(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0056968
(43) 공개일자 2009년06월03일

(51) Int. Cl.
C12N 5/08 (2006.01) *C12N 5/00* (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-7002273
(22) 출원일자 2009년02월04일
심사청구일자 2009년02월04일
번역문제출일자 2009년02월04일
(86) 국제출원번호 PCT/KR2007/001577
국제출원일자 2007년03월30일
(87) 국제공개번호 WO 2008/120832
국제공개일자 2008년10월09일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교
(72) 발명자
박국인
서울특별시 서초구 잠원동 52 신반포18차아파트 336-803
(74) 대리인
이희숙

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) SMAC을 분비하는 인간 신경줄기세포, 이의 제조방법 및용도

(57) 요 약

본 발명은 SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포, 이의 제조방법 및 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 SMAC을 암호화하는 핵산으로 형질전환된, SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포, 이의 제조방법 및 용도에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 SMAC을 암호화하는 핵산으로 형질전환된, SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포는 세포독성을 유발하지 않고 플레이트상에서 계속 미분화상태로 증식 및 성장하며, 생체 내외에서 신경원세포, 희소돌기아교세포 및 성상세포와 같은 신경세포로 분화할 수 있는 능력을 가진다. 또한 본 발명의 신경줄기세포는 인간의 생체 내에서 SMAC를 분비하여 TRAIL의 작용을 상승적으로 보조하여 종양세포의 아폽토시스를 유발하고 종양 용적의 감소를 유도한다. 따라서 본 발명의 신경줄기세포는 종양의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

SMAC을 암호화하는 핵산으로 형질전환된, SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 SMAC은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 형질전환은 서열번호 2의 SMAC을 암호화하는 핵산이 삽입된 바이러스 벡터에 의해 매개되는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포.

청구항 4

제4항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 분비 신호 서열(secretion signal sequence) 및 단백질 형질도입 도메인(protein transduction domain)을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 허피스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 및 아비폭스바이러스 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 분비 신호 서열은 Igκ-체인 리더(chain leader)인 것을 특징으로 하는 신경줄기세포.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 단백질 형질도입 도메인은 HIV-1(human immunodeficiency virus type 1) TAT인 것을 특징으로 하는 신경줄기세포.

청구항 8

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 CAG 프로모터(CAG promoter region)를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포.

청구항 9

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 도 6a에 도시된 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포.

청구항 10

(a) 분비 신호 서열, 단백질 형질도입 도메인 및 SMAC을 암호화하는 핵산이 순차적으로 연결된 DNA 구조물(construct)을 포함하는 재조합 바이러스 벡터를 제조하는 단계;

(b) 상기 재조합 바이러스 벡터를 바이러스 생산 세포주에 형질감염시켜 SMAC 발현 재조합 바이러스를 제조하는 단계; 및

(c) 상기 SMAC 발현 재조합 바이러스로 인간의 신경줄기세포를 감염시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제1항의 신경줄기세포를 제조하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 분비 신호 서열은 Igκ-체인 리더(chain leader)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 단백질 형질도입 도메인은 HIV-1(human immunodeficiency virus type 1) TAT인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 SMAC은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 허피스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 및 아비폭스바이러스 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제10항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 CAG 프로모터(CAG promoter region)를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제10항에 있어서, 상기 재조합 바이러스 벡터는 도 6a에 도시된 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제10항에 있어서, 상기 인간의 신경줄기세포는 인간 태아의 뇌 조직으로부터 얻은 세포를 신경줄기세포 성장인자가 첨가된 배지에서 배양하여 제조된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 신경줄기세포 성장인자는 bFGF(fibroblast growth factor-basic), LIF(leukemia inhibitory factor) 및 헤파린(heparin)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제1항의 신경줄기세포 및 TRAIL 분비 인간 신경줄기세포를 포함하는 종양 치료용 약학적 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 종양은 신경교종, 뇌수막종, 뇌하수체선종, 수아세포종, 전이성 뇌종양, 청신경초종, 전립선암, 악성 흑색종 및 신경아세포종으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 21

제1항의 신경줄기세포 및 TRAIL 분비 인간 신경줄기세포를 이를 필요로 하는 개체에 유효한 양으로 투여하는 것을 포함하는 종양의 치료 방법.

청구항 22

종양 치료제를 제조하기 위한 제1항의 신경줄기세포 및 TRAIL 분비 인간 신경줄기세포의 용도.

명 세 서

기 술 분 야

<1> 본 발명은 SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포, 이의 제조방법 및 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 SMAC을 암호화하는 핵산으로 형질전환된, SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포, 이의 제조방법 및 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 신경줄기세포란 주로 신경계에 존재하는 원시세포로서 미성숙, 미분화된 상태로 계속 증식하는 자가 갱신(self-

renew)을 보이고, 신경원세포(neuron) 및 신경교세포(glia)로 분화하는 분화의 다능성(multipotency)을 보이는 세포로 정의된다. 신경줄기세포는 인간을 포함한 포유동물의 태아 신경계 전반에 걸쳐 다양한 해부학적 부위에서 존재하고, 최근에는 태아뿐만 아니라 성체의 신경계에서도 신경줄기세포가 존재하며, 일생을 통하여 신경줄기세포는 뇌의 특정 부위에서 계속 증식하면서 새로운 신경세포를 생성한다. 이외에도 신경줄기세포는 신경세포뿐만 아니라 다양한 다른 종류의 세포 또는 조직으로도 분화될 수 있는 분화의 유연성(plasticity)을 가지고 있음이 보고되었다. 따라서 최근에 이러한 신경줄기세포를 이용한 줄기세포의 증식과 분화기전 및 신경계 발달에 관한 기초연구뿐만 아니라, 한번 손상되면 재생되지 않는다고 알려져 있는 난치성 종양, 특히 신경계질환에서 신경줄기세포의 생물학적 특성을 이용하여 새로운 세포 및 유전자 치료의 가능성에 대한 관심이 증대하고 있다.

<3> 현재 신경계질환에 대한 수많은 새로운 치료약물, 단백질 및 신경영양인자들이 검색되고, 생체 내외에서 치료효과와 신경보호 작용의 평가 등을 통하여 다양한 치료법이 활발히 개발되고 있으나 아직 가시화된 성과는 별로 없다. 실제 임상적으로 손상된 신경조직을 보호하고 재생시키는 특별한 치료법은 없는 실정이다. 한편 난치성 신경계 질환의 치료를 위해서는 상기 치료약물 및 신경영양인자와 같은 '소분자(small molecules)'의 개발만으로는 충분하지 않고, 이미 사멸하였거나 기능부전을 보이는 신경세포를 대체하여 신경재생을 유도하는 세포치료가 필수적이다. 따라서 최근에 줄기세포학이 발전하면서 기존 유전자 치료의 안전성과 효율성의 문제점, 그리고 1차 태아조직 또는 세포 사용의 한계점을 극복하고 인체에 대한 새로운 세포 및 유전자 치료를 가능케 하는 최상의 대안으로 인간 신경줄기세포에 대한 연구와 치료적 적용이 부각되고 있다.

<4> 그러나 현재 신경줄기세포 연구는 아직 전 세계적으로 태동기여서 많은 기초적인 연구가 필요하고 실제 임상적용을 위해서는 여러 문제들이 해결되어야 한다. 특히, 생체 내로의 신경줄기세포의 이식 시 공여세포의 생착, 이주, 분화, 외부 유전자 발현 및 숙주 신경계에 통합되는 기전이 규명되어야 하고, 분화된 신경세포가 숙주 신경계에서 적절한 신경접합, 신경연결 및 기능적 개선을 이루는지 확인되어야 한다.

<5> 한편, 아폽토시스(apoptosis)에 의한 세포사멸 발생 경로는 크게 외인성(extrinsic) 및 내인성(intrinsic) 경로로 나눌 수 있는데, 외인성 경로는 세포막에 있는 종양 괴사인자(tumor necrosis factor, TNF) 수용체 수퍼패밀리의 일종인 CD95(APO-1/FAS) 혹은 TRAIL 수용체와 같은 데쓰 리셉터(death receptors)가 자극되어 실제 세포사멸을 실행하는 효소인 카스파제(caspase)가 활성화되는 것이고, 내인성 경로는 미토콘드리아에서 시토크롬 C(cytochrome C), 아폽토시스-유발 인자(apoptosis-inducing factor), SMAC(Second mitochondria-derived activator of caspase) 혹은 엔도뉴클라제 G(endonuclease G)와 같은 세포사멸유도 물질이 세포질 내로 분비되면서 카스파제(caspase)의 활성화가 시작되는 경우이다. 많은 악성 종양세포가 치료에 반응하지 않고 진행하는 이유는 다양한 항-아폽토시스(anti-apoptotic) 혹은 전-아폽토시스(pro-apoptotic) 분자들의 발현 혹은 기능이 적절히 조절되지 못하여 발생하는데, 실제 악성 신경교모세포종과 같은 난치성이며 예후가 불량한 많은 종양에서 XIAP와 같은 아폽토시스 단백질 저해제(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs) 의 발현이 크게 증가되어 있다(Genes Dev 13:239, 1999; Cell Death Differ 6:390, 1999).그 중 SMAC은 세포사멸유도 자극에 반응하여 미토콘드리아에서 분비되며, 주로 IAPs의 작용을 억제하여 세포사멸을 유도하는 단백질이라고 알려져 있다(Cell 102:33, 2000; Cell 102:43, 2000; Nature 410:112, 2001; Nature 406:855, 2000),

발명의 상세한 설명

<6> **기술적 과제**

<7> 따라서 본 발명에서는 SMAC을 발현하는 인간 신경줄기세포를 유전적으로 조작하여 제조하고, 상기 신경줄기세포가 TRAIL을 발현하는 인간 신경줄기세포의 작용을 상승적으로 증가시켜 종양의 치료에 매우 효과적임을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

<8> 따라서 본 발명의 목적은 SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포, 이의 제조방법 및 용도를 제공하는 것이다.

<9> **기술적 해결방법**

<10> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SMAC을 암호화하는 핵산으로 형질전환된, SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포를 제공한다.

<11> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 신경줄기세포의 제조방법을 제공한다.

<12> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 신경줄기세포를 함유하는 종양 치료용 조성물을 제공한다.

<13> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<14> 본 발명은 종양세포 사멸 유도물질인 SMAC을 분비하도록 유전적으로 조작된 인간의 신경줄기세포를 처음으로 제공한다는 점에 특징이 있다.

<15> 본 발명에서 제공되는 인간의 신경줄기세포는 바람직하게는 인간 태아의 뇌로부터 유래한 것일 수 있다. 상기 뇌는 종뇌, 간뇌, 중뇌, 소뇌, 연수, 뇌교 및 척수로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 종뇌로부터 유래한 것일 수 있다. 본 발명에 따른 SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포는 세포독성을 나타내지 않으며, 플레이트 상에서 계속 미분화상태로 증식 및 성장한다(도 1 및 도 2 참조). 또한 본 발명의 신경줄기세포는 99% 이상의 세포에서 신경줄기세포 표지인자인 네스틴(nestin) 또는 비멘틴(vimentin)을 발현하고, 신경원세포, 희소돌기아세포 및 성상세포와 같은 신경세포로 분화할 수 있는 능력을 가진다(도 3 참조). 본 발명에 따른 TRAIL 및 SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포 배지와 종양세포를 공동 배양하는 경우 종양세포의 세포사멸을 유도한다(도 10 및 도 11 참조). 또한 본 발명의 신경줄기세포를 종양 동물모델(예: 인간 교모세포종 뇌종양 동물 모델)에 이식한 경우 생체 내에서 원발성 종괴의 경계부위를 특이적으로 포위하여 종괴 내부로 침윤하는 양상으로 생착 및 분포하며, 주위 신경조직으로 전이되는 종양세포를 따라 특이적으로 이주하여 속발성 종괴에도 생착 및 분포한다. 또한 본 발명의 신경줄기세포의 일부는 이식된 종양부위에서 신경원 또는 교세포로 분화하여 종양으로 손상된 신경세포를 대체 및 재생할 수 있다. 특히 본 발명의 신경줄기세포는 SMAC을 분비하여 TRAIL의 작용을 상승적으로 보조하며 생체내에서 주위의 종양세포의 아폽토시스를 유발하고, 이에 따라 종양 용적의 감소를 유도한다(도 11 참조). 반면, 정상 뇌신경 조직에는 특별한 손상을 유발하지 않는다.

<16> 이러한 특성을 갖는 본 발명의 신경줄기세포는 인간의 신경줄기세포를 SMAC을 암호화하는 핵산으로 형질전환하여 제조될 수 있다. 인간의 신경줄기세포를 SMAC을 암호화하는 핵산으로 형질전환한다는 것은 SMAC을 암호화하는 핵산을 인간의 신경줄기세포에 도입하는 것을 말한다. 본 발명에 따른 SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포는 하기의 단계를 포함할 수 있다:

<17> (a) SMAC을 암호화하는 핵산을 발현 벡터에 삽입시키는 단계; 및

<18> (b) 상기 발현 벡터를 인간의 신경줄기세포에 도입하는 단계.

<19> 상기 SMAC을 암호화하는 핵산은 당업계에 공지된 SMAC을 암호화하는 염기서열을 가지는 것이라면 제한 없이 사용될 수 있다. 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 SMAC을 암호화하는 염기서열을 가질 수 있다. 보다 바람직하게는 상기 핵산은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드를 암호화하는 염기서열을 가질 수 있으며, 가장 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 가질 수 있다. 이외에도 상기 핵산은 진뱅크 등록번호 NM_138929, NM_019887, NM_138930, AF298770, AF262240 에 개시되어 있는 염기서열을 가질 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

<20> 또한 상기 핵산은 SMAC의 기능적 동등물을 암호화하는 염기서열을 가질 수 있다. 상기 기능적 동등물이란, 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70%, 바람직하게는80%, 보다 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로서 본 발명의 본 발명의 SMAC과 실질적으로 동등한 생리활성을 나타내는 폴리펩티드를 말한다.

<21> 상기에서 '동등한 생리활성'이란 TRAIL의 작용을 상승적으로 보조하여 종양세포의 사멸을 유도하는 활성을 의미한다. 상기 기능적 동등물이란 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성(즉, 동일성)을 갖는 폴리펩티드를 말한다. 예를 들면, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 상기 기능적 동등물은 서열번호 1의 아미노산 서열 중 일부가 부가, 치환 또는 결실의 결과 생성될 것일 수 있다. 상기에서 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산 (Asp, Glu), 염기성 아미노산 (His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 또한 상기 기능적 동등물에는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 SMAC의 아미노산 중 일부가 결실된 변형체도 포함된다. 상기 아미노산의 결실 또는 치환은 바람직하게는 본 발명의 폴리펩티드의 생리활성에 직접적으로 관련되지 않은 영역에 위치해 있다. 아울러 상기 SMAC의 아미노산 서열의 양 말단 또는 서열 내에 몇몇의 아미노산이 부가된 변형체도 포함된다. 또한 본 발명의 기능적 동등물의 범위에는 본 발명에 따른 폴리펩티드의 기본 골격 및 이의 생리 활성을 유지하면서 폴리펩티드의 일부 화학 구조가 변형된

폴리펩티드 유도체도 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경이 이에 포함된다. 또한 상기 SMAC을 암호화하는 핵산은 당업계에 공지된 유전자 재조합 방법에 의하여 제조될 수 있다(Sambrook, Fritsch and Maniatis, 'Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory press, 1989; Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 1992). 예컨대, 게놈으로부터 핵산을 증폭시키기 위한 PCR 증폭, 화학적 합성법 또는 cDNA 서열을 제조하는 기술이 있다.

<22> 본 명세서에서 서열 상동성 및 동질성은 본 발명의 SMAC의 아미노산 서열(서열번호 1)과 후보 서열을 정렬하고 갭(gaps)을 도입한 후 본 발명의 SMAC의 아미노산 서열에 대한 후보 서열의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 필요한 경우, 최대 백분율 서열 동질성을 수득하기 위하여 서열 동질성의 부분으로서 보존적 치환은 고려하지 않는다. 또한, 본 발명의 SMAC의 아미노산 서열의 N-말단, C-말단 또는 내부 신장, 결손 또는 삽입은 서열 동질성 또는 상동성에 영향을 주는 서열로서 해석되지 않는다. 또한, 상기 서열 동질성은 두 개의 폴리펩티드의 아미노산 서열의 유사한 부분을 비교하기 위해 사용되는 일반적인 표준 방법에 의해 결정할 수 있다. BLAST 또는 FASTA와 같은 컴퓨터 프로그램은 두 개의 폴리펩티드를 각각의 아미노산이 최적으로 매칭되도록 정렬한다(하나 또는 두 서열의 전장서열을 따라 또는 하나 또는 두 서열의 예측된 부분을 따라). 상기 프로그램은 디폴트 오프닝 페널티(default opening penalty) 및 디폴트 갭 페널티(default gap penalty)를 제공하며 컴퓨터 프로그램과 함께 연계되어 사용될 수 있는 PAM250(표준 스코링 매트릭스 Dayhoff et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure, vol 5, supp 3, 1978)와 같은 스코링 매트릭스를 제공한다. 예를 들어, 백분율 동질성은 다음과 같이 계산할 수 있다. 일치하는 서열(identical matches)의 총 수에 100을 곱한 다음 대응되는 스팬(matched span) 내의 보다 긴 서열의 길이와 두 서열을 정렬하기 위해 보다 긴 서열 내로 도입된 갭(gaps)의 수의 합으로 나눈다.

<23> 상기 SMAC을 암호화하는 핵산은 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결되어 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 상기에서 '작동 가능하게 연결된다(operably linked)'는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 개시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 상기 프로모터로는 모든 시간대에 상시적으로 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터(constitutive promoter)를 사용할 수 있으며, 그 예로는 CMV 프로모터, CAG 프로모터(Hitoshi Niwa et al., Gene, 108:193-199, 1991; Monahan et al., Gene Therapy, 7:24-30, 2000), CaMV 35S 프로모터(Odell et al., Nature 313:810-812, 1985), Rsyn7 프로모터(미국특허출원 제08/991,601호), 라이스 액틴(rice actin) 프로모터(McElroy et al., Plant Cell 2:163-171, 1990), 유비퀴틴 프로모터(Christensen et al., Plant Mol. Biol. 12:619-632, 1989), ALS 프로모터(미국 특허출원 제08/409,297) 등이 있다. 이외에도 미국특허 제5,608,149; 제5,608,144호 제5,604,121호 제5,569,597호 제5,466,785호, 제5,399,680호 제5,268,463호 및 제5,608,142호 등에 개시된 프로모터들을 모두 사용할 수 있다. 바람직하게는 생체 내에서 목적 유전자의 발현을 잘 유도할 수 있는 프로모터를 사용할 수 있다.

<24> 그 중 CAG 프로모터는 변형된 CMV 프로모터의 일종으로 시토메갈로바이러스 즉시 초기 인헨서(cytomegalovirus immediate-early enhancer), 닭 β-액틴 프로모터(chicken β-actin promoter), 키메릭 인트론(chimeric intron), 엑손 1(exon 1) 과 토끼 β-글로빈 유전자(rabbit β-globin gene)의 엑손 2(exon 2)의 일부분으로 구성된다(Hitoshi Niwa et al., Gene, 108:193-199, 1991; Monahan et al., Gene Therapy, 7:24-30, 2000). 이와 같은 공지된 구성 및 서열의 CAG 프로모터로는 아데노바이러스 제작에 적합하지 않았기 때문에 본 발명자는 이를 아데노바이러스의 제작에 적합하도록 변형하여 사용하였다.

<25> 이를 상세히 설명하면, 본 발명에서 사용한 CAG 프로모터는 다음과 같은 과정을 통해 상용벡터인 pShuttle 벡터에 삽입되었다. 상용벡터인 TriEX-1.1 Neo DNA 벡터로부터 시토메갈로바이러스 즉시 초기 인헨서(cytomegalovirus immediate-early enhancer), 닭 β-액틴 프로모터(chicken β-actin promoter) 및 토끼 β-글로빈 종결자(rabbit β-globin terminator)를 각각 클로닝하고 이를 상용벡터인 pShuttle 벡터에 각각 삽입하여 아데노바이러스 제작에 적합하도록 변형된 CAG 프로모터를 가진 벡터를 제작하였다(도 5 참조).

<26> 여기에 상용벡터인 pShuttle-IRES-hrGFP-1 벡터로부터 IRES 및 hrGFP를 추가적으로 클로닝하여 CAG 프로모터를 가지며, GFP를 발현하는 벡터를 추가로 제작하였다(도 7 참조).

<27> 한편, 인간 신경줄기세포에서 발현된 SMAC은 종양세포의 세포질 내부에서 작용하므로, 발현된 단백질이 세포질 내로 이동하도록 하는 구조가 필수적이다. 이를 위해서 단백질 형질도입 도메인(protein transduction domain, PTD)을 SMAC을 암호화하는 핵산의 상류(upstream)에 연결하는 것이 바람직하다. 상기 단백질 전달 도메인은 자신뿐만 아니라 다른 종류의 올리고뉴클레오티드, 펩티드, 단백질 및 올리고당과 같은 고분자 유기화합물을 별도의 수용체나 에너지를 필요로 하지 않고 세포 내로 도입시킬 수 있는 수 개의 아미노산 잔기로 구성되어 있는 올리고펩티드를 말한다. 본 발명에서 상기 단백질 전달 도메인으로는 특별히 한정되지는 않으나 HIV-1 TAT의 형질도입부위, 5~12개의 아르기닌 잔기로 이루어진 올리고펩티드, 5~12개의 라이신 잔기로 이루어진 올리고펩티드, PEP-1 펩티드, ANTP, VP22 단백질 등을 사용할 수 있다(Morris et al., Nat Biotechnol, 19:1173-1175, 2001;Schwarze et al., Trends Cell Biol, 10:290-295, 2000; Vives et al., J Biol Chem 272:16010-16017, 1997). 상기 PTD는 당업계에 공지된 것이라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 HIV-1(human immunodeficiency virus type 1)의 TAT PTD(YGRKKRRQRRR), 9개의 아르기닌 잔기로 이루어진 올리고펩티드, 10개의 라이신 잔기로 이루어진 올리고펩티드 및 PEP-1 펩티드(KETWWETWWTEWSQPKKKRKV)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 것을 사용할 수 있다(Yang et al., FEBS Letters, 532:36-44, 2002, Vives et al., J. Biol. Chem., 272:16010-16017, 1997, Nagahara et al., Nature Med., 4:1449-1452, 1998).

<28> 상기 HIV-1 Tat의 형질도입부위는 침투하고자 하는 세포의 지질막(lipid barrier)을 여는 신호를 가지고 있는 것을 특징으로 한다. 상기 PEP-1 펩티드의 소수성 도메인은 침투할 단백질의 소수성 부분과 결합한 후 세포막에 타겟팅(targeting)하는 효율을 높여주고 친수성 도메인은 세포질내로의 이동을 용이하게 하는 역할을 담당한다.

<29> 또한 SMAC은 인간 신경줄기세포에서 발현된 후 세포 밖으로 분비되어야 종양세포의 세포질 내로 들어갈 수 있으므로, 분비 신호 서열(secretion signal sequence)을 TAT-SMAC을 암호화하는 뉴클레오티드에 연결하는 것이 바람직하다. 이 때 분비 신호 서열은 상기 TAT-SMAC의 상류에 연결되는 것이 바람직하다. 상기 분비 신호 서열은 Igκ- 체인 리더(chain leader), 정액 RNase(seminal RNase)의 분비 신호 서열, SEC2 서열(N-terminal 28 amino acids of human fibrillin-1), FIB 서열(nucleotides 208-303 derived from rat fibronectin mRNA sequence) 또는 FGF-4의 시그널 펩티드일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 Igκ- 체인 리더일 수 있다. 상기 Igκ- 체인 리더는 바람직하게는 서열번호 22로 표시되는 염기서열(atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgac)을 가질 수 있다. 세포 밖으로 분비된 후 상기 Igκ- 체인 리더는 불필요한 부분이므로 절단이 되는 것이 보다 효과적이다. 상기 분비 신호 서열은 그 내부에 신호 절단 부위(signal cleavage site)를 가지거나 또는 특별한 신호 절단 부위를 가지지 않아도 세포 밖으로 분비될 때 절단되는 특성을 갖는 것이 바람직하다. 상기 분비 신호 서열 중 Igκ- 체인 리더는 특별한 신호 절단 서열이 없어도 세포 밖으로 분비되면 마지막 20번 및 21번째 아미노산 사이가 잘려진다. 즉, 5'-atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca ggt tcc act ggt gac-3' 서열에서 마지막 ggt와 gac-3' 사이가 잘려진다.

<30> 이와 같이 분비 신호 서열, TAT 및 SMAC을 암호화하는 핵산이 순차적으로 연결된 DNA 구조물은 PCR 증폭, 제한효소를 이용한 DNA의 절단, 라이게이션(ligation), 형질전환 등을 포함하는 당업계에 공지된 일반적인 클로닝 방법으로 제조할 수 있다(실시예 4 참조).

<31> 또한 본 발명에서 '발현 벡터'라 함은 구조유전자를 암호화하는 핵산이 삽입될 수 있고, 숙주 세포 내에서 상기 핵산을 발현할 수 있는 당분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 벡터 또는 기타 매개체를 의미한다. 바람직하게는 바이러스 벡터일 수 있다.

<32> 상기 플라스미드로는 당업계에 공지된 포유동물 발현 플라스미드를 사용할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 pRK5(유럽특허 제307,247호), pSV16B(국제특허공개 제91/08291호) 및 pVL1392(PharMingen) 등이 대표적이다. 이러한 플라스미드 벡터를 이용한 핵산 전달 방법은 사람 세포에 직접적으로 플라스미드 DNA를 전달하는 방법으로서, FDA로부터 승인받은 사람에게 사용할 수 있는 방법이다(Nabel, E. G., et al., Science, 249:1285-1288, 1990). 플라스미드 DNA는 바이러스 벡터와는 달리 균질하게 정제될 수 있는 장점이 있다.

<33> 또한 상기 바이러스 벡터로는, 이에 제한되지는 않으나, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 허피스 바이러스 벡터, 아비폭스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등이 있다. 상기 레트로바이러스 벡터는 바이러스 유전자가 모두 제거되었거나 또는 변경되어 비-바이러스 단백질이 바이러스 벡터에 의해 감염된 세포 내에서 만들어지도록 제작된 것이다. 유전자 요법을 위한 레트로바이러스 벡터의 주요 장점은 다량의 유전자를 복제세포 내에 전달하고, 세포 DNA 내로 전달된 유전자를 정확하게 통합하며, 유전자 형질 감염 후 연속적인 감염이 유발되지 않는 것이다(Miller, A.D., Nature, 357:455-460, 1992). FDA에서 인증 받은 레트로바이러스 벡터는 PA317

암포트로픽 레트로바이러스 패키지 세포를 이용하여 제조한 것이다(Miller, A.D. and Buttimore, C., Molec. Cell Biol., 6:2895-2902, 1986). 비-레트로바이러스 벡터로는 상기에서 언급한 바와 같은 아데노바이러스가 있다(Rosenfeld et al., Cell, 68:143-155, 1992; Jaffe et al., Nature Genetics, 1:372-378, 1992; Lemarchand et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6482-6486, 1992). 아데노바이러스의 주요 장점은 다량의 DNA 단편(36kb 게놈)을 운반하고, 매우 높은 역가로 비-복제세포를 감염시킬 수 있는 능력이 있다는 것이다. 또한, 허피스 바이러스도 사람 유전자 요법을 위해 유용하게 사용될 수 있다(Wolfe, J. H., et al., Nature Genetics, 1:379-384, 1992). 이외에도, 공지된 적절한 바이러스 벡터가 본 발명에 사용될 수 있다. 바람직하게는 아데노바이러스 벡터에 삽입될 수 있다.

<34> 본 발명의 재조합 발현벡터를 이용한 아데노바이러스를 제조하는 방법은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, pAdEasy-1(Stratagene)과 같은 아데노바이러스성 백본 벡터(adenoviral backbone vector)와 함께 BJ5183 대장균에 공동도입하여 상기 두 벡터 간의 동종 재조합(homologous recombination)을 유도하고, 이를 293A 세포와 같은 아데노바이러스 생산 세포주에서 증폭하여 본 발명의 재조합 발현벡터가 삽입된 아데노바이러스를 제조할 수 있다. 이와 같은 아데노바이러스를 제조하는 방법은 하기의 문헌에 잘 나타나 있다: Benihoud, K., Yeh, P. and Perricaudet, M.(1999) Curr Opin Biotechnol 10(5):440-7, Berkner, K. L.(1988) Biotechniques 6(7):616-29, He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W. et al.(1998) Proc Natl Acad Sci U S A 95(5):2509-14., Hanahan, D.(1983) J Mol Biol 166(4):557-80., Jerpseth, B., Callahan, M. and Greener, A.(1997) Strategies 10(2):37-38., Bullock, W. O., Fernandez, J. M. and Short, J. M.(1987) Biotechniques 5(4):376-378., Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G. et al.,(1987). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, New York., Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R.(1977) J Gen Virol 36(1):59-74., Tollefson, A. E., Hermiston, T. W. and Wold, W. S. M.(1998) Methods in Molecular Medicine 21:1-9.

<35> 본 발명에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran- mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 신경줄기세포 내로 도입할 수 있다(Wu et al., J. Bio. Chem., 267:963-967, 1992; Wu and Wu, J. Bio. Chem., 263:14621-14624, 1988).

<36> 보다 바람직하게는, 본 발명에 따른 SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포는 하기의 단계를 포함하는 제조방법에 의하여 제조될 수 있다.

<37> (a) 분비 신호 서열, HIV 유래 단백질 형질도입 도메인 및 SMAC을 암호화하는 핵산이 순차적으로 연결된 DNA 구조물(construct)을 포함하는 재조합 바이러스 벡터를 제조하는 단계;

<38> (b) 상기 재조합 바이러스 벡터를 바이러스 생산 세포주에 형질감염시켜 SMAC 발현 재조합 바이러스를 제조하는 단계; 및

<39> (c) 상기 SMAC 발현 재조합 바이러스로 인간의 신경줄기세포를 감염시키는 단계.

<40> 먼저, 분비 신호 서열, HIV(human immunodeficiency virus) 유래 단백질 형질도입 도메인(protein transduction domain) 및 SMAC을 암호화하는 핵산이 순차적으로 연결된 DNA 구조물(construct)을 바이러스 벡터에 삽입하여 재조합 바이러스 벡터를 제조한다. 분비 신호 서열, HIV 유래 단백질 형질도입 도메인 및 TRAIL를 암호화하는 핵산이 순차적으로 연결된 DNA 구조물(construct)에 대해서는 위에서 설명한 바와 같다. 상기 DNA 구조물은 발현 조절 서열, 예컨대 프로모터에 작동가능하게 연결되어 당업계에 공지된 바이러스 벡터에 삽입될 수 있다.

<41> 이후, SMAC을 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 바이러스 벡터를 바이러스 생산 세포주에 도입하여 SMAC을 발현하는 재조합 바이러스를 제조한다. 상기 바이러스 생산 세포주는 사용한 바이러스 벡터에 해당하는 바이러스를 생산하는 세포주를 사용할 수 있으며, 예컨대 아데노바이러스 벡터를 사용한 경우에는 아데노바이러스 생산 세포주인 293 세포를 사용할 수 있다.

<42> 그리고 나서, SMAC을 발현하는 재조합 아데노바이러스 벡터를 인간의 신경줄기세포에 감염시킨다. 아데노바이러스를 인간의 신경줄기세포에 감염시키기 위해서는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나,

인간 신경줄기세포(HFT13 세포)를 성장인자 함유 N2 배지에 플레이팅하고, 1시간 후에 적정 MOI(multiplicity of infection)에 해당하는 바이러스성 입자를 배지에 첨가하여 세포를 감염시킨다. 이때 바이러스는 4% 수크로즈 완충용액(10 mM Tris, 4% sucrose, 2 mM $MgCl_2$ in 1 x PBS)과 함께 -80℃ 냉동고에 보관된 상태이며, 줄기세포에 감염시킬 때 만들어진 바이러스의 titer 및 MOI에 따라 대략 세포배지 1 ml 당 50 ㎕ 미만의 바이러스 용액이 첨가된다. 감염 24시간 후 바이러스를 제거하기 위해 N2 배지로 세포를 1회 세척하고, 성장인자 함유 N2 배지를 첨가하여 줄기세포를 계속 배양하는 방법에 의해 수행될 수 있다.

<43> 또한 상기 신경줄기세포는 바람직하게는 인간 태아의 뇌로부터 유래한 것일 수 있다. 상기 뇌는 종뇌, 간뇌, 중뇌, 소뇌, 연수, 뇌교 및 척수로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 종뇌로부터 유래한 것일 수 있다. 상기 인간의 신경줄기세포는 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용할 수도 있고, 바람직하게는 인간 태아의 뇌 조직으로부터 얻은 세포를 신경줄기세포 성장인자가 첨가된 배지에서 배양하여 제조할 수 있다(실시예 1). 상기 신경줄기세포 성장인자는 bFGF(fibroblast growth factor-basic), LIF(leukemia inhibitory factor) 및 헤파린(heparin)을 사용할 수 있다. 바람직하게는 20 ng/㎖ bFGF, 10 ng/㎖ LIF 및 8 ㎍/㎖ 헤파린을 사용할 수 있다.

<44> 본 발명에 따른 SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포는 당업계에 공지된 방법에 따라 증식 및 배양될 수 있다. 본 발명의 신경줄기세포는 목적 세포 타입의 생존 또는 증식을 뒷받침하는 배양액 내에서 배양된다. 종종 혈청 대신 자유 아미노산으로 영양을 공급하는 배양액을 사용하는 것이 바람직하다. 신경세포의 지속적인 배양을 위해 개발된 첨가제를 배양액에 보충하는 것이 바람직하다. 예컨대, Gibco 사에서 시판되는 N2 및 B27 첨가제가 있다. 배양시 배지와 세포의 상태를 관찰하면서 배지를 교환해 주는 것이 바람직하다. 또한 신경줄기세포가 계속 증식하여 서로 뭉쳐서 신경구(neurospheres)를 형성하면 계대배양을 실시하는 것이 바람직하다. 계대배양은 약 7-8일 마다 실시할 수 있다.

<45> 본 발명에 따른 신경줄기세포의 바람직한 배양 방법은 다음과 같다: 배양액의 조성이 알려져 있는 특정 배지(예: DMEM/F-12 또는 Neurobasal 배지 등)에 N2 또는 B27 첨가제(Gibco), 신경줄기세포 증식유발 사이토카인(예: bFGF, EGF, LIF 등)과 헤파린을 첨가한다. 일반적으로 혈청은 첨가하지 않는다. 상기 배지에서 신경줄기세포를 신경구 형태로 증식 배양한다. 3-4일에 한번씩 배지의 반 정도를 새로운 배지로 갈아준다. 세포수가 늘어나면 7-8일마다 기계적 방법 또는 트립신(0.05% trypsin/EDTA, Gibco)을 이용하여 세포를 해리시킨다. 이후, 세포 부유액을 새로운 플레이트에 플레이팅하고 상기 조성의 배지에서 계속하여 증식 배양시킨다(Gage et al. PNAS, 92(11):879, 1995; McKay. Science, 276:66, 1997; Gage., Science, 287:1433, 2000; Snyder et al. Nature, 374:367, 1995; Weiss et al. Trends Neurosci., 19:387, 1996).

<46> 또한 본 발명의 신경줄기세포는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 각종 신경세포로 분화될 수 있다. 일반적으로 분화는 세포배지에 신경줄기세포 증식유발 사이토카인은 첨가하지 않고 적절한 기질 또는 분화 시약이 첨가되는 영양 배양액을 함유하는 배양 환경에서 실행한다. 적절한 기질은, 양전하로 코팅된 고체 표면, 예를 들면 폴리-L-라이신 및 폴리오르니틴이 적합하다. 기질은 세포외 매트릭스 성분, 일례로 피브로넥틴 및 라미닌으로 코팅 가능하다. 기타 허용되는 세포외 매트릭스는 매트리겔(Matrigel)을 포함한다. 기타 적절한 것은, 폴리-L-라이신을 피브로넥틴, 라미닌, 또는 이들의 혼합물과 혼합한 조합 기질이다.

<47> 적당한 분화 시약은 다양한 종류의 성장 인자, 예를 들면, 표피 성장 인자(EGF), 전환성장인자 α(TGF-α), 임의의 형태의 섬유아세포 성장인자(FGF-4, FGF-8 및 bFGF), 혈소판 유래 성장인자(PDGF), 인슐린 유사 성장인자(IGF-1 등), 고농도의 인슐린, 골형성 단백질(특히, BMP-2 및 BMP-4), 레틴산(RA) 및 gp130과 복합하는 수용체에 대한 리간드(예: LIF, CNTF 및 IL-6)이 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

<48> 또한 본 발명의 신경줄기세포는 장기간 보관을 위하여 당업계에 공지된 방법에 따라 동결보관할 수 있다. 일반적인 동결보관은 계대배양을 계속하여 충분한 숫자의 신경줄기세포를 획득하면 기계적 방법 또는 트립신을 이용하여 신경구를 잘게 부수어 단일 세포 현탁액을 만든다. 이후, 20-50% 태아우혈청(fetal bovine serum, Gibco), 10-15% DMSO(Sigma) 및 세포 배지로 이루어진 동결 보관액에 상기 세포 현탁액을 혼합하여 동결 유리병(freezing vial, NUNC)에 분주한다. 동결 보관액에 혼합한 세포는 즉시 4℃에 보관한 상태에서 -70℃의 냉동고로 옮기고, 최소 24시간 후에 액체질소탱크로 옮겨 장기 보관한다(Gage et al. PNAS, 92(11):879, 1995; McKay. Science, 276:66, 1997; Gage., Science, 287:1433, 2000; Snyder et al. Nature, 374:367, 1995; Weiss et al. Trends Neurosci., 19:387, 1996).

<49> 아울러 동결보관된 본 발명의 신경줄기세포는 당업계에 공지된 방법에 따라 해동할 수 있다. 동결 보관된 세포를 녹일 때는 동결 유리병을 37℃ 항온 수조에 담가 천천히 흔든다. 동결 유리병에 있는 세포가 절반정도 녹았

을 때 미리 37℃로 데워져 있는, 신경줄기세포 배지가 들어있는 코니컬 튜브에 상기 세포 현탁액을 옮기기 시작한다. 세포 현탁액을 모두 옮기고 원심 분리하여 상층액을 제거한다. 침전되어 있는 세포 펠렛을 신경줄기세포 배지로 조심스럽게 부유시킨다. 세포 현탁액을 60 mm 세포 배양 플레이트에 옮긴다. 이후, 신경줄기세포 증식유발 사이토카인을 배지에 첨가하고 계속하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양한다.

<50> 본 발명의 실시예에서는 인간의 뇌조직에서 신경줄기세포를 증식시켜 이의 특성을 살펴보고, 분화를 유도하였다.

<51> 본 발명의 다른 실시예에서는 인간 신경교모세포종 세포를 배양하고, 이에 대한 동물모델을 확립하였다.

<52> 본 발명의 또다른 실시예에서는 SMAC을 구조유전자로 이용하고자 공지된 SMAC 유전자를 PCR로 클로닝한 뒤, TAT 및 분비 신호서열인 Igκ- 체인 리더를 삽입하여 구조유전자 구조물(construct)을 제조한 뒤, 상기 구조유전자 구조물을 아데노바이러스용 재조합 발현벡터에 삽입하여 SMAC을 발현하는 재조합 발현벡터를 제조하였으며, 이를 이용하여 다시 재조합 아데노바이러스를 제조하였다.

<53> 본 발명의 또다른 실시예에서는 TRAIL을 발현하는 재조합 발현벡터를 제조하였으며, 이를 이용하여 다시 재조합 아데노바이러스를 제조하였다.

<54> 본 발명의 또다른 실시예에서는 본 발명의 재조합 발현벡터를 이용하여 SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포 및 SMAC과 TRAIL을 동시에 발현하는 인간의 신경줄기세포를 제작하고 이들의 생장 및 단백질 발현 정도를 조사하였다. 그 결과, 본 발명의 재조합 발현 벡터를 이용하여 형질전환된 숙주세포 내에서 SMAC 또는 SMAC과 TRAIL이 분비됨을 확인하였으나, SMAC과 TRAIL이 동시에 감염된 세포에서는 그 생장 및 단백질 발현이 상대적으로 떨어지는 것을 알 수 있었다.

<55> 본 발명의 또다른 실시예에서는 본 발명의 SMAC을 발현하는 인간 신경줄기세포가 TRAIL의 작용에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 본 발명의 SMAC을 발현하는 인간신경줄기세포는 단독으로는 종양세포의 사멸효과는 없으나, TRAIL의 작용을 상승적으로 보조하여 그 효과를 증가시키는 것을 알 수 있었다.

<56> 따라서, 본 발명은 SMAC을 암호화하는 핵산으로 형질전환된, SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포 및 TRAIL을 분비하는 인간의 신경줄기세포를 함유하는 종양의 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 따라 SMAC을 암호화하는 핵산으로 형질전환된, SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포는 이를 필요로 하는 인간의 생체 내에서 TRAIL 또는 TRAIL을 분비하는 세포 등과 더불어 종양세포의 사멸, 신경 조직의 재구성 및/또는 재생에 사용될 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 신경줄기세포는 TRAIL의 작용을 상승적으로 보조하기 때문에 종양의 치료에 매우 효과적이다. 상기에서 '치료(treatment)'는 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 악화되지 않는 질환의 유지, 질환진행의 지연, 질환 상태의 개선 또는 완화(palliation),(일부 또는 완전한) 완화(remission)를 포함한다. 또한 치료는 치료를 받지 않은 경우 예상되는 생존율과 비교하여 증가된 생존을 의미할 수 있다. 치료는 치료적 수단 이외에 예방적 수단을 동시에 포함한다. 치료가 필요한 경우는 질환을 이미 가지고 있는 경우와 질환이 예방되어야 하는 경우를 포함한다. 질병의 완화는 치료받지 않는 상황과 비교하여 원하지 않는 질병의 임상양상의 호전이나 질병의 추이가 지연되거나 연장되는 경우이다. 전형적으로 치료는 종양세포의 사멸 또는 조직재생을 위해 본 발명의 신경줄기세포를 투여하는 경우를 포함한다.

<57> 본 발명에 따른 SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포는 원하는 조직 부위로 직접 이식하거나 이동하는 방식으로 투여되어, 종양세포의 사멸을 유도하거나, 기능적으로 결핍된 부위를 재구성하거나 재생한다. 예컨대, 치료될 질환에 따라 본 발명의 SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포를 중추신경계의 유조직 또는 수막강내 부위로 직접 이식한다. 이식은 단세포 현탁액 또는 $\mu\ell$ 당 1×10^5-1.5×10^5 세포 밀도의 작은 집합체를 이용하여 수행한다(미국특허 제5,968,829호).

<58> 본 발명에 따른 SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포는 인간 내로의 투여를 위해 약학적 조성물의 형태로 공급될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에는 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 '약학적으로 허용되는'이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 것을 말한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 각종 제형의 형태로 통용되는 기법에 따라 제조될 수 있다. 예컨대, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 포함제 형태로 제조할 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 의약 제형의 일반적인 원리에 대해서는 하기의 문헌을 참고할 수 있다: Cell Therapy; Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, G. Morstyn amp; W. Sheridan 편저,

Cambridge University Press, 1996; 및 Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. D. Ball, J. Lister amp; P. Law, Churchill Livingstone, 2000. 본 발명의 약학적 조성물은 원하는 목적, 예를 들면 생체 내 종양의 치료 및 종양으로 손상된 조직의 재구성을 위해 표기된 지시에 따라 적당한 용기 내에 포장될 수 있다.

<59> 본 발명의 약학적 조성물이 적용될 수 있는 종양은 신경교종, 뇌수막종, 뇌하수체선종, 수아세포종, 전이성 뇌종양, 청신경초종, 전립선암, 악성 흑색종 및 신경아세포종을 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다.

<60> 상기 신경교종은 성상세포종, 핍돌기교종, 상의세포종, 다형성 신경교모세포종 등을 포함한다. 특히, 신경교종 중 다형성 신경교모세포종(glioblastoma multiforme)과 같은 악성 뇌종양은 광범위한 수술적 절제, 보조적 방사선 및 화학요법에도 불구하고 실제적으로 완치가 불가능하며 대개는 사망하게 되어 예후가 극히 불량하다(Black et al., Cancer of the Nervous System, Blackwell, Oxford 1997, Surawicz et al., J. Neurooncol., 40:151, 1998). 이렇게 예후가 불량한 요인으로는 신경교종 세포들은 침윤성이 극히 높아 전체 정상 뇌 조직에 걸쳐 광범위하게 이주하는 특성이 있으며, 원발성 종괴(primary tumor mass) 부위에서 원거리까지 전이가 일어나 '종양 위성체(tumor satellites)'를 형성하기 때문에 원발성 종양 자체를 수술적으로 절제하고 다른 보조치료를 병행한다고 하여도 쉽게 수술 후 재발한다. 그러므로 원발성 종괴 부위뿐만 아니라 전이된 위성종양 병변을 표적으로 하는 치료법 개발이 성공적인 치료와 예후의 개선을 위하여 필수적이다. 따라서, 본 발명의 약학적 조성물은 다형성 신경교모세포종(glioblastoma multiforme)과 같은 악성 뇌종양의 완전한 치료를 위한 매우 보조 치료제로서 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학적 조성물을 이용한 치료 방법은 당업계에 공지된 다른 치료 방법, 예컨대, 화학요법 치료법, 방사선 치료법, 외과적 수술법, 약물 투여법 등과 함께 사용될 수 있다. 이외에도 종양에 대한 다른 치료 방법에 대한 보조 치료법(adjuvant therapy)으로도 사용될 수 있다.

<61> 또한 인간의 신경줄기세포는 중추신경계에 이식된 후 뇌종양 부위에서 발현되는 신호에 반응하여 뇌종양 부위로 특이적으로 이주하여 생착 및 분포할 뿐만 아니라, 정맥주사를 통하여 전신적으로 투여되었을 경우 중추신경계 이외의 다른 부위에서 발생한 비신경계 종양 즉, 전립선암, 악성 흑색종 및 신경아세포종 부위에도 특이적으로 이주하여 생착함을 보였다(Brown et al., Human Gene Therapy, 14:1777, 2003). 따라서, 본 발명의 약학적 조성물은 뇌종양뿐만 아니라 전신에 발생하는 전립선암, 악성 흑색종, 신경아세포종 및 기타 악성 종양 등의 비신경계 종양의 치료에도 효과적으로 사용될 수 있다.

<62> 아울러, 본 발명은 상기와 같은 본 발명의 효과를 바탕으로 SMAC을 암호화하는 핵산으로 형질전환된, SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포 및 TRAIL을 분비하는 인간의 신경줄기세포를 이를 필요로 하는 개체에 유효한 양으로 투여하는 것을 포함하는 종양의 치료 방법을 제공한다.

<63> 본 발명에서 '유효한 양'이라 함은 본 발명의 신경줄기세포가 투여 대상인 개체 내에서 종양을 치료하는 효과를 나타내는 양을 말하며, 상기 '개체(subject)'란 포유동물, 특히 인간을 포함하는 동물을 의미한다. 상기 개체는 치료가 필요한 환자(patient)일 수 있다.

<64> 본 발명의 신경줄기세포는 상기 기재한 효과 중에서 원하는 효과가 도출될 때까지 투여될 수 있으며, 당업계에 공지된 방법에 따라 다양한 경로로 투여될 수 있다.

<65> 또한, 본 발명은 종양 치료제를 제조하기 위한 SMAC을 암호화하는 핵산으로 형질전환된, SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포 및 TRAIL을 분비하는 인간의 신경줄기세포의 용도를 제공한다. 종양, 본 발명의 신경줄기세포 및 이의 효과에 대해서는 상기에서 기재한 바와 같다.

산업상 이용 가능성

<206> 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 SMAC을 암호화하는 핵산으로 형질전환된, SMAC을 분비하는 인간의 신경줄기세포는 세포독성을 유발하지 않고 플레이트상에서 계속 미분화상태로 증식 및 성장하며, 생체 내외에서 신경원세포, 희소돌기아교세포 및 성상세포와 같은 신경세포로 분화할 수 있는 능력을 가진다. 또한 본 발명의 신경줄기세포는 인간의 생체 내에서 SMAC를 분비하여 TRAIL의 작용을 상승적으로 보조하여 종양세포의 아폽토시스를 유발하고 종양 용적의 감소를 유도한다. 따라서 본 발명의 신경줄기세포는 종양의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<66> 도 1은 다양한 뇌조직으로부터 유래한 인간 신경줄기세포의 증식 및 성장 형태를 현미경으로 관찰한 결과이다.

<67> HFT13: 종뇌 유래 신경줄기세포

<68> HFD13: 간뇌 유래 신경줄기세포

<69> HFM13: 중뇌 유래 신경줄기세포

<70> HFC13: 소뇌 유래 신경줄기세포

<71> 도 2는 다양한 뇌조직으로부터 유래한 인간 신경줄기세포의 성장 곡선을 비교하여 나타낸 그래프이다.

<72> 도 3은 여러 가지 마커를 이용하여 본 발명에서 분리한 인간 신경줄기세포의 분화 양상을 현미경으로 관찰한 결과이다.

<73> 도 4는 U87MG 또는 U343MG 세포를 이식하여 제조한 인간 신경교모세포종 동물 모델에서 종양의 생성을 헤마톡실린 및 CM-DiI 염색으로 확인한 결과이다.

<74> 도 5 내지 8은 본 발명에 따른 pShuttle-CAG의 제작과정(a) 및 모식도(b)와 pShuttle-CAG-IRES-hrGFP 벡터의 제작과정(c) 및 모식도(d)를 나타낸 것이다.

<75> 도 9 내지 10은 본 발명에서 사용한 SMAC 발현 재조합 아데노바이러스 벡터의 개열지도(a) 및 TRAIL 발현 재조합 아데노바이러스 벡터의 개열지도(b)를 나타낸 것이다.

<76> 도 11은 SMAC 발현 재조합 아데노바이러스 벡터로부터 생산된 재조합 아데노바이러스에서 야생형 아데노바이러스의 오염여부를 조사한 PCR 결과를 나타낸 것이다.

<77> M : 사이즈 마커(size marker)

<78> lane 1: 음성대조군

<79> lane 2: 293A(양성대조군)

<80> lane 3: AdCAG-TAT-SMAC

<81> lane 4: AdCAG-TAT-SMAC

<82> 도 12는 SMAC 또는 GFP 발현 재조합 바이러스(AdCAG-TAT-SMAC 또는 AdCAG-GFP)에 감염된 인간 신경줄기세포의 생존도를 CCK-8 어세이로 조사한 결과이다.

<83> 도 13은 SMAC 또는 GFP 발현 재조합 바이러스(AdCAG-TAT-SMAC 또는 AdCAG-GFP)에 감염된 인간 신경줄기세포로부터 분비된 SMAC의 양을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

<84> 도 14는 SMAC, TRAIL 또는 GFP 발현 재조합 바이러스(AdCAG-TAT-SMAC, AdCAG-TRAIL 또는 AdCAG-GFP)에 각각 또는 공동 감염된 인간 신경줄기세포로부터 분비된 SMAC 및 TRAIL의 양을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

<85> 도 15 내지 16은 TRAIL, SMAC 및 GFP 발현 재조합 바이러스(AdCAG-TRAIL, AdCAG-TAT-SMAC 및 AdCAG-GFP)에 감염된 인간 신경줄기세포 배양액과 공동 배양한 인간 신경교모세포종 세포주(U87MG)의 세포사멸을 현미경으로 관찰한 결과(a) 및 상기 인간 신경줄기세포의 배양액과 공동배양에 의한 인간 신경교모세포종 세포주의 생존도를 조사한 결과(b)이다.

<86> 도 17은 신경교모세포종(U87MG) 동물모델에서 TRAIL 및 SMAC 발현 재조합 바이러스에 각각 감염된 인간 신경줄기세포를 함께 이식한 군(hNSCs-AdTRAIL + hNSCs-AdTAT-SMAC), TRAIL 및 GFP 발현 재조합 바이러스에 각각 감염된 인간 신경줄기세포를 함께 이식한 군(hNSCs-AdTRAIL + hNSCs-AdGFP), 그리고 GFP 발현 재조합 바이러스에만 감염된 인간 신경줄기세포를 이식한 군(hNSCs-AdGFP)에서 각각 종양크기의 감소정도를 비교한 결과이다.

<87> **발명의 실시를 위한 형태**

<88> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<89> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<90> <실시예 1>

<91> 인간 신경줄기세포의 분리 및 배양

<92> <1-1> 뇌조직의 분리

<93> 세브란스병원 IRB(Institution Review Board)의 승낙을 받은 후, 보건복지부의 생명윤리법안과 과학기술부 세포

응용연구사업단 윤리위원회의 연구지침 및 신촌 세브란스 병원의 인체조직 연구관리 지침을 따라 임신 13주에 자연 유산되어 사망한 태아의 사체를 사전에 보호자의 동의서를 받고 획득하였다. 태아 사체를 멸균된 차가운 H-H 완충용액(Hanks' balanced salt solution, 1×[GIBCO]+HEPES, 10 mM [GIBCO] in ddH_2O, pH 7.4)으로 세척하고, 현미경 하에서 중추신경계만 해부하였다. 이후, 뇌척수막과 혈관을 모두 제거하고 종뇌, 간뇌, 중뇌, 소뇌, 연수와 뇌교, 그리고 척수 부위의 조직을 각각 따로 분리하였다.

<94> 분리된 각 뇌 조직을 패트리 디쉬(petri dish)에 담고, 약 1×1 mm 크기로 잘랐다. 950 rpm에서 3분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 조직을 다시 H-H 완충용액으로 세척하고, 상기 원심분리를 3회 반복 수행하였다. 마지막 원심분리를 수행한 후 상층액을 모두 제거하고, 남은 조직에 0.1% 트립신(Gibco) 2 ㎖과 DNase I(Roche, 1 mg/㎗)을 첨가하여 잘 혼합하였다. 37℃, 5% CO_2 배양기에서 30분간 반응시켰다. 30분 후 혈청 함유 배지(DMEM+10% FBS+1×penicillin/streptomycin/fungizone)(모두 Gibco 제품)를 3 ㎖ 첨가하였다. 혈청 피펫(serologic pipette, Falcon)으로 천천히 조직을 잘게 부수기 시작하여 단일세포 수준까지 해리시켰다. 이후, 원심분리를 하여 상층액을 제거한 후, 세포 펠렛(pellet)을 H-H 완충용액으로 세척하였다. 그리고 다시 원심분리를 한 후, 상층액을 제거하였다.

<95> <1-2> 신경줄기세포로의 증식

<96> 상기 실시예 <1-1>을 통해 얻어진 각 뇌조직의 세포 펠렛에 N2 배지(D-MEM/F-12 [98% volume(v)/volume(v)]+N2 supplement[1% v/v]+Penicillin/Streptomycin [1% v/v]; 모두 GIBCO 제품) 10 ㎖을 첨가하여 천천히 혼합하였다. 약 4×10^6-6×10^6개의 세포를 조직배양 처리 100 mm 플레이트(tissue culture treated 100 mm plate, Corning)에 옮겼다. 신경줄기세포 성장인자로 20 ng/㎖ bFGF(recombinant human fibroblast growth factor-basic, R & D), 10 ng/㎖ LIF(recombinant human leukemia inhibitory factor, Sigma) 및 8 ㎍/㎖ 헤파린(Sigma)을 각각 첨가하여 좌우앞뒤로 잘 흔든 후, 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 24시간 후, 5 ㎖의 배지를 버리고, 새로운 N2 배지 5 ㎖를 첨가하였다. 동시에 20 ng/㎖ bFGF, 10 ng/㎖ LIF 및 8 ㎍/㎖ 헤파린을 첨가하고, 계속하여 배양하였다. 배지 교환은 배지와 세포의 상태를 관찰하면서 3-4일마다 수행하였다. 이 때 약 절반 정도의 배지만을 새 배지로 교환하고 성장인자를 함께 첨가하였다.

<97> <1-3> 계대배양

<98> 상기 실시예 <1-2>를 통해 미분화된 신경줄기세포가 계속 증식하여 서로 뭉쳐져 세포덩어리, 즉 신경구(neurospheres)를 형성하면서 자라기 시작하면(도 1), 보통 7-8일마다 계대배양을 실시하였다. 계대배양은 다음과 같은 방법으로 실시하였다: 세포 배양 플레이트에서 배지를 모두 제거하였다. 세포에 0.05% 트립신/EDTA(T/E, Gibco) 2 ㎖를 처리하고, 37℃, 5% CO_2 배양기에서 2분 30초간 반응시켰다. 이후, 트립신의 작용을 중단시키기 위하여 트립신 저해제(T/I, Soybean, Sigma, 1 mg/㎖) 2.5 ㎖를 첨가하여 잘 혼합하였다. 세포 현탁액을 15 ㎖ 코니컬 튜브(cornical tube, Falcon)에 옮겼다. 원심분리를 하여 상층액을 제거하였다. 세포를 N2 배지 3 ㎖로 재부유시킨 다음, 신경구가 단일세포로 해리될 때까지 혈청 피펫으로 잘게 부쉈다. 세포수를 측정한 후, 약 4×10^6 ~ 6×10^6 개의 세포를 포함하고 있는 세포 현탁액을 기존의 배지가 일부 포함되어 있는 새로운 세포 배양 플레이트에 옮기고, 부족한 N2 배지를 첨가하여 총 10 ㎖의 배지가 되게 하였다. 그리고 20 ng/㎖ bFGF, 10 ng/㎖ LIF 및 8 ㎍/㎖ 헤파린을 첨가한 후, 계속하여 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

<99> <1-4> 동결보관(cryopreservation)

<100> 상기 실시예 <1-3>에 기재된 방법에 따라 계대배양을 계속하여 충분한 수의 신경줄기세포를 획득하면 일부 세포는 동결보관하였다. 동결보관은 다음과 같은 방법으로 수행하였다: 세포 계대배양시와 같이 0.05% 트립신/EDTA와 트립신 저해제를 차례대로 처리한 신경구를 잘게 부수어 15 ㎖ 튜브에 모두 옮겼다. H-H 완충용액 8 ㎖를 첨가하여 세포를 세척하였다. 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 세포 펠렛에 미리 준비한 4℃ 동결보관 용액(N2 배지[40% v/v]+FBS [50% v/v]+DMSO[10% v/v, Sigma])을 첨가하여 부드럽게 세포를 재부유시켰다. 세포 현탁액을 1개의 동결 유리병(freezing vial, NUNC)에 1.8 ㎖씩 분주하였다. 보통 10 mm 세포 배양 플레이트 1개에 들어있는 세포를 3-4개의 동결 유리병으로 분주하였다. 이후, 아이스 버킷(ice bucket)에 보관한 상태에서 -70℃의 냉동고로 옮겼으며, 최소 24시간 후에 다시 액체질소탱크로 옮겨 장기 보관하였다.

<101> <1-5> 동결보관된 세포의 해동

<102> 동결보관된 세포를 해동시킬 때는 동결 유리병을 37℃ 항온수조에 담가 천천히 흔들었다. 세포가 절반정도 해동

되었을 때 세포 현탁액을 미리 37℃로 데워진 N2 배지 10 ㎖가 담겨져 있는 코니컬 튜브에 옮겼다. 원심분리를 하여 상층액을 제거하였다. 세포 펠렛을 N2 배지 5 ㎖ 로 조심스럽게 부유시켜 60 ㎜ 세포배양 플레이트에 옮겼다. 이후, 플레이트에 20 ng/㎖ bFGF, 10 ng/㎖ LIF 및 8 ㎍/㎖ 헤파린을 첨가한 후, 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 세포가 신경구를 형성하면서 자라면 다시 상기 실시예 <1-3>에 기재된 방법에 따라 계대배양을 하였다. 대개 10일 정도 지나면 10 ㎜ 세포 배양 플레이트에 옮길 수 있을 만큼 자라게 된다.

<103> <실시예 2>

<104> 인간 신경줄기세포의 생체 외 특성 분석

<105> <2-1> 세포 증식의 특성 비교 조사

<106> 상기 실시예 1에서 인간 중추신경계의 다양한 해부학적 부위로부터 분리·배양되어 신경구 상태로 자라는 신경줄기세포들을 각각 4×10^6개씩 100 ㎜ 세포 배양 플레이트에 옮겨 50일 동안 증식시켰다. 그 결과, 신경줄기세포들은 지수함수적인 성장을 보였다(도 2). 그 중에서, 간뇌 유래 신경구(HFD13 세포)의 경우에는 세포수가 배양 초기의 세포수에 비해 약 1,850배 증가하였고, 종뇌 유래 신경구(HFT13 세포)의 경우에는 약 1,035배 증가하였다. 그 외 소뇌 유래 신경구(HFC13 세포), 중뇌 유래 신경구(HFM13 세포) 및 척수 유래 신경구(HFS13 세포)는 각각 약 453, 19 및 12배 증가한 것으로 나타났다

<107> 상기 결과로부터 임신 13주 인간 태아의 전뇌, 즉 간뇌와 종뇌에서 추출된 신경줄기세포들은 빠른 속도로 증식하는 반면, 중뇌 및 척수에서 추출된 신경줄기세포들은 천천히 성장하였고, 소뇌 유래 줄기세포의 성장속도는 그들의 중간 정도임을 확인하였다. 상기 각 뇌 조직의 신경구들을 7-10일 마다 한번씩 분할하여 계속 계대배양한 결과, 종뇌, 간뇌, 소뇌, 중뇌 및 척수 유래 신경구들은 각각 계대배양 횟수(passage number) 42(약 1년), 36(약 11개월), 30(약 9개월), 10(약 6개월) 및 15(약 7개월)까지 장기적 배양이 가능하였다. 각 계대배양 과정에서 특별한 세포의 형태학적 변화 및 성장속도의 변화 등이 관찰되지 않았으며, 최종적으로 모든 세포는 노화과정을 거쳐 사멸하는 정상 원발성 세포 성장형태를 보였다(결과 미도시). 또한 각 신경구들을 액체질소에 장기간 동결보관한 후 다시 해동시켜서 동일한 방법으로 배양하여도 세포 성장 특성의 변화 없이 시험관 내에서 계속 증식 또는 분화할 수 있음도 확인하였다(결과 미도시). 본 발명의 신경줄기세포의 염색체 검사 결과, 정상 46, XY의 핵형을 보였고, 장기 계대배양시에도 정상 염색체 핵형을 보였다(결과 미도시).

<108> <2-2> 신경줄기세포의 표식인자를 이용한 면역조직화학분석

<109> 생체 외에서 증식하고 있는 신경구들을 면역조직화학법으로 염색하였다. 신경구들을 10 ㎍/㎖ 폴리-L-라이신(poly-L-lysine, Sigma)이 코팅된 챔버 슬라이드(NUNC)에 옮겨 1일간 배양하였다. 신경구가 상기 슬라이드 바닥에 부착하면, 배지를 제거하고, 차가운 1×PBS 로 1회 세척하였다. 4% 파라포름알데하이드(in Pipes buffer)(Sigma)를 10분간 처리하여 세포를 고정하였다. 이후, 1×PBS로 3회 세척한 후, 세포를 블록킹 용액(blocking solution, 5% bovine serum albumin[BSA, Sigma]+3% normal goat serum[NGS, Vector]+0.3% Triton X-100 [Sigma] in PBS)에서 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이후 캐리어 용액(carrier solution, 3% NGS+0.3% Triton X-100 in PBS)에 희석한 항-인간 특이적 네스틴 항체(anti-human specific Nestin antibody, 1:200, Chemicon) 또는 항-비멘틴 항체(anti-Vimentin antibody, 1:80, Sigma)를 첨가하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 다시 세포를 1×PBS로 3회 세척한 후, 상기 캐리어 용액에 희석한 2차 항체(species specific secondary antibodies conjugated with fluorescein, 1:200, Vector)를 넣고 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 1×PBS로 3회 세척한 후, 세포에 마운팅 배지(mounting media, Vector)를 떨어뜨리고 오버 글래스(cover glass)를 덮었다. 이후, 형광 현미경(epifluorescent microscope, Olympus)으로 관찰하였다. 그 결과, 99% 이상의 세포가 신경줄기세포의 표식인자인 네스틴 또는 비멘틴을 발현함을 확인하였다. 종뇌 유래 신경구(HFT13 세포)의 결과를 대표적으로 도 3A에 나타내었다.

<110> <2-3> 분화형태 분석

<111> 신경구를 형성하면서 증식하는 인간 신경줄기세포의 분화형태를 면역조직화학법으로 조사하였다. 각 신경구에 0.05% 트립신/EDTA를 처리하여 단일 세포현탁액으로 제조하고, 10 ㎍/㎖ 폴리-L-라이신(poly-L-lysine, Sigma)이 코팅된 8 웰 챔버 슬라이드에 옮겼다. 이후, 성장인자가 함유되지 않은 N2 배지에서 1주일 동안 배양시켰다. 그 결과, 세포들은 플레이트 바닥에 부착되어 분화된 신경세포 형태를 보였다. 배지를 제거하고, 차가운 1×PBS 로 1회 세척하였다. 4% 파라포름알데하이드(in Pipes buffer)(Sigma)를 10분간 처리하여 세포를 고정하였다. 이후, 1×PBS 로 3회 세척한 후, 블록킹 용액(blocking solution, 5% bovine serum albumin[BSA,

Sigma]+3% normal goat serum[NGS, Vector]+0.3% Triton X-100 [Sigma] in PBS)에서 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이후 캐리어 용액(carrier solution, 3% NGS+0.3% Triton X-100 in PBS)에 각 비율로 희석한 다양한 1차 항체(표 1)를 첨가하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다.

<112> 표 1

<113> 인간 신경줄기세포의 분화 형태 분석에 사용한 1차 항체

	항체명	희석비율(항체:캐리어 용액)	제조사
1	항-TUJ1(β-tubulin III) 마우스 항체	1:150	Sigma
2	항-O4 마우스 항체	1:30	Chemicon
3	항-인간 특이적 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 마우스 항체	1:200	Sternberger Monoclonals
4	항-GFAP 래빗 항체	1:400	Sigma
5	항-GABA 래빗 항체	1:500	Sigma
6	항-글루타메이트(Glutamate) 래빗 항체	1:500	Sigma
7	항-TH(Tyrosine hydroxylase) 래빗 항체	1:50	Chemicon
8	항-ChAT(choline acetyltransferase) 고우트 항체	1:200	Chemicon
9	항-NF(pan-neurofilament) 마우스 항체	1:500	Sternberger
10	항-NF-M(neurofilament-M) 래빗 항체	1:1000	Chemicon
11	항-NF-H(neurofilament-H) 래빗 항체	1:1000	Chemicon

<114>

<115> 1차 항체를 처리한 세포를 다시 1×PBS로 3회 세척한 후, 상기 캐리어 용액에 희석한 2차 항체(specific secondary antibodies conjugated with fluorescein, 1:200, Vector)를 첨가하여 37℃에서 1시간 반응시켰다. 1×PBS로 3회 세척한 후, 세포에 마운팅 배지(mounting media, Vector)를 떨어뜨리고 오버 글래스(cover glass)를 덮었다. 이후, 형광 현미경(epifluorescent microscope, Olympus)으로 관찰하였다.

<116> 그 결과, 줄기세포가 추출된 중추신경계의 해부학적 위치 및 계대배양 횟수에 따라 약간의 차이를 보였으나, 분화조건에서 인간 신경줄기세포는 각종 신경세포로 분화하고, 다양한 신경전달물질을 발현하여 분화의 다능성을 보였다(도 3B).

<117> 보다 구체적으로 살펴보면, 중추 신경계의 각 해부학적 위치에서 유래한 모든 인간 신경줄기세포에서 초기 신경마커(early neuronal marker)인 TUJ1의 발현이 관찰되었다. 이는 상기 신경줄기세포가 신경원세포로 분화할 수 있음을 보여주는 것이다. 또한 초기 희소돌기아교세포 마커(early oligodendrocyte marker)인 O4의 경우에는 대체적으로 그 발현율이 낮게 나타나 신경줄기세포의 소수가 희소돌기아교세포로 분화함을 보였다.

<118> 최근 신경교세포의 일종인 성상세포(astrocyte)의 표식인자로 알려진 GFAP를 발현하는 세포가 신경줄기세포 또는 이의 일종인 방사상 교세포(radial glial cells)임이 보고 되었다. 중추 신경계의 각 해부학적 위치에서 유래한 모든 인간 신경줄기세포가 GFAP를 발현하는 것으로 나타났다. 특히, HFT13 세포의 GFAP 발현율은 초기 및 후기 계대배양시 각각 80% 및 90-95%로 상당히 높게 나타났으며, 계대배양이 지속될수록 증가함을 보였다.

<119> 한편, 본 발명에서 배양된 인간 신경줄기세포는 분화시 다양한 신경전달물질을 발현하였는데, 특히 GABA 및 글루타메이트는 거의 모든 세포에서 발현되었다. 또한 본 방법에서 배양된 인간 신경줄기세포는 분화조건 하에서 단지 극소수의 세포만 콜린 아세틸트랜스퍼라제(콜린 AT) 및 티로신 하이드롤라제(TH)를 발현하여 도파민성 또는 콜린성 신경세포로는 잘 분화하지 않음을 보였다.

<120> <실시예 3>

<121> 인간 신경교모세포종 배양 및 인간 신경교모세포종 동물모델 확립

<122> <3-1> 인간 신경교모세포종 배양

<123> ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입한 인간 다형성 신경교모세포종의 일종인 U87MG 세포주를 10 % FBS와 1×P/S(penicillin/streptomycin; Gibco)가 첨가된 RPMI 1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 또 다른 인간 신경교모세포종의 일종인 U343MG 세포주(ATCC)는 10% FBS와 1×P/S가 첨가된 DMEM 배지(Gibco)에서 배양하였다. 이들 세포는 매 3-4일마다 0.05% 트립신/EDTA를 2분 30초간 처리하여 계대배양하였다. 마지막 계대배양 후, U87MG 또는 U343MG 세포에 트립신/EDTA를 처리하여 단일세포 현탁액을 만들었다. 상기 현탁액을 950 rpm에서 3분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 세포 펠렛에 20 ㎍/㎖ CM-DiI(Cell Tracker, Molecular Probes)를 함유하는 1×PBS 5 ㎖를 첨가하여 세포를 재부유시켰다. 이후 37℃에서 3분, 그리고 얼음 위에서 10분간 반응시켜 세포를 CM-DiI로 염색시켰다. 원심분리를 하여 얻은 세포 펠렛을 1×PBS 10 ㎖로 다시 재부유시키고 다시 3회 원심분리하여 남아있는 CM-DiI를 제거하였다. 이후, 세포수를 5×10^5 cells/4 ㎕(또는 $7x10^4$ cells/4㎕)로 조정하여 세포를 1×PBS로 재부유시켰다. 이와 같이 제조된 세포 현탁액은 생체 내 이식 전까지 얼음에 보관하였다.

<124> <3-2> 인간 신경교모세포종 동물모델 확립

<125> 6-8 주령의 비흉선 누드 마우스(Athymic nude mice, nu/nu; female)를 자일라진(Xylazine, 0.1 mg/10 g of body weight) 및 케타민(Ketamine, 0.5mg/10g of body weight)으로 마취시켰다. 두부의 정중앙 피부를 70% 알코올로 소독하고 절개하였다. 두부를 정위 장치(stereotaxic apparatus)에 고정시켰다. 오른쪽 선조체(corpus striatum) 부위에 위치를 표시한 후(브레그마(Bregma)로부터 전방으로 0.5 mm, 오른쪽 측방으로 2.5mm, 깊이 3 mm), 1 mm 드릴 바(drill bar)로 두개골에 구멍을 뚫었다. 이후, 상기 실시예 <3-1>에서 준비된 CM-DiI 표지 종양세포 현탁액을 10㎕ 헤밀톤 실린지(Hemilton syringe)에 담았다. 상기 실린지를 상기 정위 장치에 고정시킨 후, 미세주입 펌프(micro injection pump, Stoelting)를 이용하여 종양세포 현탁액 4 ㎕를 1 ㎕/분의 속도로 천천히 상기 위치의 선조체 부위에 이식하였다. 이식이 끝난 후 3분간 안정화시켰다. 다시 3분에 걸쳐 천천히 실린지 바늘을 꺼냈다. 수술부위는 요오드 연고로 소독하고 봉합하였다. 마우스는 마취가 깰 때까지 37℃ 웜 패드(warm pad)에서 안정화시켰다. 감염 예방을 위해 수술 후 3일간 세파졸린(cepazolin, 50 mg/kg/day, 유한양행)을 증류수에 희석하여 이를 상기 마우스에 피하 주사하였다.

<126> 인간 신경교모세포종 동물모델 확립을 확인하기 위해, 세포이식 수술 1주일 후 상기 마우스를 4% 파라포름알데하이드(in Pipes buffer)로 고정하고 뇌를 적출하였다. 적출된 뇌를 16 ㎛로 동결절단(cryosection)하여 헤마톡실린(hematoxylin, Vector)으로 염색하였다. 이후, 현미경 하에서 CM-DiI로 표지된 종양을 관찰하였다. 그 결과, 도 4에서 보는 바와 같이, U87MG 세포를 이식한 경우 마우스의 우측 선조체에 매우 큰 종양이 형성되었으며, U343MG 세포를 이식한 경우에도 선조체에 종양이 형성되었다.

<127> <실시예 4>

<128> SMAC 발현 재조합 아데노 바이러스 제작

<129> <4-1> CAG 프로모터를 포함하는 변형된 pShuttle 벡터의 제작

<130> CAG 프로모터를 가지는 재조합 아데노바이러스를 이용하기 위하여 pShuttle 벡터(stratagene)의 MCS(multi cloning site)에 pTriEX-1.1 Neo DNA(Novagen) 벡터로부터 가져온 CMV 즉시초기 인헨서(CMV immediately early enhancer; CMV ie enhancer), 닭 β-액틴 프로모터(β-actin promoter), 토끼 β-글로빈 종결자(β-globin terminator)와 pShuttle-IRES-hrGFP-1(stratagene) 벡터에서 가져온 IRES, hrGFP를 클로닝해서 pShuttle-CAG 또는 pShuttle-CAG-IRES-hrGFP 벡터를 만들었다(도 5 및 7 참조). 이를 상세히 설명하면 다음과 같다.

<131> 먼저 토끼 β-글로빈 종결자를 pShuttle 벡터의 *Sal*I과 *Bgl*II 사이에 다음과 같은 방법으로 클로닝하였다: pTriEX-1.1 Neo 벡터(Novagen)로부터 토끼 β-글로빈 종결자 부분을 pfu 중합효소를 이용한 PCR을 통하여 얻었다. 이때 사용한 프라이머(서열번호 4의 정방향 프라이머(CTCGAGATCAATTCTCTAGCCAAT) 및 서열번호 5의 역방향 프라이머(GGATCCTTACATATGGGCATATGT)는 pShuttle 벡터로의 클로닝을 위하여 *Xho*I과 *Bam*HI제한효소 서열을 포함하고 있다. PCR 반응은 95℃에서 5분간 초기 변성; 94℃에서 45초간 변성, 55℃에서 45초간 어닐링(annealing) 및 72℃에서 30초간 신장(extension)의 35 사이클; 및 72℃에서 7분간 최종 신장으로 수행하였다. 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T easy 벡터(Promega, Wisconsin, USA)에 클로닝하였다. 토끼 β-글로빈 종결자가 삽입된 pGEM-T easy 벡터는 *Xho*I과 *Bam*HI 으로 절단하고, pShuttle 벡터는 *Sal*I, *Bgl*II로 절단하여 각각의 산물을 연결(ligation)하였다. 이때 *Sal*I과 *Xho*I, *Bgl*II와 *Bam*HI은 각각 상보적인 응집말단(compatible cohesive end)으로써 서로 연결(ligation)이 가능하고 연결(ligation)된 벡터는 각각의 제한효소 자리를 잃는다. 이렇게 하여 토

끼 β-글로빈 종결자를 포함한 pShuttle벡터(pShuttle-rabbit β globin terminator)를 클로닝하였다.

<132> 그 다음으로 토끼 β-글로빈 종결자를 포함한 pShuttle벡터에 CMV 즉시초기 인헨서와 닭 β-액틴 프로모터 부분을 다음과 같은 방법으로 클로닝하였다: 닭 β-액틴 프로모터와 pTriEX-1.1 Neo 벡터의 MCS 사이에 존재하는 *Pac*I 제한효소 부위를 제거하기 위해 우선 *Pac*I으로 pTriEX-1.1 Neo 벡터를 자른후 클레나우 조각(klenow fragement; Takara)을 이용해 블런트 엔드(blunt end)를 만들었다. 이를 *Sma*I으로 다시 절단한 후 자가 연결(self ligation)을 수행하여 *Pac*I 제한효소 부위가 없어진 변형된 pTriEX-1.1 Neo 벡터를 얻었다. 상기의 변형된 pTriEX-1.1 Neo 벡터를 *Fse*I으로 절단 후 클레나우 조각으로 중합반응을 수행하여 블런트 엔드를 만들고 다시 *Xho*I으로 절단하여 CMV 즉시초기 인헨서와 닭 β-액틴 프로모터 부분을 얻었다. 앞서 만들어진 토끼 β-글로빈 종결자를 포함한 pShuttle벡터를 *Kpn*I과 *Xho*I으로 절단하여 얻은 산물과 상기 CMV 즉시초기 인헨서와 닭 β-액틴 프로모터 부분을 연결(ligation)하여, CMV 즉시초기 인헨서, 닭 β-액틴 프로모터와 토끼 β-글로빈 종결자를 포함한 pShuttle 벡터(pShuttle-CAG)를 완성하였다(도 5 및 6 참조).

<133> 상기 pShuttle-CAG 벡터에 다음의 방법으로 IRES와 hrGFP를 클로닝하였다: pShuttle-IRES-hrGFP-1(Stratagene) 벡터에서 IRES 및 hrGFP 부분을 pfu 중합효소를 이용한 PCR을 통하여 얻었다. 이때 사용한 프라이머(서열번호 6의 정방향 프라이머(CTCGAGGACTACAAGGATGAC) 및 서열번호 7의 역방향 프라이머(CTCGAGCACCCACTCGTGCAGGCTGCC))는 pShuttle-CAG 벡터로의 클로닝을 위하여 IRES 앞쪽에 *Xho*I제한효소 서열을 포함하고 있다. PCR 반응은 95℃에서 5분간 초기 변성; 94℃에서 45초간 변성, 55℃에서 45초간 어닐링(annealing) 및 72℃에서 1분간 신장(extension)의 35 사이클; 및 72℃에서 7분간 최종 신장으로 수행하였다. 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T easy 벡터(Promega, Wisconsin, USA)에 클로닝하였다. pGEM-T easy 벡터를 *Eco*RI으로 절단 후 클레나우 조각으로 중합반응을 실시하고 다시 *Xho*I으로 절단하여, IRES와 hrGFP 부분을 얻었다. pShuttle-CAG 벡터를 *Xho*I 및 *Eco*RV로 절단하여 얻은 산물과 위의 IRES와 hrGFP 부분을 연결(ligation)하여, pShuttle-CAG-IRES-hrGFP를 완성하였다(도 7 및 8 참조).

<134> <4-2> SMAC 발현 재조합 벡터 제작

<135> TRAIL에 반응하여 세포사멸이 유도되는 인간 신경아세포 세포주(human neuroblastoma cell line)의 일종인 SK-N-MC (ATCC number: HTB-10™)의 배양배지에 1000ng/ml의 rhTRAIL(Peprotech)을 처리하여 세포사멸을 유도하였다. 12시간 경과 후 세포를 수득하여 트리졸(Trizol, Qiagen, 미국)을 이용하여 전체 RNA를 추출하고 M-MLV 역전사효소(Invitrogen, 미국)와 Oligo dT 프라이머를 이용하여 37℃에서 50분간 반응하여 cDNA를 합성하였다.

<136> 상기에서 합성된 cDNA를 주형으로 하고 서열번호 8의 정방향 프라이머(GCGGTTCCTATTGCACAGAAATCAG) 및 서열번호 9의 역방향 프라이머(CTCGAGAATCCTCACGCAGGTAGGC)를 이용하여 서열번호 2의 SMAC 유전자를 PCR로 증폭하였다. 이 때 상기 프라이머들은 pSecTag2A 벡터(Invitrogen, 미국)로의 용이한 클로닝을 위해 그 내부에 *Xho*I 제한 효소 서열을 포함하고 있다. PCR 반응은 94℃에서 3분간 초기 변성; 94℃에서 30초간 변성, 53℃에서 40초간 어닐링(annealing) 및 72℃에서 45초간 신장(extension)의 35 사이클; 및 72℃에서 10분간 최종 신장으로 수행되었다. 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T easy 벡터(Promega, Wiscondin, USA)에 클로닝하였다(pGEM-T easy-SMAC).

<137> 한편, 전체길이의 SMAC(서열번호 3)은 발현된 후 미토콘드리아로 타겟팅되는 단백질이어서 그 N-말단에 미토콘드리아 타겟팅 서열(MTS, mitochondrial targeting sequence)을 가지고 있다. 하지만, 본 발명에서 사용될 SMAC은 세포질에 위치하여 작용하여야 하므로 미토콘드리아 타겟팅 서열이 제거되어야 할 필요가 있다. 따라서, 상기 PCR에 의해 증폭된 SMAC 서열은 상기 MTS(서열번호 3의 1 내지 55번째 아미노산)가 제거된 부분(서열번호 1)에 해당한다.

<138> 아울러, 신경줄기세포에서 발현되어 세포 밖으로 분비된 본 발명의 SMAC이 목적세포의 세포막을 통과하여 세포질 내부로 들어갈 수 있도록 하기 위해, HIV에서 유래된 11개 아미노산으로 이루어진 단백질 형질도입 도메인(protein transduction domain, TAT; YGRKKRRQRRR; 서열번호 10)을 다음과 같이 SMAC의 N-terminal에 연결하였다: 상기 pGEM-T easy-SMAC 벡터를 주형으로 하여 서열번호 11의 정방향 프라이머(AACGGAGGCAACGTAGACGCGGAGCGGTTC) 및 서열번호 9의 역방향 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 통해 SMAC 서열의 5' 말단에 TAT 서열의 일부를 연장시켰다. PCR 반응은 94℃에서 3분간 초기 변성; 94℃에서 30초간 변성, 55℃에서 30초간 어닐링(annealing) 및 72℃에서 45초간 신장(extension)의 35 사이클; 및 72℃에서 10분간 최종 신장으로 수행되었다. 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T easy 벡터(Promega)에 클로닝하였다. 이 벡터를 주형으로 다시 서열번호 12의 정방향 프라이머(AAGCTTAGGATATGGACGAAAGAAACGGAGGCAACGTAGAC) 및 서열번호 9의 역방향 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 통해 나머지 TAT 서열을 연장하였다. PCR 반응은 94℃에서 3분간 초기 변성; 94℃에서 30초간 변성, 53℃에서 40초간 어닐링(annealing) 및 72℃에서 45초간 신장(extension)의 35 사이클; 및 72

℃에서 10분간 최종 신장으로 수행되었다. 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T easy 벡터(Promega)에 클로닝하였다(pGEM-T easy-TAT-SMAC).

<139> 이후, 단백질의 세포 밖 분비를 유도하는 Igκ-체인 리더를 포함하는 pSecTag2A 벡터(Invitrogen)에 TAT와 연결된 본 발명의 SMAC을 클로닝 하였다. 즉, pGEM-T easy-TAT-SMAC 벡터와 pSecTag2A 벡터를 각각 *Hind*III 와 *Xho*I 제한효소로 자르고 TAT와 연결된 본 발명의 SMAC 단편과 pSecTag2A 벡터를 연결(ligation)하여 Igκ-체인 리더-TAT-SMAC 구조물(construct)을 완성하였다.

<140> 완성된 Igκ-체인 리더-TAT-SMAC 구조물을 아데노바이러스 셔틀 벡터로 클로닝하기 위하여 상기 구조물의 양 말단에 *Bgl*II와 *Sal*I제한 효소 서열을 PCR로 연결하였다. 이 때 PCR은 상기에서 제작한 TAT-SMAC이 포함된 pSecTag2A 벡터를 주형으로 하여 서열번호 13의 정방향 프라이머 및(AGATCTGCCACCATGGAGACA) 서열번호 14의 역방향 프라이머(GTCGACTTACAGATCCTCTTCTG)를 사용하였으며, PCR 반응은 94℃에서 3분간 초기 변성; 94℃에서 30초간 변성, 53℃에서 40초간 어닐링(annealing) 및 72℃에서 45초간 신장(extension)의 35 사이클; 및 72℃에서 10분간 최종 신장으로 수행되었다. 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T easy 벡터(Promega)에 클로닝하였다(pGEM-T easy-Igκ-TAT-SMAC). 이 후, 상기 pGEM-T easy-Igκ-TAT-SMAC 벡터를 *Bgl*II와 *Sal*I제한 효소로 절단한 후 하여 Igκ-TAT-SMAC 단편을 실시예 <4-1>에서 제작한 아데노바이러스 셔틀벡터인 pShuttle-CAG에 삽입하였으며, 이를 'pShuttle-CAG-Igκ-TAT-SMAC(도 9)'라고 명명하였다.

<141> <4-3> SMAC 발현 재조합 아데노바이러스(AdCAG-TAT-SMAC) 제조

<142> 상기에서 제조한 pShuttle-CAG-Igκ-TAT-SMAC를 *Pme*I제한효소로 절단한 후, 아데노바이러스성 백본 벡터(adenoviral backbone vector)인 pAdEasy-1(Stratagene)과 함께 BJ5183 대장균에 공동도입하여 상기 두 벡터 간의 동종 재조합(homologous recombination)을 유도하였다(pAd-CAG-Igκ-TAT-SMAC). 대장균의 형질전환은 유전자 도입기(Gene Pulser, 2.5kV, 25μF, 200Ω)(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용한 전기천공법에 의하여 수행하였다.

<143> 이렇게 얻은 pAd-CAG-Igκ-TAT-SMAC를 *Pac*I제한 효소로 절단한 후, 아데노바이러스 생산 세포주인 293A 세포(Invitrogen, CA)에 형질감염(transfection)하여 바이러스를 증폭시켰다. 생산된 재조합 바이러스(AdCAG-TAT-SMAC)는 80,000 rpm으로 10℃에서 6시간 동안 염화세슘 초원심분리(cesium chloride ultracentrifugation)를 수행하여 순수분리하였다. 이후, 4% 수크로즈 완충용액(10 mM Tris, 4% sucrose, 2 mM $MgCl_2$ in PBS)에서 투석(Pierce, Rockford, IL, USA)한 후 0.4 ㎛ 여과기로 여과하여 사용 전까지 -70℃에 보관하였다.

<144> <4-4> $TCID_{50}$ 테스트

<145> 상기에서 제조된 AdCAG-TAT-SMAC 재조합 바이러스를 정량하기 위해 293A 세포를 이용하여 $TCID_{50}$(Tissue Culture Infectious Dose 50, QBiogene) 테스트를 하였다. 293A 세포를 96 웰 플레이트(NUNC)에 플레이팅(plating)하고, 연속 희석한 재조합 바이러스를 각각 감염시켰다. 1주일 후 감염된 웰 수를 더하여 KABER 통계법(TCID 50 reference; QBiogene, CA, USA. AdenoVator applications manual)으로 $TCID_{50}$ 값을 계산하였다.

<146> 그 결과, AdCAG-TAT-SMAC 재조합 바이러스의 $TCID_{50}$ 값이 평균적으로 1×10^{10} 내지 5×10^{10} PFU/㎖ 인 것으로 나타나 아데노바이러스 벡터가 잘 제작되었음을 알 수 있었다.

<147> <4-5> 야생형 아데노바이러스의 오염 여부 확인

<148> AdCAG-TAT-SMAC 재조합 바이러스에서 야생형 아데노바이러스의 오염여부를 확인하기 위해, 상기 재조합 아데노바이러스에서는 제거된 야생형 아데노바이러스의 E1 유전자의 내부 서열로부터 프라이머를 합성하여 PCR을 수행하였다. 먼저, 각 재조합 바이러스의 게놈은 바이러스 입자를 용해(lysis) 완충용액(0.1% SDS, 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA)으로 깬 후 페놀/에탄올 침전법으로 얻었다. 이후, 얻어진 각 게놈을 주형으로 하고 야생형 아데노바이러스의 오염 여부를 확인하기 위하여 서열번호 15(TTTGTGTTACTCATAGCGCGT) 및 서열번호 16(ATTCTTTCCCACCCTTAAGCC)의 프라이머(야생형 아데노바이러스의 E1 유전자를 증폭함)를 이용하여 PCR을 수행하였으며, 추출한 재조합 아데노바이러스의 게놈을 확인하기 위하여 목적 유전자(interest gene)인 TAT-SMAC 유전자를 검출하기 위한 서열번호 13와 서열번호 14의 프라이머를 이용하여 PCR 수행하였다. PCR 반응은 94℃에서 3분간 초기 변성; 94℃에서 30초간 변성, 53℃에서 40초간 어닐링(annealing) 및 72℃에서 45초간 신장(extension)의 35 사이클; 및 72℃에서 10분간 최종 신장으로 수행되었다. 이때 293A 세포 게놈을 양성 대조군으로 하였다. 상기 293A 세포 게놈은 다이제스천(digestion) 완충용액(0.5% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-

Cl, 25 mM EDTA)으로 세포를 깬 후 페놀/에탄올 침전 방법으로 얻었다. PCR 반응 결과는 아가로스 겔 전기영동으로 확인하였다.

<149> 그 결과, 도 11에서 보는 바와 같이, 293A 세포에서는 340 bp의 E1 유전자가 검출되었으나(lane 2), AdCAG-TAT-SMAC 재조합 바이러스 게놈에서는 검출되지 않았으며(lane 3), 목적 유전자(TAT-SMAC : 756 bp)가 검출되어(lane 4) 추출한 재조합 바이러스 게놈임을 확인하였다.

<150> <실시예 5>

<151> TRAIL 발현 재조합 아데노바이러스 제작

<152> <5-1> TRAIL 발현 재조합 벡터의 제작

<153> 먼저, 인간 태아 뇌 cDNA 라이브러리(Clontech, Cat. 634258)로부터 얻은 플라스미드를 주형으로 하여 TRAIL 유전자를 PCR로 증폭하였다. 수용성 TRAIL을 제조하기 위하여, 서열번호 17의 TRAIL에서 트랜스멤브레인 도메인을 제외한 아폽토제닉 리셉터 바인딩 모이어티(apoptogenic receptor binding moiety) 부분(서열번호 17의 95-281, 서열번호 18)을 PCR로 증폭하였다. 이 때 사용한 프라이머(서열번호 19(GGTACCACCTCTGAGGAAACCATTTC) 및 서열번호 20(CTCGAGGCCAACTAAAAAGGCCCCGA))는 pSecTag2A 벡터(Invitrogen)로의 용이한 클로닝을 위해 그 내부에 각각 *Kpn*I과 *Xho*I 제한효소 서열을 포함하고 있다. PCR 반응은 94℃에서 3분간 초기 변성; 94℃에서 30초간 변성, 58℃에서 30초간 어닐링(annealing) 및 72℃에서 45초간 신장(extension)의 35 사이클; 및 72℃에서 10분간 최종 신장으로 수행되었다. 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T easy 벡터(Promega, Wisconsin, USA)에 클로닝하였다.

<154> TRAIL의 삼합체화를 통한 활성 향상을 위하여 이소류신 지퍼 도메인(이하, 'ILZ'라 함)를 다음과 같은 방법으로 클로닝하였다: 공지된 ILZ의 아미노산 서열을 역번역하여 얻어진 서열(GGCATGAAGCAGATCGAGGACAAAATTGAGGAAATCCTGTCCAAGATTTACCACATCGAGAACGAGATCGCCCGGATTAAGAAACTCATTGGCGAGGGC, 서열번호 21)의 양 말단에 *Hin*dIII 및 *Kpn*I의 제한효소 서열을 연결하여 올리고머를 합성하였다(Bioneer, 대전). 합성된 올리고머를 pGEM-T 벡터에 삽입하였다.

<155> 이후, 단백질의 세포 밖 분비를 유도하는 Igκ-체인 리더를 포함하는 pSecTag2A 벡터에 상기 ILZ와 *TRAIL* 유전자를 순서대로 삽입하였다. 즉, 먼저 ILZ가 삽입된 pGEM-T 벡터를 *Hin*dIII와 *Kpn*I으로 절단하고, 절단된 ILZ을 pSecTag2A 벡터에 삽입하였다. 또한 *TRAIL* 유전자가 삽입된 pGEM-T easy 벡터의 양 말단을 *Kpn*I과 *Xho*I으로 절단한 후, 절단된 *TRAIL* 유전자를 상기 ILZ가 삽입된 pSecTag2A에 삽입하였다. 상기 pSecTag2A 벡터로부터 발현된 TRAIL이 세포 밖으로 분비된 후 Igκ-체인 리더는 소멸하게 된다.

<156> 이와 같이 제조된 Igk-ILZ-TRAIL 구조물(construct)을 다음과 같은 방법으로 CAG 프로모터를 포함하는 변형된 pShuttle 벡터(pShuttle-CAG-IRES-hrGFP)에 클로닝하였다: 상기 Igk-ILZ-TRAIL 구조물의 양 말단에 *Bgl*II와 *Xho*I 제한효소 부위를 PCR로 연결하였다. 이 때 프라이머로는 서열번호 23(AGATCTATGGAGACAGACACACTCCT) 및 서열번호 20로 표시되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 사용하였다. PCR 반응은 94℃에서 3분간 초기 변성; 94℃에서 30초간 변성, 60℃에서 30초간 어닐링 및 72℃에서 90초간 신장의 35 사이클; 및 72℃에서 10분간 최종 신장으로 수행되었다. 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T easy 벡터(Promega, Wisconsin, USA)에 클로닝하였다. 이후, 상기 벡터를 *Bgl*II와 *Xho*I 제한효소로 절단하여 아데노바이러스 셔틀 벡터인 pShuttle-CAG-IRES-hrGFP에 각각 삽입하였으며, 이를 pShuttle-CAG-Igκ-ILZ-TRAIL-IRES-hrGFP라 명명하였다(도 10 참조). 상기 pShuttle-CAG-Igκ-ILZ-TRAIL-IRES-hrGFP 벡터에서 TRAIL 유전자의 하류에 GFP 유전자가 IRES에 의해 연결되어 있어 TRAIL이 발현되는 경우 자연적으로 GFP도 함께 발현된다.

<157> <5-2> TRAIL 발현 재조합 아데노바이러스(AdCAG-TRAIL)의 제작

<158> CAG 프로모터에 의해 TRAIL이 발현되는 재조합 아데노바이러스는 상기 pShuttle-CAG-Igκ-ILZ-TRAIL-IRES-hrGFP를 *Pme*I제한효소로 절단한 후, 아데노바이러스성 백본 벡터(adenoviral backbone vector)인 pAdEasy-1(Stratagene)과 함께 BJ5183 대장균에 공동도입하여 상기 두 벡터 간의 동종 재조합(homologous recombination)을 유도하였다(pAd-CAG-Igκ-ILZ-TRAIL-IRES-hrGFP). 대장균의 형질전환은 유전자 도입기(Gene Pulser, 2.5kV, 25μF, 200Ω)(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용한 전기천공법에 의하여 수행하였다.

<159> 이렇게 얻은 pAd-CAG-Igκ-ILZ-TRAIL-IRES-hrGFP를 *Pac*I제한 효소로 절단한 후, 아데노바이러스 생산 세포주인 293A 세포(Invitrogen, 미국)에 형질감염(transfection)하여 바이러스를 증폭시켰다. 생산된 재조합 바이러스(AdCAG-TRAIL)는 80,000 rpm으로 10℃에서 6시간 동안 염화칼슘 초원심분리(cesium chloride

ultracentrifugation)를 수행하여 순수분리하였다. 이후, 4% 수크로즈 완충용액(10 mM Tris, 4% sucrose, 2 mM $MgCl_2$ in PBS)에서 투석(Pierce, Rockford, IL, USA)한 후 0.4 ㎛ 여과기로 여과하여 사용 전까지 -70℃에 보관하였다.

<160> <5-3> GFP 발현 재조합 아데노바이러스(AdCAG-GFP)의 제작

<161> CAG 프로모터에 의해 GFP만을 발현하는 재조합 아데노바이러스(AdCAG-GFP, 대조군 바이러스)는 실시예 <4-1>에서 제조한 pShuttle-CAG-IRES-hrGFP 벡터를 이용하여 상기 실시예 <5-1> 및 <5-2>와 동일한 방법으로 제조하였다.

<162> <실시예 6>

<163> TRAIL 및 SMAC에 대한 인간 신경줄기세포의 반응 조사

<164> <6-1> SMAC 발현 재조합 아데노바이러스에 감염된 인간 신경줄기세포의 증식 및 성장 분석

<165> AdCAG-TAT-SMAC 및 AdCAG-GFP 재조합 바이러스에 각각 감염된 인간 신경줄기세포가 정상적으로 증식 및 성장하는지를 관찰하였다.

<166> HFT13 세포 5 x 10^5개를 성장인자가 포함된 N2 배지 1 ㎖와 함께 6 웰 배양 디쉬의 각 웰에 플레이팅하였다. 한 시간 후, 50 MOI의 AdCAG-GFP, 50 및 100 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스 입자를 각각 배지에 직접 넣어 세포를 감염시켰다. 감염 24시간 후 바이러스를 제거하기 위해 3 ㎖ N2 배지로 1회 세척하고, 성장인자가 포함된 3 ㎖ N2 배지에서 계속 배양하였다. 배양 2일 후 세포는 각각에서 GFP를 발현하고 정상 신경구를 형성하면서 증식 및 성장하는 것이 관찰되었다(결과 미도시).

<167> 이후, SMAC 또는 GFP 발현 재조합 아데노바이러스의 감염이 인간 신경줄기세포의 증식 및 성장에 미치는 영향을 정량적으로 분석하기 위해, CCK-8 어세이를 수행하였다. HFT13 세포 5×10^4개를 성장인자 함유 N2 배지 100 ㎕와 함께 96 웰 플레이트 각 웰에 플레이팅하였다. 1시간 후, 50 MOI의 AdCAG-GFP, 50 및 100 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스 입자를 각각 배지에 직접 넣어 세포를 감염시켰다. 감염 24시간 후 바이러스를 제거하기 위해 N2 배지 100㎕로 1회 세척하고, 성장인자 함유 N2 배지 100㎕에서 계속 배양하였다. 3일 후 CCK-8 용액 10㎕을 처리하고, 2시간 후 마이크로플레이트 리더로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 블랭크 대조군은 배양액에 CCK-8 용액만을 처리한 웰로 하였고, 바이러스 첨가하지 않은 HFT13 세포 배양군을 100% 세포 생존군으로 표현하였다. 각각의 실험군은 3개의 웰로 실험하였고, 동일 실험을 3회 반복하여 평균값을 구하였다. 바이러스 비 감염 HFT13 세포 성장을 평균 100%로 하였을 때, AdCAG-GFP 감염 세포는 평균 99.28 ± 1.98 %, 50MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 감염 세포는 평균 96.22 ± 2.19%, 및 100MOI의 AdCAG-TRAIL 감염 세포는 평균 92.78 ± 1.97 %의 생존도(viability)를 보였다(도 12 참조).

<168> 상기 결과들로부터 CMV 및 CAG 프로모터에 의한 SMAC 및 GFP의 발현이 인간 신경줄기세포의 증식과 성장을 저해하지 않으며, 또한 아데노바이러스 감염 자체에도 큰 영향을 받지 않음을 확인하였다.

<169> <6-2> TRAIL 및 SMAC 발현 재조합 아데노바이러스에 공동 감염된 인간 신경줄기세포의 증식 및 성장 분석

<170> AdCAG-TRAIL과 AdCAG-TAT-SMAC 재조합 바이러스에 동시 감염된 인간 신경줄기세포가 TRAIL 및 SMAC을 발현하면서 정상적으로 증식 및 성장하는지를 관찰하였다.

<171> HFT13 세포 5 x 10^5개를 성장인자가 포함된 N2 배지 1 ㎖와 함께 6 웰 배양 디쉬의 각 웰에 플레이팅하였다. 한 시간 후, 50 MOI의 AdCAG-GFP 바이러스 감염, 130 MOI의 AdCAG-TRAIL 바이러스 감염, 100 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스 감염, 65 MOI의 AdCAG-TRAIL 및 50 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스의 공동감염, 그리고 130 MOI의 AdCAG-TRAIL과 100 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스의 공동감염 조건으로 각각의 바이러스 입자를 배지에 직접 넣어 세포를 감염시켰다. 감염 24시간 후 바이러스를 제거하기 위해 3 ㎖ N2 배지로 1회 세척하고, 성장인자가 포함된 3 ㎖ N2 배지에서 계속 배양하였다. 배양 2일 후 인간 신경줄기세포는 각각의 조건에서 GFP를 잘 발현하고 정상 신경구를 형성하면서 증식 및 성장하였으나, 세포를 감염시키는 바이러스 농도가 가장 높은 130 MOI의 AdCAG-TRAIL 및 100 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스로 공동 감염시킨 세포에서는 세포상태가 불량하였고 정상적인 세포 성장을 보이지 않았다(결과 미도시).

<172> 상기 결과들로부터 CAG 프로모터에 의한 TRAIL 및 SMAC의 동시 발현이 인간 신경줄기세포의 증식과 성장을 크게 저해하지 않으나, 세포를 감염시키는 아데노바이러스의 농도가 높아지면 세포증식과 성장에 영향을 미침을 확인

하였다.

<173> <실시예 7>

<174> 재조합 아데노바이러스에 의한 인간 신경줄기세포의 단백질 발현양 분석

<175> <7-1> SMAC 발현 재조합 아데노바이러스에 감염된 인간 신경줄기세포의 SMAC 발현양 분석

<176> 상기 실시예 <4-2>에서 제작된 AdCAG-TAT-SMAC 재조합 바이러스가 숙주 세포내에서 SMAC을 분비하는지 확인하기 위해 다음과 같이 상기 AdCAG-TAT-SMAC 및 AdCAG-CFP 바이러스를 인간 신경줄기세포(HFT13 세포)에 감염시킨 후, 분비된 SMAC을 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 정량하였다.

<177> 이를 위하여, 상기 실시예 1에서 분리된 종뇌 유래 인간 신경줄기세포(HFT13 세포) 5×10^5개를 성장인자 함유 N2 배지 1㎖와 함께 6 웰 배양 디쉬에 플레이팅하였다. 1시간 후에 각각 50, 75, 100 및 200 MOI(multiplicity of infection)의 AdCAG-TAT-SMAC 및 50 MOI의 AdCAG-GFP 바이러스성 입자를 배지에 첨가하여 세포를 감염시켰다. 감염 24시간 후, 바이러스를 제거하기 위해 3 ㎖ N2 배지로 각 웰을 1회 세척하였다. 이후, 성장인자 함유 N2 배지 3 ㎖를 첨가하여 48시간 동안 세포를 배양하였다.

<178> 재조합 바이러스에 감염된 신경줄기세포로부터 분비된 SMAC을 정량하기 위하여 세포 배양액을 모두 수거하여 SMAC에 대한 ELISA(R&D Systems Inc., 미국)를 수행하였다. 항-인간 SMAC 항체를 인산 완충용액(PBS: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na_2HPO_4, 1.5mM KH_2PO_4, pH7.2-7.4)에 0.8 ㎍/㎖의 비율로 희석하고 이를 96 웰 플레이트의 각 웰에 100 ㎕씩 분주하고 실온에서 하루 동안 반응시켰다. 웰을 세척 완충용액(0.05% Tween-20 in PBS) 400㎕로 3회 세척하였다. 블록 버퍼(Block buffer, 1% BSA, 5% sucrose, 0.05% NaN_3, in PBS, pH7.2-7.4) 300㎕를 각 웰에 첨가하고 실온에서 1-2 시간 방치하여 블록킹(blocking)하였다. 이후 다시 3회 세척한 후, 각각 AdCAG-TAT-SMAC 재조합 아데노바이러스의 배양액과 SMAC 표준용액(standard)의 연속 희석액을 100 ㎕씩 각 웰에 분주하여 실온에서 두 시간 반응시켰다. 반응이 완료된 후, 각 웰을 3회 세척하였다. IC Diluent #1(1% BSA in PBS, pH7.2-7.4, 0.2 ㎛ filtered)에 바이오틴이 처리된 항-인간 SMAC 항체(biotinylated anti-human SMAC antibody)을 150ng의 농도로 희석하여 100 ㎕씩 분주하고 실온에서 두 시간 반응시켰다. 반응이 완료된 후, 각 웰을 3회 세척하였다. IC Diluent #1에 아비딘-홀스래디쉬 퍼옥시다제 시약(avidin-horseradish peroxidase conjuate reagent)을 희석하여 100 ㎕씩 분주하고 실온에서 20분 간 반응시키고, 3회 세척하였다. 각 웰에 기질 용액(Tetramethyl-benzidine [TMB] and hydrogen peroxide, R&D systems, 미국)을 100 ㎕씩 분주하여, 빛을 차단하고 실온에서 20분간 반응시킨 후 50 ㎕의 2N 황산(sulfuric acid)을 넣어 반응을 중지시켰다. 이후, 마이크로플레이트 리더(microplate reader, Molecular Devices, 미국)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

<179> 그 결과, 측정된 SMAC 단백질의 양은 AdCAG-TAT-SMAC를 각각 50, 75, 100 및 200 MOI로 감염시킨 경우, 48시간 후 백만 개의 신경줄기세포 배양액으로부터 각각 13.20 ± 0.46(Mean± SD), 18.70 ± 0.12, 21.71 ± 0.29 및 26.55 ± 1.32 ng 이었다. 바이러스를 감염시키지 않은 HFT13 세포 배양액 및 50 MOI의 AdCAG-GFP에 감염된 HFT13배양액에서는 각각 0.57 및 0.59 ng의 값이 측정되었다(도 13 참조).

<180> 상기 결과들로부터 SMAC 발현 재조합 아데노바이러스에 감염된 인간 신경줄기세포에서 SMAC이 정상적으로 분비됨을 확인하였으며, 이는 본 발명의 재조합 발현벡터에 의해 숙주세포에 아데노바이러스를 매개로 한 유전자 전달이 효율적으로 사용될 수 있음을 보여주는 것이다.

<181> <7-2> TRAIL 및 SMAC 발현 재조합 아데노바이러스에 공동 감염된 인간 신경줄기세포에서 발현되는 TRAIL 및 SMAC 단백질 양 분석

<182> AdCAG-TAT-SMAC과 AdCAG-TRAIL을 인간 신경줄기세포(HFT13)에 공동으로 감염시켰을 때, 각각의 단백질이 발현되는 양이 어떠한지 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. HFT13 세포 5 x 10^5개를 성장인자가 포함된 N2 배지 1 ㎖와 함께 6 웰 배양 디쉬의 각 웰에 플레이팅하였다. 한 시간 후, 50 MOI의 AdCAG-GFP 바이러스 감염, 130 MOI의 AdCAG-TRAIL 바이러스 감염, 100 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스 감염, 65 MOI의 AdCAG-TRAIL 및 50 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스의 공동감염, 그리고 130 MOI의 AdCAG-TRAIL과 100 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스의 공동감염 조건으로 각각의 바이러스 입자를 배지에 직접 넣어 세포를 감염시켰다. 감염 24시간 후, 바이러스를 제거하기 위해 3 ㎖ N2 배지로 각 웰을 1회 세척하였다. 이후, 성장인자 함유 N2 배지 3 ㎖를 첨가하여 48시간 동안 세포를 배양하였다.

<183> 재조합 바이러스에 감염된 신경줄기세포로부터 분비된 SMAC 및 TRAIL을 정량하기 위하여 세포 배양액을 모두 수거하여 SMAC에 대한 ELISA(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)와 TRAIL에 대한 ELISA(BD, San Diego, CA)를 상기의 방법으로 각각 수행하였다. 이 때, TRAIL에 대한 ELISA는 각각 65, 130, 195 및 260 MOI(multiplicity of infection)의 AdCAG-TRAIL 및 50 MOI의 AdCAG-GFP 바이러스성 입자를 배지에 첨가하여 세포를 감염시킨 것을 제외하고, 상기 SMAC에 대한 ELISA의 방법을 이용하여 측정하였다.

<184> 그 결과, 측정된 SMAC 단백질의 양은 48시간 후 백만 개의 신경줄기세포 배양액으로부터, 100 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 감염 시 22.97 ± 0.85 ng(Mean± SD), 65 MOI의 AdCAG-TRAIL과 50 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC의 공동감염 시에 12.32 ± 0.25 ng 및 130 MOI의 AdCAG-TRAIL과 100 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC의 공동감염 조건에서 13.15 ± 0.19 ng이었다. 또한 측정된 TRAIL 단백질의 양은 48시간 후 백만 개의 신경줄기세포 배양액으로부터, 130 MOI의 AdCAG-TRAIL 감염 시 42.94 ± 0.15 ng(Mean± SD), 65 MOI의 AdCAG-TRAIL과 50 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC의 공동감염 시에 37.29 ± 0.92 ng 및 130 MOI의 AdCAG-TRAIL과 100 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC의 공동감염 조건에서 38.28 ± 0.73 ng이었다(도 14 참조).

<185> 이와 같은 결과는 AdCAG-TRAIL 및 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스를 인간 신경줄기세포에 동시에 공동 감염시켜도 각각의 단백질 발현이 억제되지는 않으나, AdCAG-TRAIL 혹은 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스를 각각 따로 감염시키는 경우에 비하여 공동감염(130 MOI AdCAG-TRAIL + 100 MOI AdCAG-TAT-SMAC) 시키는 경우 감염 바이러스 농도가 높아 세포성장 상태가 불량하였고, TRAIL 및 SMAC 단백질 발현양도 감소한다는 점을 보여 준다. 감염 바이러스 농도를 절반으로 줄여서 공동 감염시키는 경우(65 MOI AdCAG-TRAIL + 50 MOI AdCAG-TAT-SMAC) 세포성장 상태는 개선되었으나, TRAIL 및 SMAC 발현양은 더 많이 감소함을 보였다.

<186> **<실시예 8>**

<187> **TRAIL 및 SMAC 발현 재조합 아데노바이러스에 감염된 인간 신경줄기세포에 의한 인간 신경교모세포종의 세포사멸 분석**

<188> **<8-1> TRAIL 및 SMAC 발현 재조합 아데노바이러스에 각각 감염된 인간 신경줄기세포에 의한 인간 신경교모세포종의 세포사멸 분석**

<189> AdCAG-TRAIL 또는 AdCAG-TAT-SMAC 재조합 바이러스에 각각 감염된 인간 신경줄기세포에서 분비되는 TRAIL과 SMAC이 서로 상승적으로 인간 신경교모세포종 세포의 사멸을 유도하는지 확인하기 위해, 각 바이러스에 감염된 신경줄기세포 배양액과 신경교모세포종 세포주의 공동 배양을 실시하였다.

<190> 먼저, HFT13 세포 5×10^5개를 6 웰 플레이트 디쉬의 각 웰에 배지와 함께 플레이팅하였다. 1시간 후, 50 MOI의 AdCAG-GFP, 130 MOI의 AdCAG-TRAIL 및 100 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스 입자를 각각 다른 웰의 세포배지에 직접 넣어 세포를 감염시켰다. 24시간 후, 세포를 N2 배지 3 ㎖로 세척하고, 성장인자 함유 N2 배지 5 ㎖에서 3일간 계속 배양하였다. 세포 배양액을 1000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 한편, U87MG 세포 2×10^5개를 12 웰 플레이트 디쉬의 각 웰에 배지와 함께 플레이팅하였다. 24시간 동안 배양한 후, 종양세포의 배지를 제거하고 상기 준비된 다양한 바이러스에 감염된 신경줄기세포 배양액의 조합을 각 웰 당 1.5 ㎖씩 첨가하고 종양세포의 사멸여부를 관찰하였다.

<191> 그 결과, AdCAG-TRAIL에 감염된 HFT13 세포의 배지 0.75㎖와 AdCAG-GFP에 감염된 HFT13 세포의 배지 0.75㎖와 함께 공동 배양된 U87MG 세포는 rhTRAIL을 직접 처리했을 때와 유사하게 세포사멸을 보였으며, 특히 AdCAG-TRAIL에 감염된 HFT13 세포의 배지 0.75㎖와 AdCAG-TAT-SMAC에 감염된 HFT13 세포의 배지 0.75㎖와 함께 공동 배양된 U87MG 세포는 더 빠르게 세포사멸이 일어나는 것을 관찰하였다(도 15 참조). 반면, AdCAG-TAT-SMAC에 감염된 HFT13 세포의 배지 0.75㎖와 AdCAG-GFP에 감염된 HFT13 세포의 배지 0.75㎖에 공동 배양된 U87MG 세포, AdCAG-GFP에만 감염된 HFT13 세포배지 1.5 ㎖에 공동 배양된 U87MG 세포들은 사멸을 보이지 않았다(도 15 참조).

<192> 이러한 세포사멸 정도를 정량화하기 위해, 미토콘드리아 디하이드로게나제 활성 어세이(mitochondrial dehydrogenase activity assay)(Cell Counting Kit-8 [CCK-8 assay], Dojindo Laboratories, Tokyo, Japan)를 수행하였다. HFT13 세포 5×10^4개를 성장인자가 포함된 N2 배지 100㎕와 함께 96 웰 플레이트의 각 웰에 플레이팅하였다. 24 시간 후 실험군 및 대조군의 배지를 처리하였다. 24시간 후 각 웰에 10 ㎕의 수용성 테트라졸리움 염(water-soluble tetrazolium salt)과 전자 캐리어(electron carrier)인 1-메톡시 PMS가 희석되어 있는 CCK-8 용액을 첨가하였다. 2시간 후 마이크로 리더를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 블랭크 대조군

은 세포 배지에 CCK-8 용액만 처리한 웰로 하였고, 무처리 HFT13 세포 배양군을 100% 생존으로 표현하였다. 모든 실험을 동일한 조건에서 3회 반복하여 평균값을 얻었다.

<193> 그 결과, 130 MOI의 AdCAG-TRAIL 재조합 바이러스에 감염된 HFT13 세포 배지 0.75㎖과 AdCAG-GFP에 감염된 HFT13 세포의 배지 0.75㎖에 24시간 공동 배양된 U87MG 세포는 49% 이상이 사멸하였다. 이에 비하여, 130MOI의 AdCAG-TRAIL에 감염된 HFT13 세포의 배지 0.75㎖과 100MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스에 감염된 HFT13 세포 배지 0.75㎖에 U87MG 세포를 24시간 공동배양 시에는 종양세포의 75% 이상이 사멸하여, TRAIL 단백질과 SMAC 단백질이 공동으로 작용할 때 더 많은 세포가 죽는 것이 관찰되었다. 반면, AdCAG-GFP에 감염된 HFT13 세포의 배지 1.5 ㎖ 또는 AdCAG-TAT-SMAC에 감염된 HFT13 세포의 배지 0.75㎖과 AdCAG-GFP에 감염된 HFT13 세포의 배지 0.75㎖에 공동 배양된 U87MG 세포들은 1% 미만의 종양세포만 사멸을 보였다(도 16 참조).

<194> **<8-2> TRAIL 및 SMAC 발현 재조합 아데노바이러스에 공동 감염된 인간 신경줄기세포에 의한 인간 신경교모세포종의 세포사멸 분석**

<195> AdCAG-TRAIL 및 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스에 공동 감염된 인간 신경줄기세포에서 분비되는 TRAIL과 SMAC이 인간 신경교모세포종 세포의 사멸을 유도하는지 확인하기 위해, 바이러스에 감염된 신경줄기세포 배양액과 신경교모세포종 세포주의 공동 배양을 실시하였다.

<196> 상기와 같은 방법으로 HFT13 세포를 각 웰에 배지와 함께 플레이팅하고 1시간 후, 상기 실시예 <8-1>에서의 조건으로 재조합 아데노바이러스 입자들을 단독 혹은 공동으로 배지에 직접 넣어 세포를 감염시켰다. 24시간 후, 세포를 N2 배지 3 ㎖로 세척하고, 성장인자 함유 N2 배지 5 ㎖에서 3일간 계속 배양하였다. 세포 배양액을 1000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 한편, U87MG 세포 2×10^5개를 12 웰 플레이트 디쉬의 각 웰에 배지와 함께 플레이팅하였다. 24시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 상기 준비된 신경줄기세포 배양액을 각 웰 당 1.5 ㎖씩 첨가하고 종양세포의 사멸여부를 관찰하였다.

<197> 이러한 세포사멸 정도를 정량화하기 위해, 상기 실시예 <8-1>과 동일한 방법으로 CCK-8 어세이를 수행하였다. 그 결과, 130 MOI의 AdCAG-TRAIL 바이러스에 감염된 HFT13 세포 배지와 U87MG 세포를 24시간 공동배양 시에는 종양세포의 60% 이상, 65 MOI의 AdCAG-TRAIL과 50 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스에 공동 감염된 HFT13 세포 배지와 U87MG 세포를 공동배양 시에는 종양세포의 51% 이상, 130 MOI의 AdCAG-TRAIL과 100 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스에 공동 감염된 HFT13 세포 배지와 U87MG 세포를 공동배양 시에는 종양세포의 48% 이상이 사멸하였다. 반면, AdCAG-GFP에 감염된 HFT13 세포의 배지 또는 100 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스에 감염된 HFT13 세포의 배지와 U87MG 세포를 공동배양 시에는 2% 미만의 종양세포만 사멸을 보였다.

<198> 따라서 인간줄기세포에 TRAIL 및 SMAC 발현 재조합바이러스를 동시에 공동 감염시킬 경우, TRAIL 발현 재조합바이러스만을 감염시킨 경우보다 세포 사멸의 정도가 낮아졌으며, 이는 바이러스 농도가 증가하여 세포 성장상태는 불량해지고, TRAIL 및 SMAC 발현양은 감소하여 효과적인 종양세포 사멸을 유도하지 못했기 때문으로 판단된다.

<199> **<실시예 9>**

<200> **신경교모세포종 동물모델에 TRAIL 발현 인간 신경줄기세포의 이식 후 종양 크기의 감소**

<201> CAG프로모터에 의해 TRAIL 및 SMAC을 발현하는 인간 신경줄기세포의 이식 후 종양크기의 감소 정도를 정량적으로 알아보기 위하여, 상기 실시예 <3-2>에서와 같이, 비흉선 누드 마우스의 오른쪽 선조체 부위에 U87MG 7×10^4cells/4 ㎕로 이식하여 뇌종양모델을 확립하였다. 1주일 후 종양세포를 주사한 두개골 천공기 구멍(skull burr hole)을 통하여 다음과 같이 신경줄기세포를 준비하여 이식하였다: 먼저, 신경구 상태로 배양하던 인간 신경줄기세포를 이식 3일 전 0.05% 트립신/EDTA(Gibco)를 처리하여 새 배양 플레이트에서 단일세포 상태로 플레이팅하였다. 1시간이 지난 후 목적하는 바이러스를 각각의 신경줄기세포에 감염시켰다. 24시간 후 N2 배지로 세포를 1회 세척하고, 성장인자 첨가된 N2 배지에서 2일간 더 배양하였다. 이식을 위하여 0.05% 트립신/EDTA(Gibco)를 처리하여 단일세포로 만들었다. 이후, H-H 완충용액으로 3회 세척하였다. 0.05% 트립판 블루로 세포를 염색하고, 이식할 때까지 얼음에 보관하였다.

<202> 뇌종양모델에 이식한 신경줄기세포는 다음과 같다: 50 MOI의 AdCAG-GFP 바이러스에 감염된 인간 신경줄기세포(5×10^5cells/4 ㎕)와 130 MOI의 AdCAG-TRAIL 바이러스에 감염된 신경줄기세포(5×10^5cells/4 ㎕)를 섞어서 이식하였으며(n=7), 다른 실험군에서는 100 MOI의 AdCAG-TAT-SMAC 바이러스에 감염된 인간 신경줄기세포(5×

10^5cells/4 ㎕)와 130 MOI의 AdCAG-TRAIL 바이러스에 감염된 인간 신경줄기세포(5×10^5cells/4 ㎕)를 섞어서 이식하였다(n=7). 대조군에서는 50 MOI의 AdCAG-GFP 바이러스에 감염된 인간 신경줄기세포(1×10^6cells/8 ㎕)를 이식하였다(n=7).

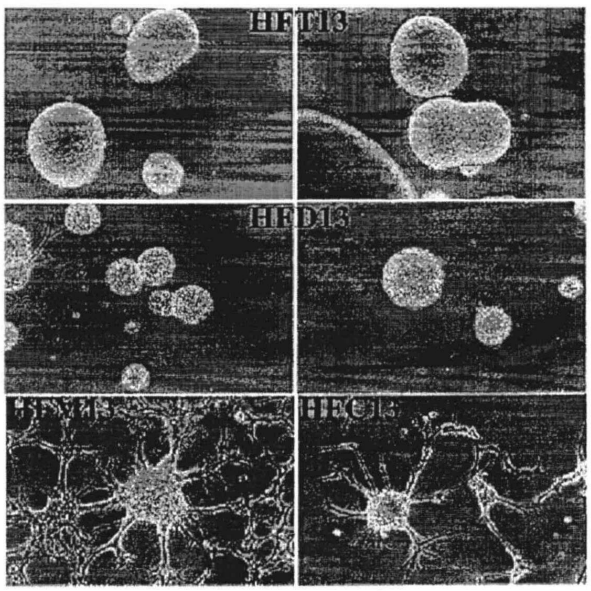
<203> 10일 후, 모든 실험군 및 대조군에서 평균 종양용적을 다음과 같이 측정하였다: 평균 종양용적을 정량적으로 평가하기 위하여 실험군과 대조군에서 종양을 포함하는 모든 슬라이드를 헤마톡실린으로 염색한 후, 종양크기를 메타모르프 이미징 시스템(MetaMorph Imaging System, Universal Imaging Corporation, PA, USA)을 통해 측정하였다.

<204> 이식 10일 후, 실험동물을 4% 파라포름알데하이드(in 0.1M Pipes buffer)로 고정한 후, 뇌를 적출하였다. 적출된 뇌를 30% 수크로스(in PBS)에 침지시켰다. 4℃에서 1-2일간 보관하여 동결보호(cryoprotection)하고, 16 ㎛로 동결절단하였다. 슬라이드에 놓인 각 뇌 조직 절편 간격은 각각 96 ㎛이었다. 이후, 뇌 조직을 염색할 때까지 -20℃에 보관하였다. 슬라이드를 1×PBS에서 20분간 침수시키고 헤마톡실린 용액에서 4분간 염색하였다. 이후, 흐르는 물에 슬라이드를 세척하고, 글리세롤 마운팅 배지로 마운팅하였다. 염색한 후 종괴 부위를 포함하는 슬라이드를 명시야 현미경 하에서 100×배율로 사진을 찍었다. 메타모르프 이미징 시스템을 이용하여 종괴 부위 영역을 지정하고, 지정된 영역의 픽셀(pixel) 수를 면적으로 환산하였으며, 조직 절편의 두께(96 ㎛)를 곱하여 최종 종괴의 부피를 측정하였다. 모든 실험군 및 대조군에서 이를 수행하여 평균값을 비교 분석하였다.

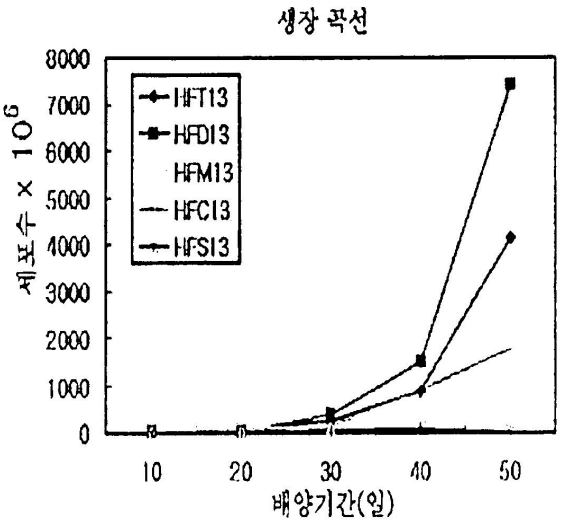
<205> 그 결과, U87MG 신경교모세포종 동물모델에서 대조군의 평균 종양용적은 0.280 mm^3 인 반면, TRAIL 및 GFP 발현 신경줄기세포를 이식한 실험군의 평균 종양용적은 0.066 mm^3 이었고, TRAIL 및 SMAC을 발현하는 신경줄기세포를 이식한 실험군은 0.035 mm^3이었다. 대조군의 종양용적을 100% 로 환산한 결과, TRAIL 및 GFP 발현 세포 이식군의 종양용적은 23.55 ± 3.11%(mean± SEM) 이었고, TRAIL 및 SMAC 발현 세포 이식군은 12.65 ± 0.71% 이었다(도 17)(대조군과 비교하여, $*p < 0.01$; 실험군간 비교하여, $**p < 0.05$, Kruskal-Wallis test). 따라서 TRAIL 발현 신경줄기세포를 이식하는 경우보다 TRAIL 및 SMAC을 각각 발현하는 인간 신경줄기세포를 혼합하여 이식하는 것이 보다 효과적으로 뇌종양 용적을 감소시켰다(도 17 참조).

도면

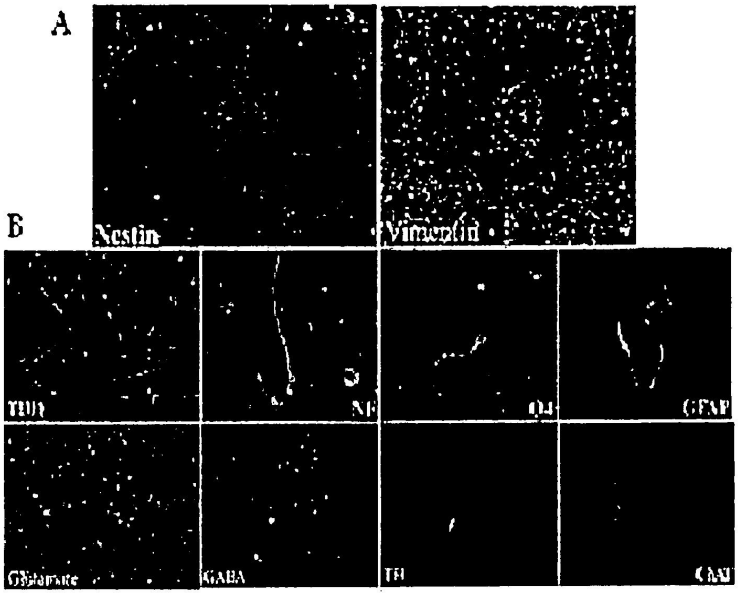
도면1



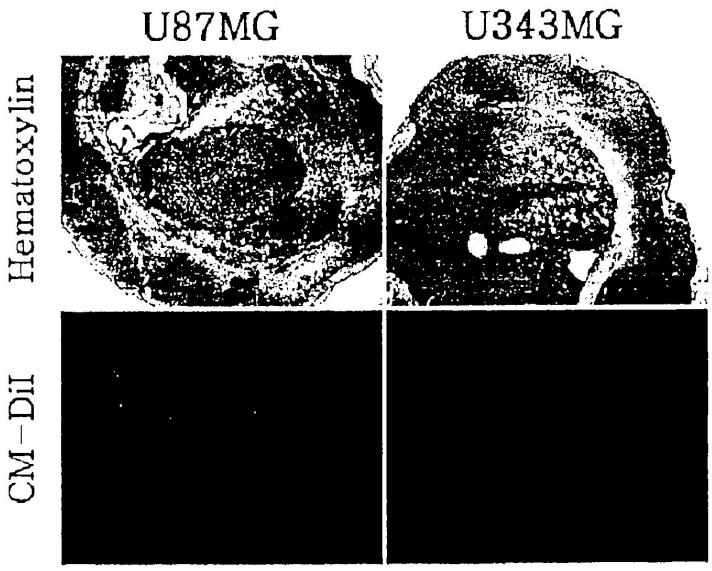
도면2


생장 곡선
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
세포수 × 10⁶
HFT13
HFD13
HFM13
HFC13
HFS13
10
20
30
40
50
배양기간(일)

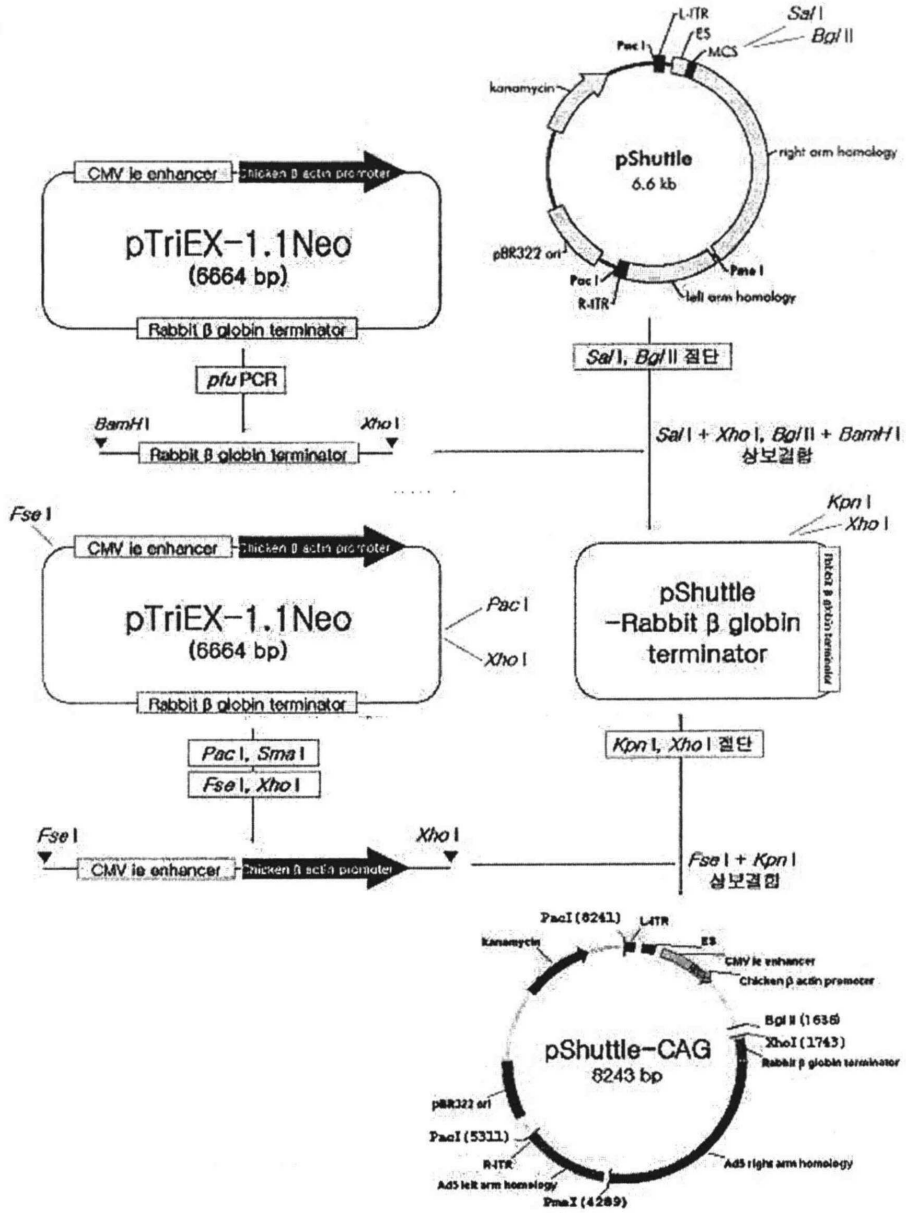
도면3


A
B
Nestin
Vimentin
TUJ
NF
O4
GFAP
GABA
TH

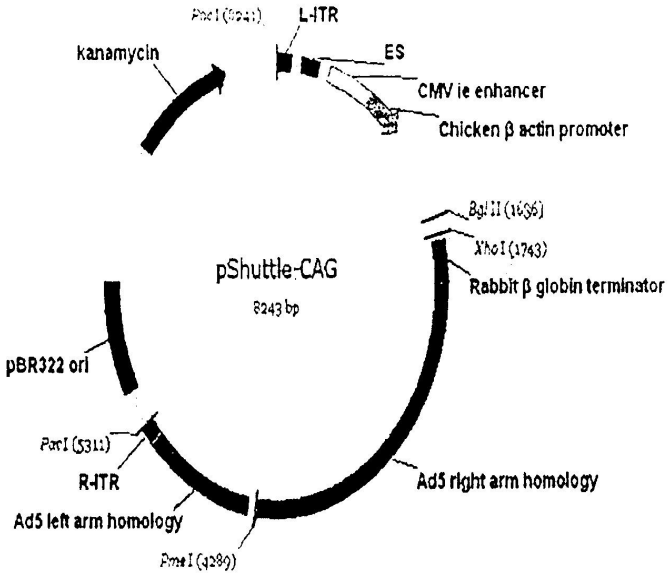
도면4



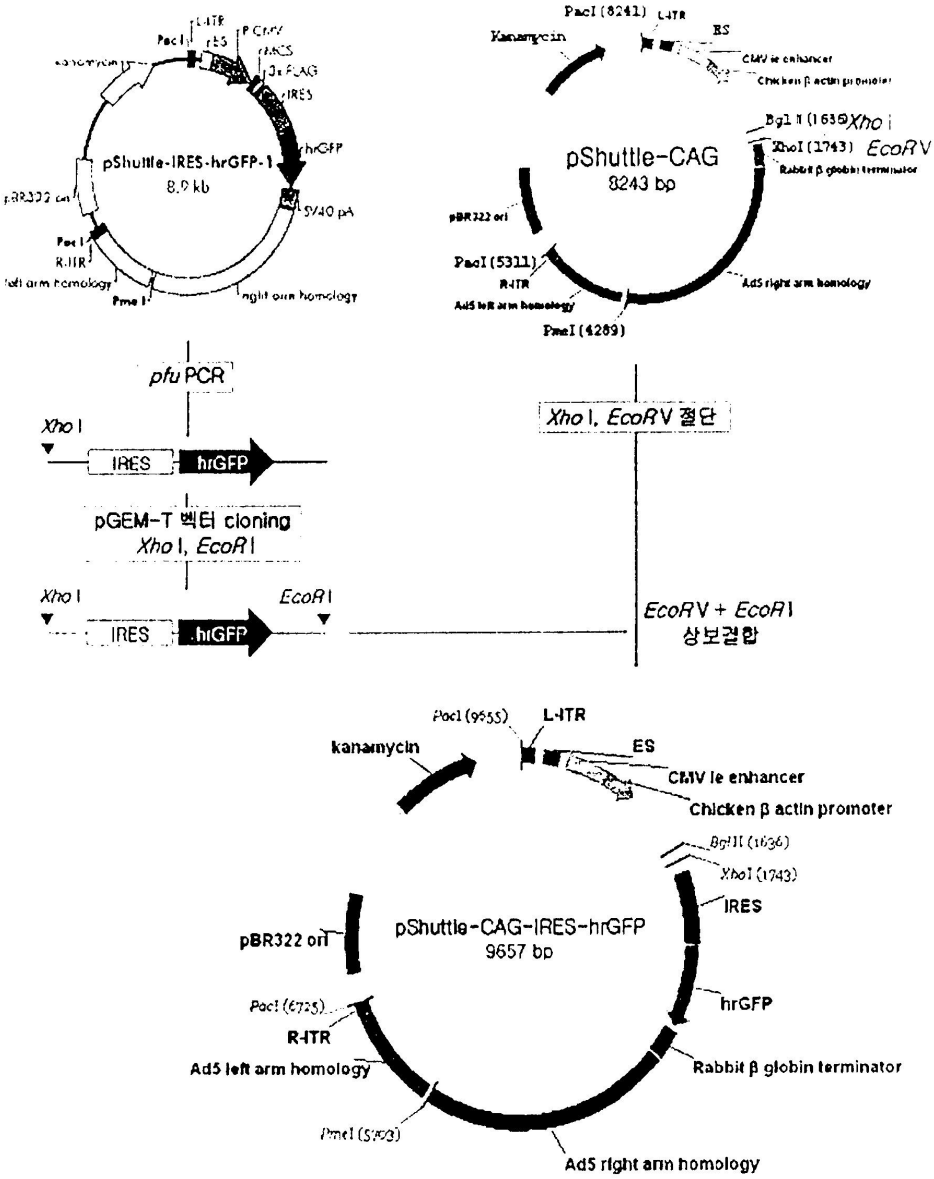
도면5


pShuttle
6.6 kb
kanamycin
pBR322 ori
Pac I
R-ITR
L-ITR
ES
MCS
Sal I
Bgl II
Pme I
right arm homology
left arm homology
CMV ie enhancer
Chicken β actin promoter
pTriEX-1.1Neo
(6664 bp)
Rabbit β globin terminator
pfu PCR
BamH I
Xho I
Sal I, Bgl II 절단
Sal I + Xho I, Bgl II + BamH I
상보결합
Fse I
Kpn I
pShuttle
-Rabbit β globin
terminator
Pac I
Xho I
Pac I, Sma I
Fse I, Xho I
Kpn I, Xho I 절단
Fse I + Kpn I
상보결합
pShuttle-CAG
8243 bp
PacI (8241)
CMV ie enhancer
Chicken β actin promoter
BglII (1638)
XhoI (1743)
Rabbit β globin terminator
PacI (5311)
Ad5 right arm homology
Ad5 left arm homology
PmeI (4289)

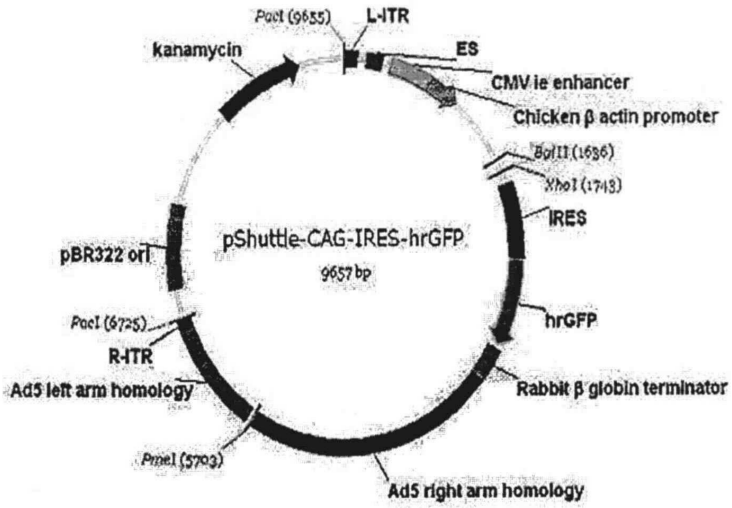
도면6


PacI (5241)
L-ITR
kanamycin
ES
CMV ie enhancer
Chicken β actin promoter
BglII (1636)
XhoI (1743)
pShuttle-CAG
8243 bp
Rabbit β globin terminator
pBR322 ori
PmeI (5311)
R-ITR
Ad5 right arm homology
Ad5 left arm homology
PmeI (4289)

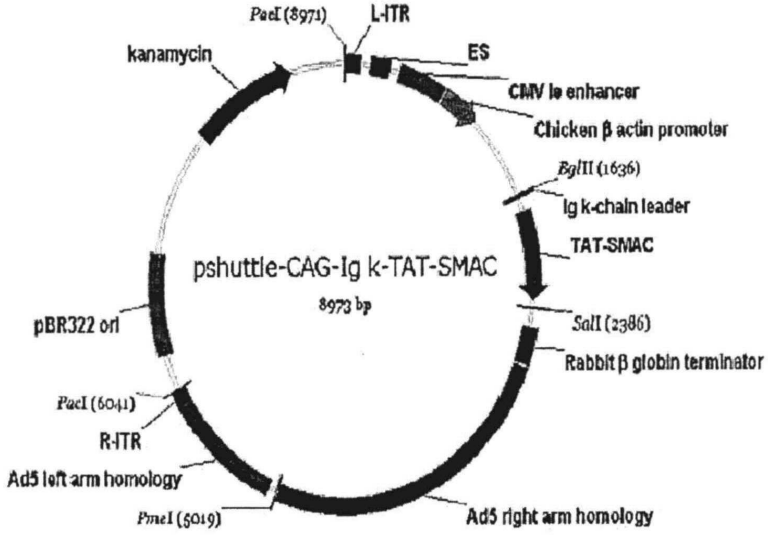
도면7


pShuttle-IRES-hrGFP-1
8.9 kb
pShuttle-CAG
8243 bp
pfu PCR
Xho I
IRES
hrGFP
pGEM-T 벡터 cloning
Xho I, EcoR I
EcoR I
Xho I, EcoRV 절단
EcoRV + EcoR I
상보결합
kanamycin
L-ITR
ES
CMV ie enhancer
Chicken β actin promoter
pBR322 ori
R-ITR
Ad5 left arm homology
Rabbit β globin terminator
Ad5 right arm homology
pShuttle-CAG-IRES-hrGFP
9657 bp

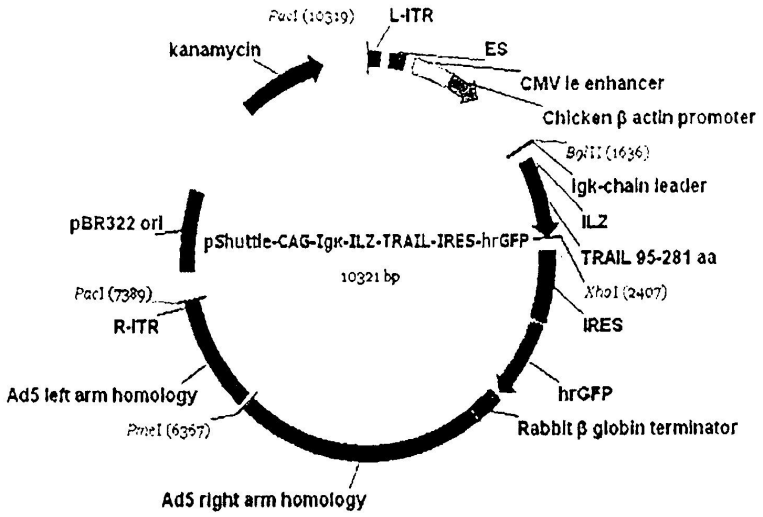
도면8


PacI (9655)
L-ITR
ES
CMV ie enhancer
Chicken β actin promoter
BglII (1636)
XhoI (1743)
IRES
hrGFP
Rabbit β globin terminator
Ad5 right arm homology
PmeI (5703)
Ad5 left arm homology
R-ITR
PacI (6725)
pBR322 ori
kanamycin
pShuttle-CAG-IRES-hrGFP
9657 bp

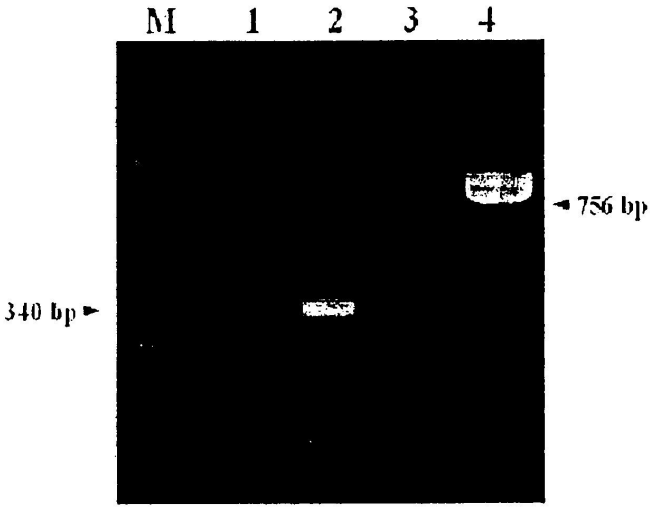
도면9


PacI (8971)
L-ITR
ES
CMV ie enhancer
Chicken β actin promoter
BglII (1636)
Ig k-chain leader
TAT-SMAC
SalI (2386)
Rabbit β globin terminator
Ad5 right arm homology
PmeI (5019)
Ad5 left arm homology
R-ITR
PacI (6041)
pBR322 ori
kanamycin
pshuttle-CAG-Ig k-TAT-SMAC
8973 bp

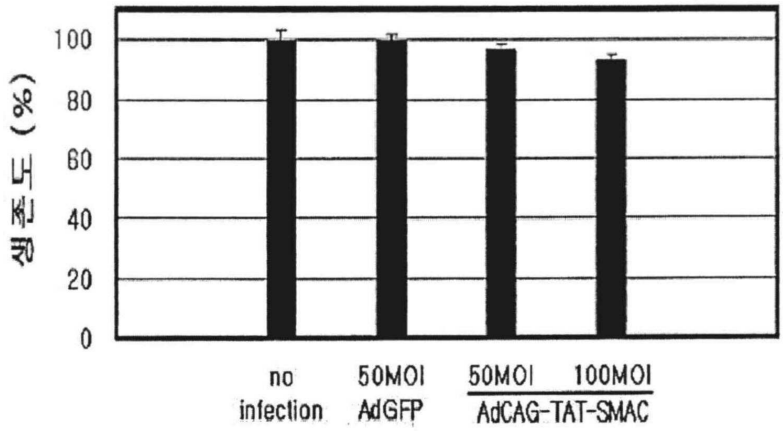
도면10



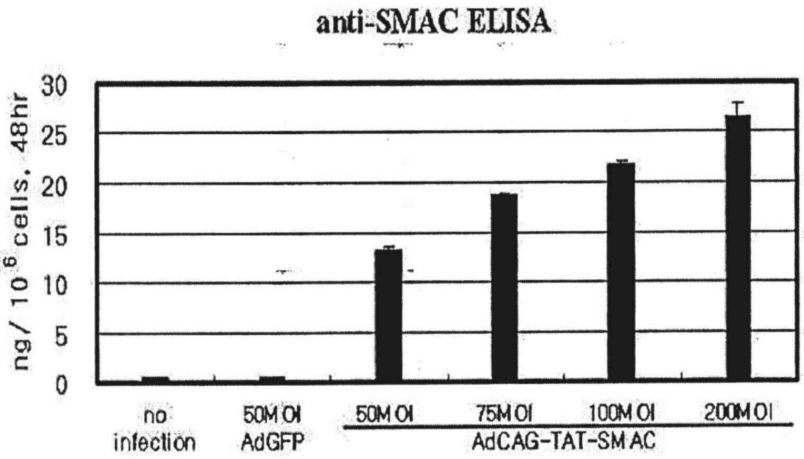
도면11



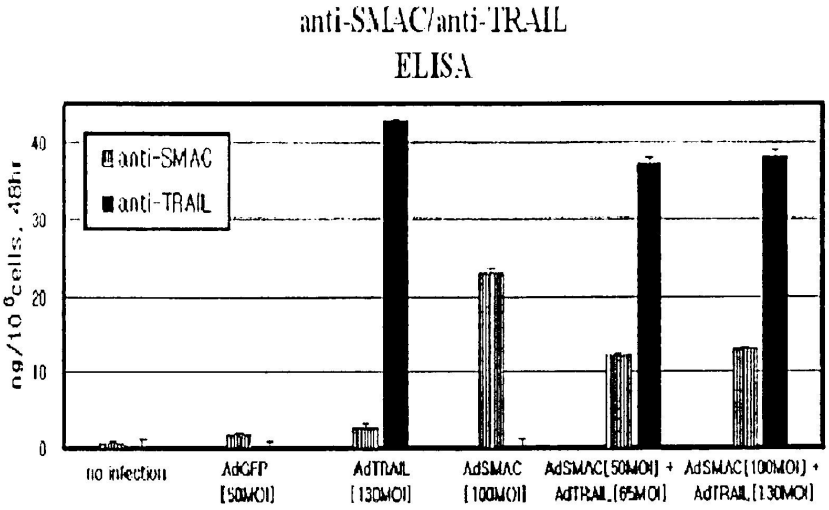
도면12



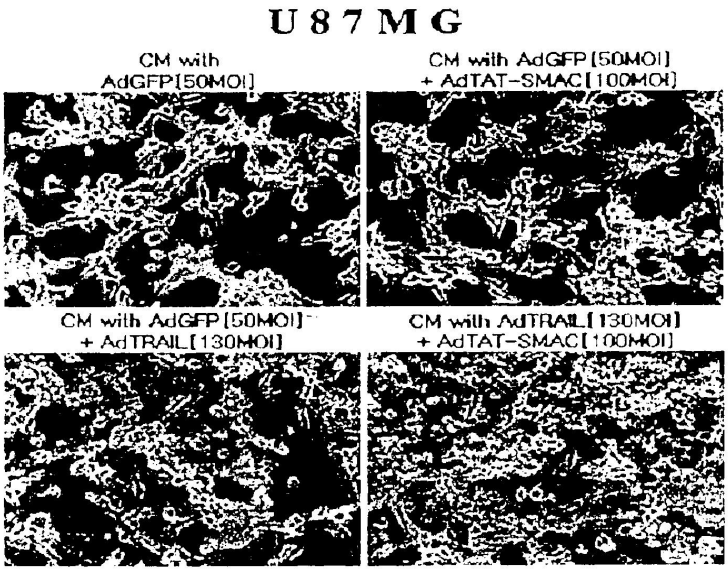
도면13


anti-SMAC ELISA
ng/ 10^6 cells, 48hr
30
25
20
15
10
5
0
no infection
50MOI AdGFP
50MOI
75MOI
100MOI
200MOI
AdCAG-TAT-SMAC

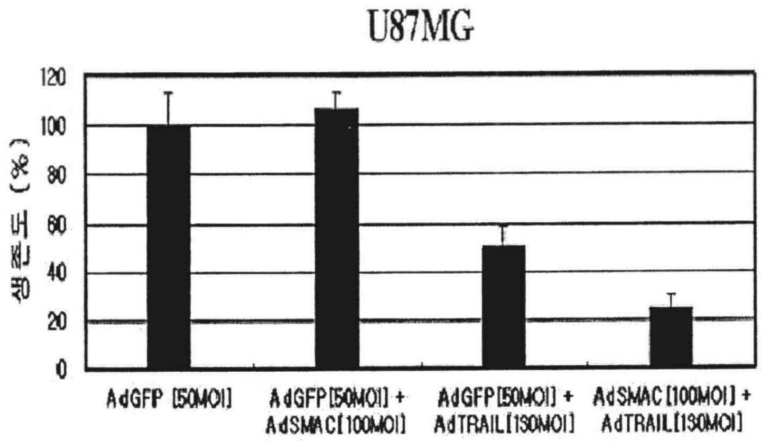
도면14


anti-SMAC/anti-TRAIL ELISA
anti-SMAC
anti-TRAIL
ng/10^6cells, 48hr
40
30
20
10
0
no infection
AdGFP [50MOI]
AdTRAIL [130MOI]
AdSMAC [100MOI]
AdSMAC[50MOI] + AdTRAIL[65MOI]
AdSMAC[100MOI] + AdTRAIL[130MOI]

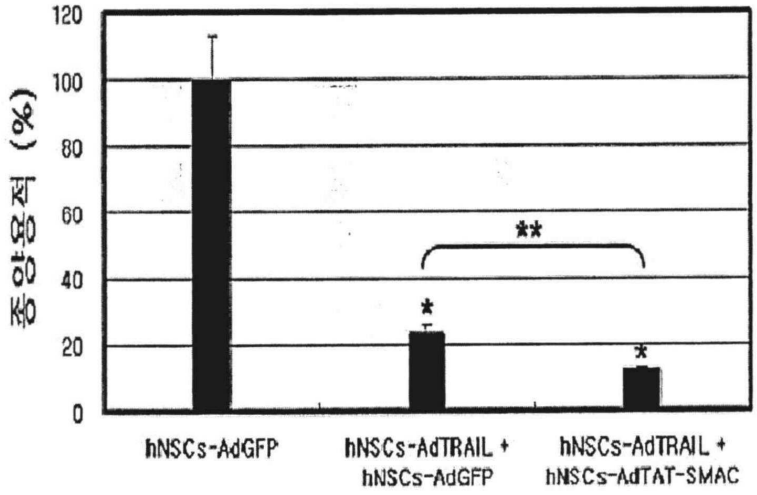
도면15


U87MG
CM with AdGFP[50MOI]
CM with AdGFP[50MOI] + AdTAT-SMAC[100MOI]
CM with AdGFP[50MOI] + AdTRAIL[130MOI]
CM with AdTRAIL[130MOI] + AdTAT-SMAC[100MOI]

도면16


U87MG
생존도 (%)
120
100
80
60
40
20
0
AdGFP [50MOI]
AdGFP[50MOI] + AdSMAC[100MOI]
AdGFP[50MOI] + AdTRAIL[130MOI]
AdSMAC[100MOI] + AdTRAIL[130MOI]

도면17


120
100
80
60
40
20
0
종양용적 (%)
**
*
*
hNSCs-AdGFP
hNSCs-AdTRAIL +
hNSCs-AdGFP
hNSCs-AdTRAIL +
hNSCs-AdTAT-SMAC