

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
A61K 48/00

(11) 공개번호 특2001-0033062
(43) 공개일자 2001년04월25일

(21) 출원번호 10-2000-7006423
(22) 출원일자 2000년06월12일
 번역문제출일자 2000년06월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US1998/25720 (87) 국제공개번호 WO 1999/30742
(86) 국제출원출원일자 1998년12월11일 (87) 국제공개일자 1999년06월24일
(81) 지정국 AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 가나
 짐바브웨 감비아
EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄
EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴 핀란드 사이프러스
OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 기네비쓰
국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크메니스탄 터키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 미국 우즈베키스탄 베트남 폴란드 포르투칼 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 가나 감비아 크로아티아 인도네시아 시에라리온 짐바브웨 유고슬라비아 그레나다 인도

(30) 우선권주장 60/069,579 1997년12월12일 미국(US)
(71) 출원인 낸다이니, 루이기
 이탈리아 토리노 코르소 몬테 쿠코 144 (우편번호:10141)
 송, 진-핑
 미국 캘리포니아 팔로 알토 램보우 드라이브 3455 (우편번호:84306)
(72) 발명자 낸다이니, 루이기
 이탈리아 토리노 코르소 몬테 쿠코 144 (우편번호:10141)
 송, 진-핑
 미국 캘리포니아 팔로 알토 램보우 드라이브 3455 (우편번호:84306)
(74) 대리인 남상선

심사첨구 : 없음**(54) 렌티바이러스성 백터의 치료학적 용도****요약**

본 발명은 세포종의 렌티바이러스의 증식을 억제하는 렌티바이러스성 백터에 관한 것이다.

명세서**기술분야**

본 발명은 렌티바이러스(Lentivirus)로 부터 발생되거나 이와 연관된 질환을 치료하는데 있어서의 렌티바이러스성 백터의 용도에 관한 것이다.

배경기술

레트로바이러스 백터가 유전자 운반에 통상적으로 이용되는 한 방편이다[참조: Miller, Nature (1992) 357:455-460]. 전위되지 않은 단일의 복사 유전자를 광범위한 설치류, 영장류 및 사람 세포 내로 운반하는 레트로바이러스 백터의 능력으로 인해, 이러한 레트로바이러스 백터는 유전자를 특정 세포로 전이시키는데 매우 적합하다.

렌티바이러스는 통상적인 레트로바이러스 유전자인 gag, pol 및 env 이외에도 조절 또는 구조적 기능을 지니고 있는 다른 유전자를 함유하는 복합적인 레트로바이러스이다. 보다 더 복합적일 수록, 렌티바이러스는 잠복 감염 과정에서와 같이, 이의 주기를 조절할 수 있다.

전형적인 렌티바이러스는 AIDS의 병인제인 사람 면역결핍증 바이러스(HIV)이다. 생체내에서, HIV는 거의 분열되지 않은 말단적으로 분화된 세포인 매크로파아지(macrophage)를 감염시킬 수 있다. 시험관내에서, HIV는 단구-유도된 매크로파아지(MDM)의 1차 배양을 뿐만 아니라 아피디콜린 또는 γ조사를 이용한 치료에 의해 세포 주기에서 억제된 HeLa-CD4 또는 T 임파양 세포를 감염시킬 수 있다.

발명의 상세한 설명

발명의 요약

본 발명은 치료학적으로 유용한 렌티바이러스성 백터 자체의 용도에 관한 것이다. 이러한 백터는 항바이러스 활성을 지니고 있는 트랜스진(transgene)를 함유할 필요가 없다.

도면의 간단한 설명

도 1은 상이한 양의 HIV로 감염시킨 후에, 상이한 감염 중복도(M.O.I.; 직사각형, 삼각형, 타원형) 하의 렌티바이러스성 백터로 형질도입된 사람 SupTi 임파구 또는 형질도입되지 않은 대조군 세포(마름모형)에서의 Gag p24 항원 발현을 나타내는 4개의 그래프를 도시하고 있다.

도 2는 렌티바이러스성 백터로 형질도입되거나(삼각형) 또는 쥐의 백혈병 바이러스 이용 백터로 형질도입된(사각형) 사람 1차 CD4⁺ 임파구 또는 형질도입되지 않은 세포(다이아몬드)를 HIV 감염시킨 후의 Gag p24 항원 발현과 세포 생존을 도시하고 있다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 렌티바이러스성 백터의 용도를 제공한다. 이러한 백터는 항바이러스 활성을 지니고 있는 외래 유전자를 수반하는 것일 수 있지만, 이 것이 본 발명을 실시하는데 필수적인 것은 아니다. 따라서, 백터 그 자체를 사용할 수 있다.

렌티바이러스성 지놈 및 프로바이러스성 DNA는 2개의 장 말단 반복LTR) 서열에 의해 플랫킹되는, 레트로바이러스에서 발견되는 3가지 유전자, 즉 gag, pol 및 env를 지니고 있다. gag 유전자는 내부 구조(매트릭스, 캡시드 및 뉴클레오태이드) 단백질을 암호화하고; pol 유전자는 RNA-지시된 DNA 폴리머라제(역 전사효소), 프로테아제 및 인테그라제를 암호화하며; env 유전자는 바이러스성 엔벨로프(envelope) 당단백질을 암호화한다. 5' 및 3' LTR은 비리온 RNA의 전사와 폴리아데닐화를 증진시키는 역할을 한다. 이러한 LTR은 바이러스 복제에 필요한 기타 모든 시스-작용성 서열을 함유하고 있다. 렌티바이러스는 (HIV-1, HIV-2 및/또는 SIV 중의) vif, vpr, tat, rev, vpu, nef 및 vpx를 포함한 부가의 유전자를 지니고 있다.

5' LTR에 인접하여 있는 것은 지놈의 역전사에 필요하고(tRNA 프라이머 결합 부위) 바이러스성 RNA를 입자 내로 효율적으로 캡시드화시키는데 필요한(Psi 부위) 서열이다. 이러한 캡시드화(또는 레트로바이러스성 RNA를 감염성 비리온 내로 패키징함)하는데 필요한 서열이 상기 바이러스성 지놈에 존재하지 않을 경우, 이와 같은 시스 결함으로 인해, 지놈성 RNA가 캡시드화되는 것이 억제된다. 그러나, 이로써 생성된 돌연변이체는 여전히, 모든 비리온 단백질의 합성을 지시할 수 있다.

관심있는 백터는 온전한 5' 및 3' 렌티바이러스 LTR을 갖는 것이다. 관심있는 백터는 LTR의 하부에 리더 서열을 포함하고 gag 유전자의 개시점 까지의 패키징 시그널 서열을 함유한다. 이러한 백터는 또한, 패키징을 증진시키기 위한 부가의 gag 유전자 특정 부분을 함유할 수도 있다. 관심있는 백터는 또한, Rev 반응 요소(RRE)를 함유하는 env 유전자의 일부를 포함하고, 이는 RRE의 하부에 슬라이스 수용체 부위를 포함하거나 포함하지 않을 수도 있다. 관심있는 백터는 하나 이상의 트랜스진, 또는 외래 핵산, 및 바람직하게는 항바이러스 활성을 지니고 있는 트랜스진을 함유할 수 있다. 그러나, 관심있는 백터가 이종(heterologous) 유전자를 함유할 필요는 없다.

이종 또는 외래 핵산 서열, 즉 트랜스진은 조절성 핵산 서열에 작동적으로 연결된다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "이종" 핵산 서열은 외래 종으로부터 유래되는 서열을 지칭하거나, 또는 동일한 종으로부터 유래된 것일 경우, 온전한 형태로부터 상당히 변형된 것일 수 있다. 또 다르게는, 특정 세포에서 정상적으로 발현되지 않는, 변화되지 않은 핵산 서열이 이종 핵산 서열이다.

용어 "작동적으로 연결된"이란 조절 서열과 이종 핵산 서열 간의 작용성 연결을 지칭하며, 이러한 연결로 인해 후자가 발현된다. 바람직하게는, 이종 서열이 프로모터에 연결되어 키메릭 유전자를 생성시킨다. 이러한 이종 핵산 서열이 바이러스성 LTR 프로모터-증진제 시그널 또는 내부 프로모터의 조절하에 있는 것이 바람직하고, 레트로바이러스성 LTR 내에 보유된 시그널은 여전히, 상기 트랜스진을 효과적으로 발현시킬 수 있다.

외래 유전자는 관심있는 어떠한 전사 가능한 핵산일 수도 있다. 일반적으로, 외래 유전자는 폴리펩티드를 암호화한다. 바람직하게는, 이러한 폴리펩티드는 몇몇 치료학적 이점을 지니고 있다. 상기 폴리펩티드는 숙주 세포에서의 내인성 단백질의 결함있거나 존재하지 않는 발현을 보충시킬 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 키메릭 시그널링 수용체와 같은 숙주 세포에 새로운 성질을 부여할 수 있다[참조: 미국 특

허 제5,359,045호]. 숙련인은 본원에 교시되고 당해 분야에 공지된 외래 유전자 실시 기술이 적절한 것 인지의 여부를 결정할 수 있다. 예를 들면, 숙련인은 특정 외래 유전자가 캡시드화에 적합한 크기인지, 그리고 외래 유전자 생성물이 적절하게 발현되는지를 인지할 것이다.

특정 분자를 본 발명의 방법에 의해 도입함으로써, 특정 세포에서의 유전자 조절성 분자의 발현을 조절하는 것이 바람직할 수 있다. 용어 "조절하다"는 특정 유전자가 과발현되는 경우에는 이의 발현을 억제시키거나 또는 이러한 유전자가 수준 미만으로 발현되는 경우에는 이의 발현을 증대시키는 것을 의미한다. 세포 증식성 장애가 특정 유전자의 발현과 연관된 경우에는, 해독 수준에서 특정 유전자의 발현을 방해하는 핵산 서열을 사용할 수 있다. 이러한 접근법은, 예를 들면, 안티센스 핵산, 리보자임 또는 삼중체 제제를 이용하여, 특이적 mRNA를 안티센스 핵산 또는 삼중체 제제로 은폐시키거나 또는 상기 mRNA를 리보자임으로 절단함으로써 이러한 특이적 mRNA의 전사 또는 해독을 차단시킬 수 있다. 이들 분자의 표적이 렌티바이러스성 RNA이다. 더욱이, 이러한 RNA는 백터 내에 존재하지 않거나 백터 내에서 돌연변이시킨, 상기 바이러스의 서열일 수 있다.

안티센스 핵산은 특이적 mRNA 분자의 적어도 일부분에 상보적인 DNA 또는 RNA 분자이다[참조: Weintraub, Sci. Am. (1990) 262:40]. 상기 세포에서, 안티센스 핵산은 이분쇄 분자를 형성하는 상응하는 mRNA와 하이브리드화된다. 안티센스 핵산은 mRNA의 해독을 방해하는데, 이는 세포가 이분쇄인 mRNA를 해독하지 않을 것이기 때문이다. 약 15개 이상의 뉴클레오티드를 갖는 안티센스 올리고머가 바람직한데, 이는 상기 올리고머가 표적 세포 내로 도입될 때 더욱 큰 분자 보다 문제를 덜 야기시키며 용이하게 합성되기 때문이다. 유전자의 시험관내 해독을 억제시키기 위해 안티센스 방법을 사용하는 것은 당해 분야에 널리 공지되어 있다[참조: Marcus-Sakura, Anal. Biochem. (1988) 172:289].

안티센스 핵산을 사용하여 바이러스성 단백질 또는 우점적으로 활성인 유전자 생성물, 예를 들면, 알츠하이머병(Alzheimer's disease)에 축적되는 유전분질 전구체 단백질의 발현을 차단시킬 수 있다. 이러한 방법은 또한, 헌팅تون병(Huntington's disease), 유전성 파킨슨병 및 기타 질환을 치료하는데 유용하다. 안티센스 핵산은 또한, 독성과 연관된 단백질의 발현을 억제시키는데 유용하다.

전사를 지연시키는 올리고뉴클레오티드의 용도는 삼중체 방법으로서 공지된 기전에 의한 것일 수 있는데, 이는 올리고머가 삼중쇄 나선을 형성하면서 이중-나선형 DNA 주위를 감고 있기 때문이다. 따라서, 이러한 삼중체 화합물은 선택된 유전자 상의 독특한 부위를 인식하도록 고안될 수 있다[참조: Maher et al., Antisense Res and Dev. (1991) 1(3):227; Helene, Anticancer Drug Dis. (1991) 6(6):569].

리보자임은 DNA 제한 엔도뉴클레아제와 유사한 방식으로 기타 단일쇄 RNA를 특이적으로 절단시키는 능력을 보유하고 있는 RNA 분자이다. 이들 RNA를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 변형을 통하여, RNA 분자 중의 특이적 뉴클레오티드 서열을 인식하여 이를 절단하는 분자를 공학적으로 처리하는 것이 가능하다[참조: Cech, J. Amer. Med Assn. (1988) 260:3030]. 이러한 접근법의 주요 이점은 특정한 서열을 갖는 mRNA 만이 불활성화된다는 것이다.

생물학적 반응 변형제를 암호화하는 핵산을 전이시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 범주에는 "인터루킨", 예를 들면, 인터루킨 1 내지 12로서 분류된 수 많은 사이토킨을 암호화하는 핵산을 포함한 면역 효능제가 포함된다. 동일한 기전에 따라서 반드시 작용하는 것은 아니지만, 이러한 범주에 포함되는 것은 인터페론, 특히 감마 인터페론(γ -IFN), 종양 괴사 인자(TNF) 및 과립구-매크로파아지 콜로니 자극 인자(GM-CSF)이다. 이러한 핵산을 골수 세포 또는 매크로파아지에 운반하여 선천성 효소 결핍증 또는 면역 결함을 치료할 수 있다. 성장 인자, 독성 펩티드, 리간드, 수용체 또는 기타 생리학적으로 중요한 단백질을 암호화하는 핵산을 또한 세포 내로 도입할 수 있다. 트랜스진은 또한 유도성 독성 분자일 수 있다.

본 발명의 방법은 또한, 생체외에서 본 발명의 재조합 렌티바이러스로 감염된 세포의 이식, 또는 중추 신경계 또는 뇌실강으로의 생체내 감염 또는 숙주 뇌 표면 상으로의 생체내 경뇌막하 감염을 포함하는, 뉴런(neuron) 세포, 신경교 세포, 섬유아세포 또는 간엽 세포 이식 또는 "그래프팅"에 유용할 수 있다. 이러한 그래프팅 방법은 당해 분야의 숙련인에게 공지될 것이며 문헌[참조: Neural Grafting in the Mammalian CNS, Bjorklund & Stenevi, eds. (1985)]에 기재되어 있다.

특정 단백질 생성물의 결핍으로 인한 질병의 경우에는, 유전자 전이가, 대체 요법을 위해서 뿐만 아니라 안티센스 돌연변이를 이용하여 상기 질환에 대한 동물 모델을 만들어 내기 위해서 정상적인 유전자를 감염된 조직 내로 도입시킬 수 있다. 예를 들면, 근육, 비장 또는 간 세포의 감염을 위해 인자 VIII 또는 IX 암호화 핵산을 렌티바이러스 내로 삽입시키는 것이 바람직할 수 있다.

프로모터 서열은 목적하는 유전자 서열과 동종이거나 이종일 수 있다. 바이러스성 또는 포유류 프로모터, 및 유도성 프로모터를 포함한 광범위한 프로모터를 이용할 수 있다. 세포 또는 조직 특이적 프로모터를 이용하여 특이적 세포 집단에서의 유전자 서열의 발현을 표적으로 할 수 있다. 본 발명에 적합한 포유류 및 바이러스성 프로모터는 당해 분야에서 입수 가능하다.

임의로 클로닝 단계 동안, 패키징 시그널과 이종 클로닝 부위를 갖는, 전이 백터로서 지칭된 핵산 작제물은 또한 선별성 마커 유전자를 함유한다. 마커 유전자를 이용하여 백터의 존재 여부를 검정하고, 이로써 감염과 통합 여부를 확인한다. 마커 유전자의 존재는 상기 삽입물을 발현하는 숙주 세포 만이 선별되어 성장한다는 것을 확인시켜 준다. 전형적인 선별 유전자는 항생제 및 기타 독성 물질, 예를 들면, 히스티디놀, 푸로마이신, 하이그로마이신, 네오마이신, 메토트렉세이트 등에 내성을 부여하는 단백질, 및 세포 표면 마커를 암호화한다.

본 발명의 재조합 바이러스는 특정 핵산 서열을 포유류 세포 내로 전이시킬 수 있다. 용어 "핵산 서열"은 본원에 상세히 논의된 바와 같은 모든 핵산 분자, 바람직하게는 DNA를 지칭한다. 이러한 핵산 분자는 DNA, cDNA, 합성 DNA, RNA 또는 이의 조합물을 포함한, 각종 공급원으로부터 유도된 것일 수 있다. 이러한 핵산 서열은 천연의 인트론을 포함하거나 포함하지 않을 수 있는 지놈성 DNA를 포함할 수 있다. 더욱이, 이러한 지놈성 DNA는 프로모터 영역, 폴리 A 서열 또는 기타 연관된 서열과 연계해서 수득될 수

있다. 지놈성 DNA는 당해 분야에 널리 공지된 방법에 의해 적합한 세포로부터 추출 및 정제할 수 있다. 또 다른게는, 메신저 RNA(mRNA)를 세포로부터 분리하고, 이를 이용하여 역전사 또는 기타 수단에 의해 cDNA를 생성시킬 수 있다.

바람직하게는, 본 발명의 방법에 의해 생성된 재조합 렌티바이러스는 사람 면역결핍증 바이러스(HIV)의 유도체이다.

관심있는 벡터는 공지된 방법을 사용하여 생성한다. 관심있는 벡터는 핵산으로서 세포 내로 도입되거나 또는 바이러스 입자로서 캡시드화되어 세포 내로 도입될 수 있다. 숙련인은 관심있는 렌티바이러스성 벡터를 캡시드화하는 방법을 잘 인지하고 있다. 이 벡터를 당해 분야의 숙련인에게 공지된 방법을 사용하여 표적 세포 내로 도입한다.

따라서, 상기 벡터를 인산칼슘 형질감염, 리포펙션(lipofection) 또는 전기천공에 의해, 일반적으로 neo, DHFR, GIn 신세타제(synthetase) 또는 ADA과 같은 우점적 선별성 마커와 함께 사람 세포주 내로 도입한 다음, 적당한 약물의 존재하에서 선별하고 클론을 분리할 수 있다. 이러한 선별성 마커 유전자가 트랜스진일 수 있다.

숙주 세포를 관심있는 벡터로 형질전환시킬 수 있는 방법은 세포를 관심있는 벡터를 수반하는 바이러스 입자로 감염시키는 것이다. 따라서, 관심있는 벡터를 문헌[참조: 미국특허 제5,686,279호 및 Naldini et al. Science (1996) 272:263-267]에 교시된 바와 같은 공지된 패키징 시스템을 사용하여 캡시드화시킬 수 있다. 간략하게 언급하면, 안정한 패키징 세포주를 사용하거나 일시적인 형질감염시킴으로써, 관심있는 벡터를 바이러스 입자 내로 패키징시키는 세포 내로 관심있는 벡터를 도입한다. 이러한 바이러스 입자는 바이러스 제제를 제공하도록 당해 분야에 공지된 바와 같이 처리된 배양 배지로부터 수득된다.

이어서, 표적 세포를 바이러스 제제에 노출시킨다. 이는 바이러스 제제를 예를 들어, 비경구 형태로 숙주에게 투여하는 생체내 투여 방법을 통하여 이루어질 수 있다. 또 다른게는, 숙주로부터의 세포를 복구한 다음, 이를 배양을 내에 유지시켜, 여기서 이들 세포가 바이러스 제제에 노출되도록 한다. 일단 이들 세포가 안정적이든 안정적이지 않은 간에 형질전환되면, 이들 세포를 다시 숙주에 주입할 수 있다.

본 발명의 치료학적 이점이 당해 벡터 자체에 의해 획득될 수 있긴 하지만, 이 벡터가 트랜스진을 수반하는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 이러한 트랜스진은 자체적으로 치료학적 효과를 지니고 있는 것이다. 따라서, 관심있는 벡터는 렌티바이러스와 연관된 질환에 대한 현재의 치료법에 일정한 위치를 차지해야 한다.

벡터 등을 작제하기 위해 사용된 기술이 특정한 조건과 과정을 기재하고 있는 표준 자재에 제공되거나 하지만, 편의상, 다음 기재 내용이 가이드라인으로서 제공될 수 있다.

본 발명에 따르는 벡터의 작제 방법은 당해 분야에 널리 인지되고 있는 표준 연결 및 제한 기술을 이용하고 있다[참조: Maniatis et al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1982]. 분리된 플라스미드, DNA 서열 또는 합성된 올리고뉴클레오티드를 절단하고, 적절히 조정한 다음, 목적하는 형태로 재연결시킨다.

부위-특이적 DNA 절단은 당해 분야에 인지되고 있는 조건[이의 세세한 내용은 시판용 제한 효소의 제조업자에 의해 구체적으로 제시된다][참조: New England Biolabs, Product Catalog] 하에서 적합한 제한 효소(들)로 처리함으로써 수행한다. 일반적으로, 플라스미드 또는 DNA 서열 약 1 μ g을 완충액 약 20 μ l 중의 효소 1단위로 절단한다. 전형적으로, 과량의 제한 효소를 사용하여 DNA 기질을 완전히 분해할 수 있다. 약 37°C에서의 약 1 내지 2시간의 배양 시간이 작업 가능하긴 하지만, 이를 변형시키는 것도 가능하다. 각 배양 후, 단백질을 폐놀/글로로포름으로 추출한 다음 애텍트 추출시킴으로써 제거하고, 에탄올로 침전시킴으로써 수성 분획으로부터 핵산을 수거한다. 경우에 따라, 표준 기술을 사용하여 폴리아크릴아미드 겔 또는 아가로즈 겔 전기영동에 의해, 절단된 단편의 크기 분리를 수행할 수 있다. 크기 분리에 관한 일반적인 내용이 문헌[참조: Methods of Enzymology 65:499-560 (1980)]에 기재되어 있다.

제한 절단된 단편을, 50mM 트리스(pH 7.6), 50mM NaCl, 6mM MgCl₂, 6mM DTT 및 5 내지 10 μ M dNTP's 중에서 20°C 하에 약 15 내지 25분의 배양 시간을 사용하여 4개의 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트(dNTP's)의 존재하에서 이. 콜라이(E. coli) DNA 폴리마라제 I(클레노우)의 큰 단편으로 처리함으로써 평활 말단시킬 수 있다. 4개의 dNTP's가 존재하는 경우일지라도, 이러한 클레노우 단편은 5' 접착 말단에 채워지길 하지만 이면 돌출성 3' 단일쇄를 파쇄시킨다. 경우에 따라, 접착 말단의 특징에 의해 지시된 제한 사항 내에서, dNTP's 중에서 단지 1개를 공급하거나 선택된 dNTP's를 사용함으로써 선별적인 복구를 수행할 수 있다. 클레노우로 처리한 후, 상기 혼합물을 폐놀/글로로포름으로 추출한 다음, 에탄올 침전시킨다. 적당한 조건하에서 S1 뉴클레아제 또는 Bal-31로 처리하면, 어떠한 단일쇄 부분도 가수분해된다.

다음의 표준 조건 및 온도 하에서 15 내지 50 μ l 용적으로 연결을 수행할 수 있다: 20mM 트리스-Cl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 33mg/ml BSA, 10mM~50mM NaCl 및 0°C 하에서의 40 μ M ATP, 0.01~0.02(Weiss) 단위 T4 DNA 리가제("접착 말단" 연결의 경우) 또는 14°C에서의 1mM ATP, 0.3~0.6(Weiss) 단위 T4 DNA 리가제("평활 말단" 연결의 경우). 분자간 "접착 말단" 연결은 통상적으로 33 내지 100 μ g/ml 총 DNA 농도(5 내지 100mM 총 말단 농도)에서 수행한다. 분자간 평활 말단 연결(통상적으로 10 내지 30배 물 과량의 링커를 이용함)은 1 μ M 총 말단 농도에서 수행한다.

렌티바이러스성 벡터[참조: Naldini et al., supra and Proc. Natl. Acad. Sci. (1996) 93:11382-11388]를 사용하여 시험관내에서 성장 억제된 사람 세포를 감염시켰고 다 자란 랫트의 뇌 내로 직접적으로 주사한 후에 뉴런을 형질도입하였다. 상기 벡터는 생체내에서 마커 유전자를 뉴런 내로 전이시키는데 유효하며, 탐지할 만한 병리학적 증상이 나타나지 않으면서도 장 시간 동안의 발현이 이루어졌다. 지금까

지 시행된 가장 긴 시간인, 상기 벡터를 단일 주사한지 10개월 후에 분석된 동물은 평균 트랜스진 발현 수준이 전혀 감소되지 않았고 조직 병리적 증상이나 면역 반응의 어떠한 징후도 나타내지 않았다[참조: Blomer et al., J. Virol. (1997) 71:6641-6649]. 비-분열성 세포를 형질도입시키는 벡터의 능력을 상쇄시키지 않고서도 HIV 발병력 유전자인 env, vif, vpr, vpu 및 nef를 결실시킨, 렌티바이러스성 벡터의 개선된 버전이 개발되었다. 배로 약독화된 버전은 이러한 벡터의 생체 안전성 측면에서 상당한 개선을 나타낸다[참조: Zufferey et al. Nat. Biotech. (1997) 15:871-875].

형질감염시킨지 48시간 후에 상등액을 여과시키는 것과 같은 표준 기술을 이용하여 바이러스성 상등액을 수거한다. 예를 들어, 10⁶개 NIH 3T3 세포 또는 10⁵개 HeLa 세포를 8μg/ml 폴리브렌(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)의 존재하에서 적당한 양의 바이러스성 상등액으로 감염시킴으로써 바이러스 역가를 결정한다. 48시간 후에, 형질도입 효능을 검정한다.

어떠한 특정한 가설에 얹매이는 것은 아니지만, 내성의 기전을 통합-후 단계에 대해 지도화하면 상기 벡터에서 온전한 HIV LTR에 의존적인 것으로 나타난 것으로 여겨진다. 형질도입된 세포를 HIV 감염시키면, 벡터 LTR로부터의 전사가 상당히 증진되어, 트랜스진의 발현이 증가되었다. 생각건대, 벡터 RNA는 트랜스액티베이터(transactivator)를 결합시키고 또한 바이러스성 입자를 발육시킴으로써 패키징하기 위하여 바이러스성 RNA와 효과적으로 경쟁하여, 바이러스 복제 및 상기 벡터의 고정화와 확산을 억제시킨다. 감염되고 형질도입된 세포로부터 수집된 바이러스성 입자는 감염되고 비-형질도입된 세포로부터 수집된 바이러스 보다 덜 감염성이고, 트랜스진을 온전한 세포 내로 효율적으로 전이시킨다.

따라서, 벡터와 바이러스 모두를 동일한 세포에 발현시키는 것은 바이러스성 복제에 손해가 되며, 이로써 트랜스진이 HIV의 선택된 표적 세포 내로 고정화 및 확산된다. 이러한 효과 및 HIV에 의해 유도된 트랜스진 발현의 강력한 증진 효과가 항-HIV 유전자 치료 적용 분야에 있어 HIV-유도된 벡터의 상당한 이점을 제공해준다.

따라서, 트랜스진을 함유하거나 함유하지 않는 본 발명의 벡터는 단독으로도 사용될 것이며, 바람직하게는 이러한 트랜스진이 항바이러스 활성을 지니고 있거나; 또는 본 발명의 벡터는 항바이러스 활성을 지니고 있는 트랜스진을 수반하는 또 다른 벡터와 조합하여 사용될 것이며, 여기서 본 발명의 벡터는 트랜스진을 함유하거나 함유하지 않는다.

바이러스성 입자를 당해 분야에 공지된 바와 같이 바이러스성 상등액으로부터 추가로 정제할 수 있다.

바이러스성 입자 또는 벡터 핵산을, 공지된 기술을 이용하여 렌티바이러스와 연관되거나 이에 의해 유발된 질환이 있는 숙주에게 투여할 수 있다.

벡터 또는 입자를 실제적으로 운반하는 것은 이를 숙주와 표적 세포 내로 수송하게 될 모든 물리적 방법을 사용함으로써 수행한다. 본원에 사용된 바와 같은 "벡터"는 그대로의 재조합 렌티바이러스성 벡터와 재조합 렌티바이러스성 입자 모두를 의미한다. 주사용으로 유용한 용제를 제공하기 위해서는, 특정 벡터를 한크스 발란스 식염수 용액이나 인산염 완충 식염수에 간단히 용해시키는 것으로 충분하다. 벡터와 함께 투여될 수 있는 담체 또는 기타 성분에 대한 공지된 어떠한 제한 사항도 없다(그러나, 비리온 또는 이의 폴리뉴클레오티드를 분해시키는 조성물은 벡터를 이용한 정상적인 방식에서는 피해야 한다).

약제학적 조성물은 매립식 폼프(당해 분야의 숙련인에게 공지되어 있고, 예를 들면, 미국 특허 제5,474,552호에 기재되어 있다)를 포함한, 근육내로 운반될 주사용 제형으로서 제조될 수 있다. 수 많은 주사용 제형이 공지되어 있고 본 발명을 실시하는데 이용될 수 있다. 당해 벡터는 투여 및 조작의 용이성 측면에서 약제학적으로 허용되는 어떠한 담체와도 함께 사용할 수 있다.

이러한 수성 용제를 경우에 따라 완충시킬 수 있으며, 액상 희석제를 먼저 식염수 또는 글루코즈로 등장성으로 만든다. 유리 산(DNA는 산성 포스페이트 그룹을 함유한다) 또는 약제학적으로 허용되는 염으로서의 당해 벡터의 용제는 하이드록시프로필셀룰로즈와 같은 계면활성제와 적절하게 혼합된 수 중에서 제조할 수 있다. 바이러스 입자의 분산제는 또한, 글리세롤, 액상 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물, 및 오일 중에서 제조할 수 있다. 통상적인 저장 및 사용 조건 하에서, 상기 제제들은 미생물의 성장을 방지시키는 방부제를 함유한다. 이용된 멀균성 수성 매질은 당해 분야의 숙련인에게 널리 공지된 표준 기술에 의해 수득될 수 있다.

주사용으로 적합한 약제학적 형태에는 멀균성 수성 용제 또는 분산제, 및 멀균성 주사용 용제 또는 분산제를 즉시 제조하기 위한 멀균성 산제가 포함된다. 모든 경우에 있어서, 이러한 형태는 멀균성이어야 하고 시린지에 의한 투여가 가능한 정도로 유체 상태여야 한다. 이러한 제형은 제조 및 저장 조건 하에서 안정해야 하고, 세균 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용으로부터 보존시켜야 한다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예: 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜 등), 이의 적합한 혼합물 및 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 예를 들면, 레시틴과 같은 피복제를 사용하고, 분산제의 경우에는 요구되는 입자 크기를 유지하며 계면활성제를 사용함으로써 적당한 유동성을 유지할 수 있다. 각종 항균제 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로잘 등을 사용함으로써, 미생물의 작용을 방지할 수 있다. 많은 경우에 있어서, 등장성 제제, 예를 들면, 당 또는 염화나트륨을 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 흡수를 자연시키는 제제, 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 사용함으로써 주사용 조성물의 흡수를 연장시킬 수 있다.

멀균성 주사용 용제는, 당해 벡터를 필요에 따라 상기 열거된 각종 기타 성분들과 함께, 적당한 용매에 요구되는 양으로 훈입시킨 다음 여과 살균시킴으로써 제조한다. 일반적으로, 분산제는, 멀균시킨 활성 성분을 염기성 분산 매질과 상기 열거된 것으로부터의 기타 필수 성분을 함유하는 멀균성 비히클 내로 훈입함으로써 제조한다. 멀균성 주사용 용제를 제조하기 위한 멀균성 산제의 경우에는, 바람직한 제조 방법이 진공 건조 및 동결 건조 방법인데, 이로써 활성 성분과 앞서의 멀균성 여과 용액으로부터의 목적 하는 모든 부가 성분을 함유하는 산제가 산출된다.

본 발명의 치료학적 화합물은 숙주에게 단독으로 투여하거나 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여할

수 있다. 앞서 인지된 바와 같이, 활성 성분과 담체의 상대적인 비율은 상기 화합물의 용해도 및 화학적 특성, 선택된 투여 경로 및 표준 약제학적 실시에 의해 결정된다.

예방 또는 치료에 가장 적합할, 본 발명의 치료학적 제제의 투여량은 투여 형태, 선택된 특정한 재조합 벡터 및 치료 중인 특정한 환자의 생리학적 특징에 따라서 다양할 것이다. 일반적으로, 초기에는 소량 투여하고, 필요한 경우, 최적의 효과가 달성을 때까지 조금씩 증량시킨다. 예시적인 투여량은 총 3 내지 10ml의 용적 중의 10 내지 대략 5×10^{15} 개 이하의 입자 범위 내이다.

본 발명을 상세히 기재하여 다음에 제시된 것은 본 발명의 각종 양태를 입증해주는 비-제한적인 실시예이다.

실시예

실시예 1

렌티바이러스성 벡터의 작제

렌티바이러스성 전이 벡터 플라스미드는 앞서 문헌[참조: Naldini et al., *Science* (1996) 272:263-267]에 기재된 플라스미드 pHR'-CMV-LacZ로부터 유도된 것이다. 플라스미드 pHR'-CMV-Neo는, 이. 콜라이 LacZ 유전자를 함유하는 pHR'-CMV-LacZ의 BamHI-Xhol 단편을 이. 콜라이의 네오마이신 포스포트랜스퍼제 유전자를 함유하는 BamHI-Xhol 단편으로 치환함으로써 유도시킨다[참조: Beck et al., *Gene* (1982) 19:327-336].

pHR2는 pHR 중의 3'LTR의 하부에 있는 nef 서열의 124개 염기쌍(bp)을 폴리링커로 대체시켜 HIV-1 서열을 감소시키고 또한 트랜스진 클로닝을 촉진시킨 렌티바이러스성 전이 벡터이다. 4.6킬로염기(kb) Clal-Stul 단편을, 주형으로서 pHR'-CMV-LacZ를 이용하는 PCR에 의해 발생된 828bp Clal-Stul 단편, 및 4.4kb Stul-NcoI 단편 및 pHR'-CMV-LacZ로부터의 4.5kb NcoI-Clal 단편과의 3 부분 연결부에서 옮리고며 뉴클레오티드 프라이머 5'-CCATCGATCACGAGACTAGTCCTACGTATCCCCGGGACGGGATCCGCGGAATTCCGTTAAGAC-3'(서열) 및 프라이머 5'-TTATAATGTCAAGGCCTCTC-3'(서열)으로 대체함으로써, pHR2를 pHR'-CMV-LacZ로부터 유도한다.

사람 PGK 전구체를 함유하는 pRT43.3PGKF3(WO 97/07225)의 Xhol-BamHI 단편(GeneBank 기탁 번호 #M11958 뉴클레오티드 2-516) 및 에이. 빅토리아(A. victoria)의 그린 형광성 단백질(GFP)의 코돈 활용 최적화되고 개선된 버전과 NotI-SacII 링커를 함유하는 플라스미드 pEGFP1(Clontech)의 BamHI-NotI 단편을 pHR2의 Xhol 및 SacII 부위 내로 클로닝시킴으로써, 플라스미드 pHR2-PGK-GFP를 유도한다.

실시예 2

렌티바이러스성 벡터에 의해 형질도입된 임파구의 HIV-1 복제 억제

사람 SupT1 T-임파아구 세포를 ATCC에 의해 수득한다. 사람 CD4⁺ 1차 혈액 임파구9(PBL)을 기증자의 연막으로부터 분리하고, 2.5μg/ml 피토헤마글루티닌 도는 OKT3 및 CD28 항체로 피복시킨 다이날 바이드(Dynal bead)로 2일 동안 자극시킨 다음, 세척하고 AIM-V 배지(Gibco) 중의 인터루킨 2(Chiron) 100U/ml와 함께 배양한다. SupT1 세포 또는 PBL을 폴리브렌 2μg/ml의 존재하에서 밤새, 동일한 트랜스진을 수반하는 쥐의 백혈병 바이러스(MLV) 벡터 또는 렌티벡터로 형질도입시키고, 세척한 다음, 48시간 후에 트랜스진 발현을 대해 선별한다.

293T 세포 및 슈도타입을 앞서 기재된 바와 같이[참조: Naldini et al., *Proc. Natl. Acad. Sci* (1996) 93:11382-88] VSV.G 엔벨로프로 일시적으로 횡단시킴으로써 모든 벡터를 제조한다. 네오마이신 내성 유전자를 수반하는 벡터로 형질도입된 세포를 1mg/ml G418을 함유하는 배지에서 선별한 다음, 바이러스 챌린지를 위해 정상적인 배지에서 배양한다. 트랜스진으로서 그린 형광성 단백질(GFP)을 수반하는 벡터로 형질도입된 세포를 세포 분류에 의해 선별한다.

이 세포를 대상으로 하여 HIV 바이러스의 양을 증가시키면서 챌린지한다. 프로바이러스성 감염성 분자 클론 R8로 형질감염된 293T 세포에 의하거나 또는 R8 바이러스로 만성적으로 감염된 SupT1 세포에 의해 HIV-1 비리온을 생성시킨다. R8은 모든 HIV 판독 프레임을 발현시키는 HXB2-D 및 NL43 분리물의 임파구 친화성 HIV-1 하이브리드이다[참조: Gallay et al., *Cell* (1995) 83:569-576]. 바이러스 모액을 HeLa P4 세포 상에서 역가 측정하면 1,000 내지 3,000 감염 단위/ng p24의 감염력을 나타낸다. 이 세포를 상기 바이러스와 함께 밤새 배양한 후에 2μg/ml 폴리브렌의 존재하에서 2회 세척하고, 3주 이하 동안 추가로 배양한다. 매 3 내지 3일마다, 상기와 같이 컨디셔닝된 배지를 수집하고 시판용 ELISA 키트(Dupont)에 의해 배지 중에서의 HIV-1 Gag p24의 촉적량에 의해 HIV 복제를 결정한다.

첫 번째 실험에서는(도 1 참조), 네오마이신 내성 유전자를 수반하는 렌티바이러스성 벡터인 pHR'-CMV-Neo에 의해 형질도입된 SupT1 세포를 시험하였다. HIV가 대조용의 비-형질도입된 배양물에 촉적되었다. 또 다른 한편, 렌티바이러스성 벡터인 pHR2에 의해 형질도입된 세포에서는, 보다 많은 양의 HIV에 대해서만 HIV 복제가 탐지되었고 p24 촉적이 상당히 저하되었으며 자연되었다. 상이한 감염 중복도(M.O.I.) 하의 렌티바이러스성 벡터로 형질도입된 후에 선별된 3가지 상이한 SupT1 집단을 이용하여 유사한 결과를 수득하였다. 더욱이, HIV 10ng 이하로 감염된 렌티벡터 형질도입된 세포에서는 어떠한 세포병리학적 효과도 관찰되지 않았다. 이와는 달리, 비-형질도입된 배양물은 시험된 모든 양의 HIV를 사용한 경우에 세포병리학적 효과를 나타내었다.

1차 세포에 HIV 성장에 대한 억제 효과를 적용할 수 있는지의 여부와 이의 렌티바이러스성 벡터에 대한 특이성을 또 다른 실험에서 시험한다(도 2 참조). CD4⁺ PBL's를 렌티벡터(pHR2-PGK-GFP)로 형질도입시키거나 사람 PGK 프로모터에 의해 구동된 동일한 GFP 트랜스진을 수반하는 MLV 렌트로벡터로 형질도입시키

고, 트랜스진 발현을 알아보기 위해 분류시킨다. 이어서, 이와 같이 선별된 집단을 상기 언급된 바와 같이 HIV 바이러스로 챌린지시킨다. 비-형질도입된 세포(도면에서 다이아몬드로 표시됨)와 MLV 레트로벡터에 의해 형질도입된 분류된 세포(사각형으로 표시됨) 모두가 배양 배지에서 유사한 수준의 p24 항원을 생성시켰다. 그러나, 렌티바이러스에 의해 형질도입된 세포(삼각형으로 표시됨)는 고용량의 HIV(바이러스의 100ng p24 등가물)로 접종시킨 후일자라도 상당히 감소된 p24를 생성시켰다. 더욱이, 감염 후 13일 동안 생존하는 렌티벡터에 의해 형질도입된 세포가 레트로바이러스에 의해 형질도입되거나 형질도입되지 않은 세포 보다 2배 정도 많았다. 렌티벡터에 의해 형질도입된 세포에서는, 트랜스진 발현이 HIV 바이러스로의 감염 후에 상당히 증대되었다.

본원에 인용된 모든 공보 및 특허원은 개개의 공보 또는 특허원이 참조로써 삽입된다고 구체적으로 언급되고 표시되는 것처럼 이의 전문이 본원에 참조문헌으로 삽입되어 있다.

본 발명이 속하는 기술 분야의 숙련인에게 명백한 바와 같이, 본 발명은 본 발명의 요지 또는 본질을 벗어나지 않으면서, 예를 들면, 기타 포유류 세포 유형을 형질감염 및 형질도입시키기 위해, 상기 구체적으로 언급된 것 이외의 형태에서 실시될 수 있다. 따라서, 상기 언급된 본 발명의 특정 양태는 단지 예시적이며 제한적이 아니다. 본 발명의 범위는 전술된 실시예에 제한되는 것이 아니라 첨부된 청구의 범위에 제시된 바와 같다.

서열 목록

```

<110> Song, Jin-Ping
      Naldini, Luigi
      Cell Genesys

<120> THERAPEUTIC USE OF LENTIVIRAL VECTORS

<130> F126422

<140>
<141>

<150> 60/069,579
<151> 1997-12-12

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 65
<212> DNA
<213> primer

<400> 1
ccatcgatca cgagactagt cctacgtata cccggggacg ggatccgcgg aattccgttt 60
aagac                               65

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> primer

<400> 2
ttataatgttc aaggccctctc

```

20

(57) 청구의 범위

청구항 1

렌티바이러스(lentivirus)에 감염된 속주를 렌티바이러스 벡터와 생물학적으로 허용되는 담체, 부형제 및 희석제에 노출시키는 것을 포함하여, 렌티바이러스에 감염된 속주를 치료하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 벡터가 온전한 5'LTR을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

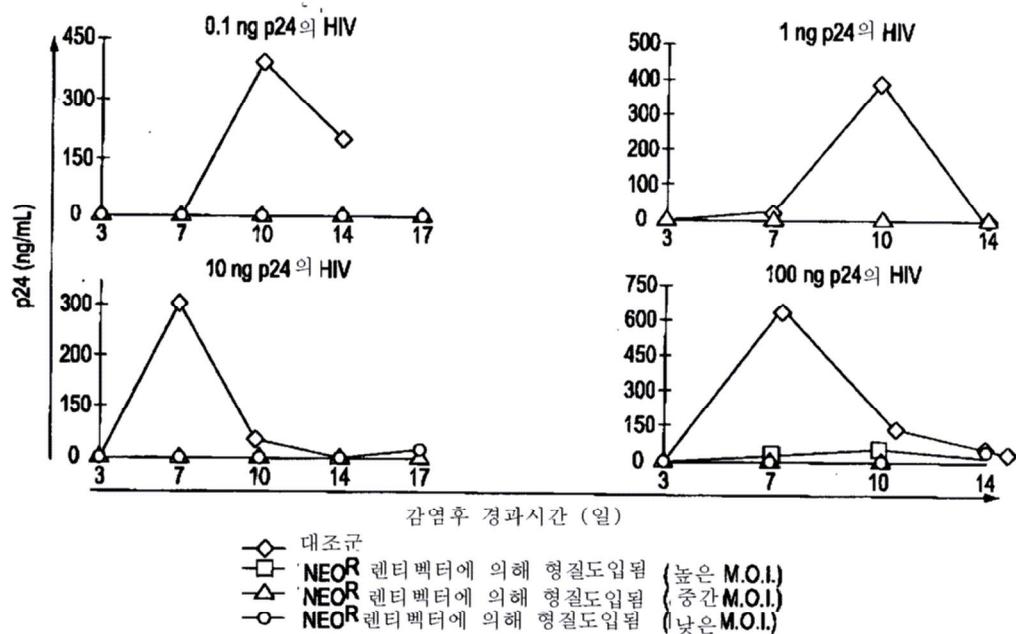
제 1항에 있어서, 렌티바이러스가 사람 면역결핍증 바이러스(HIV)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, HIV가 HIV-1인 것을 특징으로 하는 방법.

도면

도면1



도면2

