

(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C12N 15/86

(11) 공개번호 특2001-0017484
(43) 공개일자 2001년03월05일

(21) 출원번호	10-1999-0033011
(22) 출원일자	1999년08월12일
(71) 출원인	학교법인연세대학교 방우영
(72) 발명자	이희란
	서울특별시서대문구신촌동CP0Box8044연세대학교의과대학암센터암연구소 김주향
	서울특별시서대문구신촌동CP0Box8044연세대학교의과대학암센터암연구소 김재성
(74) 대리인	서울특별시서대문구신촌동CP0Box8044연세대학교의과대학암센터암연구소 이한영

심사청구 : 있음

(54) 종양 특이증식 재조합 아데노바이러스 및 그를 이용한 종양세포의 제거방법

요약

본 발명은 아데노바이러스의 자기증식에 관여하는 E1B 영역의 유전자 중 종양억제 유전자 p53 단백질과 결합하는 55kDa 단백질을 코딩하는 유전자만을 선택적으로 제거시켜, 종양세포에서만 특이적으로 증식 가능하게 하고, 이를 통해 종양을 살상시킬 수 있도록 삭제한 돌연변이형 재조합 아데노바이러스와 전기 바이러스를 이용하여 종양세포를 제거하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 종양특이적 살상능을 가진 재조합 아데노바이러스를 이용하여 종양세포를 제거하는 방법은 아데노바이러스의 유전자 중 E1B 영역의 55kDa 유전자를 제거시켜 재조합 아데노바이러스를 삭제한 다음, 이를 증식시키고, 순수분리하는 단계; 전기 분리된 재조합 아데노바이러스를 종양세포에 감염시키는 단계; 및, 전기 재조합 아데노바이러스가 감염된 종양세포를 배양하는 단계를 포함한다. 이러한 종양특이적 살상능을 지닌 재조합 아데노바이러스의 응용은 증식불능 아데노 바이러스에 치료용 유전자를 도입하여 바이러스가 도입된 세포에서만 국소적으로 치료효과를 보이는 종래의 유전자 치료의 한계를 극복할 수 있을 뿐만 아니라, 방사선 치료, 약물치료 및 치료유전자의 바이러스내 도입과 같은 기존의 암 치료법과의 병행요법을 통하여 치료효과를 극대화하고, 각각의 단점을 보완 극복할 수 있는 새로운 암 치료법의 개발에 활용될 수 있을 것이다.

대표도

도6

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 아데노바이러스 Ad5 타입의 유전자 지도이다.
도 2는 YKL-1을 감염시킨 C33A 세포에서 E1A 단백질 및 E1B 19kDa 단백질이 높은 수준으로 발현됨을 나타내는 웨스턴 블로팅 사진이다.
도 3은 정상세포주에서의 YKL-1의 세포살상 억제능력을 나타내는 사진이다.
도 4는 YKL-1의 종양특이 살상능력을 나타내는 사진이다.
도 5는 YKL-1이 생체내에서 종양의 성장을 억제함으로써 종양 퇴행능력을 보여주는 그래프이다.
도 6은 YKL-1의 종양세포 괴사능력을 보여주는 사진이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 종양 특이증식 재조합 아데노바이러스 및 그를 이용한 종양세포의 제거방법에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 아데노바이러스의 자기증식에 관여하는 E1B 영역의 유전자 중 종양억제 유전자 p53 단백질과 결합하는 55kDa 단백질을 코딩하는 유전자만을 선택적으로 제거시켜, 종양세포에서만 특이적으로 증식 가능하게 하고, 이를 통해 종양을 살상시킬 수 있도록 작제된 돌연변이형 재조합 아데노바이러스와 전기 바이러스를 이용하여 종양세포를 제거하는 방법에 관한 것이다.

현재까지 암의 원인 규명과 조기진단, 치료에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔지만, 암에 대한 치료 방법은 지난 10년간 거의 답보상태에 있었다. 한편, 분자생물학의 눈부신 발달로 유전자 수준에서 암의 치료를 비롯한 난치성 질환의 원인이 점차적으로 규명되어 가고 있어, 이를 질병치료에 응용하려는 유전자 치료가 새로운 치료분야로 발전해 나가고 있다. 실제로, 유전자 치료의 임상시험 중 70% 이상이 암을 대상 질환으로 하고 있으며, 치료용 유전자를 대상세포에 전달해 주는 매개체로는 아데노바이러스가 레트로바이러스를 대신하여 많이 이용되고 있다. 이는 아데노바이러스 전달체에 의한 유전자 발현효율이 레트로바이러스에 비하여 월등히 높을 뿐만 아니라, 고역가의 아데노바이러스를 손쉽게 얻을 수 있으며, 바이러스 자체가 상당히 안정된 구조물로 대부분의 포유동물 세포를 감염시킬 수 있고, 생체내 전달(in vivo delivery)이 용이하며, 안전도에 있어서도 우월한 이점이 있기 때문이다.

최근 암에 대한 유전자 치료의 연구 경향은 한가지 특정 유전자를 이용한 치료법의 개발보다는 여러 치료 유전자를 동시에 이용하는 방안; 암세포를 선택적으로 죽일 수 있는 종양특이 증식 살상 아데노바이러스의 개발; 및, 방사선 또는 항암제 등 기존의 치료방법과 병합 치료하는 방안 등이 연구되고 있다.

한편, 종양억제 유전자로 잘 알려진 p53 단백질은 세포내의 DNA 손상이 유발되었을 경우, 세포를 세포주기 G1기에 멈추게 하여 DNA 손상복구 과정이 이루어지게 함으로써, 암세포의 생성이 이루어 지지 못하도록 작용하며, 이미 암세포가 성장한 경우에는 형질전환된 세포가 사멸되도록 하여, 이상세포를 조직내에서 스스로 제거시키는 아포토시스(apoptosis)에 관여한다고 알려져 있다(참조: Kirsch, D.G. et al., J. Clinical Oncology, 3158-3168, 1998). p53 단백질은 폐암, 난소암, 유방암, 직장암, 두경부암 등 전체 환자종양의 50% 정도에서 비활성화되어 있음이 보고되어 있고, p53 단백질이 정상형으로 밝혀진 종양세포 중에서도 mdm2의 과다발현 또는 바이러스 감염 등으로 p53 단백질이 비활성화 되는 경우가 빈번함은 이미 잘 알려진 사실이다(참조: Talis, A.L. et al., J. Biol. Chem., 273:6439-45, 1998). 아데노바이러스의 경우에는, 바이러스 유전자 중 감염초기에 발현되는 유전자 중의 하나인 E1B 영역의 유전자가 코딩하는 55kDa 단백질이 p53 단백질과 결합하여, 그의 기능을 저해한다고 알려져 있는데, 이러한 사실을 바탕으로, 1996년 맥코믹(McCormick) 등은 p53 유전자가 비활성화된 종양세포에서 선택적으로 증식 가능하고, 결과적으로 암세포를 공격 및 살상시키는 아데노바이러스 변이체, 즉 종양 특이 증식 및 살상 아데노바이러스의 실용 가능성을 보고하였다(참조: Bischoff, J.R. et al., Science, 274:373-6, 1996).

아데노바이러스 게놈은 약 36kb 크기의 선형 이분쇄 DNA 이며, 특히 각 말단에 역반복서열(1TR), 캡시드화 서열(Psi), 초기 유전자 및 말기 유전자를 포함한다. 주요 초기 유전자는 E1, E2, E3 및 E4 지역에 포함되어 있으며, 이들에 의해 발현되는 단백질은 주로 바이러스의 구조 단백질이다. 특히, 아데노바이러스의 E1 유전자는 표적세포에 감염 후, 가장 먼저 발현되는 유전자로서, 2개의 전사단위, 즉 E1A와 E1B로 구성되어 있다. E1A 유전자 생성물의 주요 작용은 1) 정지한 세포를 정상세포주기에 들어가도록 하여 세포의 DNA 합성을 재개하고, 2) E1B 유전자와 기타 초기 영역(E2, E3, E4)의 전사를 활성화하는 것이다. 또한, E1B 유전자는 55kDa 단백질과 19kDa 단백질을 코딩하는 유전자로 구성되어 있으며, 이들 단백질은 E1A 단백질이 세포 작용을 방향전환하는 것을 도와 바이러스의 복제를 가능하게 한다(참조: Telling, C. C. et al., J. Virol., 68:541-7, 1994). E1B 유전자는 감염초기에 숙주세포에서의 발현 후, 핵내에 위치하면서 감염 말기에 발현되는 바이러스의 단백질의 전사개시와 함께 핵에서 세포질로의 바이러스 mRNA의 선택적 이동에 관여하는 역할을 할 뿐만 아니라, 종양억제 유전자 p53 단백질에 결합하여 그의 기능을 저해하는 역할을 한다고 알려져 있다(참조: Goodrum, F.D. et al., Virology, 237:404-13, 1997). 이러한 E1B 영역의 55kDa 단백질 유전자의 발현이 저하된 아데노바이러스 변이체(E1B-attenuated adenovirus: ONXY-015)를 p53 단백질이 정상적으로 발현되는 세포에 감염시키는 경우, 바이러스의 또다른 초기 발현 유전자인 E1A의 발현에 따른 p53 단백질의 활성화로 인하여 바이러스가 증식을 할 수 없는 반면, 암세포와 같이 p53 단백질의 기능이 저하된 세포에서는 야생형 바이러스와 동일하게 증식하여 암세포를 파괴할 수 있다는 것이 밝혀졌으며, 전기 아데노바이러스 변이체를 시스플라틴(cisplatin)과 같은 항암제와 함께 처리함으로써, p53 단백질의 변이가 확인되지 않은 암세포도 선택적으로 살상되는 것이 확인되었다(참조: Heise, C. et al., Nat. Med., 3:639-45, 1997). 또한, 이러한 종양특이 증식 및 살상 아데노바이러스를 두경부암에 대한 phase-I/II 임상시험에 적용하여 획기적인 치료효과를 확인한 바 있다(참조: McCormick, F., The American Society of Gene Therapy(1'st Annual Meeting), 1998).

최근에는 이러한 연구결과에 근거하여, 도입된 세포에서만 국소적으로 치료효과가 나타나는 종래의 유전자 치료의 한계를 극복하고, 기존의 암 치료법과의 병행요법을 통하여 치료효과를 극대화할 수 있는, 보다 효율적이고 안전한 종양특이 증식 및 살상능력을 가지고 있는 재조합 아데노바이러스를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

발명이 이루고자하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 종양세포를 선택적으로 제거할 수 있는 종양 특이증식 및 살상능 아데노바이러스를 개발하고자 예의 노력한 결과, 바이러스의 증식에 관여하는 E1B 영역의 유전자중 55kDa 단백질을 코딩하는 유전자가 선택적으로 소실된 재조합 아데노바이러스를 작제하였음은 물론, 전기 재조합 아데노바이러스가 정상세포에서는 증식이 불가능하며, p53 단백질의 기능이 비활성화된 종양세포주에서만 특이적으로 자기증식과 종양세포 살상이 가능함을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

결국, 본 발명의 주된 목적은 정상세포에서는 증식이 불가능하고, p53 단백질의 기능이 비활성화된 종양세포주에서만 특이적으로 자기증식이 가능한 재조합 아데노바이러스를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 전기 재조합 아데노바이러스를 이용하여 종양세포를 제거하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 종양특이적 살상능을 가진 재조합 아데노바이러스는 야생형 아데노바이러스로부터 바이러스의 복제에 필요한 기능을 하는 E1B 영역 유전자 중 55kDa 단백질을 코딩하는 유전자를 결실시킴으로써 작제할 수 있으며, 전기 재조합 아데노바이러스를 이용하여 종양세포를 제거하는 방법은 아데노바이러스의 유전자 중 E1B 영역의 55kDa 유전자를 제거시켜 재조합 아데노바이러스를 작제한 다음, 이를 증식시키고, 순수분리하는 단계; 전기 분리된 재조합 아데노바이러스를 종양세포에 감염시키는 단계; 및, 전기 재조합 아데노바이러스가 감염된 종양세포를 배양하는 단계를 포함한다.

이하, 본 발명의 종양특이적 살상능을 가진 재조합 아데노바이러스를 작제하는 방법 및 전기 재조합 아데노바이러스를 이용한 종양세포의 제거방법을 단계별로 나누어 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

재조합 아데노바이러스의 제조

본 발명의 종양 특이증식 재조합 아데노바이러스는 아데노바이러스 E1B 55kDa 단백질을 코딩하는 유전자가 제거된 종양 특이 증식 재조합 아데노바이러스이다. E1B 55kDa 단백질은 유전자로부터 발현시 p53 단백질과 결합하는 단백질로서, 이를 제거하면 전기 재조합 아데노바이러스가 종양세포에서만 특이적으로 증식하는 특성을 가지게 된다. 이때, 아데노바이러스는 모든 타입의 아데노바이러스를 사용할 수 있지만, 비교적 분자생물학적인 정보가 많이 밝혀져 있어 각종 실험 및 연구에 사용되고 있는 Ad5 타입을 사용하는 것이 바람직하다.

E1B 영역의 55 kDa 단백질 유전자를 제거하는 방법은 제한효소 처리를 비롯한 각종 실험방법에 의하여 수행할 수 있으나, 용이하게 유전자를 증폭시킬 수 있고, 그를 이용하여 유전자의 부분삭제 및 돌연변이화가 가능하게 하는 중합효소 연쇄반응법(PCR)을 사용하는 것이 바람직하다. 중합효소 연쇄반응법을 이용할 경우, 아데노바이러스 E1 영역 중, E1B 55kDa 단백질 유전자를 제외하고 E1A 유전자 및 E1B 19kDa 단백질을 코딩하는 유전자만을 증폭시킬 수 있는 프라이머를 제작하여 PCR을 수행한다. PCR로 얻어진 생성물은 아데노바이러스의 게놈 중 일부를 포함하고 있는 플라스미드인 pCA14(Microbix, Canada)에 삽입시켜 셔틀벡터(shuttle vector)를 제작하고, E1과 E3 지역의 유전자를 제외한 아데노바이러스의 전체 게놈을 포함하고 있는 플라스미드인 pTG-CMV(Microbix, Canada)와 함께 대장균(*Escherichia coli*) BJ5183에 형질전환(cotransformation)시켜 유전자 상동 재조합을 유도한다. 전기 대장균을 배양하여 DNA를 수득한 뒤, E1B 영역중 55kDa 단백질을 코딩하는 유전자가 소실되었음을 확인하고, 이를 제한효소로 처리하여 단일가닥으로 만들어 E1 유전자 산물을 제공할 수 있는 포장세포주인 293 세포에 트랜스펙션(transfection)하면 재조합 아데노바이러스를 작제할 수 있다.

상술한 방법에 의하여 작제된 재조합 아데노바이러스는 "YKL-1" 바이러스라 명명하고, 1999년 7월 1일자로 기탁기관인 사단법인 한국종균협회(KFCC)에 기탁번호 'KFCC-11099'로 기탁하였다.

전기의 재조합 아데노바이러스의 E1B 유전자 중 55kDa 단백질을 코딩하는 유전자가 결실되어 있음을 확인하기 위해서는 종양세포에 감염시켜 바이러스를 생산하고, 이로부터 바이러스 DNA를 회수하여, PCR을 수행하는 방법을 이용한다. 또한, 전기의 재조합 아데노바이러스에 의하여 감염된 정상세포 및 종양세포주로부터 모든 단백질을 회수하고 이를 이용한 웨스턴 블로팅(Western blotting)을 수행하면, E1B의 유전자 지역중 19kDa 크기에 해당하는 유전자만이 발현됨을 확인할 수 있다.

재조합 아데노바이러스의 종양세포 제거방법

재조합 아데노바이러스의 종양세포 제거방법은 재조합 아데노바이러스의 수득으로부터 자궁암세포주와 같은 종양세포에의 재조합 아데노바이러스의 주사까지의 몇가지 단계를 포함한다. 좀 더 구체적으로, 종양세포의 제거방법은 아데노바이러스의 E1B 영역 유전자 중 55kDa 단백질 유전자를 제거시켜 재조합 아데노바이러스를 작제한 다음, 이를 증식시키고, 순수분리하는 단계; 전기 분리된 재조합 아데노바이러스를 종양세포에 감염시키는 단계; 및, 전기 재조합 아데노바이러스가 감염된 종양세포를 배양하는 단계를 포함한다. 이때, 재조합 아데노바이러스는 Ad 5 타입인 아데노바이러스로부터 작제된 바이러스를 사용하는 것이 바람직하며, 종양세포주에 전기 재조합 아데노바이러스를 MOI(Multiplicity of Infection) 0.1 내지 10으로 감염시킨 다음, 37℃에서 8 내지 10 일 동안 배양시키고, 재조합 아데노바이러스가 감염 및 증식된 종양세포주 C33A의 배양배지를 수득한 다음, 원심분리함으로써 순수 분리한다. 또한, 재조합 아데노바이러스 감염은 생후 5 내지 6주된 누드마우스에 종양세포로 이루어진 종양의 단축 $5 \times 5 \text{ mm}^2$ 를 기준으로 3×10^8 내지 7×10^8 개의 재조합 아데노바이러스 입자를 종양에 주사함으로써 수행한다.

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

실시예 1: 재조합 아데노바이러스 YKL-1의 제조 및 확인

실시예 1-1: 재조합 아데노바이러스 YKL-1의 제조

아데노바이러스 Ad5 타입(참조: 도 1)의 E1 영역 중 E1B의 55kDa 단백질을 코딩하는 유전자를 결실시키기 위하여, E1A 유전자와 E1B 영역중 19kDa 단백질을 코딩하는 유전자만을 증폭시킬 수 있는 프라이머를 제작하고, pXC1(Microbix, Canada)를 주형 DNA로 하여 PCR을 수행하였다.

5' 쪽 프라이머의 염기서열은 5'-GCCCTCGAGATGAGACATATTATCTGCCACG-3'(서열번호 1)이며, 3' 쪽 프라이머의 염기서열은 5'-TCTTGGATCCAGATCTATACAGTTAAGC- CACCTATACAAC-3'(서열번호 2)로서, 양쪽 프라이머에는 BamHI 제한효소 인식부위를 삽입시키고, 3' 쪽 프라이머의 염기서열에는 E1B의 55kDa 단백질 유전자의 중

결코돈을 삽입시켜 잔류해 있는 E1B 55kDa 유전자의 발현을 억제하도록 하였다. PCR은 주형 DNA 10ng과 프라이머 100ng을 사용하여, 94℃에서 2분간 예열 단계를 거친 후, 94℃ 1분, 55℃ 1분 및 72℃ 1분을 한 주기로 하여 총 35회 반복수행하였으며, 72℃에서 10분간 최종 신장(extension) 반응을 수행하여 종결하였다.

PCR로 얻어진 약 2kb의 DNA 생성물은 아데노바이러스 전체 게놈 중, E1A 유전자 지역을 포함하고, E1B 유전자 지역 중 E1B 19kDa 단백질 유전자의 정지코돈 다음에 위치하는 염기서열로부터 E1B의 55kDa 단백질 유전자의 정지코돈이 위치하는 염기서열까지의 유전자가 결실된 지역으로서, E1B 유전자 중 19kDa의 단백질을 코딩하는 유전자(서열번호 3)만을 포함한다. 전기 PCR 생성물은 아데노바이러스 게놈의 일부를 포함하고 있는 플라스미드인 pCA14(Microbix, Canada) BglII 부위에 삽입시켜 서플렉터를 제작하고, "pCA14-E1A/E1B 19kDa"라 명명하였다. 이어, 전기 서플렉터에 제한효소 XmnI을 처리하여 단일가닥을 만든 후, E1과 E3 지역의 유전자를 제외한 아데노바이러스의 전체 게놈을 포함하고 있는 플라스미드인 pTG-CMV(Microbix, Canada)를 ClaI으로 처리하여, 함께 대장균 BJ5183에 형질전환시켜 유전자 상동 재조합을 유도하였다. 형질전환된 대장균을 하루동안 배양하여 이로부터 DNA를 수득하였으며, 제한효소 HindIII 처리 후 아가로오스 겔 전기영동을 통하여 E1B 영역의 55kDa 단백질을 코딩하는 유전자가 소실되었음을 확인하고, 이를 "pYKL-1"라 명명하였다. 전기 pYKL-1은 PacI으로 처리하여 단일가닥으로 만든 후, 293 세포주에 트랜스펙션(transfection)시켜 바이러스를 생산하였으며, 이를 "YKL-1" 바이러스라 명명하고, 1999년 7월 1일자로 기탁기관인 사단법인 한국중균협회(KFCC)에 기탁번호 'KFCC-11099'로 기탁하였다.

또한, 대조군 바이러스인 증식불능 아데노바이러스와 증식가능한 아데노바이러스는 pSp Δ E1SP1A/ β -gal과 pXC1(Microbix, Canada)를 서플렉터로 이용하여 위와 같은 방법으로 제조하였으며, 각각 "ad- Δ E1/ β -gal"과 "ad-XJ"로 명명하였다.

실시예 1-2: 재조합 바이러스 DNA의 분리와 PCR 분석

재조합 아데노바이러스의 E1B 영역 중 55kDa 단백질을 코딩하는 유전자의 결실을 확인하기 위하여, 실시예 1-1로부터 수득한 YKL-1 바이러스(KFCC-11099)를 자궁암세포주인 C33A에 MOI(Multiplicity of Infection) 10으로 감염시키고, 그로부터 2일 후 게놈 분리 키트(Qiagen Genomic Isolation Kit, Qiagen, U.S.A.)를 이용하여 바이러스 DNA를 회수하였다. 정제된 바이러스 게놈을 주형 DNA로 하고, E1A 유전자 내 에 위치하는 5' 쪽 프라이머 및 E1B 영역의 55kDa 단백질 해당 유전자의 종결 코돈 다음의 염기서열에 존재하는 3' 쪽 특이 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 재조합 바이러스 YKL-1은 E1B 55 kDa 단백질에 해당하는 유전자가 소실되었음을 확인하였다. 또한, 결실된 유전자 지역내에 위치하는 프라이머를 이용한 PCR 분석에서도, 재조합 바이러스 YKL-1이 E1B 영역의 55 kDa 단백질에 해당하는 유전자가 결실된 재조합 아데노바이러스임을 확인하였다.

실시예 1-3: 재조합 바이러스 감염 세포주의 삽입 DNA 유전자 발현 확인

재조합 아데노바이러스 YKL-1(KFCC-11099)을 적정세포주에 감염시킨 후, 삽입된 E1A 및 E1B 일부 유전자의 발현을 확인하기 위하여, 전기 삽입 유전자에 의해 발현되는 19 kDa의 단백질에 대한 특이항체를 이용하여 웨스턴블로팅(Western blotting)을 시행하였다. 종양세포주인 C33A 세포주에 YKL-1을 MOI 10으로 감염시켜, 2일 후 감염된 세포주를 회수하고, 용균 완충용액(lysis buffer, 50mM HEPES, 0.15M NaCl, 0.5% NP-40, protease inhibitor: PMSF, TLCK, TPCK)을 이용하여 용균시킨 후, SDS-PAGE를 실시하였다. PVDF 멤브레인(membrane)에 단백질을 이동시킨 후, 전기 멤브레인을 아데노바이러스 E1A에 대한 특이항체 E1A(sc-430), E1B 19kDa 단백질에 대한 특이항체 E1B 19kDa(DP17) 및 정량분석을 위한 α -actin 단일항체와 각각 반응시켰으며, HRP(Horse Radian Peroxidase)를 함유하는 2차항체를 사용하여 반응시킨 다음, ECL(Enhanced Chemi-Luminescence: RPN2108, Amersham) 방법으로 X-선 필름에 감광시켜 멤브레인 상의 단백질과 항체와의 결합여부를 조사, 확인하였다(참조: 도 2). 도 2에서, 1열은 양성대조군으로서 E1A 및 E1B 19kDa에 항상 발현되는 293 세포; 2열은 자궁암 세포주인 C33A; 3열은 재조합 바이러스 YKL-1을 감염시킨 C33A의 단백질을 회수하여 각각 웨스턴 블로팅한 결과이다. 도 2에서 보듯이, 재조합 아데노바이러스 YKL-1을 감염시킨 종양세포주 C33A는 E1A 단백질과 E1B 19kDa 단백질이 상당히 높은 수준으로 발현됨을 확인할 수 있었다.

실시예 2: YKL-1의 암세포 특이증식 및 종양세포 살상능력 규명

실시예 2-1: 정상세포와 종양세포에서의 YKL-1의 살상능 비교

정상세포와 종양세포에서의 재조합바이러스 YKL-1의 살상능을 비교하기 위하여, 간경화증 환자의 복수에서 분리한 인체 섬유 아세포와 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입한 FHs 738Lu, FHs 173We, SK-Hep1, HepG2, Hep3B, C33A, Hela 및 H460 등을 세포주로 사용하여, YKL-1, ad-XJ 및 ad- Δ E1/ β -gal 바이러스를 MOI 10, 1 또는 0.1로 처리하고, 8 내지 10일이 경과한 후, 1% 크리스탈 바이올렛(crystal violet, 50% 메탄올)으로 염색하였다(참조: 도 3). 도 3에서 보듯이, 인체 정상세포주인 복수섬유세포, 173We 섬유 아세포 및 738Lu 섬유 아세포를 YKL-1, 야생형 바이러스 ad-XJ 및 증식불능 아데노 바이러스 ad- Δ E1/ β -gal로, 바이러스의 MOI가 10, 1, 또는 0.1이 되도록 감염시켰을 때, YKL-1의 경우는 정상세포 사멸능력이 야생형 바이러스 ad-XJ에 비해 1/1000 정도 또는 그 이하로 현저히 감소함을 나타내었다. 이러한 결과는 YKL-1의 인체 정상세포주에서의 증식과 세포살상 능력이 야생형 바이러스에 비해 현저히 떨어짐을 의미한다. 도 3에서, 1열은 증식불능 아데노 바이러스 ad- Δ E1/ β -gal; 2열은 YKL-1; 그리고, 3열은 야생형 바이러스 ad-XJ를 각각 감염시킨 결과를 나타낸다.

YKL-1의 종양특이 살상능력을 검증하기 위해서는 종양세포주인 C33A, Hep-3B, SK-Hep1, HepG2, Hela 및 H460 등을 이용하였다. 상기 세포주를 YKL-1, 야생형 바이러스 ad-XJ 및 증식불능 아데노바이러스 ad- Δ E1/ β -gal로, 바이러스의 MOI가 10, 1, 또는 0.1이 되도록 감염시킨 후 세포의 사멸정도를 관찰한 결

과, YKL-1의 세포살상능력은 돌연변이에 의하여 p53 유전자가 비활성화된 것으로 알려진 C33A 및 Hep-3B에서 야생형 바이러스와 유사한 정도를 나타내었고, p53 단백질이 정상적으로 발현되는 다른 종양세포 주에서는 야생형 바이러스에 비하여 낮은 수준으로 나타났다(참조: 도 4). 도 4에서, 1열은 증식불능 아데노 바이러스 ad- Δ E1/ β -gal을; 2열은 YKL-1을; 그리고, 3열은 야생형 바이러스 ad-XJ를 각각 감염시킨 결과를 나타낸다.

결국, 상기한 결과는 재조합 아데노바이러스 YKL-1이 p53 유전자가 비활성화된 종양세포에서만 선택적으로 증식 및 살상을 유도할 수 있는 능력이 있음을 보여준다.

실시예 2-2: YKL-1의 항종양 효과 검증

YKL-1의 종양 퇴행 유발능력을 규명하기 위하여, p53 유전자가 비활성화되어 있는 1×10^7 개의 자궁암 세포주 C33A를 생후 5 내지 6주 된 누드마우스에 접종하고, 종양이 단면적 $5 \times 5 \text{mm}^2$ 정도의 크기로 성장하였을 때, $5 \times 10^8 / 50 \mu\text{l}$ 의 YKL-1 바이러스 또는, 자외선으로 비활성화시킨 동량의 음성대조군 YKL-1 바이러스를 종양에 직접 주사하였다. YKL-1을 주사한 경우, 종양 주위로 형성되어 지던 혈관들이 서서히 사라지면서, 자외선으로 비활성화시킨 동량의 음성대조군 YKL-1 바이러스를 주사한 경우에 비하여 종양의 성장이 크게 억제됨을 확인 할 수 있었다(참조: 도 5). 도 5에서, 종양의 크기는 이틀에 한번씩 조사하였고, 상대적 종양의 크기는 최초 바이러스를 주사할 때의 종양크기를 1.0으로 하여 수치로 나타낸 값이다. 또한, (●)는 실험군 YKL-1 바이러스를 나타내고, (■)는 자외선에 의하여 비활성화된 음성대조군 YKL-1 바이러스를 나타낸다.

상술한 바와 동일한 방법으로 재조합 아데노바이러스를 감염시킨 마우스로부터 종양을 채취하여 헤마톡실린/에오신(hematoxylin/eosin) 염색을 시행한 결과에서도 자외선에 의하여 비활성화된 음성대조군 바이러스를 주사한 경우, 종양세포의 성장이 활발히 진행되는 반면, YKL-1을 주사한 종양에서는 세포괴사가 현저히 유발되었음을 관찰할 수 있었다(참조: 도 6). 도 6에서, (a)는 자외선으로 비활성화시킨 음성대조군 YKL-1을 감염시킨 결과를, (b)는 실험군 YKL-1을 감염시킨 결과를 나타내는 사진으로서, 40배율로 확대된 사진이며, 각 사진내의 확대부분은 200배율로 확대한 것이다. (b)의 화살표로 표시한 부분은 YKL-1의 증식으로 인하여 세포괴사가 일어났음을 나타낸다. 이외에도, 아데노바이러스 특이 항체를 이용하여 면역조직검사(immunohistochemistry)를 수행한 결과, YKL-1을 주사한 종양에서는 종양세포의 주위로 분포된 아데노바이러스의 존재를 확인할 수 있었으나, 자외선으로 활성화된 대조군 바이러스를 주사한 경우에는 바이러스의 증식을 관찰할 수 없었다.

이러한 결과들을 비추어 볼때, E1B 55kDa 단백질을 코딩하는 유전자가 결손된 아데노바이러스 YKL-1은 생체내 조건에서도 종양특이 살상효과를 보여주며, 이를 통하여 항종양 효과가 있음을 강력하게 제시하고 있다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 아데노바이러스의 자기증식에 관여하는 E1B 영역의 유전자 중 종양억제 유전자 p53 단백질과 결합하는 55kDa 단백질을 코딩하는 유전자만을 선택적으로 제거시켜, 종양세포에서만 특이적으로 증식 가능하게 하고, 이를 통해 종양을 살상시킬 수 있도록 작제된 돌연변이형 재조합 아데노바이러스와 전기 바이러스를 이용하여 종양세포를 제거하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 종양특이적 살상능을 지닌 재조합 아데노바이러스의 응용은 증식불능 아데노 바이러스에 치료용 유전자를 도입하여 바이러스가 도입된 세포에서만 국소적으로 치료효과를 보이는 종래의 유전자 치료의 한계를 극복할 수 있을 뿐만 아니라, 방사선 치료, 약물치료 및 치료유전자의 바이러스내 도입과 같은 기존의 암 치료법과의 병행요법을 통하여 치료효과를 극대화하고, 각각의 단점을 보완 극복할 수 있는 새로운 암 치료법의 개발에 활용될 수 있을 것이다.

<110> YONSEI UNIVERSITY

<120> Tumor-Specific Recombinant Adenovirus and Method for Eradicating
Tumor Cells

<160> 3

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> single-stranded oligonucleotide

<400> 1

gccctcgaga tgagacatat tatctgccac g	31
<210> 2	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> single-stranded oligonucleotide	
<400> 2	
tcttggatcc agatctatac agttaagcca cctatacaac	40
<210> 3	
<211> 1711	
<212> DNA	
<213> Adenovirus type 5	
<400> 3	
atgagacata ttatctgcc a cggagggtgtt attaccgaag aaatggccgc cagtcttttg	60
gaccagctga tcgaagaggt actggctgat aatcttcac ctctagcca ttttgaacca	120
cctacccttc acgaactgta tgatttagac gtgacggccc ccgaagatcc caacgaggag	180
gcggtttcgc agatttttcc cgactctgta atgttggcgg tgcaggaagg gattgactta	240
ctcacttttc cgccggcgcc cggttctccg gagccgcctc acctttcccg gcagcccgag	300
cagccggagc agagagcctt gggtcgggtt tctatgccaa accttgtacc ggaggatgc	360
gatcttacct gccacgaggc tggctttcca ccagtgacg acgaggatga agagggtag	420
gagtttgtgt tagattatgt ggagcacccc gggcacgggt gcaggctctg tcattatcac	480
cggaggaata cgggggaccc agatattatg tgttcgcttt gctatatgag gacctgtggc	540
atgtttgtct acagtaagtg aaaattatgg gcagtgggtg atagagtgtt gggtttgggtg	600
tggtaatitt ttttttaatt ttacagitt tgtggtttaa agaattttgt atttgtattt	660
ttttaaaagg tcctgtgtct gaacctgagc ctgagccga gccagaaccg gagcctgcaa	720
gacctaccg ccgtcctaaa atggcgctg ctatcctgag acgcccga tcacctgtgt	780
ctagagaatg caatagtagt acggatagct gtgactccg tccttctaac acacctctg	840
agatacacc gggtgtcccg ctgtgcccc ttaaaccagt tgcctgaga gttggtgggc	900
gtgccaggc tgtggaatgt atcgaggact tgcttaacga gcctgggcaa cctttggact	960
tgagctgtaa acgccccagg ccataagggt taaacctgtg attgcgtgtg tggttaacgc	1020
ctttgtttgc tgaatgagtt gatgtaagt taataaagg tgagataatg ttttaactgc	1080
atggcgtgtt aaatggggcg gggcttaaag ggtatataat gcgccgtgg ctaatcttg	1140
ttacatctga cctcatggag gcttgggagt gtttgaaga ttttctgct gtgcgtaact	1200
tgctggaaca gagctctaac agtacctctt ggttttggag gtttctgtg ggctcatccc	1260
aggcaaagt agtctgcaga attaaggagg attacaagt ggaatttga gagcttttga	1320
aatcctgtgg tgagctgttt gattctttga atctgggtca ccaggcgctt ttccaagaga	1380
aggctatcaa gactttggat tttccacac cggggcgcg tgcggctgct gttgcttttt	1440
tgagttttat aaaggataaa tggagcgaag aaacctatct gagcgggggg tacctgctgg	1500
atthcttggc catgcatctg tggagagcgg ttgtgagaca caagaatcgc ctgctactgt	1560
tgtcttccgt ccgccggcg ataataccga cggaggagca gcagcagcag caggaggaag	1620
ccaggcgcg gcggcaggag cagagcccat ggaacccgag agccggcctg gacctcggg	1680
aatgaatgtt gtacaggtag ctgaactgta t	1711

(57) 청구의 범위

청구항 1

아데노바이러스(Adenovirus) E1B 유전자으로부터 p53 단백질과 결합하는 55kDa 단백질을 코딩하는 유전자가 제거되어, 종양세포에서만 특이적으로 증식하는 종양 특이 증식 재조합 아데노바이러스(Adenovirus).

청구항 2

아데노바이러스(Adenovirus) 타입 Ad 5의 E1B 유전자 중 p53 단백질과 결합하는 55kDa 단백질을 코딩하는 유전자가 제거된 종양 특이 증식 재조합 아데노바이러스(Adenovirus) YKL-1(KFCC-11099).

청구항 3

(i) 아데노바이러스(Adenovirus)의 E1B 유전자영역 중, p53 단백질과 결합하는 55kDa 단백질을 코딩하는 유전자를 제거시켜 재조합 아데노바이러스(Adenovirus)를 작성한 다음, 종양세포주를 이용하여 이를 증식시키고, 순수 분리하는 단계;

(ii) 전기 순수 분리된 재조합 아데노바이러스(Adenovirus)를 종양세포에 감염시키는 단계; 및,

(iii) 전기 재조합 아데노바이러스(Adenovirus)가 감염된 종양세포를 배양하는 단계를 포함하는 종양세포의 제거방법.

청구항 4

제 3항에 있어서,

재조합 아데노바이러스는 타입 Ad 5인 아데노바이러스로부터 작성된 바이러스인 것을 특징으로 하는 종양세포의 제거방법.

청구항 5

제 3항에 있어서,

종양세포주에 전기 재조합 아데노바이러스(Adenovirus)를 MOI(multiplicity of infection) 0.1 내지 10으로 감염시킨 다음, 37℃에서, 8 내지 10 일 동안 배양시키는 것을 특징으로 하는

종양세포의 제거방법.

청구항 6

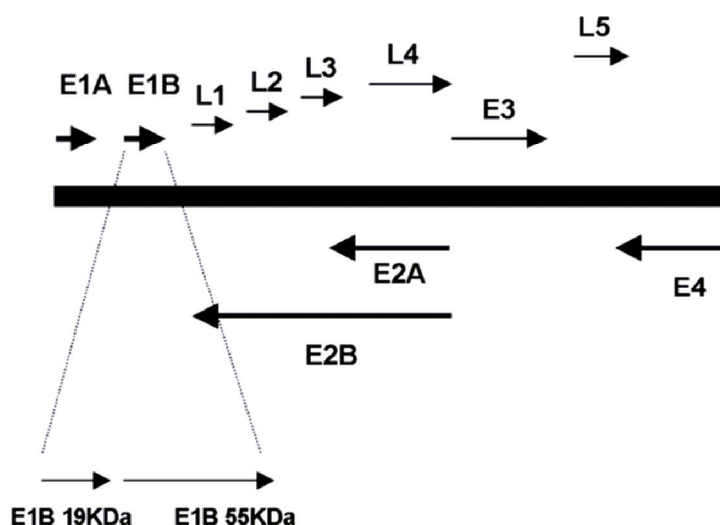
제 3항에 있어서,

감염은 종양세포로 이루어진 종양의 단축 5x5mm²를 기준으로 5x10⁸ 개의 재조합 아데노바이러스(Adenovirus) 입자를 종양에 주사하는 것을 특징으로 하는

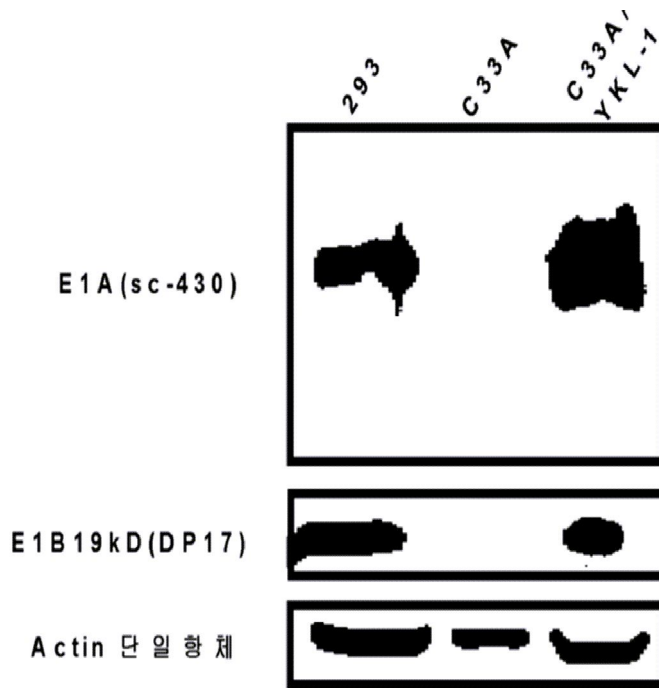
종양세포의 제거방법.

도면

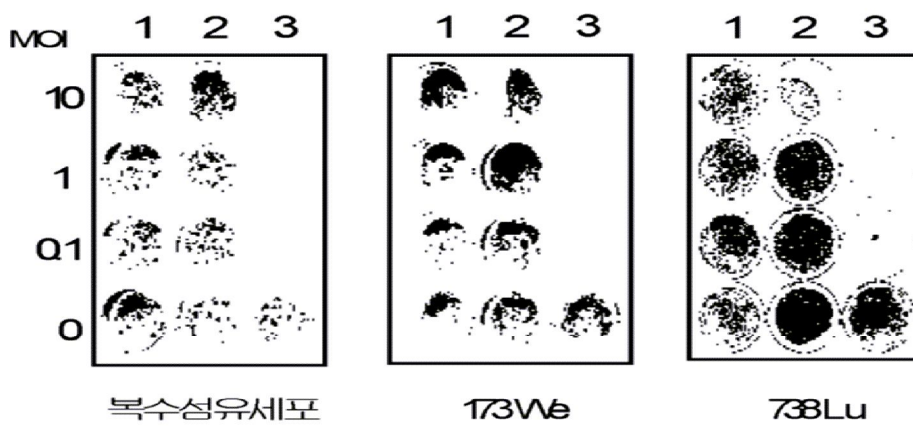
도면1



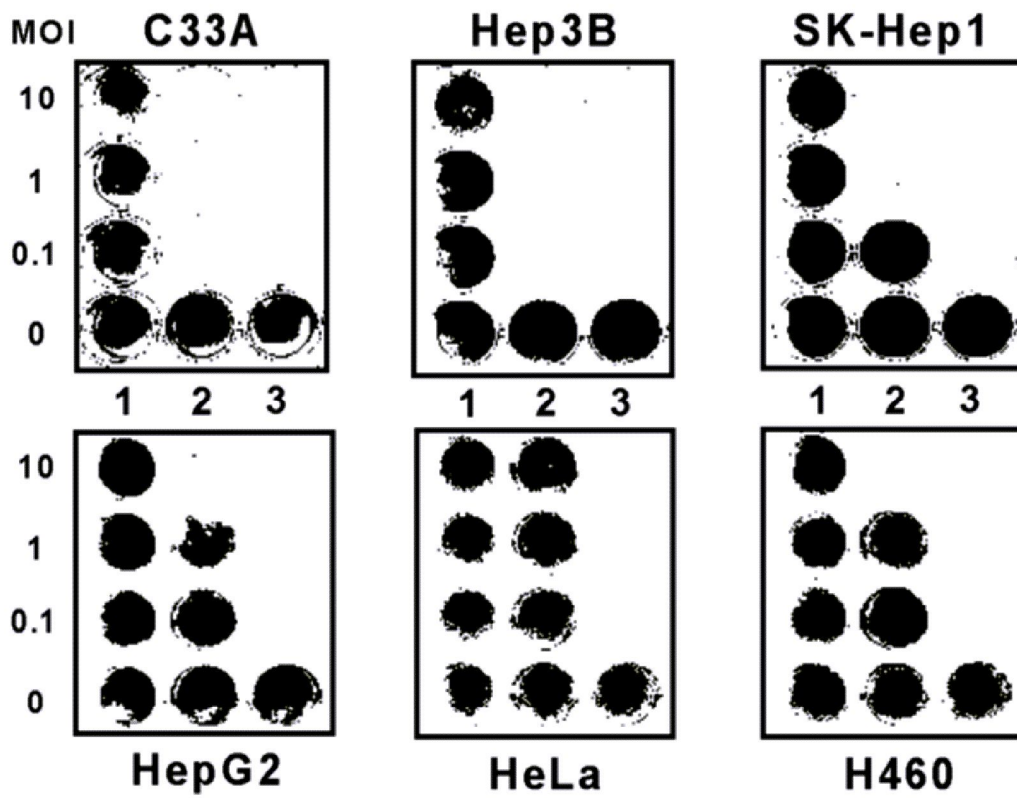
도면2



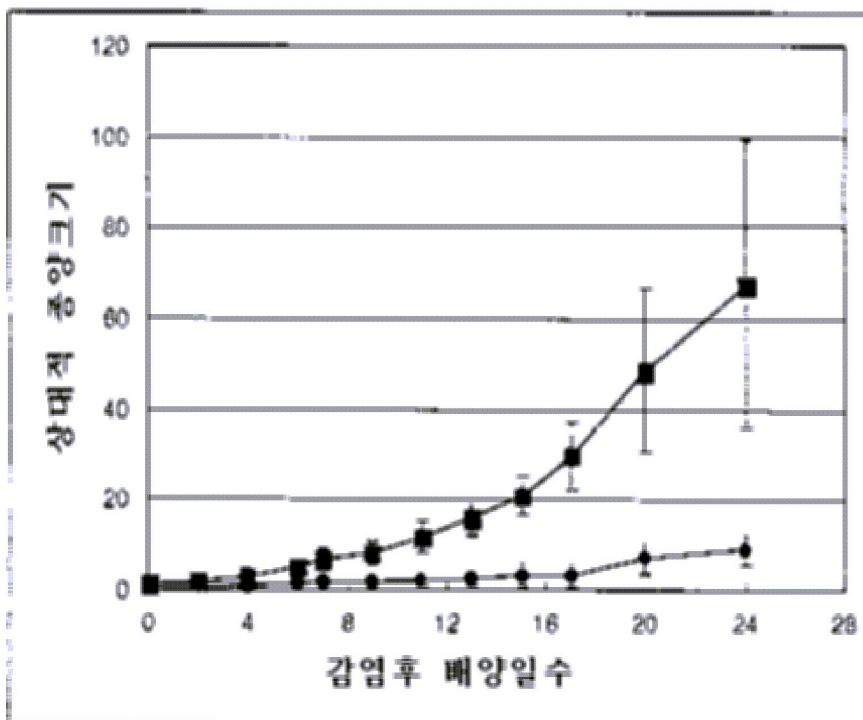
도면3



도면4



도면5



도면6



(a)



(b)