



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0114758  
(43) 공개일자 2013년10월17일

- (51) 국제특허분류(Int. C1.)  
*C12N 15/86* (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7025874(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2006년05월26일  
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2007-7030594  
원출원일자(국제) 2006년05월26일  
심사청구일자 2011년05월24일
- (85) 번역문제출일자 2013년09월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2006/002266
- (87) 국제공개번호 WO 2007/000668  
국제공개일자 2007년01월04일
- (30) 우선권주장  
60/684,954 2005년05월27일 미국(US)

- (71) 출원인  
오스페달레 산 라파엘 에스.알.엘.  
이탈리아, 밀라노 I-20132, 60, 비아 올게티나  
폰다지오네 텔레톤  
이탈리아 로마 00154 비아 데이 마가지니 제네랄  
리 18/20
- (72) 발명자  
날디니, 루이기  
이탈리아 아이-20132 밀라노 비아 올게티나 60 폰  
다지오네 센트로산 라파엘 텔 몬테 테이보  
브라운, 브라이언, 레이비드  
이탈리아 아이-20132 밀라노 비아 올게티나 60 폰  
다지오네 센트로산 라파엘 텔 몬테 테이보
- (74) 대리인  
특허법인 남앤드남

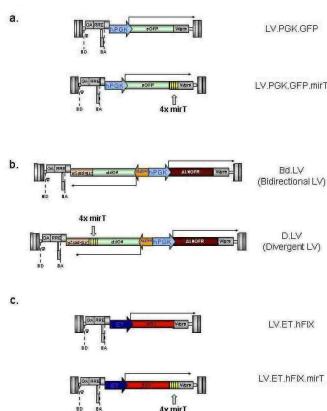
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **M I - R N A를 포함하는 유전자 벡터**

### (57) 요 약

miRNA 서열 표적을 포함하는 유전자 벡터.

### 대 표 도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

miRNA 서열 표적 및 도입유전자(transgene)를 포함하는 치료법(therapy)에 사용하기 위한 유전자 벡터.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본원발명은 유전자 도입 및 유전자 치료법 적용에 이용하기 위한 유전자 벡터, 및 상기 벡터를 생산하는 방법, 및 이의 용도와 관련이 있다.

### 배경기술

[0002] 렌티바이러스 벡터(LV) 및 그 외 바이러스성 벡터는 유전자 치료법을 위한 매력적인 도구이다(Thomas *et al.*, 2003). LV는 광범위한 조직에 형질도입될 수 있는데, 간세포, 뉴런 및 조혈모세포와 같은 비분열 세포가 포함된다. 더욱이, LV는 표적 세포의 게놈 내로 통합되며, 도입유전자(transgenes) 발현을 장기간 제공한다.

[0003] LV가 효율적이고 안정적인 유전자 도입을 제공할 수 있는 하지만, 특정 유형 세포에 대한 표적화된 (targeting) 발현, 또는 상기 세포로부터 탈-표적화된(de-targeting) 발현은 여전히 어려움이 있다. 이러한 문제점은 특히 다음에 설명하는 생체내에서의 벡터 투여와 관련이 있는데, 도입유전자의 발현은 특정 세포 개체군, 예를 들어, 종양세포 또는 간세포에서만 요망될 수 있으나, 광범위한 유형의 세포에 상기 도입유전자로 형질도입된다. 탈-표적화된 발현은 전구세포 또는 줄기세포가 형질도입될 때 중요하지만, 도입유전자의 발현이 임의의 한 특정 계통의 분화된 개체군에만 한정되도록 하는 것이 요구된다. 현재까지, 이 문제를 해결하려는 대부분의 노력은 벡터 외피를 표적화하거나 조직-특이적 프로모터를 조작하는 것에 의존하여 왔다. 그러나, 상기 두 방법에는 많은 제약이 있다.

[0004] 표적화된 외피는 벡터 역가(titer)를 감소시킬 수 있으며 그 결과 벡터 감염력의 감소를 초래한다(Sandrin *et al.*, 2003). 자연적으로 생성되는 프로모터/인핸서 엘리먼트(그러나 이와 동일한 것은 아님)에 기초하여 제작된, 조직-특이적 프로모터는 종종 어디에서나(ubiquitously) 발현되는 프로모터와 비교하여 표적 조직 내에서 약하게 발현된다. 또한, 이러한 조직-특이적 프로모터는 절대적인 세포 특이성을 항상 달성하지는 못한다 (Follenzi *et al.*, 2002). 표적이 아닌 세포 내에서 도입유전자의 발현이 다양한 이유로 일어날 수 있는데, 이에는 '새는(leaky)' 프로모터 활성 및 프로모터/인핸서 트래핑(trapping)이 포함된다(De Palma *et al.*, 2005). 상기 트래핑 현상은 벡터가 우선적으로 활발한 전사 부위로 통합되고, 차례로, 벡터의 프로모터와 독립하여 도입유전자 전사를 유도하기 때문에 일어나게 된다.

[0005] 특정 유형의 세포로부터의 도입유전자 발현을 엄격히 제한할 수 있으면서, 상기 문제점을 회피하고 높은 감염력 및 강건한 발현을 유지할 수 있는 벡터를 만들기 위해, 본 발명자들은 내생적으로 발현된 마이크로RNA(miRNA)에 의해 조절되는 벡터를 개발하였다.

[0006] PCT 국제공개공보 WO03/020931호는 miRNA를 제시하는 리포터 시스템 분석 시스템에 대해 소개하고 있으며, 상기 시스템은 용이하게 분석된 유전자의 뉴다운을 측정하는 방법을 제공한다. 상기 시스템은 siRNA 및 키메라 RNA가 용이하게 분석된 루시페라아제 유전자의 발현을 감소시킬 수 있는지 여부를 확인하기 위해 사용된다.

[0007] 미국 특허출원 제20050266552호는 miRNA 번역 리프레션(repression) 경로 및/또는 상기 경로의 화학적 조절자(modulators)와 관련된 유전자들을 동정하기 위해 사용될 수 있는 세포주를 제조하기 위해 포유동물 세포로 도입되기에 적당한 리포터 컨스트럭트의 제작에 대해 소개하고 있다.

[0008] 맨스필드 등과 브리넥 등의 논문(Mansfield JH *et al.* (2004) Nat Genet 36(10): 1079-83 Epub, erratum in Nat Genet (2004) 36(11): 1238; 및 Brennecke J *et al* (2005) PLoS Biol 3(3):e85)은 모두 miRNA 표적 서열과 함께 리포터 유전자를 포함하는 플라스미드에 대해 개시하고 있다. 상기 두 논문에서, 컨스트럭트는 내생성 (endogenous) miRNA의 발현을 확인하기 위해 디자인되었으나, 도입유전자를 조절하고/하거나 발현을 특정 유형 세포로 제한하기 위한 목적을 위해 디자인 되지는 아니하였다.

[0009] 가장 강조되어야 하는 본원발명의 중요한 기술적 특징은 본 발명자들이 벡터의 특이적 발현 프로파일이 달성되

도록 도입유전자 발현을 제어하기 위한 내생성 miRNA에 의해 벡터가 조절되도록 어떻게 디자인될 수 있는지를 개시한 부분에 있다. miRNA 표적 서열이 miRNA의 발현을 추적하기 위해 리포터 컨스트럭트(루시페라아제와 같은 마커 유전자를 발현하는 플라스미드) 내에 포함될 수 있다는 것을 설명하는, 보고가 이미 존재하지만, 기존의 보고는 벡터 조절을 위한 miRNA의 특이적 이용에 대해서는 개시하고 못하고 있다. 특히 기존 보고는 관심 있는 도입유전자에 대한 면역 매개 거부반응을 방지하기 위한 유전자 치료법적 접근 또는 바이러스 입자가 생산되는 세포에 일반적으로 치명적인 유독성 유전자(toxic gene)를 발현하는 바이러스 입자의 역가를 증가시키기 위한 제조방법적 접근에 관한 본원발명의 벡터의 용도에 대해 개시하고 있지 않다.

### 발명의 내용

- [0010] 본원발명의 일 양상에 따르면, 유전공학적 접근법, 예를 들어, miRNA 서열 표적을 포함하는 도입유전자에 관한 유전자 치료법, 유전자 도입 및/또는 발현 조절에 적당한 유전자 도입용 벡터가 제공된다. 상기 miRNA는 상기 도입유전자에 "작동가능하게 연결"된다. 용어 "작동가능하게 연결된(operably linked)"은 기재된 구성요소들이 그들의 의도된 방식으로 기능하는 것이 허용되는 관계로 놓여 있다는 것을 의미한다.
- [0011] 일 구체예에서, 상기 벡터는 miRNA 서열 표적을 포함하는 바이러스성 벡터 입자이다.
- [0012] 일 구체예에서, 상기 입자는 상기 벡터 입자의 게놈(DNA 또는 RNA)을 포함하는데, 상기 게놈이 상기 miRNA 서열 표적을 포함한다.
- [0013] 일 구체예에서, 상기 입자는 상기 벡터 입자의 게놈을 포함하는데, RNA 게놈이 상기 miRNA 서열 표적을 포함한다.
- [0014] 일 구체예에서, 상기 입자는 상기 벡터 입자의 RNA 게놈을 포함하는데, RNA 게놈이, 일렬로 나란히 연결되어(in tandem) 존재할 수 있는, 다수의 miRNA 서열 표적을 포함한다.
- [0015] 일 구체예에서, 상기 입자는 상기 RNA 벡터 입자의 게놈을 포함하는데, RNA 게놈은, 일렬로 나란히(in tandem) 존재할 수 있는, 다수의 상이한 miRNA 서열 표적을 포함한다.
- [0016] 벡터 내에 포함되는 하나 이상의 miRNA 표적 서열의 카피(copy)는 시스템의 유효성을 증가시킬 수 있다. 또한 본 발명자들은 상이한 miRNA 표적 서열이 포함될 수 있다는 것을 고려하고 있다. 예를 들어, 하나 이상의 도입 유전자를 발현하는 벡터는 하나 이상의 miRNA 표적 서열의 조절을 받는 도입유전자를 지닐 수 있는데, 상기 표적 서열들은 서로 다르거나 상이하지 않을 수 있다. 상기 miRNA 표적 서열은 일렬로 나란히 연결되어 존재할 수 있으나, 그 외 다른 배열, 예를 들어, 안티센스 방향의 이용이 예상된다. 안티센스 방향은 바이러스 입자 생산에 있어서 만일 회피되지 아니한다면 생산 세포에 유독할 수 있는, 유전자 산물의 발현을 회피하는데 유용 할 수 있다.
- [0017] 또 다른 구체예에서, 상기 입자는 벡터 입자의 게놈을 포함하는데, RNA 게놈이 도입유전자를 포함한다.
- [0018] 바람직하게는, 상기 입자는 렌티바이러스로부터 유래할 수 있다.
- [0019] 또 다른 구체예에서, 상기 유전자 도입 벡터는 비바이러스성 유전자 도입 벡터의 형태이다. 이러한 구체예에서, 상기 유전자 도입 벡터는 발현 벡터 또는 플라스미드를 포함하거나, 발현 벡터 또는 플라스미드의 형태일 수 있는데, 상기 발현 벡터 또는 플라스미드는 miRNA 표적 서열 및 선택적으로 도입유전자를 포함한다.
- [0020] 본원에 기재된 발현 벡터는 전사될 수 있는 서열을 함유한 핵산 지역을 포함한다. 따라서, mRNA, tRNA 및 rRNA 를 엔코딩하는 서열은 이러한 정의에 포함된다.
- [0021] 본원발명의 유전자 벡터 또는 유전자 도입 벡터는 관심있는 부위 또는 세포로 도입유전자를 운반하는데 사용될 수 있다. 본원발명의 벡터는 바이러스성 또는 비바이러스성 벡터에 의해 표적 부위로 운반될 수 있다.
- [0022] 벡터는 임의의 환경으로부터 또 다른 환경으로의 임의의 개체(entity)의 운반을 가능하게 하거나 용이하게 하는 도구이다. 일례로서, 재조합 DNA 기술에서 사용되는 몇몇 벡터는 개체, 예를 들어, DNA의 조각(segment)(예: 이종 DNA 조각, 이종 cDNA 조각)이 표적 세포 내로 운반되도록 한다. 선택적으로, 일단 상기 표적 세포내로 운반되면, 상기 벡터는 이후 세포내에서 상기 이종 DNA가 유지될 수 있게 도움을 주거나 DNA 복제의 한 단위로 역할할 수 있다. 재조합 DNA 기술에서 사용되는 벡터의 일례는 플라스미드, 염색체, 인공 염색체 또는 바이러스를 포함한다.

- [0023] 비바이러스성 운반 시스템은 DNA 트랜스펙션 방법을 포함하나, 이에만 한정되는 것은 아니다. 여기서, 트랜스펙션은 비바이러스성 벡터를 이용하여 임의의 유전자를 표적 포유동물 세포로 운반하는 과정을 포함한다.
- [0024] 전형적인 트랜스펙션 방법은 전기천공법(electroporation), DNA 유전자총법(biolistics), 지질-매개 트랜스펙션, 콤팩트 DNA-매개 트랜스펙션, 리포좀, 면역리포좀(immunoliposomes), 리포펙틴, 양이온성 제제-매개, 양이온성 표면 친양쪽성물질(cationic facial amphiphiles, CFAs)(Nature Biotechnology 1996 14; 556), 및 이의 조합물을 포함한다.
- [0025] 바이러스성 운반 시스템은 아데노바이러스 벡터, 아데노부속바이러스(AAV) 벡터, 포진(herpes)바이러스성 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 베클로바이러스성 벡터를 포함하나, 이에만 한정되는 것은 아니다. 그 외 벡터의 예는 생체외(*ex vivo*) 운반 시스템을 포함하는데, 상기 시스템은 DNA 트랜스펙션 방법, 예를 들어, 전기천공법, DNA 유전자총법, 지질-매개 트랜스펙션, 콤팩트 DNA-매개 트랜스펙션을 포함하나, 이에만 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 용어 "벡터 입자"는 패키지된 레트로바이러스 벡터를 의미하는데, 상기 벡터는 바람직하게는 표적 세포에 결합 및 진입할 수 있다. 벡터에 관해 이미 논의한 바와 같이, 입자의 구성요소는, 야생형 레트로바이러스와 관련하여 변형될 수 있다. 예를 들어, 입자의 단백성 외막(proteinaceous coat)내의 Env 단백질의 표적화 특이성을 변형시키거나 그 외 요망되는 몇몇 기능을 획득하기 위해 상기 단백질은 유전자적으로 변형될 수 있다.
- [0027] 바람직하게는, 바이러스성 벡터는 특정 유형의 세포 또는 여러 유형의 세포들을 우선적으로 형질도입시킨다.
- [0028] 보다 바람직하게는, 바이러스성 벡터는 표적화된 벡터인데, 천연 바이러스와 비교하여 변형된 조직 친화성(tropism)을 지니며, 이로써 상기 벡터는 특정 세포로 표적화되어 진다.
- [0029] 또 다른 구체예에서, miRNA 표적 서열을 포함하는 입자는 mir-142as(hsa-mir-142-3p로도 불리움), let-7a, mir-15a, mir-16, mir-17-5p, mir-19, mir-142-5p, mir-145, mir-218 miRNA에 의해 표적화된 입자이다.
- [0030] 본원발명의 또 다른 양상에 따르면, miRNA 서열 표적, 및 선택적으로 도입유전자를 포함하는 패키지될 수 있는 벡터 게놈을 엔코딩하는 DNA 컨스트럭트를 포함하는 바이러스성 벡터 입자를 생산하기 위한 DNA 컨스트럭트 세트가 제공된다. 패키지될 수 있는 벡터 게놈에 의해 본 발명자들이 의미하고자 하는 바는 상기 벡터 게놈이 바이러스성 벡터 입자 내로 패키지될 수 있는 환경에 존재한다는 것이다. 이는 유전자적으로 Gag-Pol 및 Env의 존재를 필요로 한다.
- [0031] 본원발명의 또 다른 양상에 따르면, 청구된 상기 DNA 컨스트럭트 세트를 숙주세포로 도입하는 단계, 및 바이러스성 벡터 입자를 수득하는 단계를 포함하는 바이러스성 벡터 입자를 제조하기 위한 방법이 제공된다.
- [0032] 본원발명의 또 다른 양상에 따르면, 본원발명의 방법에 의해 생산된 바이러스성 벡터 입자가 제공된다.
- [0033] 본원발명의 또 다른 양상에 따르면, 약제학적으로 허용되는 희석제, 부형제 또는 담체와 함께 본원발명에 따른 유전자 벡터 또는 벡터 입자를 포함하는 약제 조성물이 제공된다.
- [0034] 본원발명의 추가 양상에 따르면, 본원발명의 벡터 입자로 감염 또는 형질도입된 세포가 제공된다. 일 구체예에서 상기 세포는 상응하는(corresponding) miRNA를 포함한다. 상기 세포는 생체내 또는 시험관내 시나리오에서 형질도입 또는 감염될 수 있다. 상기 세포는 동물(바람직하게는 포유동물, 예를 들어, 사람 또는 마우스) 또는 동물의 일부분으로부터 유래될 수 있다. 따라서 본원발명은 트랜스제닉(transgenic) 동물(예를 들어, 질병 모델로 이용하기 위한 유전자이식 동물)을 제공하는데 유용하다고 여겨질 것이다. 일 구체예에서, 상기 포유동물은 사람이 아닌 포유동물이다.
- [0035] 현재의 벡터 전사 조절 접근법은 대부분 내생성 유전자로부터 취득한 인핸서-프로모터 엘리먼트의 운반에 의존하고 있다(Thomas *et al.*, 2003; Verma and Weitzman, 2005). 이러한 접근법을 이용할 때, 유전자 도입과 치료법 적용을 위해 흔히 요구되나, 고도로 특이적인 유전자 발현 패턴의 재구축은 운반 시스템, 벡터 용량, 및 삽입 관련 위치적 영향(벡터 통합을 위한)에 의해 제한된다. 조절을 위하여 내생적으로 발현된 miRNA를 이용한 신규한 벡터를 개발함으로써, 본 발명자들은 이전에 존재하지 않았던 벡터의 조절 레이어(layer)를 부가하였다. 이러한 신규한 접근법은 선택된 유형의 세포 및 계통에서의 유전자 발현의 특이적 리프레션이 가능하게 한다.
- [0036] 이러한 시스템을 통해 본 발명자들은 기존 기술로 현재 가능한 것보다 도입유전자 발현에 대한 훨씬 더 엄격한 조절을 달성할 수 있었다.
- [0037] 벡터를 통합시키는데 적용할 경우, 삽입 위치 영향(벡터-내부 프로모터의 전사 조절을 무력화시키는

(overriding) 강한 프로모터/인핸서 서열 옆에 통합)의 결과로 발생할 수 있으며 매우 높은 도입유전자 발현의 세포-특이적 패턴을 가능하게 하는, 도입유전자 이상조절(dysregulation)의 문제점을 회피할 수 있다.

[0038] 본원발명의 추가적인 몇몇 중요 이점

[0039] 유전자 도입 및 유전자 치료법을 위한 도입유전자 발현용 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터를 포함하는 바이러스성 벡터)는 세포 유형 특이적인 내생성 miRNA에 의해 인지될 수 있도록 하기 위해 miRNA 표적 서열을 이용하여 조작될 수 있는데, 그리하여 세포 소집단 내에서 도입유전자 발현이 조절될 수 있다. 더욱이, miRNA 표적 서열의 조합물은 고도로 특이적인 세포 발현 패턴을 지니는 벡터를 획득하는데 이용될 수 있다.

[0040] 본 발명자들은 상기한 사항을 let-7a, mir-15a, mir-16, mir-17-5p, mir-19, mir-142-3p, mir-142-5p, mir-145, 및 mir-218를 포함하는 9개의 상이한 miRNA들을 이용하여 증명한다. 상기 miRNA들은 세포내에서의 miRNA 농도가 벡터의 발현 프로파일을 예상하는데 이용될 수 있다는 것을 보여준다. 따라서, 본 특허에 의해 개시된 방법은 고도로 특이적인 세포 발현 패턴을 지니는 벡터를 디자인하기 위한 간편한 방법을 제공한다.

[0041] 본원발명의 다양한 용도가 예상될 수 있다.

[0042] 실제, 일례로서, 본 발명자들은, 하기 도면에 도시된 바와 같이, 어디에서나 발현되는 프로모터로부터의 도입유전자 발현이 도입유전자의 3'UTR에 mir-142-3p 표적 서열을 제시하는 벡터를 이용하여 조혈세포주에서 정밀하게 저지될 수 있다는 것을 입증하였는데, 이는 miR-142-3p가 조혈 조직에서 세포-유형 특이적 발현 패턴을 나타내기 때문이다. 따라서, 상기 시스템은 그 외 유형의 세포에서 도입유전자 발현을 감소시키지 못한다.

[0043] 본 발명자들은 또한, mir-19a에 관한 표적 서열을 벡터내로 통합시킬 때, 도입유전자의 발현이 mir-19a를 고수준으로 발현시키는 293T 생산 세포에서 억제될 수 있으며, 이것이 상기 벡터의 생산에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 것을 밝혀내었다. 이러한 전략은 유독한 도입유전자를 운반하는 고역가 벡터를 생산하는데 있어서 중요한, 그리고 지금까지는 활용할 수 없었던 수단을 제공한다.

[0044] 본원발명의 추가적인 유용성은 독특한 발현 프로파일을 지니는 2개의 도입유전자를 발현시키도록 디자인된 벡터 시스템에 있다. 본 발명자들은 상기 시스템을 mir-142-3p에 관한 표적 서열을 양방향(bidirectional) 렌티바이러스 벡터의 2개의 유전자들 중 한 유전자에 통합시킴으로써 설명한다. 신장세포에서, 상기 두 도입유전자들은 mir-142-3p가 존재하지 않기 때문에 발현된다. 그러나, 조혈세포에서, 상기 두 도입유전자들 중 한 유전자만이 발현된다. 이러한 컨스트럭트는 miRNA 조절이 단일 벡터 컨스트럭트로부터 분기적으로(divergently) 조절된 2개의 도입유전자에 대하여 이용될 수 있다는 원리증명(principle-of-proof)을 제공한다. 이러한 벡터 디자인은 세포의 이형 개체군이 형질도입될 것이고, 유전자 1의 발현이 존재하는 상기 유형의 세포들 중 어느 하나에 요구되며, 유전자 2의 발현이 다른 유형의 세포에 요구되는 그러한 상황에서의 사용을 포함한다. 이러한 디자인은 특정 세포의 역(negative) 및 순(positive) 선별(selection) 둘 모두를 필요로 하는 치료법 적용을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 배아줄기세포는 단일 벡터에 의해 형질도입될 수 있는데, 이때 유전자 1은 유독한 도입유전자가고 유전자 2는 세포에 유리한 성장을 제공하는 도입유전자이다. 유전자 1은 뉴런에 대해 특이적인 miRNA 표적 서열을 함유하며, 유전자 2는 배아줄기세포에 대해 특이적인 miRNA 표적 서열을 함유할 것이다. 이러한 방식으로, 형질도입된 배아줄기세포가 뉴런으로 분화되도록 유도될 수 있으며, 분화되지 않고 비분화된 배아줄기세포로 잔존하는 임의의 세포는 선택적으로 사멸될 것이다.

[0045] 본 발명자들은 miRNA 표적 서열의 세포로의 운반이 (심지어 고복제수로) 벡터 서열을 표적으로 삼는 내생성 miRNA의 천연적인 활성 또는 발현을 방해하지 않는다는 것을 확인하였다.

[0046] 본 발명자들은 miRNA 표적 서열의 조합물을 부가함으로써 고도로 특이적인 세포 발현 패턴을 지니는 벡터를 획득할 수 있었다.

[0047] 유전자 발현을 억제하기 위한 miRNA-매개 접근법은 도입유전자 조절에 관한 다른 전략들을 능가하는 몇몇 이점을 가진다. 현재까지, 전문항원제시세포(APCs)로부터의 발현을 제한하기 위한 대부분의 노력은 조직-특이적 프로모터에 의존하고 있다(Brown *et al.*, 2004b; Follenzi *et al.*, 2004; Mingozzi *et al.*, 2003). 이러한 접근법이 성공적으로 표적 세포에 발현을 제한시킬 수 있기는 하지만, 일부 표적이 아닌 세포들에서 '새는(leaky)' 발현이 관찰된다. 이러한 새는 발현이 일어나는 이유는, 벡터 시스템 내로의 통합을 위해 변형된, 재구성된 프로모터가 종종 그의 세포 특이성의 일부를 잃어버리기 때문에 또한 활성 프로모터 및 인핸서에 근접한 벡터 통합이 조직-특이적 프로모터를 활성화시키며 도입유전자 발현을 유도할 수 있기 때문이다. miRNA-매개 침묵이 전사후 수준에서 일어나기 때문에, 프로모터 및 인핸서 트래핑이 부적절해진다. 이와 같은 입장에서, 본 발명자들이 여기서 개시한 바와 같이, 여전히 광범위한 조직에서의 발현이 가능하게 하면서, 특정 유형 세포로부터

도입유전자 발현을 효과적으로 탈-표적화시키는데 miRNA-조절을 이용할 수 있다. miRNA 조절은 또한 프로모터/인핸서에 의해 도입유전자를 조절하기 위한 상보적인 접근법으로써 이용될 수도 있다. 조직-특이적 프로모터의 조절을 받도록 미리 발현 카세트내에 miRNA 표적 서열을 포함시킴으로써, 본 발명자들은 표적을 벗어난(off-target) 발현을 제거할 수 있는 추가의 조절 레이어를 부가하였다.

[0048] miRNA가 특정 유형의 세포로부터 도입유전자 발현을 탈-표적화시키는데 이용될 수 있다는 원리증명에 따라서, 본 발명자들은 조혈세포에서의 발현은 억제되는 반면, 간세포 및 그 외 비-조혈세포에서의 강건한 발현을 제공할 수 있는 LV를 개발하였다. 이러한 디자인은 특히 도입유전자에 대한 숙주의 면역반응이 치료법의 효능을 제한하는 전신성 유전자 치료법에 적절하다(Brown and Lilliecrap, 2002). 본 발명자들의 실험실 및 그 외 다른 실험실에서 행해진 연구들은 유전자 도입에 뒤따르는 도입유전자-특이적 면역반응의 유발에 기여하는 주요 인자가 도입유전자 발현의 부위와 관련이 있다는 것을 제안한다(Brown et al., 2004; Follenzi et al., 2004). 조혈 시스템의 APC, 예를 들어, 대식세포 및 수지상세포에서 발현된 벡터는 항-도입유전자 면역반응을 효과적으로 촉발시키는 것으로 알려져 있다(De Geest et al., 2003).

[0049] 실제로, CMV 프로모터의 조절하에 도입유전자를 발현시키는 LV의 전신성 투여가 간 및 비장에서 도입유전자의 발현을 높은 빈도로 유도하였으며, 이는 도입유전자를 발현하는 세포의 면역-매개 제거(clearance)를 초래하였다(Follenzi et al., 2004). 대조적으로, CMV 프로모터가 간-특이적 일부만 프로모터로 대체되었을 경우, 면역반응의 빈도 및 강도에서의 감소가 있었다. 면역반응 발생율이 일부만 프로모터 사용에 의해 감소되기는 하였지만, 소정 수준의 면역 반응이 여전히 관찰되었다. 이것은, 새는 전사 활성 및 프로모터/인핸서 트래핑의 결과로, APC 내에서 일부만 프로모터로부터의 낮은 수준의 도입유전자 발현에 기인하였을 것으로 추정되었다. 따라서, 전사 조절 수준에서 발생하는 사건에 의해 초래되는, 표적이 아닌 세포에서의 도입유전자 발현의 문제는 전사이후에(post-transcriptionally) 작동하는 유전자 조절 miRNA 시스템을 이용함으로써 극복될 수 있을 것이다. 도입유전자 발현을 특정 유형의 세포에 제한하는 것은 또한 도입유전자를 발현하는 세포 집단(pool)을 한정함으로써 유전자 도입의 잠재적 효율을 감소시킬 수 있다.

[0050] 따라서, 본 발명자들은 유전자 발현을 표적으로 삼기 보다 표적으로 삼지 않으며 전사후 수준에서 기능하는, miRNA 조절이 현재 유전자 운반 시스템의 한계점을 극복하기 위한 특별한 수단을 제공할 수 있을 것으로 가정하였다. 비조혈세포에서의 높은 수준의 발현을 허용하면서, 조혈세포 계통에서의 도입유전자 발현을 막음으로써, 본 발명자들은 면역 반응의 부재시에 강하고 안정적인 유전자 도입을 가능하게 할 수 있다는 것을 추론해 내었다.

[0051] 본 발명자들은, 조혈세포 기원의 세포에서 발현되는 것으로 알려진 miRNA의 표적 서열을 포함시키기 위해, 어디에서나 발현되는 PGK 프로모터의 전사 조절 하에 녹색 형광 단백질(GFP) 리포터를 함유하는, 기존의 LV를 변형하였다. 본 발명자들이 개발한 miRNA-조절된 LV 벡터의 전신 투여후, 유전자 발현이 거의 전적으로 간세포 및 간의 내피 세포에서 검출되었다. 간에 존재하는 대식세포인, 쿠퍼(Kupffer) 세포에서의 발현은 사실상 검출할 수 없었다. 이러한 결과는 miRNA 표적 서열을 함유하지 않았던 LV의 투여와는 극명하게 대비되었는데, 상기 LV 투여의 경우, 대부분의 도입유전자 발현이 쿠퍼 세포에서 일어났다.

[0052] 면역력이 있는 Balb/c 마우스로 벡터가 주입된, 연이은 실험에서, 주입후 2주까지 본 발명자들은 LV.PGK.GFP 처치된 마우스의 간 내에서 GFP 양성 세포를 관찰하지 못하였다. 완전히 대조적으로, LV.PGK.GFP.142-3pT로 처치된 마우스는 벡터 투여후 2주 경과시에 GFP 양성 간세포를 상당한 빈도로 지니고 있었다. 더욱이, GFP 발현이 주입 후 120일(마지막 분석 시점) 이상 지속되는 것이 확인되었다. 유사하게, miRNA-조절 전략은 순환하는 항원에 대한 면역 반응을 막는데에도 또한 효과적이다. 특이적으로, 본 발명자들 혈우병 B 마우스를 사람 인자 IX(hFIX)를 발현하는 렌티바이러스 벡터로 처치하였고, mir-142-3pT 서열이 상기 벡터내에 포함되었을 때, hFIX 발현이 안정적으로 유지된다는 것을 확인하였고, 반면, mir-142-3pT 서열이 결여된 유사한 벡터로 처치된 마우스에서, hFIX 발현은 주입 후 3주 경과 후에 검출되지 않았다.

[0053] 이러한 결과는 miRNA가 바이러스성 벡터의 발현을 재표적화하는데 사용될 수 있으며, 질병에 대한 장기간 지속되는 치료를 초래한다는 최초의 입증을 제공한다. 이러한 결과는 또한 벡터의 miRNA-조절이 항-도입유전자 면역 반응을 감소시킬 수 있다는 증거를 제공한다. 이러한 miRNA-조절된 LV(LV 유형 중 최초)는 간-유도 유전자 치료법과 상당한 관련이 있을 수 있는데, 조혈 세포 내에서 유전자 발현은 치료 목표물에 대하여 불리할 수 있다. 본원발명은 그러므로 도입되는 유전자에 대한 면역-매개 거부반응을 막기 위해 이용될 것이다.

[0054] 생체내 벡터 투여시에, 본원발명은 조혈세포 시스템의 일부분을 차지하는, 면역 시스템의 항원 제시 세포에서의 벡터 발현을 예방하게 될 것이고, 그로 인해 도입유전자에 대한 면역 반응의 개시가 방지될 것이다.

- [0055] 생각할 수 있는 바로는, 발현이 간세포에 표적화시키는 조직-특이적 프로모터에 적용될 때, 형질도입된 APC에서 규정된 장소 밖의 발현을 억제시킬 것이다. 이것은 잠재적으로 유전자 도입에서의 주요한 장애와 장기간 지속되어 온 문제를 해결할 것이다; 즉, 도입된 유전자에 대한 면역-매개 거부반응.
- [0056] 본원발명의 보다 특별하고 바람직한 양상은 본원에 첨부된 독립 청구항 및 종속 청구항에 제시되어 있다. 종속 청구항들의 특징들은 적절한 독립 청구항들의 특징과 조합될 것이고, 상기 독립 청구항들에 명확하게 제시된 특징들 이외에 다른 특징들과 조합될 것이다.
- [0057] 본원발명의 실시는, 달리 기재하지 않는 한, 본원발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자의 창작능력내에 속하는, 화학, 분자생물학, 미생물학, 재조합 DNA 및 면역학 분야의 통상적인 기술을 이용할 것이다. 이러한 기술은 문헌에 설명되어 있다. 예를 들어, 하기 문헌을 참조하라: J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N. Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak and James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Iri Press; D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, *방법 of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Method in Enzymology*, Academic Press; Using antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO. I by Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow (1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-544-7); Antibodies: A Laboratory Manual by Ed Harlow (Editor), David Lane (Editor) (1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-314-2), 1855. *Handbook of Drug Screening*, edited by Ramakrishna Seethala, Prabhavathi B. Fernandes (2001, New York, NY, Marcel Dekker, ISBN 0-8247-0562-9); 및 Lab Ref: *A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench*, Edited Jane Roskams and Linda Rodgers, 2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-630-3. 이러한 일반적인 각각의 문헌은 본원의 참고문헌으로써 여기에 통합된다.

## 도면의 간단한 설명

- [0058] 본원발명은 첨부된 도면에 도시된 바와 같이(단지 일례로서만) 본원발명의 바람직한 구체예들을 참고로 하여 더 상세히 기술될 것이다:

도면 1a. miRNA-조절된 렌티바이러스 벡터 시스템의 개략적 도시. 상기 도면에는 어디에서나 발현되는 사람 PGK 프로모터의 전사 조절하에서 강화된 녹색 형광 단백질(eGFP)을 엔코딩하는 렌티바이러스 모 벡터 (LV.PGK.GFP), 및 내생성 miRNA에 의해 표적화되는 서열의 4개 탠덤 카페를 포함하는, 변형된 벡터 (LV.PGK.GFP.mirT)가 도시되어 있다.

도면 1b. miRNA 조절을 이용한 분기적으로 조절된 렌티바이러스 벡터 시스템에 대한 개략적 도시. 상기 도면에는 양방향 렌티바이러스 벡터 양방향 프로모터 컨스트럭트(Bd.LV)의 전사 조절하에 eGFP 및 돌연변이된 저-친화력 신경 정장인자수용체( $\Delta$ LNGFR)를 엔코딩하는 양방향 렌티바이러스 모 벡터가 도시되어 있는데, 상기 프로모터 컨스트럭트는 독특한 전사체로서 2개의 도입유전자를 대등하게 전사시킬 수 있다. Bd.LV는 eGFP 발현 카세트의 3'-비번역지역(3'-UTR) 내에 mirT 서열을 포함하도록 변형되었다.

도면 1c. 간세포-특이적, miRNA-조절된 렌티바이러스 벡터 시스템에 대한 개략적 도시. 상기 도면에는 인공적인 간-특이적 프로모터/인핸서 엘리먼트의 전사 조절하에 사람 응고인자 IX(hFIX)를 엔코딩하는 렌티바이러스 모 벡터(LV.ET.hFIX) 및, 내생성 miRNA에 의해 표적화된 서열의 4개 탠덤 카페를 포함하는, 변형된 벡터 (LV.ET.hFIX.mirT)가 도시되어 있다.

도 2a. miRNA 프로파일 분석. 실시간 PCR에 의한 293T 및 U937 세포에서의 선택된 miRNA의 발현 분석. 발현 수준은 let-7a(구조적으로 발현되는, '하우스키핑' miRNA)와 대비하여 기록된다.

도 2b. miRNA 조절은 조혈세포 계통으로 부터 발현을 탈-표적화시키는데 이용될 수 있다. 형질도입 후 14일 경과 시점에 표기된 LV가 투여량-매칭 농도로 형질도입된 293T(신장 기원), U937(단핵구 기원) 및 1차 수지상 세포(말초혈액에서 기원함)의 FACS 분석. 간-특이적 알부민 프로모터를 포함하는 LV(LV.ALB.GFP)가 상기 프로

모터의 오프-타겟 활성과의 비교를 위해 도시되어 있다. 막대그래프는 3번의 독립적인 실험을 나타낸다. 게놈 당 벡터 복제수(C/G)가 태크만(Taqman) 분석에 의해 측정되었다. 형질도입되지 않은 세포는 녹색으로 도시되어 있다.

도 2c. miRNA 조절은 2개의 도입유전자의 분기형 조절을 위한 벡터를 구축하는데 이용될 수 있다. 형질도입 후 14일 경과 시점에, mir-142-3pT, 및  $\Delta$ LNGFR를 지니거나 지니지 않는, GFP 발현 Bd.LV가 매우 매칭된 농도로 형질도입된 293T 및 U937 세포로부터의 GFP 및  $\Delta$ LNGFR 발현에 대한 FACS 분석. 점도표(Dotplots)는 2회의 독립된 실험을 나타낸다.

도 2d. miRNA-조절된 벡터 디자인은 상이한 내생성 miRNA에 의해 조절된 다양한 벡터를 구축하는데 이용될 수 있고, 다양한 벡터 발현 프로파일을 성립시키는데 이용될 수 있다. 형질도입 후 14일 경과 시점에, mir-142-3pT, 및  $\Delta$ LNGFR를 지니거나 지니지 않는, GFP 발현 Bd.LV가 매우 매칭된 농도로 형질도입된 293T 및 U937 세포로부터의 GFP 및  $\Delta$ LNGFR 발현에 대한 FACS 분석.

도 3a. LV.PGK.GFP 또는 LV.PGK.GFP.142-3pT로 형질도입된 293T 및 U937 세포로부터의 GFP 발현에 대한 RT-PCR 정량 분석. cDNA는 도면 1b에 제시된 세포로 부터 유래한 것이다. 모든 샘플은 GAPDH 발현을 위해 표준화 시켰으며 수치는 캘리브레이터로 설정된,  $10^5$  TU/ml LV.PGK.GFP로 형질도입된 293T 세포로부터 검출된 전사체와 대비하여 기록되었다.

도 3b. 기재된 Bd.LV로 형질도입된 U937 세포로부터의 GFP 및  $\Delta$ LNGFR 발현에 대한 RT-PCR 정량 분석. cDNA는 도면 1c에 도시된 세포로부터 획득되었다. 모든 수치는  $10^5$  TU/ml Bd.LV로 형질도입된 세포에서 검출된  $\Delta$ LNGFR 전사체 수준과 대비하여 기록되었다.

도 3c. mir-142-3pT를 지니거나 지니지 아니한 LV 및 BDd.LV(각각 도 1b 및 1c에 도시됨)로 형질도입된 세포에 대한 노던 블랏 분석. 총 RNA 20마이크로그램을 각각의 샘플에 로딩하고 GFP에 대해 탐침시켰다. LV(위) 및 Bd.LV(아래) GFP 전사체의 예상된 크기는 화살표로 나타내었다.

도 3d. LV.PGK.GFP.142-3pT로 U937 세포를 반복적으로 감염시켜 증가된 벡터 산출량을 획득하였다. FACS 분석에 의해 GFP를 측정하였다. 세포 개체군에 대한 평균 벡터 C/G가 도시되어 있다. LV.PGK.GFP.142-3pT에 관한 증가된 벡터 투여량과 도입유전자 발현 사이의 관계를 보여주는 회귀 분석이 포함되어 있다(우측). U937 세포에서 LV.PGK.GFP 단일 카피(하단 좌측 패널)이 LV.PGK.GFP.142-3pT의 175C/G 보다 더 높은 수준으로 GFP를 발현한다는 것을 주목하라.

도 3e. mir-142-3p-매개 RNA 간섭의 강건성을 LV.PGK. $\Delta$ LNGFR.mir-142-3pT의 농도를 증가시키면서 4 C/G의 LV.PGK.GFP.mir-142-3pT를 내포한 U937 세포에 대한 중복감염(superinfection)으로 측정하였다. 태크만 분석을 이용하여 중복감염된 세포의 벡터 복제수를 검출하였으며, GFP 및  $\Delta$ LNGFR 발현에 있어서의 변화를 FACS 분석에 의해 측정하였다.

도 4. miRNA 조절은 벡터 역가를 감소시키지 않으면서 생산 세포에서 도입유전자 발현이 방지되도록 하기 위해 이용될 수 있다. 3개의 상이한 렌티바이러스 벡터 컨스트럭트의 도입유전자 발현 및 생산 역가를 비교하였다. 막대그래프는 벡터 생산이 진행되는 동안의 293T 세포에서의 GFP 발현을 보여준다. 점도표는 생산된 벡터를 이용한 형질도입 후의 293T 세포에서의 GFP 발현을 제시한다. 컨스트럭트 pLV.PGKas.GFPas.CTEas.polyAas 및 pLV.PGKas.GFPas.19aT.CTEas.polyAas는 안티센스 방향에 발현 카세트를 지닌다. 도시된 바와 같이, 발현 카세트가 안티센스 방향으로 놓일 때(pLV.PGKas.GFPas.CTEas.polyAas), 정규 pLV.PGK.GFP 벡터와 비교하여 벡터 역가가 10배 감소된다. 그러나, 안티센스 발현 카세트 내에 포함된 mir-19aT 서열은 상기 정규(canonical) 컨스트럭트의 역가로 역가를 회복시킨다.

도 5a. miRNA-조절된 벡터는 생체내에서 특정 세포 계통으로부터 선택적 탈-표적화 발현이 달성될 수 있게 디자인될 수 있다. 기재된 LV로 2주 전에 꼬리 정맥에 주입된 누드 마우스의 간에 대한 공초점(confocal) 현미경 분석. 도면은 3마리 마우스에 대한 결과를 도시하고 있다. GFP를 직접 형광에 의해 가시화시켰다. 간 박편(sections)을 대식세포-특이적 마커 F4/80(좌) 및 내피 세포 마커 CD31(우)에 대하여 면역염색하였다. 사실상 F4/80+ 쿠퍼 세포 중 어느 세포도 mir-142-3pT 벡터를 사용하였을 때 검출가능한 수준으로 GFP를 발현하지 않았으나, 반면, 이러한 세포들 중 다수의 세포는 상기 나머지 다른 벡터에 의해 형질도입되었을 때 GFP를 발현하였다. CD31+ 간 동굴(sinusoidal) 내피세포는, LV.PGK.GFP.142-3pT를 포함한(화살표) 모든 벡터로 형질도입시 GFP를 발현하였다는 것을 주목하라.

도 5b. miRNA-조절된 벡터는 생체내에서 특정 세포 계통으로부터 선택적 탈-표적화 발현이 달성되게 디자인될 수 있다. 동일 마우스로부터의 비장 박편을 반구형-백혈구(pan-leukocyte) CD45 마커에 대하여 면역염색하였다. LV.PGK.GFP.142-5pT가 효과적으로 CD45+ 백혈구로부터 GFP 발현을 탈표적화시켰으나, 변연대동굴(marginal zone sinus)의 조혈세포가 아닌 기질세포(CD45-음성)에서의 강한 GFP 발현이 가능케 하였다.

도 5c. miRNA-조절된 렌티바이러스 벡터가 정맥내 벡터 주입 후 조혈세포에서의 도입유전자 발현을 방지할 수 있게 디자인될 수 있다. LV.PGK.GFP- 및 LV.PGK.GFP.142-3pT-처치된 동물들의 비장세포(splenocytes)로부터의 GFP 발현에 대한 FACS 분석.

도 6a. miRNA-조절된 벡터는 생체내에서 조혈세포 계통의 세포로부터 도입유전자 발현이 방지될 수 있게 디자인될 수 있다(심지어 고복제수 벡터에서도). 이러한 마우스에 의해 고복제수의 벡터가 운반됨에도 불구하고 사실상 검출불가능한 도입유전자의 발현을 보여주는 대표적인 TgN.PGK.GFP.142-3pT(24 C/G) 및 TgN.PGK.GFP(4 C/G) 유전자도입 마우스로부터 획득한 말초혈액 및 골수에서의 GFP 발현에 대한 FACS 분석.

도 6b. miRNA-조절된 벡터는 유전자도입 마우스의 조혈세포 및 조혈세포가 아닌 계통의 세포 사이의 유전자 발현이 분리될 수 있게 디자인될 수 있다. 상기 마우스에서 획득한 기재된 기관에 대한 면역형광. GFP를 직접 형광으로 가시화시켰다. 흉선을 제외한 분석된 모든 기관에서 조혈세포 계통 세포를 CD45 면역염색에 의해 표시되도록 하였고, 여기서 CD3가 흉선세포가 표시되도록 하기 위해 사용되었다. TgN.PGK.GFP 마우스에서, 반구형-세포 GFP 발현이 모든 기관 내의 실질조직 및 기질에서 검출되었다. 조혈세포 계통 세포는 CD45 염색 및 GFP 발현 간의 중첩으로 인하여 노랗게 보인다. 대조적으로, PGK.GFP.142-3pT 유전자도입 마우스에서의 GFP 발현은 CD45+ 쿠퍼 세포(간), 폐포(폐) 및 점막고유층(lamina propria)(장) 대식세포에서 선택적으로 억제되었는데, 적색으로 보이며 화살표로 표기되어 있다. 비장 및 흉선에서, 이러한 기관들의 기질 내에서의 강한 발현에도 불구하고, GFP 발현은 또한 모든 조혈세포 계통 세포에서 음성이었다.

도 7a. miRNA-조절된 LV는 면역력이 있는 마우스에서의 안정적인 유전자 도입이 가능하게 한다. 기재된 LV를 투여한 Balb/c 마우스로부터 획득한 간 및 비장 박편에 대한 공초점 면역형광 분석. 간 내의 GFP가 직접 형광에 의해 가시화되어 있다; 쿠퍼 세포, CD8+ T-세포, 또는 내피 세포가 각각 항-F4/80, 항-CD8, 또는 항-CD31를 이용한 염색으로 검출되었다. LV.PGK.GFP 및 LV.ALB.GFP 마우스의 GFP+ 세포가 2주까지 간으로부터 제거되었는데, 이는 CD8+ T-세포 침투의 존재와 관련이 있었다. 대조적으로, 많은 GFP+ 간세포 및 내피 세포가 LV.PGK.GFP.142-3pT가 주입된 마우스에서 120일을 초과하여(>120일) 유지되었다(분석이 행해진 가장 긴 시점).

도 7b. 70일간 LV.PGK.GFP.142-3pT-처치된 마우스의 간의 GFP+ 세포는 전형적인 간세포 형상을 지녔거나 CD31+ 내피 세포였다(화살표). 이것은 특정 세포 유형으로부터의 탈-표적화된 발현이 선택적으로 일어나게 하는, 한편 광범위한 범위에 속하는 세포 계통에서의 도입유전자 발현을 가능케 하는 본 발명에 따른 접근법의 신규한 양상을 입증한다.

도 7c. 주입후 42일째에 LV.PGK.GFP.142-3pT 마우스에서의 정상적인 조직구조 및 단핵 세포 침투의 부재를 보여주는 혜마토실린(Hematoxylin) 및 에오신(H&E) 염색.

도 7d. 기재된 벡터가 주입되기 5일전 면역력있는 마우스로부터 얻은 비장에 대한 분석. mir-142-3pT 벡터로부터의 GFP 발현은 주로 변연대동굴(MS)에서 관찰되었다; 이러한 GFP+ 세포들 중 일부는 α-평활근 액틴(α-SMA)을 발현하였으며 섬유아세포-유사 기질 세포(화살표)로 확인되었다. 몇몇 CD45+ 조혈세포를 포함하는, 여기저기 분산된 GFP+ 세포가 LV.ALB.GFP 마우스(화살표)의 비장내에 존재하였다. 이것은 miRNA-조절 전략이 조직-특이적 프로모터를 능가하는 도입유전자 조절의 개선된 수단을 제공할 수 있다는 것을 추가로 입증한다.

도 8a. miRNA-조절된 렌티바이러스 벡터가 마우스 모델에서의 혈우병 B의 안정적인 치유(correction)를 매개한다. 혈우병 B 마우스(인자 IX 녹아웃 마우스)에게 간세포-특이적 ET 프로모터 조절하에 hFIX를 엔코딩하는 렌티바이러스 벡터(LV.ET.hFIX) 또는 도입유전자의 3'UTR에 mir-142-3pT 서열을 내포하는 변형된 LV.ET.hFIX (LV.ET.hFIX.142-3pT)를 꼬리를 통해 주입하였다. hFIX-특이적 ELISA로 hFIX 항원의 혈장 농도를 측정하였고 (위), 한편 FIX 응고 활성을 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간을 측정함으로써 확인하였다(아래). 그 결과는 벡터 당 처치된 3마리 마우스로부터의 표준오차를 가하거나 감한 평균으로 제시된다.

도 9A는 성숙한 hsa-mir-142 스텝 루프 서열을 보여준다.

도 9B는 표적으로서 mir-142의 서열을 보여준다.

마이크로RNAs(miRNAs)

miRNA는 식물 및 동물의 게놈내에서 엔코딩되는 작은, RNA 분자이다. 이러한 매우 보존된, 약 21-мер(mer) RNA는 특정 mRNA에 결합함으로써 유전자 발현을 조절한다(He and Harmon, 2004).

miRNA는 서열-특이적 방식으로 유전자 발현을 조절하는 작은, 논-코딩 RNA 패밀리에 속해 있다.

마이크로RNA에 대해 요약하자면 다음과 같다(SMALL RNAs WITH A BIG ROLE IN GENE REGULATION, Lin He & Gregory J. Harmon *Nature Reviews Genetics* 5, 522 -531 (2004)):

- 마이크로RNA(miRNAs)는 전사후 수준에서 유전자 발현을 네거티브하게 조절하는 ~21-25개 뉴클레오티드로 이루어진 소형 RNA 패밀리에 속해 있다.
- miRNA 패밀리의 발견된 구성원, lin-4 및 let-7은 꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*) 유생 발달의 일시적 조절에서의 결합에 대한 유전자 스크린을 통해 확인되었다.
- 유전체(Genome-wide) 클로닝 노력 덕택에, 현재 수백개의 miRNA가 곤충, 식물 및 동물을 포함하는 거의 모든 후생동물(metazoans)에서 확인되었다.
- MiRNA는 다양한 발달 및 생리 과정 중간에 일시적으로 그리고 공간적으로 조절된 발현 패턴을 나타낸다.
- 지금까지 특성규명된 대다수의 동물 miRNA는 그들의 표적 mRNA로부터의 단백질 합성에 영향을 미친다. 반대로, 지금까지 연구된 대부분의 식물miRNA는 그들의 표적의 절단을 유도한다.
- miRNA와 이의 표적 사이의 상보성의 정도(적어도 부분적으로)가 조절 메커니즘을 결정한다.
- 동물에서, miRNA의 1차 전사체는 2개의 RN아제(RNase)-III 효소(Drosha 및 Dicer)에 의해 순차적으로 작고, 불완전한 이중가닥RNA(dsRNA) 듀플렉스(miRNA:miRNA<sup>\*</sup>)로 가공되는데, 상기 듀플렉스는 성숙한 miRNA 가닥 및 이의 상보적인 가닥(miRNA<sup>\*</sup>)을 포함한다. 성숙한 miRNA 5' 말단의 상대적인 불안정성은 비대칭적으로 조립된 상기 성숙한 miRNA를 작용자 복합체인, RNA-유도 침묵 복합체(RNA-induced silencing complex, RISC)로 이끈다.
- Ago 단백질은 RISC의 중요한 구성요소이다. 다양한 후생동물 게놈 내에 존재하는 다수의 Ago 상동체는 관련성은 있으나 특이적인 생물학적 기능을 수행하는 다수의 RISC의 존재를 나타낸다.
- miRNA 표적에 대한 생물정보학적 예상은 miRNA의 기능을 탐구하기 위한 중요한 수단을 제공한다.

마우스, 사람, 초파리(*Drosophila*), 선충(*C. elegans*) 및 애기장대(*Arabidopsis*)로부터 얻은 수백개의 miRNA가 클로닝 및 서열분석되었다.

이러한 서열의 예는 [www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)에서 찾아볼 수 있다(Griffiths-Jones *et al.*, 2006). 추가로 miRNA 표적 서열을 [www.miRNA.org](http://www.miRNA.org)에서 검색할 수 있다.

mRNA와 유사하게, miRNA 발현 프로파일은 조직에 따라 다르게 나타나나 상이한 개체의 동일 조직에서는 유사하게 나타난다(Baskerville and Bartel, 2005). 요망되는 발현 프로파일을 지닌 miRNA를 확인하는 것은 본원발명이 속한 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 기술을 사용하는 달성을 수 있다. 일단, miRNA가 확인되면, 대응하는 표적 서열은, 예를 들어, 상기에 기재된 데이터베이스를 사용하여 용이하게 결정될 수 있다.

예를 들어, 앰비온 사(Ambion, Inc.)로부터 구매할 수 있는 mirVana™ miRNA 프로브 세트 및 mirVana™ miRNA 라벨링 키트가 제조업자의 사용설명서에 따라 사람 조직에서의 miRNA 발현 프로파일과 비교하는데 사용될 수 있다.

조직-특이적 miRNA를 확인하기 위한 또 다른 일반적인 방법은 노던 블랏을 이용하는 것이다. 이러한 기술의 일 예는 라고스-퀀타나 엠 등의 논문(Lagos-Quintana M *et al.*, Current Biol (2002) 12:735-739)에 기재되어 있는데, 상기 저자들은 조직-특이적 클로닝에 의해 마우스로부터 대략 21개의 뉴클레오티드로 이루어진 34개의 신규한 miRNA를 확인하였다(Lagos-Quintana *et al.*, 2002).

유사하게, 마이클 등(Michael M *et al.*, Mol Can Res (2003) 1:882-891)은 결장 선암(adenocarcinomas) 및 정상 점막에서 28개의 상이한 miRNA 서열을 동정하였음을 개시하고 있다.

첸 등(Chen C-Z *et al.*, Science (2004) 303:83-86)은 조혈세포에서 특이적으로 발현되는 3개의 miRNA(miR-181, miR-142 및 miR-223)에 대해 개시하고 있다(Chen *et al.*, 2004).

셉페 등(Sempere L *et al.*, Genome Biology (2004) 5:R13)은 특정 마우스 기관에서 독점적으로 검출되는 총 17

개 miRNA에 대해 개시하고 있는데, 이들은 다음과 같다: 7개의 뇌-특이적 miRNA(miR-9, -124a, -124b, -135, -153, -183, -219), 6개의 폐-특이적 miRNA(miR-18, -19a, -24, -32, -130, -213), 2개의 비장-특이적 miRNA(miR-189, -212), 1개의 간-특이적 miRNA(miR-122a), 및 1개의 심장-특이적 miRNA(miR-208). 기재된 마우스 뇌-, 간- 및 심장-특이적 miRNA 모두가, 사람 뇌에서의 miR-183은 예외로 하고, 사람의 대응 기관(사람 신장, 폐 또는 비장에서 miRNA 발현을 시험하지 아니하였음)에서도 검출되었다. 2개 이상의 마우스 기관에서 검출된 75개 miRNA들 중, 14개 miRNA의 수준은 임의의 다른 기관에서 보다 특정 마우스 기관에서 2배 이상 더 높은 수준으로 검출되었는데, 이들은 다음과 같다: 7개의 뇌-풍부성 miRNA(miR-9\*, -125a, -125b, -128, -132, -137, -139), 3개의 골격근-풍부성 miRNA(miR-1d, -133, -206), 2개의 신장-풍부성 miRNA(miR-30b, -30c), 및 1개의 비장-풍부성 miRNA(miR-99a). 뇌-풍부성 및 골격근-풍부성 miRNA 모두는 사람의 대응 기관에서 유사하게 그 수준이 높았다. 마우스 및 사람 사이에 이러한 기관-특이적이며 기관-풍부성인 miRNA의 높은 보존은 상기 miRNA가 이러한 특정 기관의 세포 또는 조직 유형의 구축 및/또는 유지에 있어서 보존된 역할을 할 것임을 시사한다(Sempere *et al.*, 2004).

문현(Baskerville & Bartel, RNA (2005) 11:241-247)은 24개의 상이한 사람 기관 전반에 걸쳐 175개 사람 miRNA에 대한 마이크로어레이 프로파일 조사와 발현 패턴을 개시하고 있다. 결과는 가까운 miRNA 쌍이 유전자적으로 공통발현(coexpression)된다는 것을 보여준다(Baskerville and Bartel, 2005). 또한, 발현된 miRNA 쌍들 사이의 상관관계에서 급작스런 전이가 50kb 거리로 발생하는데, 이는 50kb미만(<50kb)으로 이격된 miRNA가 일반적으로 임의의 공통 전사체로부터 유도된다는 것을 의미한다. 몇몇 miRNA는 숙주 유전자의 인트론 내에 존재한다. 인트론성 miRNA는 대개 이들의 숙주 유전자 mRNA와 함께 조화되어 발현되는데, 이것은 상기 인트론성 miRNA가 임의의 공통 전사체로부터 유전자적으로 유도되며, 숙주 유전자 발현에 대한 정위치(*in situ*) 분석이 인트론성 miRNA의 공간 및 시간적 위치를 탐침하는데 이용될 수 있다는 것을 의미한다.

바라드 등(Barad *et al.*, Genome Research (2004) 14:2486-2494)은 지금까지 확인된 사람 miRNA에 대한 효율적인 발현 분석이 가능하도록 하는 miRNA-특이적 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이 시스템을 구축하였다. 상기 시스템은 마이크로어레이상의 60-мер 올리고뉴클레오티드 프로브가, 증폭된, 크기-분별, 사람 기원 전체 RNA로부터 유래된, miRNA의 표지된 cRNA와 혼성화하나, 이들의 전구체 헤어핀 RNA와는 혼성화하지 않는다는 것을 보여준다. 단일 강도는, 가장 강한 신호를 주는 5' 지역에서의 위치, 및 가장 약한 신호를 주는 3' 말단에서의 위치와 더불어, 60-мер 프로브 내의 miRNA 서열의 위치와 관련이 있다. 따라서, 5' 말단에 1개의 miRNA 카페를 수용한 60-머 프로브는 2개 또는 3개의 miRNA 카페를 포함하는 프로브와 비교하여 유사한 강도 신호를 나타내었다. 미스매치 분석은 miRNA 서열 내의 돌연변이가 신호를 심각하게 감소시키거나 제거한다는 것을 보여주는데, 이것은 관찰된 신호가 표지된 cRNA내의 미스매치된 miRNA의 풍부성(abundance)을 충실히 반영한다는 것을 시사한다. 5개 사람 조직 및 HeLa 세포에서의 150개 miRNA의 발현 프로파일은 이전에 공개된 결과와 전반적으로 양호한 일치도를 나타내었으나, 또한 일부 차이가 있었다. 상기 저자들은 흉선, 고환, 및 태반에서의 miRNA 발현에 관한 데이터를 제시하였으며, 이러한 조직 내에 매우 풍부하게 존재하는 miRNA를 동정하였다. 이와 함께, 이러한 결과는 miRNA의 검출 및 연구를 위한 그 외 다른 방법을 능가하는 민감도가 향상된 DNA 마이크로어레이와 건강 및 질환에 있어서 이러한 마이크로어레이를 miRNA 연구를 위해 적용하는데 크나큰 잠재력을 돋보이게 한다(Barad *et al.*, 2004).

카사시마 등(Kashima K *et al.*, Biochem Biophys Res Commun (2004) 322(2):403-10)은 사람 백혈병 세포(HL-60)에서 발현된 3개의 신규한 miRNA 및 38개의 공지된 miRNA를 동정하였음을 개시하고 있다(Kashima *et al.*, 2004).

맨스필드 제이 등(Mansfield J *et al.*, Nature Genetics (2004) 36:1079-1083)은 배발생 동안의 몇몇 miRNA(miR-10a 및 miR-196a를 포함)의 조직-특이적 발현에 대해 개시하고 있다(Mansfield *et al.*, 2004).

첸 및 로디쉬(Chen C-Z and Lodish H, Seminars in Immunology (2005) 17(2):155-165)는 마우스 골수 내 B 세포에서 특이적으로 발현되는 miRNA인 miR-181에 대해 개시하고 있다(Chen and Lodish, 2005). 상기 문현은 또한 몇몇 사람 miRNA가 백혈병과 관련되어 있고; miR-15a/miR-16 유전자좌는 B 세포 만성 림프구성 백혈병을 지닌 사람에서 자주 결실되어 있거나 다운-레귤레이션되어 있으며 miR-142는 활발한(aggressive) B 세포 백혈병 환자에서 발견되는 전좌 부위에 존재한다는 것을 개시하고 있다. 상기 문현은 이러한 결과들이 miRNA가 포유동물 조혈의 중요한 조절자일 수 있다는 것을 나타내는 것임을 제시하고 있다.

전산 접근법을 이용한 신규한 miRNA 및 이의 표적 서열을 확인하는 방법은 PCT 국제공개공보 WO2004/066183호 및 브레네케 등(Brennecke J *et al.*, PLoS Biology (2005) 3(3):0404-0418)에 개시되어 있다(Brennecke *et al.*,

2005).

다음 표 1에는 본원발명에서 유용성을 찾을 수 있는 miRNA가 요약되어 있다.

표 1 포유동물 miRNA에 관한 발현 연구		
발현 패턴	miRNA	참조
<b>포유동물 miRNA의 조직-특이적 발현 패턴</b>		
ES-세포 특이적으로 발현됨	miR-296	a
ES 세포에서 발현되나, 분화 상 상향조절되어 있음	miR-21 및 miR-22	a
ES 세포 및 다양한 성인 조직에 서 발현됨	miR-15a, miR-16, miR-19b, miR-92, miR-93, miR-96, miR-130 및 miR-130b	a
생쥐 뇌 발달 과정 중 풍부하게 발현됨	miR-128, miR-19b, miR-9, miR-125b, miR-131, miR-178, miR-124a, miR-266 및 miR-103	b, c
성인 뇌에서 풍부하게 발현됨	miR-9*, miR-125a, miR-125b, miR-128, miR-132, miR-137, miR-139, miR-7, miR-9, miR124a, miR-124b, miR-135, miR-153, miR-149, miR-183, miR-190 및 miR-219	b
폐에서 풍부하게 발현됨	miR-18, miR-19a, miR-24, miR-32, miR-130, miR-213, miR-20, miR-141, miR-193 및 miR-200b	b
비장에서 풍부하게 발현됨	miR99a, miR-127, miR-142-a, miR-142-s, miR-151, miR-189b 및 miR-212	b

조혈 조직	miR-181, miR-223 및 miR-142	b
간에서 풍부하게 발현됨	miR-122a, miR-152, miR-194, miR-199 및 miR-215	b
심장에서 풍부하게 발현됨	miR-1b, miR-1d, miR-133, miR-206, miR-208 및 miR-143	b
신장에서 풍부하게 발현됨	miR-30b, miR-30c, miR-18, miR-20, miR-24, miR-32, miR-141, miR-193 및 miR-200b	b
어디에서나 발현됨	miR-16, miR-26a, miR-27a, miR-143a, miR-21 let-7a, miR-7b, miR-30b 및 miR-30c	b
<u>종양생성 과정에서 비정상적인 miRNA 발현</u>		
만성 림프구성 백혈병에서 하향조절되어 있음	miR-15 및 miR-16	d
폐암 세포주에서 하향조절되어 있음	miR-26a 및 miR-99a	e
대장암에서 하향조절되어 있음	miR143/miR-145 클리스터	f
비키트(Burkitt) 임파종, ES 세포, miR-155 배아줄기세포에서 상향조절되어 있음		g

a - Houbaviy *et al*, Dev. Cell (2003) 5:351-358.

b - Sempere *et al*, Genome Biol. (2004) 5, R13.

c - KrIChevsky *et al*, RNA (2003), 9: 1274-1281.

d - Calin *et al*, Proc Natl Acad Sci (2002) 99:15524-15529.

e - Calin *et al*, Proc Natl Acad Sci (2004) 101:2999-3004.

f - MIChael *et al*, Mol Cancer Res (2003) 1:882-891.

g - Metzger *et al*, Genes Chromosome Cancer (2004) 39:167-169.

비록 본 발명자들이 획득한 데이터가 조혈세포로부터의 발현을 억제하기 위한 이러한 접근법의 유용성을 입증하는 하지만, 내생성 miRNA 조절 네트워크는 도입유전자 발현의 강력한 억제와 관련한 훨씬 더 많은 가능성을 제공할 수 있을 것이다. 발현 연구는 뉴런, 이자 섬(pancreatic islets), 및 지방 조직을 포함하는, 다수의 상이한 유형의 세포에 특이적인 miRNA를 이미 밝혀내었다. 본원발명의 디자인을 사용하여, 티미딘 키나아제와 같은 자살 유전자에 속박된, 배아줄기세포(ESCs) 분화 후 상향조절되는 2개의 miRNA(Houbaviy *et al.*, 2003), miR-21 및 miR-22의 표적 서열을 포함하는 벡터를 제조할 수 있다. 상기 벡터는 ESC-유도 조직 내의 비분화된 ESC를 선택적으로 사멸시킬 수 있는데, ESC-기반 치료법을 임상에 적용하는데 있어 훨씬 더 바람직한 안정성 조절을 제공한다.

암 치료에 있어서 miRNA-조절된 벡터 디자인의 또 다른 가능한 용도가 있을 수 있다. 몇몇 보고가 특정 miRNA 들이 특정 종양에서 하향조절된다고 개시하였다. 예를 들어, miR-15 및 miR-45는 만성 임파구성 백혈병 및 유방암에서 하향조절되어 있다(Calin *et al.*, 2004a; Calin *et al.*, 2004b; Iorio *et al.*, 2005). miR-15 또는 miR-145 표적 서열은 유독한 도입유전자를 발현하는 벡터내에 포함될 수 있다. 벡터 생산 세포를 포함하는 miR-15 또는 miR-145를 발현하는 정상 세포는 독소 생산을 억제할 것이고 그에 따라 생존할 것이나, 반면 miR-15 또는 miR-145를 더이상 발현하지 않는 형질도입된 종양세포는 독소 유전자를 용이하게 생산할 것이며 죽게

될 것이다.

miRNA-조절된 벡터 디자인의 또 다른 가능한 용도는 야생형 바이러스로 초감염된 형질도입된 조혈세포로부터의 벡터 이동을 방지하게 될 것이다. miRNA 표적 서열은 또한 도입유전자를 위한 발현 카세트와는 별개의 벡터 지역에 포함될 수도 있다.

miRNA 벡터는 양방향 프로모터와 함께 사용될 수 있다(Amendola *et al.*, 2005). 단일 프로모터로부터 2개의 별개 mRNA 전사체를 생산하는 독특한 특성을 지니는, 이러한 벡터는 발현 카세트 중 하나 또는 둘 모두에 miRNA 표적 서열을 포함하도록 변형될 수 있다. 따라서, 도입유전자 1에 mir-142-3pT의 부가(도입유전자 2에는 부가되지 않음)는 도입유전자 2가 어디에서나 발현될 수 있게 할 것이고, 동시에 조혈 세포 내에서의 도입유전자 1의 발현을 억제할 것이다. 이러한 디자인은 2개의 도입 유전자에 대한 분기형 조절이 가능하게 하는데, 이것은 현재의 기술들로는 구현할 수 없는 성과이다.

miRNA는 적당한 유전자 벡터, 즉 유전자(도입유전자)를 운반하는데 적당한 벡터, 예를 들어, 바이러스성 벡터와 같이 사용될 수 있다. 이러한 벡터에 대한 예는 아래에 기재되어 있다.

#### 레트로바이러스

지난 십년간, 유전자 치료법은 수많은 임상적 시도로 질병 치료에 적용되어 왔다. 다양한 도구들이 유전자를 사람세포내로 운반시키기 위해 개발되어 왔다; 상기 도구들 중, 렌티바이러스를 포함하는 유전자적으로 조작된 레트로바이러스가 현재 유전자 운반을 위한 가장 인기있는 도구 중의 하나이다. 대부분의 시스템은 관심있는 유전자를 수용할 수 있는 벡터 및 벡터를 함유하는 감염성 바이러스 입자가 생성되도록 하는 바이러스 구조 단백질과 효소를 제공할 수 있는 헬퍼 세포를 포함한다. 레트로바이러스과(Retroviridae)는 뉴클레오티드와 아미노산 서열, 계놈 구조, 병원성, 및 숙주 범위가 상이한 레트로바이러스의 패밀리이다. 이러한 다양성은 상이한 생물학적 특징을 지닌 바이러스를 사용할 수 있는 기회를 제공하여 상이한 치료 적용법이 개발될 수 있게 한다. 임의의 운반 도구를 사용함에 따라, 효율, 특정 조직 또는 세포 유형을 표적으로 삼는 능력, 관심있는 유전자의 발현, 및 레트로바이러스-기반 시스템의 안정성이 유전자 치료법의 성공적 적용을 위하여 중요하다. 최근 수년간 이러한 연구 분야에 상당한 노력이 기울여졌다. 유전자 발현을 변형시키고, 운반을 표적화하고, 바이러스 역ガ를 개선시키고, 안정성을 증가시키기 위하여 레트로바이러스-기반 벡터 및 헬퍼 세포에 대한 다양한 변형이 이루어졌다. 본원발명은 관심있는 유전자가 이러한 바이러스성 벡터 내로 효율적으로 운반되도록 작동한다는 점에서 이러한 디자인 과정에서의 개선을 제시한다.

바이러스는 유전자 운반을 위한 필연적인 도구이다. 이들은 세포 내부에서 복제하며, 그러므로 세포내로 진입하여 그들의 유전자를 발현시키기 위해 세포내 기구를 이용하는 메커니즘을 진화시켜 왔다. 바이러스-기반 유전자 운반의 개념은 관심있는 유전자를 발현할 수 있도록 바이러스를 조작하는 것이다. 바이러스의 특이적 적용 및 바이러스 유형에 따라, 대부분의 바이러스성 벡터는 야생형 바이러스처럼 숙주내에서 자유롭게 복제할 수 있는 그들의 능력을 해치는 돌연변이를 내포한다.

몇몇 상이한 패밀리로부터 유래한 바이러스들이 유전자 운반을 위한 바이러스성 벡터를 생산하기 위해 변형되었다. 이러한 바이러스들은 레트로바이러스es, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노부속바이러스, 단순헤르페스바이러스, 피코르나바이러스(picornavirues), 및 알파바이러스를 포함한다. 본원발명은 렌티바이러스를 포함하는 레트로바이러스를 이용하는 것이 바람직하다.

유전자 운반을 위한 이상적인 레트로바이러스 벡터는 효율적이어야 하고, 세포-특이적이어야 하며, 조절되어야 하고, 안전하여야 한다. 운반 효율은 치료법의 효능을 결정할 수 있으므로 중요하다. 현재의 노력은 레트로바이러스 벡터를 이용한 세포-유형-특이적 감염 및 유전자 발현의 달성을 목표로 하고 있다. 또한, 치료법이 장기간-지속되거나 조절되는 발현을 요할 수 있기 때문에, 레트로바이러스 벡터가 관심있는 유전자의 발현을 조절할 수 있도록 개발되어 진다. 대부분의 바이러스가 병원체이거나 잠재적인 병원성을 지지기 때문에 안정성이 바이러스 유전자 운반의 주요 논쟁거리이다. 유전자 운반 중간에, 환자가 완전한 복제 잠재력을 지니는 병원성 바이러스를 부주의하게 주입받지 않는 것도 또한 중요하다.

레트로바이러스는 통합된 DNA 중간체를 통해 복제하는 RNA 바이러스이다. 레트로바이러스 입자는 전장-길이 바이러스 RNA의 카피 2개를 단백질막으로 싸는데, 각각의 카피는 바이러스 복제에 필요한 완전한 유전자 정보를 포함한다. 레트로바이러스는 지질 외피를 소유하고 있고 숙주세포에 진입하기 위하여 막에 깊숙히 박혀있는 바이러스에 의해 엔코딩되는 외피 단백질과 세포 수용체간의 상호작용을 이용한다. 비리온 안에 존재하는 바이러스에 의해 엔코딩되는 효소 역전사효소를 사용하여, 바이러스 RNA가 DNA 카피로 역전사된다. 이러한 DNA 카피

는 바이러스에 의해 엔코딩되는 또 다른 효소인, 인테그라아제에 의해 숙주 세포에 통합된다.

통합된 바이러스 DNA는 프로바이러스로 지칭되며 숙주 세포의 영구적인 일부분이 된다. 세포 전사 및 번역 기구는 바이러스 유전자의 발현을 수행한다. 숙주 RNA 폴리머라아제 II는 RNA를 생산하기 위해 프로바이러스를 전사하고, 및 그 외 세포 가공과정이 RNA를 변형시키고 핵으로부터 RNA를 운반한다. 소정 분량의 바이러스 RNA는 몇몇 유전자들이 발현될 수 있도록 스플라이싱되며, 반면 그 외 다른 바이러스 RNA는 전장-길이를 그대로 유지한다. 숙주 번역 기구는 바이러스 단백질을 합성하고 변형시킨다. 새롭게 합성된 바이러스 단백질과 새롭게 합성된 전장-길이 바이러스 RNA는 조립되어 숙주세포 밖으로 뚫고 나오는 새로운 바이러스를 형성시킨다.

바이러스 구조에 근거하여, 레트로바이러스는 단순한 레트로바이러스와 복잡한 레트로바이러스로 분류될 수 있다. 단순한 레트로바이러스와 복잡한 레트로바이러스는 *gag*(그룹-특이적 항원), *pro*(프로테아제), *pol*(폴리머라아제), 및 *env*(외피) 유전자를 엔코딩한다. 이러한 유전자들 이외에도, 복잡한 레트로바이러스들은 또한 다수의 부속 유전자들을 엔코딩한다.

레트로바이러스들은 또한 온코바이러서, 렌티바이러스 및 스푸마바이러스로 분류될 수도 있다. 대부분의 종양 바이러스들은 단순한 레트로바이러스이다. 렌티바이러스, 스푸마바이러스, 및 몇몇 종양바이러스들은 복잡한 레트로바이러스이다. 현재, 모두 3가지 유형의 바이러스가 유전자 치료법의 도구로서 이용되고 있다. 아래에서는 각 유형의 예를 고찰할 것이다.

마우스 백혈병 바이러스(MLV)는 종양바이러스의 일예이며, 사람 면역결핍 바이러스 1(HIV-1)은 렌티바이러스의 일예이며, 사람 포말 바이러스는 스푸마바이러스의 일예이다.

복제 능력이 있는 레트로바이러스가 천연 숙주세포에 감염될 때, 상기 바이러스는 숙주 세포 안에서 프로바이러스를 형성하고, 바이러스 유전자를 발현시키며, 새로운 감염성 입자를 방출시켜 다른 숙주를 감염시킬 수 있다. 대부분의 유전자 치료법 적용에 있어서, 바이러스가 표적으로 삼은 조직을 벗어나 전파될 수 있으며 좋지 않은 병원성 효과를 야기시킬 수 있기 때문에 복제 능력이 있는 바이러스가 환자에게 운반되게 하는 것은 바람직하지 않다. 그러므로, 유전자 운반을 위하여 디자인된 대부분의 레트로바이러스 시스템에서, 바이러스 구성성분은 자유롭게 복제할 수 있는 바이러스의 능력을 제한하기 위하여 벡터와 헬퍼 컨스트럭트로 나뉘어 지게 된다.

용어 벡터는 일반적으로 관심있는 유전자(들)(또는 도입유전자) 및 유전자 발현 및 복제에 필요한 시스-작용 엘리먼트를 포함하는 변형된 바이러스를 의미한다. 대부분의 벡터는 바이러스 단백질 코딩 서열 중 일부 또는 전부에 대한 결실(들)을 내포함으로써 복제 능력이 없다. 헬퍼 컨스트럭트는 벡터의 결여된 바이러스 유전자를 발현하고 벡터의 복제를 보조하기 위하여 디자인된다. 헬퍼 바이러스로 제공되거나 코트랜스펙션(cotransfection) 플라스미드로서 제공될 수도 있으나, 헬퍼 기능은 헬퍼 세포 형태로 가장 흔히 제공된다.

헬퍼 세포는 레트로바이러스 벡터를 증식시키기 위해 필요한 바이러스 단백질을 발현하는 조작된 배양 세포이다; 이것은 일반적으로 바이러스 단백질을 발현하는 플라스미드를 배양 세포에 트랜스펙션시킴으로써 달성된다. 대부분의 헬퍼 세포주는 레트로바이러스 벡터 복제를 보조할 때에 균일성을 보장하기 위해 세포 클론으로부터 유도된다.

헬퍼 바이러스는 복제능력이 있는 바이러스가 높은 빈도의 재조합을 통해 생성될 수 있다는 가능성때문에 흔히 사용되지 않는다. 헬퍼 기능은 또한 레트로바이러스 벡터의 급속한 증식이 이루어지게 하는 헬퍼 컨스트럭트의 일시적 트랜스펙션에 의해 제공될 수 있다.

대부분의 레트로바이러스 벡터는 벡터 DNA의 조작 및 증식을 용이하게 하는 박테리아 플라스미드로 유지된다. 이러한 이중-가닥 DNA 벡터는 DNA 트랜스펙션, 리포펙션, 또는 전기천공법과 같은 통상적인 방법에 의해 헬퍼 세포 내로 도입될 수 있다. 출현한 헬퍼 세포는 모든 바이러스 단백질(Gag, Gag-Pol, 및 Env)을 발현하나 패키징 시그널을 함유하는 RNA가 결여되어 있다. 상기 바이러스 RNA는 감염성 바이러스 입자의 형성 및 방출을 위해 필요하지만, "텅빈(empty)" 비감염성 바이러스 입자의 형성에는 불필요하다. 벡터 DNA가 헬퍼 세포 내로 도입될 때, 패키징 시그널을 함유하는 벡터 RNA가 전사되고 바이러스 입자로 효율적으로 패키지된다. 바이러스 입자는 헬퍼 컨스트럭트로부터 발현된 바이러스 단백질과 벡터로부터 전사된 RNA를 포함한다. 이러한 바이러스 입자는 표적 세포에 감염될 수 있고, 벡터 RNA를 역전사하여 2중-가닥 DNA 카피를 형성시킬 수 있으며, 숙주 세포 내로 상기 DNA 카피를 통합시켜 프로바이러스를 형성할 수 있다. 이러한 프로바이러스는 관심있는 유전자(들)을 엔코딩하며 숙주세포 기구에 의해 발현된다. 그러나, 벡터는 임의의 바이러스 단백질을 발현하지 않기 때문에, 상기 벡터는 그 밖의 다른 표적세포로 증식할 수 있는 감염성있는 바이러스 입자를 생성시킬 수 없다.

헬퍼 세포는 레트로바이러스 벡터의 증식을 보조할 수 있게 디자인된다. 헬퍼 세포 내의 바이러스 단백질은 포유동물 세포 내로 트랜스펙션되는 헬퍼 컨스트럭트로부터 발현된다. 헬퍼 컨스트럭트는 그들의 발현 양상 및 그들이 엔코딩하는 유전자에 있어서 차이가 있다.

#### 단일-게놈(One-genome) 헬퍼 컨스트럭트

초기에 개발된 헬퍼 세포주에서, 하나의 헬퍼 컨스트럭트로부터 모든 바이러스 유전자가 발현되어 졌다. 이러한 헬퍼 세포의 예는 C3A2 및 -2이다. 이러한 세포주를 위한 헬퍼 컨스트럭트는 패키징 신호가 결여된 클로닝된 프로바이러스 DNA이었다. 이러한 헬퍼 세포는 레트로바이러스 벡터의 효율적인 증식을 보조할 수 있다. 그러나, 이러한 헬퍼 세포가 지닌 주요한 문제점은 복제능력이 있는 바이러스들이 바이러스성 벡터의 증식 과정에서 빈번하게 생성될 수 있다는 것이다. 헬퍼 컨스트럭트는 바이러스 게놈의 대부분을 함유하며 그렇기 때문에 레트로바이러스 벡터와 상당한 서열 상동성을 공유한다. 서열 상동성은 헬퍼 컨스트럭트와 레트로바이러스 벡터간의 재조합을 용이하게 하여 복제능력이 있는 바이러스가 생성될 수 있게 한다. 헬퍼 RNA가 패키징 신호를 갖추고 있지는 아니할지라도, 상기 RNA는 여전히 낮은 효율로 비리온으로 패키지될 수 있다(상기 신호를 포함한 RNA 보다 대략 100 내지 1,000배 덜 효율적임). 레트로바이러스 재조합은 공통패키지된 두 바이러스 RNA를 사이에 빈번하게 발생하여 양쪽 모 바이러스의 유전 정보를 포함하는 DNA 카피를 생성시킨다. 헬퍼 RNA와 벡터 RNA가 동일한 비리온으로 패키지되면, 상기 두 RNA들 간에 서열 상동성이 존재하는 거대 지역은 역전사 과정에서 복제능력이 있는 바이러스를 생성시키는 상동성 재조합을 용이하게 할 수 있다. 유사한 재조합 사건이 헬퍼 RNA와 내생성 바이러스로부터 생성된 RNA 사이에서 보다 낮은 효율로 발생할 수 있는데, 이는 복제능력이 있는 바이러스가 생성되도록 한다.

#### 분절-게놈(Split-Genome) 헬퍼 컨스트럭트

복제능력이 있는 바이러스 생성과 관련한 안정성에 대한 관심은 CRIP, GP+envAm12, 및 DSN을 포함하는, "분절 게놈"을 이용한 다수의 헬퍼 세포주들에 대한 디자인을 조장하였다. 이러한 헬퍼 세포에서, 바이러스 Gag/Gag-Po1 폴리단백질은 하나의 플라스미드로부터 발현되며 Env 단백질은 또 다른 플라스미드로부터 발현된다. 더욱이, 상기 두 헬퍼 컨스트럭트들은 또한 레트로바이러스 벡터와의 서열 상동성을 감소시키거나 없애버리는 바이러스 시스-작동 엘리먼트의 결실을 내포한다. 이러한 헬퍼 세포에서, 바이러스 단백질을 엔코딩하는 유전자는 2개의 서로 다른 컨스트럭트에 나뉘어지며 바이러스 시스-작동 엘리먼트는 벡터내에 위치된다. 그러므로, 바이러스 게놈을 재구축하기 위하여 몇몇 재조합 사건이 발생하여야만 한다. 또한, 상동성 지역의 감소는 이러한 재조합 사건이 일어날 확률을 감소시킨다. 그러므로, 분절-게놈 헬퍼 컨스트럭트를 포함하는 헬퍼 세포는 단일-게놈 헬퍼 컨스트럭트를 포함하는 헬퍼 세포 보다 더 안전한 것으로 여겨진다.

#### 유도성 헬퍼 컨스트럭트

바이러스 단백질을 구조적으로 발현하는 상기 기재된 헬퍼 세포주와는 대조적으로, 몇몇 헬퍼 세포주는 유도성 방식으로 바이러스 단백질을 발현하도록 디자인되었다. 유도성 헬퍼 세포주에 관한 한 이론적 근거는 몇몇 바이러스 단백질은 세포에 유독하며 쉽게 높은 수준으로 발현될 수 없다는 것이다. 유도성 시스템을 이용함으로써, 세포독성 단백질의 발현은 바이러스가 증식되는 단계로 제한될 수 있다. 세포독성 단백질의 발현을 조절함으로써, 높은 바이러스 역가가 얻어질 수 있다. 유도성 헬퍼 세포의 예는 293 GPG 세포 및 HIV-1 헬퍼 세포주를 포함한다.

#### 일시적 트랜스펙션 시스템

효율적인 트랜스펙션 방법이 개발됨에 따라, 일시적 트랜스펙션 시스템이 또한 레트로바이러스 벡터의 증식을 위해 개발되어 왔다. 이러한 시스템에서, 헬퍼 기능은 일반적으로 2개의 서로 다른 컨스트럭트들로부터 발현되는데, 상기 컨스트럭트들 중 하나는 *gag-pol*을 발현하며 또 다른 하나는 *env*를 발현한다. 이러한 2개의 컨스트럭트들은 일반적으로 서열 상동성을 거의 공유하지 않는다. 레트로바이러스 벡터와 헬퍼 컨스트럭트들은 세포내로 트랜스펙션되며, 바이러스들이 트랜스펙션후 수일경과시 수확된다.

#### 슈도타입(Pseudotype) 바이러스를 생산하는 시스템

슈도타이핑(Pseudotyping)은 임의의 한 바이러스에서 유래한 바이러스 게놈과 임의의 상이한 바이러스에서 나온 바이러스 단백질의 일부분(또는 전부)를 포함하는 바이러스 입자를 의미한다. 슈도타이핑의 가장 일반적인 형태는 임의의 다른 바이러스의 외피 단백질을 이용하는 임의의 한 바이러스를 포함한다. 몇몇 헬퍼 세포주들은 임의의 한 바이러스로부터의 *gag-pol* 및 임의의 다른 바이러스로부터의 *env*를 발현하는 헬퍼 컨스트럭트들을 포

함한다. Gag 폴리단백질들은 바이러스 RNA를 선별하기 때문에, 증식되는 바이러스성 벡터는 이러한 세포에서 발현된 Gag 폴리프로테인에 의해 인지되는 RNA를 포함한다. 그러나, 생산된 바이러스 입자 임의의 다른 바이러스로부터 유래한 Env 단백질을 포함한다. 그러므로, 이러한 바이러스 입자는 이종 외피 단백질과 상호작용할 수 있는 수용체를 발현하는 세포에만 감염될 수 있다. 예를 들어, 헬퍼 세포주 PG13은 MLV로부터의 gag-pol과 긴팔원숭이 백혈병 바이러스(gibbon ape leukemia virus, GaLV)로부터의 env를 발현한다. PG13 세포주가 MLV Gag 폴리프로테인을 발현하기 때문에, MLV-기반 레트로바이러스 벡터를 효율적으로 패키지할 수 있다. 상이한 패밀리의 바이러스들로부터 유래한 일부 외피가 또한 레트로바이러스들을 슈도타이핑할 수 있으며 감염성 바이러스 입자들을 생산할 수 있다는 것도 밝혀진 바 있다. 예를 들어, 랍도바이러스인 수포성 구내염 바이러스 (vesicular stomatitis virus, VSV)의 G 단백질은 슈도타이핑된 레트로바이러스 벡터를 생산하는데 이용될 수 있다. 이러한 VSV G 슈도타이핑된 바이러스들은 매우 광범위한 숙주 범위를 나타내며 정상적으로 레트로바이러스들이 감염될 수 없는 다양한 세포에 감염될 수 있다. 벡터 슈도타이핑을 위하여 사용될 수 있는 그밖의 다른 외피는 다음 바이러스들의 외피이다: RD114 내생성 펠린 레트로바이러스(조혈세포를효과적으로 표적으로 삼음), 림프구 맥락수막염 바이러스(Lymphocytic ChorioMeningitis Virus, LCMV), 광견병 바이러스, 에볼라 및 모콜라 바이러스, 로쓰 리버(Ross River) 및 셈리키 포레스트(Semliki Forest) 바이러스, 및 배콜로바이러스 gp64 외피.

슈도타이핑은, 예를 들어, HIV 또는 말 전염성 빈혈 바이러스(EIAV)과 같은 렌티바이러스에 기반한 레트로바이러스 계놈을 포함할 수 있으며 외피 단백질은, 예를 들어, 4070A로 명명된 양쪽성 외피 단백질일 수 있다. 대안으로, 외피 단백질은 인플루엔자 헤마글루틴과 같은 또 다른 바이러스로부터의 단백질일 수 있다. 또 다른 대안으로, 외피 단백질은 돌연변이와 같은 변형된 외피 단백질, 절단되거나 조작된 외피 단백질(예를 들어, 조작된 RD114 외피)일 수 있다. 변형은 표적화 능력을 도입하거나 독성을 감소시키거나 또 다른 목적을 위하여 행해지거나 선택될 수 있다.

#### 세포 또는 조직 표적화를 위한 유전자적으로 변형된 env를 내포하는 시스템

바이러스 외피 단백질과 세포 수용체 간의 상호작용은 바이러스의 숙주 범위를 결정한다. 바이러스 Env를 변형시킴으로써 바이러스 운반을 특정 유형의 세포로 표적화시키는 전략이 개발되어 왔다. 번역 및 변형 후, Env의 SU 부분은 세포 수용체와 상호작용한다. Env의 SU 부분에 대한 변형은 SU의 코딩 지역 일부에 대한 결실에 의해 흔히 달성되며 상기 부분은 그외 다른 단백질의 지역으로 대체된다. Env의 SU 부분을 변형시키기 위해 사용되어 온 단백질은 에리트로포이에틴, 헤레굴린(heregulin), 인슐린-유사 성장 인자 I, 및 다양한 단백질에 대한 단일-사슬 가변 단편 항체를 포함한다.

#### 하이브리드 시스템

최근에 개발된 몇몇 시스템은 레트로바이러스 벡터의 증식을 위한 하이브리드 접근법을 이용한다. 헬퍼 세포주가 구조적으로 몇몇 바이러스 단백질을 발현시키는데 사용되며, 반면, 그외 다른 바이러스 단백질이 일시적 트랜스펙션에 의해 헬퍼 세포주 내로 도입된다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터는 구조적으로 MLV gag-pol을 발현하는 헬퍼 세포주 내로 도입될 수 있다. 레트로바이러스 벡터를 증식시키기 위하여, VSV G를 발현하도록 디자인된 플라스미드가 일시적 트랜스펙션에 의해 시스템내로 도입될 수 있다. 이 주제에 관한 또 다른 변형으로써, 레트로바이러스 벡터 그 자체가 일부 바이러스 단백질(예를 들어, Gag/Gag-Pol)을 엔코딩할 수 있으며, 헬퍼 세포주가 그외 다른 바이러스 단백질(Env)을 제공할 수 있다(Boerkoeil et al., 1993). 레트로바이러스 헬퍼 컨스트럭트를 운반하기 위하여 그외 다른 바이러스들을 이용하는 접근법이 사용될 수도 있다. 예를 들어, 변형된 단순헤르페스바이러스가 헬퍼 기능을 제공할 수 있도록 레트로바이러스 gag, pol, 및 env포함하도록 생성되었다. 유사하게, 아데노바이러스 벡터 및 셈리키 포레스트 바이러스-유래 발현 벡터가 또한 MLV 바이러스 단백질을 엔코딩하는 유전자를 헬퍼 세포로 운반하기 위하여 사용되어 왔다.

#### 상이한 레트로바이러스들에 기반한 벡터

많은 레트로바이러스들이 관심있는 유전자(들)(도입유전자)를 운반할 수 있는 벡터를 생산하기 위해 변형되었다. 바이러스성 벡터는 일반적으로 바이러스 복제 및 유전자 발현에 필요한 모든 시스-작동 엘리먼트들을 포함한다. 몇몇 바이러스들로부터 유래한 벡터들에 있어서 추가 엘리먼트들이 성공적인 유전자 운반을 보장하기 위하여 요구될 수 있다. 이러한 시스-작동 엘리먼트의 구비는 이러한 바이러스들에 대한 생물학적 이해가 향상됨에 따라 종종 명확해졌다. 또한 박테리아 세포에서의 용이한 조작을 가능케 하기 위하여, 대부분의 레트로바이러스 벡터는 플라스미드 형태로 존재하며 박테리아 복제 기점 및 항생제 내성 유전자를 포함하는 백본을 지닌다. 그 다음 단계들은 전형적으로 레트로바이러스 벡터로부터 바이러스 입자를 생산하기 위해 수행된

다. 백터 DNA가 제일먼저 트랜스펙션, 전기천공법, 또는 리포펙션에 의해 헬퍼 세포내로 도입된다. 헬퍼 세포내로 DNA의 도입후, 백터 DNA는 헬퍼 세포에 통합되고 발현된다. 바이러스 RNA가 5'LTR로부터 발현되며 2개의 R 지역 사이의 모든 서열로 이루어 진다. 이러한 바이러스 RNA는 패키징 신호를 함유하며 효율적으로 바이러스 입자로 패키지된다. 레트로바이러스 복제 과정에서, 상기 2개의 LTR 바깥쪽의 플라스미드 백본 서열은 표적 세포로 운반되지 않는다. 여러 레트로바이러스들로부터 유래한 몇몇 레트로바이러스 백터의 기본 구조가 아래에 기재되어 있다.

#### 종양바이러스로부터 유래한 백터

3개의 서로 다른 종양바이러스들로부터 유래한 백터들이 여기에 설명될 것인데 이들은 가장 폭넓게 사용되는 레트로바이러스 백터 중 일부를 대표한다. 종양바이러스들은 분열중인 세포에만 감염될 수 있다; 그러므로, 종양바이러스들로부터 유래한 백터들은 유전자들을 분열중인 세포로 효율적으로 운반하는데에만 사용할 수 있다. 때때로 세포 증식을 위한 구비조건이 빠르게 분열하는 세포(예를 들어, 암세포)를 선택적으로 표적으로 삼는데 유리하게 이용될 수 있다.

1. 마우스 백혈병 바이러스-기반 백터. 현재까지, MLV-기반 레트로바이러스 백터 및 헬퍼 세포는 유전자 운반을 위한 가장 빈번하게 사용되는 시스템이다. 조작된 백터와 헬퍼 세포주에 대한 개발 및 유용성은 MLV-기반 백터의 인기를 드높였다. 백터는 유전자 발현 및 바이러스 복제에 필요한 시스-작동 바이러스 서열, 예를 들어, LTR, PBS, PPT, 및 att를 포함한다. 패키징 신호는 최소길이 신호 또는 gag 개방해독틀(+)로 신장되는 보다 긴 신호일 수 있다. 상기 + 가 백터내에 존재할 때, 절단된 Gag 단백질의 발현을 막기위하여 gag의 번역 개시 코돈을 돌연변이시킬 필요가 있다. 몇몇 백터는 패키징 신호와 3' 비번역 지역 사이의 다수의 제한효소부위를 포함하도록 디자인되었다. 이러한 클로닝 부위의 존재는 관심있는 유전자를 발현할 수 있는 백터 제작을 용이하게 한다.

MLV-기반 백터는 모든 MLV 헬퍼 세포주에서 효율적으로 증식될 수 있다. MLV 백터의 숙주 범위를 확장시키는 몇몇 MLV 외피 단백질이 있다. 에코트로픽(ecotropic) 외피를 이용하는 바이러스는 마우스 세포에 감염될 수 있으나 그외 다른 종에서 유래한 세포에는 감염될 수 없다. 앰포트로픽(amphotropic) 외피를 이용하는 바이러스는 마우스 세포와 사람 세포를 포함하는 그외 다른 종에서 유래한 세포에 감염될 수 있다. 제노트로픽(xenotropic) 외피를 이용하는 바이러스는 마우스 세포에는 감염될 수 없으나 그외 다른 종에서 유래한 세포에 감염될 수 있다. 또한, MLV 백터는 또한 비장괴사바이러스(SNV)-기반 헬퍼 세포주에서 증식될 수 있다. SNV는 MLV와는 거리가 먼 조류 바이러스이다. 놀랍게도, SNV 단백질은 MLV 시스-작동 서열과 상호작용하며, MLV RNA를 패키징하며, MLV 게놈을 역전사시키며, MLV RNA를 숙주내로 통합시키는 능력을 보유하고 있다.

2. 비장괴사바이러스-기반 백터. 이러한 백터에서 요구되는 바이러스 서열은 MLV 백터의 서열과 매우 유사하다. E로 표기된, SNV의 패키징 신호는 gag 개방해독틀로 신장되지 않는다; 그러므로, 대부분의 SNV-기반 백터는 gag 코딩 지역을 포함하지 않는다. MLV 백터와 유사한, 관심있는 유전자가 패키징 신호와 3' 비번역 지역 사이의 다수의 제한 부위를 포함하는 링커 지역내로 삽입된다. SNV-기반 백터는 SNV-기반 헬퍼 세포주, 예를 들어, C3A2, DSDH, DSH134G, 및 DSN에서 증식될 수 있다.

3. 로우스육종바이러스(Rous Sarcoma Virus)- 및 조류백혈병바이러스(Avian Leukosis Virus)-기반 백터. RSV는 유일하게 공지된 복제능력이 있는 급성 종양생성(oncogenic) 레트로바이러스이다. gag-pol 및 env 이외에, RSV가 또한 env와 3' LTR 사이에 온코유전자 v-src를 엔코딩한다. v-src 상류에 위치한 스플라이스 수용체 부위(splice acceptor site)가 유전자를 스플라이스된 유전자로 발현되도록 한다. RSV는 추가의 유전자를 엔코딩하는 능력을 가지고 있다. 다양한 변형이 복제능력이 있는 바이러스성 백터를 생산하기 위해 행해졌는데, 이러한 변형의 일예는 스플라이스 수용체 부위 및 몇몇 제한효소부위에 의한 v-src의 대체이다. DNA 단편이 관심있는 유전자를 발현하는 복제능력이 있는 백터를 생산하기 위하여 제한 부위로 삽입될 수 있다.

ALV가 또한 이들의 증식을 위하여 헬퍼 세포를 필요로 하는 백터를 생산하기 위하여 변형되었다. 상기에 설명한 MLV 및 SNV 백터와 유사하게, ALV 백터의 기본 구조도 또한 5' 및 3' LTR, att, PBS5 PPT, 및 패키징 신호를 포함한다. ALV의 패키징 신호는 gag 개방해독틀로 신장되며, gag의 적절한 일부가 효율적인 패키징을 달성하기 위하여 ALV-기반 백터에 포함된다.

#### 렌티바이러스로부터 유래한 백터

종양바이러스와는 대조적으로, 몇몇 렌티바이러스는 비분열, 휴지기 세포에 감염되는 것으로 입증되었다. 렌티바이러스는 이들의 복제 주기 조절에 관한 보조 단백질을 발현시킬 필요가 있을 수 있는 복잡한 레트로바이러스

이다. 이러한 보조 단백질 중 몇몇은 바이러스 게놈의 여러 지역에 결합하여 유전자 발현을 조절한다. 그러므로, 렌티바이러스-기반 벡터는 효율적인 바이러스 복제 및 유전자 발현이 일어날 수 있도록 추가의 시스-작동 엘리먼트를 포함할 필요가 있다. 렌티바이러스-기반 벡터의 예로서, HIV-1- 및 HIV-2-기반 벡터가 아래에 설명되어 있다.

HIV-1 벡터는 단순한 레트로바이러스에서도 발견되는 시스-작동 엘리먼트를 포함하고 있다. gag 개방해독틀로 신장되는 서열이 HIV-1의 패키징에 중요하다는 것이 밝혀졌다. 그러므로, HIV-1 벡터는 흔히 번역 개시 코돈이 돌연변이된 적절한 gag 부분을 포함한다. 또한, 대부분의 HIV-1 벡터는 또한 RRE를 포함하는 env 유전자의 일부를 내포한다. Rev는 RRE에 결합하는데, 상기 RRE는 전장길이 또는 따로따로 스플라이싱된 mRNA를 핵으로부터 세포질로 운반시킨다. Rev 및/또는 RRE의 부재시에, 전장길이 HIV-1 RNA는 핵내에 축적된다. 대안으로, 특정 단순한 레트로바이러스, 예를 들어, 메이슨-화이자(Mason-Pfizer) 원숭이 바이러스로부터의 구조적 운반 엘리먼트가 Rev 및 RRE에 대한 필요를 경감시키는데 이용될 수 있다. HIV-1 LTR 프로모터로부터의 효율적인 전사는 바이러스 단백질 Tat를 필요로 한다. 그러므로, HIV-1 LTR 프로모터로부터의 효율적인 전사가 요구된다면 Tat가 표적 세포내에서 발현되는 것이 중요한다. Tat 발현에 대한 요구는 레트로바이러스 벡터로부터의 Tat 유전자를 발현시킴으로써 충족될 수 있다. 대안적으로, 이종 내부 프로모터로부터 관심있는 유전자를 발현시킴으로써 Tat 발현에 대한 요구를 교묘하게 회피할 수 있다.

대부분의 HIV-2-기반 벡터는 구조적으로 HIV-1 벡터와 매우 유사하다. HIV-1-기반 벡터와 유사하게, HIV-2 벡터도 전장길이이나 또는 따로따로 스플라이싱된 바이러스 RNA의 효율적인 운반을 위하여 RRE를 필요로 한다.

또한 HIV-1 벡터는 원숭이(simian) 면역결핍바이러스로부터 나온 바이러스 단백질을 이용하여 고 바이러스 역가로 증식될 수 있다는 것이 입증된 바 있다. 일 시스템에서, 벡터 및 헬퍼 컨스트럭트가 2개의 서로 다른 바이러스들로부터 나오며, 감소된 뉴클레오티드 상동성은 재조합 확률을 감소시킬 수 있다. 영장류 렌티바이러스에 기반한 벡터 이외에, 벡터s 기반 on 고양이 면역결핍 바이러스에 기반한 벡터가 또한 병원성 HIV-1 게놈으로부터 유래한 벡터의 대안으로서 개발되었다. 이러한 벡터의 구조는 또한 HIV-1 기반 벡터와 유사하다.

#### 스푸마바이러스로부터 유래한 벡터

포말(Foamy) 바이러스는 이들의 복제 주기에서의 많은 특징들이 종양바이러스 및 렌티바이러스의 특징들과는 상이하다는 점에서 통상적이지 아니한 레트로바이러스이다. 비록 이러한 바이러스들이 배양된 세포에 유독할 수 있지만, 포말 바이러스들 중 어느 것도 숙주에서 임의의 질병을 유발하는 것으로 알려진 바 없다.

포말 바이러스 벡터의 예는 전형적인 레트로바이러스 시스-작동 서열을 포함한다. 5' 비번역 지역 내 서열 이외에, gag 개해독틀의 5' 부분 및 pol 개방해독틀의 3' 부분 내의 서열이 효율적인 패키징을 위해 중요하다. 렌티바이러스와 유사하게, 사람 포말 바이러스 프로모터로부터의 발현은 바이러스 단백질 Tas에 의해 활성화된다.

#### 레트로바이러스 벡터의 디자인

레트로바이러스 벡터는 유전자 치료전문가를 위한 다양한 목적을 제공하는 다수의 상이한 변형을 포함할 수 있다. 이러한 변형은 하나 이상의 유전자가 발현되도록 하기 위하여, 유전자 발현을 조절하기 위하여, 바이러스 성 벡터를 활성화시키거나 비활성화시키기 위하여, 그리고 복제능력이 있는 바이러스가 생산되는 것을 피할 목적으로 바이러스 서열을 제거하기 위하여 도입될 수 있다. 이러한 변형들의 일부 예가 아래에 설명되어 있다.

##### A. 기본 벡터

- U3 프로모터-유도 유전자 발현. 전장길이 바이러스 RNA가 5' LTR의 U3 지역내에 위치한 레트로바이러스 프로모터로부터 발현된다. 바이러스 RNA는 R, U5, 5' 비번역 지역, 관심있는 유전자, 3' 비번역 지역, U3, 및 R을 포함한다. 5'과 3' 비번역 지역 사이에 삽입된 유전자는 U3 프로모터로부터 전사되는 전장길이 RNA로부터 번역될 수 있다.

바이러스 스톡(stocks)의 증식 과정에서, 바이러스성 벡터에 의해 트랜스펙션 또는 감염된 헬퍼 세포가 선별될 수 있도록 하기 위하여 벡터 내의 선별 마커 유전자가 발현되도록 하는 것이 종종 바람직할 수 있다. 그러므로, 흔히 관심있는 유전자 뿐만 아니라 선별 마커 유전자를 발현하는 레트로바이러스 벡터를 디자인 할 필요가 있다. 약제 내성 유전자가 선별 마커로서 자주 이용되지만, 그외 다른 마커 유전자, 예를 들어, 녹색형 광단백질 유전자가 또한 트랜스펙션 또는 감염된 세포를 선별하기 위해 이용될 수 있다. 레트로바이러스 벡터 내의 2 유전자들의 발현은 내부 프로모터, RNA 스플라이싱, 또는 내부 리보좀 도입 부위(IRES)를 사용하여 3'

유전자를 발현시킴으로써 달성될 수 있다.

2. 추가 유전자들을 발현시키기 위하여 내부 프로모터를 사용하는 벡터. 여기서 내부 프로모터를 포함하는 레트로바이러스 벡터로부터의 유전자 발현의 예로서, 예를 들어, 바이러스 U3 프로모터로부터 발현되는 전장길이 RNA가 관심있는 제1 유전자(들)을 번역하는데 사용된다. 내부 프로모터로부터 발현되는 부분계놈(subgenomic) RNA가 관심있는 제2 유전자(들)을 번역하는데 사용된다.

3. 추가 유전자들을 발현시키기 위하여 스플라이싱을 사용하는 벡터.

레트로바이러스는 스플라이싱을 조절함으로써 env를 발현한다. env를 발현하기 위하여 사용되는 스플라이스 공여 부위는 레트로바이러스의 5' 비번역 지역 내에 위치한다. 복제가 일어나는 동안, 일부 전장길이 바이러스 RNA는 Env 단백질을 발현시키기 위해 사용되는 부분계놈 바이러스 RNA를 생산하기 위하여 스플라이싱된다. 바이러스 스플라이스 공여 및 스플라이스 수용 부위를 사용하여 2개의 서로 다른 유전자들을 발현시키는 동일한 원리를 이용하여 스플라이싱 벡터가 개발되었다. 스플라이싱 벡터의 장점은 단지 하나의 프로모터가 필요하며, 포로모터 간섭에 관한 임의의 잠재가능성이 사라지게 된다는 것이다.

4. 추가 유전자들을 발현시키기 위하여 번역 조절 신호를 사용하는 벡터. mRNA 서열은 리보좀이 mRNA의 가운데에 결합되도록 하며 상기 mRNA의 5' 말단으로부터 멀리 떨어진 곳에 위치한 유전자를 번역하도록 하는 신호로서 역할할 수 있음이 피코르나바이러스에서 최초로 입증되었다. 이러한 서열(IRES로 명명됨)은 현재 레트로바이러스 벡터에서 일반적으로 사용된다. 피코르나바이러스에서 확인된 IRES 서열 이외에, IRES 서열들이 몇몇 레트로바이러스의 5' 비번역 지역, 예를 들어, MLV, SNV, 및 내생성 바이러스 유사 입자(VL30)에서도 확인되었다. 그러므로, 두번째 유전자를 발현시키는데 아마도 이러한 레트로바이러스 IRES 서열들을 사용할 수 있다. 단일 전사체로부터 다수의 단백질이 발현되게 하는 그 외 다른 서열은 구제역(Foot-and-Mouth disease) 바이러스 및 그 외 피코RNA 바이러스로부터 유래한 자가-절단 2A-유사 웹티드(또한 CHYSEL(cis-acting hydrolase element s)로도 불리움)이다. 대안으로 양방향 프로모터가 동일 프로모터로부터 2개의 유전자들을 발현시키는데 사용될 수 있다.

#### B. 더블-카피 벡터

LTR 서열이 레트로바이러스 벡터 내에 중복으로 존재한다는 사실이 관심있는 유전자의 카피 2개를 포함하는 벡터를 구축하는데 이용되어 왔다. 예를 들어, 더블-카피 벡터의 첫번째 세트는 바이러스의 상류에 위치하는 U3 지역내에 관심있는 유전자를 포함한다. 이러한 유전자는 RNA 폴리머라아제 II 프로모터 또는 RNA 폴리머라아제 III 프로모터 중 어느 하나를 사용하여 발현된다. 이러한 전략은 성공적으로 유전자 발현 수준을 증가시키는 것으로 입증되었다. 더블-카피 벡터의 또 다른 예에서, 벡터는 R 지역의 중간에 관심있는 유전자를 포함한다.

#### C. 자체-비활성화(Self-Inactivating) 벡터

유전자 치료법을 위하여 레트로바이러스 벡터를 사용하는 것과 연관된 안정성에 대한 한가지 걱정거리는 벡터의 증식 과정에서 복제능력이 있는 바이러스가 생성될 수 있다는 것인데, 이는 표적이 아닌 조직으로 치료법 벡터의 우발적인 전파를 초래할 수 있다. 이러한 걱정거리에 초점을 맞추어, 자체-비활성화를 겪게 되는 벡터들이 디자인되었다. 유전자 운반후, 벡터가 복제의 또 다른 라운드를 완료하기 위하여 요구되는 시스-작동 엘리먼트의 일부를 결실시키는 것이 원리가 될 것이다. 그러므로, 심지어 복제능력이 있는 바이러스의 존재시에도, 이러한 벡터들은 그의 다른 표적 세포로 효율적으로 이동할 수 없다. 복제능력이 있는 바이러스의 생산은 때때로 결합 헬퍼 플라스미드와 관심있는 유전자를 엔코딩하는 벡터 사이의 재조합을 포함한다. 그러므로, 자체-비활성화 벡터의 또 다른 가능한 이점은 복제능력이 있는 바이러스가 생성될 가능성이 줄어 들게 된다는 것이다.

1. U3 마이너스 벡터. U3 마이너스 벡터는 개발된 최초의 자체-비활성화 레트로바이러스 벡터이다. 이러한 벡터는 표적세포 내의 프로바이러스가 바이러스 프로모터가 결여되도록 역전사가 일어나는 동안 바이러스 U3 프로모터가 결실되도록 디자인된다. 이러한 벡터에서, 5' LTR의 U3는 온전하게 존재하나, 반면, 3' LTR의 U3는 대규모 결실로 인하여 비활성화된다. 이러한 벡터로부터 생성된 RNA는 R, U5, 5' 비번역 지역, 관심있는 유전자(들), 3' 비번역 지역, 결실된 U3, 및 R을 포함한다. 역전사 과정에서, 바이러스 RNA 3' 말단의 U3는 일반적으로 주형으로 사용되어 LTR을 생성시킨다. 그러므로, 역전사를 통해 U3 마이너스 벡터로부터 합성된 바이러스 DNA는 양쪽 LTR에 결실된 U3 서열을 포함한다. 바이러스 프로모터가 역전사가 일어나는 동안 결실되기 때문에, 관심있는 유전자는 내부 프로모터의 조절하에 놓이게 된다. U3 마이너스 벡터의 이점은 복제능력이 있는 바이러스의 생산 가능성이 줄어들기 때문에 잠재적으로 더 안전하다는 것이다. 그러나, 낮은 빈도로, DNA 트랜스펙션 과정에서 재조합이 일어나 3' LTR에서 U3이 생성되게 할 수 있다. 이것이 일어나면, 그 결과 생성되는 벡터

는 여전히 U3에 프로모터를 포함할 것이고 그리하여 2개의 완전한 LTR들을 유지할 것이다. 몇몇 U3 마이너스 벡터에서 5'과 3' LTR 사이의 상동성을 감소시키기 위하여 추가 변형이 행해졌는데, 이는 DNA 트랜스펙션의 일어나는 동안의 온전한 LTR의 재조합 및 재생서의 가능성을 감소시킨다.

2. Cre/loxP 벡터. 박테리오파지 P1의 천연적으로 생성되는 위치-특이적 리콤비나아제인, Cre 리콤비나아제는 loxP로 명명된 32개 염기쌍(bp)의 서열을 인지한다. Cre는 다양한 길이를 가진 서열에 의해 분리되는 2개의 loxP 부위를 이용한 위치-특이적 재조합을 효율적으로 매개할 수 있다. 재조합 사건은 loxP 부위들 사이의 서열의 결실, 삽입, 및 역위를 포함한다. 이 시스템은 자체-비활성화 레트로바이러스 벡터를 개발하기 위해 이용되어 왔다(Choulika *et al.*, 1996; Russ *et al.*, 1996). 이러한 벡터의 예는 온전한 5' LTR 및 레트로바이러스 복제에 필요한 모든 시스-작동 엘리먼트들을 포함한다. 벡터는 내부 프로모터를 사용하여 발현되는 cre 리콤비나아제 유전자를 포함한다. 3' LTR은 loxP 부위, 프로모터, 및 관심있는 유전자를 포함하는 U3 내 몇몇 서열에 대한 삽입에 의해 변형된다; 또한, 3' U3는 종종 프로모터 활성을 감소시키기 위한 결실을 내포한다. 전장길이 바이러스 RNA는 비리온으로 패키지되고, 표적 세포에 감염됨에 따라, 바이러스 RNA는 역전사된다. 3' U3 서열은 양 LTR을 합성하기 위한 주형으로 사용된다; 결과적으로, 양 LTR의 서열은 loxP 부위의 카피, 프로모터, 및 관심있는 유전자를 포함한다. cre 유전자가 발현되고, Cre 리콤비나아제가 감염된 표적 세포내에서 합성된다. 이후 Cre 리콤비나아제는 바이러스 DNA 내의 2개의 loxP 부위들 사이의 서열의 결실을 매개하는데, 결국 5' LTR, 5' 비변역 지역, 내부 프로모터, 및 cre의 결실이 일어나게 된다. 그 결과, 표적 세포 내의 프로바이러스는 관심있는 유전자를 발현하는 하나의 LTR 만을 포함하게 된다.

동일한 원리를 이용하여, Cre/loxP 시스템은 레트로바이러스 벡터내의 서로 다른 서열을 결실시키는데 뿐만 아니라 패키지되는 세포 내의 헬퍼 컨스트럭트 중 일부분을 결실시키는데 이용될 수 있다. Cre/loxP 시스템의 또 다른 응용은 바이러스 DNA가 표적 세포의 염색체 내로 통합된 후, 레트로바이러스 벡터로 부터 선별 마커를 결실시키는 데 이용될 수 있다는 것이다. 상기 선별 마커는 벡터 내에 내포됨으로써 벡터 DNA로 트랜스펙션된 헬퍼 세포가 선별될 수 있다. 선별 마커의 결실이 요망될 수 있는데, 선별 마커의 존재가 프로모터 간섭 또는 형질도입된 세포에 대한 면역반응을 유도할 수 있기 때문이다. 선별 마커의 결실이 선별 마커 유전자가 측면에 접한 2개의 loxP 부위의 삽입에 의해 이루어진다. 벡터가 감염에 의해 표적 세포내로 도입된 후, 표적 세포는 Cre 리콤비나아제를 발현하는 또 다른 벡터로 감염된다. 이후 상기 Cre 리콤비나아제는 선별 마커를 포함하는 상기 2개의 loxP 부위 사이에서 서열을 결실시킨다. 그 결과, 최종 프로바이러스는 관심있는 유전자만을 발현시킨다.

#### D. 자체-비활성화 및 자체-활성화 벡터

유전자 산물의 특성 및 효과에 따라서, 헬퍼 세포내에 불활성화된 관심있는 유전자를 지니고 상기 유전자 산물이 표적 세포에 운반된 후 이러한 유전자가 활성화되는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 관심있는 유전자로부터의 산물이 세포독성이 있다면, 이후 헬퍼 세포 내에서 유전자를 발현시키는 것이 유독성을 초래할 것이고 대부분은 바이러스 생산을 감소시키거나 생성되지 못하게 할 것이다. 일련의 벡터는 유전자 운반 도중에 동시에 유통으로 유전자를 활성화시키고 벡터를 불활성화시키도록 만들어졌다. 이것은 역전사 도중에 직접적으로 반복된 서열의 빈번한 결실에 의해 이루어진다. 직접적으로 반복된 서열이 바이러스 내에 존재한다면, 상기 직접 반복 서열 중 한 카피 및 2개의 반복체들 사이의 모든 서열이 역전사 도중에 높은 빈도로 결실될 수 있다. 역전사효소의 이러한 특성은 자체-활성화 및 자체-비활성화 레트로바이러스 벡터를 생산하기 위해 이용된다.

#### E. 특이 세포를 표적화된 벡터

유전자 치료전문가의 중요한 목표는 특이 세포 유형 또는 조직에 대하여 유전자 운반을 표적화하는 수단을 개발하는 것이다. 적어도 2가지 전략이 레트로바이러스 벡터를 이용한 유전자 운반을 표적화시키기 위한 노력에 사용되어 왔다. 한가지 전략은 바이러스의 숙주 세포로의 진입 시점에 세포-유형-특이적 수용체와 상호작용하는 천연 또는 유전자적으로 조작된 외피 단백질을 이용하여 유전자 운반이 조절되도록 디자인된다. 또 다른 전략은 조직-특이적 프로모터를 이용함으로써 특이 유형 세포 내에서 치료 유전자의 발현이 조절되도록 디자인된다.

#### F. 세포-유형-특이적 프로포터를 이용하는 벡터

특정 조직 내에서 활성화되거나 특정 반응시약에 반응하는 프로모터가 관심있는 유전자의 발현을 조절하기 위하여 사용될 수 있다. 이러한 프로모터는 레트로바이러스 벡터의 LTR들 사이에 삽입될 수 있다. 대안적으로, 조절된 프로모터가 U3 지역 내의 바이러스 프로모터를 대체하기 위하여 사용될 수 있다. 내부 조직-특이적 프로모터를 지니는 레트로바이러스 벡터 디자인은 내부 프로모터를 포함하는 다른 레트로바이러스 벡터의 디자인과

유사하다.

### 바이러스 숙주 범위

1. 외피 선택 및 바이러스 숙주 범위에 대한 고려사항. 바이러스 외피 단백질의 특성이 특정 바이러스가 표적 세포에 진입할 수 있는지를 결정한다. 따라서, (위에서 논의한 바와 같이) 바이러스 생산에 사용될 외피 단백질의 선택 전에 표적 세포가 올바른 세포 표면 수용체를 가지는지 여부를 고려하는 것이 중요하다.

본원발명에 따른 레트로바이러스 백터 입자는 또한 천천히-분열하는 세포, 및 MLV와 같은 비-렌티바이러스가 효율적으로 형질도입될 수 없을 수 있는 세포에 형질도입될 수 있을 것이다. 특정 종양 세포를 포함하는 천천히-분열하는 세포는 약 3 내지 4일에 한번 분열한다. 종양이 빠르게 분열하는 세포를 포함할지라도, 몇몇 종양 세포는 특이적으로 종양의 중간에 존재하는 세포이고, 드물게 분열한다. 대안으로, 표적 세포는 종양 덩어리의 중심부에 존재하는 세포와 같이 세포분열을 겪을 수 있는 성장-지체된 세포 또는 혈액 줄기 세포와 같은 줄기 세포 또는 CD34-양성 세포일 수 있다. 추가 대안으로서, 표적 세포는 단핵구 전구체, CD33-양성 세포, 또는 골수 전구체와 같은 분화된 세포의 전구체일 수 있다. 추가 대안으로서, 표적 세포는 뉴런, 성상세포, 교세포 (glial cell), 미세교세포, 대식세포, 단핵구, 상피 세포, 내피 세포 또는 간세포와 같은 분화된 세포일 수 있다. 표적 세포는 개개의 사람으로부터 분리된 후 시험판내에서 형질도입되거나 생체내에서 직접적으로 형질도입될 수 있다.

### 아데노바이러스로부터 유래한 백터

아데노바이러스는 2종 가닥의, 선형 DNA 바이러스인데, RNA 중간체를 거치지 않는다. 50종 이상의 서로 다른 아데노바이러스 사람 혈청형이 존재하는데, 거의 유사한 유전자 구조를 나타내는 유전자 서열 상동성에 근거하여 6개의 하위그룹으로 구분된다. 사람 아데노바이러스 그룹 C 혈청형 2 및 5(95% 서열 상동성을 지님)가 아데노바이러스 백터 시스템에 가장 일반적으로 사용되며, 일반적으로 젊은 사람에서의 상부 기도(upper respiratory tract) 감염과 연관되어 있다.

본원발명의 아데노바이러스/아데노바이러스 백터는 사람 또는 동물에서 기원할 수 있다. 사람 기원의 아데노바이러스와 관련하여, 바람직한 아데노바이러스는 그룹 C로 분류된 아데노바이러스, 특히 제2형(Ad2), 제5형(Ad5), 제7형(Ad7) 또는 제12형(Ad12) 아데노바이러스가 바람직하다. Ad2 또는 Ad5 아데노바이러스가 더 바람직하다. 동물 기원의 다양한 아데노바이러스들 중에서, 마우스 아데노바이러스 또는 CELO 바이러스와 같은 조류 아데노바이러스(Cotton *et al.*, 1993, J Virol)가 이용될 수 있다. 동물 아데노바이러스와 관련하여, 개과 동물 기원의 아데노바이러스, 특히 CAV2 아데노바이러스 종[예를 들어, 맨하탄 종 또는 A26/61(ATCC VR-80Q)]가 바람직하다. 그 외 동물 기원의 아데노바이러스들은 본원의 참고로서 여기에 통합된 PCT 국제출원 WO-A-94/26914호에 인용된 아데노바이러스들을 포함한다.

위에 언급한 바와 같이, 아데노바이러스 계놈의 구조는 모든 아데노바이러스 그룹에서 유사하며, 특이적 기능은 일반적으로 연구된 각각의 혈청형에서 동일한 위치에 자리하고 있다. 아데노바이러스의 계놈은 각 말단에 역전된 말단 반복부(ITR), 캡시드화 서열(Psi), 초기 유전자 및 후기 유전자를 포함한다. 주요한 초기 유전자들은 중간 초기(E1a), 지연된 초기(E1b, E2a, E2b, E3 및 E4), 및 중간 지역의 배열로 구별되어 왔다. 이러한 지역들 중에서, 특히 E1 지역내에 포함된 유전자들이 바이러스 증식에 필요하다. 주요한 후기 유전자들은 L1 내지 L5 지역에 포함되어 있다. Ad5 아데노바이러스의 계놈은 완전하게 서열분석되어 있으며 데이터베이스에서 이용할 수 있다(참조: 특히 진뱅크(Genebank) 접근 번호 M73260). 게다가, 그 외 다른 아데노바이러스 계놈의 일부분, 또는 심지어 모든 계놈(예를 들어, Ad2, Ad7, Ad12)이 또한 서열분석되어 있다.

재조합 백터로의 사용을 위하여, 아데노바이러스는 일반적으로 감염된 세포내에서의 복제가 불가능하도록 변형된다.

따라서, 본 발명이 속하는 종래기술 분야에 기재된 컨스트럭트는 바이러스 복제에 필수적인, E1 지역이 결실된 아데노바이러스를 포함하는데, 이종 DNA 서열이 상기 결실된 E1 지역에 삽입된다(Levrero *et al.*, 1991, Gene 101: 195; Gosh-Choudhury *et al.*, 1986, Gene 50: 161). 더욱이, 백터의 특성을 개선하기 위하여, 그 외 다른 결실 또는 변형을 아데노바이러스 계놈 내에 형성시키는 것이 제안되었다. 따라서, 열-민감 점 돌연변이가 ts125 돌연변이체에 도입되었는데, 상기 돌연변이는 72kDa DNA-결합 단백질(DBP)이 비활성화되게 한다. 바람직하게는, 본 발명의 재조합 아데노바이러스 백터는 백터 계놈의 E1 지역에 결실을 내포한다. 보다 구체적으로, 상기 백터는 E1a 및 E1b 지역에 결실을 내포한다. 특이 바람직한 양상에 따르면, 상기 E1 지역은 Ad5 아데노바이러스 서열(진뱅크 접근 번호 M73260)내에 뉴클레오티드 454로부터 뉴클레오티드 3328까지 걸쳐있는 PvuII-

BgHI 단편의 결실에 의해 비활성화된다. 또 다른 바람직한 구체예에서, E1 지역은 뉴클레오티드 382로부터 뉴클레오티드 3446까지 걸쳐있는 HinflII-Sau3A 단편의 결실에 의해 비활성화된다.

그 외 아데노바이러스 벡터는 바이러스 복제 및/또는 증식에 필수적인 또 다른 지역인 E4 지역의 결실을 내포한다. 상기 E4 지역은 후기 유전자의 발현 조절, 후기 핵 RNA의 안정, 숙주세포 단백질 발현 감소 및 바이러스 DNA 복제 효율에 관여한다. E1 및 E4 지역 결실된 아데노바이러스 벡터는 따라서 매우 감소된 바이러스 유전자 발현 및 전사 백그라운드 노이즈를 나타낸다. 이러한 벡터들은, 예를 들어, PCT 국제공개공보 WO-A-94/28152호, WO-A-95/02697호, WO-A-96/22378호에 기재되어 있다. 또한, IVa2 유전자의 변형을 내포한 벡터는 또한 PCT 국제공개공보 WO-A-96/10088호에 기재되어 있다.

바람직한 변종에 따라서, 본 발명에 이용된 재조합 아데노바이러스 벡터는, 또한 이의 계놈의 E4 지역DP 결실을 포함한다. 보다 구체적으로, E4 지역의 결실은 모든 개방해독틀에 영향을 미친다. 뉴클레오티드 33466 내지 35535 또는 33093 내지 35535의 결실이, 정확인 일예로서 언급될 수 있다. 특히, 바람직한 벡터는 E4 지역 전체의 결실을 내포한다. 이것은 뉴클레오티드 35835-32720에 상당하는 MaeII-MscI 단편의 결실 또는 절단을 가져오게 될 수 있다. E4 지역의 다른 유형의 결실은, 본원의 참조로서 여기에 통합되어 있는, PCT 국제공개공보 WO-A-95/02697호 및 WO-A-96/22378호에 기재되어 있다.

대안으로, 단지 E4의 기능성 부분만이 결실된다. 상기 부분은 적어도 ORF3 및 ORF6 프레임을 포함한다. 일예로서, 이러한 코딩 프레임들은 각각 뉴클레오티드 34801-34329 및 34115-33126에 대응하는 PvuII-AluI 단편 및 BglII-PvuII 단편의 형태로 계놈으로부터 결실될 수 있다. 본 발명의 프레임에 속하는, 바이러스 Ad2 d1808 또는 Ad5 d11004, Ad5 d11007, Ad5 d11011 또는 Ad5 d11014의 E4 지역에 대한 결실이 또한 이용될 수 있다.

위에서 제시된 위치들은 공개 및 데이터베이스에서 접근가능한 야생형 Ad5 아데노바이러스 서열을 의미한다. 다양한 아데노바이러스 혈청형들 사이에 사소한 변이가 존재할 수 있지만, 일반적으로 이러한 위치들은 임의의 혈청형으로부터, 특히 아데노바이러스 Ad2 및 Ad7로부터의 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스의 구축에 적용될 수 있다.

더욱이, 생산된 아데노바이러스들은 그들의 계놈에 기타 변형을 보유할 수 있다. 특히, 그 외 다른 지역들이 바이러스의 용량을 증가시키기 위해서 결실될 수 있으며, 바이러스 유전자 발현과 연계된 이의 부작용을 줄이기 위하여 결실될 수 있다. 따라서, E3 또는 특히 IVa2 지역의 전부 또는 일부가 결실될 수 있다. E3 지역과 관련해서, 그러나 gp19K 단백질을 엔코딩하는 부분을 보존시키는 것이 특히 바람직할 수 있다. 상기 단백질은 실제로 다음과 같이 아데노바이러스 벡터가 (i) 상기 단백질의 활동을 제한할 것이며, (ii) 상당한 부작용을 가질 수 있는 면역 반응의 목적물이 되는 것을 막는다. 특이적 양상에 따라, 상기 E3 지역이 결실되고 gp19K 단백질을 엔코딩하는 서열은 이종 프로모터의 조절하에서 제도입된다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드/NOI가 재조합 계놈의 다양한 부위로 삽입될 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 결실된 서열 또는 잉여 서열을 대체함으로써, E1, E3 또는 E4 지역 내로 삽입될 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 바이러스 생산을 위해 시스로(*in cis*) 필요한 서열(ITR 서열 및 캡시드화 서열)을 제외한, 임의의 다른 부위 내로 삽입될 수 있다.

E2 지역 72kDa DNA 결합 단백질, DNA 폴리머라아제 및 DNA 합성을 개시하기 위한 단백질 프라이밍에 필요한 55kDa 말단 단백질(Terminal protein, TP)의 80kDa 전구체를 엔코딩하기 때문에 필수적이다.

보다 더 결함이 있는 바이러스를 만들기 위한 대안적인 접근법은 바이러스 복제에 필요한 말단 반복체만을 완전히 유지시키면서 바이러스의 "계놈을 제거(gut)"시키는 것이다. "계놈이 제거된(gutted)" 또는 "거의 모든 계놈이 제거된(gutless)" 바이러스들은 293 세포주에서 제1 세대 헬퍼 바이러스와 함께 고 역가로 증식할 수 있다.

재조합 아데노바이러스들은 전형적으로 캡시드화 세포주에서 생산되는데, 상기 세포주는 재조합 아데노바이러스 계놈에서 결함이 있는 하나 이상의 기능을 트랜스(*in trans*)로 보완시켜 줄 수 있는 세포주이다. 이러한 세포주들 중 하나가, 예를 들어, 293 세포주인데, 아데노바이러스 계놈의 일부가 상기 세포주내로 통합된다. 보다 더 정확하게는, 293 세포주는, 좌측 LTR, 캡시드화 지역, E1 지역(E1a 및 E1b를 포함), 단백질 pIX를 엔코딩하는 지역 및 단백질 pIVa2를 엔코딩하는 지역의 일부를 포함하는, 혈청형 5 아데노바이러스(Ad5) 계놈의 왼쪽 말단(약 11-12%)을 내포하는 사람 신장 배아 세포주이다. 이 세포주는 E1 지역, 다시 말하자면, E1 지역의 전부 또는 일부가 결실된 재조합 아데노바이러스를 트랜스컴플리션(transcompletion)할 수 있으며, 고역가를 지닌 바이러스 스톤을 생산할 수 있다. 이 세포주는 또한 증식허용온도(permissive temperature)(32°C)에서, 추가적으

로, 열-민감 E2 돌연변이를 내포하는, 바이러스 스톡을 생산할 수 있다.

E1 지역을 보완할 수 있는 그 외 세포주들이 개시되어 있는데, 이들은 특히 사람 폐 암세포 A549(PCT 국제특허 공개공보 WO-A-94/28152호) 또는 사람 망막아세포(Hum. Gen. Ther. (1996) 215)에 기초하고 있다. 더욱이, 일부 아데노바이러스 기능을 트랜스컴플리션할 수 있는 세포주들이 개시되어 있는데, 예를 들어, E1 및 E4 지역을 보완하는 세포주(Yeh *et al*, 1996, J. Virol. 70: 559; Krougliak *et al*, 1995, Hum. Gen. Ther. 6: 1575) 그리고 E1 및 E2 지역을 보완하는 세포주(PCT 국제특허공개공보 WO-A-94/28152호, WO-A-95/02697호, WO-A-95/27071호)가 있다.

재조합 아데노바이러스들은 일반적으로 바이러스 DNA를 캡시드화 세포주로 도입시킴으로써 생산되는데, 도입후 상기 세포주는 약 2 또는 3일후에 용균된다(아데노바이러스 주기의 속도(kinetics)는 24 내지 36 시간임). 상기 과정이 진행되는 동안, 세포에 트랜스펙션된, 도입된 바이러스 DNA는 완전한 재조합 바이러스 게놈이 될 수 있으며, 선택적으로 박테리아(PCT 국제공개공보 WO-A-96/25506호) 또는 효모(PCT 국제공개공보 WO-A-95/03400호)에서 구성될 수 있다. 또한 재조합 바이러스가 캡시드화 세포주를 감염시키는데 이용될 수 있다. 바이러스 DNA는 또한 재조합 바이러스 게놈의 일부 및 상동성 지역을 나르는 각 단편들의 형태로 도입될 수 있는데, 상기 단편들은, 캡시드화 세포로 도입후, 다양한 단편들 사이의 상동성 재조합에 의하여 재조합 바이러스 게놈을 재구성하는 것이 가능하다.

복제능력이 있는 아데노바이러스는 또한 유전자 치료법에 이용될 수 있다. 예를 들어, E1a 유전자는 종양-특이적 프로모터의 조절하에서 제 1세대 바이러스로 삽입될 수 있다. 이론적으로, 종양내로 바이러스의 주입후, 상기 유전자는 종양내에서 특이적으로 복제될 수 있으나 주변 정상 세포에서는 복제될 수 없다. 이러한 유형의 벡터는 용균에 의해 직접적으로 종양 세포를 사멸시키거나 갠시클로비르(ganciclovir) 처리후 감염된 세포 및 방관자 세포를 사멸시킬 수 있는 단순 포진 바이러스 티미딘-키나아제 유전자(HSV tk)와 같은 "자살 유전자"를 운반하기 위해 이용될 수 있다.

따라서, 본원발명의 HRE 컨스트럭트가 수많은 고형 종양 덩어리 내에 존재하는 저산소(hypoxic) 상태로 인하여 특정 종양 조직내에서 우선적으로 활성화될 수 있는 조건이 주어진다면, 본원발명은 아데노바이러스 E1a 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 본원발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 아데노바이러스 벡터를 제공한다. HRE 인핸서 조절하의 E1a 폴리펩티드는 저산소 상태에서만 발현될 수 있으며 따라서 아데노바이러스는 저산소 상태에서만 복제능력을 발휘할 수 것이다. 아데노바이러스는 내생성 E1 유전자가 결여되어 있으며, 바람직하게는 내생성 E3 유전자도 결여되어 있다. 결실될 수 있는 그 외 아데노바이러스 게놈의 지역은 위에 기재되어 있다. 숙주세포 면역반응 조절(modulation)이 적합한 종양내부에서의 바이러스 전파 및 감염된 세포에 대한 면역 반응이 획득될 수 있도록 균형을 이루게 하는 그러한 저산소증(hypoxia) 반응 인자의 조절하에서 E3 유전자의 전부 또는 일부를 포함하는 것이 바람직할 수도 있다. E1b에만 결함이 있는 아데노바이러스는 임상 제 1기의 항종양 치료에 특이적으로 이용되어 왔다.

E1b에 의해 엔코딩되는 폴리펩티드들은 p53-매개 아폽토시스를 방해할 수 있는데, 이것은 세포가 바이러스 감염에 반응하여 스스로 사멸되는 것을 막는다. 따라서, 정상 비종양 세포에서, E1b의 부재시, 바이러스는 아폽토시스를 방해할 수 없으며 따라서 감염성있는 바이러스의 생산 및 전파는 불가능하다. p53에 결함이 있는 종양 세포에서, E1b 결함 바이러스는 인접 p53-결함 종양 세포에서 성장 및 전파가 가능하나 정상세포에서는 불가능하다. 게다가 또, 이러한 유형의 벡터는 또한 치료 유전자, 예를 들어, HSV tk를 운반하는데 이용될 수도 있다.

결과적으로, 본원발명의 E1a-발현 아데노바이러스들은 기능성 E1b 유전자가 결여되는 것이 바람직하다.

그 외 필수적인 바이러스 유전자들이 또한 저산소증 반응성 조절 인자의 조절하에 놓여질 수 있다

#### 단순 포진 바이러스로부터 유래한 벡터

##### 1. 바이러스 종

본원발명의 HSV 벡터는, 예를 들어, HSV1 또는 HSV2 종, 또는 이의 파생체(derivatives), 바람직하게는 HSV1로부터 유래할 수 있다. 파생체는 HSV1 및 HSV2 종에서 유래한 DNA를 내포하는 유형간(inter-type) 재조합체를 포함한다. 파생체는 바람직하게는 HSV1 또는 HSV2 게놈 중 어느 하나와 70% 이상의 서열 상동성, 보다 바람직하게는 90% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 지닌다.

치료 과정에서 HSV 종의 사용은 이들이 용균 주기를 구축할 수 없도록 약독화(attenuation)시킨 종을 필요로 할 것이다. 특히, HSV 벡터가 사람을 대상으로 한 유전자 치료법에서 사용되는 경우라면, 폴리뉴클레오티드는 바

람직하게는 필수적인 유전자내로 삽입되어야 한다. 이것은 벡터 바이러스가 야생형 바이러스와 조우하게 되면, 재조합에 의해 야생형 바이러스로 이종 유전자의 전이가 일어나기 때문이다. 그러나 폴리뉴클레오티드가 필수적인 유전자내로 삽입되는 한, 이러한 재조합성 전이는 또한 수령 바이러스내의 필수적인 유전자를 결실시킬 것이고 복제 능력있는 야생형 바이러스 개체군으로의 이종 유전자의 '이탈(escape)'이 방지될 것이다.

본원에서 단지 일례로서 제시된 것이지만, 약독화된 종은 본원발명의 HSV 종을 생산하기 위해 이용될 수 있는데, ICP34.5 또는 ICP27 중 어느 하나에 다수의 돌연변이를 지니는 종을 포함하며, 이러한 종에는 예를 들어, 1716 종(MacLean *et al.*, 1991, J Gen Virol 72: 632-639), R3616과 R4009 종(Chou and Roizman, 1992, PNAS 89: 3266-3270) 및 R930(Chou *et al.*, 1994, J. Virol 68: 8304-8311)(상기 종 모두는 ICP34.5 내에 다수의 돌연변이를 지님), 그리고 ICP27에 하나의 결실을 지니는 d27-1(Rice and Knipe, 1990, J. Virol 64: 1704-1715)이 있다. 대안적으로 VMW65에 비활성화 돌연변이를 지니거나, 상기 돌연변이들의 임의의 조합을 지니는 ICP4, ICP0, ICP22, ICP6, ICP47, vhs 또는 gH에서 결실이 일어난 종이 또한 본원발명의 HSV 종을 생산하기 위해 이용될 수 있다.

다양한 HSV 유전자들을 설명하는데 사용된 용어는 다음 참고문헌에 기재된 용어이다(Coffin and Latchman, 1996. Herpes simplex virus-based vectors. In: Latchman DS (ed). Genetic manipulation of the nervous system. Academic Press: London, pp 99-114).

## 2. 보완 세포주(Complementing cell lines)

ICP27에 결함이 있는 HSV 바이러스들은 ICP27를 발현하는 세포주, 예를 들어, V27 세포(Rice and Knipe, 1990, J. Virol 64: 1704-1715) 또는 2-2 세포(Smith *et al.*, 1992, Virology 186: 74-86)에서 증식된다. ICP27-발현 세포주들은 포유동물 세포(예를 들어, Vero 또는 BHK 세포)를 상기 세포 내에서 발현될 수 있는 기능성 HSV ICP27 유전자를 포함하는 벡터(바람직하게는 플라스미드 벡터) 및 선별 마커, 예를 들어, 네오마이신 내성 선별 마커를 엔코딩하는 벡터(바람직하게는 플라스미드 벡터)를 이용하여 코트랜스펙션시킴으로써 생산될 수 있다. 선별 마커를 보유한 클론들은 이후 본원발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법(예: 라이스 및 니페의 논문에 소개된 방법(Rice and Knipe, 1990))을 이용하여, 예를 들어, HSV 종의 ICP27<sup>-</sup> 돌연변이체의 성장을 보조하는 이들의 능력에 기초하여, 어느 클론이 기능성 ICP27를 발현하는지 여부를 추가로 스크리닝받게 된다.

HSV 종의 ICP27<sup>-</sup> 돌연변이체의 기능성 ICP27를 지니는 종으로의 전환을 허용하지 않는 세포주는 위에 기재한 바와 같이 생산되는데, 이는 기능성 ICP27 유전자를 포함하는 벡터가 ICP27<sup>-</sup> 돌연변이체 바이러스내에 남아 있는 서열과 중첩되는(즉, 상기 서열에 상동성이 있는) 서열을 포함하지 않는다는 것을 보장한다.

본원발명의 HSV 종이 그 외 필수적인 유전자, 예를 들어, ICP4에서 비활성화 변형을 포함하는 경우, 보완 세포주들은 ICP27와 관련하여 기재된 바와 동일한 방식으로 변형된 필수적인 유전자를 보완하는 기능성 HSV 유전자를 추가로 포함할 것이다.

## 3. 돌연변이의 방법

HSV 유전자들은 본원발명이 속하는 기술분야에 널리 공지된 몇몇 기술에 의해 기능적으로 비활성화되어 질 수 있다. 예를 들어, 이러한 유전자들은 결실, 치환 또는 삽입, 바람직하게는 결실에 의해 기능적으로 비활성화될 수 있다. 결실은 유전자들의 일부분 또는 전체 유전자를 제거시킬 수 있다. 삽입된 서열은 위에 기재된 발현 카세트를 포함할 수 있다.

HSV 종내의 돌연변이들은 본원발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 상동성 재조합 방법에 의해 행해진다. 예를 들어, HSV 계놈 DNA가 측면이 상동성 HSV 서열들로 접해진 돌연변이된 서열을 포함하는 벡터(바람직하게는 플라스미드 벡터)와 함께 트랜스펙션된다. 상기 돌연변이된 서열은 결실, 삽입 또는 치환을 포함할 수 있는데, 이를 모두는 일반적인 기술에 의해 이루어질 수 있다. 삽입은 선별 마커 유전자, 예를 들어, β-갈락토시다아제 활성에 의해 재조합 바이러스들을 스크리닝하는 lacZ를 포함할 수 있다.

돌연변이들은 그 외 HSV 유전자들, 예를 들어, ICPO, ICP4, ICP6, ICP22, ICP47, VMW65, gH 또는 vhs와 같은 유전자들에서 만들어질 수 있다. VMW65 유전자의 경우, 전체 유전자가 결실되지 않는데, 이는 상기 유전자가 필수적인 구조 단백질을 엔코딩하기 때문이며, 그러나 소규모 비활성화 삽입은 IE 유전자들을 전사적으로 활성화시키는 VMW65의 활성의 완전한 파괴를 조장한다(Ace *et al.*, 1989, J Virol 63: 2260-2269).

#### 4. 본원발명에 따른 도입유전자 및 miRNA를 포함하는 HSV 종

본원발명의 도입유전자 및 마이크로RNA는 바이러스가 여전히 증식될 수 있음을 전제로 HSV 게놈의 임의의 위치로 삽입될 수 있는데, 상기 바이러스는 NOI가 필수적인 유전자내로 삽입되는 경우 HSV의 또 다른 필수적인 유전자(상기 2.에서 기재된 바와 같이)를 운반하는 세포주의 사용을 필요로 할 수 있다.

본원발명의 서열은 돌연변이 도입과 관련하여 위에 기재된 바와 같이, 예를 들어, HSV 서열로 측면이 접해진 발현 카세트를 운반하는 플라스미드 벡터와 HSV 종의 상동성 재조합에 의해 HSV 게놈 내로 삽입될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 본원발명이 속하는 기술분야에 널리 공지된 클로닝 기술을 이용하여 HSV 서열을 포함하는 적당한 플라스미드 벡터로 도입될 수 있다.

#### 그 외 바이러스성 벡터

본원발명에서 이용될 수 있는 그 외 바이러스성 벡터는 아데노부속바이러스, 수포성구내염 바이러스, 백시니아바이러스 및 SV-40-기반 바이러스성 벡터를 포함한다.

#### 투여

miRNA 및 도입유전자는 환자에게 투여될 수 있거나 형질전환 식물 또는 사람이 아닌 동물을 생산하는데 사용될 수 있다. 용어 "투여된"은 바이러스성 또는 비바이러스성 기술에 의한 운반을 포함한다. 바이러스 운반 메카니즘은 위에 기재한 바와 같이 아데노바이러스 벡터, 아데노부속바이러스(AAV) 벡터, 헤르페스바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 및 배콜로바이러스성 벡터 등을 포함하나, 이에만 제한되는 것은 아니다. 비바이러스성 운반 메카니즘은 지질 매개 트랜스펙션, 리포좀, 면역리포좀, 리포펙틴, 양이온성 표면 양친매물질 및 이의 조합물을 포함한다.

#### 질병

본원발명에 따른 벡터 시스템에 의한 하나 이상의 치료 유전자들의 운반은 단독으로 또는 그 외 치료제들과 병용하여 또는 치료제의 구성성분으로서 사용될 수 있다.

예를 들어, 본원발명의 벡터는 PCT 국제공개공보 WO-A-98/05635호에 그 목록이 나열된 질병들의 치료에 유용한 하나 이상의 도입유전자들을 운반하는데 이용될 수 있다. 참조의 편이를 위하여, 상기 목록의 일부가 지금부터 제공된다: 암, 염증 또는 염증성 질환, 피부 질환, 발열, 심혈관 영향, 출혈, 응고 및 급성기 반응, 악액질, 식욕 부진, 급성 감염, HIV 감염, 기절(shock) 상태, 이식편 대 숙주 반응, 자가 면역 질환, 재관류 손상, 수막염, 편두통 및 아스피린-의존성 항-혈전증; 종양 성장, 침입 및 확산, 신생혈관형성, 전이, 악성종양, 복수(ascites) 및 악성흉막삼출(malignant pleural effusion); 대뇌 허혈, 허혈성 심장질환, 골관절염, 류마티스 관절염, 골다공증, 천식, 다발성 경화증, 신경퇴화(neurodegeneration), 알츠하이머병, 죽상 동맥 경화증, 뇌졸중, 맥관염, 크론병과 궤양성 대장염; 치주염, 치은염; 건선, 아토피성 피부염, 만성 궤양, 수포성 표피박리증; 각막 궤양형성, 망막증과 외파의 창상치유; 비염, 알레르기성 결막염, 습진, 아나필락시스; 재협착, 울혈성 심부전, 자궁 내막증, 죽상 동맥 경화증 또는 혈관내경화증(endosclerosis).

이 이외에, 또는 대안으로, 본원발명의 벡터는 PCT 국제공개공보 WO-A-98/07859호에 목록이 나열된 질병의 치료에 유용한 하나 이상의 도입유전자(들)을 운반하는데 이용될 수 있다. 참조의 편이를 위하여, 상기 목록의 일부가 지금부터 제공된다: 이에는 사이토킨 및 세포 증식/분화 활성; 면역억제 또는 면역자극 활성(예를 들어, 인간 면역결핍 바이러스에 의한 감염을 포함하는, 면역 결핍 치료를 위한 활성; 림프구 성장 조절을 위한 활성; 암과 다수의 자가면역질환의 치료를 위한 활성; 및 장기이식 거부반응 방지하거나 종양 면역성을 유발하기 위한 활성); 조혈작용의 조절, 예를 들어, 골수성 또는 림프구성 질환의 치료; 예를 들어, 상처 치유, 화상, 궤양 및 치주질환 및 신경퇴화의 치료를 위한 뼈, 연골, 아킬레스건(tendon), 인대(ligament)와 신경조직의 성장 촉진; 여포 자극 호르몬(수정능력의 변조)의 억제 또는 활성화(수정력을 변화시킴); 화학주성(chemotactic)/화학운동성(chemokinetic) 활성(예를 들어, 상처 또는 감염 부위로 특이 유형의 세포들을 이동시키는 활성); 지혈성(haemostatic) 및 혈전용해성(hrombolytic) 활성(예를 들어, 혈우병과 뇌졸증을 치료하기 위한 활성); 항염증 활성(예를 들어, 패혈성 쇼크 또는 크론병을 예를 들면 치료하기 위한 활성); 항균제; 대사 또는 행동 등의 조절제; 진통제; 특이한 결핍 장애의 치료; 인간의학 또는 수의학에서 건선 등의 치료가 포함된다.

이 외에, 또는 대안으로, 본원발명의 레트로바이러스 벡터는 PCT 국제공개공보 WO-A-98/09985호에 목록이 나열된 질병의 치료에 유용한 하나 이상의 도입유전자(들)을 운반하는데 이용될 수 있다. 참조의 편이를 위하여, 상기 목록의 일부가 지금부터 제공된다: 상기 목록에는 대식세포 억제 및/또는 T 세포 억제 활성 및 그 결과,

항-염증 활성; 항-면역 활성, 즉 세포성 및/또는 체액성 면역 반응에 대한 억제 효과(염증과 관련이 없는 반응을 포함함); T 세포에서 상향-조절된 파스(fas) 수용체 발현 뿐만 아니라, 세포외 기질 성분 및 피브로네틴에 고착되는 대식세포 및 T세포의 활성 억제; 류마티스 관절염을 포함하는 관절염, 과민증과 관련된 염증, 알레르기성 반응, 천식, 전신성 홍반성 루푸스, 교원병(collagen diseases) 및 그 외 자가면역질환, 아테롬성 동맥경화증과 관련된 염증, 동맥경화, 동맥경화성 심장 질환, 재판류 손상, 심정지, 심근경색증, 맥관 염증성 질환, 호흡 곤란 증후군 또는 그 외 심폐 질환, 소화성 궤양과 관련된 염증, 궤양성 대장염 및 그 외 위장관 질환, 간섬유증, 간경화 또는 그 외 간 질환, 갑상선염 또는 그 외 선성(glandular) 질환, 사구체신염 또는 그 외 신장 및 요로성(urologic) 질환, 이염(otitis) 또는 그 외 이(oto)-비(rhino)-후두성(laryngological) 질환, 피부염 또는 그 외 피부 질환, 치주질환 또는 그 외 치아 질환, 고환염 또는 부고환염성 고환염(epididymo-orchitis), 불임, 오키드 트라우마(orchidal trauma) 또는 그 외 면역-관련 고환 질환, 태반 기능부전, 태반 부족, 습관성 유산, 자간증, 임신중독증 및 그 외 면역 및/또는 염증-관련 부인과(gynaecological) 질환, 후포도막염, 중간포도막염, 전포도막염, 결막염, 맥락망막염, 유베오레티니티스(uveoretinitis), 시신경염, 안구 내의 염증, 예를 들어, 망막염 또는 낭포황반부종(retinitis or cystoid macular oedema), 교감성 안염, 공막염, 색소성 망막염, 퇴행성 풍류 질환의 면역 및 염증 성분, 안외상(ocular trauma)의 염증 성분, 감염으로 유발된 안염증, 증식성 유리체-망막병증(proliferative vitreo-retinopathies), 급성 허혈성 시신경변증, 과도한 상흔(예를 들어, 녹내장 여과 수술(glaucoma filtration operation) 후의 상흔), 안구 이식 및 그 외 면역-관련 및 염증-관련 안질환에 대한 면역 반응 및/또는 염증반응, 자가면역질환 또는 병태 또는 장애와 관련된 염증(중추신경계(CNS), 임의의 기타 장기, 또는 상기 둘 모두에서, 면역 및/또는 염증 억제가 이로울 것임), 파킨슨병, 파킨슨의 치료에 따른 합병증 및/또는 부작용, AIDS-관련 치매 복합체 HIV-관련 뇌질환, 데뷔병, 시드넘 무도병, 알츠하이머병과 그 외 퇴행성 질환, 중추신경계의 병태 또는 장애, 스토크의 염증성 성분, 소아마비후 증후군, 정신장애의 면역성 및 염증성 성분, 척수염, 뇌염, 아급성 경화성 팬뇌염, 뇌척수염, 급성 신경병증, 아급성 신경병증, 만성 신경병증, 궤레인-바레(Guillain-Barre) 증후군, 시덴함(Sydenham) 무도병, 중증 근무력증, 가성 뇌종양(pseudo-tumour cerebri), 다운 증후군, 헌팅턴 병, 근위축성 측삭경화증, 중추신경계 압박 또는 중추신경계 트라우마 또는 중추신경계의 감염의 염증성 성분, 근위축증 및 근육실조증의 염증성 성분, 및 면역 및 염증 관련 질환, 중추신경계 및 말초신경계의 병태 또는 장애, 트마우마후 염증, 패혈증성 쇼크(septic shock), 감염성 질환, 수술의 염증성 합병증 또는 부작용, 골수 이식 또는 그 외 합병증 및/또는 부작용, 유전자 치료법(천연 또는 인공 세포, 조직 및 장기(예: 각막, 골수, 장기, 수정체, 페이스메이커, 천연 또는 인공 피부 조직)를 이식하는 경우에 이식 거부반응을 예방 및/또는 치료하기 위하여, 단핵구 또는 림프구의 양을 감소시킴으로써, 단핵구 또는 백혈구 증식성 질환(예를 들어, 백혈병)을 치료하거나 경감시키기 위한, 체액성 면역반응 및/또는 세포성 면역반응을 억제시키거나 저해시키기 위한, 유전자 치료법)의 염증성 및/또는 면역성 합병증 및 부작용(예를 들어, 바이러스 운반체에 의한 감염, 또는 AIDS와 관련된 염증에 기인함)을 포함하는 원치않는 면역 반응 및 염증의 억제가 제시되어 있다.

본원발명은 또한 유전자 치료법에 의하여 개체를 치료하기 위한 약제 조성물을 제공하는데, 상기 조성물은 하나 이상의 운반가능한 치료 및/또는 진단 도입유전자(들)을 포함하는 본원발명의 백터 또는 상기 백터에 의해 생산되거나 이로부터 획득된 바이러스 입자를 치료학적으로 유효한 양으로 포함한다. 상기약제 조성물은 사람 또는 동물에게 사용하기 위한 것일 수 있다. 일반적으로, 내과의사는 개별 환자에게 가장 적당한 실질적인 투여용량을 결정할 것이고, 이것은 연령, 체중 및 특정 개체의 반응에 따라 달라질 것이다.

조성물은 선택적으로 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 애주번트를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제의 선택은 의도된 투여 경로 및 표준 약제 관행에 따라 선택될 것이다. 약제 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제로서 또는 이외에, 임의의 적당한 결합제(들), 윤활제(들), 혼탁제(들), 코팅제(들), 용해제(들), 및 표적부위 표적부위로의 바이러스 진입을 보조하거나 증가시킬 수 있는 (예를 들어, 지질 운반 시스템과 같은) 그 외 운반체(carrier agents)를 포함할 수 있다.

적절한 경우, 약제 조성물은 다음 중 어느 하나 이상에 의해 투여될 수 있다: 흡입제, 좌약 또는 폐서리의 형태로, 로션, 용액, 크림, 연고 또는 가루 분말의 형태로 국소적으로, 피부 폐치를 사용함으로써, 전분 또는 젖당과 같은 부형제를 함유하는 정제의 형태로, 또는 단독으로 또는 부형제와 혼합된 캡슐 또는 소란(ovules)으로, 또는 착향제(flavouring agent) 또는 착색제를 포함하는 엘릭시르, 용액 또는 혼탁액의 형태로, 또는 이들은 비경구적으로, 예를 들어, 비내로(intracavernosally), 정맥내로, 근육내로 또는 경피로 투여될 수 있다. 비경구 투여의 경우, 조성물은 멸균된 수용성 용액의 형태로 사용되는 것이 가장 좋을 수 있는데, 상기 용액은 기타 물질들, 예를 들어, 상기 용액을 혈액과 등장인 용액으로 만들 수 있는 충분한 염제 또는 단당류를 포함할 수 있다. 구강 또는 설하 투여의 경우, 조성물은 통상적인 방법으로 제형화될 수 있는 정제 또는 로렌지(lozenges)

의 형태로 투여될 수 있다.

본원발명에 따른 벡터 시스템에 의하여 운반되는 하나 이상의 치료 유전자는 단독으로 또는 기타 치료제들 또는 치료제의 성분들과 함께 병용하여 사용될 수 있다. 치료될 수 있는 질병들은 다음을 포함하나, 이에만 한정되는 것은 아니다: 암, 신경성 질환, 유전병, 심장 질환, 발작, 관절염, 바이러스 감염 및 면역체계의 질환. 적당한 치료 유전자는 종양억제단백질, 효소, 전구약물 활성화 효소, 면역조절 분자, 항체, 조작된 면역글로불린-유사 분자, 융합 단백질, 호르몬, 막 단백질, 혈관작용성(vasoactive) 단백질 또는 웹티드, 사이토카인, 케모카인, 항-바이러스 단백질, 안티센스 RNA 및 리보자임을 코딩하는 유전자를 포함한다.

## 실시예

### 플라스미드 제작

본원에서 사용된 모든 miRNA의 서열은 miRNA 레지스트리로부터 획득하였다(Griffiths-Jones *et al.*, 2006) (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtml>). miRNA 표적(mirT) 서열은 다음과 같이 구성되었다:

4x.mir-142-3p.표적서열(mir-142-3pT)의 경우, 다음 올리고뉴클레오티드들이 어닐링되었다:

5' - CTAGAGTCGACTCCATAAAGTAGGAAACACTACACGATTCCATAAAGTAGGAAACACTACAACCGGT(S1),

5' - TGTAGTGTTCTACTTATGGAATCGTGTAGTGTTCCTACTTTATGGAGTCGACT(AS1),

5' - TCCATAAAGTAGGAAACACTACATCACTCCATAAAGTAGGAAACACTACAC(S2),

5' - TCGAGTGTAGTGTTCTACTTTATGGAGTGATGTAGTGTTCCTACTTTATGGAACCGGT(AS2).

이러한 올리고뉴클레오티드들의 라이게이션은 Xba I 및 Xho I 스틱키(sticky) 말단을 지닌 2종 가닥 DNA 단편을 생성시켰다. 밑줄이 쳐진 서열들은 특이적인 miRNA에 완전히 상보적이게 디자인된다. 어닐링된 올리고뉴클레오티드들을 pBluescript11.KS의 Xba I 및 Xho I 부위로 서브클로닝하였다. 그 결과 얻어진 벡터들을 연이어 Sac II 및 Kpn I, Nhe I 및 Age I, 또는 Sal I 중 어느 하나로 절단하였으며, mirT 단편을 분리하여 하기 수령 벡터의 적절한 부위에 라이게이션시켜 하기 벡터들을 제조하였다:

pCCL.sin.cPPT.PGK.GFP. WPRE에 라이게이션시켜

pCCL.sin.cPPT.PGK.GFP. WPRE.mirT를 제조;

pCCL-SmICPPT-PGKaS-GFPaS-CTEaS-PoIyAas에 라이게이션시켜

pCCL.sin.cPPT.PGKaS.GFPaS.mirTas.CTEas.polyAas 를 제조;

pCCL.sin.cPPT.PGK.  $\Delta$ LNGFR.WPRE에 라이게이션시켜

pCCL.sin.cPPT.PGK.  $\Delta$ LNGFR.mirT.WPRE를 제조;

pRRL.sin.cPPT.CMV.hFIX. WPRE에 라이게이션시켜

pRRL.sin.cPPT.CMV.hFIX. WPRE.mirT를 제조;

pRRL.sin.cPPT.ET.hFIX.WPRE에 라이게이션시켜

pRRL.sin.cPPT.ET.hFIX. WPRE.mirT를 제조;

pCCL.sin.cPPT.polyA.CTE.eGFP.minhCMV.hPGK.deltaNGFR.Wpre에

라이게이션시켜

pCCL.sin.cPPT.polyA.CTE.mirT.eGFP.minhCMV.hPGK.deltaNGFR.Wpre를 제조.

대규모 DNA 제조를 마링겐(Marlingen) 바이오사이언스(Biosciences) 무내독소(endotoxin-free) 고순도 플라스미드 최대 제조 시스템을 이용하여 수행하였다.

### 벡터 생산 및 역가측정(titration)

VSV-슈도타입화된 제 3세대 LV를 일시적 4-플라스미드 코트랜스펙션으로 293T 세포에서 생산하였고 문헌(De Palma and Naldini, 2002)에 기재된 바와 같이 초원심분리로 정제하였다. GFP의 발현 역가를 제한 희석 (limiting dilution)에 의해 293T 세포에서 측정하였다. 벡터 입자를 HIV-1 gag p24 항원 면역포획(NEN Life

Science 제품)에 의해 측정하였다. 모든 벡터의 경우, 농축된 벡터 발현 역가의 범위는  $0.15 - 1.5 \times 10^{10}$  형질 도입 유닛(transducing units)<sup>293T</sup>(TU)/ $\mu\text{l}$ 이었다.

### 세포 배양

293T 세포를 10% 우태아 혈청(FBS; Gibco) 및 폐니실린-스트렙토마이신 및 글루타민의 조합물이 보충된 이스코브(Iscove)의 변형된 둘베코(Dulbecco) 배지(IMDM; Sigma)에서 유지하였다. U937 단핵구 세포주를 상기와 같이 보증된 RPMI(완전 RPMI)에서 유지하였다. 사람 수지상 세포의 1차 배양물을 이전에 기재한 바와 같이 말초혈액으로부터 분리하고 GM-CSF 및 IL-4이 보충된 완전 RPMI(Bender *et al*, 1996)에서 유지하였다.

### DNA 및 RNA 추출

세포 및 조직으로부터의 DNA를 제조업자의 사용설명서에 따라 "블러드 & 셀 컬처 DNA 미디 키트(Qiagen, Hilden, Germany)"를 사용하여 추출하였다. 세포로부터의 RNA를 제조업자의 사용설명서에 따라 "트라이 시약(Tri Reagent)(Sigma, Saint Louis, Missouri)"을 사용하여 추출하였다.

### 노던 블랏

노던 블랏을 이전에 개시된 바와 같이 실행하였다(De Palma and Naldini, 2002). 총 RNA 20 마이크로그램을 로딩하였으며, <sup>32</sup>P로 표지된-GFP 프로브 100ng을 사용하였다.

### 벡터 복제수 정량

벡터 C/G를 실시간 PCR을 이용하여 정량하였는데, 마우스 조직으로부터 추출된 100ng의 주형 DNA 또는 세포주로부터 추출된 200ng의 주형 DNA를 출발물질로 사용하였다. 분석에 사용된 프라이머 및 프로브의 세트는 다음과 같다:

LV 벡본:

750nmol 정방향 프라이머(F): 5' - TGAAAGCGAAAGGGAAACCA - 3' ,

200nmol 역방향 프라이머(R): 5' - CCGTGCAGCTTCAG - 3' ,

200nmol 프로브(P): 5' - VIC - CTCTCTCGACGCAGGACT-MGB - 3' ;

젖과동물 게놈 DNA:  $\beta$ -액틴:

300nmol F: 5' - AGAGGGAAATCGTGCGTGAC - 3' ,

750nmol R: 5' - CAATAGTGATGACCTGGCCGT - 3' ,

200nmol P: 5' - VIC-CACTGCCGCATCCTCTTCCTCCC-MGB - 3' ;

사람 게놈 DNA: hTERT:

200nmol F: 5' - GGCACACGTGGCTTCG - 3' ,

600nmol R: 5' - GGTGAACTCGTAAGTTATGCAA - 3' ,

200nmol P: 5'-6FAM-TCAGGACGTGAGTGGACACGGTG-TAMRA - 3' .

표준 곡선과 관련하여 공지된 다수의 LV 통합(서던 블랏에 의해 결정됨)을 지닌 형질전환 마우스 또는 사람 세포주로부터의 연속 희석을 이용하였다. 반응을 애이비아이 프리즘 7900 에치티 서열 검출 시스템(ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System, Applied Biosystems)에서 3회 반복(triplicate)하여 실행하였다. C/G를 다음식에 의해 계산하였다:(ng LV/ng 내생성 DNA) X (표준 곡선에서의 LV 통합의 n°).

### 유전자 발현 분석

역전사를 RT-PCR용 수퍼스크립트 III 퍼스트-스트랜드 합성 시스템(Invitrogen, Carlsbad, CA)의 램덤 헥사머프로토콜을 이용하여 총 RNA 2 $\mu\text{g}$ 에 대하여 실행하였다. GFP mRNA의 농도를 정량하기 위하여 정량 PCR 분석을 실행하였으며, 표준화를 위하여 GAPDH 발현을 사용하였다. 다음과 같은 2 세트의 프라이머 및 프로브를 사용하였다:

GFP의 경우, 20X 애세이 온 디멘드(Assay on Demand, Applied Biosystems),

F: 5' - CAGCTCGCCGACCACTA - 3',

R: 5' - GGGCCGTCGCCGAT - 3' 및

P: 5' - 6FAM-CCAGCAGAACACCCCC-MGB - 3'; 및

GAPDH의 경우:

200nmol F: 5' - ACCACAGTCCATGCCATCACT - 3',

\*900nmol R: 5' - GGCCATCACGCCACAGSTT - 3' 및

200nmol P: 5' - TET-CCACCCAGAAGACTGTGGATGGCC-TAMRA - 3'.

반응을 에이비아이 프리즘 7900 애치티 서열 검출 시스템(Applied Biosystems)에서 3회 반복하여 실행하였다.

### miRNA 발현 분석

제조업자의 사용설명서에 따라 어플라이드 바이오시스템즈 태크만(Taqman) 마이크로RNA 애세이 시스템을 이용하여 miRNA 검출을 실행하였다. 결과를 has-mir-16에 대하여 표준화하였으며 let-7a를 캘리브레이터로 사용하였다. let-7a의 발현과 대비한 수치를 기록한다.

### 유체 세포측정(Flow Cytometry)

GFP 발현이 안정적인 상태에 도달되도록 하고 가상형질도입(pseudotransduction)이 배제되도록 하기 위하여 형도입된 293T 세포를 FACS 분석전에 14일 이상 배양하였다. FACS 분석전에, 고착된 세포를 0.05% 트립신-EDTA를 이용하여 떼어내고, 세척하고 2% FBS를 함유하는 PBS에 재현탁시켰다. 혼탁액 중에서 배양한 세포를 세척하고 2% FBS를 함유하는 PBS에 재현탁시켰다. 면역염색을 위하여, 세포  $10^5$  개를 4°C에서 15분간 PBS, 5% 인간 혈청, 2% FBS 중에서 블록킹시켰다. 블록킹시킨 후, R-피코에리트린(RPE)-접합 항체(항-ALNFR 또는 항-CD45, BD Pharmingen, San Diego, CA)를 첨가하고 세포를 4°C에서 30분간 인큐베이션하고, 세척하고, 베크만 쿰터 사이토믹스 에프씨500(Beckman Coulter Cytomics FC500, Beckman Coulter, Miami, FL) 상에서 2-색 유체 세포측정으로 분석하였다.

### 생체내 벡터 투여

6-8주령의 누드 및 Balb/c 마우스를 찰스 리버스 실험실(Charles Rivers Laboratories, Milan, Italy)로부터 구매하고 특정 병원균이 없는(specific-pathogen-free) 상태로 유지하였다. 혈우병 B(응고 인자 IX 녹아웃) 마우스를 살크 인스티튜트(Salk Institute, La Jolla, CA)에서 획득하고 사육하고 특정 병원균이 없는 상태로 유지하였다. 벡터 투여를 마우스에 대하여 꼬리 정맥 주입으로 실행하였다. 모든 동물실험 절차를 산 라파엘 병원 동물 보호 및 이용 자선 위원회(Hospital San Raffaele Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 승인된 프로토콜에 따라 실행하였다.

### 유전자변환(Transgenesis)

형질전환 마우스를 개시된 바와 같이 LV를 이용하여 생산하였다(Lois et al., 2002). 간략히 요약하자면, 암컷 FVB 마우스를 임마혈청(pregnant mare serum) 및 사람 융모성 고나도트로핀(chorionic gonadotropin) 조합물로 과잉배란시켰다. 암컷당 평균 20 내지 30개 사이의 배아를 수집하였고 동일한 날에  $5 \times 10^7$  TU/ml LV 스톡 10-100pL를 난황주위 공간으로 미세주입하였다. 조작된 배아를 즉시 가임신된 CD1 마우스의 수란관에 이식하였다. 새끼의 유전자형을 PCR에 의한 GFP 서열의 존재에 관하여 구분하였다. 양성 마우스를 사육하여 도입유전자의 생식계열 세포주 전달을 시험하였다. DNA를 꼬리에서 추출하고 이를 기증자 및 F1 자손 마우스에서 실시간 PCR로 벡터 복제수를 정량하기 위하여 이용하였다.

### 면역조직화학검사

면역형광과 관련하여, 조직을 4% 파라포름알데히드에서 고정시키고, PBS 중의 20% 수크로오즈에서 48시간 동안 4°C로 평형화시키고, 최적 절단 온도(optimal cutting temperature, OCT)에서 보관하고, 동결시켰다. 크리오 스테이트 섹션(Cryostate sections)(두께 5 $\mu$ m)을 파라포름알데히드로 후고정(postfix)시키고, 5% 염소 혈청(Vector Laboratories, Burlingame, CA), 1% 우혈청 알부민(BSA), PBS5 중의 0.1% 트리톤 중에서

블로킹시키고, 래트 항-마우스 F4/80(Serotec, Raleigh, NC), 또는 항-마우스 CD45, CD31 또는 CD8(BD Pharmingen) 중 어느 하나와 함께 인큐베이션하였다. 3-레이저 공초점현미경(Radiance 2100; Bio-Rad, Hercules, CA)에 의해 단일 광 섹션으로부터의 형광 신호를 획득하였다.

### 인자 IX(hFIX) 정량

hF.IX 농도를 인자 IX:Ag에 관한 효소-면역분석(Roche, Milan, Italy)에 의해 마우스 구연산 혈장(citrated serum)에서 측정하였으며, 이전에 기재된 바대로(Brown *et al.*, 2004b), 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT) 분석으로 FIX 활성에 대해 측정하였다.

### 결과

탈표적화된 발현 프로파일을 지닌 통합된 벡터 시스템을 만들어 내기 위하여, 본 발명자들은 최근에 확인된 miRNA-매개 전사후 침묵 시스템을 이용하였다. 본 발명자들은 mir-30a, mir-142-5p 또는 mir-142-3p 중 어느 하나에 대하여 완전한 상보성을 지니는 23개 염기쌍(bp)으로 이루어진 서열(mirT)의 연계된 카피(tandem copies) 4개를 어디에서나 발현되는 포스포글리세린산염 키나아제(PGK) 프로모터에 의해 유도된 GFP 발현 카세트의 3'-비번역 지역(3'UTR)에 삽입시킴으로써 miRNA-조절된 렌티바이러스 벡터(LV)를 제조하였다(도. 1a). 완전히 상보적인 표적의 다수 카피를 이용한, 이러한 디자인은 miRNA의 존재시 도입유전자의 리프레션을 최적화하기 위한 의도로 구상된 것이며, miRNA-매개 조절을 지배하는 규칙에 대한 최근에 등장한 이해에 기초하고 있다(Bartel and Chen, 2004; Doench *et al.*, 2003). mir-142-5p 및 mir-142-3p는, 노던 블랏 및 마이크로어레이 분석을 이용한, 최근의 보고가, 이러한 miRNA들이 조혈세포에 풍부하게 존재한다는 것을 제시하고 있기 때문에 선택되었다(Baskerville and Bartel, 2005; Chen *et al.*, 2004). 본 발명자들은 이러한 이전의 발견들을 실시간 PCR 정량 분석을 실행하여 본 발명자들의 표적 세포에서 특이적인 miRNA의 농도를 측정함으로써 확증하였다(도. 2a). 도 2a에 도시된 바와 같이, mir-142-3p 및 mir-142-5p의 발현수준은 U937 세포에서 매우 높게 나타났지만, 293T 세포에서는 낮은 수준으로만 검출되었다. mir-30a는 293T 및 U937 세포 둘 모두에서 낮은 수준으로 발현된다는 것이 확인되었고, 따라서 본 연구를 위한 대조군으로 설정된다.

이전에 기재된 바와 같이 벡터를 제조하고 농축시켰다. miRNA-조절된 LV의 역가측정은 표적 서열의 통합이 벡터 감염력 또는 비조혈 세포에서의 도입유전자 발현 수준에 나쁜 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주었다(도. 2b). 형질도입 및 도입유전자 발현 수준은 miRNA 표적 서열(LV.PGK.GFP) 없이도 모 벡터에 필적하는 수준으로 달성되었다. 대조적으로, 사람 U937 단핵구 세포주 또는 사람 1차 수지상 세포 둘 모두에서의 형질도입은 2 벡터, LV.PGK.GFP와 LV.PGK.GFP.142-3pT 사이에서 현격하게 상이한 발현 프로파일을 초래하였다. 태크만 분석이 계놈 당 벡터의 카피(C/G)이 유사하다는 것을 밝혀냈을지라도, U937 세포에서, 평균 형광 강도는 LV.PGK.GFP로 형질도입된 세포에서 50 내지 100배 더 높았다. 유사한 발견이 또한 수지상 세포에서 관찰되었는데, 상기 세포에서는 심지어 형질도입후에도 벡터 농도가 높았으며(> 50 MOI), LV.PGK.GFP.142-3pT 벡터를 수용한 세포에서도 도입유전자의 발현은 거의 완전히 폐기되었다. 대조군 벡터로서, LV.PGK.GFP.mir-30aT을 제조하기 위하여 mir-30a의 표적 서열이 LV.PGK.GFP에 클로닝되었다. mir-30a는 조혈세포에서 발현되지 아니하며(Zeng *et al.*, 2002), 예상한 바대로, 본 발명자들은 세포 형질도입 후에 GFP 발현에 있어서 어떠한 감소도 관찰하지 못하였다. 따라서, 본 발명자들의 결과는 본 발명자들의 벡터 디자인이 사람 세포에서 높은 벡터 감염력을 유지하며, 한편, 특정 유형의 세포에서 유전자 발현을 억제시킨다는 것을 명백히 입증한다.

본 발명자들 이전에 2개의 독특한 전사체를 대등하게 발현시키기 위하여 양방향 활성을 지닌 단일 프로모터 성분을 이용한 벡터 시스템을 소개하였다(Amendola *et al.*, 2005). 이러한 시스템은 2개의 도입유전자들이 단일 벡터로 형질도입된 후 세포 내에서 발현될 수 있도록 할 수 있다. 이러한 시스템은 많은 유전자 치료법 적용에 유용하지만, 2개의 도입유전자들 중 한 유전자만의 발현이 필요할 수 있는 상황도 존재한다. 불행하게도, 현재 까지 단일 벡터로부터 2개의 도입유전자들에 대한 분기된 조절을 가능하게 할 수 있는 유전자 도입 시스템은 존재하지 않는다.

분기적으로 조절된 벡터 시스템을 개발하기 위하여, 본 발명자들은 양방향 LV(Bd.LV)를 변형하여 mir-142-3pT가 GFP 리포터 카세트의 3'UTR에 포함되게 하였다(도. 1b). 이러한 벡터는 PGK 프로모터의 고유한 양방향 활성을 이용하여 2개의 도입유전자들의 분기된 전사를 유도한다. 293T 세포의 형질도입은 mirT를 지니거나 지니지 않는 Bd.LV 간의 GFP 또는 저-친화성 신경성장인자수용체( $\Delta$ LNGFR) 발현에서 차이를 나타내지 않았다(도. 2c). 그러나, 형질도입된 단핵구에서, mirT를 지니지 않는 Bd.LV는 GFP와  $\Delta$ LNGFR 모두를 발현하였으나, mirT가 태그된 벡터는  $\Delta$ LNGFR만을 발현하였다. 이는 상기 태그된 도입유전자의 리프레션이 전사후 수준에서 발생되나, 전사 침묵에 의해 발생되지 않는다는 것을 보여주는데, 이는 프로모터의 침묵이 두 도입유전자들의 발현을 억제하

였을 것이기 때문이다. 이러한 결과는 또한 벡터 디자인 제공을 위한, 양방향 벡터 시스템과 조합된, 본 발명자들의 유용한 miRNA-조절 전략이 단일 벡터로부터 2개의 도입유전자들을 분기적으로 조절하는데 이용될 수 있다는 것을 입증한다.

이러한 접근법의 다양한 용도를 추가로 입증하기 위하여, 본 발명자들은 293T 세포 및 U937 세포에서의 이들의 분화된 발현에 기초한 한 패널의 miRNA을 선택하였고(도면 2a), 이러한 miRNA의 표적서열을 Bd.LV 벡터의 GFP 발현 카세트 내로 클로닝하였다. 도 2d에 도시되어 있는 바와 같이, 두 세포군에 대한 형질도입은 각각의 벡터들 사이에서 매우 다양한 발현 패턴을 나타내었다. 중요하게는, 실시간 PCR에 의해 측정된, miRNA의 농도가 관찰된 억제 정도와 강한 상관관계를 보여주었다. 예를 들어, 218T.GFP.mCMV.PGK.ΔNGFR로부터의 GFP 발현은 이후 293T 세포에서 10배 이상 감소되었으나, mir-218만 낮은 수준으로 발현되는 U937 세포에서는 거의 억제되지 않거나 억제되지 않았다. 따라서, 이러한 데이터는 본 발명자들의 접근법의 잠재적인 유용성을 그 외 miRNA에도 확장시키며, 발현 프로파일링이 바람직한 조직 발현 패턴을 지니는 벡터 시스템을 디자인하기 위한 간편한 수단을 제공할 수 있다는 것을 입증한다.

miRNA 활성의 강건성에 대하여 거의 알려져 있지 않기 때문에, 본 발명자들 표적 세포에서 miRt를 운반하는 벡터 카페를 증가시킴으로써 극복될 수 있는 조절 역치가 있었는지 여부를 확인하기 시작하였다. U937 세포에 대한 형질도입이 여러 라운드를 거친 후, 유일하게 도입유전자 발현에 점진적 증가가 있었는데, 이는 벡터 C/G와 선형적으로 관련이 있었다(도. 3d). 이러한 결과는 억제가 시험된 모든 벡터 투여량에서 동일한 정도로 유지되었으며, 포화가 심지어 175 벡터 C/G에도 도달되지 아니한다는 것을 보여준다. 본 발명자들은 다음으로 miRt를 운반하는 외인성 서열을 발현시키는 것이 내생성 miRNA를 이의 천연 표적으로부터 스켈치(squelch)할 수 있었는지에 대하여 의문을 품었다. miR-142-3p에 대한 표적 mRNA가 확인되어 있었기 때문에, 본 발명자들은 서로 다른 발현 카세트 내에 동일한 miRt를 운반하는 제2의 벡터로 세포를 과감염(overload)시켰다. 4C/G의 LV.PGK.GFP.142-3pT를 운반하는 U937 세포를 LV.PGK.ΔLNGFR.142-3pT로 중복감염시켰으며, 도 3e에 도시된 바와 같이, 새로운 벡터의 카페 30개가 도입된 후에도, GFP 발현에서 증가는 없었다. 또한, ΔLNGFR 발현은 miR-142-3p에 의해 억제되었다(도. 3e). 전반적으로, 본 발명자들의 데이터는 miR-142-3p가 RNA 간섭 경로에서 반응이 제한되지 않으며, miR-142-3pT를 내포하는 새로운 유전 물질의 도입이 이러한 miRNA의 천연적인 활성을 방해해서는 않된다는 것을 시사한다.

신규한 miRNA 조절 전략이 이전에는 불가능했던 방식으로 벡터를 조작할 수 있는 가능성을 제공한다. 조혈세포에서의 발현을 막는 상기 전략의 유용성 이외에도, 본 발명자들은 벡터 생산 세포에서 도입유전자 발현을 선택적으로 막는데 miRNA 조절을 사용하는 것을 추구하였다. 일반적으로 벡터 생산 과정이 진행되는 도중에, 도입 플라스미드로부터 벡터 게놈이 발현될 뿐만 아니라, 또한 도입유전자의 발현이 일어난다. 유독한 문자를 엔코딩하는 벡터의 경우, 이것은 특히 문제가 되는데, 유독한 단백질의 발현이 생산 세포를 사멸시키고 벡터역가에서 전반적인 감소를 초래하기 때문이다. 따라서, 생산 세포에서 도입유전자 발현을 선택적으로 막는 능력은 특이적 벡터, 예를 들어, 유독한 문자를 엔코딩하는 벡터의 생산을 위한 주요한 진보일 것이다.

본 발명자들의 miRNA 프로파일링 데이터는 miR-19a가 293T 세포에서 높게 발현된다는 것을 보여주었다. 이러한 miRNA는 이전에 암과 관련되어 있는 것으로 밝혀진 바 있으나, 정상조직에서는 발견되지 않으며, 형질변환 세포주 및 종양 세포주에서 이의 높은 발현의 원인이 될 것이다. 본 발명자들은 miR-19aT 서열의 통합이 293T 생산 세포에서 도입유전자 발현이 방해 받았을 것으로 추론하였다. 벡터 역가를 감소시키기 않기 위하여, 본 발명자들은 19aT 서열을 포함하는 발현 카세트가 안티센스인 상태로 존재할 수 있도록 벡터를 제작하였다. 이러한 배열에서, 벡터 게놈은 전사될 수 있고, 19aT 서열이 안티센스 방향으로 존재하기 때문에, 전사체는 miR-19a-매개 RNAi에 의해서 분해되지 아니할 것이다.

도 4에 도시된 바와 같이, 293T의 일시적 트랜스펙션시, GFP 발현은 각각 pLV.PGKas.GFPas.19aT.CTEas.polyAas 및 pLV.PGK.GFP 및 pLV.PGKas.GFPas.CTEas.polyAas 사이에서 100배 및 10배 이상 감소되었다. 따라서, 이것은 miR-19aT 서열의 통합이 293T 세포에서의 유전자 발현을 막을 수 있다는 것을 제시한다. 중요하게는, 정규 플라스미드와 비교하였을 때 벡터 역가에 있어서 10배 감소가 초래된 pLV.PGKas.GFPas.CTEas.polyAas와 달리(상기 감소는 플라스미드에 의해 생산된 상보적인 전사체의 안티센스 영향에 기인함), pLV.PGKas.GFPas.19aT.CTEas.polyAas는 보다 낮은 역가를 지닌 벡터를 생산하지 않았으며 이 외에 또한 pLV.PGK.GFP 컨스트럭트도 그러하였다. 따라서, 본 발명자들의 데이터는 miRNA 조절이 벡터 생산이 진행되는 도중에 벡터 역가에 부정적인 영향을 미치지 않으면서 도입유전자의 발현을 막는데 이용될 수 있다는 것을 입증한다.

사람 세포에서 본 발명자들의 miRNA-조절된 LV의 시험관내 특성결정후, 본 발명자들은 우리의 연구를 마우스로 확장하였다. 마우스는, 비록 이들의 조직 발현 패턴이 제위치에서 (*in situ*) 확증된 것은 아니지만(Lagos-Quintana *et al.*, 2002), 본 발명자들이 시험관내에서 시험했던 각각의 사람 miRNA의 정확한 상동체를 발현시킨다. 누드 마우스에  $2 \times 10^8$  개 LV 입자를 투여하였다. 비장 및 간에 대한 정량 PCR(Q-PCR) 분석은 모든 처치 그룹에서 벡터 함량이 유사함을 보여주었다(데이터 미제시). 그러나, 발현 프로파일은 현격하게 상이하였다. LV.PGK.GFP와 LV.PGK.GFP.30aT로 처치된 동물들은 쿠퍼 세포, 간세포 및 내피 세포를 포함하는, 간내에서 광범위한 세포 발현 패턴을 보여주었다(도. 5a). 대조적으로, LV.PGK.GFP.142-3pT로 처치된 동물들은 쿠퍼 세포에서 거의 검출불가능한 GFP 발현을 보여주었으나, 간세포 및 내피 세포에서 높은 수준의 GFP 발현을 유지하였다.

일치되는 발견들이 처치된 동물들의 비장에서 관찰되었다. LV.PGK.GFP 벡터를 투여받은 마우스에서, FACS 분석에 의해 제시된 바와 같이, 강한 발현 수준과 함께, 높은 빈도의 GFP+ 비장세포(>5%)가 존재하였다(도. 5c). 대조적으로, LV.PGK.GFP.142-3pT로 처치된 동물들로부터 1% 또는 그 미만의 비장세포들은 GFP+였으며, 단지 낮은 강도로 발현되었다. 이러한 마우스들에 대한 면역조지화학분석은 주변 지역(marginal zone)에서 거의 전적으로 발견되는 GFP+ 세포의 존재를 드러내주었다. 이러한 세포들은 팬-백혈구 마커 CD45에 대한 네가티브 공-염색(co-staining)에 의해 나타난 바와 같이, 조혈세포 계통의 세포가 아니었으나(도. 5b), 비장의 지지 기질(supporting stroma)의 일부분인 망상 섬유아세포일 것으로 추정되었다(Steiniger *et al.*, 2003). 이것은 특정 세포 계통에서의 발현을 제한하는 한편, 유전자 발현을 매우 다양한 유형의 세포에서 유지시킬 수 있다는 이러한 접근법의 신규한 양상을 입증한다.

본 발명자들의 벡터의 발현 프로파일과, 이에 부합하여, mir-142-3p의 조절 활성에 대하여 보다 더 특성규명하기 위하여, LV.PGK.GFP.142-3pT 벡터를 이용하여 형질전환 마우스를 생산하였다. 4 내지 24 C/G 범위의 벡터를 운반하는 F1 자손의 말초혈액을 분석하였으며, 모든 조혈세포 계통에서 사실상 GFP 발현을 검출할 수 없었다(n=26; 도. 6a). 더욱이, 비장, 흉선, 및 골수의 기질 구조 뿐만 아니라, 간, 장 및 폐의 실질조직 구석구석의 밝은, 팬-세포 형광에도 불구하고, 본 발명자들은 이러한 장기들의 조혈세포 계통 세포에서 GFP 발현을 관찰하지 못하였다(도. 6b). 이러한 결과는 내생성 mir-142-3p가 조혈세포 계통로부터의 도입유전자 발현을 철저하게(sharply) 또한 강건하게 제한한다는 것을 입증한다.

마지막으로, 본 발명자들은 면역력있는 성체 Balb/c 마우스에서의 전신적 유전자 도입에 관한 본 발명자들의 miRNA-조절된 LV의 유용성에 대하여 평가하였다. 본 발명자들은 LV.PGK.GFP, LV.PGK.GFP.142-3pT 또는 일부만 프로모터의 조절하에 GFP를 발현하는 LV(LV.ALB.GFP) 중 어느 하나를  $5 \times 10^8$  형질도입 유닛(TU)/마우스로 투여하였다. 다양한 시점에, 비장 및 간 내의 강한 네오(neo)-항원(Stripecke *et al.*, 1999)인, GFP의 발현에 관하여 마우스를 분석하였다. LV.PGK.GFP로 처치된 마우스에서, 5일째에 GFP+ 세포가 검출되었으나, 14일까지 GFP+ 세포가 거의 또는 전혀 관찰되지 아니하였으며(이는 본 발명자들의 이전 발견과 일치함(Follenzi *et al.*, 2004)), 벡터 함량이 거의 검출불가능한 수준으로 감소되었다(도. 7a). LV.ALB.GFP로 처치한 마우스에서, 비록 발현이 간세포에 전적으로 제한될 지라도, 또한 GFP+ 세포의 제거(clearance)가 일어났다. 특히, 그러나, 이러한 벡터로부터의 탈표적 발현이 비장내에서 검출되었으며(적은 비율의 조혈세포 내에서의 검출이 포함됨), 상기 탈표적 발현은 면역-매개 벡터 제거의 개시에 소정의 역할을 하였을 것이다(도. 7d).

LV.PGK.GFP 및 LV.ALB.GFP와 관련한 본 발명자들의 발견과는 대조적으로, GFP+ 간세포 및 내피 세포는 분석된 모든 시점에서 LV.PGK.GFP.142-3pT로 처치된 모든 마우스의 간에 높은 빈도로 존재하였다(>120일, 도 7a, 7b). 형태측정학적(Morphoteric) 분석은 10 내지 20% 사이의 간세포들이 GFP+(n=10)이었으며, 중요하게는, 양성 세포의 빈도가 안정적으로 유지되었다는 것을 보여주었다. 벡터 C/G는 초기에 모든 처치 그룹에서 유사하였으나, 14일까지 LV.PGK.GFP와 LV.ALB.GFP로 처치된 마우스에서 급격하게 감소하였으며, LV.PGK.GFP.142-3pT로 처치된 마우스들에서 검출이 용이한 수준으로 유지되었다. C/G에서의 느린 감소가 장기간의 추후 연구에서 관찰되었으나, 이러한 감소가 GFP+ 간세포에서의 감소와 일치하지 않았기 때문에, 상기 감소는 정상 조혈세포로의 복귀(turnover)가 진행되는 도중에 형질도입된 쿠퍼 세포의 대체에 기인하였을 것으로 추정되었다.

간에서의 강도높은 GFP 발현에도 불구하고, 본 발명자들은 어떠한 GFP+ 쿠퍼 세포를 검출하지 못하였다. 더욱이, 본 발명자들은 비장의 주변 지역에서 GFP+ 망상 섬유아세포를 관찰하지 못하였으며, 한편 조혈세포 계통 세포에서 도입유전자의 발현이 검출되지 않았다. 지속된 결과로서, 본 발명자들은 심각한 CD8+ 침습 또는 간에서의 병리 징후를 관찰하지 못하였는데, 이는 지속된 GFP 발현과 부합된다(도. 7c).

장기간의 도입유전자 발현을 확립하기 위한 본 발명자들의 접근법의 유용성에 대한 추가 입증으로서, 본 발명자

들은 우리의 시스템을 혈우병 B의 치료에 사용할 수 있도록 설계하였다. 혈우병 B 마우스는 응고 FIX가 완전히 결함이 있으며, 이와 동일한 것으로, 상기 마우스는 1%미만(<1%)의 정상 응고 활성을 지닌다. 또한, 이러한 마우스들은 당연히 FIX를 발현하지 않기 때문에, FIX 항원의 도입시, 이들은 아주 쉽게 항-FIX 면역을 발달시킨다. 이러한 문제점을 회피하기 위하여, 본 발명자들 자신을 포함한, 다수의 그룹들이 APC에서 유전자 발현을 막고 항-FIX 면역 유도를 회피하기 위하여 간세포-특이적 FIX 발현 벡터를 제조하였다(Brown *et al.*, 2004a; Brown *et al.*, 2004b; Follenzi *et al.*, 2004; Migozzi *et al.*, 2003). 그러나, 도 8에 도시된 바와 같이, 간세포-특이적 LV.ET.hFIX 벡터는 정맥내 투여후 혈우병 B 마우스에서 장기간의 FIX 발현을 제공할 수 없었다. 대조적으로, FIX 발현 카세트 3'UTR 내에 mir-142-3pT 서열을 포함하는, LV.ET.hFIX.142-3pT 벡터의 주입은 장기간의 FIX 발현을 초래하였으며, 응고 활성을 정상 수준의 40% 이상(>40%)까지 회복시켰다.

전체적으로, 이러한 결과는 miRNA-조절된 LV를 사용하여, 세포내에서 또는 세포외에서, 고-수준의 안정적인 네오-항원의 발현을 누드 마우스에서 성공적으로 구축할 수 있으며, 혈우병 B 마우스에서 증명된 바와 같이, 질환의 표현형을 교정하는데 또한 사용할 수 있다는 것을 제시한다.

본원에서, 본 발명자들은 도입유전자 조절을 위한 내생성 miRNA 기구를 개발한 최초의 바이러스 유전자 운반 시스템을 소개한다. LV-매개된 운반을 이용함으로써, 생체내 유전자 운반이 가능하였고, 이러한 방식으로, 본 발명자들은 성체 포유동물에서 miRNA 활성의 최초의 정위치 데이터의 일부를 제공한다. 저급 후생동물에서의 연구(Brennecke *et al.*, 2005; Reinhart *et al.*, 2000)와 유사하게, 본 발명자들은 매우 효과적인 miRNA 조절을 확인하였다. LV를 정맥내 투여한 마우스와 마찬가지로, 형질전환 마우스에서, 본 발명자들은 모든 조혈세포에서 일관된 mir-142-3p 활성을 확인하였다. miRNA-142-3pT 서열을 도입유전자에 부가함으로써, 비조혈세포에서 발현에 대한 영향이 없이, 조혈계통 세포에서 도입유전자의 발현이 100배까지 감소되었다.

본 발명자들의 시스템에서, 내생성 miRNA 조절은 조혈계 세포에서 벡터 발현을 막기위기 위한 좋은 수단과 그 외에 간세포-특이적 일부만 프로모터의 용도를 제공하였다. 이것은 전사후의 조절이 조직-특이적 프로모터의 삽입 및/또는 불완전한 재구성의 위치적 효과에 기인한 표적을 벗어난 발현을 극복할 수 있기 때문에 일어났을 것으로 강하게 추정된다. 이러한 현상은 이전 세포 상태에서 전사되거나 새는 전사에 기인하여 발생하는 mRNA의 번역을 막는 miRNA 조절의 제안된 자연적 기능들의 하나와 유사할 수 있다(Bartel and Chen, 2004; Farh 등, 2005). 이와 같이, miRNA 조절의 벡터내로의 도입은 어디에나 존재하는 프로모터를 사용하거나 조직-특이적 전사 요소와 결합하여 도입유전자의 발현 전반에 걸친 중요한 조절 레이어를 제공할 수 있다.

조혈계통 세포로부터 도입유전자 발현을 탈-표적화시키는 miRNA 조절을 이용함으로써, 본 발명자들은 면역-매개된 벡터 제거를 막을 수 있었으며, 안정적인 유전자의 운반이 가능하도록 함으로써, 임상적 유전자 치료에 대한 가장 중요한 장벽 중 하나를 극복할 수 있었다(Thomas *et al.*, 2003). 특히 관련성이 있는 것 중, 본 발명자들은 세포내 및 세포외 양자에서 순환 항원에 대한 이 같은 접근의 유용성을 증명한다. miRNA 조절 전략을 이용함으로써, 본 발명자들은 혈우병 B 마우스의 응고 표현형을 안정적이며 고수준으로 교정할 수 있었다. 본 발명자들이 알고 있기도는, 본원발명은 내생성 miRNA 조절을 이용하기 위한 치료적 적용의 최초의 증명이다.

기재된 본원발명은 또한 miRNA-매개된 조절이 강력한 구조적 활성 벡터 프로모터로부터 사실상 발현을 무력화시키기 위한 또는 조직-특이적 프로모터의 성능을 개선하기 위한 확고하고 고 효율적 수단이라는 최초의 증거를 제공한다. 전체적으로, miRNA가 도입유전자를 조절하기 위한 강력한 방법을 제공할 수 있다는 것은 본원발명으로부터 명확하고, 이러한 복합 네트워크를 이용함으로써, 본 발명자들은 치료 유전자 운반을 위한 중요한 수단인 벡터 디자인에서 새로운 패러다임을 개발하였다.

조합된 miRT 배열을 허여하는, 본 발명자들의 접근을 통해서, 시험관내 또는 생체내에서 사용되는, 유전자 치료 또는 동물의 형질전환을 위한 다양한 유전자 운반 컨스트럭트가 제조될 수 있는데, 상기 컨스트럭트는 두개의 별개의 도입유전자를 분기적으로 조절할 수 있는 능력을 포함하는 복잡한 패턴의 유전자 발현이 달성되게 한다. 본 발명자들은 새로운 조직-특이적 miRNA 뿐만 아니라 벌달 및 종양-특이적 miRNA에 대한 개발을 지속하고 있으므로, 성장 또는 분화 및 심지어 종양발생에도 조건부로 반응하는 벡터를 구축하는 것이 가능할 것이다.

본 명세서에 언급된 각각의 출원 및 특허, 및 각각의 출원 및 특허의 출원경과의 과정을 포함하는 상기 출원 및 특허의 각각에 인용되거나 참조된 각각의 문헌("출원에 언급된 문헌") 및 각각의 출원 및 특허내 및 모든 출원에 언급된 문헌에 인용되거나 언급된 모든 물건을 위한 모든 제조자의 지침 또는 카탈로그는 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 또한 본 명세서에 언급된 모든 문헌 및 본 명세서에 언급된 문헌에 인용되거나 참조된 모든 문헌, 및 본 명세서에 인용되거나 언급된 모든 물건을 위한 모든 제조자의 지침 또는 카탈로그는 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본원발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자가 본원발명의 영역 및 정신에서 벗어나지 아니하면서 본원발명의 상기 기재된 방법 및 시스템에 대한 다양한 수정 및 변형을 가할 수 있을 것다는 것은 자명할 것이다. 본원발명이 바람직한 특정 구체예와 연계하여 기술되었으나, 청구된 바와 같은 본원발명이 명백히 이러한 특정 구체예들로 국한되어서는 않된다는 것을 이해하여야 한다. 오히려, 분자생물학 또는 관련 분야의 통상의 기술자에게 자명한, 본원발명을 실시하기 위한 상기 기재된 양상에 대한 다양한 변형이 특히청구범위의 청구항들의 영역내에 포함되도록 의도된 것이다.

#### 참고문헌

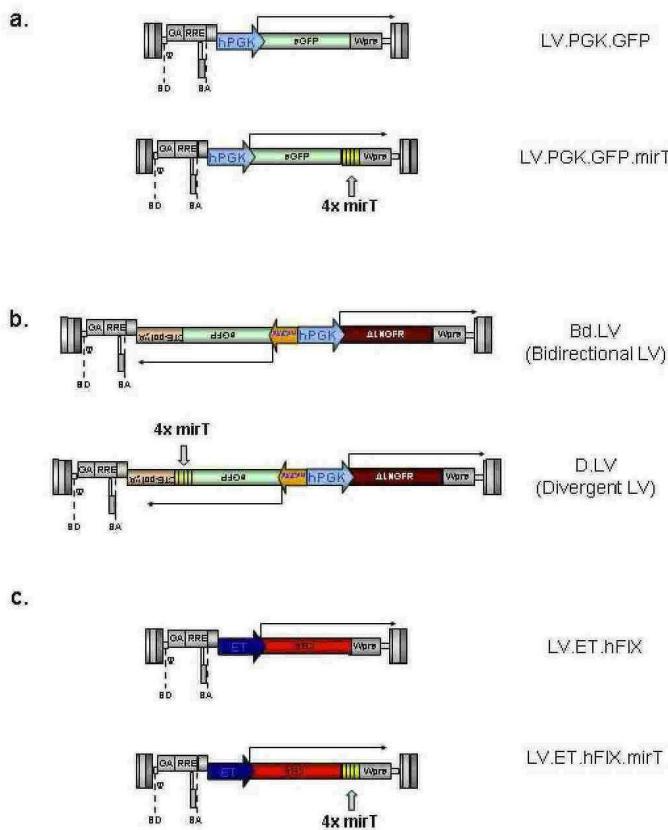
- Amendola, M., Venneri, M. A., Biffi, A., Vigna, E., and Naldini, L. (2005). Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters. *Nat Biotechnol* 23, 108-116.
- Barad, O., Meiri, E., Avniel, A., Aharonov, R., Barzilai, A., Bentwich, I., Einav, U., Gilad, S., Hurban, P., Karov, Y., et al. (2004). MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res* 14, 2486-2494.
- Bartel, D. P., and Chen, C. Z. (2004). Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet* 5, 396-400.
- Baskerville, S., and Bartel, D. P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *Rna* 11, 241-247.
- Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., Steinman, R. M., and Bhardwaj, N. (1996). Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 196, 121-135.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., and Cohen, S. M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3, e85.
- Brown, B. D., and Lillicrap, D. (2002). Dangerous liaisons: the role of "danger" signals in the immune response to gene therapy. *Blood* 100, 1133-1140.
- Brown, B. D., Shi, C. X., Powell, S., Hurlbut, D., Graham, F. L., and Lillicrap, D. (2004a). Helper-dependent adenoviral vectors mediate therapeutic factor VIII expression for several months with minimal accompanying toxicity in a canine model of severe hemophilia A. *Blood* 103, 804-810.
- Brown, B. D., Shi, C. X., Rawle, F. E., Tinlin, S., McKinven, A., Hough, C., Graham, F. L., and Lillicrap, D. (2004b). Factors influencing therapeutic efficacy and the host immune response to helper-dependent adenoviral gene therapy in hemophilia A mice. *J Thromb Haemost* 2, 111 - 118.
- Calin, G. A., Liu, C. G., Sevignani, C., Ferracin, M., Felli, N., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Cimmino, A., Zupo, S., Dono, M., et al. (2004a). MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 707, 11755-11760.
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., and Croce, C. M. (2004b). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2999-3004.
- Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F., and Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303, 83-86.
- Chen, C. Z., and Lodish, H. F. (2005). MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Semin Immunol* 17, 155-165.
- De Geest, B. R., Van Linthout, S. A., and Collen, D. (2003). Humoral immune response in mice against a circulating antigen induced by adenoviral transfer is strictly dependent on expression in antigen-presenting cells. *Blood* 101, 2551-2556.
- De Palma, M., Montini, E., de Sio, F. R., Benedicenti, F., Gentile, A., Medico, E., and Naldini, L.

- (2005). Promoter trapping reveals significant differences in integration site selection between MLV and HIV vectors in primary hematopoietic cells. *Blood* 105, 2307-2315.
- De Palma, M., and Naldini, L. (2002). Transduction of a gene expression cassette using advanced generation lentiviral vectors. *Methods Enzymol* 346, 514-529.
- Doench, J. G., Petersen, C. P., and Sharp, P. A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17, 438-442.
- Farh, K. K., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B. P., Johnston, W. K., Lim, L. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2005). The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 310, 1817-1821.
- Follenzi, A., Battaglia, M., Lombardo, A., Annoni, A., Roncarolo, M. G., and Naldini, L. (2004). Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice. *Blood* 103, 3700-3709.
- Follenzi, A., Sabatino, G., Lombardo, A., Boccaccio, C., and Naldini, L. (2002). Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes *in vivo* by improved lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 13, 243-260.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A., and Enright, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34, D140-144.
- He, L., and Harmon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5, 522-531.
- Houbaviy, H. B., Murray, M. F., and Sharp, P. A. (2003). Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* 5, 351-358.
- Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C. G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., et al. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 65, 7065-7070.
- Kashashima, K., Sakota, E., and Kozu, T. (2004). Discrimination of target by siRNA: designing of AML1-MTG8 fusion mRNA-specific siRNA sequences. *Biochimie* 86, 713-721.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12, 735-739.
- Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J., and Baltimore, D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295, 868-872.
- Mansfield, J. H., Harfe, B. D., Nissen, R., Obenauer, J., Srivastava, J., Chaudhuri, A., Farzan-Kashani, R., Zuker, M., Pasquinelli, A. E., Ruvkun, G., et al. (2004). MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet* 36, 1079-1083.
- Mingozzi, F., Liu, Y. L., Dobrzensky, E., Kaufhold, A., Liu, J. H., Wang, Y., Arruda, V. R., High, K. A., and Herzog, R. W. (2003). Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by *in vivo* hepatic gene transfer. *J Clin Invest* 111, 1347-1356.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
- Sandrin, V., Russell, S. J., and Cosset, F. L. (2003). Targeting retroviral and lentiviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 281, 137-178.
- Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, L., Moss, E., Dmitrovsky, E., and Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with

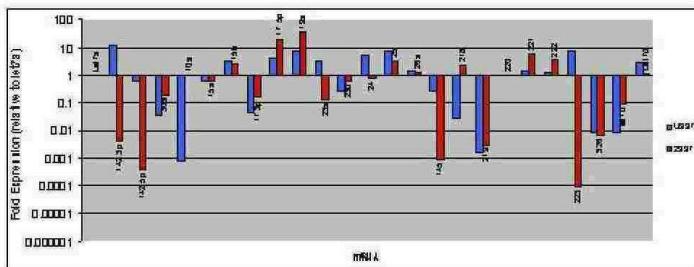
- possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 5, R1 3.
- Steiniger, B., Ruttinger, L., and Barth, P. J. (2003). The three-dimensional structure of human splenic white pulp compartments. *J Histochem Cytochem* 51, 655-664.
- Stripecke, R., Carmen Villacres, M., Skelton, P., Satake, N., Halene, S., and Kohn, D. (1999). Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy. *Gene Ther* 5, 1305-1312.
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A., and Kay, M. A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4, 346-358.
- Verma, I. M., and Weitzman, M. D. (2005). GENE THERAPY: Twenty-First Century Medicine. *Annu Rev Biochem* 74, 711-738.
- Zeng, Y., Wagner, E. J., and Cullen, B. R. (2002). Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell* 9, 1327-1333.

## 도면

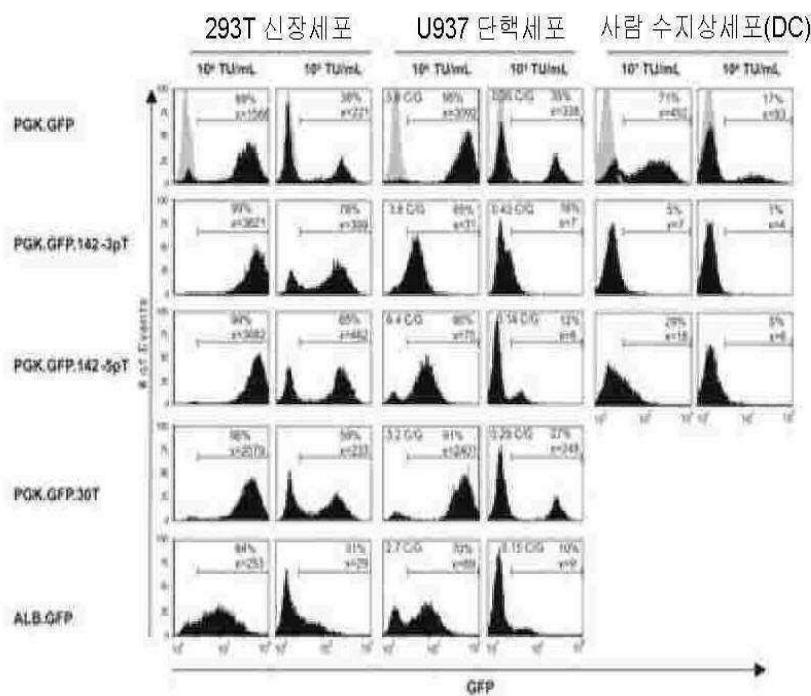
### 도면1



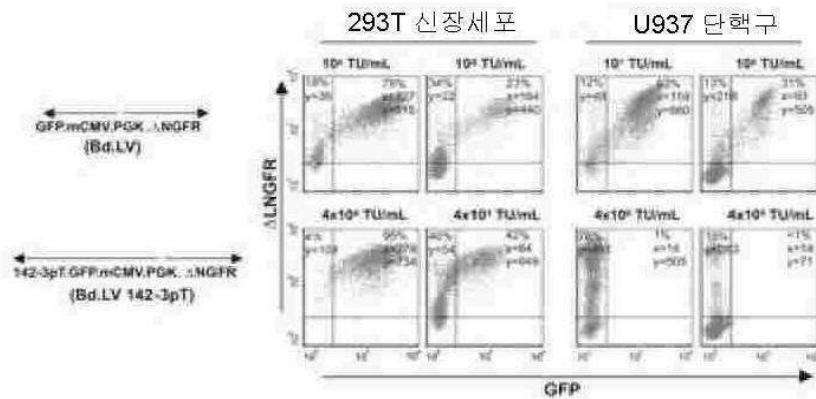
## 도면2a



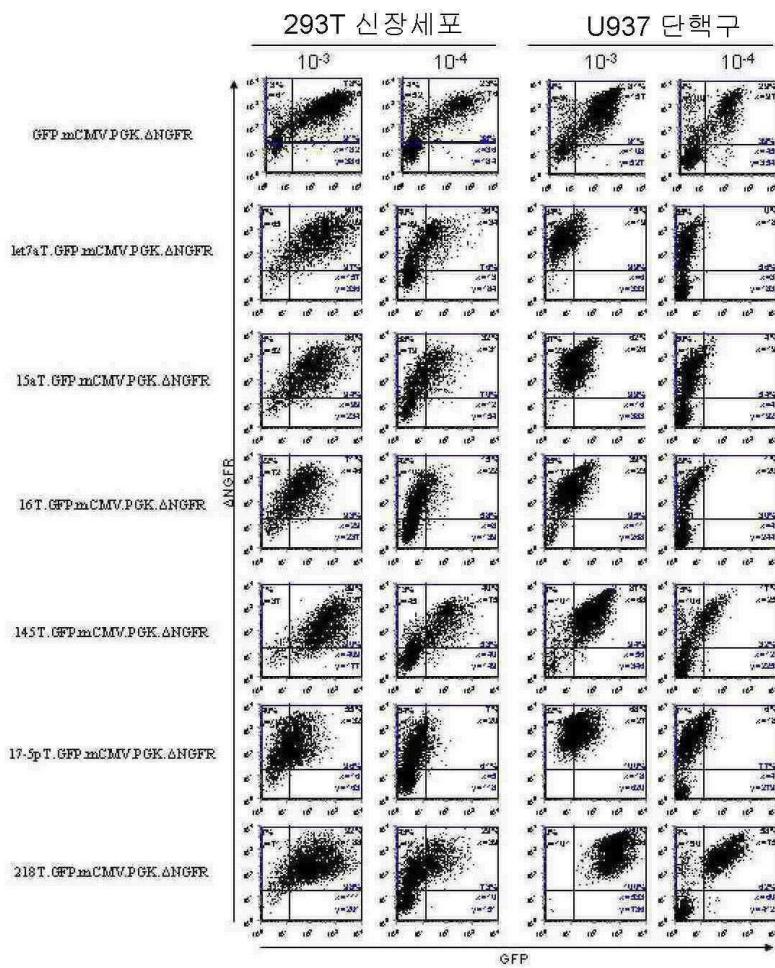
## 도면2b



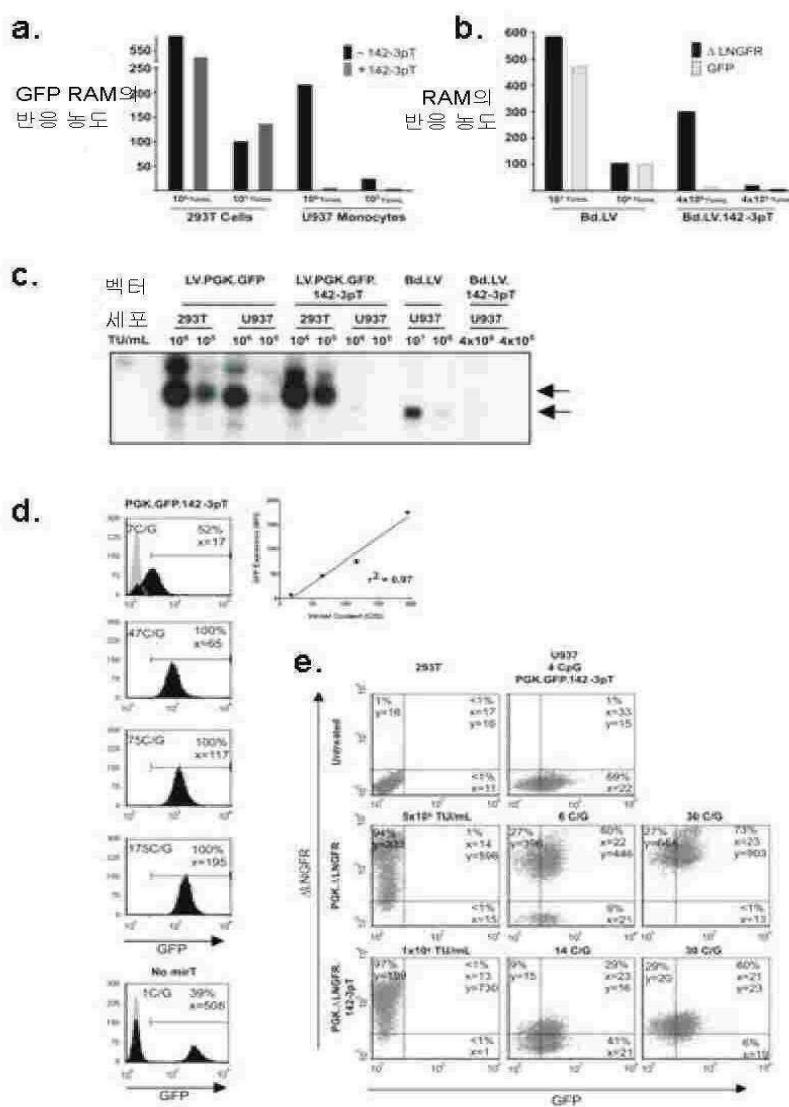
## 도면2c



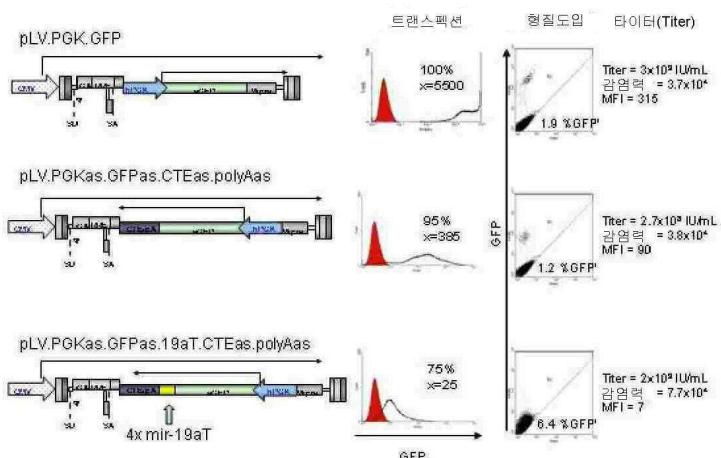
## 도면2d



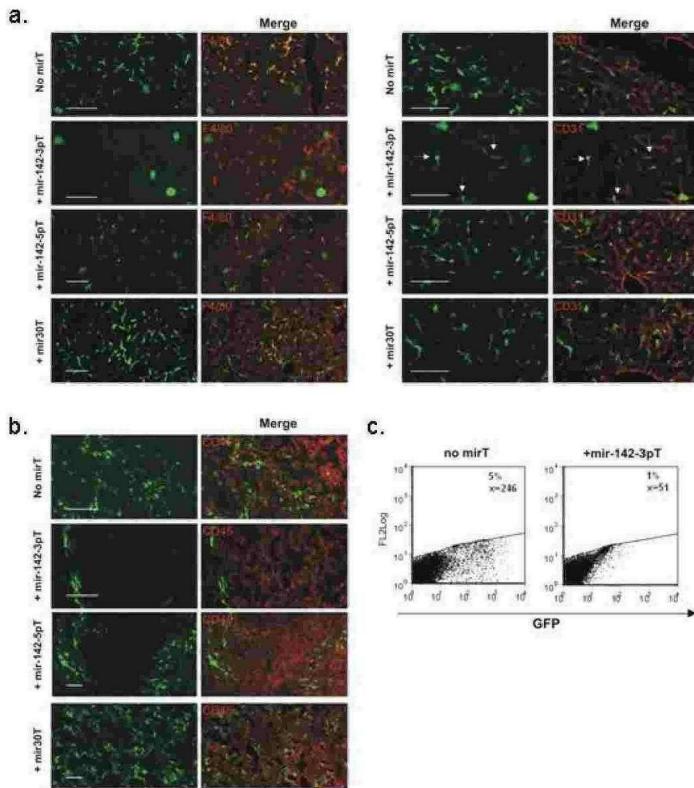
## 도면3



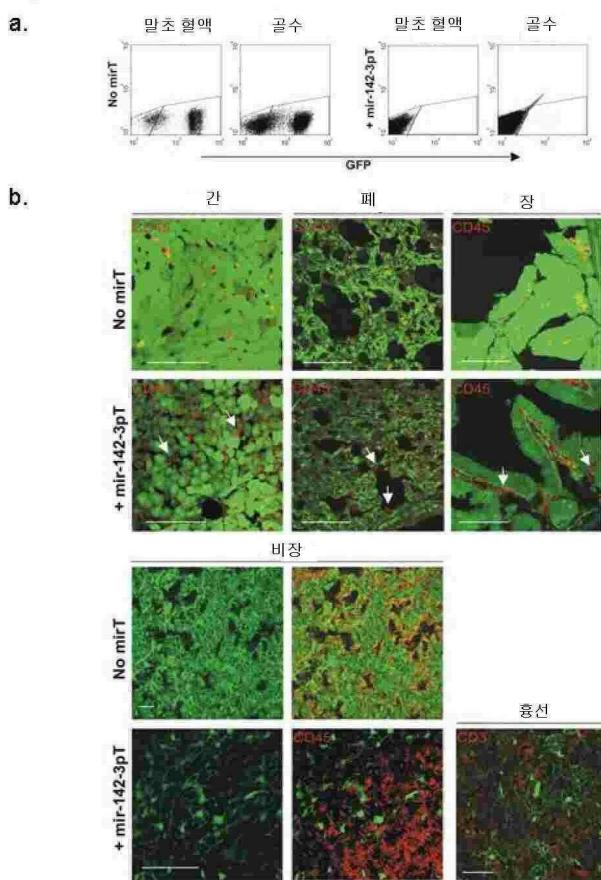
## 도면4



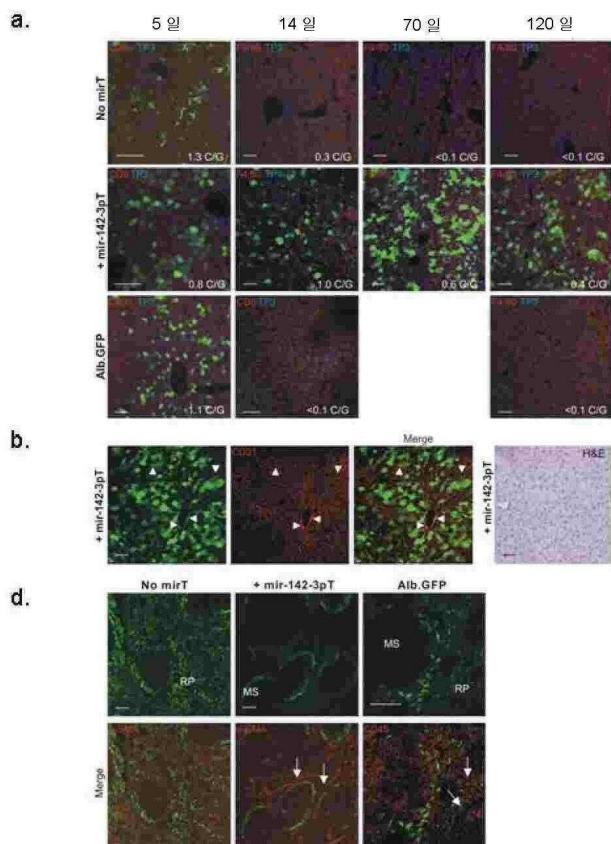
## 도면5



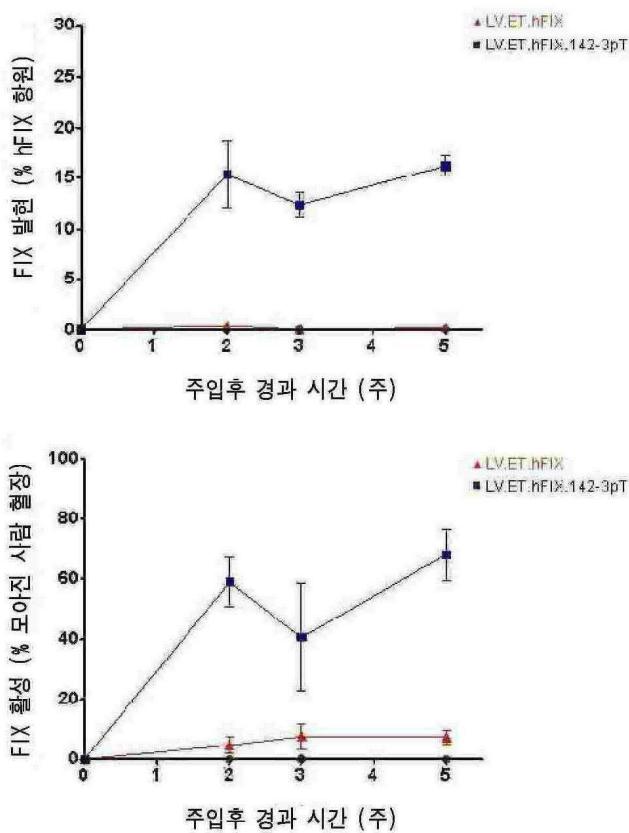
## 도면6



## 도면7



## 도면8



## 도면9

### A. 성숙한 hsa-mir-142 스템 루프 서열



### B. 1x-mir-142as. 표적

TCCATAAAGTAGGAAACACTACA

## 서 열 목 록

### SEQUENCE LISTING

<110> Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor and  
Fondazione Telethon

<120> Gene Vector

<130> P023380W0

<140> PCT/IB2006/002266

<141> 2006-05-26

<150> US 60/684,954

<151> 2005-05-27

<160> 21

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide

<400> 1

ttagagtcga ctccataaag taggaaacac tacacgattc cataaagtat gaaacactac 60

aaccggtaaccgg 67

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide

<400> 2

tgttgtttt cctactttat ggaatcggtt agtgtttctt actttatgga gtcgact 57

<210> 3

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide

<400> 3

tccataaagt aggaaacact acatcactcc ataaagttagg aaacactaca c 51

<210> 4

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide

<400> 4

tcgagttag tgtttctac ttatggagt gatgtatgtt ttcctacttt atggaaccgg 60

t	61
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 5	
tgaaagcgaa agggaaacca	20
<210> 6	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 6	
ccgtgcgcgc tttag	15
<210> 7	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Oligonucleotide probe	
<400> 7	
ctctctcgac gcaggact	18
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 8	
agagggaaat cgtgcgtgac	20
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Oligonucleotide primer	

<400> 9  
caatagtgt gacctggccg t 21  
<210> 10  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Oligonucleotide probe

<400> 10  
cactgccgca tccttttccc 23  
<210> 11  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 11  
ggcacacgtg gcttttcg 18  
<210> 12  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 12  
ggtaaacctc gtaaggttat gcaa 24  
<210> 13  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223>  
> Oligonucleotide probe

<400> 13  
tcaggacgtc gagtgacac ggtg 24  
<210> 14  
<211> 17  
<212> DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 14

cagctcgccg accacta

17

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 15

gggccgtcgc cgat

14

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Oligonucleotide probe

&lt;400&gt; 16

ccagcagaac accccc

16

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 17

accacagttc atgccccatcac t

21

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 18

ggccatcactcg ccacagstt

19

&lt;210&gt; 19

<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Oligonucleotide probe  
<400> 19  
ccacccagaa gactgtggat ggcc 24  
<210> 20  
<211> 87  
<212> RNA  
<213> Mus musculus  
<220><221> stem\_loop  
<222> (1)..(87)  
<400> 20  
gacagugcag ucacccauaa aguagaaagc acuacuaaca gcacuggagg guguaguguu 60  
uccuacuuua uggaugagug uacugug 87  
<210> 21  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> miR-142 target sequence  
<400> 21  
tccataaagt aggaaacact aca 23