



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0101747
(43) 공개일자 2023년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)

C12N 2710/24121 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0187984

(22) 출원일자 2022년12월28일

심사청구일자 2022년12월28일

(30) 우선권주장

1020210191795 2021년12월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

손우찬

서울특별시 강동구 성안로7길 17, 301호(성내동)

이지영

서울특별시 강동구 성내로6길 14-13, 201호(성내동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이명진

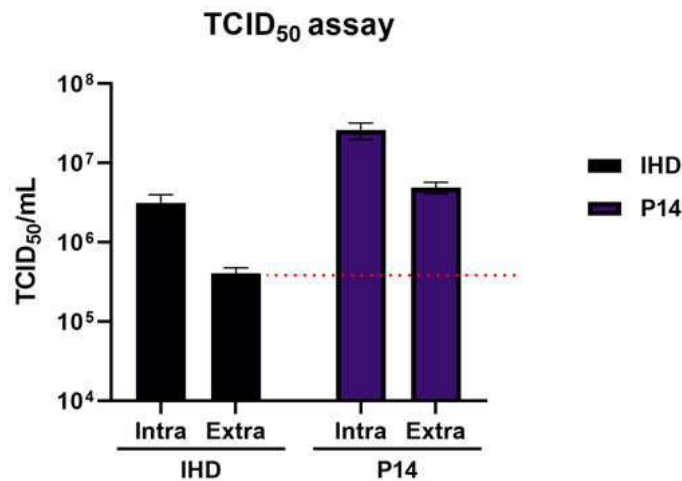
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 외피외 바이러스 생산이 증가한 신규한 백시니아 바이러스 변이주

(57) 요약

본 발명은 외피외 바이러스 생산이 증가한 백시니아 바이러스 등에 관한 것으로, 본 발명의 백시니아 바이러스는 바이러스 전파력과 관련된 외피외 바이러스 생산을 증가시킴으로써 종양 내 바이러스 확산을 향상시켜 백시니아 바이러스의 종양 용해 가능성을 극대화함으로써 종래의 백시니아 바이러스보다 유의적으로 높은 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12N 2710/24132 (2013.01)

(72) 발명자

손호선

대전광역시 유성구 배울2로 42, 509동 1402호(관평동, 대덕테크노밸리5단지아파트)

김태희

서울특별시 강남구 테헤란로64길 9, 708호(대치동, 선릉역대우아이빌)

고수민

서울특별시 양천구 목동동로 100, 1304동 1103호(신정동, 목동신시가리아파트13단지)

이장미

경기도 시흥시 대은로104번길 25, 105동 101호(은행동, 두산아파트)

강지연

강원도 속초시 소평로 162, 311동 302호(조양동)

정다솜

광주광역시 북구 운암산길 48, 104동 1303호(동림동, 동림동 대광로제비앙 아파트)

임희선

서울특별시 광진구 아차산로39길 35, 401호(자양동)

이동현

서울특별시 관악구 남부순환로214길 35, 303호(봉천동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415168212
과제번호	10067737
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	바이오산업기술개발(R&D)
연구과제명	신약 실패율 감소를 위한 사전 예측 평가 플랫폼 구축 및 서비스
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2016.10.01 ~ 2022.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

기탁번호 KCTC 15195BP로 수탁된 외피외 바이러스(extracellular enveloped virus; EEV) 생산이 증가한 것을 특징으로 하는 신규한 백시니아 바이러스.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 백시니아 바이러스는 IHD 스트레인(strain)인 것을 특징으로 하는, 백시니아 바이러스.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 백시니아 바이러스는 C2L, C1L, N1L, N2L, M1L, M2L, K1L, K2L, K3L, K4L, K5L, K6L, K7R, F1L, F2L, F3L, F4L, F5L, A52R, A53R, A55R, 및 A56R로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자가 결실된 것을 특징으로 하는, 백시니아 바이러스.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 백시니아 바이러스는 코멧 플라크(comet plaque)를 형성하는 것을 특징으로 하는, 백시니아 바이러스.

청구항 5

(a) 세포에 백시니아 바이러스를 감염시키고 감염된 세포를 배양하는 단계;

(b) 상기 단계 (a)의 상층액으로 다른 세포를 백시니아 바이러스에 감염시키고 감염된 세포를 배양하며, 상층액을 분리하여 (b) 단계를 반복 수행하는 단계; 및

(c) 상기 단계 (b)의 감염된 세포에서 증식하는 백시니아 바이러스를 분리하는 단계를 포함하는 제1항의 신규한 백시니아 바이러스의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 단계 (b)는 2회 내지 20회 반복하는 것을 특징으로 하는, 신규한 백시니아 바이러스의 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 백시니아 바이러스는 IHD 스트레인(strain)인 것을 특징으로 하는, 신규한 백시니아 바이러스의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 외피의 바이러스 생산성이 증가한 신규한 백시니아 바이러스 변이종에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 백시니아 바이러스는 약 190 kb 선형의 DNA 게놈을 가진 막성 바이러스로, 1980년대 초부터 이상적인 발현 벡터로 쓰이게 되었다. 그 이유는 25 kb 이상의 외부 DNA를 안정하게 삽입이 가능하고, 세포질에서 복제가 이루어지기 때문에 숙주 게놈의 간섭 없이 유전자 발현이 가능하고 비교적 높은 단백질 합성 수준을 보유하고 있으며, 완전한 번역후-변형(post-translational modification)이 일어나기 때문이다. 뿐만 아니라, 백시니아 바이러스의 이러한 유용성으로 인하여 유전자 재조합 백신 또는 항암바이러스로 사용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0004] 백시니아 바이러스는 4가지 형태의 입자를 통해 세포에 감염 및 전파되며 각각의 형태가 가진 특징을 바탕으로 감염에서 전파까지 다른 역할을 맡고 있다. 4가지 바이러스 입자의 형태는 세포내 성숙 바이러스(Intracellular Mature virus ; IMV), 세포내 피막성 바이러스(Intracellular enveloped virus ; IEV), 세포성 바이러스(Cell associated virus ; CEV), 외피의 바이러스(Extracellular enveloped virus ; EEV)이다. 백시니아 바이러스는 세포에 감염된 후 세포질에서 복제 및 조립되어 한 겹의 막으로 둘러싸인 세포 내 성숙 바이러스(IMV)를 생성한다. 다수의 세포내 성숙 바이러스는 세포 용해를 통해 세포 밖으로 전파되지만, 일부 세포내 성숙 바이러스는 소포체 혹은 골지체로부터 유래한 성분으로 포장되어 두 겹의 막을 가진 세포내 피막성 바이러스(IEV)를 형성한다. 세포내 피막성 바이러스(IEV)가 미세소관에 의해 세포표면으로 이동한 뒤, 세포내 피막성 바이러스의 바깥막과 세포막이 융합하여 세포성 바이러스(CEV)를 형성하며, 이 세포성 바이러스가 액틴 중합화(Polymerization of actin)에 의해 세포 표면에서 떨어져 배양액으로 분비된 것이 외피의 바이러스(EEV)이다. 위의 4가지 형태 중 세포성 바이러스(CEV)는 세포 간 감염에서 중요한 역할을 담당하며, 외피의 바이러스(EEV)는 바이러스의 전신 전파에 중요한 역할을 맡고 있다.

[0005] 한편, 보통 백시니아 바이러스의 외피의 바이러스(EEV)는 생성되는 전체 바이러스 중 1~2%로 구성비가 낮지만, 전신 전파 담당, 보체 매개 면역시스템에 대한 저항성을 가진다. 또한 외피의 바이러스는 세포내 성숙 바이러스와 비교 시, 상대적으로 중화항체에 대한 저항성을 가지는 등 백시니아 바이러스 자체의 생존 및 확산에 생물학적으로 중요한 역할을 담당하고 있다. 따라서, 백시니아 바이러스의 외피의 바이러스의 생산과 백시니아 바이러스가 세포에서 세포로 퍼지는데 중요한 것으로 간주되는 comet plaque의 형성 능력은 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제 10-1179166호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 발명자들은 바이러스의 종양 내 전파력과 관계있는 외피의 바이러스(EEV) 생산성이 우수하면서 항암 바이러스 벡터로서 사용하기에도 유리하도록 감염력이 유지되는 백시니아 바이러스를 확보하고자 예의 연구한 결과, 외피의 바이러스 생산과 관련 있는 comet plaque를 형성하지 않던 IHD strain (ATCC VR-156)의 상층액 내 외피의 바이러스만 세포에 감염시키는 방식으로 계대(passage)를 반복함으로써 comet plaque를 형성하는 백시니아 바이러스 변이주를 분리하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 신규한 백시니아 바이러스 변이주를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 신규한 백시니아 바이러스의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 기탁번호 KCTC 15195BP로 수탁된 외피외 바이러스(extracellular enveloped virus; EEV) 생산이 증가한 것을 특징으로 하는 신규한 백시니아 바이러스를 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 백시니아 바이러스는 IHD 스트레인(strain)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 백시니아 바이러스는 C2L, C1L, N1L, N2L, M1L, M2L, K1L, K2L, K3L, K4L, K5L, K6L, K7R, F1L, F2L, F3L, F4L, F5L, A52R, A53R, A55R, 및 A56R로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자가 결실된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 백시니아 바이러스는 코멧 플라크(comet plaque)를 형성할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 또한, 본 발명은 (a) 세포에 백시니아 바이러스를 감염시키고 감염된 세포를 배양하는 단계;

[0019] (b) 상기 단계 (a)의 상층액으로 다른 세포를 백시니아 바이러스에 감염시키고 감염된 세포를 배양하며, 상층액을 분리하여 (b) 단계를 반복 수행하는 단계; 및

[0020] (c) 상기 단계 (b)의 감염된 세포에서 증식하는 백시니아 바이러스를 분리하는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 신규한 백시니아 바이러스의 제조방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단계 (b)는 2회 내지 20회 반복할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 백시니아 바이러스는 IHD 스트레인(strain)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 백시니아 바이러스는 바이러스 전파력과 관련된 외피외 바이러스 생산성이 증가되어 종양 내 바이러스 확산을 향상시킬 수 있어 백시니아 바이러스의 종양 용해 가능성을 극대화함으로써 종래의 백시니아 바이러스보다 유의적으로 높은 항암 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 신규한 백시니아 바이러스를 분리하기 위하여 계대 배양한 뒤 각 계대별로 플라크 분석(Plaque assay)을 실시한 결과를 나타낸 도면이다.

도 2 내지 도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른 백시니아 바이러스의 유전체 변이를 검증하기 위하여 야생형 백시니아 바이러스와 차세대염기서열분석을 실시한 결과를 나타낸 것으로, 도 2 내지 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른 백시니아 바이러스 분리주의 left arm 영역의 차세대염기서열분석 결과, 도 4 내지 도 5b는 A52R 부터 A56R 유전자 영역의 차세대염기서열분석 결과를 나타낸 도면이다. 도 3a 및 도 3b는 전체로서 하나의 도면을 나

타내며 하나의 도면에서 도 3a는 우측, 도 3b는 좌측에 위치한다. 도 5a 및 도 5b는 전체로서 하나의 도면을 나타내며, 하나의 도면에서 도 5a는 좌측, 도 5b는 우측에 위치한다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 백시니아 바이러스와 야생형 백시니아 바이러스의 역가를 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명의 발명자들은 바이러스의 종양 내 전파력과 관계있는 외피외 바이러스(EEV) 생산성이 우수하면서 항암 바이러스 벡터로서 사용하기에도 유리하도록 감염력이 유지되는 백시니아 바이러스를 확보하고자 예의 연구한 결과, 외피외 바이러스 생산과 관련 있는 comet plaque를 형성하지 않던 IHD strain (ATCC VR-156)의 상층액 내 외피외 바이러스만 세포에 감염시키는 방식으로 계대(passage)를 반복함으로써 comet plaque를 형성하는 백시니아 바이러스 변이주를 분리하여 본 발명을 완성하였다.
- [0030] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0032] 본 발명은 기탁번호 KCTC 15195BP로 수탁된 외피외 바이러스(extracellular enveloped virus; EEV) 생산이 증가한 것을 특징으로 하는 신규한 백시니아 바이러스 변이주를 제공한다.
- [0033] 본 발명에 따른 신규한 백시니아 바이러스는 하기와 같은 단계를 통해 획득될 수 있다:
- [0034] 야생형 백시니아 바이러스(ATCC VR-156)를 세포에 감염시키기 전 6-웰 플레이트에 Vero 세포를 웰당 8×10^5 개씩 깔고 overnight 정치 배양한 뒤, 배지를 모두 제거하고 야생형 백시니아 바이러스를 $10^0 \sim 10^{-5}$ 로 배지에 희석하여 1 mL씩 분주한다. 48시간 배양 후 각 웰의 배지를 모두 샘플링하여 3600 rpm, 5분 원심분리하여 상층액만 분리하여 다음 계대에 감염시킬 바이러스로 사용하고, 이러한 계대 과정을 2-20회 반복하여 comet plaque가 형성된 백시니아 바이러스를 찾아낸 후 이를 분리함으로써 본 발명에 따른 백시니아 바이러스를 획득할 수 있다.
- [0035] 상기 과정을 통해 획득한 본 발명에 따른 백시니아 바이러스는 모 바이러스(야생형 IHD strain 백시니아 바이러스)와는 유전정보가 상이한 신규한 바이러스임을 확인하였으며, 이를 KCTC (Korean Collection for Type Culture)에 2022년 11월 15일자로 수탁하였다 (기탁번호 : KCTC 15195B).
- [0036] 본 발명에서 “백시니아 바이러스”란 약 190kbp의 선형 이중 나선 DNA 유전자를 가지고 있으며, 약 200개 유전자를 코딩하는 크고, 복잡한 외피성 바이러스이다. 천연두를 근절시킨 백신으로서의 백시니아 바이러스의 역할은 주지되어 있다. 천연두의 근절 후, 과학자들은 생물학적 조직 내로 유전자를 전달하기 위한 도구로서의 백시니아 바이러스의 사용을 연구하여 왔다 (유전자 치료 및 유전 공학). 백시니아 바이러스는 DNA 바이러스 중에서도 특이한데, 이는 단지 숙주 세포의 세포질에서만 복제하기 때문이다. 따라서 바이러스 DNA 복제를 위해 필요한 바이러스 효소 및 단백질을 코딩하기 위해서는 큰 게놈이 요구된다. 복제 과정 동안, 백시니아는 이들의 외막에서와는 상이한 몇몇 감염 형태인 세포내 성숙 바이러스(Intracellular Mature virus; IMV), 세포내 피막성 바이러스(Intracellular enveloped virus; IEV), 세포성 바이러스(Cell associated virus; CEV) 및 외피외 바이러스(Extracellular enveloped virus; EEV)를 생산한다. IMV는 가장 풍부한 감염 형태이며 접해있는 이웃세포의 감염에 관여하는 것으로 생각된다. 한편, CEV는 세포와 세포의 분포에 일정한 역할을 하는 것으로 생각되며, EEV는 숙주 기관 내의 긴 범위 전파에 중요한 것으로 생각된다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 백시니아 바이러스는 종(strain)은 웨스턴 리저브(Western Reserve), 코펜하겐(Copenhagen), 와이에쓰(Wyeth), IHD일 수 있으나, 바람직하게는 IHD 스트레인(strain)일 수 있다. 상기 백시니아 바이러스는 자연형 또는 유전적으로 변형된 것일 수도 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 바람직하게는 ATCC사의 VR-156 IHD 스트레인일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 백시니아 바이러스는 C2L, C1L, N1L, N2L, M1L, M2L, K1L, K2L, K3L, K4L, K5L, K6L, K7R, F1L, F2L, F3L, F4L, F5L, A52R, A53R, A55R, 및 A56R로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자가 결실될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 백시니아 바이러스는 상기 C2L, C1L, N1L, N2L, M1L, M2L, K1L, K2L, K3L, K4L, K5L, K6L, K7R, F1L, F2L, F3L, F4L, 및 F5L 유전자가 포함된 left arm 영역 약 15kb가 결실된 것을

특징으로 할 수 있다. 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 백시니아 바이러스는 A52R부터 A56R 유전자 위치까지 약 3.7kb 정도 길이의 A52R, A53R, A55R, A56R 유전자 결실이 발생한 것을 특징으로 할 수 있다.

[0040] 본 발명에 있어서, 상기 백시니아 바이러스는 코멧 플라크(comet plaque)를 형성할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0041] 본 발명에서 “코멧 플라크(comet plaque)”란 혜성 모양의 플라크를 의미하는 것으로, 백시니아 바이러스의 코멧 플라크 형성은 전신 전파에 중요한 역할을 담당하는 외피외 바이러스의 형성과 전파를 나타내는 것일 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명은 (a) 세포에 백시니아 바이러스를 감염시키고 감염된 세포를 배양하는 단계;

[0044] (b) 상기 단계 (a)의 상층액으로 다른 세포를 백시니아 바이러스에 감염시키고 감염된 세포를 배양하며, 상층액을 분리하여 (b) 단계를 반복 수행하는 단계; 및

[0045] (c) 상기 단계 (b)의 감염된 세포에서 증식하는 백시니아 바이러스를 분리하는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 신규한 백시니아 바이러스의 제조방법을 제공하며, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 상층액에는 백시니아 바이러스의 외피외 바이러스가 포함되어 있어, 이에 의해 세포가 감염되는 것을 특징으로 한다.

[0046] 구체적으로, 상기 (b) 단계는 상기 단계 (a)의 상층액으로 상기 단계 (a)의 세포(제1세포)와 구별되는 다른 세포(제2세포)를 백시니아 바이러스에 감염시키고, 배양한 후, 제2세포의 상층액을 분리한 뒤, 제2세포에서 분리한 상층액을 이용하여 또 다른 세포(제3세포)를 백시니아 바이러스에 감염시키고 배양한 후, 제3세포의 상층액을 분리한 뒤, 제3세포에서 분리한 상층액을 이용하여 또 다른 세포(제4세포)를 감염시키고 배양하는 것과 같이 일련의 과정을 반복 수행하는 것을 의미한다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 백시니아 바이러스의 제조방법에서 사용하는 세포는 동일한 종류 또는 상이한 종류의 세포를 사용할 수 있다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (b)는 2회 내지 20회, 2회 내지 18회, 2회 내지 16회, 2회 내지 14회, 2회 내지 12회, 2회 내지 10회, 2회 내지 8회, 2회 내지 6회, 2회 내지 4회, 2회 내지 3회, 3회 내지 18회, 3회 내지 16회, 3회 내지 14회, 3회 내지 12회, 3회 내지 10회, 3회 내지 8회, 3회 내지 6회, 3회 내지 4회, 4회 내지 5회, 5회 내지 9회, 9회 내지 15회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 11회, 12회, 13회, 14회, 또는 15회 반복할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단계 (b)의 백시니아 바이러스에 감염된 세포에서 코멧 플라크가 형성된다면 상기 단계 (b)의 반복 수행 횟수에는 제한이 없다.

[0049] 본 발명에 있어서, 상기 백시니아 바이러스는 IHD 스트레인(strain)일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 바람직하게는 ATCC사의 VR-156 IHD 스트레인일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0052] 상기 백시니아 바이러스는 전신 전파에 중요한 역할을 하는 외피외 바이러스(EEV) 생산이 향상된 것을 특징으로 하는 바, 백시니아 바이러스의 종양 용해 가능성을 극대화시켜 항암 치료의 효율을 증진시킬 수 있으므로 본 발명에 따른 신규한 백시니아 바이러스는 암과 같은 과증식성 질병의 치료 및 예방에 사용될 수 있다. 치료에 고려되는 예로는 담낭암, 대장암, 췌장암, 백혈병, 난소암, 위암, 폐암, 유방암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 피부암, 결장암, 자궁경부암, 두경부암, 전립선암, 신장암, 골암, 고환암, 위장관암, 림프종, 폐에서의 전암 병변, 흑색종, 육종, 방광암 및 임의의 다른 암 또는 치료될 수 있는 종양이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 본 발명에서 약학적 조성물의 유효량이란 종양의 성장 또는 이의 크기를 서서히 억제 또는 감소시키는 것뿐 아니라, 암 세포의 종양 살상 또는 파괴 또는 용해를 유도하기에 충분한 것으로서 정의되며 임의의 경우에는 종양의 근절을 포함한다.

[0054] 본 발명의 조성물의 투여 경로는 병변의 위치 및 성질에 따라 다양할 것이며, 예를 들어, 피 내, 경피(transdermal), 비경구, 정맥 내, 근육 내, 비 내, 피하, 구역(예를 들어, 종양에의 근접 구역, 특히 종양의

혈관 또는 인접한 혈관을 포함), 기관 내, 복막 내, 동맥 내, 방광 내, 종양 내, 흡입, 관류, 세척, 및 경구 투여 및 제제를 포함한다.

[0055] 종양 내 주입 또는 종양 혈관으로의 직접 주입은 특히 분리된, 접근가능한 고체 종양에 대해 고려된다. 국소적이거나, 구역적이거나 또는 전신적 투여 또한 적절할 수 있다. 4 cm 초과 종양에 있어, 투여되는 부피는 약 4 내지 10 ml일 것이며, 4 cm 미만의 종양에 있어서는, 약 1 내지 3 ml의 부피가 사용될 것이다. 단일 투여량으로 전달되는 다중 주입은 약 0.1 내지 약 0.5 ml 부피를 포함한다. 바이러스 입자는 약 1 cm 간격으로 떨어져 있는 종양의 다중 주입 투여를 통해 유리하게 접촉될 수 있다. 수술적 개입의 경우에, 본 발명은 수술 전에 사용되어 수술 불가능한 종양 대상의 절제를 가능하게 한다. 예를 들어, 종양 또는 종양 혈관 내로 카테터를 삽입함으로써 계속적 투여 또한 적절한 곳에 적용될 수 있다. 이러한 계속적 관류는 치료 시작 후 약 1 내지 2 시간에서부터, 약 2 내지 6 시간까지, 약 6 내지 12 시간까지, 약 12 내지 24 시간까지, 약 1 내지 2 일까지, 약 1 내지 2 주까지, 또는 더 긴 시간 동안 행해질 수 있다. 일반적으로, 계속적 관류를 통한 조성물의 투여량은 관류가 일어나는 동안의 시간에 걸쳐 조절되는, 단일 또는 다중 주입을 통해 주어지는 것과 균등할 것이다. 또한 특히 흑색종 및 육종의 치료에서의 본 발명의 조성물을 투여하는데 사지 관류를 사용할 수 있음을 고려한다.

[0057] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

[0060] 실시예 1. 세포 배양

[0061] Vero (African green monkey kidney epithelial cell line)은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 세포는 2% FBS (fetal bovine serum)와 1% AA (antibiotic-antimycotic)을 함유한 DMEM 배지를 이용하여 유지하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂, 습윤하 조건에서 배양하였다.

[0063] 실시예 2. 바이러스 확보

[0064] 본 실험에서 사용한 Vaccinia virus(백시니아 바이러스), IHD strain은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 바이러스는 Vero 세포를 숙주세포로 이용하여 증식시켰다. 사용한 바이러스는 Biosafety level 2에 해당하는 감염성 물질로, 적절한 안전설비가 확보된 시설에서 실험을 수행하였다. 구매한 바이러스를 75T 플라스트에 깔은 2×10⁶개 Vero 세포에 감염시키고 48시간 후에 상층액을 샘플링하고 원심분리하여 세포 부스러기를 제거한 후 사용하였다.

[0066] 실시예 3. 외피의 바이러스(extracellular enveloped virus; EEV) 생산이 증가한 백시니아 바이러스 분리

[0067] 세포에 감염시키기 전 6-웰 플레이트에 Vero 세포를 웰당 8×10⁵개씩 깔고 overnight 정치 배양하였다. 배지를 모두 제거하고 상기 실시예 2에서 준비한 백시니아 바이러스를 10⁰ ~ 10⁻⁵로 배지에 희석하여 1 mL씩 분주하였다. 48시간 배양 후 각 웰의 배지를 모두 샘플링하여 3600 rpm, 5분 원심분리하여 상층액만 분리하여 다음 계대에 감염시킬 바이러스로 사용하였다. 이러한 계대 과정을 14회 반복하였다. 바이러스 감염 48시간 후 배지를 샘플링하고 난 세포는 Crystal violet으로 염색하여 바이러스 감염에 의해 발생한 플라크(plaque)를 확인하였다. 웰 안의 세포를 모두 죽이지 않고 계수 가능한 정도의 플라크를 보이는 웰에서 얻은 배지를 다음 계대에 감염시킬 바이러스로 사용하였다.

[0069] 실시예 4. 플라크 분석(Plaque assay)

[0070] 계대 과정 중 이전 차수에서 배지를 샘플링하고 난 세포는 Crystal violet 용액으로 염색하여 바이러스 감염에 의해 발생한 플라크(plaque)를 확인하였다. Crystal violet 염색제는 증류수에 0.15% crystal violet, 8% formaldehyde, 5% ethanol로 조제하여 사용하였다. 배지를 제거한 세포에 crystal violet 용액을 1 mL 분주하

고 5분간 상온에서 대기하였다. 염색제를 흡인하여 제거한 후 플레이트를 건조시켜 플라크의 수와 모양을 확인하였다.

[0071] 도 1에 나타난 바와 같이, 각 계대별 바이러스 플라크의 모양을 확인한 결과, 야생형(original) IHD strain은 원형의 작은 플라크를 형성하는 반면 P3부터 혜성 모양의 comet plaque가 관찰되었으며, P3 이후의 모든 계대에서 혜성 모양의 플라크가 관찰되는 것을 확인할 수 있었다.

[0073] 실시예 5. 차세대염기서열분석(Next-Generation Sequencing; NGS)

[0074] 야생형 백시니아 바이러스 IHD 균주와 14회 계대를 거친 바이러스를 Vero 세포에 감염시킨 후 Agarose overlay 방법을 통해 단일 바이러스 플라크를 분리하였다. 분리한 바이러스 플라크를 175T 플라스크 10개에 대량으로 배양한 다음 초고속원심기를 이용하여 농축하였다. 농축된 고농도의 바이러스 샘플의 비특이적인 단백질 성분을 제거하기 위해 PK digestion을 진행한 후, Phenol/Chloroform 방식으로 바이러스 gDNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 Macrogen Inc. (Korea)의 차세대염기서열분석(NGS) 기법을 이용한 Whole Genome Sequencing 서비스를 통해 야생형 바이러스와 분리한 바이러스 변이주의 유전체 변이를 검증하였다.

[0075] 그 결과, 도 2 내지 3b에 나타난 바와 같이, left arm의 약 15kb가 삭제된 것을 확인할 수 있었으며, 유전자에서 삭제된 유전자 영역은 C2L, C1L, N1L, N2L, M1L, M2L, K1L, K2L, K3L, K4L, K5L, K6L, K7R, F1L, F2L, F3L, F4L, 및 F5L에 해당하였다.

[0076] 또한, 도 4 내지 5b에 나타난 바와 같이, 백시니아 바이러스의 EEV를 세포에서 반복 계대할 경우, 야생형 IHD strain 바이러스와 다르게 A52R부터 A56R 유전자 위치에 약 3.7kb 정도 길이의 유전자 deletion이 발생한 것을 확인할 수 있었다. 유전자에서 삭제된 유전자 영역은 A52R, A53R, A55R, A56R와 같으며, 삭제된 유전자 영역의 기능은 표 1에 나타내었다.

표 1

Gene	Function	Localization in cell
A52R	Bcl-2-like protein which targets host toll-like receptor signaling complexes to suppress innate immune response	cytoplasmic
A53R	CrmC, vTNFR, Truncated secreted TNF-receptor-like protein	secreted
A55R	Kelch repeat and BTB domain-containing protein 1	cytoplasmic
A56R	Hemagglutinin(HA)	transmembrane

[0077]

[0079] 실시예 6. TCID₅₀ (Median Tissue Culture Infectious Dose) assay

[0080] 8×10^5 개의 Vero 세포를 6-웰 플레이트에 분주하여 37 °C, 5% CO₂, 습윤하 조건에서 밤새 배양한 후, 세포에 야생형 IHD 바이러스 및 계대를 진행한 바이러스(P14)를 10 MOI로 감염시켜 37°C 인큐베이터에서 30분간 배양하였다. 바이러스 용액을 흡인하여 제거하고 PBS로 3회 세척 후 1 mL의 새 배지를 공급하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 상층액만 얻어 불순물을 제거한 것을 세포 외 바이러스(Extra) 샘플로 이용하였다. 모든 배지를 제거한 웰에 1 mL의 새 배지를 넣은 후 cell scraper로 세포를 플레이트 바닥에서 탈락시킨 후 Freezing & Thawing을 3회 진행한 샘플을 세포 내 바이러스(Intra) 샘플로 이용하였다.

[0081] 바이러스 역가는 감염성 분석 중 하나인 TCID₅₀ 분석으로 결정하였다. 4.2×10^3 개의 Vero 세포를 성장배지에 현탁하여 96-웰 플레이트의 각 웰에 분주하고 37°C, 5% CO₂, 습윤하 조건에서 밤새 배양하였다. 바이러스 샘플 원본의 1:10으로 예를 들어, 바이러스 원본의 10^{-2} 에서 10^{-8} 까지 일련의 희석을 준비하였으며, 모든 바이러스 샘플은 각 웰에 50 μ l의 바이러스를 옮기기 직전까지 강하게 vortexing 하였다. 세포 플레이트는 37°C, CO₂ 인큐베

이터에서 4일간 배양한 후 CPE (Cytopathic effect)를 관찰하였다. CPE가 3개의 개별 판독값에 대해 희석당 동일하게 나타날 때 endpoint를 결정하였으며, Spearman-Kärber 방법 (Ramakrishnan, 2016)에 기초하여 역가를 계산하였다. EEV의 비율(%)은 Intra 및 extra 바이러스 역가의 합에 대한 extra 바이러스의 역가를 백분율로 계산하였다.

[0082] 역가 측정 결과, 표 2에 나타난 바와 같이, 계대를 진행한 바이러스(P14)의 외피외 바이러스 비율이 야생형 IHD 바이러스보다 높게 나타났다.

표 2

	IHD	P14
Intra (TCID ₅₀ /mL)	3.14.E+06	2.57.E+07
Extra (TCID ₅₀ /mL)	4.05.E+05	4.87.E+06
EEV(%) in total	11.44	15.92

[0083]

[0085] 나아가, 도 6에 나타난 바와 같이, 계대를 진행한 바이러스의 세포 내 및 세포 외 바이러스 역가가 야생형 IHD 바이러스보다 약 10배 증가하여 전체적으로 외피외 바이러스 생산성이 향상된 것을 확인할 수 있었다.

[0087] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

수탁번호

[0089]

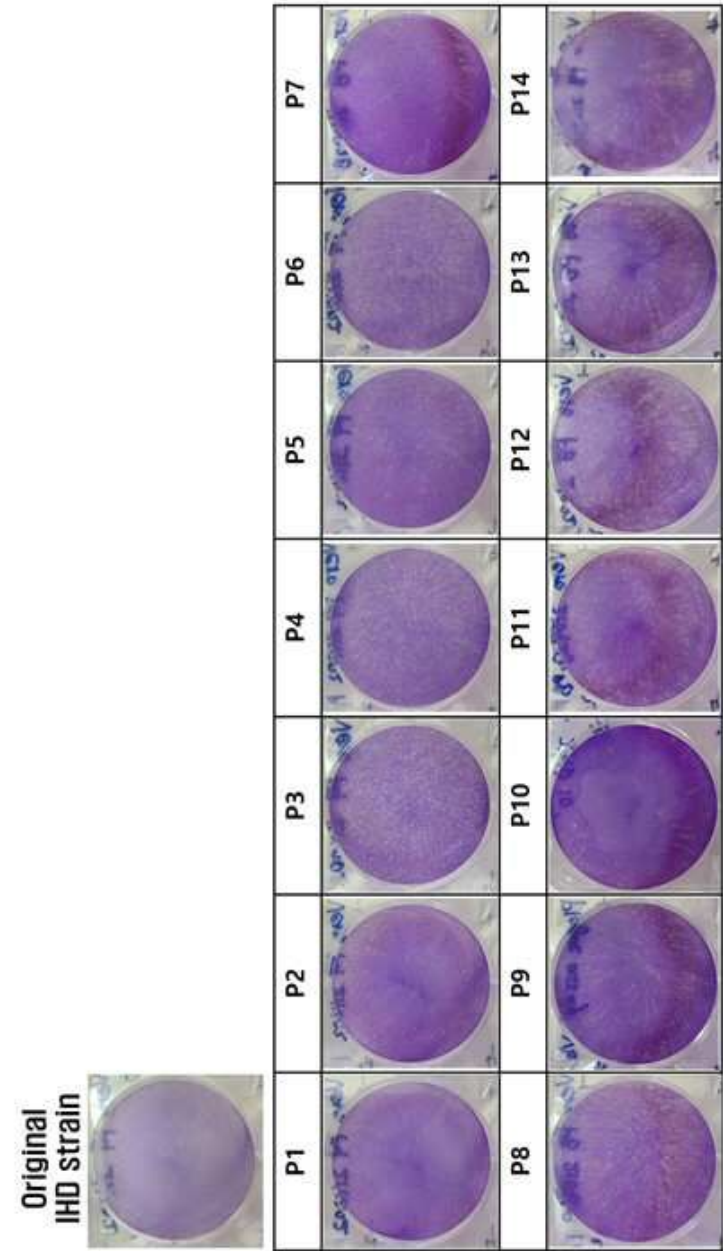
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터

수탁번호 : KCTC15195BP

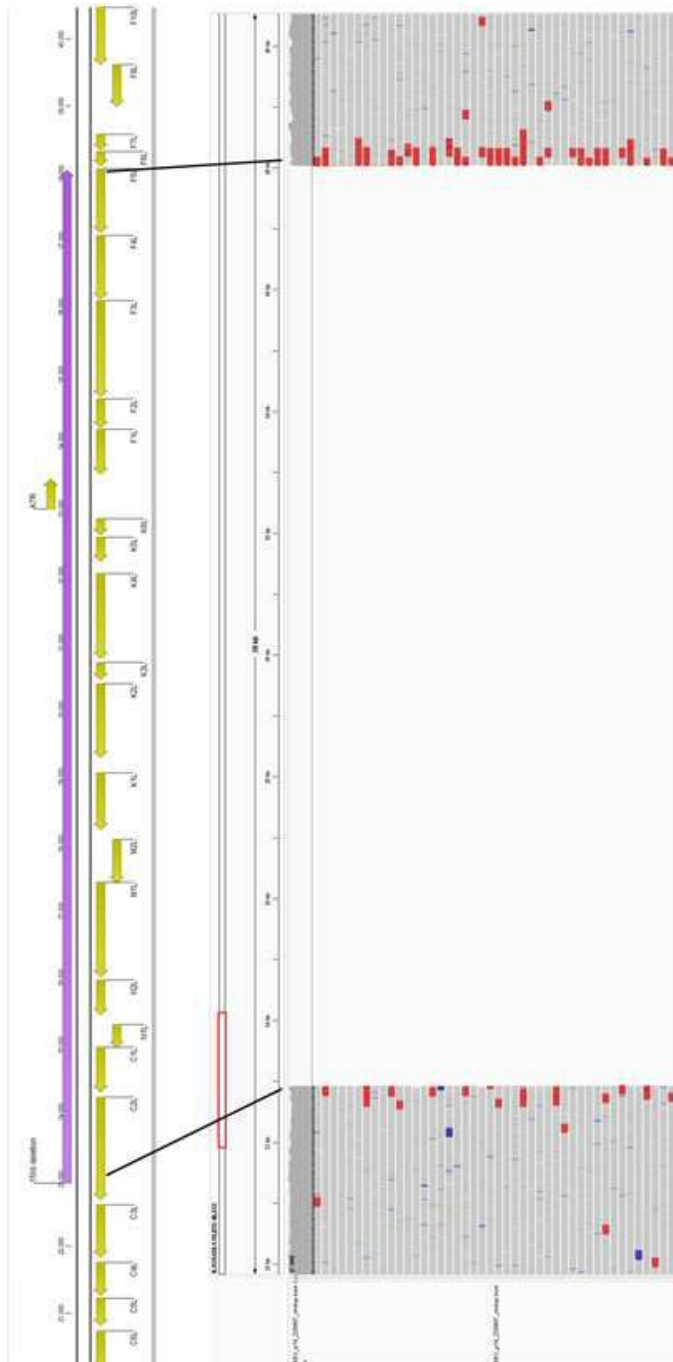
수탁일자 : 20221115

도면

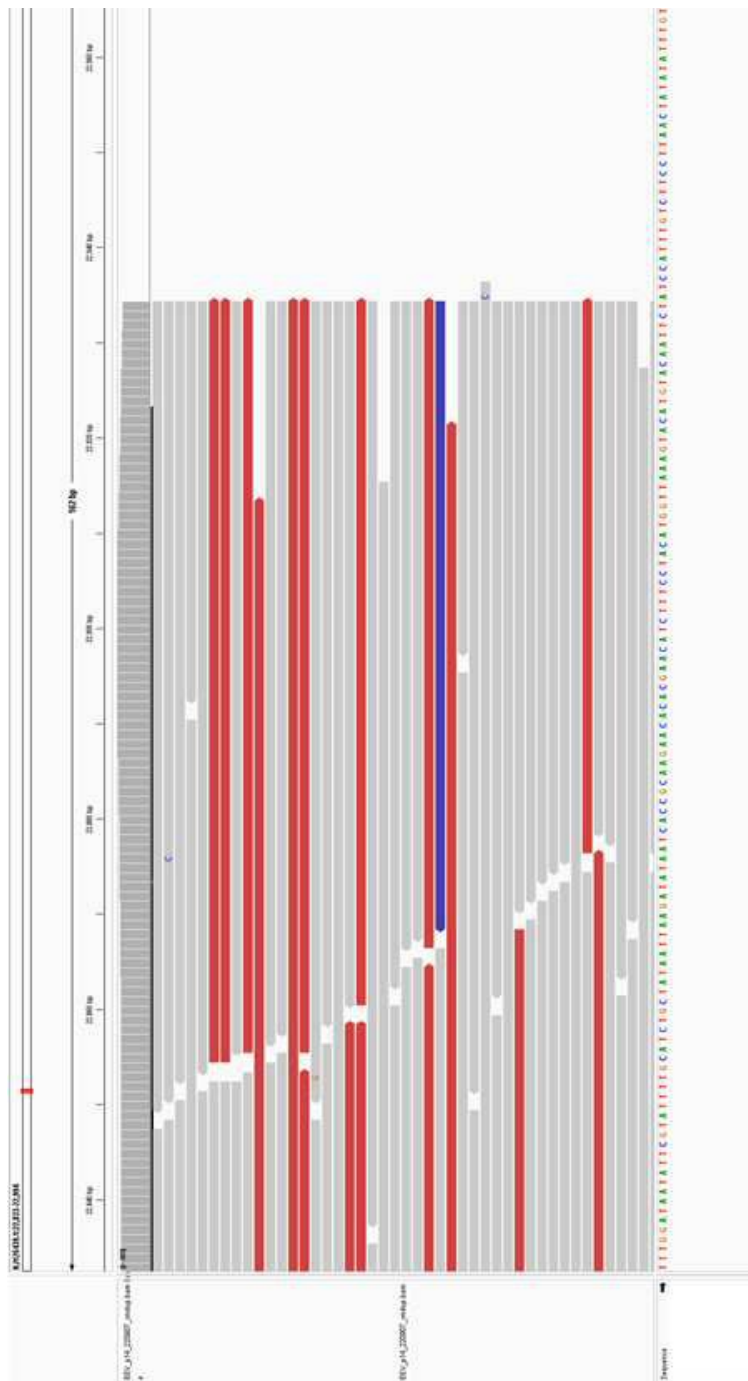
도면1



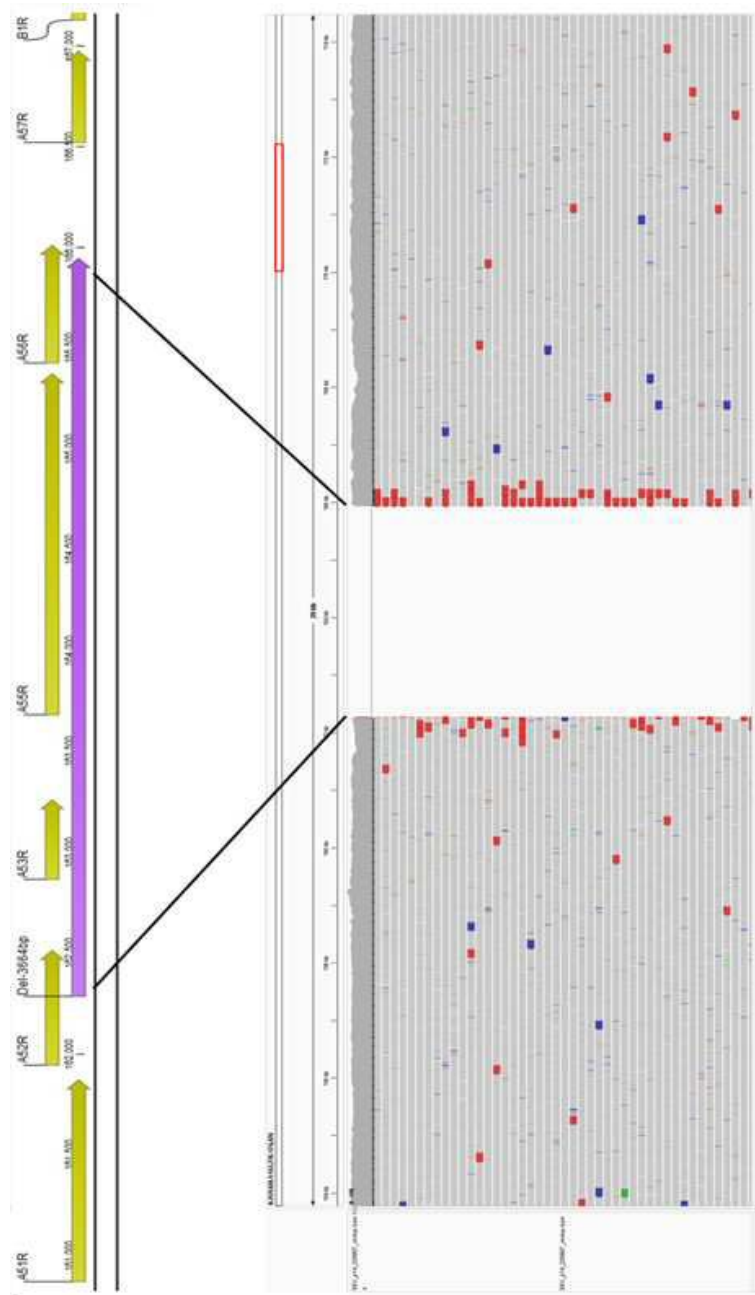
도면2



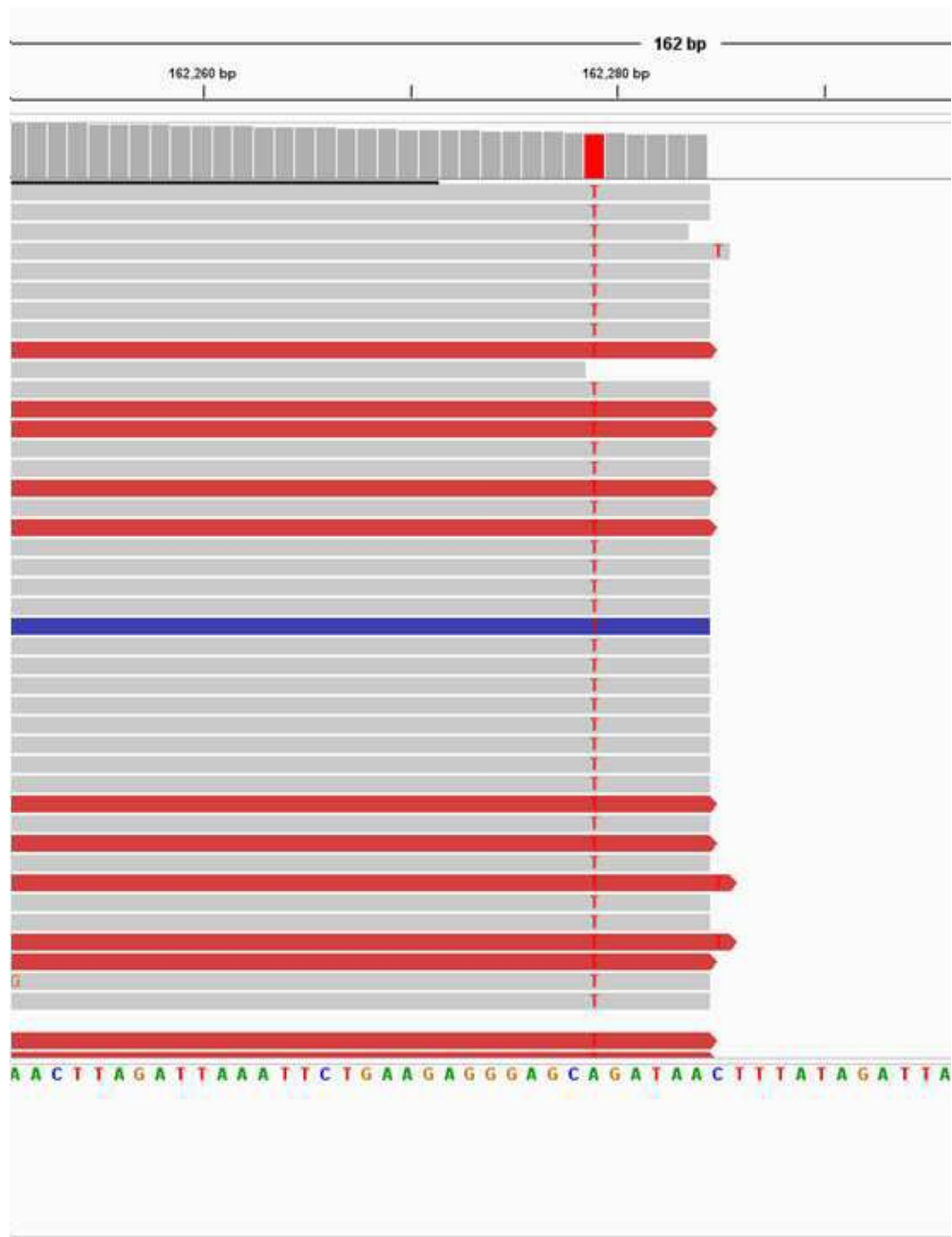
도면 3b



도면4



도면5a



도면5b



도면6

