(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0011979
(43) 공개일자 2018년02월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/867 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/867 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0094611
(22) 출원일자 2016년07월26일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김연수
대전광역시 유성구 계룡로 52번길 11, 세움펠리피아 1111
강문경
대전광역시 유성구 가정로 65 (신성동,대림두레아파트)106-604
김지영
대전광역시 유성구 문화원로 118-1 (봉명동,에이스타운) 905호
(74) 대리인
이원희

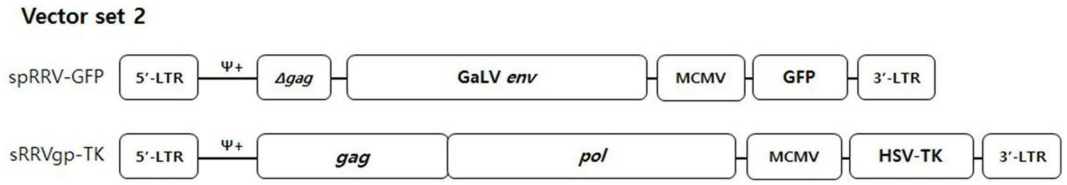
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **유전자 분할 전달 방법 및 이용**

(57) 요 약

본 발명은 유전자 분할 전달방법을 이용해 암세포조직으로의 효율적인 유전자 전달을 가능하게 하는 HSV-TK 치료유전자 최적화 복제가능 레트로바이러스 벡터 시스템에 관한 것으로써, 구체적으로 상기 벡터 시스템은 Gag, Pol 유전자 및 Env 유전자를 두 개의 벡터에 나누어서 발현시켜 양쪽 모두에 치료 유전자를 넣을 수 있기 때문에 삽입 유전자의 크기에 제한받지 않고 다양한 치료용 외래 유전자를 삽입하여 목적하는 암조직 부위에 효과적으로 전달할 수 있으며, 티미딘 키나아제 유전자를 gag-pol 벡터에 클로닝 한 sspRRVGFP/sRRVgpTK 벡터는 재조합(recombination)이 일어나지 않고 온전한 형태의 바이러스 지놈이 자가복제하여 재감염하므로, 상기 벡터시스템으로 세포주를 트랜스펙션시켜 생산된 레트로바이러스를 포함하는 암치료 유전자 전달용 조성물 및 암 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 9/1211 (2013.01)
C12Y 207/01021 (2013.01)
C12N 2740/10033 (2013.01)
C12N 2740/10041 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015M3A9B5053640
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오·의료기술개발사업
연구과제명 난치성 암치료를 위한 지능형 복제가능 레트로바이러스벡터 최적화
기 여 율 1/1
주관기관 충남대학교
연구기간 2015.09.01 ~ 2020.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

MuLV (Murine Leukemia virus, MuLV)-Gag 유전자 및 MuLV-Pol 유전자를 포함하는 제 1 재조합 발현벡터; 및 GaLV (Gibbon Ape Leukemia Virus)-Env 유전자 및 암 치료 유전자를 포함하는 제 2 재조합 발현벡터;를 포함하는 복제가능 레트로바이러스 벡터 시스템.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 암치료 유전자는 세포자살유전자, 세포사멸유도 유전자, 면역 유전자, 신생혈관형성억제 유전자, 및 암세포를 사멸시킬 수 있는 유전자침묵 (gene silencing)을 유도하는 shRNA 또는 miRNA를 발현하는 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 복제가능 레트로바이러스 벡터 시스템.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 세포자살 유전자는 전구체약물을 활성화시키는 것을 특징으로 하는 복제가능 레트로바이러스 벡터 시스템.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 세포자살 유전자는 허피스 심플렉스(herpes simplex) 바이러스의 티미딘 키나아제(thymidine kinsae)이며 전구체약물인 간사이클로비르(Ganciclovir; GCV)를 활성화시키는 것을 특징으로 하는 복제가능 레트로바이러스 벡터 시스템.

청구항 5

제 1 항의 벡터 시스템이 형질도입(transfection)된 세포주로부터 생산된 레트로바이러스.

청구항 6

제 5항의 레트로바이러스를 포함하는 암치료 유전자 전달용 조성물.

청구항 7

제 5항의 레트로바이러스를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 암은 점액상 세포 암종, 둥근 세포 암종, 국소적 진행 종양, 전이성 암, 어윙(Ewing) 육종, 암전이, 림프성 전이, 편평상피 세포 암종, 식도 편평상피 세포 암종, 경구 암종, 다발성골수종, 급성 림프구성 백혈병, 급성 비림프구성 백혈병, 만성 림프구 백혈병, 만성 골수구 백혈병, 모양 세포성 백혈병, 유출 림프종 (체강계 림프종), 흉선 림프종 폐암, 소 세포 폐암종, 피부 T 세포 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨성 림프종, 부신 피질 암, ACTH-생성 종양, 비소세포 폐암, 유방암, 소 세포 암종, 도관 암종, 위암, 결장암, 결장

직장암, 결장직장 종양 형성과 관련된 용종, 췌장암, 간암, 방광암, 1차 표면 방광 종양, 방

광의 침습성 전이 세포 방광암종, 근 침윤성 방광암, 전립선암, 대장암, 신장암, 간암, 식도암, 난소 암종, 자궁경부암, 자궁내막암, 융모암, 난소암, 원발성 복막상피 신생물, 자궁 경관 암종, 질암, 외음부암, 자궁암, 난포 중 고형 종양, 고환암, 음경암, 신장 세포 암종, 뇌암, 두경부암, 구경부암, 신경아세포종, 뇌간 신경교종, 신경교종, 중추신경계 중 전이성 종양 세포 침윤, 골종, 골육종, 악성 흑색종, 인간 피부 케라티노사이트의 종양 진행, 편평상피 세포 암종, 갑상선 암, 망막아종, 신경아세포종, 중피종, 빌름스 종양, 담낭암, 영양아세포 종양, 혈관주위세포종, 또는 카포시 육종인 것인 암 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 9

MuLV-Gag 유전자 및 MuLV-Pol 유전자를 포함하는 제 1 재조합 발현벡터를 제조하는 단계; 및

GaLV-Env 유전자 및 암 치료 유전자를 포함하는 제 2 재조합 발현벡터를 제조하는 단계;

를 포함하는 슈도타입 복제가능 레트로바이러스 벡터 시스템의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 암세포조직으로의 효율적인 유전자 전달을 가능하게 하는 HSV-TK 치료유전자 최적화 복제가능 레트로바이러스 벡터 시스템에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 유전자 치료란(gene therapy) 질환을 치료하기 위하여 환자의 세포 또는 조직에서 질환을 유발하는 비정상 유전자를 대체할 유전자나 질병을 치료하는데 도움이 되는 유전자를 삽입하는 치료기술을 통칭한다. 유전자 치료제 개발 초기에는 외부의 DNA를 표적세포의 염색체 내에 삽입하여 특정 유전자를 발현하도록 만드는 것이 유전자 치료의 주된 개념이었으나, 근래에 안티센스 올리고디옥시뉴클레오티드,작은 리보핵산(siRNA:small interfering RNA)등을 이용하여 특정 질환 관련 유전자의 발현을 억제하는 안티센스 요법 개념도 유전자 치료의 범주에 포함되고 있다.

[0004] 이러한 유전자 치료는 질환의 근본 원인을 분자 수준에서 규명하여 치료할 수 있으며, 유전자 수준에서 단백질 발현을 조절하는 것은 지금까지의 치료법과는 전혀 다른 개념의 접근 방법이고, 염기서열 특이적인 작용이기 때문에 주요 질환인자를 제거함으로서 타 치료법에서 문제시되는 불필요한 부작용을 최소화 할 수 있다. 또한 유전자를 표적으로 하는 방법이기 때문에 발현을 높이거나 억제하기 원하는 유전자의 염기서열만 알면 치료제를 제작하는데 있어 별다른 최적화가 필요없으므로 항체나 화합물 치료제와 비교할 때 치료제의 최적화 과정이 매우 간단하다. 또한 타 치료제가 표적화 할 수 없는 표적도 질병의 발병기전을 파악하여 원인이 되는 유전자만 알면 얼마든지 표적화 할 수 있기 때문에 난치병 치료제로도 사용될 수 있어, 차세대 치료제로서의 잠재 능력이 충분하다고 할 수 있다. 유전자 치료의 대상질환으로는 현재 기술로 치료하기 힘든 난치병 질환 대부분이 포함되며, 암, 에이즈, 유전질환, 신경계질환 등이 대표적이다. 기존의 의료기술로 치료하기 힘든 여러 질환들이 유전자 치료를 이용하면 치료가능성이 높아 질 수 있다는 여러 연구 결과들이 있으며 실제 임상으로의 적용이 활발히 진행되고 있는 중이다(YOUNG et al,2006).

[0005] 유전자치료제는 치료 유전자와 유전자 전달체로 구성된다. 실제적으로 유전자치료의 임상적, 상업적 성공의 가장 큰 장애물은 효과적인 유전자 전달체의 부재였으며, 유전자치료 발전과정은 효과적인 유전자전달체를 개발하여 인체에 적용하고자 하는 과정이었다.

[0007] 유전자를 생체 내로 전달하기 위한 도구인 유전자 전달체는 크게 바이러스성 전달체와 비바이러스성 전달체의 두 종류로 나눌 수 있다(Gould DJ, Favorov P. Vectors for the treatment of autoimmune disease. Gene Ther

2003; 10: 912-927). 바이러스성 벡터는 바이러스 유전자의 대부분, 혹은 일부 필수 유전자를 없애서 복제 할 수 없게 만들고 대신 치료 유전자를 삽입하여 제조한다(Lotze MT, Kost TA. Viruses as gene delivery vectors: application to gene function, target validation, and assay development. Cancer Gene Ther 2002; 9: 692-699). 이들은 상당히 고효율로 유전자를 전달할 수 있으나, 바이러스 종류에 따라 대량생산의 어려움, 면역반응 유발가능성, 독성, 혹은 복제가능 바이러스의 출현가능성 등의 단점을 지닌다. 현재 유전자치료제 개발에 활용되고 있는 주요 바이러스 벡터로는 레트로바이러스(retrovirus), 렌티바이러스(lentivirus, 일종의 레트로바이러스), 아데노바이러스(adenovirus), 아데노부속바이러스(adeno-associated virus:AAV), 허피스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus)와 폭스바이러스(pox virus)등이 있다.

[0008] 비바이러스성 벡터는 면역반응을 유도하지 않으며 독성이 낮고 대량생산이 용이하다는 장점을 지니나, 유전자 전달효율이 낮고 그 발현이 일시적이라는 단점을 지닌다.

[0009] 임상에서 많이 쓰이는 바이러스성 벡터 중 하나인 레트로바이러스 벡터는 1990년 미국 국립보건원(NIH)에서 실시된 최초의 유전자치료 임상시험에 사용된 벡터로서 치료유전자를 안정하게 삽입하기에 가장 유용한 벡터로 여겨지고 있으며, 현재까지 Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV)에 기초한 레트로바이러스 벡터가 각종 유전자 치료를 위한 임상 시험에 사용되고 있다. 자가복제가 제한된 복제불능(defective) 레트로바이러스 벡터의 경우 비교적 큰 유전자를 삽입할 수 있으며, 역가도 10^6~10^7pfu(plaque forming units)/㎖ 정도에 이르기 때문에 대상세포에의 감염에도 큰 문제가 없으며, 레트로바이러스는 packaging cell line(포장세포주)이 개발되어 있어 제조방법이 용이하며, 레트로바이러스 플라스미드 내로 치료유전자를 삽입하고 이를 포장세포내로 감염시키면 재조합 바이러스가 생성되고, 이를 대상세포에 감염시키는 방식으로 scale-up도 가능하다. 그러나 염색체로의 삽입 과정에서 유전자 삽입에 따른 돌연변이(insertional mutagenesis)가 일어날 수 있다는 이론적인 위험을 지니고 있다. 현재 레트로바이러스 벡터는 유전질환, 암 질환 등은 물론 류마티스 관절염 등에 대한 유전자치료 임상시험에 활용되어 왔다(Ghivizzani SC et al. Clinical gene therapy for arthritis. Drugs Today (Barc) 1999; 35: 389-396).

[0010] 그러나 암세포와 같이 증식성 세포에서 자가복제가 가능한 복제가능 레트로바이러스 벡터는 지놈 안정성에서 많은 논란이 있으며, 유전자 치료용 자가복제(replication-competent) 바이러스벡터 개발 시 외래도입 유전자 크기가 약 1.3 kb로 제한된다는 보고가 있으므로 internal promoter를 포함한 다양한 치료유전자 적용에 걸림돌이 되고 있다 (J. of virology(2001) Vol.75, 6989-6998,).

[0011] 레트로바이러스 벡터 기반 암 치료를 위한 치료 유전자로 허피스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus)의 티미딘 키나아제(thymidine kinase)와 같은 자살유전자, Interleukin-12, GM-CSF와 같이 면역반응을 촉진할 수 있는 사이토카인 유전자, CEA, Her-2등과 같은 종양특이적 항원유전자가 많이 사용되고 있다(Gottesman MM. Cancer gene therapy: an awkward adolescence. Cancer Gene Ther 2003; 10: 501-508). 자살유전자의 경우 암세포로 전달된 후 암을 사멸시키는데 사용되며 사이토카인 유전자 혹은 종양특이적 항원 유전자의 경우 암에 대한 면역반응을 활성화시켜 암세포를 공격하는데 이용된다.

[0012] 상기와 같은 여러 치료 유전자 중에서, 가장 널리 사용되고 있는 자살유전자로 in vitro 뿐 아니라 실제 임상 3상까지 완료된 보고가 있는 효능과 안전성이 입증된 후보물질(Human gene therapy, 4 : 725-731, 1993, Molecular therapy, 1 : 195-203, 2000)인 허피스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제(Herpes simplex virus thymidine kinase; HSV-TK)는 외부에서 주입된 세포에 무해한 간사이클로비르(gancyclovir; GCV)라는 전구약물(prodrug)을 효소반응을 통해 세포독성을 가지는 물질로 바꿈으로써 자살유전자를 가지는 세포뿐만 아니라, 간극연접(gap junction)을 통해 독성물질이 인접한 세포에 전달되어 주위의 세포 사멸을 유도하는 방관자 효과(bystander effect)를 가지는 특징이 있다. 실제로, 자살 유전자를 암 조직에서 발현시킨 뒤, 전구체를 생체에 전신적으로 투여했을 때 정상세포에는 독성이 나타나지 않지만 치료유전자가 발현되는 종양세포에만 전구체가 독성물질로 전환되어 종양세포를 파괴할 수 있다.

[0014] 그러나 치료 효과가 우수한 HSV-TK(Herpes simplex virus thymidine kinase)를 복제가능 레트로바이러스 벡터(Replicating- Retrovirus Vector; RRV)에 도입 시 프로모터 포함 유전자 크기가 약 1.8 kb로 지놈 크기가 약 10 kb 이상이 되어 지놈 안정성(stability)에 영향을 주므로 벡터 구축에 어려움이 있어왔으며, 유전자치료용 복제가능 레트로바이러스 벡터의 경우 원래 레트로바이러스가 가진 지놈 RNA(wild-type retroviral genomic RNA)외에 외래 유전자가 도입되기 때문에 지놈 RNA의 크기가 증가하고 비상동(heterologous) 염기서열이 추가되

어 재조합(recombination)이 일어나 치료유전자를 소실할 가능성이 높다.

[0016] 따라서, 본 발명자들은 지놈 크기를 최소화하면서도 재조합(recombination)이 일어나지 않는 벡터를 개발하고자 노력한 결과, 지놈 크기를 최소화하면서도 HSV-TK(Herpes simplex virus thymidine kinase)를 수반하며 재조합(recombination)이 일어나지 않아 치료 유전자 소실이 없는 안정성이 뛰어난 복제가능 레트로바이러스 벡터를 개발하였고, 상기 벡터가 효율적으로 HSV-TK(Herpes simplex virus thymidine kinase)를 발현하며, 온전한 형태의 바이러스 지놈이 생체 외(in vitro)에서 자가복제하며, 뇌종양 마우스 모델에서도 바이러스가 효율적으로 자가 복제하여 발현하고 있으므로, 상기 벡터를 암 예방 또는 치료용 약학 조성물로 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명의 목적은 MuLV (Murine Leukemia virus, MuLV)-Gag 유전자 및 MuLV-Pol 유전자를 포함하는 제 1 재조합 발현벡터; 및 GaLV (Gibbon Ape Leukemia Virus)-Env 유전자 및 암 치료 유전자를 포함하는 제 2 재조합 발현벡터;를 포함하는 복제가능 레트로바이러스 벡터 시스템을 개발해 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 MuLV (Murine Leukemia virus, MuLV)-Gag 유전자 및 MuLV-Pol 유전자를 포함하는 제 1 재조합 발현벡터; 및 GaLV (Gibbon Ape Leukemia Virus)-Env 유전자 및 암 치료 유전자를 포함하는 제 2 재조합 발현벡터;를 포함하는 복제가능 레트로바이러스 벡터 시스템을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 벡터 시스템으로 세포주를 트랜스펙션시켜 생산된 레트로바이러스를 제공한다.

[0022] 아울러, 본 발명은 상기 벡터 시스템으로 세포주를 트랜스펙션시켜 생산된 레트로바이러스를 포함하는 암 예방 및 암치료 유전자 전달용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에서는 Gag-Pol과 GalV-Env가 각각 독립된 벡터에서 발현하도록 분리하고, 티미딘 키나아제 유전자를 Gag-Pol 벡터와 GalV-Env 벡터에 각각 클로닝하여 삽입 유전자의 크기에 제한받지 않고 다양한 치료용 외래 유전자를 삽입할 수 있으며, 상기 벡터는 신경교종세포(U-87)에 감염시, 세포내 수준에서 암세포에 도입된 바이러스가 복제되어 증식하고 증식한 복제가능 레트로바이러스 벡터가 다시 주위의 암세포를 감염시켜 최종적으로 모든 세포를 감염시킬 수 있는 능력이 있으며, 뇌종양 마우스 모델에서 바이러스가 효율적으로 자가 복제하였고, 티미딘 키나아제 유전자를 Gag-Pol 벡터에 넣어서 구축한 sspRRVGFP/sRRVgpTK 벡터는 유전자 재조합에 의한 치료유전자의 소실이 없으므로 본 발명의 벡터 시스템은 암 예방 또는 치료용 약학 조성물로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 형광마커단백질을 발현하는 허피스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제 유전자(Herpes simplex virus thymidine kinase; HSV-TK)를 수반하는 복제가능 레트로바이러스 벡터의 구조를 나타낸 도로, 도 1A는 spRRV-TK가 GalV-Env 발현 구조 및 HSV-TK 유전자를 함유한 것이고, sRRVgp-RFP는 Gag-Pol 발현 구조 및 RFP 서열을 함유한 것이며, 도 1B는 spRRV-GFP가 GaLV-Env 발현 구조 및 GFP 서열을 함유한 것이고, sRRVgp-TK가 Gag-Pol 발현 구조 및 HSV-TK 유전자를 함유한 것이다.

도 2는 유세포분석기(FACS)에 의해 측정된 녹색형광단백질(green fluorescent protein; GFP)의 정량적 발현을

확인하고 역가를 계산한 도이다.

도 3은 복제가능 레트로바이러스 벡터 바이러스를 인간 신경교종세포(human glioma cell)인, U-87MG 에 순차감염시켜 복제가능 레트로바이러스 벡터의 자가복제능력을 적색형광단백질(red fluorescent protein; RFP) 및 녹색형광단백질의 형광 발현을 측정하여 나타낸 도이다.

도 4는 허피스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제 유전자를 발현하는 인간 신경교종세포(human glioma cell)인, U-87MG 세포 생존을 MTT 어세이를 통해 관찰한 도이다.

도 5는 뇌종양 마우스 모델에서 적색형광단백질의 형광발현을 측정하여 spRRV의 자가 복제능을 확인 한 도이다.

도 6은 spRRV-TK와 sRRVgp-GFP 벡터의 감염능 및 재조합을 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR)을 통해 관찰한 도이다.

적색삼각형: 예상되는 벡터 크기의 밴드;

적색별: 예상되는 Env 벡터 크기보다 작은 크기의 밴드

도 7은 spRRV-TK 벡터의 재조합결과를 분석한 도이다.

도 8은 spRRV-GFP와 sRRVgp-TK 벡터의 감염능 및 재조합을 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR)을 통해 관찰한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0029] 본 발명은 MuLV (Murine Leukemia virus, MuLV)-Gag 유전자 및 MuLV-Pol 유전자를 포함하는 제 1 재조합 발현벡터; 및 GaLV (Gibbon Ape Leukemia Virus)-Env 유전자 및 암 치료 유전자를 포함하는 제 2 재조합 발현벡터;를 포함하는 복제가능 레트로바이러스 벡터 시스템을 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명의 제 2 재조합 발현벡터는 암 치료 유전자를 포함하는 것으로, 암 치료 유전자의 종류는 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 세포자살 유전자, 세포사멸유도 유전자, 면역 유전자, 신생혈관형성억제 유전자, 및 암세포를 사멸시킬 수 있는 유전자침묵 (RNAi)을 유도하는 shRNA, miRNA 또는 siRNA를 발현하는 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0032] 상기 세포자살 유전자는 허피스 심플렉스 (herpessimplex) 바이러스의 티미딘 키나아제 (thymidine kinase), 박테리아나 효모의 싸이토신 디아미네이즈(cytosine deaminase) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0033] 상기 세포자살 유전자는 전구체약물을 활성화시킬 수 있는데, 일례로 세포자살 유전자 도입 후, 전구체약물(prodrug)을 투여하면 세포자살 유전자에 의해 전구체약물이 활성화될 수 있다.

[0034] 상기 세포자살유전자로 허피스 심플렉스 바이러스의 티미딘 키나아제 (herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK) 를 사용할 수 있으며, 상기 허피스 심플렉스 바이러스의 티미딘 키나아제 (HSV-TK)에 의해 전구체약물인 간사이클로비르(Ganciclovir; GCV)가 활성화될 수 있다.

[0036] 본 발명의 복제가능 레트로바이러스 (Replication Competent Retrovirus, RCR) 벡터는 비용균성 (nonlytic)바이러스이기 때문에 숙주 면역 시스템에 의해 세포 손상이 일어나지 않으며, 바이러스에 대한 항체가 생성되지 않기 때문에 바이러스 제거 (viral clearance)가 일어나지 않아 유전자 전달체로써 매우 우수하다.

[0037] 상기 복제가능 (Replication Competent)은 특정 바이러스에 대해 감염성이 높은 동물 세포에 상기 바이러스 유전자를 트랜스펙션 또는 상기 바이러스를 감염시켰을 경우, 그 결과로 얻어진 감염 혹은 형질전환된 세포에서 바이러스를 생산할 수 있는 능력을 가졌음을 의미할 수 있다.

[0038] 상기 복제가능 레트로바이러스는 핵막이 깨지는 틈을 타 핵 안으로 들어가기 때문에 분열하는 세포에만 감염할 수 있어 암세포에 특이적으로 감염할 수 있다. 따라서 삽입유전자가 다른 정상세포에서 발현되는 것을 막아 암세포에 유전자 전달의 안전성을 제공할 뿐만 아니라, 바이러스가 복제 가능하기 때문에 유전자 전달 효율도 증

대시킬 수 있다.

[0039] 상기 Gag 유전자는 레트로바이러스의 코어의 4종의 단백질을 이루는 폴리단백질일 수 있으며, 상기 Pol 유전자는 역전사효소를 나타내며, 상기 Env 유전자는 외피당단백질을 나타낼 수 있다.

[0040] 본 발명에서는 레트로바이러스의 GaLV-Env 유전자를 포함하는 발현벡터에 암 치료 유전자를 넣어줌으로써 유전자 재조합에 의한 치료 유전자 소실없이 유전체 전달 효율을 높일 수 있다.

[0042] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 Gag, Pol 유전자와 Env(GalV) 유전자가 각각 독립된 벡터에서 발현하도록 분리하였으며, 허피스 심플렉스 티미딘 키나아제(HSV-TK) 유전자를 Gag, Pol 유전자가 있는 벡터와 Env(GaLV)유전자가 있는 벡터에 각각 클로닝하여 복제가능 레트로바이러스 벡터를 구축하였다(도 1a 및 도1b 참조).

[0043] 또한, 본 발명자들은 상기 벡터들의 바이러스 역가를 측정한 결과, 상기 벡터는 6.13X107 TU/ml의 역가를 나타내었다(도 2 참조).

[0044] 또한, 본 발명자들은 상기 벡터들의 유효성을 확인하기 위하여 바이러스 10^6 TU/㎖을 전날 계대한 인간 신경교종세포(human glioma cell)인, U-87MG에 3일간 감염하여 상층액을 그 전날 새로 계대한 각 세포에 3일 간격으로 8번 순차 감염시켜 얻은 세포를 형광현미경으로 형광 관찰을 한 결과, 상기 벡터들이 생체외수준(in vitro)에서 효율적으로 자가복제 함을 확인하였다(도 3 참조).

[0045] 또한, 본 발명자들은 상기 벡터들의 유효성을 확인하기 위하여 상기 벡터 바이러스를 뇌종양 마우스의 뇌에 10^4 TU으로 주사하여 쥐의 뇌를 동결절단해 형광현미경으로 형광 관찰을 한 결과, 상기 벡터들은 생체내수준(in vivo)에서 효율적으로 자가복제함을 확인하였다(도 5 참조).

[0046] 또한, 본 발명자들은 중합효소연쇄반응(PCR) 및 MTT 어세이, 형광관찰을 수행하여 허피스 심플렉스 티미딘 키나아제(HSV-TK) 유전자를 Gag, Pol 유전자가 있는 벡터에 클로닝하여 구축한 벡터와 허피스 심플렉스 티미딘 키나아제(HSV-TK) 유전자를 Env(GaLV)유전자가 있는 벡터에 클로닝하여 구축한 벡터의 안정성을 비교하였다. 그 결과, 허피스 심플렉스 티미딘 키나아제 유전자를 Gag, Pol 유전자가 있는 벡터에서 발현시킬 경우, 전구체 약물인 간사이클로비르(Ganciclovir; GCV)를 처리했을때 세포 생존능이 뛰어남을 확인하였으며(도 4 참조), 유전자 재조합에 의한 치료유전자의 소실이 없이 온전한 형태의 바이러스 지놈이 자가복제하여 재감염함을 확인하였다(도 6 및 도 7 및 도 8 참조).

[0047] 따라서, 본 발명의 MuLV (Murine Leukemia virus, MuLV)-Gag 유전자 및 MuLV-Pol 유전자를 포함하는 제 1 재조합 발현벡터; 및 GaLV (Gibbon Ape Leukemia Virus)-Env 유전자 및 암 치료 유전자를 포함하는 제 2 재조합 발현벡터;를 포함하는 복제가능 레트로바이러스 벡터 시스템은 암 예방 및 암 치료용 암세포 표적성 유전자 전달용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명에서는 상기 벡터 시스템으로 세포주를 형질도입(transfection)시켜 생산된 레트로바이러스를 제공한다.

[0050] 상기 세포주의 종류는 인간 293세포, 헬라 (Hela)세포, 케나인 D17세포, 펠라인 PG4세포를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 상기 트랜스펙션 방법은 당업계에 공지된 방법에 따를 수 있으며, 리포펙타민 방법 (Invitrogen사), 미세 주입법 (Capecchi, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., Virology,52:456(1973)), 전기천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포좀-매개 형질감염법 (Wong,T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법 (Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)) 및 유전자 밤바드먼트 (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990))를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 또한, 형질감염된 세포를 배양시 본 발명에서 이용될 수 있는 배지는 동물세포의 배양에 통상적으로 이용되는 배지를 사용할 수 있으며, Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. Science 130:432(1959)), a-MEM (Stanner, C.P. et al., Nat. New Biol. 230:52(1971)), Iscove'sMEM (Iscove, N. et

al., J. Exp. Med. 147:923(1978)), 199 배지 (Morgan et al., Proc. Soc. Exp. Bio.Med., 73:1(1950)), CMRL 1066, RPMI 1640 (Moore et al., J. Amer. Med. Assoc. 199:519(1967)), F12 (Ham,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53:288(1965)), F10 (Ham, R.G. Exp. Cell Res. 29:515(1963)), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., Virology 8:396(1959)), DMEM과 F12의 혼합물 (Barnes, D. et al., Anal. Biochem. 102:255(1980)), Way-mouth's MB752/1 (Waymouth, C. J. Natl.Cancer Inst. 22:1003(1959)), McCoy's 5A (McCoy, T.A., et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med.100:115(1959)) 및 MCDB 시리즈 (Ham, R.G. et al., In Vitro 14:11(1978))를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 또한, 본 발명은 상기 벡터 시스템으로 세포주를 형질전환(transfection)시켜 생산된 레트로바이러스를 포함하는 암치료 유전자 전달용 조성물 및 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0055] 상기 레트로바이러스가 표적하는 세포는 분열 중인 모든 세포를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 암세포일 수 있다. 상기 암세포는 그 종류에 있어서 특별히 한정된 것은 아니며, 상기 암세포는 점액상 세포 암종, 둥근 세포암종, 국소적 진행 종양, 전이성 암, 어윙 (Ewing) 육종, 암전이, 림프성 전이, 편평상피 세포 암종, 식도 편평 상피 세포 암종, 경구 암종, 다발성 골수종, 급성 림프구성 백혈병, 급성 비림프구성 백혈병, 만성 림프구 백혈병, 만성 골수구 백혈병, 모양 세포성 백혈병, 유출 림프종 (체강계 림프종), 흉선 림프종 폐암, 소 세포 폐암종, 피부 T 세포 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨성 림프종, 부신 피질 암, ACTH-생성 종양, 비소세포 폐암, 유방암, 소 세포 암종, 도관 암종, 위암, 결장암, 결장직장암, 결장직장 종양 형성과 관련된 용종, 췌장암, 간암, 방광암, 1차 표면 방광 종양, 방광의 침습성 전이 세포 방광암종, 근 침윤성 방광암, 전립선암, 대장암, 신장암, 간암, 식도암, 난소 암종, 자궁경부암, 자궁내막암, 융모암, 난소암, 원발성 복막상피 신생물, 자궁 경관암종, 질암, 외음부암, 자궁암, 난포 중 고형 종양, 고환암, 음경암, 신장 세포 암종, 뇌암, 두경부암, 구경부암, 신경아세포종, 뇌간 신경교종, 신경교종, 중추신경계 중 전이성 종양 세포 침윤, 골종, 골육종, 악성 흑색종, 인간 피부 케라티노사이트의 종양 진행, 편평상피 세포 암종, 갑상선 암, 망막아종, 신경아세포종, 중피종, 빌름스 종양, 담낭암, 영양아세포 종양, 혈관주위세포종, 또는 카포시 육종으로부터 유래된 세포를 포함할 수 있다.

[0057] 본 발명의 상기 벡터 시스템으로 세포주를 형질전환(transfection)시켜 생산된 레트로바이러스를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산 알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0058] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0059] 본 발명에 따른 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 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 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 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0060] 구체적으로, 본 발명에 따른 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.1 mg 내지 100 mg, 바람직하게는 0.5 mg 내지 10 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내

지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0061] 아울러, 본 발명은 MuLV (Murine Leukemia virus, MuLV)-Gag 유전자 및 MuLV-Pol 유전자를 포함하는 제 1 재조합 발현벡터; 및 GaLV (Gibbon Ape Leukemia Virus)-Env 유전자 및 암 치료 유전자를 포함하는 제 2 재조합 발현벡터;를 포함하는 복제가능 레트로바이러스 벡터 시스템을 제공한다.

[0063] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0064] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실 시 예 1

[0066] **세포배양**

[0067] 293T (human embryonic kidney) 세포, U-87 MG (human glioma) 세포들은 10% 소태아혈청 (Invitrogen)과 항생제 (Invitrogen)를 넣어준 Dulbecco' 미디엄 에센셜 배지 (DMEM, Thermo Hyclone)로 배양하였다. 모든 실험에서 세포들은 세포배양용기 (100mm dish, 6well plate)에 5% CO2 배양기에서 배양되었으며 세포빈도가 70-80%정도 차면 1:5로 계대배양하였다.

실 시 예 2

[0069] **바이러스 벡터의 제작**

[0070] 기존 RRV 벡터는 gag, pol, env-MuLV가 하나의 지놈으로 합성되는 형태이다. 이 벡터를 gag-pol과 Env(MuLV)가 각각 독립된 벡터에서 발현하도록 분리하였으며 Env는 영장류 감염에 친화적인 GaLV(Gibbon ape Leukemia virus) Env로 치환하였다.고효율의 HSV-TK 발현 벡터를 탐색하기 위해 TK 유전자를 gag-pol 벡터와 Env(GaLV)에 각각 클로닝 하였으며, 표적 마커로 형광유전자를 각 벡터에 교차 클로닝 하였다.

[0071] 구체적으로, 본 발명의 바이러스 벡터는 하기와 같은 방법으로 제작하였다.

[0072] 1. spRRV-TK 벡터:MCMV 프로모터 아래에 멀티클로닝부위(multicloning site)를 갖고 있는 spRRV-mcs 벡터를 PmeI으로 잘라 CIAP(alkaline phosphatase, Calf intestinal)로 처리하였고, pSXLC-TK를 NcoI-XhoI으로 자른 후, T4 DNA polymerase를 처리하여 TK 유전자만 회수하여 spRRV-mcs 벡터에 클로닝 하였다.

[0073] 2. sRRVgpRFP 벡터:sRRVgp 벡터는 pol과 3' 사이에 EcoRI을 포함하고 있으며 EcoRI으로 자른 후 DNA polymerase, CIAP를 처리하였고, 본 연구실에서 기 구축한 LentiM1.4-RFP(monomer)를 PpuMI-NcoI으로 잘라 T4 DNA polymerase를 처리하여 MCMV-RFP를 회수한 후, sRRVgp 벡터에 클로닝 하였다.

[0074] 3. spRRV-GFP 벡터:GFP 발현 레트로바이러스 벡터 Retro-MCMV-GFP 벡터의 gag과 GFP사이에 GaLV-Env를 클로닝하기 위해 본 연구실에서 기 구축한 Retro-MCMV-GFP를 PmeI으로 잘랐고, GaLV Env는 PmlI이 포함되도록 PCR 한 후 해당 제한효소(restriction enzyme)로 잘라 회수 한 후 Retro-MCMV-GFP에 클로닝하여 완성하였다. 이때 프라이머[GaLV-PmlI-F 프라이머: 5'-CGGCACGTGATGGTATTGCTGCCTGGG-3'(서열번호 1); GaLV-PmlI-R 프라이머: 5'-GCCCACGTGTTAAAGGTTACCTTCGTT-3'(서열번호 2)]를 이용하였으며, GaLV를 증폭하기 위한 주형(template)은 본 연구실에서 기 구축한 MYK-GaLV 벡터를 활용하였다.

[0075] 4.spRRV-GFP 벡터:RFP 발현 레트로바이러스 벡터 Retro-MCMV-RFP 벡터의 gag와 RFP사이에 GaLV-Env를 클로닝하기 위해 본 연구실에서 기 구축한 Retro-MCMV-RFP를 PmeI으로 잘랐고, GaLV Env는 PmlI이 포함되도록 PCR 한 후 해당 제한효소로 잘라 회수한 후 Retro-MCMV-RFP에 클로닝하여 완성하였다. 이때 프라이머[GaLV-PmlI-F 프라이머:5'-CGGCACGTGATGGTATTGCTGCCTGGG-3'(서열번호 1); GaLV-PmlI-R 프라이머:5'-GCCCACGTGTTAAAGGTTACCTTCGTT-3'(서열번호 2)]를 이용하였으며, GaLV를 증폭하기 위한 주형(template)은 본 연구실에서 기 구축한 MYK-GaLV 벡터를 활용하였다.

[0076] 5. sRRVgpTK 벡터:sRRVgp 벡터는 pol과 3' 사이에 EcoRI을 포함하고 있으며 EcoRI으로 자른 후 CIAP를 처리하

였고, 본 연구실에서 기 구축한 spRRV-TK를 주형(template)으로 하여 EcoRI이 포함되도록 PCR 하였고 이후 회수하여 해당 제한효소로 잘라 sRRVgp EcoRI에 클로닝하였다. 이때 프라이머[HSV-TK-EcoRI-F 프라이머:5'-CGGAATTCATGGCTTCGTACCCCGGCCA-3'(서열번호 3); HSV-TK-EcoRI-R 프라이머:5'-GCGAATTCTCAGTAGCCTCCCCCATCTC-3'(서열번호 4)]를 이용하였다(도 1a 및 도1b).

실 시 예 3

[0078] **바이러스 생산**

[0079] 상기 <실시예 2>에서 제조한 허피스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제 유전자(HSV-TK)를 발현하는 2종의 세미-복제가능 레트로 바이러스 벡터(semi-RRV)set(1. spRRV-TK/ sRRVgpRFP, 2. spRRV-GFP/ sRRVgpTK)바이러스를 생산하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0080] 구체적으로, 293T세포를 트랜스펙션 (transfection) 하루 전날 6 well 플레이트에 6×10^5개/well의 세포를 접종하였다. 다음날 배지를 FBS가 들어있지 않은 DMEM으로 1 ㎖씩 교체하였다. 세포배양기에 플레이트 (plate)를 다시 넣고 2개의 1.5 ㎖ 튜브에 각각 DMEM을 100 ㎕/well씩 넣었다. 한 튜브에 상기 <실시예 2>에서 제조한 복제가능 레트로 바이러스 벡터(semi-RRV) DNA (total 1㎍)와 PLUS reagent (Invitrogen) 5 ㎕/well, 다른 하나에는 리포펙타민 (Invitrogen) 3 ㎕/well을 넣고 10초간 볼텍스(vortex)한다. 15분간 상온에서 배양한 후 리포펙타민이 들어있는 튜브의 용액을 PLUS가 들어있는 튜브에 넣고 다시 10초간 볼텍스 (vortex)하였다. 20분간 상온에서 배양한 후 세포가 깔려있는 플레이트를 꺼내어서 208 ㎕/well을 세포가 떨어지지 않게 방울방울 떨어뜨렸다. 세포배양기에 넣어준 뒤 4시간 뒤에 세포배지를 제거하고 3% FBS가 들어있는 DMEM을 조심히 넣어주었다. 동물실험에 사용될 바이러스는 FBS를 첨가하지 않았다. 48 시간 후에 상층액을 취하여 0.45 ㎛ 주사기 필터(syringe filter)로 여과한 후, 30 ㎖의 바이러스를 100 kDa cut-off의 cellulose로 형성된 15 ㎖ centricon으로 정제하고, 순도를 높이기 위해 15 ㎖ D-PBS로 2번 여과하여 10배 농축 한 후 50 ㎕ 씩 분주하여 80 ℃에 보관하였다.

실 시 예 4

[0082] **생산된 바이러스의 역가 측정**

[0083] 상기 <실시예 3>에서 생산된 바이러스의 역가측정을 하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0084] 구체적으로, 바이러스 감염 전날 신경교종세포(U87MG)를 6 well plate에 계대하였으며, 감염 직전 각 세포의 수를 기록하였다. 이후, 10X로 농축하여 분리한 바이러스를 새로운 배지(fresh medium)로 1X, 10X, 50X, 100X, 500X로 순차 희석하였다. 희석된 바이러스 1 ㎖을 4 ㎍/ml polybrene이 되도록 첨가 한 후 신경교종세포에 감염하였고 48시간 후에 바이러스의 역전사 저해제인 50 μM 아지도티미딘(azidothymidine; AZT)을 24시간 처리하여 바이러스 증식을 억제하였다. 이후 GFP 발현을 형광 관찰과 유세포분석기(FACS) 분석으로 정량화 하여 하기 식과 같이 역가를 계산하였다.

[0085] TU/ml = (cell number before infection X % of GFP)/dilution factor)

[0086] 그 결과, 감염 직전 신경교종세포의 개수는 $1.533X10^5$ 개였으며, 신경교종세포에 대한 바이러스 역가는 약 $6.13X10^7$ TU/ml 이라는 것을 확인하였다(도 2).

[0087]

실 시 예 5

[0088] **세포내 수준에서 복제가능 레트로바이러스 벡터(RRV) 유효성 확인**

[0089] 복제가능 레트로바이러스 벡터(RRV)의 유효성 검증은 일부 암세포에 도입된 바이러스가 복제되어 증식하고 증식한 복제가능 레트로바이러스 벡터가 다시 주위의 암세포를 감염시켜 최종적으로 모든 세포를 감염시킬 수 있는 능력을 평가하는 것으로 상기 <실시예 2>에서 구축한 복제가능 레트로바이러스벡터의 유효성을 검증하고자 형광관찰과 MTT 어세이를 수행하였다.

[0091] **<5-1> 형광관찰을 통한 복제가능 레트로바이러스 벡터 유효성 확인**

[0092] 상기 <실시예 2>에서 구축한 벡터는 GFP 및 RFP 형광 표지 마커를 포함하므로 벡터의 유효성을 확인하고자 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0093] 구체적으로, 상기 <실시예 2>에서 구축한 벡터 바이러스를 상기 <실시 예3>의 방법으로 생산한 바이러스 10^6 TU/㎖을 전날 계대한 신경교종세포(U87MG)에 3일간 감염하였으며, 상층액을 그 전날 새로 계대한 각 세포에 3일 간격으로 8번 순차 감염하였고 이를 P1(passage1)~P8(passage8)이라 명명하고 형광현미경으로 각 passage 세포의 형광을 관찰하였다.

[0094] 그 결과, P1(passage1)부터 P8(passage8)까지 바이러스가 감염된 세포에서 형광이 관찰되었으므로 상기 <실시예2>에서 구축한 벡터가 효율적으로 자가 복제함을 확인하였다(도 3).

[0096] **<5-2> MTT 어세이를 통한 복제가능 레트로바이러스 벡터 유효성 확인**

[0097] 상기 <실시예 2>에서 구축한 벡터는 허피스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제 유전자(HSV-TK)를 포함하므로 벡터에서 발현하는 허피스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제 유전자의 발현능을 확인하고자 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0098] 구체적으로, 상기 <실시예 5-1>에서 형광이 관찰된 바이러스가 감염된 각 passage의 신경교종세포(U87MG)를 96 well 플레이트에 각각 $4X10^3$개/well의 세포를 접종하고, 120 μM(30 ug/ml) 간사이클로비르(Ganciclovir; GCV)를 3일 동안 처리한 후, MTT 어세이로 세포 생존을 확인하였다.

[0099] 그 결과, spRRV-GFP/sRRVgpTK 벡터에서 Passage6까지 세포 생존이 감소함을 보였고, spRRV-TK/sRRVgpRFP 벡터는 passage2부터 세포 생존이 현저히 증가함을 확인하였으며, 상기 <실시예2>에서 구축한 벡터는 허피스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제 유전자의 발현능이 있음을 확인하였다. 또한 허피스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제 유전자는 Env 벡터에서 발현하는 것보다 gag-pol 벡터에서 발현하는 조합이 암세포 사멸에 더 효율적임을 확인하였다(도 4).

실 시 예 6

[0101] **뇌종양 마우스 모델에서 바이러스의 유효성 확인**

[0102] 생체내(in vivo)에서의 바이러스 유효성을 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0103] 구체적으로, 상기 <실시예 2>에서 구축한 spRRV-TK/sRRVgpRFP 벡터와 sspRRVGFP/sRRVgpTK 벡터 바이러스를 뇌종양 마우스의 뇌에 10^4 TU으로 주사하였고, 2주 후 쥐를 희생시켜 뇌를 동결절단하고(cryosection) 형광현미경으로 RFP 퍼짐을 확인하였다.

[0104] 그 결과, spRRV-TK/sRRVgpRFP 벡터와 sspRRVGFP/sRRVgpTK 벡터 모두 in vitro 실험에서 얻은 결과와 유의하게 바이러스가 효율적으로 자가 복제하여 형광 발현을 하고 있음을 확인하였다(도 5).

실 시 예 7

[0106] **복제가능 레트로바이러스 벡터(RRV)의 재조합(recombination) 확인**

[0107] 유전자치료용 복제가능 레트로바이러스 벡터의 경우 원래 레트로바이러스가 가진 지놈 RNA(wild-type retroviral genomic RNA)외에 외래 유전자가 도입되기 때문에 지놈 RNA의 크기가 증가하고 비상동(heterologous) 염기서열이 추가되어 재조합(recombination)이 일어날 가능성이 높다. 따라서 효율적이고 안정적인 유전자치료용 복제가능 레트로바이러스 벡터를 구축하기 위해서는 개발단계에서 재조합 여부 및 그 정도를 확인하는 것이 매우 중요하다. 상기 <실시예 2>에서 구축한 벡터의 안정성을 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0109] **<7-1> spRRV-TK/sRRVgpRFP 벡터의 안정성 확인**

[0110] 상기 <실시예 2>에서 구축한 vector set1(spRRV-TK/sRRVgpRFP)의 안정성을 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0111] 구체적으로, 상기 <실시예 5>에서 확보한 각 passage의 세포로부터 지놈 DNA를 분리한 후 Env 벡터 및 gag-pol 벡터 특이적인 프라이머[MuLV4194F 프라이머:5`-AGCAAGCTATTGGCCACTG-3`(서열번호 5); GaLV(1624)F프라이머:5`-GACTCAGTCAGCAAGTTAGAG-3`(서열번호 6); MFGSaclR 프라이머:5`-CAATCGGAGGACTGGCGCCCCGAGTGA-3`(서열번호 7)]로 연쇄중합효소반응(PCR)을 수행하여 기대 크기로 유전자가 증폭되는지, 유전자 발현이 안정적으로 지속되는지를 확인하였다. 연쇄중합효소반응(PCR)은 하기와 같은 조건으로 수행하였다. PCR 반응 튜브에 지놈 DNA 100 ng, 1X Reaction buffer, 0.25 mM dNTP, 0.2 pmol forward primer, 0.2 pmol reverse primer(forword라 기재되어있는데 reverse가 맞는지 확인 부탁드립니다), 0.2 unit Taq polymerase를 넣고 최종 볼륨이 20 ul이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하였다. 이후 94 °C, 3 분(denaturation)/ 94 °C, 30초/ 60 °C, 30초/ 72 °C, 2분 30초, 28 cycles(polymerization)/ 72 °C, 7분 (extension)에서 반응을 한 후 1% agarose gel에 걸어 반응물을 분석하였다.

[0112] 그 결과, Vector set1(spRRV-TK/sRRVgpRFP)의 Env 벡터에서 발현하는 티미딘키나아제(TK) 유전자는 passage2부터 밴드의 강도가 약해졌고 passage3부터는 크기가 급격히 작아짐을 확인하였다. 그러나 gag-pol 벡터에서 발현하는 RFP는 passage8까지 지속적으로 같은 크기의 PCR 산물이 증폭됨을 확인하였다(도 6).

[0113] 또한, 지놈 DNA 연쇄중합효소반응 후 기대 크기보다 작아진 Env vector(spRRV-TK) Passage4의 연쇄중합효소반응 산물을 회수하여 유전자 분석을 수행하였다.

[0114] 그 결과, GaLVEnv와 MCMV 프로모터 사이부터 3-LTR 직전까지 약 2 kb 유전자가 소실 되거나, GaLVEnv와 MCMV 프로모터 사이부터 HSV-TK 말단까지 약 1.8 kb가 소실되는 경향을 보였다. 이를 통해 AGAAAAAGGGGGGAAT 또는 ATGGGG라는 반복되는 염기서열 간에 재조합이 원인임을 확인하였다(도 7).

[0116] **<7-2> sspRRVGFP/sRRVgpTK 벡터의 안정성 확인**

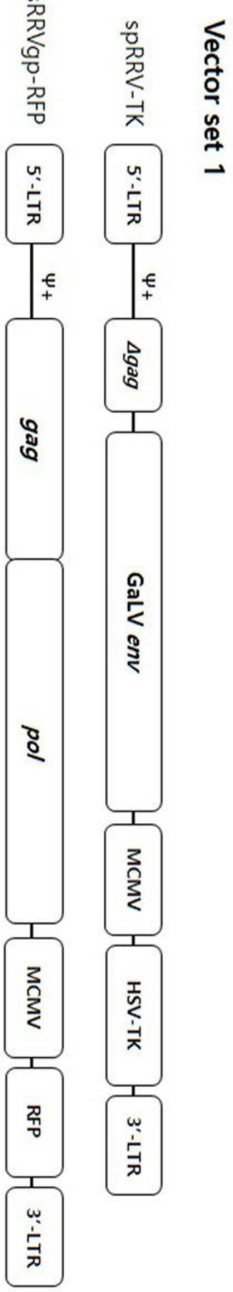
[0117] 상기 <실시예 2>에서 구축한 Vector set2(spRRVGFP/sRRVgpTK)의 안정성을 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0118] 구체적으로, 상기 <실시예 5>에서 확보한 각 passage의 세포로부터 지놈 DNA를 분리한 후 상기 <실시예 7-1>에서 사용한 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응을 수행하여 기대 크기로 유전자가 증폭되는지, 유전자 발현이 안정적으로 지속되는지를 확인하였다. 연쇄중합효소반응(PCR)은 하기와 같은 조건으로 수행하였다. PCR 반응 튜브에 지놈 DNA 100 ng, 1X Reaction buffer, 0.25 mM dNTP, 0.2 pmol forward primer,0.2 pmol reverse primer(forword라 기재되어있는데 reverse가 맞는지 확인 부탁드립니다), 0.2 unit Taq polymerase를 넣고 최종 볼륨이 20 ul이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하였다. 이후 94 °C, 3분(denaturation)/ 94 °C, 30 s초/ 58 °C, 30초/ 72 °C, 2분 30초, 28 cycles(polymerization)/ 72 °C, 7분 (extension)에서 반응을 한 후 1% agarose gel에 걸어 반응물을 분석하였다.

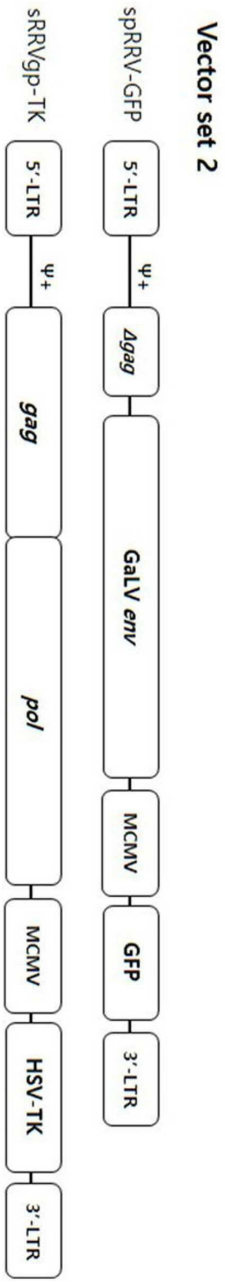
[0119] 그 결과, sspRRVGFP/sRRVgpTK 벡터는 GFP를 발현하는 Env 벡터 뿐 아니라 허피스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제를 발현하는 gag-pol 벡터 모두 passage8까지 온전한 형태의 바이러스 지놈이 자가복제하여 재감염함을 확인할 수 있었으며(도 8) spRRV-TK/sRRVgpRFP 벡터보다 sspRRVGFP/sRRVgpTK 벡터가 더 안정함을 확인할 수 있었다.

도면

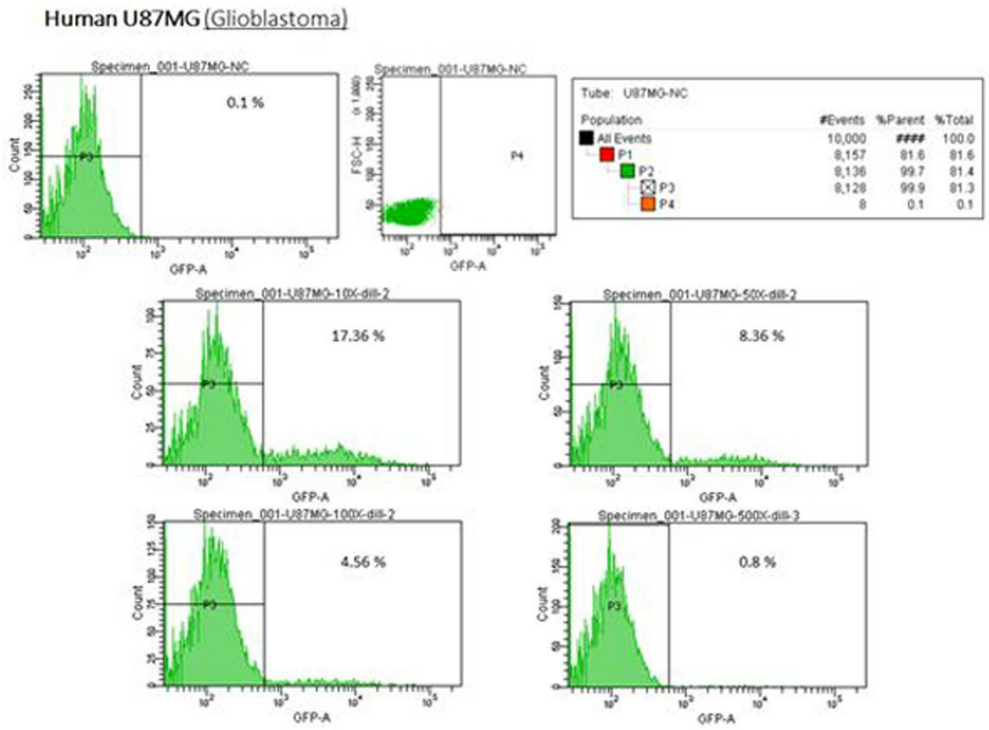
도면1a


Vector set 1
spRRV-TK
5'-LTR
Ψ+
Δgag
GaLV env
MCMV
HSV-TK
3'-LTR
sRRVgp-RFP
5'-LTR
Ψ+
gag
pol
MCMV
RFP
3'-LTR

도면1b

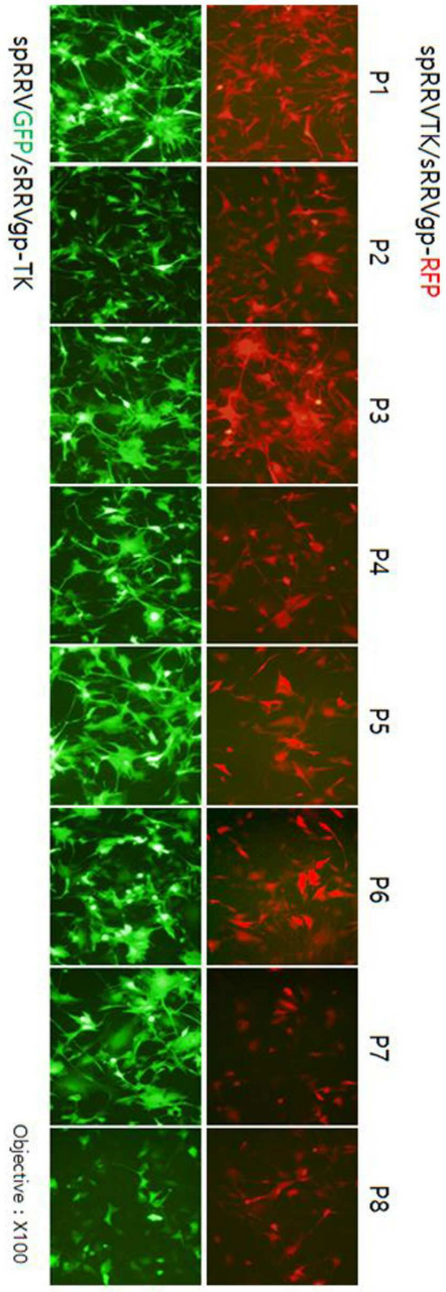

Vector set 2
spRRV-GFP
5'-LTR
Ψ+
Δgag
GaLV env
MCMV
GFP
3'-LTR
sRRVgp-TK
5'-LTR
Ψ+
gag
pol
MCMV
HSV-TK
3'-LTR

도면2

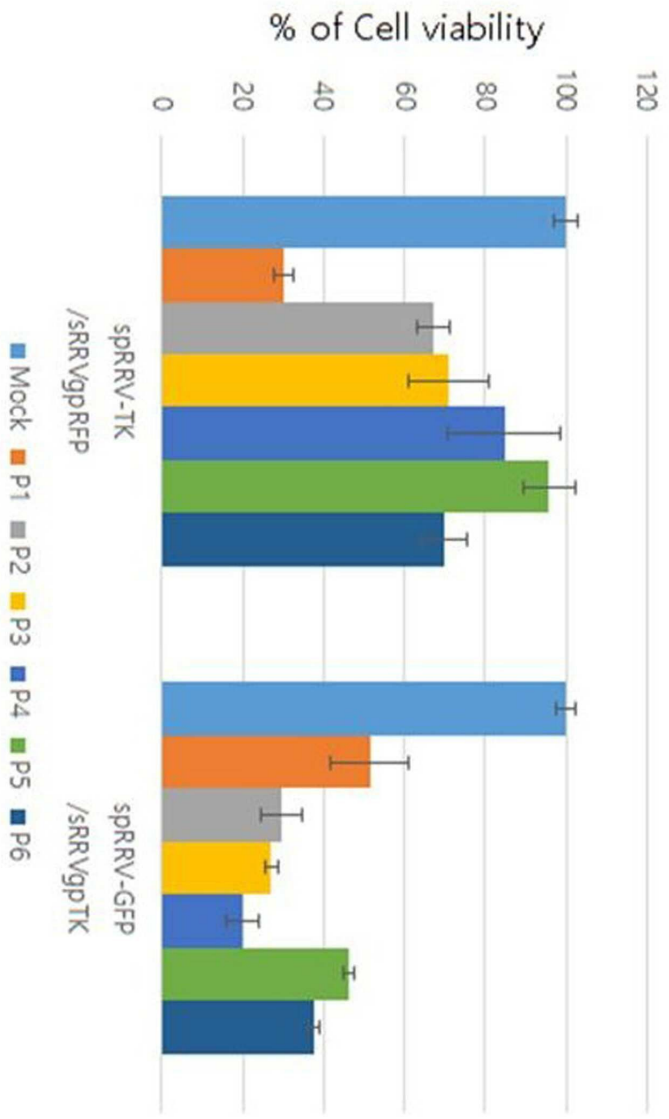


	% of GFP in mouse U87MG infected by sRCRGFP & gpTK			
	10X dilution	50X dilution	100X dilution	500X dilution
Replicate1	16.7	8.3	4.7	1.2
Replicate2	17.5	8.6	4.7	0.4
Replicate3	17.9	8.2	4.3	0.8
Average	17.36	8.36	4.56	0.8
TU /ml	2.66X10E7	6.41X10E7	7.00X10E7	6.13X10E7

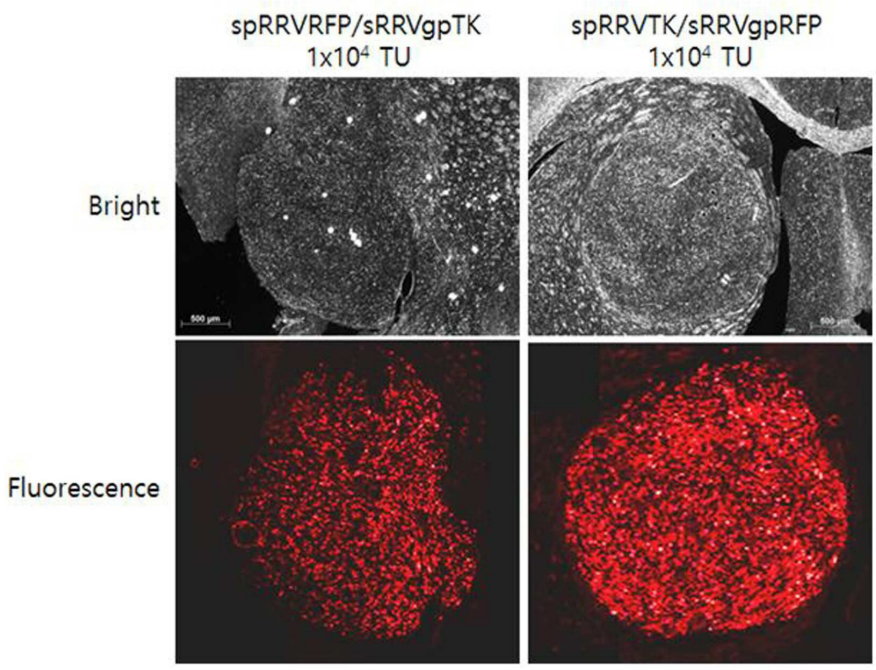
도면3


spRRVTK/sRRVgp-RFP
P1
P2
P3
P4
P5
P6
P7
P8
spRRVGFP/sRRVgp-TK
Objective : X100

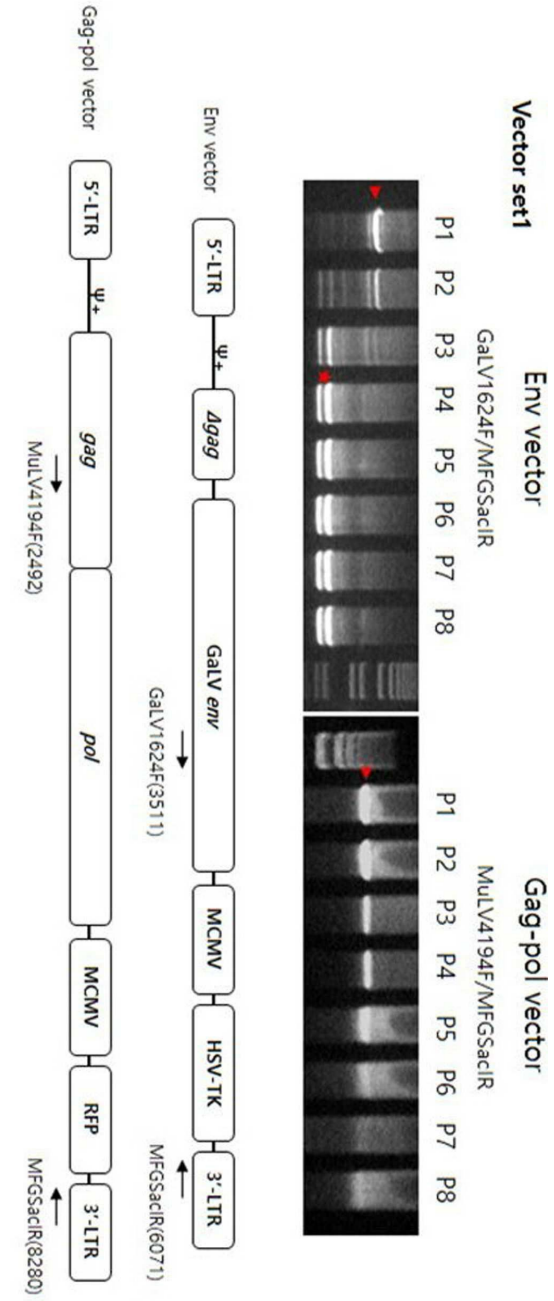
도면4


% of Cell viability
0
20
40
60
80
100
120
spRRV-TK /sRRVgpRFP
spRRV-GFP /sRRVgpTK
Mock
P1
P2
P3
P4
P5
P6

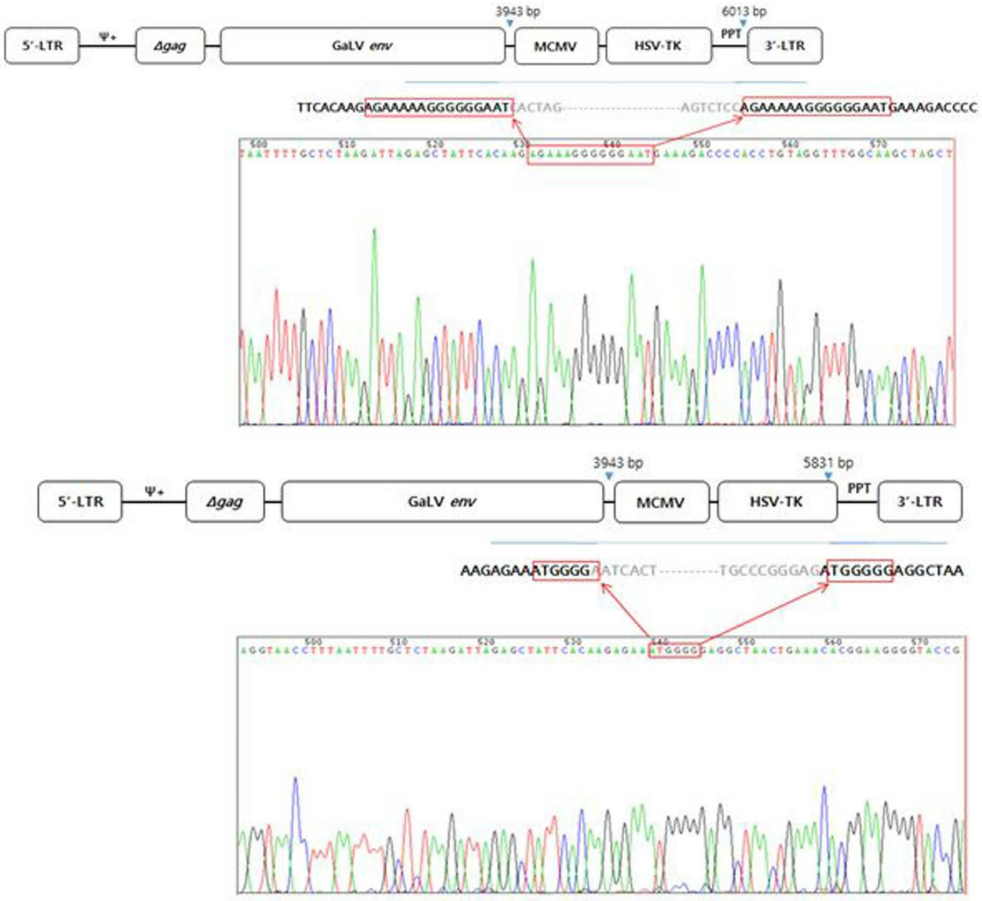
도면5


spRRVRFP/sRRVgpTK
1x10⁴ TU
spRRVTK/sRRVgpRFP
1x10⁴ TU
Bright
Fluorescence

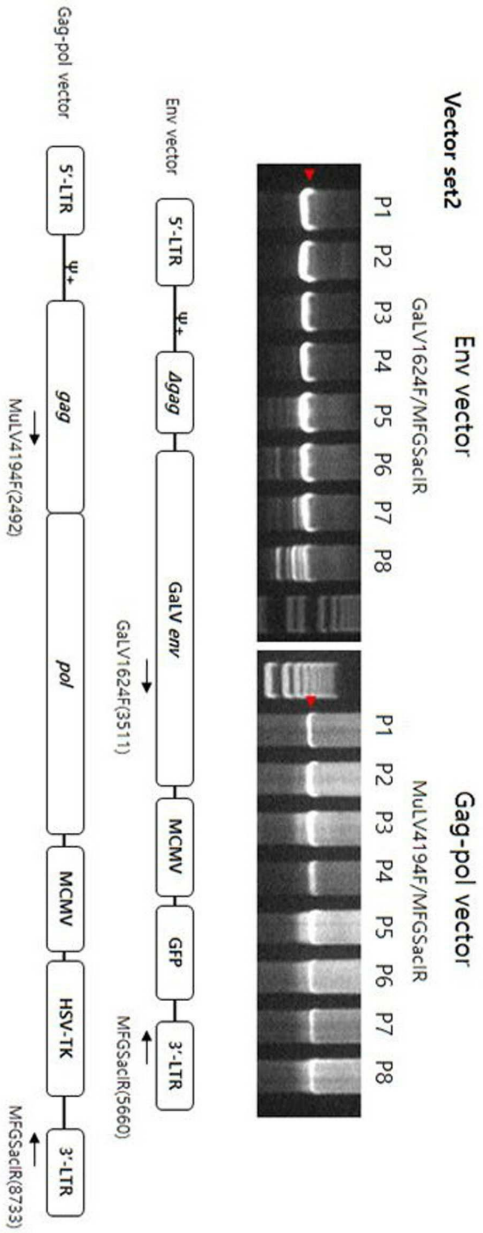
도면6


Vector set1
Env vector
GaLV1624F/MFGSacIR
P1 P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8
Gag-pol vector
MuLV4194F/MFGSacIR
P1 P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8
Env vector
5'-LTR
Ψ+
Δgag
GaLV env
MCMV
HSV-TK
3'-LTR
GaLV1624F(3511)
MFGSacIR(6071)
Gag-pol vector
5'-LTR
Ψ+
gag
pol
MCMV
RFP
3'-LTR
MuLV4194F(2492)
MFGSacIR(8280)

도면7


3943 bp
6013 bp
5'-LTR
Ψ+
Δgag
GaLV env
MCMV
HSV-TK
PPT
3'-LTR
TTCACAAGAGAAAAAGGGGGGAAT
AGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCC
3943 bp
5831 bp
5'-LTR
Ψ+
Δgag
GaLV env
MCMV
HSV-TK
PPT
3'-LTR
AAGAGAAAATGGGG
TGCCCGGGAGATGGGGGAGGCTAA

도면8



서 열 목 록

<110> Chungnam National University

<120> Splitted gene delivery system and methods of use

<130> 2016P-07-007

<160> 7

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GaLV-PmlI-F primer

<400> 1

cggcacgtga tggtattgct gcctggg 27

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GaLV-PmlI-R primer

<400> 2

gcccacgtgt taaaggttac cttcgtt 27

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HSV-TK-EcoRI-F primer

<400> 3

cggaattcat ggcttcgtac cccggcca 28

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HSV-TK-EcoRI-R primer

<400> 4

gcgaattctc agtagcctcc cccatctc 28

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MuLV4194F primer

<

400> 5

agcaagctat tggccactg 19

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GaLV(1624)F primer

<400> 6

gactcagtca gcaagttaga g 21

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MFGSaclR primer

<400> 7

caatcggagg actggcgccc cgagtga 27