

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(21) 출원번호	10-2001-7001361	(65) 공개번호	10-2001-0072162
(22) 출원일자	2001년01월31일	(43) 공개일자	2001년07월31일
번역문 제출일자	2001년01월31일		
(86) 국제출원번호	PCT/GB1999/002529	(87) 국제공개번호	WO 2000/08191
국제출원일자	1999년08월02일	국제공개일자	2000년02월17일

AP ARIPOT👨히 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 절바브웨.

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메.

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 폴란드, 사이프러스.

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우.

(30) 웃선권준장 9816781-0 1998년07월31일 영국(GB)

(73) 특허권자 바이오벡스 리미티드
영국 올스퍼드 OX14 4RX 애빙顿 밀튼 파크 70

(72) 발명자 코핀,로버트스튜어트
영국런던더블유1피6디피클리브랜드스트리트46,더윈드여빌딩,디파트먼트어브몰레큘러패솔로지,디비전어브패솔로지,유씨엘메디컬스쿨

체인, 벤자민
영국런던더블유1피6디파클리브랜드스트리트46, 더윈드여빌딩, 디파트먼트어브몰레剋러페쓰로지 디비전어브페쓰로지 유피엘메디컬스쿨

(74) 대립의 이한영

심사관 : 퇴 - 허태희

(54) 수상세포를 숙주로 하는 허파스 바이러스 벡터

요약

본 발명은 수상세포(dendritic cell)내에서 일어나는 항원처리과정을 방해하지 않으면서 수상세포를 효율적으로 감염시킬 수 있는 약독화된 허파스 바이러스(attenuated herpes virus)를 제공한다. 약독화된 허파스 바이러스 및 전기 바이러스에 감염된 수상세포는 질병을 치료하는 면역요법에 유용하다.

명세서

기술분야

본 발명은 수상세포(dendritic cell)를 효과적으로 감염시킬 수 있는 약독화된 허파스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 질병 치료를 위한 면역요법에 전기 바이러스를 사용하는 용도에 관한 것이다.

배경기술

수상세포(dendritic cell, 이하 'DC'라 함)는 가장 강력한 항원제시세포(antigen presenting cell)이며, 면역시스템에 대해 관용상태에 있는 항원에 대해서도 반응을 유발하는데 효과적이다. 그러므로, 종양에 대한 면역반응을 증가시키는 종양 면역요법에 있어서, DC가 종양특이적 항원을 제시하도록 할 수 있다면, DC의 용도는 종양 면역요법에 아주 이상적일 것이다. DC는 세균, 바이러스 또는 기생충과 같은 감염원으로부터 유래된 항원을 제시하는데 사용되어, 전기 감염원의 질병에 대한 예방 또는 치료 백신으로 제공될 수 있다. 그러나, 이러한 접근법에 있어서 전기의 표적에 대한 항원을 어떻게 DC로 효과적으로 전이시키는 것이 가장 큰 문제점으로 대두되었다.

종양 항원 또는 다른 질병과 연관된 항원에 대한 면역반응을 발생시키려는 기회를 제공하는데 있어서, 몇 가지 조건이 충족되어야 한다. 첫 번째로, 면역반응에 대한 표적으로서 작용할 수 있는 종양 또는 질병 특이적(또는 적어도 선택적인)인 분자를 식별하는 것이 필수적이다. 이것은 대부분의 흔한 종양에 대해 매우 어려운 과제임이 판명되었지만, 대부분의 자궁암의 경우 E6 및 E7 종양유발 유전자가 존재한다는 것이 알려졌으며, 다른 종양에 대해서도 훌륭한 후보 항원들이 식별되기 시작하고 있다. 예를 들어, MUC-1 유전자 산물은 난소암의 90%를 포함한 수많은 종양에서 과발현된다. 다양한 종양과 연관된 항원들이 또한 식별되고 있으며, 그것 중의 어느 것이라도 암치료를 위한 면역요법에 사용될 수도 있다. 두 번째로, 항원의 식별 후에, 면역유발형(immunogenic)의 항원을 면역계로 운반하는 것이 필수적이다. 이것은 종양 제거에 필수적인 세포면역반응을 발생시키기 위해, 단백질이 숙주세포의 세포질 안으로 운반되거나(고분자 단백질 항원에 대해서는 어려운 일) 또는 유전자 운반(gene delivery) 혹은 DNA 접종후에 숙주세포에 의해 합성되어야 한다는 것을 의미한다. 이러한 목적을 위해 고려될 수 있는 바이러스 벡터로는 백시니아(vaccinia), 아데노바이러스(adenovirus) 또는 리트로바이러스(retrovirus)가 포함한다.

최적화된 면역 자극을 제공한다고 널리 인식되고 있는 세포유형은 바로 럼프 수상세포(DC)이다(참조: Girolomoni and Ricciardi Castagnoli, 1997). 참으로, DC는 *in vivo*에서 일차면역반응(primary immune response)을 자극할 수 있는 유일한 세포유형인 것처럼 보이며, 더구나 어떤 환경에서는 이미 성립된 관용상태를 깨뜨릴 수 있는 것으로 알려졌다. 수많은 연구 그룹이 치료효과를 기대하며 종양에 대한 면역반응을 자극시키는 자가채용면역요법(autologous adoptive immunotherapy) 방법에 있어서 DC의 용도를 탐구하고 있다. 그러한 방법은 말초혈액으로부터 DC를 배양하여, *in vitro*에서 DC에 항원을 얹은 후, DC를 환자에게 재주입시키는 단계를 포함한다. 그러나, 이러한 접근법은 DC에 항원을 얹는 효율적인 방법이 없어서 실용적이지 못하였다. 최근의 연구에서, 펩티드로 흥분된 DC에 의한 항원제시가 *in vivo*에서 항종양반응을 유발하였다는 것이 보고되었다(참조: Celluzzi *et al.*, 1996; Zitvogel *et al.*, 1996). 바이러스 벡터에 대해서, 리트로바이러스는 높은 효율로 DC에 유전자 운반을 하지 않음이 밝혀졌고(참조: Reeves *et al.*, 1996; Aicher *et al.*, 1997), 본 연구진의 연구에서는, 다른 연구진에 의해 보고된 연구와는 다르게(참조: Arthur *et al.*, 1997), 아데노바이러스는 아주 낮은 효율의 유전자 운반을 하였다.

본 연구진은 예전의 연구에서, 비록 연관된 독성은 측정되지 않았지만, 허파스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus, HSV)가 DC에 효율적으로 감염되고 유전자를 운반한다는 사실을 보고하였다(참조: Coffin et al., 1998). HSV는 넓은 범위의 다양한 세포를 효과적으로 감염시킬 수 있고(다른 벡터 시스템으로는 감염시키기 어려운 것들을 포함하여, 참조: Diloo et al., 1997; Coffin et al., 1998), 조작하기 쉬우며, 다종 유전자(multiple gene)를 발현할 수 있는 거대한 DNA를 수용할 수 있다(참조: Coffin and Latchman 1996). DC에 여러 항원을 운반하여 몸 속에 재주입하는 것은 어떤 종류의 암과 감염 질병의 치료에 있어서 특별히 전도유망한 접근법이다.

발명의 요약

본 연구진은 예전에 HSV가 다른 벡터들과는 달리 효과적으로 DC를 형질도입(transduction)할 수 있다는 것을 발견했지만(참조: Coffin et al., 1998), 형질도입된 DC의 독성효과나 기능적 능력에 대해서는 평가되지 않았다. 본 연구진은 야생형 HSV부터 일부의 세포에서 복제될 수 없는 돌연변이를 가진 HSV 바이러스(비필수유전자(non-essential gene)에 돌연변이를 가진) 또는 모든 세포에서 복제될 수 없는 돌연변이를 가진 HSV 바이러스(필수유전자(essential gene)에 돌연변이를 가진) 및 필수와 비필수 유전자 모두에 조합된 결실을 가진 돌연변이까지 다양한 HSV 돌연변이를 평가하였다. 본 연구진은 이러한 다양한 돌연변이의 유전자 운반 효율 및 독성(DC 세포의 사멸로서 평가된) 레벨에 상당한 차이가 있음을 발견하였다.

놀랍게도, 본 연구진은 하기와 같은 점을 발견하였다: (i) ICP34.5, VMW65, *vhs*, 및 UL43에 불활성화 돌연변이를 가진 바이러스는, 예전에 보고된 바이러스를 포함한(참조: Coffin et al., 1998) 다른 복제 적합 바이러스(replication competent virus) 및 수많은 복제 비적합 바이러스(replication incompetent virus)보다 DC에 대해 훨씬 낮은 독성 및 훨씬 높은 유전자 운반 효율을 제공한다. 이 사실은 ICP34.5, VMW65, *vhs*, 및 UL43 모두가 비필수유전자(non-essential gene)로 간주되기에 특히 놀랄만하다. 예를 들어, 하나의 필수유전자에 결실(ICP34.5, VMW65, *vhs*, 및 ICP27에 돌연변이)을 포함한 유사한 바이러스는 전기 바이러스보다 훨씬 낮은 유전자 운반 효율을 나타낸다. 더 나아가서, 다른 돌연변이 바이러스와는 달리, 효율적인 항원처리가 일어났다는 결과는 표적세포내에서 증명될 수 있었다. 이것은 형질도입된 DC가 *in vivo*에서 효율적인 면역반응을 자극시키는 기능적 능력을 유지하고 있음을 암시한다. 본 연구진은 또한 (ii) 표적세포내에서 급발성 초기유전자(immediate early gene)가 최소 수준으로 발현되도록 조작된 바이러스(따라서, 매우 낮은 수준의 HSV 유전자 발현이 예상되는)가 비슷한 결과를 나타낸다는 것을 발견하였는데, 하나의 급발성 초기유전자가 제거된 다른 돌연변이에서는 그렇지 못하였다.

이 결과는 DC로의 효율적인 유전자 운반이 HSV 벡터를 사용하여 상대적으로 쉽게 달성될 수 있는 반면, 세포가 항원처리 능력을 보유하고 있으려면, 바이러스 내의 돌연변이의 특별한 조합이 선택되어져야 한다는 것을 보여준다. 따라서, 본 발명은 감염된 DC의 항원처리능력에 부정적인 영향없이, DC에 높은 유전자 운반효율을 나타내는 바이러스 벡터를 처음으로 제공한다.

그러므로, 본 발명은 감염세포내에서 효율적인 항원처리를 방해하지 않으면서 DC에 효과적으로 감염될 수 있는 약독화된 허파스 바이러스(attenuated herpes virus)를 제공한다. 바람직하게는, 전기 허파스 바이러스는 인간 허파스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus, HSV)이다. 보다 바람직하게는, 전기 바이러스는 HSV1 또는 HSV2 또는 비슷한 균주(strain)의 허파스 심플렉스 바이러스이다.

하나의 구체적인 실시태양에서(실시태양 (i)), 본 발명의 허파스 바이러스는 전형적으로 HSV의 기능적 UL43 유전자 및 기능적 *vhs* 유전자 또는 다른 바이러스 균주의 전기 유전자의 기능적 등가물(equivalents)이 결핍되어 있다. 바람직하게는, 본 발명의 바이러스는 HSV ICP34.5 유전자 및 다른 바이러스 종의 기능적 등가물이 또한 결핍되어 있다. 본 발명의 바이러스는 또한 기능적 VMW65 유전자 또는 다른 바이러스 균주의 전기 유전자의 기능적 등가물이 결핍될 수 있는데, 이것은 전기 유전자의 전사촉진활성을 제거하는 돌연변이에 기인한다. 두번째 실시태양에서(실시태양 (ii)), 본 발명의 허파스 바이러스는 바이러스내 결실을 의도하지 않은채 세포내 급발성 초기유전자의 발현을 최소화하는 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 그러한 바이러스는 ICP27 및 ICP4를 암호화하는 유전자 내의 불활성화 돌연변이를 가진 바이러스 및 트랜스액션(transaction) 기능을 제거한 vmw65 유전자 내의 돌연변이를 가진 바이러스를 포함한다(참조: Ace et al., 1989; Smiley et al., 1997). 그러한 바이러스는 또한 각각의 조절 급발성 초기유전자(ICP4, ICP27, ICP0 및 ICP22를 암호화하는)내의 불활성화 돌연변이를 가진 바이러스를 포함한다(비조절 급발성 초기 유전자인 ICP47의 불활성화는 옵션이다).

본 발명의 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 바이러스는 기능적인 *vhs* 유전자, 기능적인 UL43 유전자, 기능적인 ICP34.5 유전자 및 기능적인 VMW65 유전자(전사촉진활성을 제거한 전기 VMW65 유전자의 돌연변이에 기인한)가 결핍된 적어도 4개의 유전자의 돌연변이를 포함하는 약독화된 HSV 균주, 기능적인 ICP4 유전자, 기능적인 ICP27 유전자 및

기능적인 vmw65 유전자(전사촉진활성을 제거한 전기 VMW65 유전자의 돌연변이에 기인한)가 결핍된 돌연변이를 포함하는 약독화된 HSV 균주, 또는 기능적인 ICP4 유전자, 기능적인 ICP27 유전자, 기능적인 ICP0 유전자 및 기능적인 ICP22 유전자가 결핍된 돌연변이를 포함하는 약독화된 HSV 균주이다.

본 발명은 더 나아가서 이종 유전자를 가지고 있는 바이러스를 제공한다. 이종 유전자(heterologous gene)란 용어는 바이러스 게놈에서 발견되지 않는 임의의 유전자를 의미하도록 의도된 용어이다. 이종유전자는 야생형 유전자의 대립형질 변형체(allelic varient) 또는 돌연변이 유전자일 수 있다. 바람직하게는, 이종유전자는 DC, 특히 인간의 DC에서 전기 이종유전자의 발현을 가능케 하는 통제서열(control sequence)에 작동가능하게 연결되어 있다. 따라서, 본 발명의 바이러스는 이종유전자가 발현될 DC로 이종유전자를 운반하는데 사용될 수 있다.

바람직하게는, 이종유전자는 치료용도의 폴리펩티드를 암호화한다. 특히, 이종유전자는 사이토카인이나 다른 면역조절 펩티드와 같은 면역반응을 조절할 수 있는 폴리펩티드를 암호화한다. 이종유전자는 또한 비종양세포에는 존재하지 않고 종양세포에만 존재하는 항원성 폴리펩티드 또는 비종양세포에 비해 종양세포에서 발현이 잘 되는 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 본 발명의 감염된 DC는 숙주세포의 면역시스템이 종양특이적 또는 종양 우세적 항원과 반응하여 종양이 감소/퇴보하도록 자극시키기 때문에, 본 발명은 암치료에 유용할 것이다. 바람직하게는, 폴리펩티드 항원은 세포 표면 폴리펩티드하거나 또는 세포표면으로 이동하도록(예를 들어, 시그널 펩티드와 융합되어) 고안된 폴리펩티드이다. 이종유전자는 기생충, 바이러스 또는 세균 유래의 폴리펩티드를 암호화할 수 있는데, 이것은 본 발명의 바이러스에 감염된 DC에 의해 숙주 면역시스템이 감염원(pathogen)에 대해 감염전 또는 감염후에 면역반응을 생성할 수 있도록 촉진시키기 위한 것이다. 이종유전자는 또한 면역반응을 유도할 수 있도록 다른 질병(예를 들어, 헌팅턴씨 병(Huntington's disease), 알츠하이默 병(Alzheimer's disease) 또는 파킨슨씨 병(Parkinson's disease)과 같은 신경퇴행성 질병)과 연관된 단백질을 암호화할 수 있다.

본 발명은 더 나아가서, 면역요법에 의한 인간 또는 동물치료용 이종유전자를 지니고 있는 바이러스를 제공한다. 예를 들어, 전기 바이러스는 종양, 기생충, 세균 또는 바이러스 감염 치료 또는 예방에 사용될 수 있다.

본 발명의 바이러스로 형질도입된 DC가 또한 제공된다. 전기 세포는 악성종양 또는 바이러스, 세균 감염과 같은 질병을 치료하는 *ex vivo* 방법에 사용될 수 있다.

발명의 상세한 설명

A. 바이러스

본 발명의 약독화된 바이러스는 감염된 DC의 항원처리능을 제거하지 않으면서 효율적으로 DC를 감염시킬 수 있다. 본 발명의 바이러스는 1회 감염시 바람직하게는 전체 세포의 적어도 40%, 보다 바람직하게는 전체세포의 적어도 50, 60, 70 또는 80%를 감염시킬 수 있다. 본 발명의 바이러스를 사용하여 얻어진 각각의 세포내 발현 수준/효율은 발현될 폴리펩티드 및 전기 폴리펩티드를 암호화하는 유전자에 작동 가능하게 연결된 통제서열에 따라 변화하나, 적어도 야생형 바이러스를 사용하여 얻어진 값만큼 효율적이다. 부가적으로, 본 발명의 바이러스는 감염된 세포에 대해 매우 낮은 독성을 나타낸다. 감염후 세포 생존율은 감염 1일후에 바람직하게는 적어도 50%, 보다 바람직하게는 감염 1일후에 적어도 60, 70, 80 또는 90%이다.

DC로의 효율적인 감염 및 DC의 항원처리능을 유지하면서 독성을 줄이기 위하여, 본 발명의 바이러스는 전형적으로 기능적인 UL43 유전자 및 *vhs* 유전자(HSV) 또는 다른 바이러스 균주의 전기 유전자의 기능적 등가물이 결핍되어 있다. 단백질의 트랜스액션(transaction) 활성을 최소화하기 위해 vmw65를 암호화하는 유전자 내에 돌연변이를 포함 및/또는 ICP34.5를 암호화하는 유전자 내에 불활성화 돌연변이를 포함시킴으로써 바이러스의 독성을 감소시키는 부가적인 돌연변이가 도입될 수 있다. 선택적으로 또는 부가적으로, 바이러스는 급발성 초기유전자 발현을 최소화하는 돌연변이를 포함할 수 있다(더 나아가서 다른 돌연변이를 함께 포함할 수 있다). 따라서, 본 발명의 바이러스는 전형적으로 ICP27, ICP4에 돌연변이되어 있으며, 단백질의 트랜스액션(transaction) 활성을 최소화하는 vmw65에 대한 돌연변이 또는 선택적으로 ICP4, ICP27, ICP0 및 ICP22를 암호화하는 각각의 유전자에 대해 돌연변이되어 있을 수 있다. 본 발명의 바이러스는 부가적으로 ICP47을 암호화하는 유전자가 돌연변이되어 있을 수 있다.

비록 본 발명은 허파스 심플렉스 바이러스를 사용하여 예시를 들었지만, 허파스 바이러스 과(family)의 다른 바이러스들이 DC로의 효율적인 감염 및 DC의 항원처리능을 유지하면서 독성을 줄이기 위하여 변형될 수 있다는 사실을 주지하여야만 한다. 특히, 다른 허파스 바이러스 종에서 상기 HSV 유전자(특히 UL43 및 *vhs*)의 유사 유전자가 존재할 때, 전기 유사 유전자는 변형될 것이다. 선택적으로 또는 부가적으로, 급발성 초기유전자에 돌연변이를 가지거나 또는 감소된 급발성 초기

유전자 발현을 나타내는 돌연변이를 가지는 바이러스가 특히 바람직하다. "유사유전자(homologue)"라는 용어는 동등한 HSV 유전자에 대하여 아미노산 또는 핵산 서열의 유사성을 나타내는 유전자를 의미한다. 전형적으로, HSV 유전자의 유사유전자는 적어도 15%, 바람직하게는 적어도 20%의 아미노산이 동등한 HSV 유전자와 동일하다. 예를 들어, 스와인 허파스 바이러스(swine herpes virus), 슈도레이비스 바이러스(pseudorabies virus)의 *prv43* 유전자는 UL43과 23% 동일하다(참조: Powers *et al.*, 1994).

핵산 및 단백질의 유사성을 측정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, UWGCG 키트는 유사성을 계산하는데 사용될 수 있는 BESTFIT 프로그램을 제공한다(참조: Devereux *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12:387-395(1984)).

비슷하게, PILEUP 및 BLAST 알고리듬이 서열을 정렬하는데 사용될 수 있다(참조: Altschul, S.F.(1993) *J. Mol.Evol.*, 36:290-300; Altschul, S.F. *et al.*, (1990) *J. Mol.Biol.*, 215:403-10). BLAST 분석을 실행하는 프로그램은 NCBI (National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>))를 통해 공개적으로 이용 가능하다.

많은 여러 가지 세팅이 그러한 프로그램에 대해서 가능하다. 본 발명에 따르면, 기본값 설정이 사용될 수 있다.

HSV 유사 유전자는 HSV 유전자의 일부 또는 전체를 포함하는 탐침(probe)을 가지고 다른 바이러스의 게놈 또는 cDNA 라이브러리를 탐침시킴으로써 식별될 수 있다(예를 들어, 0.03M sodium chloride 및 0.03M sodium citrate, 50°C 내지 60°C의 높은 염중도(stringency) 조건에서). 선택적으로, 보존된 아미노산 서열을 암호화하는 변형체 및 유사유전자 내의 표적서열에 대해 고안된 프라이머를 사용하는 축퇴 중합효소연쇄반응법(degenerate PCR)을 사용하여 종(species)간의 유사성을 얻을 수 있다. 프라이머에는 하나 또는 그 이상의 축퇴 위치(degeneracy position)가 있을 수 있고 알려진 서열에 대한 하나의 서열 프라이머를 가지고 클로닝하는데 사용되는 염중도 조건(stringency condition)보다 낮은 염중도 조건에서 사용될 수 있다.

안전성(safety)의 이유로, 본 발명의 바이러스는 표적세포에서 효율적으로 복제될 수 없도록 약독화(attenuated)되었다. 약독화를 위해 변형된 바이러스 영역은 제거되거나(완전히 또는 부분적으로), 기능을 발휘하지 못하도록 만들거나, 이종 유전자 서열에 의해 치환될 수 있다. 약독화 돌연변이는 바이러스 벡터로 사용되는 모든 바이러스 그룹에 대해 이미 기술되어 있다. 예를 들어, HSV는 ICP34.5 및/또는 ICP4와 ICP27같은 필수유전자의 돌연변이에 의해 비독성(avirulence)이 될 수 있다.

1. 허파스 심플렉스 바이러스(Herpes Simplex Virus)

i. 바이러스

본 발명의 바이러스가 허파스 심플렉스 바이러스일 때, 바이러스는 HSV1 또는 HSV2 균주 또는 그것의 유도체로부터 유래될 수 있으며, 바람직하게는 HSV1으로부터 유래된다. 유도체는 HSV1 및 HSV2 균주의 DNA를 포함하는 상호형 재조합체(inter-type recombinant)를 포함한다. 유도체는 여기 기술된 방법에 의해 측정되었을 때, 바람직하게는 HSV1 또는 HSV2 게놈에 대해 적어도 70%의 서열 유사성을 가지며, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 가장 바람직하게는 적어도 90 또는 95%의 유사성을 갖는다. 본 발명의 바이러스를 획득하기 위해 사용될 수 있는 다른 유도체는, 본 발명의 바이러스에서 기능적으로 불활성화될 수 있는 유전자 내의 돌연변이를 이미 가지고 있는 균주, 예를 들어, 균주 1716(참조: MacLean *et al.*, 1991), 균주 R3616 및 R4009(참조: Chou and Roizman, 1992) 및 R930(참조: Chou *et al.*, 1994)(이들 모두는 ICP34.5에 돌연변이를 가지고 있다), ICP4에 결실을 가진 균주 d120(참조: DeLuca *et al.*, 1985), ICP27에 결실을 가진 균주 d27-1(참조: Rice and Knipe, 1990), ICP27 및 ICP4에 결실을 가진 균주 d92를 포함한다. 이러한 균주들의 사용은 본 발명의 돌연변이 HSV 균주를 작제하는데 필요한 수많은 단계를 감소시킬 것이다.

다양한 HSV 유전자를 기술하는데 필요한 용어는 Coffin 및 Latchman, 1996에서 찾을 수 있다.

ii. 상보적 세포주(complementing cell line)

본 발명의 허파스 심플렉스 바이러스가 ICP4 또는 ICP27를 암호화하는 특정 필수유전자가 결핍되어 있을 때, 본 발명의 바이러스는 필수유전자를 발현하는 세포주를 사용하여 증식할 수 있다. 예를 들어, 바이러스가 ICP27 유전자가 결핍되어 있을 때, 바이러스는 V27 세포주(참조: Rice and Knipe, 1990), 2-2 세포주(참조: Smith *et al.*, 1992) 또는 B130/2 세포주(참조: WO98/30707), 바람직하게는 B130/2 세포주를 사용하여 증식할 수 있다. 바이러스가 ICP4 유전자가 결핍되어 있을 때, 바이러스는 ICP4를 발현하는 E5 세포주(참조: Deluca *et al.*, 1985)를 사용하여 증식할 수 있다. 바이러스가 ICP4

및 ICP27 유전자가 결핍되어 있을 때, 바이러스는 ICP4 및 ICP27을 동시에 발현하는 E26 세포주(참조: Samaniego *et al.*, 1995)를 사용하여 증식할 수 있으며, 바이러스가 부가적으로 기능적인 vmw65 유전자가 결핍되어 있을 때, 바이러스는 vmw65의 비HSV 유사유전자(예를 들어, 이くん 허파스 바이러스(equine herpes virus) 유전자 12 또는 보바인 허파스 바이러스(bovine herpes virus)로부터의 BTIF)를 포함하는 세포주를 사용하여 증식할 수 있다.

ICP27을 발현하는 세포주는 Vero 또는 BHK 같은 포유동물세포에, 전기 세포에서 발현될 HSV ICP27 유전자를 포함하는 벡터, 바람직하게는 플라스미드 벡터 및 네오마이신 저항성같은 선택 마아커를 암호화하는 벡터, 바람직하게는 플라스미드 벡터를 동시에 트랜스펙션(transfection)함으로써 작제될 수 있다. 선택마아커를 포함하는 클론을 당업계의 전문가에게 잘 알려진 방법으로(예를 들어, Rice and Knipe, 1990에 기술된 대로), ICP27⁻ HSV 균주의 성장을 뒷받침하는 능력에 기초하여 ICP27을 발현하는 클론을 결정하도록 스크리닝한다.

ICP27⁻ HSV 균주를 기능적 ICP27을 가진 HSV 균주로 되돌리지 않는 세포주가 상기 기술된 대로 작제될 수 있는데, 이것은 기능적 ICP27 유전자를 포함한 벡터가 ICP27⁻ HSV 균주에 남아 있는 서열과 겹치는(즉, 상동한) 서열을 포함하고 있지 않다는 것을 확인시켜 준다.

본 발명의 HSV 균주가 ICP4같은 다른 필수유전자에 불활성화 변형을 포함할 때, 상보적 세포주가 ICP27에 대해서 상기 기술된 것과 똑같은 방법으로 변형된 필수유전자를 보충할 것이다. 예를 들어, ICP27 및 ICP4 모두에 돌연변이를 가진 HSV 균주의 경우에, ICP27 및 ICP4 모두를 발현하는 세포주 E26(참조: Samaniego *et al.*, 1995)이 사용된다. 다른 필수 유전자를 발현하는 HSV 균주는 ICP27에 대해 기술된 것과 비슷한 방법으로 작제될 수 있다.

B. 돌연변이 방법

언급된 다양한 바이러스 유전자가 당업계에 잘 알려진 몇 가지 기술에 의해 기능적으로 불활성화될 수 있다. 예를 들어, 결실, 치환 또는 삽입, 바람직하게는 결실에 의해 기능적으로 불활성화 될 수 있다. 결실은 유전자의 일부 또는 전체를 제거하는 것이다. 예를 들어, 오직 한 개의 뉴클레오티드의 결실은 해독틀의 이동(frame shift)으로 나타난다. 그러나, 더욱 커다란 결실, 바람직하게는 전체 암호화 및 비암호화 서열의 적어도 25%, 보다 바람직하게는 적어도 50%(또는 선택적으로, 절대적인 용어로서 적어도 10개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 적어도 100개, 가장 바람직하게는 적어도 1000개의 뉴클레오티드)의 결실이 이루어진다. 특히 전체유전자 및 그 주변의 서열을 제거하는 것이 바람직하다. 삽입될 서열은 아래에 설명할 이종 유전자를 포함하는데, 특히 이종 유전자를 ICP4 또는 ICP27에 삽입하는 방법이 선호된다. VMW65 유전자의 경우에는 이들이 필수적인 구조 단백질을 암호화하기 때문에 전체 유전자를 결실할 수 없으나, 전사적으로 IE 유전자를 활성화시키는 VMW65의 기능을 제거하기 위해 크기가 작은 불활성화 삽입이 만들어진다(참조: Ace *et al.*, 1989; Smiley *et al.*, 1997).

HSV의 돌연변이는 당업자들에게 잘 알려진 상동 재조합에 의해서 만들어진다. 예를 들어, HSV 게놈 DNA를 상동 HSV 염기서열을 측면에 갖고 있는 돌연변이 염기서열을 포함하는 벡터, 바람직하게는 플라스미드 벡터와 같이 트랜스펙션(transfection)한다. 돌연변이된 염기서열은 결실, 삽입 또는 치환을 포함하는데, 이들은 모두 일반적인 방법으로 만들어진다. 삽입을 위해 lacZ 또는 GFP 같은 선택적 표지 유전자가 사용되는데, 이는 이 유전자의 베타-갈락토시다제(β-galactosidase)활성 측정법 또는 형광에 의해 재조합 바이러스를 선별할 수 있기 때문이다.

C. 이종 유전자 및 프로모터

본 발명의 바이러스는 이종유전자를 가지도록 변형될 수 있다. "이종유전자(heterologous gene)"란 용어는 임의의 유전자를 포함한다. 비록 이종유전자는 허파스 바이러스 게놈에 존재하지 않는 유전자이지만, 암호화 서열이 원래의 바이러스 통제 서열과 작동가능하게 연결되어 있지 않을 때에는, 허파스 유전자도 사용될 수 있다. 이종유전자는 야생형의 임의의 대립형질 변이체(allelic variant) 또는 돌연변이된 유전자일 수 있다. "유전자(gene)"란 용어는 적어도 전사가 될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 것으로 해석되는 술어이다. 그러므로, mRNA, tRNA 및 rRNA를 암호화하는 서열이 이 정의안에 포함된다. 그러나, 본 발명은 tRNA 및 rRNA보다 폴리펩티드의 발현에 관련되어 있다. mRNA를 암호화하는 서열은 전사는 되지만 번역은 되지 않는, 그렇지 않으면 번역되는 암호화 서열과 연관된 5' 및/또는 3'쪽 인접서열의 일부 또는 전부를 임의적으로 포함한다. mRNA 암호화 서열은 더 나아가서 전사 중지신호(transcriptional stop signal), 폴리아데닐레이션 부위(polyadenylation site) 및 하류 인핸서 요소(downstream enhancer element)와 같은 전사서열과 연관된 전사통제서열(transcriptional control sequence)을 임의적으로 포함할 수 있다.

이종유전자는 HSV 서열에 인접한 이종유전자를 지니고 있는 플라스미드 벡터를 HSV 균주의 상동재조합에 의해 바이러스 게놈 속으로 삽입될 수 있다. 이종유전자는 당업자들에게 잘 알려진 클로닝 기법으로 허페스 바이러스 서열을 포함하는 적당한 플라스미드 벡터속으로 도입될 수 있다. 이종유전자는 바이러스가 계속 증식하는 한, 바이러스 게놈의 어느 위치에도 삽입될 수 있다. 이종유전자는 필수유전자로 삽입되는 것이 바람직하다. 이종유전자는 바이러스 게놈내 여러 부위에 삽입될 수 있다.

이종유전자의 전사서열(transcribed sequence)은 수상세포(dendritic cell, DC), 바람직하게는 포유동물의 수상세포, 보다 바람직하게는 인간의 수상세포 내에서 이종유전자의 발현을 허락하는 통제서열(control sequence)에 작동가능하게 연결된다. "작동가능하게 연결된(operably linked)"이라는 용어는 병치상태(juxtaposition)를 언급하며, 이는 그 구성 요소들이 원래 의도되어진대로 서로서로 기능을 수행하도록 허용하는 관계에 있음을 의미한다. 암호화 서열에 "작동가능하게 연결된" 통제 서열은, 그것과 양립할 수 있는 조건하에서 암호화 서열이 발현될 수 있게 하는 방식으로 연결된다.

통제 서열은 이종유전자의 발현을 가능하게 하는 프로모터 및 전사의 종결을 위한 신호를 포함한다. 프로모터는 포유동물에서, 바람직하게는 인간 DC에서 기능을 발휘할 수 있는 프로모터들로부터 선택된다. 프로모터는 진핵 유전자의 프로모터 염기서열로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 프로모터는 이종 유전자의 발현을 가능케 하는 세포, 바람직하게는 포유동물의 DC, 보다 바람직하게는 인간의 DC 게놈으로부터 유래한 프로모터이다. 이러한 진핵 프로모터들에 관해, 그것이 조직에 상관없이 항상 일정하게(β -actin 및 tubulin의 프로모터들) 또는 선택적으로는, 조직-특이적 방식(tissue-specific manner)으로 (피루베이트 인산화효소(pyruvate kinase)와 같은 유전자의 프로모터들)으로 작용하는 프로모터들이다. 또한, 그들은, 예를 들어, 스테로이드 호르몬 수용체(steroid hormone receptor)에 결합하는 프로모터 같이 특별한 자극에 반응하는 프로모터들이다. 또한, 말로니 뮤린 루케미아 바이러스의 긴 말단 반복 배열(Moloney Murine Leukemia Virus Long Terminal Repeat:MMLV LTR)이나 HSV 유전자의 프로모터 같은 바이러스 프로모터가 사용된다.

HSV LAT 프로모터 및 LAT 프로모터 부분의 요소(element)를 포함하고 있는 프로모터들이 특히 바람직한데, 이는 잠복기 동안 이종 유전자의 장기간 발현(long-term expression)을 가능하게 하기 때문이다. 특히, 그 자체로는 프로모터 역할을 할 수 없으면서, 어떠한 프로모터에 연관된 LAT P2 및 하나의 이종유전자로서 순서적으로 구성된 발현 카세트(expression cassette)가 바람직하다.

"장기간 발현(long-term expression)"이라는 용어는 HSV가 심지어 잠복 기간에 들어간 후에도 본 발명의 HSV로 감염된 세포에서 이종 유전자가 발현된다는 것을 의미한다. 바람직하게는, 이는 적어도 2주간 계속되고, 보다 바람직하게는 적어도 감염 후에 1달 내지 2달간 계속되며, 가장 바람직하게는 세포의 일생 동안 계속된다.

발현 카세트는 전기의 HSV LAT P2부분과는 같은 방향으로, 1차 프로모터 및 1차 이종유전자(first heterologous gene)와는 반대 방향으로 작용 가능하도록 연관된 2차 프로모터와 2차 이종유전자(second heterologous gene)를 추가로 포함하는데, 여기서 말하는 2차 프로모터와 2차 이종유전자는 1차 프로모터와 1차 이종 유전자와 동일하거나 또는 다른 것이다. 그리하여, 반대 방향으로 제조된 프로모터/이종유전자 쌍은 단일 LAT P2부분의 측면에 존재하게 되면서, 동일하거나 다른 프로모터에 의해 유도되는 동일하거나 다른 이종 유전자쌍의 장기간 발현을 가능하게 한다. 게다가, 1차 이종 유전자의 산물은 적당한 생리 조건하에서 2차 이종 유전자의 발현을 조절할 수 있고, 그의 반대의 경우도 일어날 수 있다.

발현 카세트 및 이종유전자와 통제서열을 포함하는 다른 적당한 구조물들은 당업자들에게 널리 알려진 일반적인 클로닝 방법을 사용하여 만들어진다(참조: Sambrook et al., Molecular Cloning-A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Press, 1989). LAT P2 영역은 HSV 균주 17+(GenBank HE1CG; PstI-BstXI 부위로부터)의 HSV1 뉴클레오타이드 118,866 내지 120,219로 정의되며, 이 부분의 절편 또는 유도체를 포함하고, 다른 HSV1 및 HSV2 균주의 상동적인 영역을 포함하는데, 이는 이들과 연결된 프로모터에 장기간 발현을 할 수 있는 능력을 제공한다.

또한, 유도될 수 있는 프로모터의 사용은 세포의 생장 기간 동안 이종유전자의 발현을 조절할 수 있기 때문에 유용하다. 유도적(inducible)이라는 것은 프로모터를 사용시 수득되는 발현 수준을 조절할 수 있다는 것을 의미한다. 예를 들어, 한 종류 이상의 이종 유전자가 HSV 게놈에 삽입되는 바람직한 실시태양에서, 삽입되는 프로모터는 전에 기술된 바와 같이(참조: Gossen & Bujard, 1992; Gossen et al., 1995), tet repressor/VP16 전사 활성인자 융합 단백질(transcriptional activator fusion protein)과 반응하고, 이종 유전자의 발현을 조절할 수 있는 프로모터를 포함한다. 제 2의 프로모터는 tet repressor /VP16 융합 단백질의 발현을 추진시킬 수 있는 강력한 프로모터(예를 들어, CMV IE 프로모터)로 구성된다. 그리하여, 이 실시예에서 1차 이종유전자의 발현은 테트라사이클린(tetracycline)의 존재 유무에 의존한다.

게다가, 이러한 프로모터들 중 일부는, 인핸서 염기서열(enhancer sequence, HSV LAT 부분의 구성 요소 포함)같은 조절 염기서열의 첨가에 의해 변형될 수 있다. 위에서 기술한 둘 또는 그 이상의 다른 프로모터들로 이루어진, 예를 들어 MMLV LTR/LAT 퓨전 프로모터(참조: Lokensgard *et al.*, 1994) 또는 LAT 부분의 구성요소들로 이루어진 프로모터와 같은 키메릭 프로모터(chimeric promoter)가 사용된다.

이종유전자는 전형적으로 치료용 폴리펩티드를 암호화한다. 예를 들어, 특정 종양에 대한 면역반응을 특이적으로 증가시키기 위하여, 종양 항원의 발현을 조절하는 본 발명의 바이러스를 DC에 형질도입하는 것이 바람직하다. 종양 항원은 종양 세포에 특이하거나 또는 같은 유형의 비종양세포에 비해 항원 발현의 상승 조절에 의하여 종양세포에서 훨씬 높은 수준으로 발현될 수 있다. 특히, 종양 항원이 종양세포 표면에서 발현(예를 들어, 세포 표면 수용체나 세포 부착 단백질)되는 것이 바람직하다. 종양 항원의 예로는 난소암을 포함한 수많은 종양에서 과발현되는 MUC-1 유전자 산물, 자궁암과 관련된 인간 파필로마 바이러스(human papilloma virus) 단백질인 E6 및 E7를 포함한다. T-세포의 반응을 유도하는 종양 항원이 특히 바람직하다.

이종유전자는, 예를 들어 사이토카인(α , β 또는 γ -인터페론, IL-1, IL-2를 포함하는 인터루킨, 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor), 또는 인슐린 유사 성장 인자(insulin-like growth factor) I 또는 II) 면역 조절 단백질같은 면역반응을 매개하는 폴리펩티드를 암호화할 수 있다.

이종유전자는 또한 백신으로 사용되는 항원성 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 바람직하게는, 그러한 항원성 폴리펩티드는 기생충, 세균, 또는 바이러스같은 감염원으로부터 유래된다. 그러한 항원성 폴리펩티드의 예로는 C형 간염 바이러스 항원, B형 간염 바이러스 항원, HIV 항원, 말라리아 항원, 백일해 독소, 콜레라 독소 또는 디프테리아 독소를 포함한다.

또한, 이종유전자는 표지 유전자(예를 들어, 베타-갈락토시다아제 또는 녹색 형광 단백질(GFP)) 또는 유전자 산물이 다른 유전자의 발현을 조절하는 유전자(예를 들어, 위에서 설명한 tet repressor/VP16 전사 활성인자 융합 단백질을 포함하는 전사 조절 인자)를 포함한다.

유전자 요법과 이외의 다른 치료에 사용하기 위하여는, 다양한 유전자의 투여를 필요로 한다. 다양한 유전자의 발현은 다양한 조건에서의 치료에 유용하다. HSV는 다른 바이러스 벡터 체계와는 달리 팩키징능력이 제한되지 않기 때문에 특히 적당하며, 그리하여 다양한 이종유전자들이 그것의 계놈안에 수용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 것을 가능하게 하는 적어도 2가지의 방법이 있다. 예를 들어, 한 종류 이상의 이종유전자와 이와 관련된 조절 서열을 특정한 HSV균주로 바이러스 계놈안의 한 부위 또는 여러 부위에 삽입할 수 있다. 또한, 서로 반대 방향으로 마주보고 있는 프로모터의 쌍(동일하거나 또는 서로 다른 프로모터)을 사용할 수 있는데, 이러한 프로모터들은 전기에서 설명한 바와 같이 이종유전자(동일하거나 또는 서로 다른 이종유전자)의 발현을 촉진시킨다.

D. 수상세포(Dendritic Cell)

수상세포는 여러 가지 방법으로 분리/제조될 수 있는데, 예를 들어 말초혈액으로부터 직접 정제되거나, G-CSF의 처리에 의해 말초혈액으로 이동 후 CD34+ 전구세포로부터 발생되거나 또는 직접 골수로부터 얻을 수 있다. 말초혈액으로부터의 부착 전구세포를 GM-CSF/IL-4 혼합물로 처리하거나(참조: Inaba *et al.*, 1992) 또는 골수로부터의 비부착 CD34+ 세포를 GM-CSF/TNF- α 로 처리한다(참조: Caux *et al.*, 1992). DC는 Sallusto 및 Lanzavecchia(1994)의 방법과 비슷하게, 정제된 PBMC(peripheral blood mononucleocyte cell)를 사용하여 부착세포를 GM-CSF 및 IL-4로 2시간 처리함으로써, 인간 지원자의 말초혈액으로부터 일상적으로 획득할 수 있다. 전기 획득물에 대해 마그네틱 베드(magnetic bead)를 사용하여 CD19+ B-세포 및 CD3+, CD2+ T-세포를 제거시킨다(참조: Coffin *et al.*, 1998). 다른 방법들이 또한 DC의 획득을 위해 사용될 수 있다.

E. 치료 용도

본 발명의 바이러스 및 본 발명의 바이러스에 감염된 DC는 치료용으로 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 바이러스 및 종양 항원을 발현할 수 있는 본 발명의 바이러스에 감염된 DC는 암 치료에 사용될 수 있다. 보다 자세하게, 본 발명의 바이러스 및 본 발명의 바이러스에 감염된 DC는 인간을 포함한 포유동물의 다양한 종양, 예를 들어, 난소암, 자궁암 및 자궁내막암, 유방암, 폐암, 방광암 및 결장암,의 성장을 억제하는데 사용될 수 있다. 억제될 수 있는 다른 암의 예로는 연조직(soft tissue) 및 뼈의 육종암 및 백혈병같은 혈액악성종양을 포함한다. 본 발명의 바이러스 및 종양항원을 발현하는 본 발명의 바이러스에 감염된 DC를 사용하여 치료될 수 있는 암의 예로는 흑색종(melanoma), 백혈병(leukemia), 자궁암(cervix cancer) 및 난소암(ovarian cancer)이 있다.

본 발명의 바이러스 및 본 발명의 바이러스에 감염된 DC는 기생충, 세균, 또는 바이러스 감염을 예방하고 치료하는데 사용될 수 있다. 이 경우, 바이러스 및 DC는 숙주의 예방 면역반응을 자극하기 위해 감염전에 투여되거나 또는 감염에 맞서 싸우는 면역계를 자극하기 위해 감염후에 투여될 수 있다.

F. 투여

본 발명의 HSV는 치료를 필요로 하는 사람이나 동물에게 치료 유전자를 전달하는데 사용된다. 본 발명의 HSV를 사용한 치료 유전자의 전달은 악성종양 및 감염 치료에 사용된다.

유전자 치료를 위한 투여 방법의 하나는 전기에서 설명한 바와 같이 본 발명의 HSV 계נים에 치료 유전자를 삽입하고, 전기에서 수득된 재조합 바이러스를 약제학적으로 허용되는 담체나 희석제와 조합하여 약제학적인 조성물을 만드는 것이다. 적당한 담체와 희석제는 인산 완충 식염수(phosphate-buffered saline) 등의 등장 식염 용액을 포함한다. 조성물은 비경구적, 근육내, 정맥내, 피하 또는 피부(transdermal) 투여를 위해 조제된다.

본 발명의 바이러스를 DC에 감염시키는 것은 환자에 바이러스를 포함한 조성물 투여에 의해 *in vivo*에서 수행될 수 있다. 약학적 조성물은 치료용 유전자를 포함하는 바이러스가 적당한 부위에 있는 세포에 병합되도록 투여된다. 투여될 바이러스의 양은 10^4 내지 10^{10} pfu의 범위이고, 바람직하게는 10^5 내지 10^8 pfu의 범위, 보다 바람직하게는 10^6 내지 10^7 pfu의 범위이다. 접종할 때는, 전형적으로 $10\mu\text{l}$ 내지 1ml , 바람직하게는 $100\mu\text{l}$ 내지 1ml 의 바이러스를 약제학적으로 허용되는 적당한 담체나 희석제를 사용하여 투여된다.

또 다른 방법은 말초혈액 또는 골수로부터 DC를 분리하여 *in vitro*에서 본 발명의 바이러스를 감염시키는 것을 포함한다. 형질도입된 DC는 근육내, 복강내, 피하 또는 정맥내 주사에 의해 환자에게 투여되거나, 또는 환자의 림프절로 직접 투여되는데, 림프절로의 직접투여가 바람직하다. 일반적으로, 10^4 내지 10^8 개의 형질도입된 DC, 바람직하게는 10^5 내지 10^7 개의 DC, 보다 바람직하게는 약 10^6 개의 DC가 환자에게 투여된다.

투여 경로와 투여량은 당업계의 전문의들이 환자의 나이, 체중 및 상태를 고려해서 최적의 투여 경로와 투여량을 결정할 수 있기 때문에, 이는 단지 하나의 지침일 뿐이다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

치료 및 방법

바이러스 균주의 작제 및 증식

모든 바이러스 균주는 HSV1 17+로부터 유래되며, 그것의 서열은 GenBank(Accession No. HE1CG)에 기탁되었다. 모든 균주는 BHK C-21(ECACC No.8501143)을 사용하여 작제되고 증식되었는데, 17+/27-/pR20 및 1764/27-/pR20.5/vhs 균주는 B130/2(HSV1 ICP27 유전자가 형질도입된 BHK세포)에서 증식하였고, 1764/27-4-/pR20.5는 HSV1 ICP27, ICP4 및 이くん 허피스 바이러스(equine herpes virus, EHV) 유전자 12로 형질도입된 세포에서 증식하였다. EHV 유전자 12는 vmw65 돌연변이와 연관된 증식결핍을 보충할 수 있는 HSV vmw65 유전자의 유사유전자이다. 하지만, EHV 유전자 12의 단백질 산물은 변형되지 않은 HSV vmw65가 바이러스 증식에 사용될 때와 같이 HSV 비리온(virion)으로 팩키징(packaging)되지 않는다. 전기 세포는 하기와 같이 발생되었다: BHK 세포(DMEM + 10% FCS(Gibco) 배지로 37°C, 5% CO₂에서 자란)를 CMV 프로모터와 BGHPA 서열(pcDNA3/E)의 조절하에 있는 EHV-유전자 12를 포함하는 플라스미드 및 ICP27을 암호화하는 플라스미드 pSG130BS(참조: Sekulovich *et al.*, 1988)로 10cm 플레이트에서 형질도입 시켰다(참조: Gorman, 1985). 네오마이신 선택후, 네오마이신 저항성 클론을 골라내어 ICP27 및 vmw65 돌연변이를 가진 HSV의 증식을 뒷받침하는지 평가하고서 상당히 높은 HSV의 증식을 나타내는 클론을 골라내었다. ICP4를 도입하기 위해, 플레오마이신/네오마이신 저항성 세포주가 EHV 유전자 12 및 ICP27을 포함하는 BHK 세포로부터 작제되었는데,

여기서 ICP4는 덱사메타손-유도적(dexamethasone inducible)-MMTV 프로모터 및 SV40 polyA(플라스미드 pMAMzeo/ICP4)에 의해 증진된다. pMAMzeo/ICP4의 작제를 위해서, 플라스미드 pMAMneo(Invitrogen)의 네오마이신 저항성 유전자(BamHI으로 잘라진)가 pVgRXR(Invitrogen)로부터의 BamHI 절편인 플레오마이신 저항성 유전자로 대체되었다. ICP4 암호화 영역(HSV1 nts 127,167–131, 187[MseI–BstEII] GenBank file he1cg)을 XhoI 부위의 MMTV 프로모터 뒤에 삽입하였다. ICP27/EHV 유전자 12를 포함하는 세포에 형질도입하여 플레오마이신 저항성 선택(selection) 후(Zeocin; Cayla, Toulouse, France), ICP4, ICP27 및 vmw65 돌연변이를 가진 HSV의 증식을 뒷받침하는 클론을 골라내었다.

VMW65에 대해 돌연변이를 가지는 바이러스에 대해, 3mM 헥사메틸렌-비스아세트아미드(hexamethylene-bisacetamide)가 바이러스 증식에 사용되도록 배지에 포함되었다(참조: McFarlane *et al.*, 1992).

(i) 17+ /pR20.5/UL43

서로 반대방향이고 HSV LAT 영역 서열(nts 118,866–120,219)에 의해 분리된 RSV/lacZ/pA 서열 및 CMV/GFP/pA 서열로 구성된 플라스미드 pR20.5로부터의 카세트를 표준방법에 의해 정제된 HSV1 균주 17+ 게놈 DNA의 UL43위치에 상동성 재조합에 의해 삽입하였다. pR20.5 카세트는 NsiI 부위의 UL43 인접영역(참조: Coffin *et al.*, 1996)을 포함하는 플라스미드로 삽입하여 플라스미드 pR20.5/43을 만들었다. 20.5 카세트는 SrfI를 가지고 pGEM5(Promega) 플라스미드로부터 잘라질 수 있는데, 이것은 SrfI를 암호화하는 올리고뉴클레오티드가 카세트의 양쪽에 삽입되어 있기 때문이다. 플라스미드 pR20.5의 작제를 위해서 RSV 프로모터는 pRc/RSV(Invitrogen)로부터 잘라내며, lacZ/pA는 pCH10(Pharmacia)로부터, CMV/pA는 pcDNA3(Invitrogen)으로부터 GFP는 pEGFP-N1(Clontech)로부터 잘라내었다.

(ii) 17+ /pR20.5/US5

pR20.5 카세트를 US5 인접영역(플라스미드 pΔUS5)에 삽입함으로써 HSV1 US5 위치에 삽입하여 플라스미드 pR20.5/US5를 만들고 BHK에서 정제된 HSV1 17+ 게놈 DNA와 상동성 재조합을 하여 바이러스 균주 17+ /pR20.5/US5를 만들었다. 플라스미드 pΔUS5는 HSV1으로부터의 BamHI-EcoNI 절편(nts 136,289–131,328)을 플라스미드 pAT153으로 클로닝함으로써 작제되는데, 이것은 US5 암호화 영역을 포함한다. pR20.5는 US5 유전자 내의 nt 137,945에 위치한 SacI 부위에 삽입되었다.

(iii) 17+ /27-/pR20

플라스미드 pR20이 정제된 HSV 17+ DNA와의 상동성 재조합을 위해 사용되었다. 플라스미드 pR20은 ICP27 인접영역(두 개의 절편을 연결하는 MluI 부위에 삽입될 수 있는 pACYC184(NBL) 내의 HSV1 nts 11095–113273 및 nts 116869–118439)에 삽입된 LAT P2(HSV1 nts 118,866–120,219)/CMV/lacZ 카세트를 포함한다. LacZ를 발현하는 플라크를 B130/2 세포주를 사용하여 분리하였다.

(iv) 1764/pR20.5/UL43

플라스미드 pR20.5/43이 정제된 HSV 1764 DNA와의 상동성 재조합 및 GFP 및 LacZ를 발현하는 플라크 분리를 위해 사용되었다(참조: Coffin *et al.*, 1996). HSV 1764 균주는 HSV 17+ 균주에서 두 개의 ICP34.5가 결실되고 vmw65 유전자에 불활성화 돌연변이를 가진 균주이다(참조: Ace *et al.*, 1989).

(v) 1764/pR20.5/US5

플라스미드 pR20.5/5이 정제된 HSV 1764 DNA와의 상동성 재조합 및 GFP 및 LacZ를 발현하는 플라크 분리를 위해 사용되었다.

(vi) in1814/pR15

플라스미드 pR15가 in1814 균주의 UL41 유전자(virion host shutoff protein)로의 상동성 재조합을 위해 사용되었다(참조: Ace *et al.*, 1989). 플라스미드 pR15는 HSV LAT/MMLV LTR 키메라 프로모터(참조: Lokengsgard *et al.*, 1994) 하의 lacZ 유전자가 UL41 유전자 내의 NruI 부위에 삽입된 vhs 인접영역을 포함하고 있다. LacZ를 발현하는 플라크를 분리하였다.

(vii) 1764/pR15

플라스미드 pR15가 정제된 HSV 1764 균주 DNA와의 상동성 재조합을 위해 사용되었고 LacZ를 발현하는 플라크를 분리하였다.

(viii) 1764/27-/pR20.5/vhs

pR20.5 카세트를 NruI 부위의 vhs 인접영역에 삽입하여 정제된 HSV 1764/27- 균주 DNA와의 상동성 재조합을 위해 사용될 플라스미드 pR20.5/vhs를 만들었다. lacZ 및 GFP 모두를 발현하는 플라크를 B130/2 세포주를 사용하여 정제하였다. 1764/27- 균주는 lacZ 유전자를 제거하는 상동성 재조합 및 ICP27 위치 주위의 뉴클레오티드 113322-115743을 결실시켜서 1764/27-/pR20(플라스미드 pR20을 HSV 균주 1764 DNA로 상동성 재조합을 하고 lacZ 발현 플라크를 분리함으로써 작제된)으로부터 작제되었다.

(ix) 1764/pR15/MSVGFP/UL43

MSV LTR 프로모터/GFP 카세트를 NsiI 부위에 UL43 인접영역으로 삽입하여 플라스미드 pMSVGFP/43을 만들었다. pMSVGFP/43은 정제된 HSV 1764/pR15 게놈 DNA와의 상동성 재조합 및 GFP 및 LacZ를 발현하는 플라크 분리를 위해 사용되었다

(x) 1764/27-/4-/pR20.5

바이러스 균주 1764/27-/4-/pR20.5는 서로 반대방향이고 HSV1 LAT 영역 서열(PstI-BstXI: nts 118,866-120,219, GenBank file he1cg)에 의해 분리되며 각각 CMV 및 RSV 프로모터에 의해 조절되는 GFP(E-GFP; Clontech) 및 lacZ로 구성되는 카세트를 ICP4 인접영역(플라스미드 pDICP4에서 nts 124,945-125,723[NotI-NotI; encodes ICP34.5]가 제거되고 XbaI 및 SalI 부위에 의해 분리된 HSV1 nts 123,459-126,774[Sau3aI-Sau3aI] 및 131,730-134,792[SphI-KpnI])에 삽입하고 1764/27- 균주에 ICP27 및 ICP4를 모두 보충하는 B4/27 세포를 사용하여 재조합함으로써 작제되었다. X-gal 염색/녹색 형광 플라크를 골라내어 분리하였다. B4/27 세포주 pSG130BS, 플라스미드 p4/2(ICP4 암호화 영역, 프로모터 및 polyA 영역) 및 pMAMneo(Invitrogen)을 BHK세포로 동시에 형질도입시킴으로써 작제되었다. 네오마이신 저항성을 갖는 클론을 골라내었다.

실시예 1: HSV 벡터를 사용하여 유전자는 수상세포로 효율적으로 운반될 수 있다.

본 실험은 야생형 바이러스를 사용하여 HSV가 DC를 감염시켜 유전자를 운반할 수 있는지의 여부를 결정하기 위한 실험이다. 0.1 내지 10의 감염다중도(multiplicity of infection, MOI)가 사용되었다. 여기서, 각각의 경우에 1×10^5 개의 DC를 가벼운 펠렛팅(pelleting)에 의해 모아서 100 μ l DMEM 바이러스 혼탁액에 재현탁시킨 후, 37°C에서 1시간동안 반응하고, RPMI/10%FCS + 100ng/ml GM-CSF, 50ng/ml IL-4 2ml에 24웰 플레이트로 옮겼다. 이 플레이트를 실험의 나머지 부분에서 37°C/5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 바이러스 17+/pR20.5/UL43 및 17+/pR20.5/US5가 실험을 위하여 사용되었으며, 각각은 pR20.5 카세트의 삽입에 의해 UL43 및 US5에 돌연변이를 가졌다. UL43 및 US5 모두 다 이전의 연구에서 배양에서 HSV 증식을 위해 필수적이 아닌 것으로 식별되었으며, *in vivo* 생쥐모델에서 감염 키네틱(kinetic)에 영향을 미치지 않는다. 유전자 운반효율은 감염 24시간후에 형광현미경을 통하여 GFP 양성 세포의 수를 셈으로써 측정되었다. 하기 표 1에 나타난 결과는 HSV가 효율적으로 유전자를 DC로 운반할 수 있다는 사실을 증명한다.

[표 1]

MOI	유전자 운반 효율(%)	
	17+/pR20.5/UL43	17+/pR20.5/US5
0.1	10	11
0.5	15	30

1	45	45
5	65	55
10	85	75

실시예 2: 수상세포는 HSV의 증식을 상대적으로 잘 허용하지 않으며, UL43의 불활성화는 증식을 더욱 감소시킨다.

실시예 1에서 관찰된 효율적인 유전자 운반이 바이러스의 용해성 복제(lytic replication)에 기인한 것인지를 결정하기 위하여, 실시예 1에서처럼, 0.1 내지 10 MOI에서 감염된 DC에서 증식 곡선을 그렸으며, 시간에 따른 바이러스 증식을 정량하였다. 24시간 간격으로, 배양액 샘플을 BHK세포에서 적정하였고(HSV 증식의 허용도) 플라크의 수를 세었다.

[표 2]
수상세포 배양액의 총 바이러스(pfu)

주입후 시간(일)	17+/pR20.5/UL43			17+/pR20.5/US5		
	MOI			MOI		
	0.1	1	10	0.1	1	10
0	10000	100000	1000000	10000	100000	1000000
1	200	100000	300000	100	100000	10000
2	2000	10000	60000	10000	40000	8000
3	20000	1000	20000	300000	30000	2000
4	1000	1000	10000	100000	20000	2000

상기 표 2와 같이, 본 실험은 HSV로 감염시킨 DC 세포 배양에서 제한적인 생산적 감염이 일어날 수 있으나, 이것은 단지 낮은 MOI(특히, US5가 결실된)에서 명백하다. US5 대신 UL43의 불활성화는 이러한 제한적인 생산적 감염을 더욱 감소시킨다. DC 세포배양액에서 야생형 HSV의 매우 느린 턴오버(turn-over)가 일어나는 것처럼 보이는데, 이것은 UL43의 불활성화에 의해 더욱 감소되나, DC의 세포사멸에 의해 수반되는 것은 아니다(참조: 실시예 3). UL43의 불활성화는 HSV의 증식 키네틱(kinetic)에 영향을 미치지 않는 것으로 보고되었다(참조: Maclean et al., 1991).

실시예 3: 서로 다른 HSV 돌연변이는 수상세포에서 서로 다른 유전자 운반 효율 및 독성을 나타낸다.

상기 기술된 바이러스 군주(i)-(x)가 실시예 1에서처럼 0.1 내지 10의 MOI 범위에서 DC를 감염시키는데 사용되었다. 시간간격마다 두 개의 시료(배양액 2×200μl)를 취했고 1개의 시료는 GFP 발현(형광현미경)을 위해 및/또는 시험중인 특정 바이러스에 삽입된 내용에 따라 X-gal로 염색하였다(펠레팅(pelleting)후 고정액(0.8% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)에서 10분간 고정한 후 X-gal 완충액(Coffin et al., 1996의 것과 똑같은)으로 37°C에서 2시간 배양). 나머지 시료는 트립판 블루(trypan blue)로 염색하여(살아 있는 세포는 염색되지 않는) 원래 배양액의 전체세포수에 대해 염색되지 않은 세포의 수를 백분율로 나타내었다. 두번씩 반복되고 한 번당 3종류의 바이러스를 시험하는 각각의 실험에서, 바이러스 (i)이 DC 세포군 사이의 편차를 조정하는 내부 대조군으로서 사용되었다. MOI=1에 대한 결과가 표 3에 나타나 있다.

[표 3]

불활성화된 유전자 (X)	바이러스									대조군(no virus)
	(i)	(ii)	(iii)	(iv)	(v)	(vi)	(vii)	(viii)	(ix)	
UL43	X			X					X	
US5		X			X					

VMW65				X	X	X	X	X	X	X	
ICP27			X				X		X		
Vhs						X	X	X	X		
ICP34.5				X	X		X	X	X	X	
ICP4										X	
% 유전자 운반효율 1일째 (lacZ/GFP)	45/45	45/45	3/-	70/70	70/70	35/-	30/-	15/15	*/85	20/25Z	-
% 세포생존율 1일째	85	84	90	75	70	58	70	90	90	92	99
% 세포생존율 4일째	60	50	ND	41	47	38	45	ND	65	80	82

* 많은 세포가 X-gal로 염색되었으나, 매우 낮은 광도를 나타내서 정확한 정량이 불가능함.

Z 실시예 5 참조

ND 실행되지 않음

바이러스(참조: 시료 및 방법): (i) 17+ /pR20.5/UL43 (ii) 17+ /pR20.5/US5

(iii) 17+ /27-/pR20 (iv) 1764/pR20.5/UL43 (v) 1764/pR20.5/US5 (vi) in1814/pR15 (vii) 1764/pR15 (viii) 1764/27-/pR20.5/vhs (ix) 1764/pR15/MSVGFP/UL43 (x) 1764/27-/4-/pR20.5

이 결과는 유전자 결합의 서로 다른 조합이 다양한 유전자 운반 효율 및 독성의 결핍을 가진 바이러스를 제공한다는 사실을 보여준다. 바이러스 (i) 및 (ii)의 유전자 운반효율 및 세포생존율에 대해 어떤 것은 전자, 어떤 것은 후자, 어떤 것은 둘 모두에 비해 개선되었으며, 어떤 것은 감소되었다. 하나의 필수 급발성 초기유전자(ICP27)를 제거하면, 독성이 최소화되는 것으로 보이나 유전자 운반 효율은 상당히 감소하였다. 불활성화된 비필수유전자(ICP34.5, VMW65, vhs 및 UL43)조합을 가진 바이러스는 각각 *in vivo*에서 독성이 감소되는 것으로 보고되었고(UL43이외의 것), 본 실시예에서도 가장 훌륭한 유전자 운반효율(GFP, 실시예 4) 및 독성결핍의 조합을 나타내는 것이 발견되었는데, 유전자 운반 효율은 평가된 다른 바이러스보다 상당히 높았다. 그러나, 독성이 최소로 낮은 바이러스 (x)는 높은 수준의 GFP 및 lacZ RNA 발현-비록 형광에 의한 GFP는 낮게 검출되었어도 바이러스 (ix)와 비슷한 수준으로-을 나타내었다. 항 HSV ICP27, ICP4, ICP0, ICP22 및 ICP47 항체를 사용하여 웨스턴 블라팅을 수행한 결과, 바이러스 내 결핍(즉, ICP27, ICP4 및 vmw65의 돌연변이)을 보충할 수 없는 세포에서, 바이러스는 매우 낮은 수준의 급발성 초기유전자를 발현하는 것이 나타났다.

실시예 4: UL43, ICP34.5, vhs 및 VMW65 불활성화 돌연변이를 가진 HSV 균주는 형질도입된 수상세포에서 운반된 항원의 효율적인 단백질 분해 처리가 일어남을 암시하는 결과를 나타내었다.

UL43, ICP34.5, vhs 및 VMW65가 결합된 바이러스는 GFP의 효율적인 운반을 나타내었다. 반면, lacZ 활성을 많은 세포에서 나타난 반면, 감염 24시간 후에 X-gal 염색법의 검출한계에서 매우 낮은 수준으로 나타났다. 이 사실은 lacZ 및 GFP 모두 세포에서 효율적으로 생성되나, lacZ 활성이 정상상태의 기능적인 DC에서 기대되는 것처럼 lacZ항원의 효율적인 단백질 분해처리에 의해 감소하는 중이라는 가능성을 높여준다. lacZ 유전자는 DC에서 강한 X-gal 염색을 나타냈던 다른 바이러스에서와 똑같은 프로모터로부터 전사된다. 따라서, lacZ의 처리가 세포안에서 일어난다면, lacZ mRNA 및 GFP mRNA 모두 노던 블라팅에 의해 상대적으로 같은 수준으로 쉽게 검출되어야만 하나, 웨스턴 블라팅에 의해 lacZ 단백질만이 상당히 감소되었다.

노던 및 웨스턴 블라팅은 MOI 1의 수준으로 17+ /pR20.5/UL43 또는 1764/pR15/MSVGFP/UL43으로 감염된 DC로부터의 RNA 및 단백질(각각의 경우 1×10^5 세포로부터 추출된)을 사용하여 수행되었다. 웨스턴 블라팅에서 탐침(probe)은 항-lacZ 항체(Promega) 또는 항-GFP 항체(Quantum)을 사용하였다. 노던 블라팅에서 탐침은 lacZ 유전자(pCH110

(Pharmacia)로부터 HindIII-BamHI으로 잘라진) 또는 GFP 유전자(pEGFP-N1(Clontech)로부터 NotI-HindIII으로 잘라진)를 사용하였다. 노던 및 웨스턴 블라팅은 방사성 동위원소(노던 블라팅) 또는 비방사성 동위원소(웨스턴 블라팅; ECL, Amersham) 법에 의한 표준 방법에 의해 수행되었다.

결과

웨스턴 블라팅 결과:

(i) 17+/pR20.5/UL43으로 감염된 DC에서 lacZ 및 GFP 모두 효율적으로 검출되었다. 각각의 경우에 한 개의 밴드가 예상된 분자량 위치에서 관찰되었으며, 크기가 작은 약간의 희미한 밴드도 보였다.

(ii) X-gal 염색법 결과에 의해 기대되었듯이, GFP는 1764/pR15/MSV/GFP/UL43에서 쉽게 검출되는 반면, 예상되는 단백질 분자량에서의 lacZ 단백질 수준은 상당히 감소하였다.

노던 블라팅 결과 17+/pR20.5/UL43 또는 1764/pR15/MSV/GFP/UL43으로 감염된 세포에서 각각의 경우에 예상되는 크기에 두꺼운 밴드가 관찰되었다.

이 결과는 lacZ mRNA가 17+/pR20.5/UL43 및 1764/pR15/MSV/GFP/UL43 모두에 감염된 DC에서 효율적으로 생성되나 1764/pR15/MSV/GFP/UL43에 대해, 이 RNA는 번역되지 않거나 또는 lacZ 단백질이 번역후 빠르게 분해되어 웨스턴 블라팅에 의해 검출될 수 있는 완전한 단백질의 수준이 상당히 감소한다는 것을 증명한다. 항원처리에 있어서 DC의 역할을 고려할 때, 운반된 항원이 효율적인 방법으로 처리되는 것이 기대되는 것처럼 후자의 경우가 사실을 가능성이 높다. 따라서, 다른 돌연변이에 대해서는(하기 실시예 5는 제외하고), 각각의 경우에 강한 X-gal 염색이 나타나는 것으로 보아서 효율적인 항원처리가 일어나지 않는다. 따라서, DC에서 바이러스에 의해 운반된 항원의 항원처리가 일어나려면, 운반에 사용될 바이러스 돌연변이의 정확한 선택이 주의깊게 행해져야만 한다.

실시예 5: 최소 수준의 급발성 초기유전자 발현이 가능한 HSV는 효율적이고 낮은 독성의 DC로의 유전자 운반을 할 수 있으며 형질도입된 DC에서 운반된 항원의 처리가 일어난다는 결과를 나타낸다.

상기 실시예 4에서와 같이, 웨스턴 및 노던 블라팅의 비교실험이 수행되었다(RNA에 대해서는 slot blot을 수행하였다). 17+/pR20.5/UL43, 1764/pR15/MSVGFP/UL43 또는 1764/27-/4-/pR20.5에 감염된 DC의 추출물에서 lacZ 및 GFP 단백질 수준 및 RNA 수준을 비교하였다.

결과

본 실험의 결과는 1764/27-/4-/pR20.5에 감염된 세포를 제외하고는 실시예 4의 결과와 같았다. 여기서, 17+/pR20.5/UL43 및 1764/pR15/MSVGFP/UL43으로 감염된 세포에서 동등한 수준의 lacZ 및 GFP RNA가 검출되는 반면, 17+/pR20.5/UL43 또는 1764/pR15/MSVGFP/UL43의 경우보다 상당히 낮은 수준으로 상대적으로 낮은 수준의 GFP가 웨스턴 블라팅에 의해 검출되었다. 따라서, 1764/27-/4-/pR20.5의 경우에는 실시예 4 및 5에서 평가된 모든 바이러스에 대해 비슷하게 존재하는 lacZ 및 GFP RNA의 양을 생각할 때, 기대되는 것보다 lacZ 및 GFP 단백질의 낮은 발현수준이 검출되었다(실시예 4에서 1764/pR15/MSVGFP/UL43의 lacZ 단백질의 낮은 발현수준보다도 오히려 낮은). 이 결과는 지금까지 평가된 바이러스와는 달리, 1764/27-/4-/pR20.5으로 유전자 운반 후 lacZ 및 GFP 둘 다 기능적인 DC에서 예상되는 것과 같은 단백질 분해과정을 겪는다는 것을 암시한다. 이것은 1764/pR15/MSVGFP/UL43를 사용하여 유전자 운반후에 얻은 상기 결과를 넘어선 더 심오한 기능성을 암시한다.

REFERENCES

- MacLean, A. R. et al., (1991), J. Gen. Virol. 72: 632-239.
- Chou, J. et al., (1994), J. Virol. 68: 8304-8311.
- Chou, J. and Roizmann B. (1992), PNAS 89: 3266-3270.
- Gendler, S. J. et al., (1990), J. Biol. Chem. 265: 15286-15293.

- Aicher, A. et al., (1997), *Exp. Hematol.* 25: 39-44.
- Samaniego, L. A. et al., (1995), *J. Virol.* 69: 5705-5715.
- Zitvogel, L. et al., (1996), *J. Exp. Med.* 183: 87-97.
- Celluzzi, C. M. et al., (1996), *J. Exp. Med.* 183: 283-287.
- Reeves, M. E. et al., (1996), *Cancer Research* 56: 5672-5677.
- Arthur, J. F. et al., (1997), *Cancer Gene Therapy* 4: 17-25.
- Coffin, R. S. et al., (1998), *Gene Therapy* 5: 718-722.
- Coffin, R. S. and Latchman, D. S.(1996), *Genetic Manipulation of the Nervous System*(D. S. Latchman Ed.) pp 99-114: Academic Press, London.
- Inaba, K. et al., (1992) *J. Exp. Med.* 175: 1157-1167.
- Caux, C. et al., (1992), *Nature* 360: 258-261.
- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994), *J. Exp. Med.* 179: 1109-1118.
- Coffin, R. S. et al., (1996), *Gene Therapy* 3: 886-891.
- Ace, C. I. et al., (1989), *J. Virol.* 63: 2260-2269.
- Smith, I. L. et al., (1992), *Virology* 186: 74-86.
- Rice, S. A. and Knipe, D. M. (1990), *J. Virol.* 64: 1704-1715.
- DeLuca, N. A. et al., (1985), *J. Virol.* 56: 558-570.
- MacFarlane, M. et al., (1992), *J. Gen. Virol.* 73: 285-292.
- Locensgard, J. R. et al., (1994), *J. Virol.* 68: 7148-7158.
- Maclean, C. A. et al., (1992), *J. Gen. Virol.* 72: 897-906.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992), *PNAS* 89: 5547-5551.
- Gossen, M. et al., (1995), *Science* 268: 1766-1769.
- Smiley, J. R. and Duncan, J. (1997), *J. Virol.* 71: 6191-6193.
- Gorman, C. M. (1985), *DNA cloning, a practical approach*. Glover, D. M.(Ed). IRL Press: 143-190.
- Soriano, P. C., Montgomery, R., Geske, and A. Bradley(1991), *Cell* 64: 693-702.
- Sekulovich, R. E., Leary, K. and Sandri-Goldin, R. M. (1988), *J. Virol.* 62: 4510-4522.

청구항 1.

삭제

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.

삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.

삭제

청구항 12.

삭제

청구항 13.

삭제

청구항 14.

삭제

청구항 15.

삭제

청구항 16.

삭제

청구항 17.

삭제

청구항 18.

삭제

청구항 19.

삭제

청구항 20.

삭제

청구항 21.

바이러스의 UL43 유전자 및 vhs 유전자가 결실되고, 수상세포 내에서 일어나는 항원의 처리과정을 방해하지 않으면서 수상세포를 효율적으로 감염시킬 수 있는, 약독화된 허피스 바이러스.

청구항 22.

제 21항에 있어서,

바이러스는 허피스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus) 1 또는 2인 것을 특징으로 하는,

약독화된 허피스 바이러스.

청구항 23.

제 22항에 있어서,

바이러스의 ICP34.5 유전자가 결실된 것을 특징으로 하는

약독화된 허피스 바이러스.

청구항 24.

제 21항 내지 제 23항의 어느 한 항에 있어서,

바이러스는 전사촉진 활성이 불가능한 구조단백질을 암호화하는 VMW65 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는

약독화된 허피스 바이러스.

청구항 25.

제 21항 내지 제 23항의 어느 한 항에 있어서,

ICP0, ICP4, ICP22 및 ICP27을 암호화하는 유전자로부터 선택되는 적어도 1개의 기능적인 급발성 초기유전자가 결실된 것을 특징으로 하는

약독화된 허피스 바이러스.

청구항 26.

제 25항에 있어서,

상기 급발성 초기유전자는 ICP22인 것을 특징으로 하는

약독화된 허피스 바이러스.

청구항 27.

제 25항에 있어서,

ICP4 및 ICP27이 모두 결실되어 전사촉진활성이 불가능한 구조단백질을 암호화하는 VMW65 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는

약독화된 허피스 바이러스.

청구항 28.

제 25항에 있어서,

ICP0, ICP4, ICP22 및 ICP27을 암호화하는 유전자가 결실된 것을 특징으로 하는

약독화된 허피스 바이러스.

청구항 29.

제 22항 또는 제 23항에 있어서,

바이러스의 ICP47 유전자가 결실된 것을 특징으로 하는

약독화된 허피스 바이러스.

청구항 30.

제 21항 내지 제 23항 및 제 26항 내지 제 28항의 어느 한 항에 있어서,

면역 조절 단백질을 암호화하는 이종유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는

약독화된 허피스 바이러스.

청구항 31.

삭제

청구항 32.

삭제

청구항 33.

삭제

청구항 34.

제 21항 내지 제 23항 및 제 26항 내지 제 28항의 어느 한 항에 있어서,

기생충, 바이러스 또는 세균 유래의 폴리펩티드를 암호화하는 이종유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는
약독화된 허피스 바이러스.

청구항 35.

제 21항 내지 제 23항 및 제 26항 내지 제 28항의 어느 한 항에 있어서,

종양 항원(tumor antigen)을 암호화하는 이종유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는
약독화된 허피스 바이러스.

청구항 36.

삭제

청구항 37.

제 21항 내지 제 23항 및 제 26항 내지 제 28항의 어느 한 항에 개시된 약독화된 허피스 바이러스에 의해 감염된, 분리된
수상세포.

청구항 38.

삭제

청구항 39.

제 21항 내지 제 23항 및 제 26항 내지 제 28항의 어느 한 항의 약독화된 허피스 바이러스를 인간을 제외한 포유동물의 수
상세포에 생체 외(*in vitro*) 감염시키는 단계를 포함하는, 제 37항의 수상세포의 생체 외 제조방법.

청구항 40.

삭제

청구항 41.

삭제