



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년08월17일
(11) 등록번호 10-0912270
(24) 등록일자 2009년08월07일

(51) Int. Cl.

C12N 15/66 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0032245

(22) 출원일자 2008년04월07일

심사청구일자 2008년04월07일

(56) 선행기술조사문헌

Molecular Therapy. Vol. 3(6), pp. 964-975.*

Journal of American Chemical Society. Vol. 124(47), pp. 13996-13997.*

Journal of Chromatography. Vol. 857(2), pp. 231-239.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

울산대학교 산학협력단

울산 남구 무거2동 산29

단국대학교 산학협력단

경기도 용인시 수지구 죽전동 126 단국대학교 내

(72) 발명자

이희란

경기 성남시 분당구 정자동 상록마을라이프아파트 106동201호

최한석

서울 송파구 석촌동 156번지 501호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 14 항

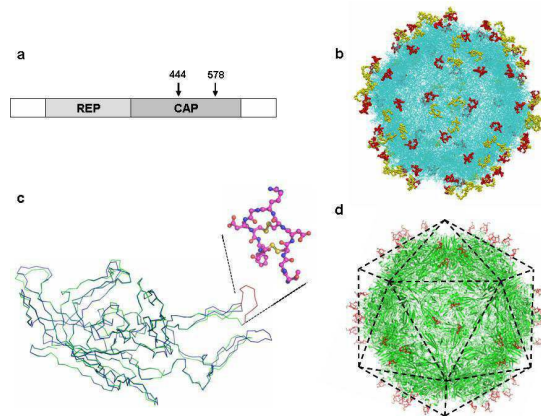
심사관 : 김지윤

(54) 표적화된 유전자 전달을 위한 아데노-부속 바이러스 혈청형5 벡터

(57) 요약

본 발명은, 아데노-부속 바이러스 혈청형 중에서 안전성이 높은 아데노-부속 바이러스 혈청형 5를 표적화된 유전자 전달체로 사용하기 위한 것으로, 구체적으로 캡시드 단백질의 내부 아미노산 잔기에 표적 분자를 특이적으로 인지하는 표적화 모티프 펩타이드를 삽입시키는 방법으로 제조한 표적화가 가능한 아데노-부속 바이러스 혈청형 5 유래의 재조합 바이러스 벡터와 상기 벡터를 이용하여 표적 세포 특이적으로 유전자를 전달하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이한샘

서울 강남구 개포동 12 대청아파트 301동 211호

김지연

경기 고양시 일산구 주엽2동 문촌마을동아아파트
803동601호

신오규

강원 강릉시 교2동 유하그린맨션 1103호

이원일

경기 수원시 영통구 망포동 동양하이츠 A-102

정선주

서울 강남구 대치동 아이파크아파트 111동 2401호

박기량

충북 청주시 흥덕구 가경동 동부아파트 107동 203
호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M10534050002-07N3405-00210

부처명 과학기술부

연구사업명 항암 유전자치료기술개발

연구과제명 유전자 치료용 아데노 부속 바이러스 전달체 개발

주관기관 단국대학교 산학협력단

연구기간 2007년 04월 01일 ~ 2008년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

아데노-부속 바이러스 혈청형 5 유래의 바이러스 벡터로서, 캡시드 단백질의 444번 또는 578번 잔기에 표적화 모티프 펩타이드가 삽입된 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 표적화된 재조합 바이러스 벡터.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 표적화 모티프 펩타이드는 5 내지 25의 아미노산 길이를 가지는 것인 표적화된 재조합 바이러스 벡터.

청구항 4

제 1항에 있어서, 표적화 모티프 펩타이드는 종양 세포막에 존재하는 분자를 인지하는 것인 표적화된 재조합 바이러스 벡터.

청구항 5

제 4항에 있어서, 종양 세포막에 존재하는 분자가 시알릴 루이스 X, 인테그린 또는 테나신 C인 표적화된 재조합 바이러스 벡터.

청구항 6

제 5항에 있어서, 시알릴 루이스 X를 특이적으로 인지하는 표적화 모티프 펩타이드가 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 표적화된 재조합 바이러스 벡터.

청구항 7

제 5항에 있어서, 인테그린을 특이적으로 인지하는 모티프 펩타이드가 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 표적화된 재조합 바이러스 벡터.

청구항 8

제 5항에 있어서, 테나신 C를 특이적으로 인지하는 모티프 펩타이드가 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 또는 서열번호 8의 아미노산 서열을 가지는 표적화된 재조합 바이러스 벡터.

청구항 9

아데노-부속 바이러스 혈청형 5 유래의 바이러스 벡터로서, 캡시드 단백질의 444번 또는 578번 잔기에 표적화 모티프 펩타이드가 삽입된 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 표적화된 재조합 바이러스 벡터를 이용하여 표적 세포 특이적으로 유전자를 전달하는 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

제 9항에 있어서, 표적화 모티프 펩타이드는 5 내지 25의 아미노산 길이를 가지는 것인 방법.

청구항 12

제 9항에 있어서, 표적화 모티프 펩타이드는 종양 세포막에 존재하는 분자를 인지하는 것인 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 중앙 세포막에 존재하는 분자가 시알릴 루이스 X, 인테그린 또는 테나신 C인 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 시알릴 루이스 X를 특이적으로 인지하는 표적화 모티프 펩타이드가 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 방법.

청구항 15

제 13항에 있어서, 인테그린을 특이적으로 인지하는 모티프 펩타이드가 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 방법.

청구항 16

제 13항에 있어서, 테나신 C를 특이적으로 인지하는 모티프 펩타이드가 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 또는 서열번호 8의 아미노산 서열을 가지는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 캡시드 단백질의 특정 내부 아미노산 잔기에 표적 분자를 특이적으로 인지하는 표적화 모티프 펩타이드를 삽입시키는 방법으로 표적화가 가능한 아데노-부속 바이러스 혈청형 5 유래의 재조합 바이러스 벡터와 상기 벡터를 이용하여 표적 세포 특이적으로 유전자를 전달하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 재조합 아데노-부속 바이러스 (Recombinant adeno-associated virus: rAAV)는 목적 유전자의 전달에 사용될 수 있는 많은 특성을 가지고 있다. rAAV는 분열하거나 비분열하는 다양한 세포를 모두 감염할 수 있고, 최소의 면역 역 반응을 유도하면서 이식유전자(transgene)를 지속적으로 발현시킨다 [Wu, Z. et al., 2006, *Mol Ther* 14: 316-327; Warrington, K. H. et al., 2006, *Hum Genet* 119: 571-603]. 목적 유전자의 전달에 사용될 수 있는 많은 AAV의 혈청형들 중에서, 가장 널리 연구된 벡터는 아데노-부속 바이러스 혈청형 2 (Adeno-associated virus serotype 2)로, 낭포성섬유증 [Moss, R. B., et al., 2007, *Hum Gene Ther* 18: 726-732], 혈우병 [Wu, Z., et al., 2007, *Mol Ther.*; Sabatino, D. E., et al., 2007, *Mol Ther* 15: 1677-1685; Wiwanitkit, V., 2007, *Hum Gene Ther* 18: 89-92] 및 카나반 병 [McPhee, S. W., et al., 2006, *J Gene Med* 8: 577-588]의 임상적 유전자 전달에 현재 사용되고 있다. 또한, 최근에는 암 유전자 치료 분야 (cancer gene therapy) 에서 rAAV의 잠재성이 증가하고 있다 [Li, C. et al., 2006, *Cancer gene therapy* 12: 913-925; Hacker, U. T., et al., 2005, *J Gene Med* 7: 1429-1438.].

<3> 그럼에도 불구하고, 목적인 조직에서는 매우 낮은 수준으로 유도되고, 목적인 조직 외에서 이식유전자의 예측하지 못한 발현 때문에, 광범위한 숙주 범위를 가지는 rAAV의 사용이 제한 받고 있다. 세포/조직에 대한 향성 (tropism)의 일차적 결정인자는 세포 수용체에 대한 rAAV 캡시드의 결합 특이성에 의존한다 [Berns, K. I. et al., 2001, *Field's Virology*, Lippincott-Raven, Philadelphia]. 이 사실에 기반하여, 여러 연구자들이 수용체 특이성을 변형시키고자, rAAV 캡시드 영역을 유전적으로 조작하였다. rAAV2 캡시드 단백질에 삽입 돌연변이를 유발(14-아미노산 표적화 펩타이드가 삽입된)하여, 그로드(Girod) 등은 rAAV2 감염에 저항성을 나타내는 세포로 rAAV를 표적화 시키는 성공적 시도를 첫번째로 하였다[Girod, A., et al., 1999, *Nat Med* 5: 1438]. 그 이후, 비슷한 전략으로 rAAV2를 변형하여 인 비트로 (*in vitro*) 뿐만 아니라 인 비보 (*in vivo*) 에서도, 표적화시킨 유전자 전달을 지지하는 연구들이 있었다 [Work, L. M., et al., 2006, *Mol Ther* 13: 683-693; Grifman, M., et al., 2001, *Mol Ther* 3: 964-975; White, K., et al., 2007, *Gene therapy*; Lieber, A., 2003, *Nature biotechnology* 21: 1011-1013]. 지금까지의 rAAV의 재표적화 연구는 백본(backbone)으로 rAAV2를 사용하였다.

<4> 그리프만 (Grifman) 등은 AAV1에서 AAV15의 캡시드 서열을 카닌 파코바이러스의 대응하는 영역과 정렬하였고 [Grifman, M., et al., 2001, *Mol Ther* 3: 964-975], 그는 각각 rAAV2의 아미노산 447번과 587번에서의 아르기닌(Arg)을 각각 포함하는 루프 III과 루프 IV가 바이러스 복제능의 상실없이 자유롭게 변경될 수 있음을 지적하

였다. 이런 위치들은 지로드 (Girod) 등에 의하여, 변경 표적화 영역으로 동정되었으며, 루프 IV는 rAAV2의 항성 변경에 빈번하게 사용되었다 [Girod, A., et al., 1999, *Nat Med* 5: 1438]. rAAV1 혈청형의 경우에도 혈관 내피세포를 목표로 하고 항성 변경을 위해 rAAV2 캡시드 아미노산 587번 위치에 대응하는 rAAV1 캡시드 단백질의 아미노산 590번에 RGD-4C 모티프를 넣은 연구 사례가 있다 [MD Stachler, MD. et al., 2006, *Gene Therapy* 13:926-931]. 그러나 현재까지 항성 변경을 위해 그 외 다른 rAAV 혈청형들의 캡시드 단백질에 유전적 돌연변이를 일으킨 연구가 거의 없는 상황이다.

<5> 전체돌연변이(systemic mutation) 연구와 함께[Wu, P., et al., 2000, *J Virol* 74: 8635-864], AAV2의 원자구조 분석에 따르면 아미노산 587번 내의 주요 수용체 결합 모티프(루프 IV)가 3-기단부 피크(threefold-proximal peak)내에 위치하였다[Xie, Q., et al., 2002, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 10405-10410]. 수용체를 인지하는 역할을 하는 다른 루프 (loop III)는, 반대로, 피크의 말단부(distal floor)에 위치하였다. rAAV2 캡시드와 약 55%의 동일성을 보이는 rAAV5는 헤파린 설페이트(heparin sulfate)을 필요로 하는 AAV2와 구별되게 숙주세포의 2,3-결합된 시알릭산(2,3-linked sialic acid)을 필요로 하였다[Walters, R. W., et al., 2001, *The Journal of biological chemistry* 276: 20610-20616].

<6> rAAV5 캡시드와 CPV(canine parvovirus) 캡시드는 모두 시알릭산에 결합하는 것으로 알려졌지만, 이들 캡시드의 구조를 비교한 결과, rAAV5의 표면 특성이 CPV의 수용체 표면형과 아주 일치하지 않음을 시사하였다. 월터(Walter) 등에 의한 AAV2 및 AAV5의 CPV와의 모델-기반 비교는 2축에서 억제되는 벽(wall in the depression at the twofold axis)에 위치하는 3개의 아미노산(I528, N546, M547)이 rAAV5의 수용체 결합에 관련되어 있음을 암시하였다[Walters, R. W., et al., 2004, *J Virol* 78: 3361-3371]. 578번 아미노산에 호밍 펩타이드를 도입하면 rAAV5에 의한 TE가 급격히 감소되는 본 발명의 테이터는, 본래의 rAAV5 항성이 녹다운(knock-down) 되는 것임을 시사한다. 따라서, 2축 내의 내부 표면에 있는 영역이 아니라 3축-기단부 피크에 존재하는 578번 아미노산 근처의 영역이 rAAV5가 시알릭산에 결합하도록 하는 영역으로 보인다. 그러나, rAAV5 수용체 결합시의 상세 특징을 결론내기 위해서는 연구가 더 필요하다.

<7> 알파 브이 인테그린 (alpha V integrin)은 광범위한 종류의 종양세포와 혈관구조에서 자주 과발현된다[Bello, L., et al., 2001, *Neurosurgery* 49: 380-389; discussion 390; Brooks, P. C., et al., 1994, *Science* 264: 569-571]. 알파 브이 인테그린-결합 RGD 모티프 (RGD-4C)는 원래는 유전적으로 아데노바이러스를 표적화하기 위하여 도입하였으며 이들 돌연변이체는 인 비트로(*in vitro*) 및 인 비보(*in vivo*) 모두에서 인간 암 세포를 현저하게 이식유전자 발현을 강화시켰다 [Kanerva, A., et al., 2004, *International journal of cancer* 110: 475-480; Niu, G., et al., 2007, *Mol Imaging Biol*]. RGD 모티프를 노출시킨 rAAV2는 성공적으로 rAAV2를 재표적화하였다[Girod, A., et al. 1999, *Nat Med* 5: 1438; Shi, W., et al., 2006, *Gynecologic oncology* 103: 1054-1062]. sLeX(Sialyl Lewis X)는 다양한 암 세포 표면에서 발견되는데, sLeX 결합 모티프는 펩타이드-AHWIPRYSSPAT-결합 분석(peptide-AHWIPRYSSPAT-binding analysis)으로 동정되었다[Kwon, M., et al., 2002, *J Am Chem Soc* 124: 13996-13997]. TnC(Tenascin C)는 상이한 종류의 인간 종양에서 빈번하게 과발현되었다 [Wiksten, J. P., et al., 2003, *Oncology* 64: 245-250]. TnC-호밍 펩타이드는 sLeX와 같은 전략으로 페이지 디스플레이(phage display)로 동정되었다

<8> 항종양 효과에 대한 기대는, 암의 유전자 치료 분야까지 지속적으로 증대되고 있다[Li, C., et al., 2005, *Cancer gene therapy* 12: 913-925; Bazan-Peregrino, M., et al., 2007, *Cancer gene therapy* 14: 117-127]. 종양 혈관구조의 형성을 표적화하는 항신생혈관형성 치료(anti-angiogenesis therapy)는 일차 종양 형성과 전이된 종양 모두에서 암 치료의 매력적인 전략으로 여겨졌다[Folkman, J. et al., 1989, *Nature* 339: 58-61]. 항종양 효능을 위해서는, 지속적 수준의 신생혈관 억제제가 요구된다는 것을 제시하는 증거들과 함께, rAAV는 장기간의 항종양 효과를 획득하기 위한 적절한 벡터로 확인되었다 [Davidoff, A. M., et al., 2002, *Cancer research* 62: 3077-3083]. 그러나, 생체내로 rAAV를 전신 투여하면, 대부분의 바이러스는 간과 비장에 분포하게 되어, 그 적용이 제한받았다[Nathwani, A. C., et al., 2007, *Blood* 109: 1414-1421]. 베이커(Baker)와 공동 연구자들은 원하는 항성을 가지는 rAAV2를 이용하여 혈관 조직 (vascular tissue)으로의 표적화된 전달을 달성하였다[Work, L. M., et al., 2006, *Mol Ther* 13: 683-693; White, K., et al., 2007, *Gene therapy*; White, S. J., et al. 2004, *Circulation* 109: 513-519].

<9> 그러나, rAAV에 의해 매개된 형질도입 효율 (Transduction efficiency: TE)은 존재하는 중화항체들에 의하여 부정적인 영향을 받게 되는데, rAAV2에 대한 항체가 일반의 인간 집단에 매우 광범위하게 퍼져 있음을 시사하는 여러 발표들이 있었다 [Boissier, M. C., et al., 2007, *Hum Gene Ther* 18: 525-535; Blacklow, N. R., et

al., 1968, *Journal of the National Cancer Institute* 40: 319-327; Blacklow, N. R., et al., 1971, *American journal of epidemiology* 94: 359-366; Halbert, C. L., et al., 2006, *Hum Gene Ther* 17: 440-447]. 따라서, 유전자 전달체로서의 rAAV2의 잠재성은 생체내 적용, 특히 전신 투여시에는 심각하게 방해 받을 수 있다.

- <10> AAV2, 5 및 6에 대한 중화 항체를 측정한 최근 연구에 의하면, AAV5에 대해서는 최소 집단만이 혈청 양성을 보이므로, 천연의 항성을 유전적으로 조작하여 변경된 항성을 제공하기 위한 백본(backbone)으로서 rAAV5가 rAAV2의 유망한 대안이 될 수 있다는 것을 시사한다[Halbert, C. L., et al., 2006, *Hum Gene Ther* 17: 440-447]. rAAV2는 다른 AAV 혈청형과 비교하여 세포 면역을 유발하는 경향이 있는데 비하여 [Vandenberghe, L. H., et al., 2006, *Nat Med* 12: 967-971; Mingozi, F., et al., 2007, *Nat Med* 13: 419-422], 일반적인 인간 개체는 rAAV5에 대하여 보다 적은 혈청-양성을 보였다[Blacklow, N. R., et al., 1971, *American journal of epidemiology* 94: 359-366; Halbert, C. L., et al., 2006, *Hum Gene Ther* 17: 440-447]. 또한, 다양한 rAAV 혈청형의 생산을 최적화하는 동안, 그림(Grimm) 등은 rAAV5가 rAAV2보다 더 효율적임을 밝혔다 [Grimm, D., et al., 2003, *Mol Ther* 7: 839-850].

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <11> 지금까지 인 비트로(*in vitro*) 및 인 비보(*in vivo*)에서 대중적인 유전자 전달 벡터로 사용되어 왔지만 중화항체에 의한 심각한 면역반응이 유도되는 아데노-부속 바이러스 혈청형 2를 대신하여 상대적으로 안전한 혈청형 5를 유전자 전달 벡터로 사용하되, 보다 효율적으로 유전자 전달(gene delivery)에 사용하기 위하여, 특정 세포 또는 조직으로 표적화가 가능하게 하도록 하는 것이다.

과제 해결수단

- <12> 이를 위하여, 아데노-부속 바이러스 혈청형 5를 둘러싸고 있는 외피를 구성하는 캡시드 단백질의 특성과 기능을 개조시키는 방법으로 바이러스가 특정 세포로 표적화 되도록 하였다. 구체적으로, 바이러스 벡터의 캡시드 단백질 내부에 표적화 모티프 펩타이드를 삽입하여, 표적 분자를 인지하고 결합할 수 있는 개조된 표면 특성을 가지는 바이러스를 생성하는 벡터를 제작하였다.
- <13> 이하 본 발명을 자세히 설명한다.
- <14> 하나의 양태로서, 본 발명은 아데노-부속 바이러스 혈청형 5 유래의 바이러스 벡터로서, 캡시드 단백질의 내부 아미노산 잔기에 표적화 모티프 펩타이드가 삽입된 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 표적화된 재조합 바이러스 벡터에 관한 것이다.
- <15> 본 발명의 “바이러스 벡터”는 표적분자에 대하여 특이적 항성을 가지도록 기능과 특성이 개조된 캡시드 단백질을 발현하는, 따라서, 원하는 세포, 조직 및/또는 기관으로 치료 유전자 또는 유전 물질을 특이적으로 전달할 수 있는 특이성과 효율성이 개선된 아데노-부속 바이러스 혈청형 5 유래의 바이러스 벡터이다. 본 발명의 벡터는 바이러스 구조 단백질인 캡시드 단백질 중간에 표적화 모티프 펩타이드가 펩타이드 결합(peptide bond)을 통하여 한 가닥의 폴리펩타이드로 연결되어 있는 키메라(chimeric) 형태의 캡시드 단백질을 발현한다. 따라서, 본 발명의 벡터로부터 생성된 바이러스는, 삽입되는 펩타이드의 종류와 특성에 따라 표적 물질에 대한 항성을 가지는 외피를 가지게 되고, 펩타이드의 종류와 특성에 따라 특정 세포를 선택적으로 형질 도입시킬 수 있는 특성도 가지게 된다. 본 발명의 벡터는, 벡터에 삽입하는 표적화 모티프 펩타이드의 종류를 조절하여 목적인 바에 맞도록 바이러스의 항성과 표적화 특성을 손쉽게 조작할 수 있다.
- <16> 본 발명의 벡터는, 유전적 수준에서 재조합된 캡시드 단백질과 모티프 펩타이드가 하나의 폴리펩타이드로 발현이 되도록 펩타이드를 코딩하는 핵산서열이 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산서열 내에 삽입되어 있다.
- <17> 본 발명의 “표적화 모티프 펩타이드”는 특정 세포의 막 등에 존재하는 특이적으로 존재하거나 과량으로 존재하는 표적 분자를 특이적으로 인지 및/또는 결합할 수 있는 펩타이드로, 본 발명의 벡터에 삽입 가능한 표적화 모티프 펩타이드는 바이러스 생성능을 상실시키지 않고, 바이러스에 표적화 기능을 부여할 수 있는 모든 펩타이드를 포함한다.
- <18> 구체적으로, 본 발명의 표적화 모티프 펩타이드는 종양 세포에서 발현되는 분자, 예를 들어 시알릴 루이스 X (sialic Lewis X), 인테그린 (integrin) 또는 테나신 C(Tenascin C)를 특이적으로 인지 및/또는 결합하는 펩타

이드다. 보다 구체적으로, 시알릴 루이스 X를 특이적으로 인지하는 표적화 모티프 펩타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열, 인테그린을 특이적으로 인지하는 모티프 펩타이드는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열, 또는 테나신 C를 특이적으로 인지하는 모티프 펩타이드는 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 또는 서열번호 8의 아미노산 서열을 가진다.

<19> 상기 표적화 모티프 펩타이드의 크기는, 벡터에 삽입되어 바이러스로 생성될 때, 바이러스 복제능과 조립능의 상실없이 바이러스를 생성할 수 있는 크기로 제한된다. 바람직하게는 5 내지 25개의 아미노산, 보다 바람직하게는 7 내지 20개의 아미노산을 포함한다. 7 내지 20개의 아미노산 범위에 있는 다양한 크기의 펩타이드는 바이러스 복제능과 조립능의 상실없이 현저한 입자의 부유밀도를 가지면서 캡시드 단백질에 삽입이 가능하였다. 또한, 이 범위내에서는 삽입되는 크기와 바이러스 입자를 생성하는 효율성 사이에는 상관관계가 없었다. 본 발명의 이 결과는 이전에 측정되어 밝혀진 17개의 아미노산을 가지는 rAAV2보다 더 긴 크기이다 [Blacklow, N. R., et al., 1968, *Journal of the National Cancer Institute* 40: 319-327].

<20> 본 발명의 모티프 펩타이드는 바이러스 복제능과 조립능을 영향을 주지 않고 유전적으로 변형을 가할 수 있는 캡시드 단백질의 아미노산 잔기 부위에 삽입된다. 본 발명자들은 아데노-부속 바이러스 혈청형 5의 아미노산 444번과 578번 잔기의 양 루프가 바이러스 복제능과 조립능에 영향을 미치지 않고, 유전적으로 변형을 가할 수 있는 부위임을 밝혔다. 구체적으로, 본 발명자들은 rAAV5는 캡시드 영역, 444 또는 578 아미노산 잔기 부위가 외부 펩타이드의 삽입이 가능한 유전적으로 변형이 가능한 위치이고, 상기 위치로 제한된 크기의 표적화 모티프 펩타이드가 삽입된 돌연변이체는 야생형 바이러스 수준의 바이러스 생성능을 가지며, 펩타이드 삽입에 의해 유전적으로 변이된 바이러스는 재표적화되는 수용체의 특성에 따라 인간 암 세포를 형질 유도할 수 있음을 밝혔다.

<21> 또한, 본 발명의 벡터는, 당 벡터 제조 분야에서 통상적인 이루어지고 있는 수정, 변형, 및 응용이 가능하다.

<22> 본 발명의 벡터는, 세포, 조직 및 기관으로 전달 및 발현하고자 하는 하나 이상의 유전자를 코딩하는 핵산을 벡터에 삽입하여 의학적, 수의학적 분야에서 다양한 질병의 예방 및 치료의 목적으로 사용될 수 있다. 본 발명의 벡터에 삽입될 수 있는 유전자에는 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 약제감수성 유전자, 약제 내성 유전자, 리간드 단백질 및 수용체, 세포표면항원, 수용체 길항물질과 같은 다양한 생리활성 펩타이드, 이들의 유도체 등을 예로 들 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 또한, 표적 세포에서 유전자 발현을 조절하는 안티센스 핵산 또는 siRNA를 발현하는 핵산을 포함할 수 있다.

<23> 또 다른 양태로서, 본 발명은 아데노-부속 바이러스 혈청형 5 유래의 바이러스 벡터로서, 캡시드 단백질의 내부 아미노산 부위에 표적화 모티프 펩타이드가 삽입된 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 표적화된 재조합 바이러스 벡터를 이용하여 표적 세포 특이적으로 유전자를 전달하는 방법에 관한 것이다.

<24> 구체적으로, 상기에서 언급한 세포, 조직 및/또는 기관으로 전달 및 발현하고자 하는 하나 이상의 유전자를 코딩하는 본 발명의 표적화된 재조합 바이러스 벡터는 당업계에서 아데노-부속 바이러스를 복제하는 방법, 예를 들어 아데노바이러스, 백시니아 바이러스 또는 허피스 바이러스 등의 헬퍼 바이러스(helper virus) 등을 이용하여 순도, 안정성, 형태 및 감염력 등을 고려한 조건에서 바이러스로 증식시킬 수 있다.

<25> 상기 아데노-부속 바이러스 혈청형 5 바이러스는, 개체에서 분리한 세포에 이입한 후 개체에게 세포를 재이식하는 방법의 엑스 비보 (*ex vivo*)적 방법과 개체에게 직접 주사하는 인 비보 (*in vivo*)적 방법으로 인간뿐만 아니라 바이러스에 의해 감염능을 가지는 동물에게도 유전자 전달체로 사용가능하다.

<26> 본 발명의 벡터 및 바이러스는, 혈우병, 경상적혈구빈혈, 화학요법에 의한 빈혈 등의 혈액이상 질환, 알츠하이머, 파킨슨씨병, 다발성경화증, 헌팅턴병 및 유전자결함 정신질환 등의 중추신경계 질환, 낭포성섬유증, 당뇨병, 성장호르몬결핍증 및 골다공증 등의 대사이상 질환, 다발성경화증, 건선 및 류마티스성 질환 등의 자가면역 질환, HIV감염, 인플루엔자, 단순포진, 유두종바이러스 및 마이코박테리아 등의 감염증과 종양 등의 다양한 질환의 치료에 사용될 수 있다.

<27> 본 발명의 바이러스는 허용 가능한 약제학적 담체와 함께 적절한 제제로 제형화되어 다양한 경로, 예를 들어, 경구 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 될 수 있다.

효 과

<28> 본 발명의 벡터로부터 생성된 아데노-부속 바이러스 혈청형 5 돌연변이체는 바이러스 생성능이 상실되지 않은

채 야생형 바이러스 수준의 바이러스 생성능을 보였으며, 삽입된 모티프 펩타이드의 종류와 특성에 따라 특정 세포에 대한 특이적인 형질유도능을 보였다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <29> 이하, 본 발명을 하기 실시예에 좀더 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.
- <30> <실시예 1: 재료 및 방법>
- <31> 1-1세포 배양 및 rAAV 감염
- <32> 293T 와 인간 뇌종양 U251 세포는 각각, 하버드 메디칼 스쿨의 Dr. Jung과 피츠버그 대학의 Dr. Lee로부터 제공 받았다. 다른 인간 암 세포 (hepatocellular SK-Hep1, cervical HeLa, breast MDA-MB-231 및 MDA-MD-435S, glioblastoma U-251, U87-MG, U118-MG, colon HCT-116)는 ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA) 로부터 구입하였다. 세포는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum), L-글루타맥스 (L-glutamax) (2 mM), 페니실린(penicillin) (100 IU/ml) 및 스트렙토마이신(streptomycin) (50 µg/ml)가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다. 유전자 전달을 위하여, 세포를 다양한 MOI(multiplicities of infection)의 rAAV로 처리하였다. 대조구로 사용된 Mock-처리 세포는 rAAV를 처리하지 않은 세포이다. GFP 발현은 도립 형광 현미경 (inverted fluorescent microscope: Leica DMIRB, Leica, Germany) 으로 관찰하고 사진을 찍었다.
- <33> 1-2 바이러스 플라스미드 제조
- <34> pR2C5와 pHpa-trs-SK는 Dr. High로부터 획득하였으며 아데노바이러스 pXX6 헬퍼플라스미드 (adenoviral pXX6 helper plasmid)는 Stratagene (La jolla, CA, USA)으로부터 획득하였다. pcDNA3.1(+)-sc39TK는 도널드 비 콘 (Donald B Kohn: University of Southern California, Keck School of Medicine, University of Los Angeles)으로부터 제공받았다. pHpa-trs-SK는 scAAV2 (self-complementary AAV2) 게놈 내에 EGFP 발현 카세트가 구성되어 있다.
- <35> pSp72-R2C5 플라스미드는 pR2C5의 4.2-kb의 *KpnI-XbaI* 단편을 pSp72 벡터의 *KpnI-XbaI* 부위로 서브클로닝하여 제조되었다. 그리고, 서브클로닝을 쉽게 하기 위하여, pSp72-R2C5의 rAAV5 VP1-인코딩 서열 코돈의 교체 없이 1210 bp 에서 1215 bp 의 *SnaBI* 부위를 제조사(Stratagene, La Jolla, California)에서 기술한 바와 같이 QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit를 이용하여 생성하였고, 이 플라스미드를 pSp72-R2C5-*SnaBI*으로 명명하였다. pSp72-R2C5에서 PCR 생성물의 1.0-kb의 *XbaI-SnaBI* 단편은 서열번호 9과 10의 프라이머를 이용하여 획득되었다.
- <36> 플라스미드 pGEM-T easy-Cap5은 pR2C5의 1.0 kb *XbaI-SnaBI* 단편을 pGEM®-T Easy 벡터(Promega, Madison, WI)의 삽입 부위의 3' T overhangs로 TA 클로닝하여 획득하였다. 각 돌연변이체를 위한, QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis의 PCR 단편은 주형으로 pGEM T-easy-Cap5 플라스미드를 이용하고 각각의 두 프라이머를 이용하여 제조하였다. 하나의 프라이머(Forward)는 삽입부위의 VP1 유전자 상류(upstream)에 속하는 15 뉴클레오타이드 이상과 모티프 펩타이드의 5' 말단을 코딩하는 일부 뉴클레오타이드를 포함하고, 다른 하나의 프라이머(Reverse)는 삽입부위의 캡(cap) 유전자 하류(downstream)에 속하는 15 뉴클레오타이드 이상과 모티프 펩타이드의 3' 말단을 코딩하는 일부 뉴클레오타이드를 포함한다. 아래의 서열번호 11과12, 서열번호 13와 14, 서열번호 15과 16, 서열번호 17와 18, 서열번호 19과 20, 서열번호 21과 22, 서열번호 23와 24, 서열번호 25과 26의 프라이머들이 각각 사용되었다. 1.0-kb의 Tn3 PCR 단편은 주형 pGEM-Cap5-Tn1에서 획득하였다. PCR 산물은 연결되어, XL-Blue *E.coli* (Stratagene, La Jolla, California)에서 증폭하여 서열 분석을 하였다.
- <37> 각각의 pSp72-R2C5 돌연변이 플라스미드는 각 pGEM-Cap5 돌연변이 플라스미드의 모티프 펩타이드-인코딩 서열을 포함하는 1.0-kb의 *SnaBI-XbaI* 단편을 pSp72-R2C5-*SnaBI*의 *XbaI* 과 *SnaBI* 부위로 서브클로닝하여 제조되었다.
- <38> pSp72-scAAV2-eGFP는 pHpa-trs-SK의 2.3-kb의 *PvuII-PvuII* 단편을 pSp72 벡터의 *BglII* 와 *HindIII* 부위로 평활-말단 서브클로닝 (blunt-end subcloning)하여 제조되었고, 따라서, EGFP 단백질을 코딩하는 전장의 scAAV2(self-complementary AAV2) 게놈을 포함한다.
- <39> pSp72-scAAV2-sc39TK는 pcDNA3.1(+)-sc39TK에서 sc39TK 유전자의 *BamHI-Sa/I* PCR 단편을, 대응하는 단편이 제

거쳐어진 pSp72-scAAV2-eGFP의 *Bam*HI-*Sal*I 부위로 서브클로닝하여 제조되었다.

<40> **1-3 rAAV의 생성과 적정**

<41> scrAAV(self-complementary rAAV) 벡터의 제조는[Wiksten, J. P., et al., 2003, *Oncology* 64: 245-250], 간략히, 293T 세포로 DNA 플라스미드 (야생형의 rAAV5와 AAV5-sLeX1, -sLeX2, -RGD1, -RGD2, -TnC1, -TnC2, -TnC3, -TnC4의 돌연변이체 바이러스 제조를 위하여, 각 pSp72-R2C5, pSp72-R2C5-sLeX1, -sLeX2, -RGD1, -RGD2, -TnC1, -TnC2, -TnC3, -TnC4와 pSp72-scAA2-eGFP AAV2 genome plasmid 및 helper plasmid)를 형질전환시켰다. 연속적으로 2번 CsCl 구배 초원심분리하여 rAAV 순수 개체를 준비하였다. 1 mM MgCl₂ 와 10% 솔비톨을 포함하는 50 mM Tris buffer (pH 7.8) 로 투석한 후, 정제된 rAAV를 나누어서 -80°C에 보관하였다. rAAV 입자 총수는 TaqMan-기반 실시간 PCR 분석(iQTM supermix, Bio-Rad, Hercules, CA)을 서열번호 27와 28의 프라이머와 CMV(cytomegalovirus) 프로모터를 표적화하는 서열번호 29의 TaqMan 프로브 (5' -FAM CCTGGCTGAC CGCCCAACGAC TAMRA-3' : 프로브의 5'말단은 FAM 이, 3'말단은 TAMRA 가 결합된 형태로 사용)를 사용하여 실시하여 계산되었다[Moon, M. S., et al., 2005, *Intervirology* 48: 153-160].

<42> **1-4 유세포측정법 (Flow cytometric analysis)**

<43> 세포 표면 마커를 분석하기 위하여, 세포를 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 FITC (Chemicon, Temecula, CA)로 부착된 αVβ3와 αVβ5에 대한 일차 항체로 실온에서 30 분 배양하고, 세포를 PBS 버퍼로 3번 세척하였다. 세포 표면의 알파2,3-시알릭산(α2,3-sialic acids)을 분석하기 위하여, 세포를 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 바이오틴 (Vector laboratories, Burlingame, CA)으로 부착된 일차 MAL II 렉틴(lectin)으로 실온에서 30분간 염색하고, PBS로 3번 세척한 후, 2차 스트렙타비딘-FITC (Vector laboratories, Burlingame, CA)로 실온에서 30분간 배양하였다.

<44> 형질도입효율 (transduction efficiency: TE)와 형광강도평균(means of fluorescence intensity: MFI)를 측정하기 위하여, GFP 유전자를 가지는 scAAV로 형질도입된 세포와 면역-복합체 형성 세포(immune-complexed cell)를 모우고 원심분리하는 방법으로 PBS에서 세척하고 4% 파라포름알데하이드를 포함하는 차가운(ice-cold) PBS로 고정하였다. 형광-양성 세포 비율과 MFI는 유세포측정법과 CellQuest Plus program (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA)을 이용하여 측정하였다. GFP 양성 세포의 백분율은 비감염 대조구 세포의 99.9% 영역 이상인 분획으로 정의되었다.

<45> **1-5 RGD 펩타이드 경쟁 분석 (RGD peptide competition assay)**

<46> 펩타이드 처리 배양전에 HeLa, SK-Hep1, 및 U87-MG 세포를 48-웰 플레이트에서 24시간 배양하였다. 세포들은 2% FBS와 200, 100, 50, 20, 10 uM의 활성 RGDS (active RGDS)(Sigma, Steinheim, Germany)와 비활성 RGS (sham RGS) (Sigma, Steinheim, Germany) 펩타이드를 함유한 새 배지들에서 30분간 실온에서 배양하였다. 그 후, rAAV5-GFP 또는 GFP 발현 카세트(virus titers at approximate 50% transduction)를 가지는 돌연변이체를 세포에 4시간 동안 처리하였다. 세포에서 GFP 발현을 최대화시키기 위하여, 아데노바이러스 타입 5 (PFU 2 or 5 per cell) 를 rAAV5 벡터와 함께 추가하였다. 세포를 PBS로 3번 세척하였다. 형질도입으로부터 48시간 후에, 처리구 또는 비처리구의 그룹의 각 세포는 펠렛으로 되고, 200μl PBS 또는 4% 파라포름알데하이드를 포함하는 PBS 200 μl에서 재현탁시켰다. GFP-양성 세포는 유세포측정법으로 측정하였다.

<47> **1-6 TnC의 RT-PCR**

<48> 제조사의 설명서에 기재된 바와 같은 방법으로 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 HCT-116, U251, U87-MG, 및 U118-MG에서 RNA를 분리하였다. TnC 선택적 스프라이싱 형태 (alternative splicing form)의 발현을 검출하고자, 서열번호 30의 TNfn 5 정방향 프라이머와 서열번호 31의 TNfn A1 역방향 프라이머로 RT-PCR을 하였고, TNC C-말단 형태의 발현을 검출하고자 서열번호 32의 TNfbg 정방향 프라이머와 서열번호 33의 TNfbg 역방향 프라이머를 RT-PCR에 사용하였다. 각 RT-PCR 반응에는 2μg의 RNA가 사용되었고, 역전사 반응은 역전사효소(1U/μl; Qiagen, Crawley, West Sussex, UK)로 37°C에서 1시간 수행하였다.

<49> **<실시예 2: 유전학적으로 변형된 캡시드를 가지는 rAAV5의 제조와 생성>**

<50> rAAV5를 재표적화시키기 위하여, 표1에서 기재된 바와 같이 3개의 호밍 모티프에서 유래한 8개의 다른 펩타이드 서열을 이용하였다. VP1의 아미노산 444 또는 578 위치에서(도 1b, d) 에피토프를 삽입한 연구는, 이전의 연구들, 즉 i) 다양한 펩타이드 모티프를 삽입한 유전적으로 변형된 rAAV2의 제조 (도. 1c) [Huttner, N. A., et

al., 2003, *Gene therapy* 10: 2139-2147], ii) AAV5 크라이오-구조 (AAV5 cryo-structure) 분석[Walters, R. W., et al., 2004, *J Virol* 78: 3361-3371], 및 iii) 벡터 NTI 에서 수행된 AAV 혈청형의 VP1 영역의 정렬에 기반하여 수행하였다. rAAV5 캡시드의 구조 시뮬레이션에 따르면, 표적화 펩타이드를 삽입하여도 지탱될 정도로, 두 아미노산 위치가 다른 도메인에서 튀어나왔으며 유연하다는 것이 밝혀졌다 (도. 1a). 또한, 바이러스 표면에서 삽입 부위의 위치를 컴퓨터-모델링(computer-modeling)으로 예측하였다 (도 1b; 붉은색; 444, 노란색; 578).

<51> 돌연변이체의 바이러스 입자 증폭능을 분석하였으며, 그 결과, 바이러스 대부분은 생성 정도가 야생형 rAAV5만큼 효율적이었다(표 1). 바이러스 생산 역가는 1ml당 7.3×10^{10} 내지 2.8×10^{11} 의 바이러스 게놈 복제수(virus genome copies)의 범위에 있었다. 뉴클레아제 벤조아제 (nuclease benzonase) 처리 후에도, 바이러스 입자는 형질유도능이 손상되지 않은 채로 유지되었다. 이는 바이러스 조립(assembly)이 효율적으로 일어났으며 그에 따른 바이러스 입자가 모체(parental type)와 거의 비슷한 것을 의미한다. CsCl₂ 구배에서 각 바이러스의 부유 밀도는 1.365 내지 1.385 g/ml의 좁은 범위내에 존재하였으며, 야생형 보다는 (1.394 ± 0.007 g/ml) 살짝 가벼웠다. 감염성의 바이러스는 오직 이러한 주 피크에서만 검출되었다. 투사전자현미경(transmission electron microscopy) 결과는, 돌연변이체들이 구조적으로 안정성을 유지하고 있음을 암시한다(도 2). rAAV5와 돌연변이체 sLeX2의 평균 직경은 각, 22.2 ± 1.3 nm와 23.0 ± 1.5 nm로 유사하였다. 이를 모두 종합할 때, 짧은 펩타이드를 VP1의 444 와 578 위치에 삽입하여 rAAV5를 유전적으로 변형하는 것이 가능하다는 것을 의미한다.

표 1

Motives	Viruses	Sites	Homing peptide	Amino acid length	Titer (VG/ml)	Relative titer	Buoyant density (g/ml)
	Wild-type	-	-	-	1.3×10^{11}	1.0	1.394 ± 0.007
sLeX	sLeX1	444	AHWIPRYSSPAT	12	7.3×10^{10}	0.6	ND
	sLeX2	578	G-AHWIPRYSSPAT-GG	15	9.8×10^{10}	0.8	1.385
RGD	RGD1	578	G-CDRCGDCFC-	10	1.2×10^{11}	0.9	1.380
	RGD2	578	G-CDRCGDCFC-GLS	13	1.0×10^{11}	0.8	ND
TnC	TnC1	578	GCDCG-FHKHK-SCFC	14	1.1×10^{11}	0.9	ND
	TnC2	578	G-FHKHKS	7	1.9×10^{11}	1.4	ND
	TnC3	578	GCDCG-FHKHKSPALSPV-CFC	20	2.4×10^{11}	1.9	ND
	TnC4	578	G-FHKHKSPALSPV	13	2.0×10^{11}	1.5	ND

VG: viral genome. Genome copies were determined by real-time PCR as described in Materials and Methods. Relative titer shows the ratio of the mutant virus titer to wild rAAV5 titer. Buoyant density of CsCl₂ gradients means the CsCl₂ density of the major peak of rAAV5 mutants vectors purified and fractioned.

<52>
<53> 야생형과 돌연변이체 바이러스의 바이러스 입자 생산능 비교

<54> <실시예 3 RGD-결합 모티프(RGD-binding motif)를 발현하는 rAAV5에 의한 인간 암 세포의 형질도입>

<55> 인테그린($\alpha V \beta 3$ 또는 $\alpha V \beta 5$)에 대한 RGD rAAV5의 형성은 다양한 인간 암 세포를 rAAV5 또는 GFP 이식유전자를 인코딩하는 RGD 바이러스로 감염시키고 TE를 측정함으로써 평가하였다. RGD1 바이러스에 의한 형질도입 특징이 RGD2 보다 월등하였으므로, 나머지 연구는 RGD1으로 수행하였다. MOI=5000에서, 대부분의 HeLa와 U87-MG은 형질도입되었으며 TE는 각각 67.51 ± 1.71 % 및 62.90 ± 7.01 %였다 (표 2). MDA-MB-231은 약하게 형질도입되는 반면에, MDA-MB-435S와 SK-Hep1도 형질도입되었다. 유세포 측정 결과는, 이러한 세포들은 모두 rAAV5의 주된 숙주 수용체로 알려진 알파2,3-시알릭산에 양성을 나타내며, 따라서, 높은 형질도입을 나타내는 것을 의미한다. 반대로, 이러한 세포들은 $\alpha V \beta 3$ 인테그린 또는 $\alpha V \beta$ 인테그린 발현 프로파일에서 크게 차이가 났다. MDA-MB-231이 양 타입의 인테그린에 모두 음성인데 비하여, RGD 바이러스로 형질도입된 세포는 하나 또는 양 타입의 인테그린을 발현하였고, 이는 MDA-MB-231 세포가 RGD 바이러스 증식을 허용하지 않는 것을 입증하는 것이다. RGD1 바이러스의 RGD-4C 펩타이드가 인테그린과 결합할 수 있는지 여부를 확인하고자, 세포로 형질도입하기 전에 RGDS 펩타이드로 RGD1 바이러스를 배양하여 경쟁 분석을 수행하였다 (도 3). RGD1 바이러스에 의한 유전자 전달은 펩타이드 농도 의존적 방식으로 RGDS 펩타이드에 의해 현저하게 감소하였지만, 비특이적 RGES 펩타이드(non-specific sham RGES peptide)에 대해서는 감소하지 않았다. HeLa, SK-Hep1 및 U87-MG 세포의 형질도입은, RGDS 펩타이드를 처리하지 않았을 때와 비교하여, 200, 50uM에서 각각 63.28 ± 5.37 %, 85.08 ± 8.92 %, 및 52.60 ± 16.83 %로 감소하였다. 비특이적 펩타이드 RGES는 RGD1 바이러스에 의한 TE를 감소시키지 않았다. 예측한 바와 같이, 야생형 바이러스의 TE는 펩타이드에 의해 방해받지 않았다. 종합할 때, RGD1 바이러

스가 인테그린-의존적 방식으로 인간 암 세포를 감염하는 것을 증명한다.

표 2

Cells	FC analysis			TE		Relative TE (% of WT)	RGD Competition* (%)
	α V β 3	α V β 5	α 2,3-sialic acid	RGD1 (MOI 5,000)	WT (MOI 100)		
HeLa	-	+	++	67.51 $\pm$ 1.71	93.98 $\pm$ 3.26	0.23	63.28 $\pm$ 5.37
MDA-MB-231	-	-	+	6.54 $\pm$ 3.44	52.13 $\pm$ 17.87	0.01	ND
MDA-MB-435S	+++	+++	+	20.12 $\pm$ 6.66	33.88 $\pm$ 11.60	0.50	ND
SK-Hep1	-	++	+	14.05 $\pm$ 6.19	52.31 $\pm$ 11.12	0.13	85.08 $\pm$ 8.92
U87-MG	+	-	+	62.90 $\pm$ 7.01	86.69 $\pm$ 5.68	0.53	52.60 $\pm$ 16.83†

†Competition assay of rAAV5-RGD1 with 50 μ M of RGDs peptide in U87-MG cells

*Relative inhibition (%) of rAAV5-RGD1 infection with 200 μ M of RGDs peptide

<56>

<57>

rAAV-RGD1 및 rAAV 바이러스의 형질도입과 인간 암 세포에서의 인테그린 발현 분석

<58>

<실시예 4: rAAV5-TnC 변이체에 의한 인간 암 세포의 형질 도입>

<59>

테나신 C를 통한 4 종류 TnC 바이러스의 형질도입 잠재능을 조사하고자, TnC-양성 또는 TnC-음성 인간 암 세포에서 TE를 측정하였다. TnC3과 TnC4에 의해서 TnC-양성 세포는 형질도입되었다. TnC 바이러스들 중에서, TnC4 바이러스는 다른 바이러스보다 우수하게 세포를 형질도입할 수 있었다. 표 3에서 볼 수 있는 바와 같이, TnC-음성 HCT-116은 야생형 바이러스에 의해 효율적으로 형질도입되는 반면에, TnC 바이러스에 의해서는 형질도입되지 않았다. U87-MG 세포는 TnC4 바이러스에 의해 높은 TE를 나타내었다. RGD 바이러스에 대한 데이터와 함께, 이런 사실들은 rAAV5 VP1의 루프 3에 새로 삽입된 펩타이드가 돌연변이체 바이러스가 대응하는 표면 수용체를 인지할 수 있도록 인도하는 것을 시사하는 것이다

표 3

	TE		
	TnC expression	TnC4 (MOI 10,000)	scAAV5 TE (MOI 1,000)
U-251	+	+	+++
U87-MG	+	++	+++
U118-MG	+	+	++
HCT-116	-	-	++

<60>

<61>

테나신 C-양성 및 테나신 C-음성 암 세포에서 TnC4 바이러스의 형질도입

산업이용 가능성

<62>

본 발명의 아데노-부속 바이러스 혈청형 5-유래 표적화 벡터는 안전성과 선택적으로 형질도입능이 우수한 벡터로, 의학적 및 수의학적 분야에서, 혈액이상 질환, 중추신경계 질환, 대사이상 질환, 자가면역 질환, 감염증과 종양 등의 다양한 질환의 예방 및 치료에 폭넓게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<63>

도 1은 돌연변이 AAV5 캡시드 서브유닛의 구조와 바이러스 표면의 토폴로지를 나타내는 것으로, (a) AAV2 REP(rep coding gene)와 VP1 CAP(VP1 capsid coding gene)를 포함하는 pSp72-R2C5 플라스미드의 개략도를 보여주고, (b) 아미노산 444번 위치에서의 rAAV5-sLeX1의 표면(붉은색)과 아미노산 578번 위치에서의 rAAV5-sLeX2 표면(노란색)을 리본으로 보여주며, (c) AAV2 (파란색)와 rAAV5-RGD1(초록색)의 백본을 비교한 것으로, 붉은색 루프 영역은 아미노산 578 부위에 삽입된 RGD-4C 펩타이드 도메인을 나타내며, 이 영역은 색을 가지는 구와 막대 형태로 확대하여 나타내었으며, (d) 60개의 캡시드 서브유닛에 의해 정20면체형으로 조립된 rAAV5-RGD1를 보여주는 삽화로, 표현된 모든 표면은 PyMOL을 사용하여 제작하였고, 붉은색 단편은 578 위치에 있는 RGD-기반

호밍 모티프를 나타낸다.

<64>

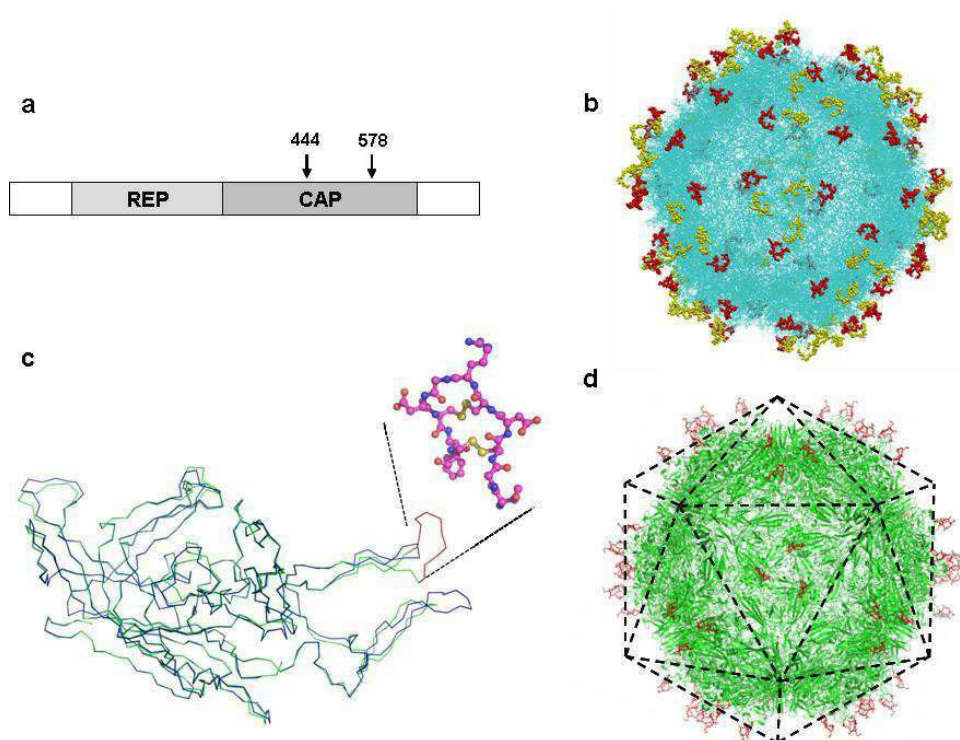
도 2는 rAAV5 바이러스와 rAAV5-sLeX2 바이러스의 투과 전자 현미경 사진으로, (a) 야생형 rAAV5 입자를 보여주고, (b) 돌연변이 rAAV5-sLeX2 입자를 보여준다. 모든 바이러스 입자는 2 mM MgCl₂과 2% 소비톨을 포함하는 10mM Tris 완충액(pH7.9)에 있었다.

<65>

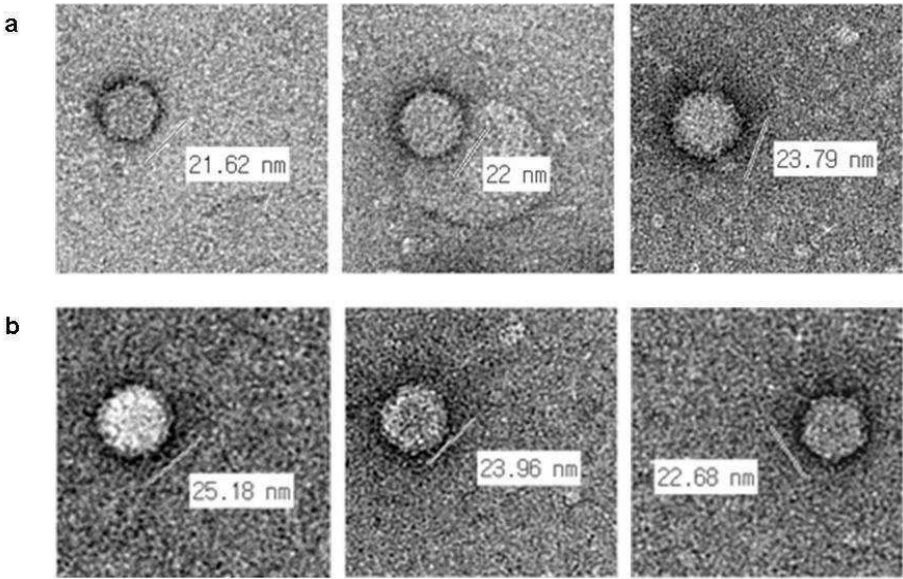
도 3은 인테그린-양성 암 세포에서 rAAV5-RGD1의 형질도입의 RGDS 펩타이드-매개 억제를 보여주는 것으로, HeLa 세포, SK-Hep1 세포 및 U87-MG 세포를 각 MOI 10, 100, 및 200의 rAAV5-eGFP 또는 각 MOI 5,000, 10,000, 및 5,000의 rAAV5-RGD1로 감염시켰다. 세포를 RGDS 또는 비-특이적 RGEs 펩타이드를 처리하여 배양하였다. (a) 48시간 후, 유세포 측정법으로 GFP 양성 세포를 측정된 결과이며, (b) U87-MG의 사진이다. 모두 (n=3, *: $p < 0.05$, † : $p < 0.05$) 조건이다.

도면

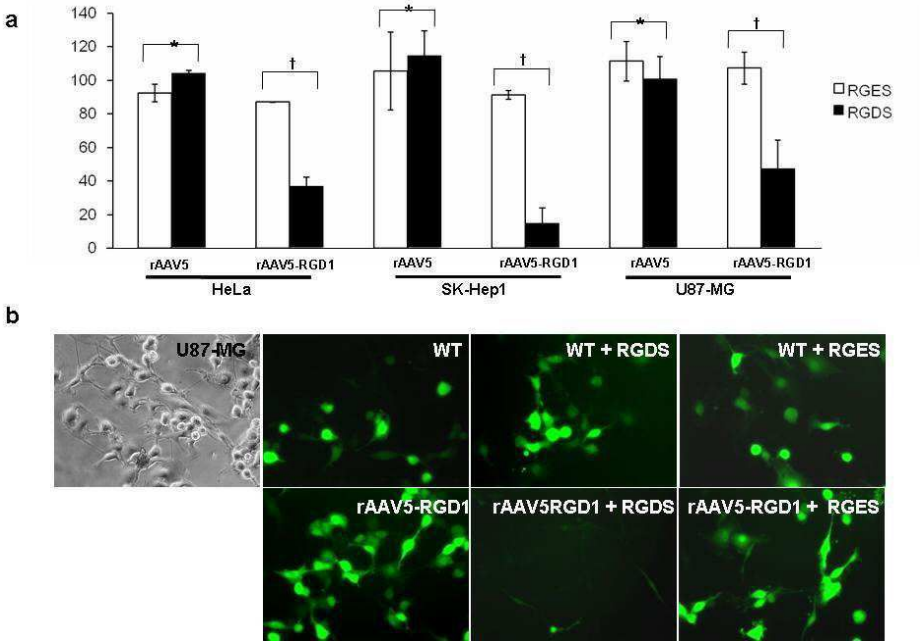
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
Industry-Academic Cooperation Foundation, Dankook University
- <120> Adeno-Associated Virus Serotype 5 Vector for Targeted Gene
Delivery

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide sLeX1

<400> 1

Ala His Trp Ile Pro Arg Tyr Ser Ser Pro Ala Thr

1

5

10

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide sLeX2

<400> 2

Gly Ala His Trp Ile Pro Arg Tyr Ser Ser Pro Ala Thr Gly Gly

1

5

10

15

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide RGD1

<400> 3

Gly Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys

1

5

10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide RGD2

<400> 4

Gly Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly Leu Ser
1 5 10

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide TnC1

<400> 5

Gly Cys Asp Cys Gly Phe His Lys His Lys Ser Cys Phe Cys
1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide TnC2

<400> 6

Gly Phe His Lys His Lys Ser
1 5

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide TnC3

<400> 7
 Gly Cys Asp Cys Gly Phe His Lys His Lys Ser Pro Ala Leu Ser Pro
 1 5 10 15

Val Cys Phe Cys
 20

<210> 8
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> peptide TnC4

<400> 8
 Gly Phe His Lys His Lys Ser Pro Ala Leu Ser Pro Val
 1 5 10

<210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cap5 XbaI primer

<400> 9
 ggtcgactct agagaccaca agagg 25

<210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cap5 SnaBI primer

<400> 10
tgagtttacg tacaacttg agg 23

<210> 11
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sLeX1-Forward

<400> 11
tacagctccc ccgccaccac tggcggagtc cagttcaac 39

<210> 12
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sLeX1-Reverse

<400> 12
tctggggatc cagtgggcgt tattgtgct cacgaagcg 39

<210> 13
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sLeX2-Forward

<400> 13
agctcccccg ccaccggagg cactgcccc gcgaccggca cgtacaacc 49

<210> 14
<211> 48
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sLeX2-Reverse

<400> 14

gtatctgggg atccagtggg ctccggtgga gctctggttg ttggtggc

48

<210> 15

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RGD1-Forward

<400> 15

cgacagtcac agccggtgga gctctggttg tt

32

<210> 16

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RGD1-Reverse

<400> 16

aggcgactgt ttctgtactg ccccgcgac c

31

<210> 17

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RGD2-Forward

<400> 17

tcgcctcgac agtcacagcc ggtggagctc tggttgtt 38

<210> 18
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RGD2-Reverse

<400> 18
ctgtttctgt ggctgtcaa ctgccccgc gacc 34

<210> 19
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TnC1-Forward

<400> 19
atgaaagccg caatcgagc cggaggagct ctggtt 36

<210> 20
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TnC1-Reverse

<400> 20
aaacataaaa gctgcttttg cactgcccc gcgacc 36

<210> 21
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TnC2-Forward

<400> 21
tatgaaagcc ggtggagctc tggtt 25

<210> 22
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TnC2-Reverse

<400> 22
aacataaaag cactgcccc gcgacc 26

<210> 23
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TnC3-Forward

<400> 23
cagcgccggg cttttatgtt tatg 24

<210> 24
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TnC3-Reverse

<400> 24

agcccggtgt gcttttgac tgcc 24

<210> 25
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TnC4-Forward

<400> 25
 cttttatggt tatgaaagcc ggtggagctc tgggt 35

<210> 26
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TnC4-Reverse

<400> 26
 cccggcgctg agcccggtga ctgccccgc gacc 34

<210> 27
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> forward primer for Real-Time PCR

<400> 27
 cgttacataa cttacggtaa atg 23

<210> 28
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> reverse primer for Real-Time PCR

<400> 28
 atacgtcatt attgacgtca atg 23

<210> 29
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TaqMan probe

<400> 29
 cctggctgac cgcccaacga c 21

<210> 30
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TNfn 5 forward primer

<400> 30
 ccctgctctg gaagacacc 19

<210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TNfn A1 reverse primer

<400> 31

ataaggcgta gcagccttga 20

<210> 32
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TNfbg forward primer

<400> 32
 ggtacagtgg gacagcaggt g 21

<210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TNfbg reverse primer

<400> 33
 aactggattg agtggttcgtg g 21