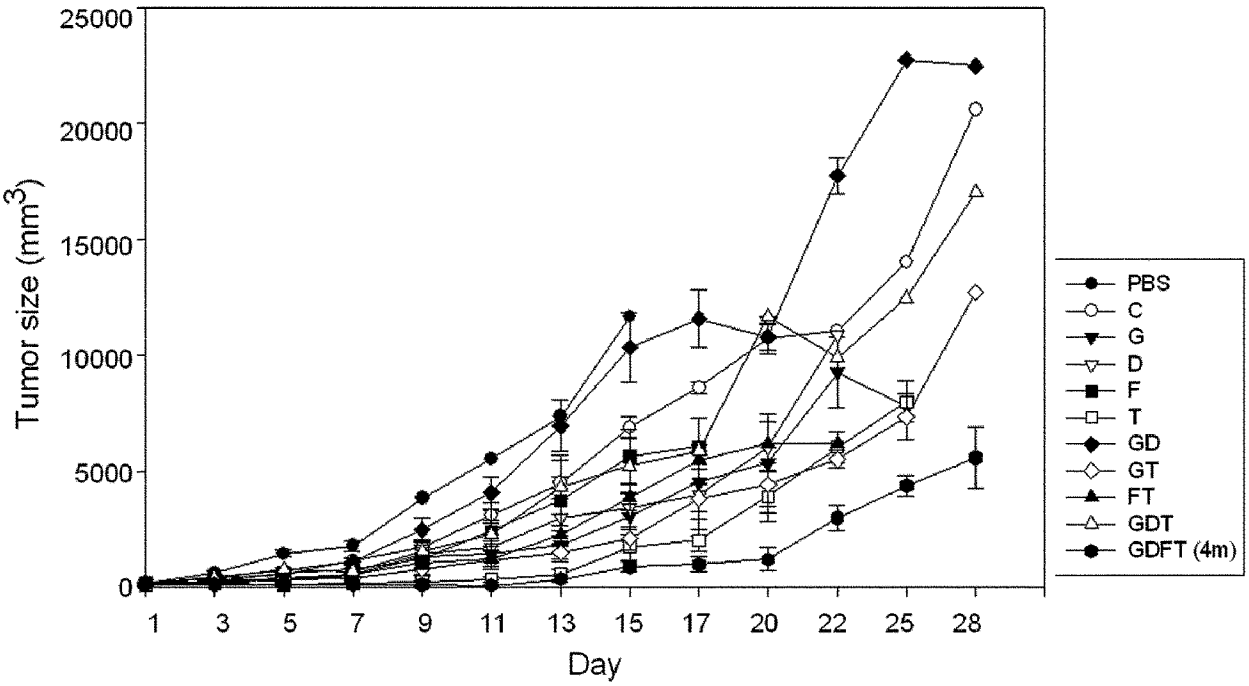
[Fig. 58]


IL-12 concentration by ELISA
IL-12 concentration (ng/ml)
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
PBS
oncolytic NC
oncolytic mouse multi
IFN-γ concentration by ELISA
IFN-γ concentration (ng/ml)
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
PBS
oncolytic NC
oncolytic mouse multi

[Fig. 59]


C57BL/6
PBS
oncolytic NC
oncolytic mouse multi
adenovirus
NK cell
CD4+T cell
CD8+T cell

[Fig. 60]


Tumor size (mm3)
25000
20000
15000
10000
5000
0
1
3
5
7
9
11
13
15
17
20
22
25
28
Day
PBS
C
G
D
F
T
GD
GT
FT
GDT
GDFT (4m)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/003175

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/113; C12N 15/63; A61K 31/7088; C12N 15/86; C12N 15/861; G01N 33/574; A61K 48/00; A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: GM-CSF, TGF-β2, decorin, FoxP3, shRNA, antitumor composition

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2012-0099503 A (GRADALIS, INC.) 10 September 2012 See abstract; paragraphs [0046] and [0059]-[0060]; claims 1, 11-13, 20, 37, 43 and 66.	1,4-8,26
Y		2-3,9,11-14,16-18,20-23
A		15,24
Y	NCBI, GenBank accession no. M11220.1 (08 November 1994) See the entire document.	2,12,21
Y	KR 10-2013-0088792 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 08 August 2013 See abstract; claims 1-4; sequence numbers 3-4.	3,9,13,22
Y	KR 10-2006-0094630 A (YUN, Chae Ok et al.) 30 August 2006 See abstract; claim 1.	11-14,16-18,20-23
Y	WO 2010-037042 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION et al.) 01 April 2010 See abstract; claims 53-56.	11-14,16-18,20-23
Y	NCBI, GenBank accession no. BC138564.1 (12 May 2008) See sequence.	14,23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 JUNE 2015 (29.06.2015)	**29 JUNE 2015 (29.06.2015)**
Name and mailing address of the ISA/**KR** Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NCBI, GenBank accession no. DQ010327.1 (10 May 2005) See sequence.	1-9,11-18,20-24,26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/003175

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: **10, 19, 25**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/KR2015/003175

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0099503 A	10/09/2012	CA 2785258 A1	30/06/2011
		CN 102917709 A	06/02/2013
		EP 2515916 A1	31/10/2012
		JP 05553906 B2	23/07/2014
		JP 2013-515731 A	09/05/2013
		JP 2014-210781 A	13/11/2014
		KR 10-2014-0108344 A	05/09/2014
		WO 2011-079077 A1	30/06/2011
KR 10-2013-0088792 A	08/08/2013	CN 104245936 A	24/12/2014
		JP 2015-506696 A	05/03/2015
		KR 10-1420564 B1	17/07/2014
		WO 2013-115579 A1	08/08/2013
KR 10-2006-0094630 A	30/08/2006	CN 101128592 A	20/02/2008
		CN 101128592 B	27/02/2013
		EP 1869190 A1	26/12/2007
		EP 1869190 A4	20/08/2008
		JP 04982680 B2	25/07/2012
		JP 2008-531010 A	14/08/2008
		US 2008-0132449 A1	05/06/2008
		WO 2006-091045 A1	31/08/2006
WO 2010-037042 A2	01/04/2010	US 2011-287949 A1	24/11/2011
		WO 2010-037042 A3	27/05/2010

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/003175

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/113(2010.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 15/113; C12N 15/63; A61K 31/7088; C12N 15/86; C12N 15/861; G01N 33/574; A61K 48/00; A61P 35/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:GM-CSF, TGF-β2, 데코린, FoxP3, shRNA, 항종양 조성물

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2012-0099503 A (그래댈리스, 인코포레이티드) 2012.09.10 요약; 단락 [0046] 및[0059]-[0060]; 청구항 1, 11-13, 20, 37, 43 및 66 참조.	1,4-8,26
Y		2-3,9,11-14,16-18,20-23
A		15,24
Y	NCBI, GenBank accession no. M11220.1 (1994.11.08) 전체 문헌 참조.	2,12,21
Y	KR 10-2013-0088792 A (연세대학교 산학협력단) 2013.08.08 요약; 청구항 1-4; 서열번호 3-4 참조.	3,9,13,22
Y	KR 10-2006-0094630 A (윤채옥 등) 2006.08.30 요약; 청구항 1 참조.	11-14,16-18,20-23
Y	WO 2010-037042 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION 등) 2010.04.01 요약; 청구항 53-56 참조.	11-14,16-18,20-23
Y	NCBI, GenBank accession no. BC138564.1 (2008.05.12) 서열 참조.	14,23

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2015년 06월 29일 (29.06.2015)	2015년 06월 29일 (29.06.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/003175

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NCBI, GenBank accession no. DQ010327.1 (2005.05.10) 서열 참조.	1-9,11-18,20-24,26

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/003175

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☒ 청구항: 10, 19, 25
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/003175

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0099503 A	2012/09/10	CA 2785258 A1	2011/06/30
		CN 102917709 A	2013/02/06
		EP 2515916 A1	2012/10/31
		JP 05553906 B2	2014/07/23
		JP 2013-515731 A	2013/05/09
		JP 2014-210781 A	2014/11/13
		KR 10-2014-0108344 A	2014/09/05
		WO 2011-079077 A1	2011/06/30
KR 10-2013-0088792 A	2013/08/08	CN 104245936 A	2014/12/24
		JP 2015-506696 A	2015/03/05
		KR 10-1420564 B1	2014/07/17
		WO 2013-115579 A1	2013/08/08
KR 10-2006-0094630 A	2006/08/30	CN 101128592 A	2008/02/20
		CN 101128592 B	2013/02/27
		EP 1869190 A1	2007/12/26
		EP 1869190 A4	2008/08/20
		JP 04982680 B2	2012/07/25
		JP 2008-531010 A	2008/08/14
		US 2008-0132449 A1	2008/06/05
		WO 2006-091045 A1	2006/08/31
WO 2010-037042 A2	2010/04/01	US 2011-287949 A1	2011/11/24
		WO 2010-037042 A3	2010/05/27