



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0086610
(43) 공개일자 2023년06월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) A61K 35/768 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/54 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 35/768 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-0169132
(22) 출원일자 2022년12월06일
심사청구일자 2022년12월06일
- (30) 우선권주장
1020210174188 2021년12월07일 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)
김태희
서울특별시 강남구 테헤란로64길 9, 708호(대치동, 선릉역대우아이빌)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
이명진

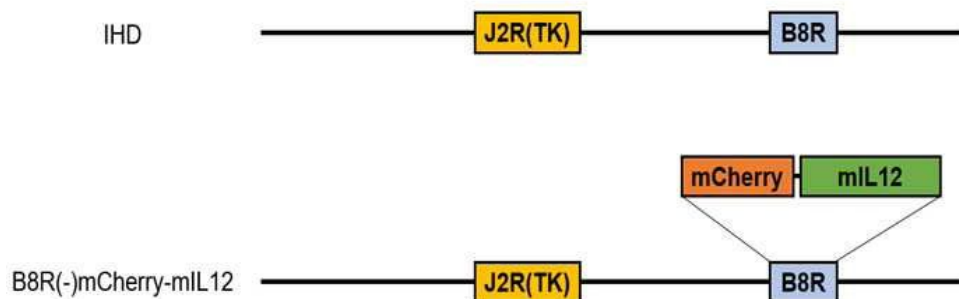
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 IL-12를 발현하는 재조합 백시니아 바이러스 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 인터루킨-12 유전자를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스 및 이의 용도에 관한 것으로, B8R 유전자를 삭제하고, 삭제된 B8R 자리에 인터루킨-12 유전자를 삽입시킨 재조합 백시니아 바이러스는 IFN- γ 활성 및 IL-12 활성이 증가함으로써 면역에서 상승적인(synergistic) 효과를 나타내어 항-종양 면역성 (Anti-tumor immunity) 을 증진시킬 수 있으므로 암의 예방, 개선, 또는 치료에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/5434 (2013.01)

C12N 2710/24121 (2013.01)

C12N 2710/24132 (2013.01)

(72) 발명자

이지영

서울특별시 강동구 성내로6길 14-13, 201호(성내동)

손호선

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

고수민

서울특별시 양천구 목동동로 100, 1304동 1103호(신정동, 목동신시가지아파트13단지)

이장미

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

강지연

강원도 속초시 소평로 162, 311동 302(조양동)

정다솜

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

임희선

서울특별시 광진구 아차산로39길 35, 401호(자양동)

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

인터루킨-12 (interleukin-12; IL-12) 유전자를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스로서,

상기 인터루킨-12 유전자는 백시니아 바이러스 유전자 B8R 영역에 삽입되는 것을 특징으로 하는, 재조합 백시니아 바이러스.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인터루킨-12 (interleukin-12; IL-12) 유전자는 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 재조합 백시니아 바이러스.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 백시니아 바이러스 유전자 B8R은 서열번호 11의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 재조합 백시니아 바이러스

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 재조합 백시니아 바이러스는 백시니아 바이러스 유전자 B8R 영역이 결실된 것을 특징으로 하는, 재조합 백시니아 바이러스.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 백시니아 바이러스는 웨스턴 리저브(Western Reserve, WR), NYVAC(New York Vaccinia Virus), Wyeth(The New York City Board of Health; NYCBOH), LC16m8, 리스터(Lister), 코펜하겐(Copenhagen), 티안탄(Tian Tan), USSR, 타쉬켄트(TashKent), 에반스(Evans), 및 IHD (International Health Division) 백시니아 바이러스 종(strain)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 재조합 백시니아 바이러스.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 재조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 암은 편평상피세포암, 신경교종, 폐암, 폐의 선암, 복막암, 피부암, 안암, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 골육종, 연조직 육종, 요도암, 혈액암, 간암, 위장암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 방광암, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막암, 자궁암, 침샘암, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 두경부암, 구강암, 설암, 뇌암, 악성 흑색종, 및 기질 종양으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 조성물은 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특성을 만족하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물:

- (a) 종양 내 CD3+ T 세포 수준을 증가시킴;
- (b) 종양 내 CD4+ T 세포 수준을 증가시킴; 및
- (c) 종양 내 CD8+ T 세포 수준을 증가시킴.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 조성물은 항-종양 면역성 (Anti-tumor immunity)을 증진시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 제조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 항종양 면역성 증진용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 조성물은 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특성을 만족하는 것을 특징으로 하는, 항종양 면역성 증진용 조성물:

- (a) 종양 내 CD3+ T 세포 수준을 증가시킴;
- (b) 종양 내 CD4+ T 세포 수준을 증가시킴; 및
- (c) 종양 내 CD8+ T 세포 수준을 증가시킴.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 제조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 키트.

청구항 13

인터루킨-12 (interleukin-12; IL-12) 유전자를 전달백터에 삽입하는 단계; 및

상기 전달백터를 백시니아 바이러스에 삽입하는 단계를 포함하는, 제1항의 제조합 백시니아 바이러스의 제조방

법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 재조합 바이러스를 이용한 암 치료제에 관한 것으로, 구체적으로 인터루킨-12 (interleukin-12; IL-12) 유전자를 포함하며 B8R 유전자가 결실된 재조합 백시니아 바이러스 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 최근 제약산업에서 주목받고 있는 치료법 중 하나인 종양용해성 바이러스 (Oncolytic virus)는 정상세포에서는 증식하지 않으며, 암세포 특이적으로 증식하여 암세포를 파괴하는 특징을 가지고 있다. 종양용해성 바이러스의 4가지 주요기전은 직접감염으로 인한 종양용해, 항-종양 면역 세포 활성화에 기여하는 종양 관련 항원 (TAA) 방출, 재조합 바이러스에 유전적으로 삽입된 외래 유전자의 발현에 의한 숙주 면역 촉진, 그리고 B세포 및 T세포 면역 기억으로 인한 암 재발 방지 기전으로, 직접적으로 암세포를 공격하는 것 외에도 인체의 적응면역반응을 촉진시키는 기능 (Immune stimulation)과 더불어 종양 혈관내피세포를 특이적으로 감염시켜 파괴하여 신생혈관 생성을 억제하는 기능이 알려져 있다.
- [0004] 1904년 Dock G가 42세 여성 골수성 백혈병 환자가 인플루엔자로 추정되는 감기 바이러스 감염 후 보인 종양 관해를 보고한 것을 시작으로, 수두바이러스(chickenpox), 인플루엔자 바이러스 등의 바이러스에서 항암 연구가 진행, 보고되고 있으며, 현재 많은 종양용해성 바이러스의 연구와 임상시험이 진행되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2000-0023562호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자들은 안전하며 항암 효능이 우수한 종양용해성 바이러스를 발굴하기 위하여 예의 연구한 결과, 백시니아 바이러스의 B8R 유전자를 인터루킨-12 유전자로 치환할 경우, IFN- γ 활성 및 IL-12 활성 증가에 따른 면역에서의 상승적인(synergistic) 효과로 항-종양 면역이 현저하게 증가하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 인터루킨-12 (interleukin-12; IL-12) 유전자를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스로서, 상기 인터루킨-12 유전자는 백시니아 바이러스 유전자 B8R 영역에 삽입되는 것을 특징으로 하는, 재조합 백시니아 바이러스를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 항종양 면역성 증진용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 바이러스를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 키트를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 바이러스의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0014] 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

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 인터루킨-12 (interleukin-12; IL-12) 유전자를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스로서, 상기 인터루킨-12 유전자는 백시니아 바이러스 유전자 B8R 영역에 삽입되는 것을 특징으로 하는, 재조합 백시니아 바이러스를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 인터루킨-12 (interleukin-12; IL-12) 유전자는 서열번호 9의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 백시니아 바이러스 유전자 B8R은 서열번호 11의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 재조합 백시니아 바이러스는 백시니아 바이러스 유전자 B8R 영역이 결실된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 백시니아 바이러스는 웨스턴 리저브(Western Reserve, WR), NYVAC(New York Vaccinia Virus), Wyeth(The New York City Board of Health; NYCBOH), LC16m8, 리스트(Lister), 코펜하겐(Copenhagen), 티안탄(Tian Tan), USSR, 타쉬켄트(TashKent), 에반스(Evans), 및 IHD (International Health Division) 백시니아 바이러스 중(strain)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 IHD (International Health Division) 백시니아 바이러스 중일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 항종양 면역성 증진용 조성물을 제공한다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공할 수 있으며, 상기 식품 조성물은 건강기능식품 조성물일 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스의 암 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스의 암 치료제 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 항종양 면역성 증진 방법을 제공한다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스의 항종양 면역성 증진 용도를 제공한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스의 항종양 면역성 증진제 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 암은 편평상피세포암, 신경교종, 폐암, 폐의 선암, 복막암, 피부암, 안암, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 대분비선암, 부갑상선암, 부신암, 골육종, 연조직 육종, 요도암, 혈액암, 간암, 위장암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 방광암, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막암, 자궁암, 침샘암, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 두경부암, 구강암, 설암, 뇌암, 악성 흑색종, 및 기질 종양으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 조성물은 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특성을 만족하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] (a) 종양 내 CD3+ T 세포 수준을 증가시킴;

[0034] (b) 종양 내 CD4+ T 세포 수준을 증가시킴; 및

[0035] (c) 종양 내 CD8+ T 세포 수준을 증가시킴.

[0036] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 항-종양 면역 (Anti-tumor immunity)성을 증진시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0037] 또한, 본 발명은 인터루킨-12 (interleukin-12; IL-12) 유전자를 전달벡터에 삽입하는 단계; 및 상기 전달벡터를 백시니아 바이러스에 삽입하는 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0039] 본 발명은 인터루킨-12 유전자를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스 및 이의 용도에 관한 것으로, 백시니아 바이러스에서 B8R 유전자를 삭제하고, 삭제된 B8R 자리에 인터루킨-12 유전자를 삽입시킨 재조합 백시니아 바이러스는 IFN- γ 활성 및 IL-12 활성이 증가함으로써 면역에서 상승적인(synergistic) 효과를 나타내어 항-종양 면역성 (Anti-tumor immunity)을 증진시킬 수 있으므로 암의 예방, 개선, 또는 치료에 유용하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 플라스미드 pB8R(-)mCherry-mIL12의 클로닝 방법을 나타낸 모식도이다.

도 2a 및 도 2b는 재조합 플라스미드 pSP72-B8R 및 pB8R(-)mCherry-mIL12의 모식도를 나타낸 도면이다.

도 3은 단일 플라그 분리 (single plaque isolation) 과정을 거쳐 분리된 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스 (B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스)의 플라그를 확인한 결과를 나타낸 도면이다 (A: Bright-field microscopy, $\times 100$ /B: Fluorescence microscopy (Red), $\times 100$).

도 4는 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스(B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스)의 특성 분석을 위해 재조합 백시니아 바이러스 처리된 세포 및 배지에 대하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 IL-12 단백질의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스(B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스)의 세포독성을 Vero 세포, MC38 및 LLC1 세포에서 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 유전적 조작을 가하지 않은 IHD 바이러스(모 바이러스)와 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스(B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스)의 마우스 췌장암 세포(Pan02)에 대한 세포독성을 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 유전적 조작을 가하지 않은 IHD 바이러스(모 바이러스)와 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스(B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스)의 마우스 흑색종 세포(B16F10)에 대한 세포독성을 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

도 8a 내지 도 8e는 마우스 췌장암 모델에서 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스(B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스)의 항-종양 효과를 확인한 것으로, 도 8a는 체중 변화를 측정한 결과, 도 8b는 체중에 대한 비장의 상대적인 무게를 확인한 결과, 도 8c는 종양 부피를 측정한 결과, 도 8d는 종양 무게를 측정한 결과, 도 8e는 마우스 췌장암 모델에서 적출한 종양을 나타낸 도면이다.

도 9는 마우스 췌장암 모델에서 적출한 비장 조직을 이용하여 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스(B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스) 처리 후의 T 세포 활성도를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 10a 내지 도 10c는 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스(B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스) 처리 후 마우스 췌장암 모델에서 적출한 종양 조직에 면역 염색을 수행하여 종양침윤림프구 수를 분석한 결과를 나타낸 것으로, 도 10a는 CD3 면역 염색 슬라이드를 분석한 결과를, 도 10b는 CD8 면역 염색 슬라이드를 분석한 결과를, 도 10c는 CD4 면역 염색 슬라이드를 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

도 11a 내지 도 11e는 마우스 흑색종 모델에서 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스(B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스)의 항-종양 효과를 확인한 것으로, 도 11a는 체중 변화를 측정한 결과, 도 11b는 체중에 대한 비장의 상대적인 무게를 확인한 결과, 도 11c는 종양 부피를 측정한 결과, 도 11d는 종양 무게를 측정한 결과, 도 11e는 마우스 흑색종 모델에서 적출한 종양을 나타낸 도면이다.

도 12는 마우스 흑색종 모델에서 적출한 비장 조직을 이용하여 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스(B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스) 처리 후의 T 세포 활성도를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 13은 마우스 흑색종 모델에서 적출한 종양 조직에 CD8 면역 형광 염색을 수행하여 종양 내 침윤된 세포독성 T 세포의 분포를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 14a 내지 도 14d는 햄스터 흑색종 모델에서 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스(B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스)의 항-종양 효과를 확인한 것으로, 도 14a는 체중 변화를 측정한 결과, 도 14b는 종양 부피를 측정한 결과, 도 14c는 종양 무게를 측정한 결과, 도 14d는 햄스터 흑색종 모델에서 적출한 종양을 나타낸 도면이다.

도 15는 햄스터 흑색종 모델에서 적출한 비장 조직을 이용하여 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스(B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스) 처리 후의 T 세포 활성도를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 16은 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스(B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스) 처리 후 햄스터 흑색종 모델에서 적출한 종양 조직에 면역 염색을 수행하여 종양침윤림프구 수를 분석한 결과를 나타낸 것으로, 도 16a는 CD3 면역 염색 슬라이드를 분석한 결과를, 도 16b는 CD8 면역 염색 슬라이드를 분석한 결과를, 도 16c는 CD4 면역 염색 슬라이드를 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

도 17은 본 발명의 재조합 바이러스의 항-종양 기전을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 18은 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스(B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스)의 모식도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 본 발명은 인터루킨-12 (interleukin-12; IL-12) 유전자를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스 및 이의 용도에 관한 것으로, 백시니아 바이러스의 B8R 유전자를 IL-12 유전자로 치환하는 경우, IFN- γ 활성 및 IL-12 활성이 증가함으로써 면역에서 상승적인(synergistic) 효과를 나타내어 항-종양 면역성을 증진시켜 현저한 항암 효과를 나타내는 것을 확인하여 완성된 것이다.

[0044] 이하, 본 발명에 대해 구체적으로 설명한다.

[0046] 본 발명은 인터루킨-12 (interleukin-12; IL-12) 유전자를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스로서,

[0047] 상기 인터루킨-12 유전자는 백시니아 바이러스 유전자 B8R 영역에 삽입되는 것을 특징으로 하는, 재조합 백시니아 바이러스를 제공한다.

[0048] 본 발명에서 “백시니아 바이러스 (vaccinia virus)”는 우두(cowpox) 바이러스로도 불리며, 가장 널리 연구된 종양용해성 바이러스 (oncolytic) 중 하나로 세포질에서 증식하고 200 kb의 이중가닥 DNA를 게놈으로 가지고 있는 외피 보유 바이러스로 두창바이러스(poxvirus)에 속한다. 백시니아 바이러스는 200 kb의 이중가닥 DNA를 전사하고 번역해 총 250개의 유전자를 발현하며, 200 kb의 선형 DNA 게놈을 가지고 있어 다수의 유전자 제거 및 최대 40 kb까지 전이 유전자 삽입이 가능하므로 유전자 치료 및 운반의 도구로 널리 이용되고 있으며, 상피암에서 활성화 되어있는 EGFR/RAS 경로에 의존하여 증식하기 때문에 선천적인 종양 특이성을 가지므로 발암성 유발의 위험이 적다는 장점이 있다.

[0049] 본 발명에 있어서, 상기 백시니아 바이러스는 웨스턴 리저브(Western Reserve, WR), NYVAC(New York Vaccinia Virus), Wyeth(The New York City Board of Health; NYCBOH), LC16m8, 리스터(Lister), 코펜하겐(Copenhagen), 티안탄(Tian Tan), USSR, 타슈켄트(Tashkent), 에반스(Evans), IHD (International Health Division) 백시니아 바이러스 중(strain)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 IHD 중 백시니아 바이러스를 사용하였다.

[0050] 본 발명에 있어서, “재조합 (recombinant) 백시니아 바이러스”란 게놈 내에 외래 유전자가 하나 이상 삽입

(도입)된 백시니아 바이러스를 의미한다. 외래 유전자가 삽입되는 게놈 내 위치에는 제한이 없으나, 바람직하게는, 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스는 IL-12 유전자가 백시니아 바이러스 유전자 B8R 영역에 삽입되는 것을 특징으로 하며, 보다 바람직하게는, 상기 재조합 백시니아 바이러스는 백시니아 바이러스의 B8R 유전자가 IL-12 유전자로 치환된 것을 특징으로 한다. 또한, 본 발명에서 유전자 변형되는 상기 백시니아 바이러스는 야생형일 수 있고, 감염 효율, 복제 기능, 항암 효과 등을 증진시키기 위해 일부 서열이 결실된 것일 수 있다.

[0051] 본 발명에 있어서, “B8R”은 분비형 인터페론 감마(IFN- γ) 결합 단백질을 암호화하는 백시니아 바이러스의 유전자로, 인터페론 감마 결합 단백질은 인터페론 감마의 결합을 차단하여 숙주의 인터페론 감마 활성을 억제하고 항바이러스 면역을 지연시키는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스는 백시니아 바이러스 유전자 B8R 영역이 결실되어 있어 인터페론 감마 결합 단백질을 생성하지 못하므로 숙주에서 T림프구와 자연 살상 세포(NK 세포)를 활성화하고 체액성 면역을 향상시키는데 관여하는 인터페론 감마 활성을 증가시키는 것을 특징으로 한다.

[0052] 본 발명에 있어서, 상기 B8R 유전자는 서열번호 11로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 상기 염기서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명의 서열번호 11로 표시되는 염기서열의 핵산분자는 이를 구성하는 핵산분자의 작용성 등가물, 예를 들어, 핵산 분자의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 핵산 분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다. 구체적으로, B8R 유전자는 서열번호 11로 표시되는 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 폴리뉴클레오티드에 대한 “서열 상동성의 %”는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 B8R 유전자는 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0054] 본 발명에 있어서, “인터페론 감마(interferon gamma, IFN-g 또는 IFN- γ)”는 항암 면역 반응의 중심에서 조절자 역할을 하는 단백질로서, 암세포에 대한 세포면역을 활성화하여 암세포 증식 억제, 암세포 사멸 촉진 등을 유도할 수 있다.

[0055] 본 명세서에서 바이러스 유전 서열과 관련하여 사용되는 용어 “결실”은 해당 서열이 완전히 결실된 것뿐만 아니라, 부분적으로 결실된 것도 포함하는 의미를 가진다. 상기 서열 결실에 의해 유전자의 기능적 단백질의 발현이 일어나지 않거나 저해된다.

[0056] 본 발명에 있어서, “인터루킨-12(interleukin-12; IL-12)”은 가장 효과적이고 유망한 항암 사이토카인 중의 하나이다. IL-12는 이황화결합으로 연결된 40 kDa 및 35 kDa 서브유닛을 포함하는 헤테로다이머(heterodimeric) 단백질이며, 활성화된 대식세포, 단핵구, 수지상세포 및 활성화된 B 림프구에 의해 생성된다. IL-12는 T-helper 1 세포 면역을 증진시킬 수 있고, 세포성 T-림프구의 세포독성을 증가시키며, 혈관신생을 억제시킬 수 있다. 일반적으로 IL-12는 T 세포 및 NK 세포의 IFN- γ 생산을 활성화시킨다. IL-12의 국소적 발현은 종양세포가 T-세포 매개 세포독성에 민감하게 반응하도록 하며, 결과적으로 종양 성장 억제 및 체액성 면역(systemic immunity)의 구축을 가져오는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 IL-12 유전자는 마우스의 IL-12 유전자(mIL-12)일 수 있다.

[0057] 상기 IL-12 유전자는 서열번호 9로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 상기 염기서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명의 서열번호 9로 표시되는 염기서열의 핵산분자는 이를 구성하는 핵산분자의 작용성 등가물, 예를 들어, 핵산 분자의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 핵산 분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다. 구체적으로, IL-12 유전자는 서열번호 9로 표시되는 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 폴리뉴클레오티드에 대한 “서열 상동성의 %”

는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클 레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명에 있어서, 상기 IL-12 유전자는 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0059] 본 발명에 있어서, 상기 IL-12 유전자는 백시니아 바이러스의 게놈 내 B8R 유전자 영역에 백터를 이용하여 도입될 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스는 백터를 이용하여 B8R 유전자를 IL-12 유전자로 치환하여 B8R 유전자는 발현하지 않고, IL-12 유전자를 발현하는 것을 특징으로 한다.

[0060] 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스의 게놈 변형 방법에는 제한이 없으며, 공지된 유전자 재조합 기술을 이용하여 제작할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스는 상동말단연결(homologous endjoining)을 통해 외래 유전자(즉, IL-12 유전자)가 게놈 내에 삽입될 수 있다. 상동말단연결은 DNA의 이중가닥 절단을 수선하는 방법 중 하나로, DNA 수선시 상동성을 가진 서열을 주형으로 이용해 절단된 DNA를 합성하는 것을 특징으로 하며, 절단된 DNA 가닥이 그대로 연결되는 비-상동말단연결(non-homologous endjoining)과는 구별된다.

[0061] 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스를 제조하고자 하는 경우, 야생형 백시니아 바이러스로 세포를 감염시킨 후, 바이러스의 게놈 내에 삽입하고자 하는 유전자를 포함하는 백터를 세포에 도입시켜 세포 내에서 백시니아 바이러스 게놈의 변형(즉, 유전자의 삽입)이 일어나도록 유도할 수 있다. 백터의 세포 내 도입 및 야생형 백시니아 바이러스의 감염은 순서에 제한이 없고, 동시에 또는 순차적으로 이루어질 수 있다. 백터의 세포 내로의 도입, 즉, 백터의 형질감염 또는 트랜스펙션은 원핵 또는 진핵 숙주세포 내로 외인성 핵산(DNA 또는 RNA)을 도입하기 위해 통상 사용되는 다양한 기술, 예를 들어 전기천공법, 인산칼슘 침전법, DEAE-덱스트란 트랜스펙션 또는 리포펙션(lipofection) 등을 통해 이루어질 수 있다.

[0062] 또한, 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스는 형질전환체를 선별하기 위한 마커 유전자 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 마커 유전자는 백시니아 바이러스의 게놈 내에 함께 삽입된 IL-12 유전자와 동시에 발현되어 바이러스 내지 형질전환체의 식별을 가능하게 하는 표현형을 부여하는 것이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스는 마커 유전자로서 형광 단백질(fluorescent protein) 코딩 유전자를 포함할 수 있다. 형광 단백질이란 특정 파장의 빛을 흡수하여 활성화된 뒤 다시 정상상태로 되돌아가는 과정에서 특정 파장의 빛을 외부로 발산함으로써 특유의 색깔로 발광하는 단백질을 지칭한다. 형광단백질의 예시로는 GFP(green fluorescent protein) 코딩 유전자, RFP(red fluorescent protein) 단백질 코딩 유전자, 및 mCherry 코딩 유전자 등이 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스는 마커 유전자로서 mCherry 코딩 유전자(예를 들어, 서열번호 13)를 더 포함할 수 있다. 상기 마커 유전자의 게놈 내 위치에는 제한이 없으나, 바람직하게는 B8R 유전자 영역에 존재할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 재조합 백시니아 바이러스의 게놈 내에 삽입된 IL-12 유전자의 업스트림(upstream) 또는 다운스트림(downstream)에 위치할 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0065] 본 명세서에서 “유효성분”은 단독으로 목적으로 하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체 등과 함께 목적으로 하는 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.

[0066] 본 명세서에서 사용된 용어 “암”이란, 제어되지 않은 세포성장으로 특징지어지며, 이러한 비정상적인 세포성장에 의해 종양이라고 불리는 세포 덩어리가 형성되어 주위의 조직으로 침투하고 심한 경우에는 신체의 다른 기관으로 전이되기도 하는 것을 말한다. 본 발명에 있어서, 암은 고형암 또는 혈액암일 수 있으며, 이의 비제한적인 예시로서 편평상피세포암, 신경교종, 폐암, 폐의 선암, 복막암, 피부암, 안암, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 골육종, 연조직 육종, 요도암, 혈액암, 간암, 위장암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 방광암, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막암, 자궁암, 침샘암, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 두경부암, 구강암, 설암, 뇌암, 악성 흑색종, 및 기질 종양으로 등으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 상기 혈액암은 백혈병, 림프종, 다발성 골수종 등일 수 있다.

- [0067] 본 발명의 조성물 내의 상기 재조합 백시니아 바이러스의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 또는 0.001 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.
- [0068] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0069] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡슐제, 연질캡슐제, 서방캡슐제, 장용캡슐제, 환제, 틱크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [0070] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0071] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 대상체 내로 투여되었을 때 상기 조성물 내에 포함된 재조합 백시니아 바이러스가 생체에서 이용 가능하도록 제형화될 수 있다. 투여 후에는 ELISA 등의 검출 방법을 통해 종양 조직, 혈액, 및 기타 조직 내에 존재하는 백시니아 바이러스를 모니터링할 수 있다.
- [0072] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비용, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0073] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 이를 필요로 하는 개체에 단회 투여 또는 2회 이상 반복 투여될 수 있으며, 종양이 감소하거나 소멸할 때까지 반복 투여될 수 있다.
- [0074] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스는 종양 내(intratumorally) 직접투여 또는 정맥투여를 통해 투여될 수 있으며, 종양의 상태 및 종류 등에 따라 적절한 투여방법을 선택할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [0076] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0077] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스의 암 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [0078] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스의 암 치료제 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0079] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

- [0080] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0081] 본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0082] 본 발명은 일 실시예에서, 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스가 IL-12 단백질을 발현하는 것을 확인하였다 (실시예 3 참조).
- [0083] 본 발명은 다른 실시예에서, 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스가 모 바이러스와 비교하여 우수한 종양 살상능을 나타내는 것을 확인하였다 (실시예 5 참조).
- [0084] 본 발명은 또 다른 실시예에서, 마우스 체장암 모델, 마우스 흑색종 모델, 및 햄스터 흑색종 모델을 이용하여 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스의 항-종양 효과를 확인한 결과, 모 바이러스와 비교하여 종양 억제능이 우수하며, CD3, CD4 및 CD8을 발현하는 T-세포를 증가시킴으로써 T-세포를 높게 활성화시키는 것을 확인하였다 (실시예 6 내지 8 참조).
- [0085] 따라서, 본 발명에 있어서, 본 발명에 따른 조성물은 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특성을 만족할 수 있다:
- [0086] (a) 종양 내 CD3+ T 세포 수준을 증가시킴;
- [0087] (b) 종양 내 CD4+ T 세포 수준을 증가시킴; 및
- [0088] (c) 종양 내 CD8+ T 세포 수준을 증가시킴.
- [0089] 본 발명에 있어서, 본 발명에 따른 조성물은 항-종양 면역성 (Anti-tumor immunity)을 증진시킬 수 있다.
- [0091] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 항종양 면역성 증진용 조성물을 제공한다.
- [0092] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 항종양 면역성 증진 방법을 제공한다.
- [0093] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스의 항종양 면역성 증진 용도를 제공한다.
- [0094] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스의 항종양 면역성 증진제 제조를 위한 용도를 제공한다.
- [0095] 본 발명에 있어서, “항종양(Anti-tumor)”은 암세포의 사멸, 암세포의 생존능 저하, 암세포의 증식 억제에 따른 암이 가지는 병리적 증상의 억제나 지연, 암 전이 억제, 암 재발 억제를 포함하는 의미이다.
- [0096] 본 발명의 항종양 면역성 증진용 조성물은 허가된(approved) 임의의 항암제와 병용 또는 혼합되어 사용될 수 있다. 항암제와 병용 또는 혼합되어 사용될 경우 그러한 항암제로는 대사 길항제, 알킬화제, 토포아이스오머라제 길항제, 미세소관 길항제, 식물유래 알칼로이드 등 암세포에 세포독성을 나타내는 임의의 항암제, 임의의 사이토카인 의약품, 임의의 항체 의약품, 임의의 면역관문 억제제 의약품, 임의의 세포 치료제(car-T cell therapy, car-NK cell therapy) 의약품 등을 포함한다. 구체적으로 탁솔, 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 제피티닙, 보르테오미, 수니티닙, 카보플라틴, 시스플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 소라페닙, IL-2 의약품, INF- α 의약품, INF- γ 의약품, 트라스투주맙, 블리나투모맙, 이필리무맙, 펄브롤리주맙, 니볼리주맙, 아테졸리주맙 (Atezolizumab), 두발루맙(Durvalumab), 베바시주맙, 세록시맙, 티사젠렉루셀(Tisagenlecleucel, 킴리아), 액시캅타젠 실로루셀(Tisagenlecleucel Axicabtagene Ciloleucel, 예스카타) 등이 예시될 수 있으며, 이들 예시된 항암제 이외에도 당업계에 공지된 여타의 항암제도 제한없이 본 발명의 조성물과 혼합되어 사용되거나 병용 사용될 수 있다.
- [0098] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공할 수 있으며, 상기 식품 조성물은 건강기능식품 조성물일 수 있다.
- [0099] 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 재조합 백시니아 바이러스를 그

대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스는 원료에 대하여 15 중량% 이하, 또는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0100] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0101] 본 발명에 따른 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당 및 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스 및 수크로오스와 같은 디사카라이드, 텍스트린 및 시클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨 및 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL당 일반적으로 약 0.01-0.20g, 또는 약 0.04-0.10g이다.

[0102] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01-0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0103] 본 명세서에 있어서, “건강기능식품”이란 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하는데, 상기 식품은 암의 예방 또는 개선에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.

[0104] 본 발명의 건강기능식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나다.

[0106] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 키트를 제공한다. 상기 키트는 면역항암제를 더 포함할 수 있다. 상기 키트는 암을 예방 또는 치료하는데 사용할 수 있는 물질 내지 기기 등의 조합을 의미하며, 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스를 제조, 보관, 또는 투여할 수 있는 형태이면 되고, 구체적인 형태에는 제한이 없다. 따라서, 본 발명에 따른 키트는 재조합 백시니아 바이러스 및 면역항암제 뿐만 아니라 특정 질환의 치료를 위한 키트의 구성요소로서 당업계에 공지된 것이라면 제한 없이 포함할 수 있다.

[0108] 또한, 본 발명은 인터루킨-12 (interleukin-12; IL-12) 유전자를 전달벡터에 삽입하는 단계; 및 상기 전달벡터를 백시니아 바이러스에 삽입하는 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 전달벡터는 pB8R(-)mCherry-mIL12를 사용하였으나, 이에 제한되지 않는다.

[0109] 상기 "벡터(vector)"라는 용어는 벡터가 복제될 수 있는 세포 속으로 도입시키기 위한 외인성 뉴클레오티드 서열을 삽입시킬 수 있는 운반체 핵산 분자로 사용될 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 "외인성"일 수 있고, 이는 벡터를 도입시키는 세포에 대해 외부의 것이라는 의미이거나, 서열이 세포 내의 서열에 대해 상동이지만 서열이 통상적으로 발견되지 않는 숙주 세포 내의 위치에 핵산이 위치하는 것을 의미할 수 있다. 벡터에는 플라스미드, 코스미드, 바이러스(박테리오파지, 동물 바이러스 및 식물 바이러스) 및 효모 인공 염색체(예: YAC)가 포함될

수 있다.

[0110] 목적하는 유전자를 상기 벡터에 삽입하는 것은, 당업계에 알려진 모든 유전자 재조합 방법 중에서 선택되는 방법에 의해 수행되는 것일 수 있으며, 상기 벡터를 상기 박시니아 바이러스에 삽입하는 것은 당업계에 알려진 모든 형질감염 방법 중에서 선택되는 방법에 의해 수행되는 것일 수 있다.

[0112] 본 발명의 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명의 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.

[0113] 본 발명의 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.

[0114] 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.

[0116] [실험방법]

[0117] 1. 세포 배양

[0118] Vero (African green monkey kidney epithelial cell line) 및 RPMI 1846 (Syrian golden hamster melanotic melanoma cell line)은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. Pan02 (murine pancreatic cancer cell line), B16F10 (murine melanoma cell line), MC38 (murine colon adenocarcinoma cell line), 및 LLC1 (murine lung cancer cell line)은 APEX(Asan Preclinical Evaluation center for cancer therapeutiX)에서 입수하였다. 모든 세포주에 ATCC 권장량의 FBS(fetal bovine serum)을 각각 보충하고 1% AA(antibiotic-antibiotics)를 함유한 적절한 배지로 유지하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂, 습윤하 조건에서 배양하였다.

[0120] 2. 플라스미드(plasmid)

[0121] 유전자 재조합 박시니아 바이러스 제작을 위한 플라스미드 전달체(vector)는 대장균에서 증식하기 위한 복제기점과 항생제 ampicillin 저항성 유전자를 가진 pSP72 플라스미드에 B8R 유전자위(locus)에 재조합 반응이 일어나 삽입되기 위한 박시니아 바이러스 유래의 상동서열을 삽입하고, 추가로 외래 유전자인 mCherry 형광단백질과 마우스 단일사슬 형태의 IL-12 유전자를 적절한 프로모터(promoter)와 결합하여 삽입하였다. 구체적으로는 B8R 유전자가 결실된 플라스미드를 만들고, mCherry-mIL12 전이유전자(transgene)를 삽입하여 pB8R(-)mCherry-mIL12를 만들었다. 플라스미드 클로닝 방법의 전체 단계는 도 1에 나타내었다.

[0122] 구체적으로, 상업 플라스미드인 pSP72는 Promega Corporation에서 구입하였으며, 하기 표 1에 기재된 프라이머 pSP72-R (서열번호 1) 및 pSP72-F (서열번호 2) (Phusion flash high-fidelity 70 PCR Master mix, F548S)를 이용하여 PCR 반응을 통해 증폭하였다 (Step1). B8R locus 또한 하기 표 1에 기재된 프라이머 SP72-B8R_Left-F (서열번호 3) 및 SP72-B8R_Right-R (서열번호 4)을 사용하여 IHD 바이러스 게놈 DNA를 주형으로 사용하는 PCR 반응을 통해 증폭하였다 (Step2). SP72 PCR 산물과 B8R locus PCR 산물을 overlap cloner kit (EBK1011, Elpis Bio.)를 사용하여 SP72-B8R 플라스미드를 만들기 위해 조립하였다 (Step3). SP72-B8R 플라스미드 서열은 하기 표 1에 기재된 프라이머 Seq-B8Rp-F (서열번호 7), Seq-B8R-R (서열번호 8), 및 상업용 프라이머 T7, SP6을 사용하여 Cosmogenetech(Korea)의 DNA 시퀀싱 서비스(genome sequencing service)를 통해 검증하였다.

[0123] pSP72-B8R 서열을 모두 검증한 후, B8R 유전자가 없는 서열을 PCR로 증폭하였다 (Step4). B8R locus가 없는 서열은 하기 표 1에 기재된 프라이머 ApaI-B8Rminus_Left-R (서열번호 5) 및 XhoI-B8R_Right-F (서열번호 6)로 증폭하였다. 합성된 유전자 생성물을 효소 ApaI 및 XhoI로 분해하였다 (Step5). 증폭한 B8Rminus 서열은

overlap cloner에 의해 합성된 유전자 생성물과 각각 조립하였다 (Step6).

표 1

서열번호	프라이머	서열	Tm	용도
1	pSP72-R	5'-TTC TAT AGT GTC ACC TAA ATC GTA TGT-3'	62.7°C	PCR
2	pSP72-F	5'-GCC GGT CTC CCT ATA GTG AGT CGT ATT-3'	69.6°C	PCR
3	SP72-B8R_Left-F	5'-TTA GGT GAC ACT ATA GAA ATG ATG AAT GAA CGC GAT GTT-3'	61.8°C	PCR
4	SP72-B8R_Right-R	5'-ACT ATA GGG AGA CCG GCT CAA TAA GGA GAA GTT GAT AAT GCC -3'	57.1°C	PCR
5	ApaI-B8Rminus_Left-R	5'-AAC AAA ATG AAA TTC GGGCCC GGT GTT GTT TGT TAT TTG ACT-3'	58.1°C	PCR
6	XhoI-B8R_Right-F	5'-CCG CCT GAT TTT TAT CTCGAG CTA ATT TTT ATT AAT GAT ACA AAA ACG-3'	56.1°C	PCR
7	Seq-B8Rp-F	5'-AGC ACA TCA AAT GAT GTT ACC ACT-3'	64.0°C	Sequencing
8	Seq-B8R-R	5'-TAT AAG GGC GTT AAC CAG TGT-3'	62.1°C	Sequencing

3. 플라스미드 *E. coli* 형질전환 및 정제

검증한 플라스미드를 적절한 *E. coli* 세포로 형질전환시키고, ampicillin을 함유하는 LB Agar 플레이트에 도말하고 37°C에서 밤새 배양하여 콜로니를 형성케 하였다. pB8R(-)mCherry-mIL12 *E. coli* 콜로니는 상기 표 1에 기재되어 있는 프라이머 Seq-B8Rp-F (서열번호 7) 및 Seq-B8R-R (서열번호 8)으로 각각 Colony PCR을 수행하였다. 예상되는 밴드 크기를 가진 콜로니를 LB Broth 배지를 포함하는 10 mL Ampicillin 액상배지에 접종하고 37°C 진탕 배양기에서 밤새 배양하여, Plasmid DNA Purification Kit Mini (CMP0112, Cosmogenetech, Korea)를 사용하여 정제된 플라스미드를 얻었다. 최종 생산물인 pB8R(-)mCherry-mIL12는 상기 표 1에 기재된 프라이머 Seq-B8Rp-F (서열번호 7), Seq-B8R-R (서열번호 8), 및 상업용 프라이머 T7, SP6을 사용하여 Cosmogenetech(Korea)의 DNA 시퀀싱 서비스를 통해 검증하였다.

4. 바이러스

백시니아 바이러스 IHD 균주(VR-156)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 재조합 백시니아 바이러스는 IHD 바이러스(모 바이러스)를 감염시킨 Vero 세포에 플라스미드 전달벡터를 형질전환(jetPRIME, #101000015, Polyplus, USA)시켜 변형하였다. 모든 플라그(Plaque)가 적색 형광을 발현할 때까지 단일 재조합 플라그를 분리하기 위해 Agarose 오버레이 방법을 연속적으로 수행하였다.

단일 플라그를 분리한 후, 재조합 백시니아 바이러스를 Vero 세포에서 증폭하고 30% sucrose gradient ultracentrifugation (13,700 rpm, 4°C 1hr 20min, Acel 9, Decel 9)를 통해 정제하였다.

5. TCID₅₀ 분석에 의한 바이러스 역가 측정

[0133] 바이러스 역가는 감염성 분석 중 하나인 TCID₅₀ 분석에 의해 결정하였다. 4.2×10^3 개의 Vero 세포를 96-웰 플레이트의 각 웰에 있는 성장 배지에서 준비하여 37°C, 5% CO₂, 습윤하 조건에서 밤새 배양하였다. 바이러스 샘플 원본의 1:10으로 예를 들어, 바이러스 원본의 10^{-3} 에서 10^{-7} 까지 일련의 희석을 준비하였으며, 모든 바이러스 샘플은 각 웰에 50 μ l의 바이러스를 옮기기 직전까지 강하게 vortexing 하였다. 세포 플레이트는 3 내지 4일 동안 CPE (Cytopathic effect)를 모니터링하기 위해 37°C, CO₂ 인큐베이터로 다시 이동시켰다. CPE가 3개의 개별 관독값에 대해 희석당 동일하게 나타날 때 endpoint를 결정하였으며, Spearman-Kärber 방법 (Ramakrishnan, 2016)에 기초하여 역가를 계산하였다.

[0135] 6. 웨스턴 블롯 분석

[0136] 1 mL의 적절한 배지로 된 6-웰 플레이트에 seeding한 Vero 세포를 바이러스(모(parent) 바이러스, 및 pB8R(-)mCherry-mIL12 바이러스)로 36시간 동안 감염시켰다. 배지를 조심스럽게 1.5 mL e-tube로 옮겨 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였으며, 상층액을 새로운 1.5 mL e-tube로 옮기고, 10 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)를 첨가하여 20°C에서 보관하였다. 잔여 세포 펠렛(pellet)은 1 mL PBS로 스크랩하여, 4,000rpm에서 3분 동안 원심분리하였다. 상층액을 조심스럽게 제거하고 펠렛을 200 μ L PRO-PREP 용액에서 최소 30분 동안 인큐베이션하여 20°C에서 보관하였다.

[0137] 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE(4-15%)에 로딩하고 크기 별로 분리하여 polyvinylidene difluoride membrane (Thermo Scientific™)으로 옮겼다. 막(membrane)을 mouse IL-12A(1:2000, ab133751, Abcam, Cambridge, UK), β -액틴(1:5000, sc-47778, Santa Cruz, CA, 132 USA)에 대한 1차 항체와 함께 4°C에서 밤새 배양하였다. 2차 항체 (Goat anti-mouse IgG, 및 Goat anti-rabbit IgG (no. A90-116P, A120-101P, Bethyl, Montgomery, TX, USA))와 함께 실온에서 인큐베이션하기 1시간 전 막을 0.1% Tween 20이 포함된 PBS에서 3회 세척하였다. 면역반응성 밴드는 ECL western blot detection reagent (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 사용하여 화학 발광으로 시각화하였다.

[0139] 7. *In vitro* 세포독성 분석

[0140] 96-웰 플레이트에 seeding한 세포를 72시간 동안 서로 다른 농도(0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 및 500 MOI)의 바이러스로 감염시켰다. 10 μ L의 CCK-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) 용액을 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 2시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 세포 생존율은 파장 450 nm에서 TECAN 2000 spectrophotometer (Spark, Mannedorf, Swiss)로 분석하였다.

[0142] 8. 동물 실험

[0143] 암컷 C57BL/6 마우스 (7주령)은 오리엔트 바이오 (한국)에서, 암컷 Syrian golden 햄스터는 자바이오 (한국)에서 구입하였다. 모든 동물은 아산병원 동물관리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC)의 지침에 따라 처리하였다. 구입 후, 약물 처리 또는 종양 형성을 시작하기 전 일주일 동안 새로운 환경에 적응하는 순화기간을 가졌다. 동물은 온도와 습도가 조절되며, 12/12시간의 명암 주기가 있는 표준화된 조건에서 사육하였으며, 식이와 물은 자유롭게 접근할 수 있도록 하였다.

[0145] 9. *In vivo* 항-종양 효능

[0146] 마우스 체장암, 흑색종 동종이소 종양 모델을 확립하기 위해, 마우스에 5×10^5 개의 Pan02 및 B16F10 세포를 오른쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 종양의 부피가 100 mm³에 도달하면 마우스를 무작위로 세 그룹으로 나눈 뒤, 각 그룹의 마우스에 PBS (음성 대조군), 1×10^8 TCID₅₀의 IHD 바이러스, 및 1×10^8 TCID₅₀의 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스를 단회 종양 내 주사하였다. 종양 크기는 Vernier caliper로 2-3일마다 측정하였고 종양 부피는 [(폭)²×길이]×0.5로 계산하였다. 종양이 임의의 치수에서 16 mm에 도달하거나 실험이 종료된 때 마우스를 안

락사시켰다.

[0147] 또한, 햄스터 흑색종 동종이소 종양 모델을 확립하기 위해, 햄스터에 1×10^7 개의 RPMI 1846 세포를 오른쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 종양의 부피가 500 mm^3 에 도달하면 햄스터를 무작위로 세 그룹으로 나눈 뒤, 각 그룹의 햄스터에 PBS (음성 대조군), 1×10^8 TCID₅₀의 IHD 바이러스, 및 1×10^8 TCID₅₀의 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스를 단회 종양 내 주사하였다. 종양의 부피가 10000 mm^3 에 도달하기 전에 실험을 종료하여 햄스터를 안락사시켰다.

[0149] 10. ELISpot 분석

[0150] ELISpot 플레이트를 준비하여 멸균 PBS (200 μl /웰)로 4회 세척하고, 세포에 사용된 것과 동일한 혈청 10%를 함유하는 배지로 최소 30분 동안 컨디셔닝(conditioning)하였다. 단일 분리된 비장세포를 각 웰에 분주하고 (마우스, 5.0×10^5 비장세포; 햄스터, 2.5×10^5 비장세포) 자극원(종양 세포)을 5:1의 비율로 추가하였다. 플레이트를 약 18시간 동안 37°C에서 5% CO₂의 가습 인큐베이터에서 배양하였다.

[0151] 세포를 제거하고 플레이트를 각 웰당 200 μl PBS로 5회 세척하였다. 검출 항체 (마우스, R4-6A2-biotin; 햄스터, MTH29-biotin)를 0.5% FBS를 함유하는 PBS (PBS-0.5% FBS)에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하고 각 웰에 100 μl 씩 첨가하여 플레이트를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS로 3회 세척하였다. Streptavidin-ALP를 PBS-0.5% FBS에 희석(1:1000)하고, 각 웰에 100 μl 씩 첨가하였다.

[0152] 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS로 3회 세척하였다. 바로 사용할 수 있는 기질 용액 (BCIP/NBT-plus)을 0.45 μm 필터를 통해 여과하여 각 웰에 100 μl 씩 첨가하였다. 수돗물로 플레이트를 광범위하게 세척한 후 건조하였다. 플레이트를 검사하고 ELISpot 판독기를 사용하여 스팟을 계산하였다.

[0154] 11. 면역조직화학 염색

[0155] 각 그룹의 종양 및 비장 조직을 채취하여 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 조직을 다듬고, Shandon Excelsior ES tissue processor (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 탈수하고, 파라핀으로 침투시키고, EG1150H paraffin-embedding station (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)을 사용하여 파라핀 블록에 세로로 포매하였다. 파라핀 블록을 3 μm 로 박절하여 염색을 수행하였다.

[0156] 절편(section)의 면역조직화학은 automated slide preparation system (Benchmark XT; Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ)을 사용하여 수행하였다. 탈파라핀화, 에피토프 검색(Epitope retrieval), 및 면역염색은 제조업체의 지침에 따라 수행하였다. 세포 컨디셔닝 용액을 사용하여 에피토프 검색을 수행하였다. 면역염색을 위해 BMK UltraView Universal DAB Detection Kit (catalog no. 670-501)를 사용하였다. 종양 및 비장 절편은 37°C에서 36분 동안 CD3 (1:400, ab16669, Abcam, Cambridge, UK), CD4 (1:1000, ab183685, Abcam, Cambridge, UK), CD8 (1:2000, ab217344, Abcam, Cambridge) 항체를 반응시켰다. UltraMap Anti-rabbit HRP를 37°C에서 16분 동안 2차 항체로 사용하였다. UltraView DAB 및 UltraView Copper를 사용하여 양성 신호를 증폭하고 절편을 hematoxylin 및 bluing 시약으로 대조염색하였다. 숙련된 병리학자가 종양과 비장의 조직학적 검사를 수행하였으며, Motic Easy Scan 슬라이드 스캐너를 이용하여 염색된 슬라이드의 400배 확대된 스캔 이미지를 얻었다.

[0158] 12. 면역형광 염색

[0159] 각 그룹의 종양 및 비장 조직을 채취하여 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 조직을 다듬고, Shandon Excelsior ES tissue processor (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 탈수하고, 파라핀으로 침투시키고, EG1150H paraffin-embedding station (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)을 사용하여 파라핀 블록에 세로로 포매하였다. 파라핀 블록을 3 μm 로 박절하여 염색에 사용하였다.

[0160] 조직 절편을 탈파라핀화한 후 Tris/EDTA (pH9) 용액을 이용하여 항원 복구를 수행하였다. 슬라이드를 수분 상자 (moisture chamber)에 배치한 후 5% normal goat serum이 포함된 0.4% Triton-X PBS (PBST)로 실온에서 1시간

동안 블로킹(blocking)하였다. 슬라이드에 마우스 항 CD8 항체 (ab217344, Abcam, Cambridge)를 1% normal goat serum 포함 PBST에 1:100으로 희석하여 처리하였다. 각 단계마다 PBST로 3회씩 세척하였다. 2차 항체로 goat anti-rabbit IgG (H&L)-Alexa Fluor 488을 PBST에 1:1000으로 희석하여 처리하였고 1시간동안 실온에 방치하였다. DAPI를 이용한 핵 대조염색을 5분간 처리한 후 수성 봉입제로 슬라이드를 봉입하였다. 염색한 슬라이드는 형광현미경(Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰, 촬영하였다.

[0162] 13. 통계 분석

[0163] 모든 통계 분석은 Prism8 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA)을 사용하여 수행하였다.

[0165] [실시예]

[0166] 실시예 1. 플라스미드 공학 (Plasmid engineering)

[0167] 플라스미드 생산의 모든 과정은 순차적으로 진행하였다. SP72-B8R locus를 포함하는 플라스미드(pSP72-B8R)를 먼저 제조한 후, 최종 생산물인 pB8R(-)mCherry-mIL12를 성공적으로 제조하였다. 제조한 플라스미드의 모식도는 도 2a 및 도 2b에 나타났다. 염기서열은 여러 개의 프라이머를 이용한 게놈 시퀀싱 서비스와 겔 전기영동 후 PCR 산물의 예상 밴드 크기를 확인함으로써 검증하였다.

[0169] 실시예 2. 바이러스 생성

[0170] B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스는 형질감염 (transfection) 동안 상동 재조합을 통해 제작하였으며, 이는 제작한 플라스미드 벡터 내에서 바이러스 B8R 유전자 영역이 동일한 서열로 전환되었음을 의미한다. 재조합 후, 도 3에 나타난 바와 같이, 강화된 적색 형광 단백질 (mCherry; GenBank: BAP87017.1) 유전자를 바이러스 유전자에 삽입하여 적색 형광을 발현하는 재조합 바이러스에 감염된 세포를 허용하였다.

[0172] 실시예 3. 단백질 수준에서 재조합 바이러스 특성화(characterization)

[0173] 바이러스 유전자에 삽입된 인터루킨-12 (interleukin-12; IL-12)가 단백질 형태로 번역되는지 확인하기 위해 웨스턴 블롯을 수행하였다. 샘플 준비를 위해, Vero 세포를 모 바이러스(IHD 바이러스), 및 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스로 감염시켰다. 세포 펠렛과 배지는 별도로 준비하였다.

[0174] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 모 바이러스 처리 샘플의 세포 및 배지에서는 관찰되지 않았던 IL-12 단백질이 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스 처리 샘플의 세포 및 배지 모두에서 발현되는 것을 확인하였다. 함께 로딩 (loading)된 단백질 래더(protein ladder)를 기준으로 두 개의 두드러진 밴드의 크기는 29 kDa 및 70 kDa이었다. 로딩된 샘플의 양이 일정하고 예상한 대로 배지 샘플에서 전혀 검출되지 않았음을 확인하기 위해 β -액틴으로 웨스턴 블롯 분석 염색을 수행하였다.

[0176] 실시예 4. 바이러스 감염성 분석

[0177] B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스의 감염성을 평가하기 위해, 세 가지 다른 세포주에서 CCK (cell counting kit) 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스의 Vero 세포에 대한 $IC_{50}=0.4915$, MC38 세포에 대한 $IC_{50}=0.3903$, LLC1 세포에 대한 $IC_{50}=32.21$ 였고, MC38, Vero, LLC1 순서로 세포에 매우 민감한 결과를 나타냈다.

[0179] 실시예 5. 바이러스 감염성 분석

[0180] B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스의 감염성을 IHD 원(original) 바이러스와 비교하기 위해, 마우스 췌장암 세포주 (Pan02)와 마우스 흑색종 세포주(B16F10)에서 CCK (cell counting kit) 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 6과 도 7에 나타난 바와 같이, B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스의 Pan02 세포에 대한 $IC_{50}=83.25$, B16F10 세포에 대한

IC₅₀=146.6였고, IHD 바이러스는 Pan02 세포에 대한 IC₅₀=210.5, B16F10 세포에 대한 IC₅₀=406.3을 나타냈다. 두 가지 세포주 모두에서 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스가 IHD 바이러스보다 우수한 종양 살상능을 보였다.

[0182] 실시예 6. 마우스 체장암 모델에서 *in vivo* 항-종양 효과 확인

[0183] 6-1. 항-종양 효과 확인

[0184] 마우스 체장암 세포주 Pan02를 10% FBS, 1% AA (Antibiotic-Antimycotic) RPMI-1640 배지에 정치배양하며 유지하였다. 세포를 수확하여 계수한 후 5×10^5 개의 Pan02 세포와 Matrigel 50 μ L을 혼합하여 제모한 6주령 C57BL/6 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하주사하였다. 종양이 형성되면 장축과 단축의 크기를 caliper로 측정하며 관찰하였고, 종양의 부피는 $a^2b/2$ (a: 단축의 길이, b: 장축의 길이) 식을 이용하여 계산하였다. 평균 종양의 크기가 100 mm³에 도달하면 마우스를 무작위로 3그룹으로 나눈 뒤, 각 그룹의 마우스에 PBS (음성 대조군), 1×10^8 TCID₅₀의 모 바이러스, 및 1×10^8 TCID₅₀의 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스를 50 μ L씩 단회 종양 내 투여하였다. 종양의 크기 및 동물의 체중을 2-3일 간격으로 측정하였고, 바이러스를 투여한 날(0일)을 기준으로 9일째 동물을 희생하여 종양과 비장을 적출하였다.

[0185] 모 바이러스 및 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스를 마우스 체장암 모델에 투여한 후 동물의 체중을 측정한 결과, 도 8a에 나타난 바와 같이, 유의한 체중 변화를 보이지 않는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 8b에 나타난 바와 같이, 체중에 대한 비장의 상대적인 무게를 계산한 결과, B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스 처리군이 음성 대조군 (PBS 투여군) 및 모 바이러스 투여군에 비해 약 2배 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 이는 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스 처리로 면역 증강(immune boosting)이 유발된 것을 의미한다.

[0186] 모 바이러스 및 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스를 투여한 후 0일부터 9일까지 종양 부피를 측정한 결과 도 8c에 나타난 바와 같이, 음성 대조군과 비교하여 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스 처리군에서 현저한 종양 억제를 확인할 수 있었다.

[0187] 부검 시 모든 동물의 종양 조직은 오른쪽 옆구리에서 뚜렷하게 분리되었다. 도 8d에 나타난 바와 같이, 분리한 종양의 무게를 측정하였을 때 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스 투여군에서 뚜렷한 무게 감소를 확인할 수 있었고, 도 8e에 나타난 바와 같이, 육안으로도 종양의 크기가 상당히 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0189] 6-2. T세포 활성화도 확인

[0190] 마우스 체장암 세포주 Pan02 종양이 이식된 C57BL/6 마우스를 희생한 후 비장 조직을 얻었다. 주변의 지방을 제거한 비장 조직을 갈아 단일 세포로 분리한 후 세척 및 계수하여 각 동물별 비장세포를 확보하였다. 마우스 IFN- γ ELISpot 96-웰 플레이트에 각 동물별 비장세포 510⁵개씩 분주하고 1×10^5 개의 Pan02를 자극원 (stimuli)으로 추가하였다. 시험은 각 동물별로 최소 3개의 웰을 이용하여 수행하였다. 비장세포와 자극원을 37℃에서 18 시간동안 배양한 후 세척 및 2차 항체를 처리하여 비장세포에서 분비된 IFN- γ 에 의해 형성되는 spot을 발색시켰다. AID ELISpot Reader를 이용하여 염색된 플레이트에서 Spot의 개수를 계수하였다.

[0191] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스를 투여한 군에서 활성화된 T 세포에서 분비하는 IFN- γ 양과 비례하는 반점 수가 음성 대조군 (PBS 투여군) 및 모 바이러스 투여군에 비해 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0193] 6-3. 종양 침윤 림프구 확인

[0194] 마우스 체장암 세포주 Pan02 종양이 이식된 C57BL/6 마우스를 희생하여 얻은 종양 조직을 10% 중성 완충 포르말린에 고정한 후 조직처리 과정을 거쳐 파라핀에 포매된 블록으로 제작하였다. 파라핀 블록을 3 μ m 두께로 박절하여 New Silane III 코팅 슬라이드에 부착하였다. 이렇게 얻은 슬라이드에 T세포 마커 (CD3, CD4, CD8) 항체를 이용한 면역조직화학염색을 수행하였다. 슬라이드를 탈파라핀, 항원 복구를 거쳐 각각 적절한 농도로 희석된 1차 항체로 반응시켰고, 1차 항체 숙주 동물에 맞는 2차 항체까지 반응시킨 후 DAB로 발색시켰다. 종양 내 침윤된 T세포는 세포막에 갈색의 염색상으로 염색되었다. Motic Easy Scan 슬라이드 스캐너를 이용하여 염색된 슬라이드

이드의 400배 확대된 스캔 이미지를 얻었다. QuPath-0.3.2 프로그램을 이용하여 종양의 면적과 종양 내 침윤된 T세포의 개수를 분석하였고, 단위 (종양) 면적 당 침윤된 T세포의 수를 계산하였다.

[0195] 그 결과, 도 10a 내지 도 10c에 나타낸 바와 같이, B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스 투여군에서 적출한 종양에 세포독성 및 도움 T 세포가 음성 대조군 및 모 바이러스 투여군에 비교하여 유의하게 많이 침윤된 것을 확인할 수 있었다.

[0196] 상기 결과로부터, 바이러스-처리군에서 발생한 면역 증강은 높게 활성화된 T 세포, 특히, CD4 및 CD8을 발현하는 T 세포에 의한 것으로 예상되었으며, 이러한 면역 증강은 IFN- γ 활성화와 IL-12 활성화에 의한 상승적인 효과 (synergistic effect)로 판단되었다.

[0198] 실시예 7. 마우스 흑색종 모델에서 *in vivo* 항-종양 효과 확인

[0199] 7-1. 항-종양 효과 확인

[0200] 마우스 악성 흑색종 세포주 B16F10을 10% FBS, 1% AA (Antibiotic-Antimycotic) RPMI-1640 배지에 정치배양하며 유지하였다. 세포를 수확하여 계수한 후 5×10^5 개의 B16F10 세포와 Matrigel 50 μ L을 혼합하여 제모한 6주령 C57BL/6 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하주사하였다. 종양이 형성되면 장축과 단축의 크기를 caliper로 측정하며 관찰하였고, 종양의 부피는 $a^2b/2$ (a: 단축의 길이, b: 장축의 길이) 식을 이용하여 계산하였다. 평균 종양의 크기가 100 mm³에 도달하면 마우스를 무작위로 3그룹으로 나눈 뒤, 각 그룹의 마우스에 PBS (음성 대조군), 1×10^8 TCID₅₀의 모 바이러스, 및 1×10^8 TCID₅₀의 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스를 50 μ L씩 단회 종양 내 투여하였다. 종양의 크기 및 동물의 체중은 2-3일 간격으로 측정하였고, 바이러스를 투여한 날(0일)을 기준으로 9일째 동물을 희생하여 종양을 적출하였다.

[0201] 모 바이러스 및 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스를 마우스 흑색종 모델에 투여한 후 동물의 체중을 측정한 결과, 도 11a에 나타낸 바와 같이, 유의한 체중 변화를 보이지 않는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 11b에 나타낸 바와 같이, 체중에 대한 비장의 상대적인 무게를 계산한 결과, B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스 처리군이 음성 대조군 (PBS 투여군) 및 모 바이러스 투여군에 비해 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 이는 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스 처리로 면역 증강(immune boosting)이 유발된 것을 의미한다.

[0202] 모 바이러스 및 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스를 투여한 후 0일부터 9일까지 종양 부피를 측정한 결과 도 11c에 나타낸 바와 같이, 음성 대조군과 비교하여 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스 처리군에서 현저한 종양 억제를 확인할 수 있었다.

[0203] 부검 시 모든 동물의 종양 조직은 오른쪽 옆구리에서 뚜렷하게 분리되었다. 도 11d에 나타낸 바와 같이, 분리한 종양의 무게를 측정하였을 때 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스 투여군에서 뚜렷한 무게 감소를 확인할 수 있었고, 도 11e에 나타낸 바와 같이, 육안으로도 종양의 크기가 상당히 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0205] 7-2. T세포 활성화도 확인

[0206] 마우스 악성 흑색종 세포주 B16F10 종양이 이식된 C57BL/6 마우스를 희생한 후 비장 조직을 얻었다. 주변의 지방을 제거한 비장 조직을 갈아 단일 세포로 분리한 후 세척 및 계수하여 각 동물별 비장세포를 확보하였다. 마우스 IFN- γ ELISpot 96-웰 플레이트에 각 동물별 비장세포 5×10^5 개씩 분주하고 1×10^5 개의 B16F10를 자극원 (stimuli)으로 추가하였다. 시험은 각 동물별로 최소 3개의 웰을 이용하여 수행하였다. 비장세포와 자극원을 37 °C에서 18시간동안 배양한 후 세척 및 2차 항체를 처리하여 비장세포에서 분비된 IFN- γ 에 의해 형성되는 spot을 발색시켰다. AID ELISpot Reader를 이용하여 염색된 플레이트에서 Spot의 개수를 계수하였다.

[0207] 그 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이, B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스를 투여한 군에서 활성화된 T 세포에서 분비하는 IFN- γ 양과 비례하는 반점 수가 음성 대조군(PBS 투여군) 및 모 바이러스 투여군에 비해 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0209] **7-3. 종양 내 침윤된 세포독성 T세포 확인**

[0210] 각 그룹의 종양 및 비장 조직을 채취하여 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 조직을 다듬고, Shandon Excelsior ES tissue processor (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 탈수하고, 파라핀으로 침투시키고, EG1150H paraffin-embedding station (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)을 사용하여 파라핀 블록에 세로로 포매하였다. 파라핀 블록을 3 μ m로 박절하여 염색에 사용하였다.

[0211] 조직 절편을 탈파라핀화한 후 Tris/EDTA (pH9) 용액을 이용하여 항원 복구를 수행하였다. 슬라이드를 수분 상자 (moisture chamber)에 배치한 후 5% normal goat serum이 포함된 0.4% Triton-X PBS (PBST)로 실온에서 1시간 동안 블로킹(blocking)하였다. 슬라이드에 마우스 항 CD8 항체 (ab217344, Abcam, Cambridge)를 1% normal goat serum 포함 PBST에 1:100으로 희석하여 처리하였다. 각 단계마다 PBST로 3회씩 세척하였다. 2차 항체로 goat anti-rabbit IgG (H&L)-Alexa Fluor 488을 PBST에 1:1000으로 희석하여 처리하였고 1시간동안 실온에 방치하였다. DAPI를 이용한 핵 대조염색을 5분간 처리한 후 수성 봉입제로 슬라이드를 봉입하였다. 염색한 슬라이드는 형광현미경(Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰 및 촬영하였다.

[0212] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스를 투여한 군에서 적출한 종양에 침윤된 세포독성 T 세포가 막 패턴(membranous pattern)의 녹색 형광을 띄며 염색된 것을 확인할 수 있었다. 음성 대조군 및 모 바이러스 투여군에는 양성으로 염색된 세포독성 T 세포가 매우 드물게 관찰되었다.

[0214] **실시에 8. 햄스터 흑색종 모델에서 *in vivo* 항-종양 효과 확인**

[0215] **8-1. 항-종양 효과 확인**

[0216] 햄스터 악성 흑색종 세포주 RPMI 1846을 10% FBS, 1% AA (Antibiotic-Antimycotic) McCoy's 5A 배지에 정치배양하며 유지하였다. 세포를 수확하여 계수한 후 1×10^7 개의 RPMI 1846 세포와 Matrigel 100 μ L을 혼합하여 제모한 6주령 시리안 햄스터의 오른쪽 옆구리에 피하주사하였다. 종양이 형성되면 장축과 단축의 크기를 caliper로 측정하며 관찰하였고, 종양의 부피는 $\frac{a^2b}{2}$ (a: 단축의 길이, b: 장축의 길이) 식을 이용하여 계산하였다. 평균 종양 크기가 500 mm^3 이 되었을 때 햄스터를 무작위로 3그룹으로 나눈 뒤, 각 그룹의 햄스터에 PBS (음성 대조군), 1×10^8 TCID₅₀의 모 바이러스, 및 1×10^8 TCID₅₀의 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스를 100 μ L씩 단회 종양 내 투여하였다. 종양의 크기 및 동물의 체중은 2-3일 간격으로 측정하였고, 바이러스를 투여한 날(0일)을 기준으로 10일째 동물을 희생하여 종양을 적출하였다.

[0217] 모 바이러스 및 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스를 햄스터 흑색종 모델에 투여한 후 동물의 체중을 측정한 결과, 도 14a에 나타난 바와 같이, 유의한 체중 변화를 보이지 않는 것을 확인할 수 있었다. 또한 도 14b에 나타난 바와 같이, 모 바이러스 및 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스를 투여한 후 0일부터 10일까지 종양 부피를 측정한 결과 음성 대조군과 비교하여 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스 처리군에서 현저한 종양 억제 효과를 확인할 수 있었다.

[0218] 부검 시 모든 동물의 종양 조직은 오른쪽 옆구리에서 뚜렷하게 분리되었다. 도 14c에 나타난 바와 같이, 분리한 종양의 무게를 측정하였을 때 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스 투여군에서 뚜렷한 무게 감소를 확인할 수 있었고, 도 14d에 나타난 바와 같이, 육안으로도 종양의 크기가 상당히 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0220] **8-2. T세포 활성화도 확인**

[0221] 햄스터 악성 흑색종 세포주 RPMI-1846 종양이 이식된 시리안 햄스터를 희생한 후 비장 조직을 얻었다. 주변의 지방을 제거한 비장 조직을 갈아 단일 세포로 분리한 후 세척 및 계수하여 각 동물별 비장세포를 확보하였다. 햄스터 마우스 IFN- γ ELISpot 96-웰 플레이트에 각 동물별 비장세포 2.5×10^5 개씩 분주하고 5×10^4 개의 RPMI-1846를 자극원(stimuli)으로 추가하였다. 시험은 각 동물별로 최소 3개의 웰을 이용하여 수행하였다. 비장세포와 자극원을 37°C에서 18시간동안 배양한 후 세척 및 2차 항체를 처리하여 비장세포에서 분비된 IFN- γ 에 의해 형성되는 spot을 발색시켰다. AID ELISpot Reader를 이용하여 염색된 플레이트에서 Spot의 개수를 계수하였다.

[0222] 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스를 투여한 군에서 활성화된 T 세포에서 분비하는 IFN- γ 양과 비례하는 반점 수가 음성 대조군(PBS 투여군) 및 모 바이러스 투여군에 비해 유의하게 증가한

것을 확인할 수 있었다.

[0224] **8-3. 종양 침윤 림프구 확인**

[0225] 햄스터 악성 흑색종 세포주 RPMI 1846 종양이 이식된 Syrian golden 햄스터를 희생하여 얻은 종양 조직을 10% 중성 완충 포르말린에 고정한 후 조직처리 과정을 거쳐 파라핀에 포매된 블록으로 제작하였다. 파라핀 블록을 3 μm 두께로 박절하여 New Silane III 코팅 슬라이드에 부착하였다. 이렇게 얻은 슬라이드에 T세포 마커 (CD3, CD4, CD8) 항체를 이용한 면역조직화학염색을 수행하였다. 슬라이드를 탈파라핀, 항원 복구를 거쳐 각각 적절한 농도로 희석된 1차 항체로 반응시켰고, 1차 항체 숙주 동물에 맞는 2차 항체까지 반응시킨 후 DAB로 발색시켰다. 종양 내 침윤된 T세포는 세포막에 갈색의 염색상으로 염색되었다. Motic Easy Scan 슬라이드 스캐너를 이용하여 염색된 슬라이드의 400배 확대된 스캔 이미지를 얻었다. QuPath-0.3.2 프로그램을 이용하여 종양의 면적과 종양 내 침윤된 T세포의 개수를 분석하였고, 단위 (종양) 면적 당 침윤된 T세포의 수를 계산하였다. 저산소증 상태 및 바이러스의 항종양 효과로 괴사가 일어난 부분은 분석에서 제외하였다.

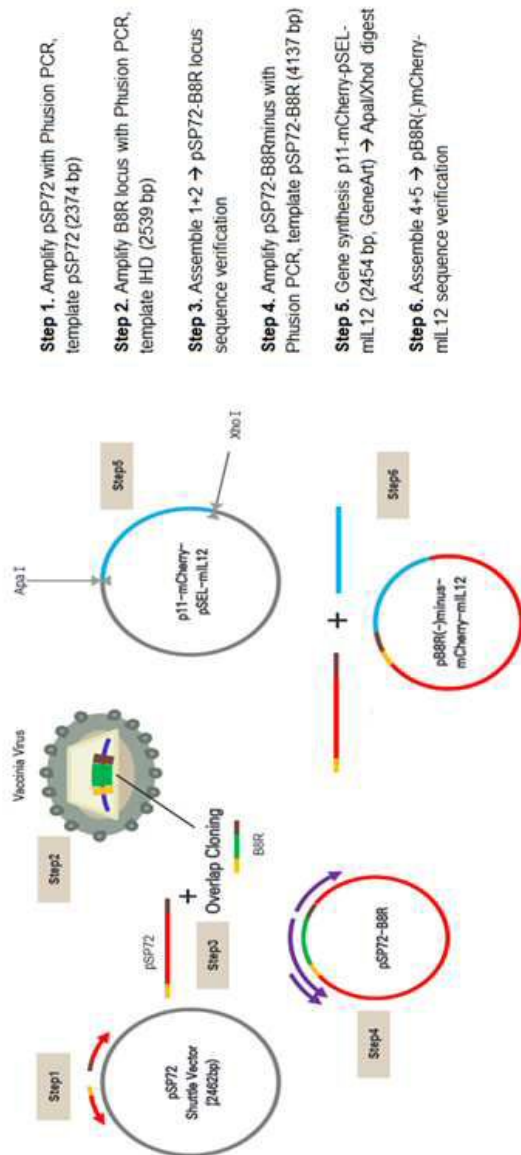
[0226] 그 결과, 도 16a 내지 도 16c에 나타내 바와 같이, B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스 투여군에서 적출한 종양에 세포독성 T 세포가 음성 대조군 및 모 바이러스 투여군에 비교하여 상당히 더 침윤된 것을 확인할 수 있었다. CD4 양성 도움 T 세포의 경우 모 바이러스 투여군에서 가장 많이 침윤된 것으로 나타났으나 그 차이의 정도가 B8R(-)mCherry-mIL12 바이러스 투여군과 크지 않았다.

[0227] 상기 결과로부터, 바이러스-처리군에서 발생한 면역 증강은 높게 활성화된 T 세포, 특히, CD4 및 CD8을 발현하는 T 세포에 의한 것으로 예상되었으며, 이러한 면역 증강은 IFN- γ 활성 및 IL-12 활성화에 의한 상승적인 효과 (synergistic effect)로 판단되었다. 다만, 햄스터 동종이식 모델에서의 결과는 바이러스에 삽입한 IL-12 유전자 서열이 마우스 유래였기 때문에 마우스와 비교하여 상대적으로 덜한 면역 증강 효과를 보인 것으로 판단되었다.

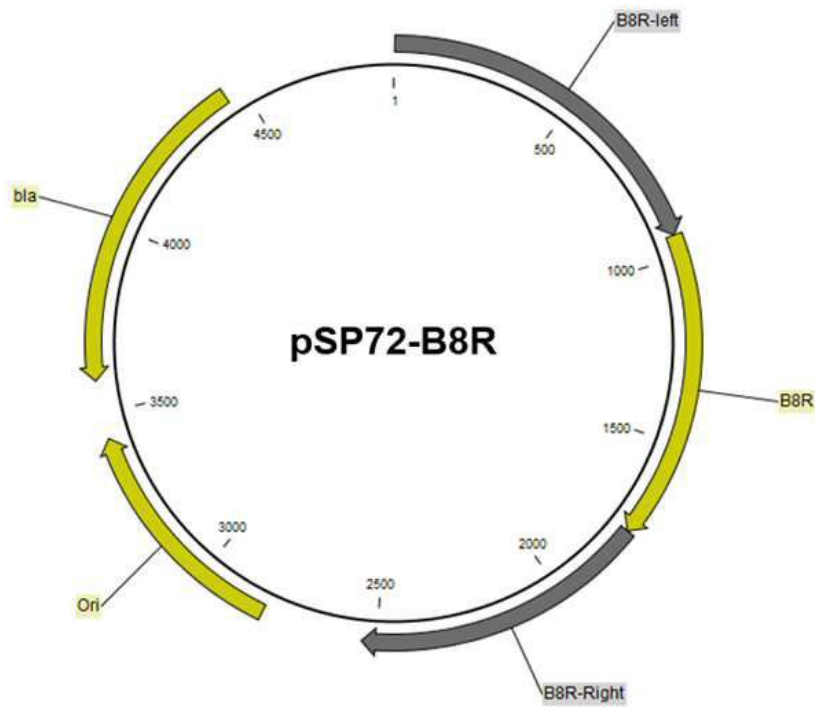
[0229] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

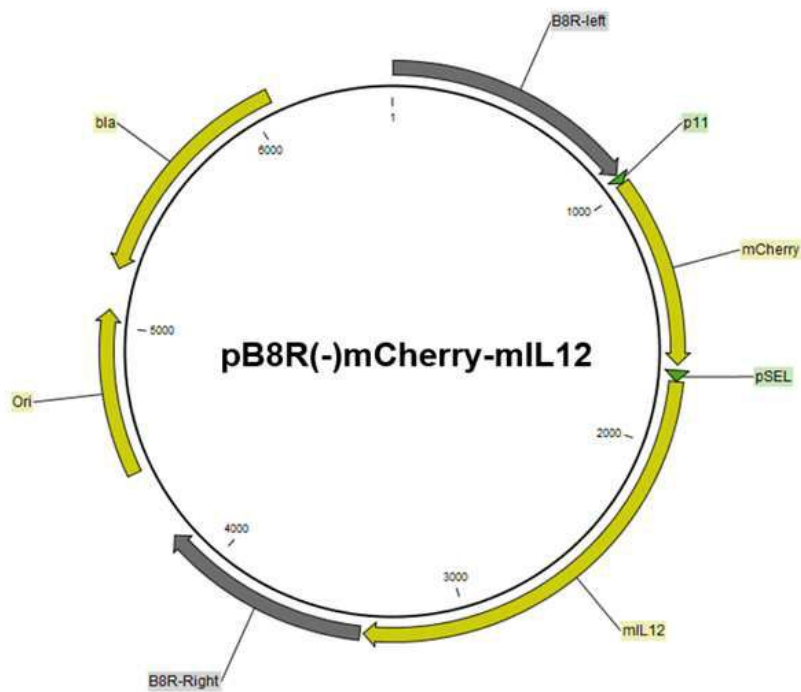
도면1



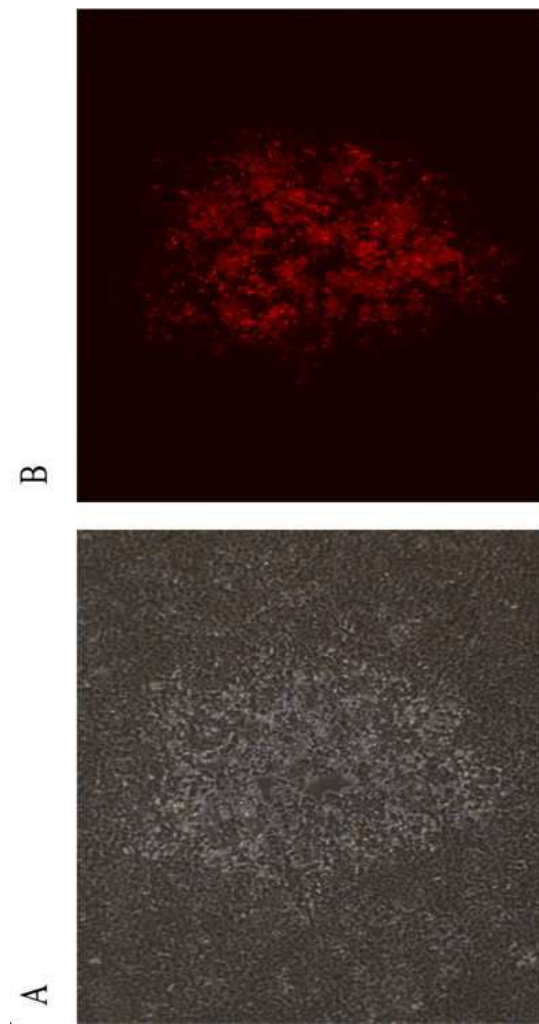
도면2a



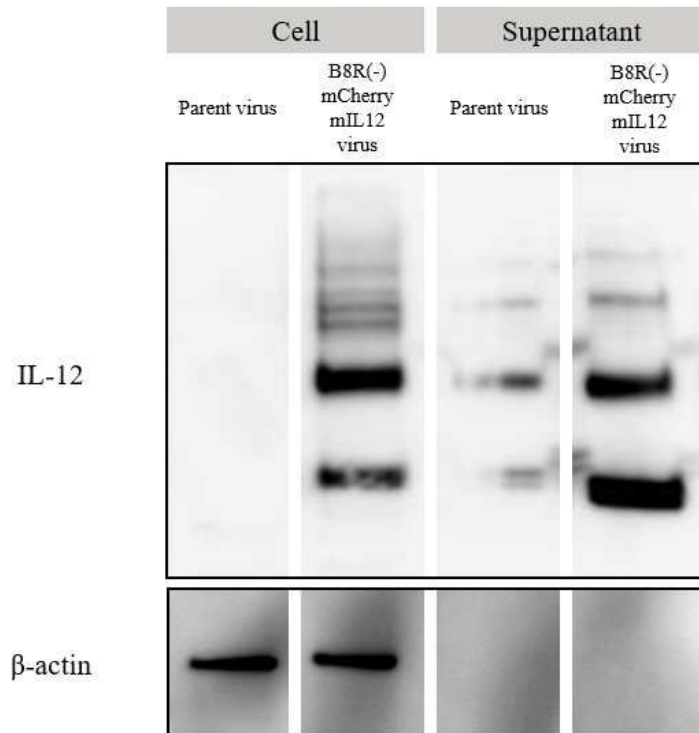
도면2b



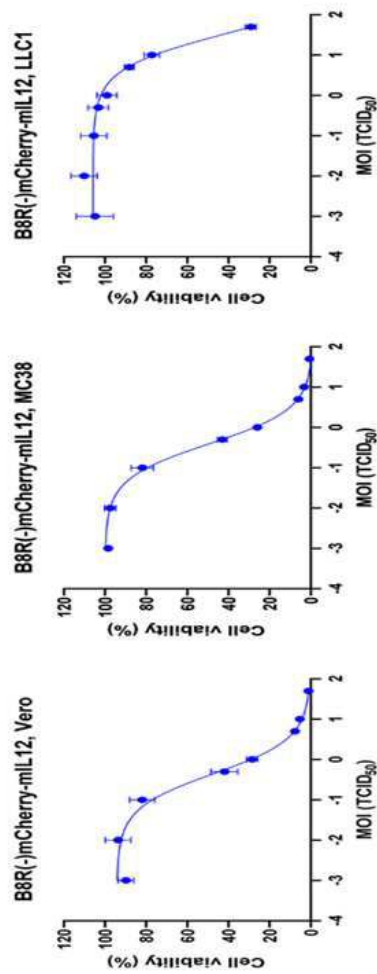
도면3



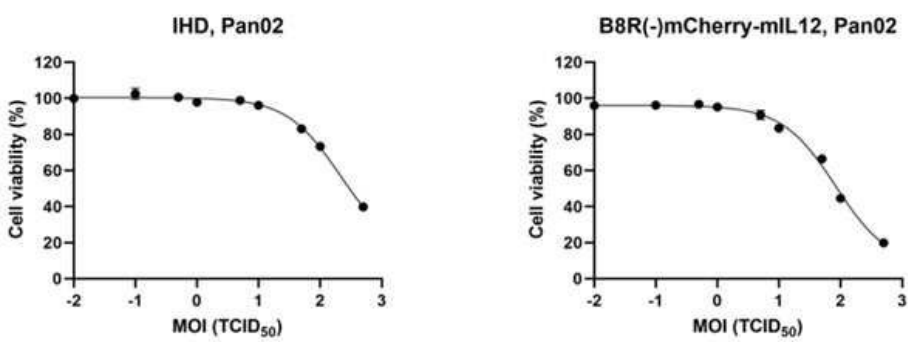
도면4



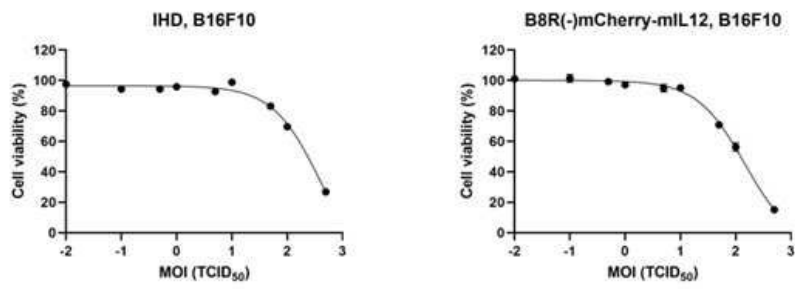
도면5



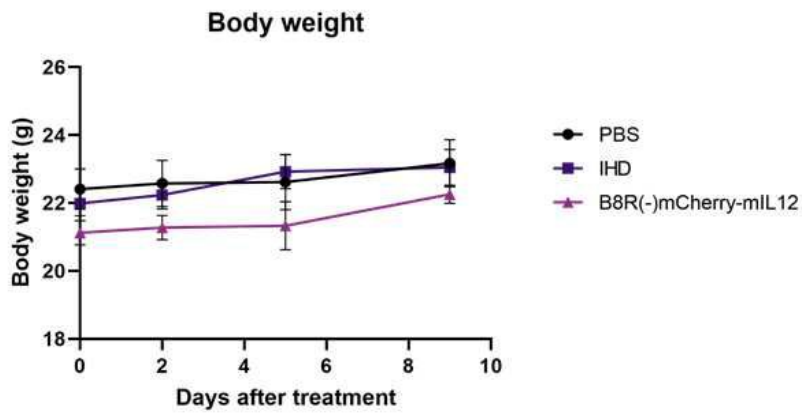
도면6



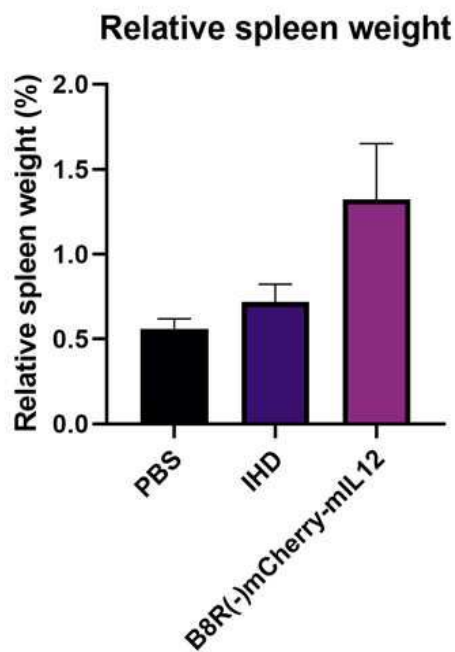
도면7



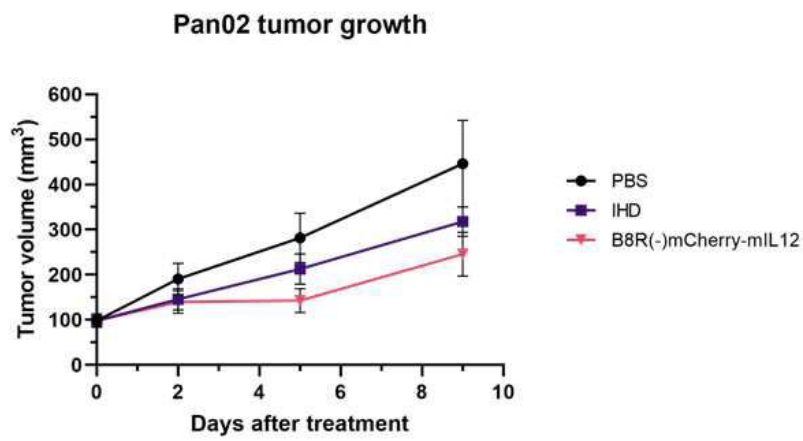
도면8a



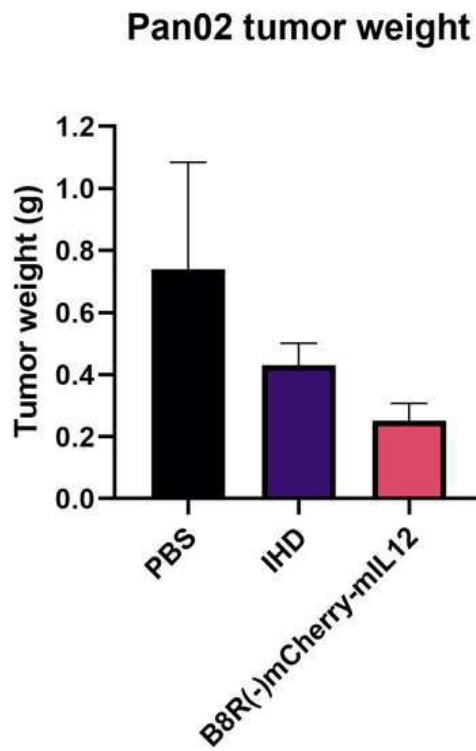
도면8b



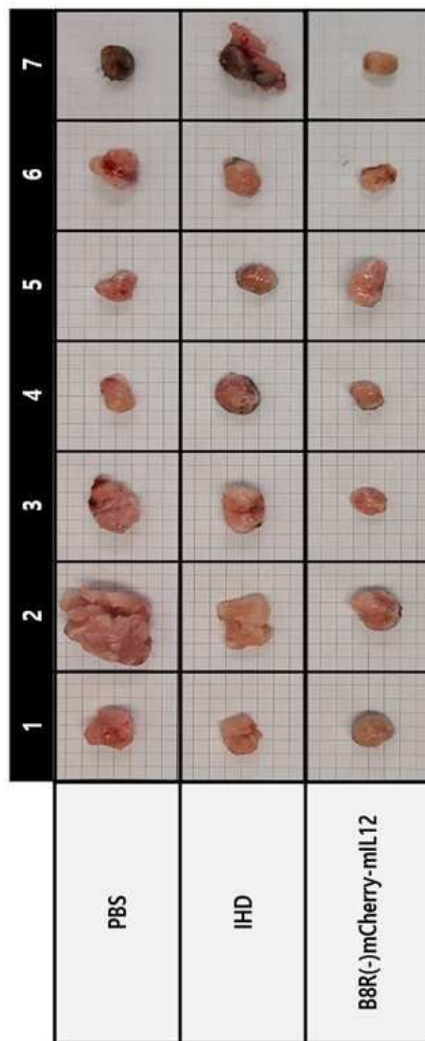
도면8c



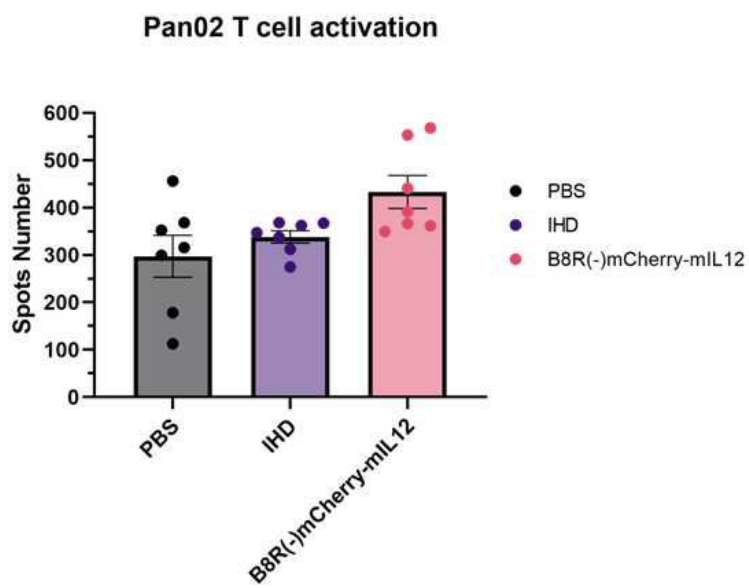
도면8d



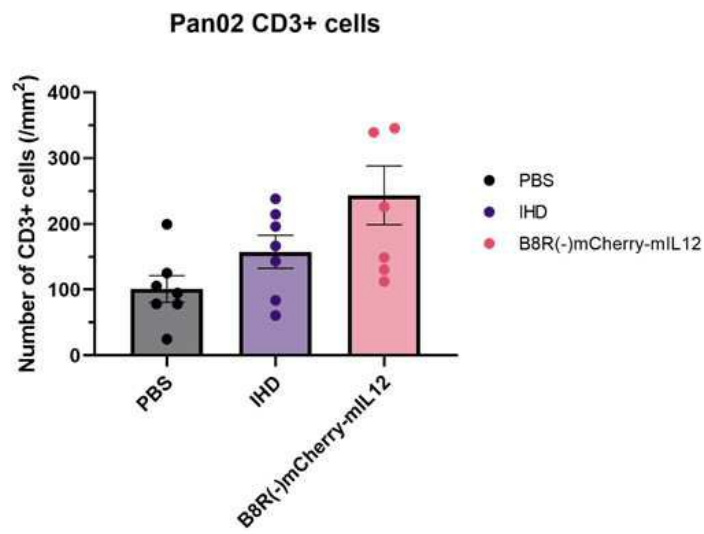
도면8e



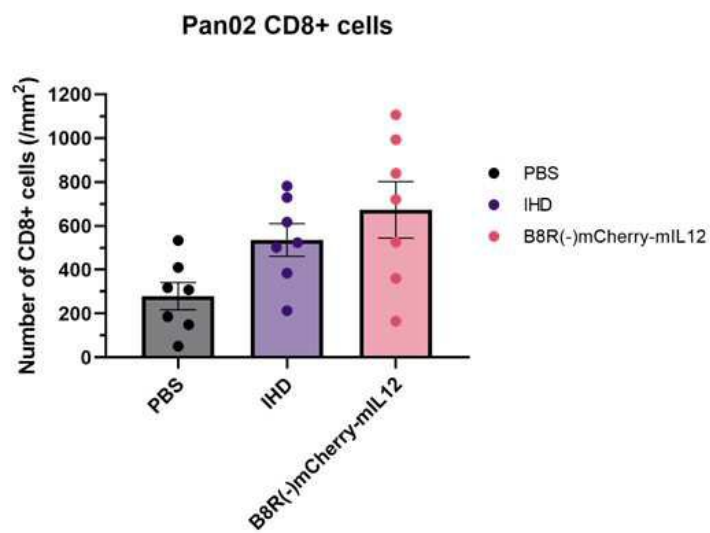
도면9



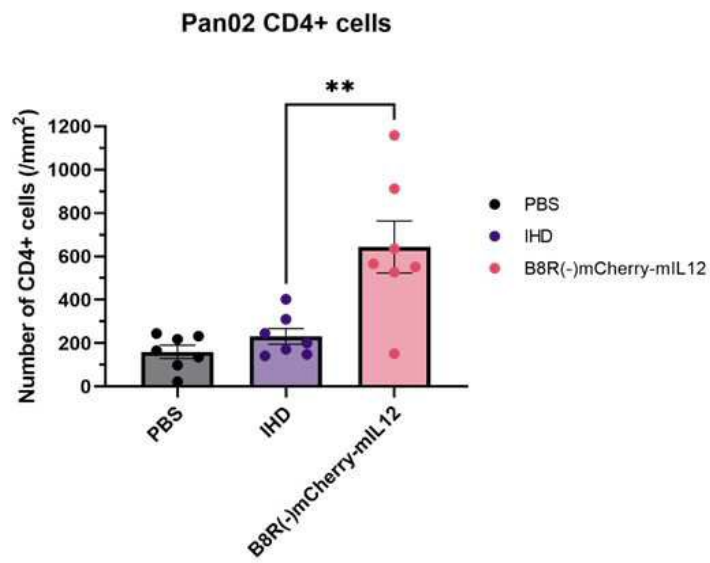
도면10a



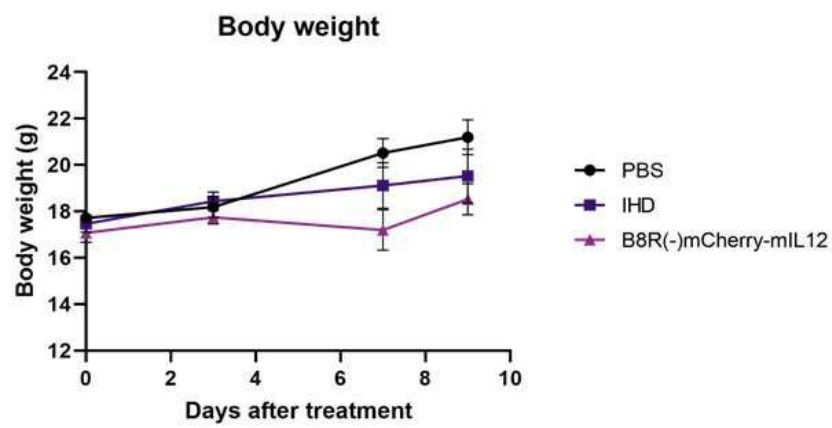
도면10b



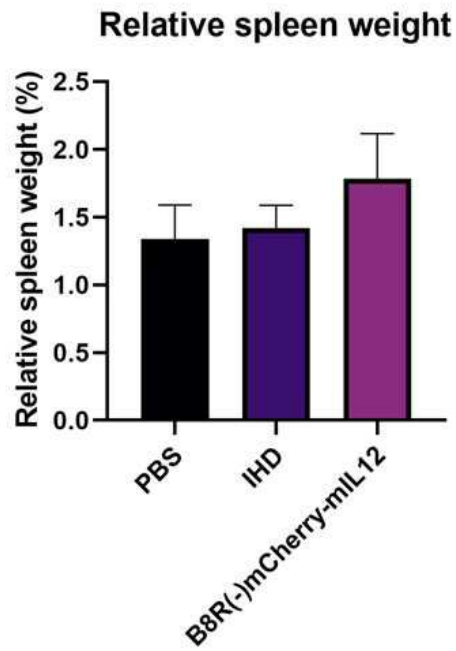
도면10c



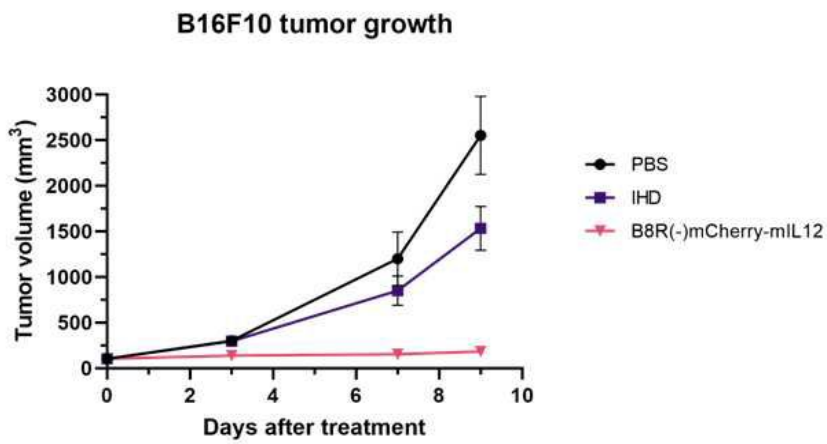
도면11a



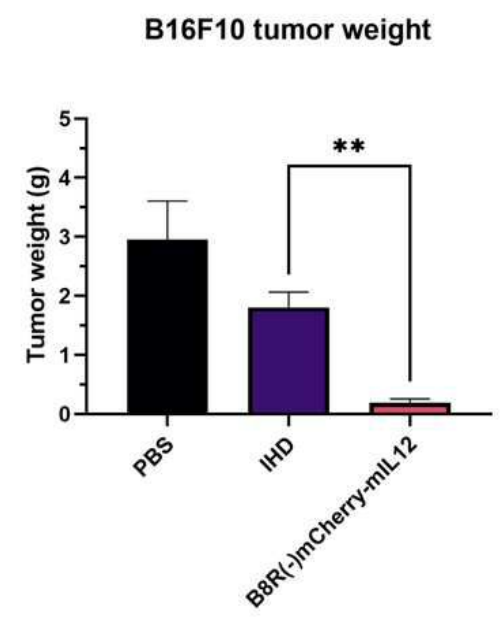
도면11b



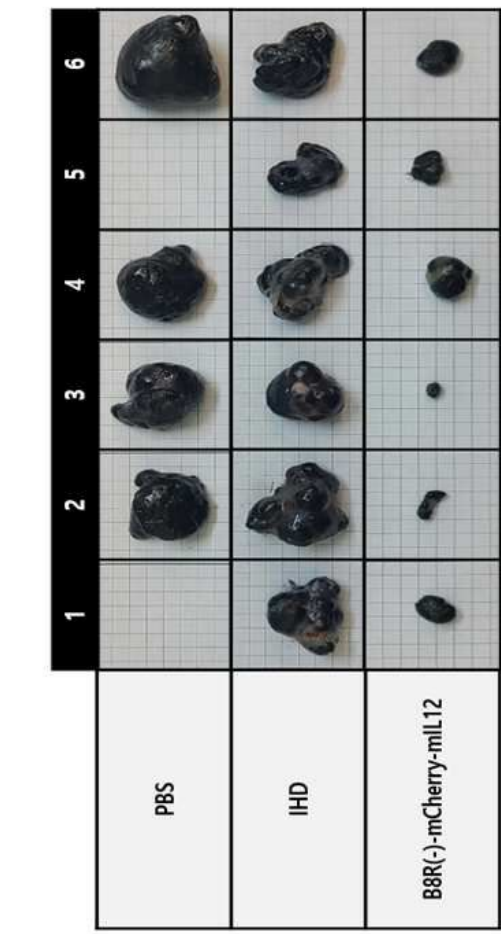
도면11c



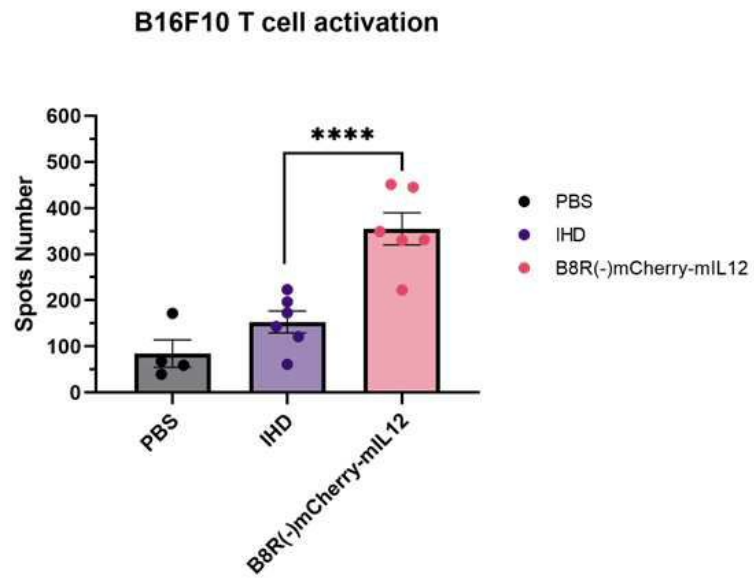
도면11d



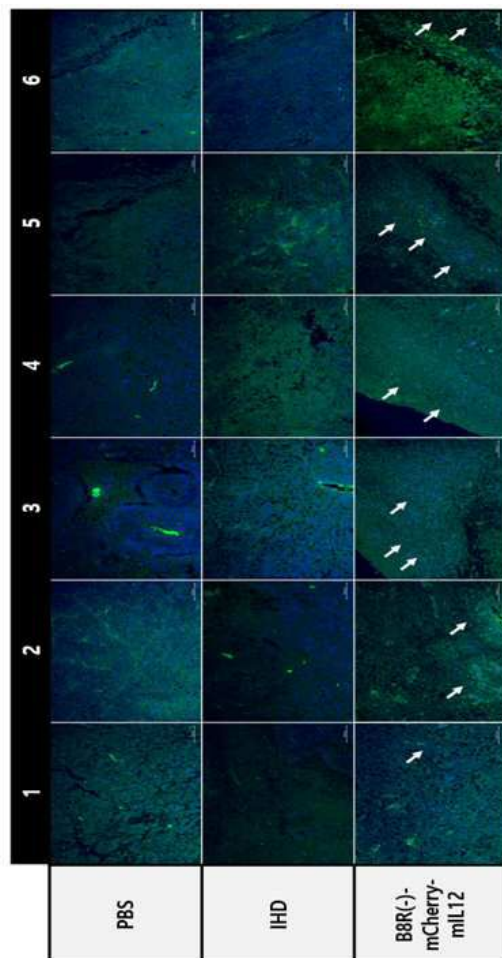
도면11e



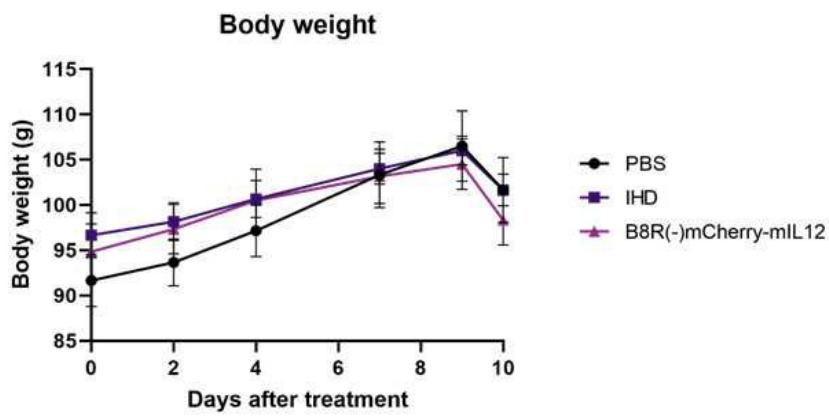
도면12



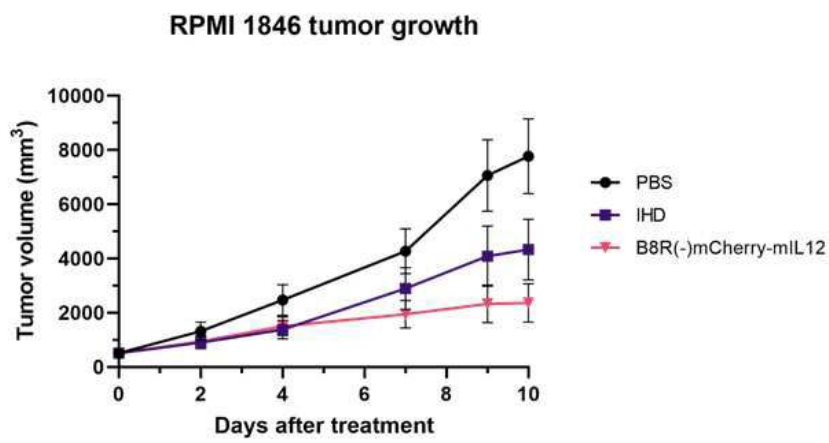
도면13



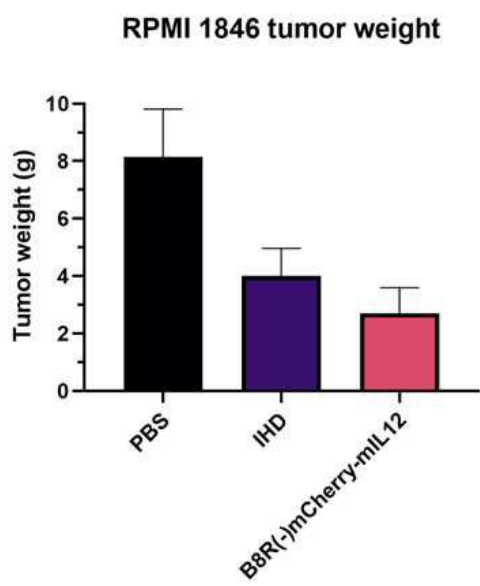
도면14a



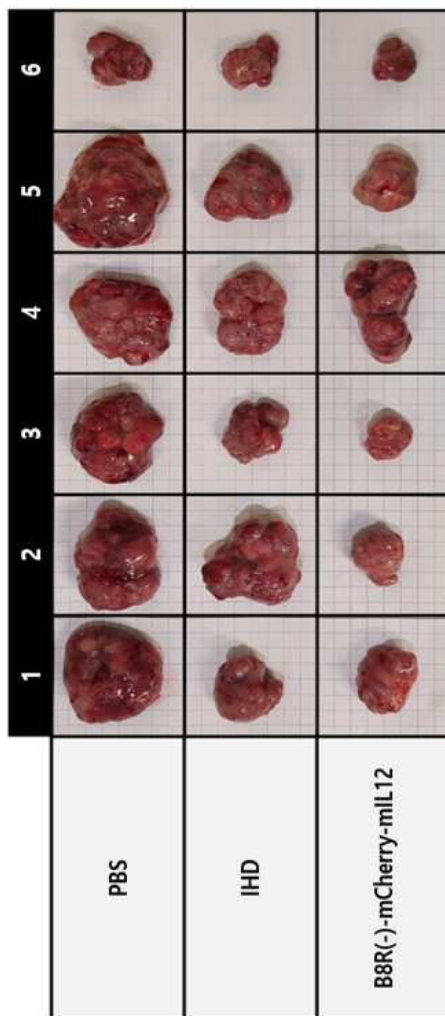
도면14b



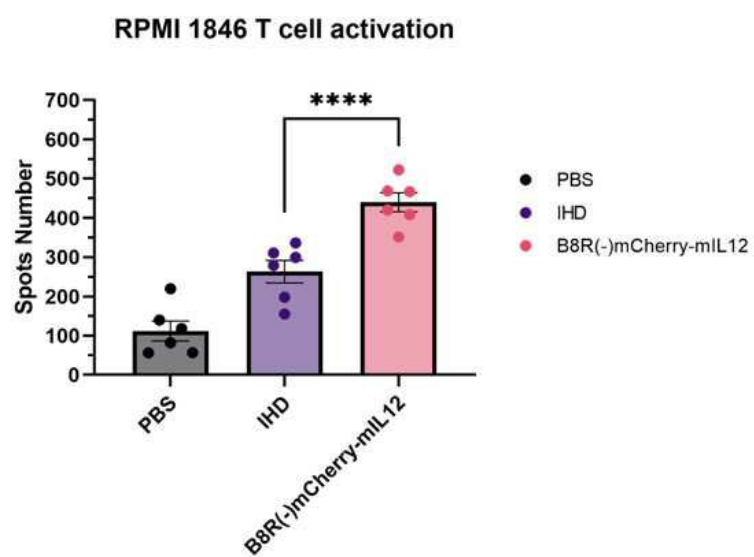
도면14c



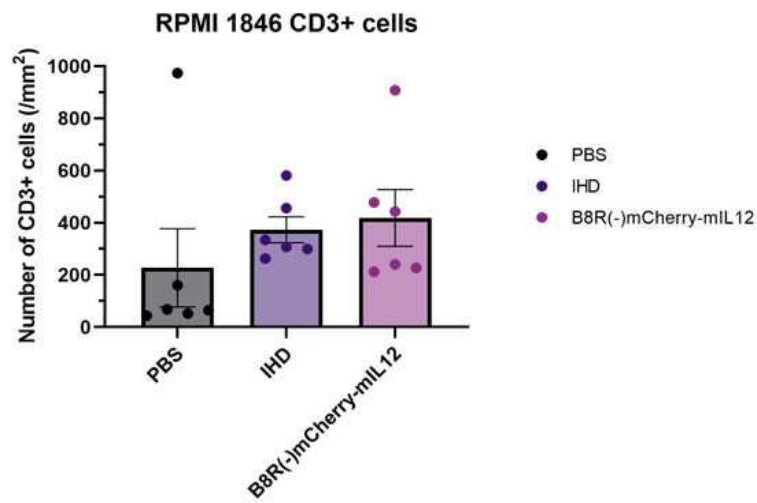
도면14d



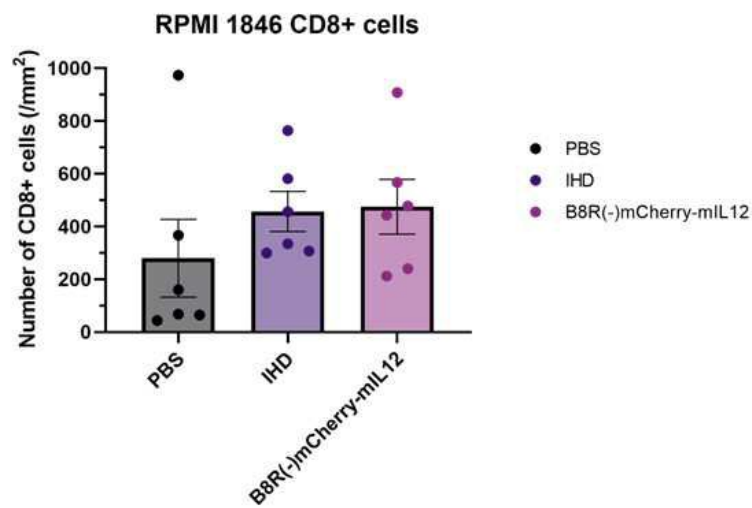
도면15



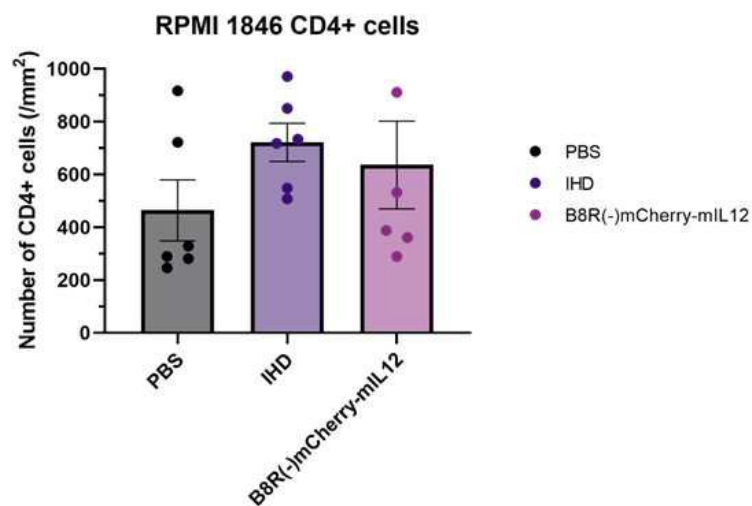
도면16a



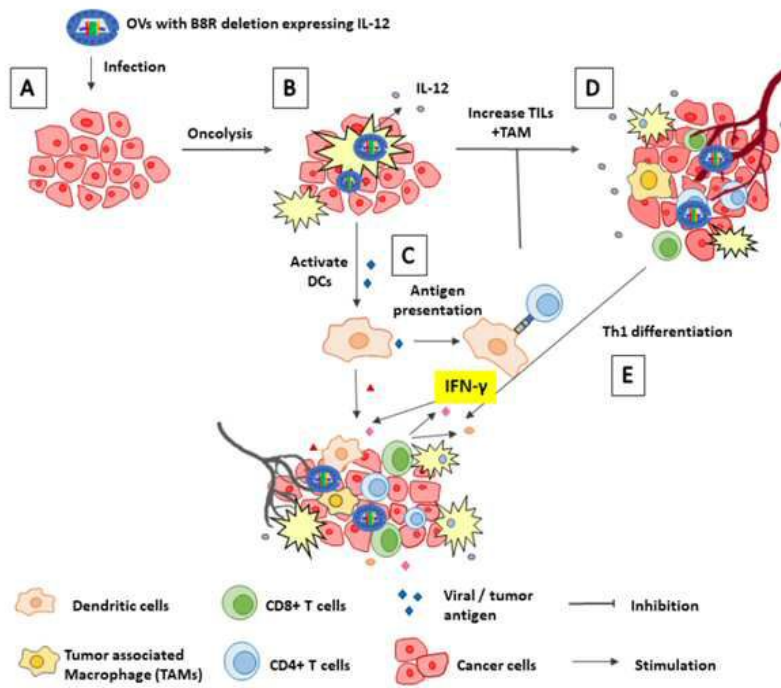
도면16b



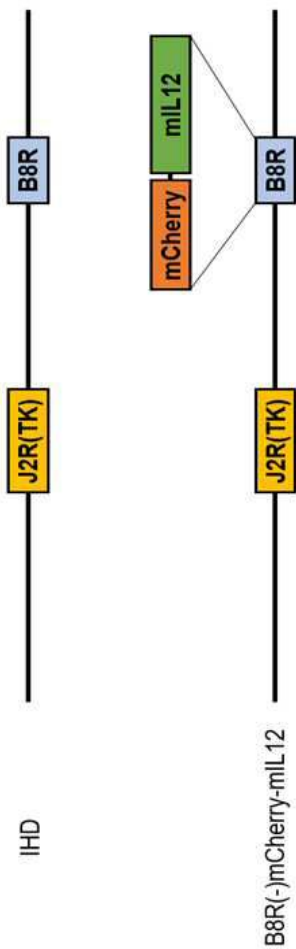
도면16c



도면17



도면18



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.