

명세서

발명의 명칭: 재조합 백시니아 바이러스 및 이를 포함하는 약학 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 암 치료 유전자를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스 및 이를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 암 치료제 개발 목적으로 다양한 바이러스를 유전적으로 조작하여 변형시킨 종양 살상 바이러스(Oncolytic virus)에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나, 아직까지는 종양 살상 바이러스의 문제점이 완전히 해결되지 못하고 있는 상황이다. 예를 들어, 항암제로 개발하기 위하여 유전적 조작을 통해 종양 선택적 복제능을 갖는 바이러스를 제작하였으나, 암세포뿐만 아니라 정상세포를 살상한다는 문제점이 발견되기도 하였고, 항암 효과가 충분하지 못한 문제점도 발견되었다. 따라서, 종양 살상 바이러스가 정상세포에 미치는 영향을 최소화하면서, 암세포에 대한 선택성 및 효능을 높일 수 있는 기술의 개발이 지속적으로 요구되고 있다.
- [3] 한편, 백시니아 바이러스는 약 200개의 독립 유전자를 인코딩하는 약 200 kbp의 이중가닥 선형 게놈 DNA를 갖는 피막 DNA 바이러스이다. 백시니아 바이러스는 18세기에 에드워드 제너가 최초로 천연두(smallpox)의 예방백신으로 사용한 이후 다양한 예방 백신들로 개발되었다. 초기의 백시니아 바이러스 백신은 야생형 바이러스를 사용하였고, 백신을 투여한 환자에서 전신감염 또는 진행성 감염 등의 심각한 부작용이 나타났었다. 이에, 부작용을 줄이기 위해 양카라(MVA, modified vaccinia Ankara), LC16m8(derived from the Lister strain) 및 NYVAC(derived from the Copenhagen vaccinia strain, New York Vaccinia Virus) 등과 같이 독성이 약화된 변형 백시니아 바이러스들이 개발되었다. 이러한 백시니아 바이러스들을 기반으로 다양한 질환에 적용가능한 백신들이 개발되었고, 특히, 웨스턴 리저브(Western Reserve, WR), NYVAC, Wyeth, 리스터(Lister) 등의 백시니아 바이러스 종(strain)들은 종양 살상 바이러스로도 개발되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 본 발명의 목적은 암 치료 유전자를 포함하거나 암 치료 유전자를 포함하면서 일부 유전자의 발현이 억제된 재조합 백시니아 바이러스, 및 이를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [5] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 sPD-1(soluble programmed cell death

protein-1)을 코딩하는 유전자, 히알루로니다아제(hyaluronidase)를 코딩하는 유전자, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스를 제공한다.

[6] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[7] 또한, 본 발명은 상기 재조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

[8] 본 발명에 따른 암 치료 유전자를 포함하거나 암 치료 유전자를 포함하면서 일부 유전자의 발현이 억제된 재조합 백시니아 바이러스는 항종양 효과가 우수한 특징이 있다. 따라서, 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스는 암을 치료하는 데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[9] 도 1은 VGF, TK 및 K3L이 결실된 IHD-W 백시니아 바이러스(IHD-W-VV01)의 유전자 구조를 도식화한 것이다. 바이러스 유전자 결실 및 치료유전자 도입에 대해 약기한 용어의 의미는 하기 표 1에 나타낸 바와 같다.

[10] [표 1]

약기	의미
IHD-W-VV01	VGF, TK 및 K3L 이 결실된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스
IHD-W-VV02	VGF, TK 및 K3L 이 결실되고 sPD1-Fc 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스
IHD-W-VV03	VGF, TK 및 K3L 이 결실되고 PH20 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스
IHD-W-VV04	VGF, TK 및 K3L 이 결실되고 IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스
IHD-W-VV05	VGF, TK 및 K3L 이 결실되고 sPD1-Fc 및 PH20 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스
IHD-W-VV06	VGF, TK 및 K3L 이 결실되고 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스

[12] 도 2는 VGF, TK 및 K3L이 결실되고, sPD1-Fc 유전자가 삽입된 IHD-W-VV02의 유전자 구조를 도식화한 것이다.

[13] 도 3은 IHD-W-VV02의 gDNA를 전기영동하여 sPD1-Fc 유전자가 삽입된 것을 확인한 것이다.

[14] 도 4는 IHD-W-VV02가 감염된 HeLa 세포에서 분비된 단백질을 웨스턴 블롯하여 sPD1-Fc 유전자가 발현된 것을 확인한 것이다.

[15] 도 5는 VGF, TK 및 K3L이 결실되고, PH20 유전자가 삽입된 IHD-W-VV03의 유전자 구조를 도식화한 것이다.

[16] 도 6은 IHD-W-VV03의 gDNA를 전기영동하여 PH20 유전자가 삽입된 것을 확인한 것이다.

- [17] 도 7은 IHD-W-VV03가 감염된 HeLa 세포에서 분리된 단백질을 웨스턴 블롯하여 PH20 유전자가 발현된 것을 확인한 것이다.
- [18] 도 8은 VGF, TK 및 K3L이 결실되고, IL-12 유전자가 삽입된 IHD-W-VV04의 유전자 구조를 도식화한 것이다.
- [19] 도 9는 IHD-W-VV04의 gDNA를 전기영동하여 IL-12 유전자가 삽입된 것을 확인한 것이다.
- [20] 도 10은 IHD-W-VV04가 감염된 HeLa 세포에서 분리된 단백질을 웨스턴 블롯하여 IL-12 유전자가 발현된 것을 확인한 것이다.
- [21] 도 11은 VGF, TK 및 K3L이 결실되고, sPD1-Fc 및 PH20 유전자가 삽입된 IHD-W-VV05의 유전자 구조를 도식화한 것이다.
- [22] 도 12는 IHD-W-VV05의 gDNA를 전기영동하여 sPD1-Fc 및 PH20 유전자가 삽입된 것을 확인한 것이다.
- [23] 도 13은 IHD-W-VV05가 감염된 HeLa 세포에서 분리된 단백질을 웨스턴 블롯하여 sPD1-Fc 및 PH20 유전자가 발현된 것을 확인한 것이다.
- [24] 도 14는 VGF, TK 및 K3L이 결실되고, sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자가 삽입된 IHD-W-VV06의 유전자 구조를 도식화한 것이다.
- [25] 도 15는 IHD-W-VV06의 gDNA를 전기영동하여 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자가 삽입된 것을 확인한 것이다.
- [26] 도 16은 IHD-W-VV06가 감염된 HeLa 세포에서 분리된 단백질을 웨스턴 블롯하여 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자가 발현된 것을 확인한 것이다.
- [27] 도 17은 VGF, TK 및 K3L 발현이 비활성화된 WR 백시니아 바이러스(WR-VV01)의 유전자 구조를 도식화한 것이다. 바이러스 유전자 비활성화 및 치료유전자 도입에 대해 약기한 용어의 의미는 하기 표 2에 나타낸 바와 같다.

[28] [표 2]

약기	의미
WR-VV01	VGF, TK 및 K3L 발현이 비활성화된 재조합 WR 백시니아 바이러스
WR-VV05	VGF, TK 및 K3L의 발현이 비활성화되고 sPD1-Fc 및 PH20 유전자의 발현이 유도된 재조합 WR 백시니아 바이러스
WR-VV06	VGF, TK 및 K3L 발현이 비활성화되고 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 WR 백시니아 바이러스

- [30] 도 18은 VGF, TK 및 K3L 발현이 비활성화되고, sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자가 삽입된 WR-VV06의 유전자 구조를 도식화한 것이다.
- [31] 도 19는 WR-VV06의 gDNA를 전기영동하여 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자가 삽입된 것을 확인한 것이다.
- [32] 도 20a는 WR-VV06가 감염된 HeLa 세포에서 분리된 단백질을 웨스턴 블롯하여 sPD1-Fc, PH20 유전자가 발현된 것을 확인한 것이다.
- [33] 도 20b는 WR-VV06가 감염된 HeLa 세포에서 분리된 단백질을 ELISA 하여

IL-12 유전자가 발현된 것을 확인한 것이다.

- [34] 도 21은 VGF, TK 및 K3L이 결실된 Lister 백시니아 바이러스(Lister-VV01)의 유전자 구조를 도식화한 것이다. 바이러스 유전자 결실 및 치료유전자 도입에 대해 약기한 용어의 의미는 하기 표 3에 나타낸 바와 같다.

- [35] [표 3]

약기	의미
Lister-VV01	VGF, TK 및 K3L 이 결실된 재조합 Lister 백시니아 바이러스
Lister-VV05	VGF, TK 및 K3L 이 결실되고 sPD1-Fc 및 PH20 유전자의 발현이 유도된 재조합 Lister 백시니아 바이러스
Lister-VV06	VGF, TK 및 K3L 이 결실되고 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 Lister 백시니아 바이러스

- [37] 도 22는 VGF, TK 및 K3L이 결실되고, sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자가 삽입된 Lister-VV06의 유전자 구조를 도식화한 것이다.
- [38] 도 23은 Lister-VV06의 gDNA를 전기영동하여 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자가 삽입된 것을 확인한 것이다.
- [39] 도 24a는 Lister-VV06가 감염된 HeLa 세포에서 분비된 단백질을 웨스턴 블롯하여 sPD1-Fc, PH20 유전자가 발현된 것을 확인한 것이다.
- [40] 도 24b는 Lister-VV06가 감염된 HeLa 세포에서 분비된 단백질을 ELISA로 IL-12 유전자가 발현된 것을 확인한 것이다.
- [41] 도 25는 대장암 마우스 모델에 IHD-W-VV02, IHD-W-VV03 및 IHD-W-VV05를 종양 내 투여한 후 암세포 성장을 확인한 결과이다.
- [42] 도 26은 흑색종 마우스 모델에 IHD-W-VV01 및 HD-W-VV05를 종양 내 투여한 후 암세포 성장을 확인한 결과이다.
- [43] 도 27은 폐암 마우스 모델에 IHD-W-VV01 및 HD-W-VV05를 종양 내 투여한 후 암세포 성장을 확인한 결과이다.
- [44] 도 28은 대장암 마우스 모델에 IHD-W-VV02, IHD-W-VV03, IHD-W-VV04 및 IHD-W-VV06을 종양 내 투여한 후 암세포 성장을 확인한 결과이다.
- [45] 도 29는 폐암 마우스 모델에 IHD-W-VV02, IHD-W-VV03, IHD-W-VV04 및 IHD-W-VV06을 종양 내 투여한 후 암세포 성장을 확인한 결과이다.
- [46] 도 30은 대장암 마우스 모델에 IHD-W-VV05 및 IHD-W-VV06을 종양 내 투여한 후 암세포 성장을 확인한 결과이다.
- [47] 도 31은 흑색종 마우스 모델에 IHD-W-VV05 및 IHD-W-VV06을 종양 내 투여한 후 암세포 성장을 확인한 결과이다.
- [48] 도 32는 폐암 마우스 모델에 IHD-W-VV05 및 IHD-W-VV06을 종양 내 투여한 후 암세포 성장을 확인한 결과이다.
- [49] 도 33은 흑색종 마우스 모델에 IHD-W-VV01 및 IHD-W-VV06을 종양 내 투여한 후 암세포 성장을 확인한 결과이다.
- [50] 도 34는 폐암 마우스 모델에 IHD-W-VV01 및 IHD-W-VV06을 종양 내 투여한

후 암세포 성장을 확인한 결과이다.

[51] 도 35는 폐암 마우스 모델에 WR-VV01 및 WR-VV06을 종양 내 투여한 후 암세포 성장을 확인한 결과이다.

[52] 도 36은 폐암 마우스 모델에 Lister-VV01 및 Lister-VV06을 종양 내 투여한 후 암세포 성장을 확인한 결과이다.

[53] 도 37은 IHD-W-VV06, WR-VV06 및 Lister-VV06의 in vitro 세포 살상능을 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[54] 본 발명은 일 측면으로, sPD-1(soluble programmed cell death protein-1)을 코딩하는 유전자, 히알루로니다아제(hyaluronidase)를 코딩하는 유전자, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스를 제공한다. 상기 재조합 백시니아 바이러스는 IL-12를 코딩하는 유전자를 더 포함하는 것일 수 있다.

[55] 본 발명에서 사용하는 용어 "sPD-1"은 면역글로불린 분자군에 속하는 T 세포의 보조저해분자로 잘 알려진 55 kDa의 제I형 경막 단백질인 PD-1(programmed death-1)의 세포외 도메인 또는 이의 단편을 의미한다. 또한, 상기 sPD-1은 sPD-1의 단편 또는 sPD-1 전장과 면역글로불린 Fc 영역이 융합된 sPD-1 융합 단백질을 포함하는 의미로 사용될 수 있다. 상기 융합 단백질의 일 구체예로는 sPD-1과 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 sPD-1-Fc일 수 있다. 이때, sPD-1과 Fc는 직접 또는 링커를 통해 결합할 수 있다. 이때, 상기 링커는 1 내지 50개, 2 내지 45개, 3 내지 40개, 5 내지 30개, 7 내지 25개의 아미노산으로 구성된 펩타이드일 수 있으며, 구체적으로, 3 내지 40개의 아미노산으로 구성된 펩타이드일 수 있다. 상기 링커는 GGGGS(서열번호 123),

GGGGSGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCP(서열번호 124),

SPKAQAGGGGSAQPQAEGLGSGGSAKASAPAGGGGS(서열번호 125),

GGSGSGSGSGSGGSEQEER(서열번호 126), GGGGSGGGSGGS(서열번호

127), SGGGSGGGSGGGSGGSGTHTCPPCP(서열번호 128),

GGSGGGGS(서열번호 129) 및 GGGGSGGGSGGGGS(서열번호 130)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[56] 상기 sPD-1은 GenBank: NM_008798.2의 서열의 일부일 수 있으며, 어느 하나의 서열로 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 sPD-1은 서열번호 131 또는 서열번호 133의 아미노산 서열일 수 있다. 또한, sPD-1은 sPD-1의 기능을 변형시키지 않는 내에서 서열번호 131의 아미노산 서열과 약 90%, 91%, 92%, 93%, 또는 94% 이상, 바람직하게는, 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상일 수 있으며, 가장 바람직하게는, 약 99% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

[57] 또한, 본 발명에서 사용하는 용어 "sPD-1 유전자"는 "sPD-1 단백질을 코딩하는 유전자 또는 목적 단백질인 sPD-1 단백질과 기타 단백질이 융합된 sPD-1 융합

단백질"을 코딩하는 유전자를 의미한다. 구체적으로, 상기 sPD-1 유전자는 Fc 영역을 포함하는 sPD-1 융합 단백질(sPD1-Fc)을 코딩하는 것일 수 있다. 상기 sPD-1 유전자는 서열번호 132 또는 134의 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, sPD-1 유전자는 sPD-1의 기능을 변형시키지 않는 내에서 서열번호 134의 염기서열과 약 90%, 91%, 92%, 93%, 또는 94% 이상, 바람직하게는, 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상일 수 있으며, 가장 바람직하게는, 약 99% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

[58] 또한, 본 발명에서 사용하는 용어 "히알루로니다아제"는 히알루론산을 분해하는 효소를 의미한다. 상기 히알루로니다아제는 양, 소, 마우스 또는 인간 유래의 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 히알루로니다아제는 인간 히알루로니다아제(PH20) 또는 재조합 인간 히알루로니다아제(rHuPH20)일 수 있다. 상기 히알루로니다아제는 GenBank: NM_003117.4의 서열일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 히알루로니다아제는 서열번호 135의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 구체적으로, 상기 히알루로니다아제 유전자는 서열번호 136의 염기서열을 가질 수 있다. 또한, 히알루로니다아제 유전자는 히알루로니다아제의 기능을 변형시키지 않는 내에서 서열번호 136의 염기서열과 약 90%, 91%, 92%, 93%, 또는 94% 이상, 바람직하게는, 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상일 수 있으며, 가장 바람직하게는, 약 99% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

[59] 또한, 본 발명에서 사용하는 용어 "IL-12"는 사이토카인에 속하는 분자로 면역체계와 관련이 있다. 상기 IL-12는, 예를 들어, 인간(hIL-12), 마우스(mIL-12), 말, 소, 돼지 등의 임의의 동물로부터 획득될 수 있는 것과 동일한 것일 수 있다. 상기 IL-12는 GenBank의 NM_000882.3(hIL-12A), AY008847.1(hIL-12B), NM_001159424.2(mIL-12 α) 또는 NM_001303244.1(mIL-12 β)에 개시된 서열일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 IL-12는 서열번호 137의 아미노산 서열일 수 있다. 구체적으로, 상기 IL-12 유전자는 서열번호 138의 염기서열로 표시되는 링커, 서열번호 139의 염기서열(p35 서브유닛), 또는 서열번호 140(p40 서브유닛)의 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, IL-12 유전자는 IL-12의 기능을 변형시키지 않는 내에서 서열번호 138 내지 서열번호 140의 염기서열과 약 90%, 91%, 92%, 93%, 또는 94% 이상, 바람직하게는, 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상일 수 있으며, 가장 바람직하게는, 약 99% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

[60] 상기 재조합 백시니아 바이러스는 상기 sPD-1 유전자를 포함하는 백시니아 바이러스, 히알루로니다아제 유전자를 포함하는 백시니아 바이러스 또는 IL-12 유전자를 포함하는 백시니아 바이러스일 수 있다. 이때, sPD-1 유전자, 히알루로니다아제 유전자 및/또는 IL-12 유전자는 백시니아 바이러스 게놈에 삽입될 수 있다. 또한, 상기 유전자들은 백시니아 바이러스 게놈의 서로 다른 위치에 삽입될 수도 있으나, 동일하거나 비슷한 위치에 삽입될 수 있다. 일례로,

백시니아 바이러스의 TK, K3L 또는 VGF 위치에 삽입될 수 있다. 바람직하게, 상기 재조합 백시니아 바이러스는 sPD-1, 히알루로니다아제 및/또는 IL-12를 숙주세포내에서 발현할 수 있다.

- [61] 또한, 상기 재조합 백시니아 바이러스는 상기 sPD-1 유전자, 히알루로니다아제 유전자 또는 IL-12 유전자 중 적어도 두 종의 유전자를 포함할 수 있다. 예를 들어, sPD-1 유전자 및 히알루로니다아제 유전자가 삽입된 백시니아 바이러스, sPD-1 유전자 및 IL-12 유전자가 삽입된 백시니아 바이러스 또는 히알루로니다아제 유전자 및 IL-12 유전자가 삽입된 백시니아 바이러스일 수 있다. 바람직하게 상기 재조합 백시니아 바이러스는 sPD-1 유전자, 히알루로니다아제 유전자 및 IL-12 유전자를 모두 포함할 수 있다. 즉, sPD-1 유전자, 히알루로니다아제 유전자 및 IL-12 유전자의 발현이 가능한 백시니아 바이러스일 수 있다.
- [62] 상술한 백시니아 바이러스는 K3L을 코딩하는 유전자, TK(thymidine kinase)를 코딩하는 유전자 및 VGF(vaccinia growth factor)를 코딩하는 유전자 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 발현이 억제될 수 있다. 이때, 상기 조합은 K3L을 코딩하는 유전자, TK를 코딩하는 유전자 및 VGF를 코딩하는 유전자 중 2종 이상을 의미하는 것일 수 있다.
- [63] 예를 들어, 상기 재조합 백시니아 바이러스는 sPD-1 유전자를 가지는 백시니아 바이러스, 히알루로니다아제 유전자를 가지는 백시니아 바이러스, sPD-1 유전자 및 히알루로니다아제 유전자를 가지는 백시니아 바이러스, sPD-1 유전자 및 IL-12 유전자를 가지는 백시니아 바이러스, 히알루로니다아제 유전자 및 IL-12 유전자를 가지는 백시니아 바이러스, 또는 sPD-1 유전자, 히알루로니다아제 유전자 및 IL-12 유전자를 가지는 백시니아 바이러스 중에서, K3L 유전자, TK 유전자 및 VGF 유전자 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 발현이 억제된 것일 수 있다.
- [64] 본 발명에서 사용하는 용어 "VGF"는 백시니아 성장인자를 의미한다. 상기 백시니아 성장인자는 상피세포 성장인자와 유사한 활성을 나타내는 효소이다. 상기 VGF 유전자에 의해 코딩된 백시니아 성장인자는 바이러스에 감염되었을 때 성장인자의 활성을 나타내고, 바이러스에 의한 감염 초기에 합성될 수 있다. 상기 VGF는 GenBank: AAO89288.1, ABD52455.1 또는 AIX98927.1의 서열일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 VGF는 서열번호 141의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 상기 VGF 유전자는 서열번호 142의 염기서열일 수 있다. 상기 VGF는 서열번호 141의 아미노산 서열과 약 70% 또는 75% 이상, 바람직하게는 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 또는 89% 이상일 수 있다. 또한, 상기 VGF 유전자는 서열번호 142의 염기서열과 약 90%, 91%, 92%, 93%, 또는 94% 이상, 바람직하게는, 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상일 수 있으며, 가장 바람직하게는, 약 99% 이상의 상동성을 가질 수 있다.

- [65] 본 발명에서 사용하는 용어 "TK"는 티미딘 키나아제를 의미한다. 상기 티미딘 키나아제는 뉴클레오티드의 생합성에 관여하는 효소이다. 상기 TK 유전자에 의해 코딩된 티미딘 카나아제는 ATP의 감마(γ) 위치의 인산을 티미딘에 결합시켜 바이러스 DNA를 구성하는 뉴클레오티드들을 만들 수 있다. 상기 TK는 GenBank: AAO89373.1, ABD52560.1 또는 AIX99011.1의 서열일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 TK는 서열번호 143의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 상기 TK 유전자는 서열번호 144의 염기서열일 수 있다. 상기 TK는 서열번호 143의 아미노산 서열과 약 70% 또는 75% 이상, 바람직하게는 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 또는 89% 이상일 수 있다. 또한, 상기 TK의 유전자는 서열번호 144의 염기서열과 약 90%, 91%, 92%, 93%, 또는 94% 이상, 바람직하게는, 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상일 수 있으며, 가장 바람직하게는, 약 99% 이상의 상동성을 가질 수 있다.
- [66] 본 발명에서 사용하는 용어 "K3L"은 K3L 단백질을 의미한다. 상기 K3L 유전자에 의해 코딩되는 K3L 단백질은 eIF-2 α (translation initiation factor-2 α)와 상동성을 갖는 단백질로, 인터페론 활성화 인자인 PKR(protein kinase R)의 작용을 억제할 수 있다. 상기 K3L은 GenBank: AAO89313.1, ABD52483.1 또는 AGB75754.1의 서열일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 K3L은 서열번호 145의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 상기 K3L 유전자는 서열번호 146의 염기서열일 수 있다. 상기 K3L은 서열번호 145의 아미노산 서열과 약 70% 또는 75% 이상, 바람직하게는 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 또는 89% 이상일 수 있다. 또한, 상기 K3L의 유전자는 서열번호 146의 염기서열과 약 90%, 91%, 92%, 93%, 또는 94% 이상, 바람직하게는, 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상일 수 있으며, 가장 바람직하게는, 약 99% 이상의 상동성을 가질 수 있다.
- [67] 본 발명에 따른 유전자의 발현 억제란, 유전자 일부 또는 전부의 결실, 또는 유전자 내부에 외래 유전자가 삽입됨으로써, 유전자가 발현되지 않거나, 유전자의 일부만 발현되어 유전자가 코딩하는 단백질의 활성이 나타나지 않는 것을 의미한다. 상기 유전자를 결실시키거나, 외래 유전자를 삽입하는 방법은 통상의 기술분야에서 잘 알려진 방법으로 수행될 수 있다. 예를 들어, Methods described in Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, by J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis(2003), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Virology Methods Manual, edited by Brian W J Mahy and Hillar O Kangro(1996) Academic Press and Expression of genes by Vaccinia virus vectors. Current Protocols in Molecular Biology, published by John Wiley and Son(1998), Chapter 16에 개시되어 있는 외래 유전자를 삽입하는 방법으로 수행될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서는 pGEM-T Easy(Promega, Cat No. A1360) 또는 pGEM-T(Promega, Cat No. A3600) 플라스미드 시스템을 이용하여 외래 유전자를 삽입하였다.

- [68] 상기 백시니아 바이러스는 웨스턴 리저브(Western Reserve, WR), NYVAC(New York Vaccinia Virus), Wyeth(The New York City Board of Health; NYCBOH), LC16m8, 리스터(Lister), 코펜하겐(Copenhagen), 티안탄(Tian Tan), USSR, 타쉬켄트(TashKent), 에반스(Evans), IHD-J(International Health Division-J), IHD-W(International Health Division-White), 이들의 변이체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 백시니아 바이러스는 WR, Lister 또는 IHD-W 백시니아 바이러스일 수 있으며, GenBank: AY243312.1, DQ121394.1 또는 AIX98951.1의 서열을 가지는 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시예로 상기 백시니아 바이러스는 IHD-W일 수 있다.
- [69] 본 발명에서 사용된 용어 "V" 또는 "바이러스 V"는 백시니아 성장인자 유전자인 VGF가 결실된 재조합 백시니아 바이러스를 의미하며, 상기 바이러스는 VGF 유전자가 결실되어, VGF 유전자를 발현하지 못한다.
- [70] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "T" 또는 "바이러스 T"는 티미딘 키나아제(TK) 유전자가 결실된 재조합 백시니아 바이러스를 의미하며, 상기 바이러스는 TK 유전자가 결실되어, TK 유전자를 발현하지 못한다.
- [71] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "K" 또는 "바이러스 K"는 K3L 유전자가 결실된 재조합 백시니아 바이러스를 의미하며, 상기 바이러스는 K3L 유전자가 결실되어, K3L 유전자를 발현하지 못한다.
- [72] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "VT" 또는 "바이러스 VT"는 VGF 및 TK 유전자가 결실된 재조합 백시니아 바이러스를 의미한다. 상기 백시니아 성장인자 및 티미딘 키나아제의 발현을 비활성화 시키는 방법은 상술한 바와 같다.
- [73] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "IHD-W-VV01"은 VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스를 의미한다. 상기 백시니아 성장인자, 티미딘 키나아제 및 K3L 단백질의 발현을 비활성화 시키는 방법은 상술한 바와 같다.
- [74] 또한, 본 발명의 일 실시예에서 사용된 용어 "IHD-W-VV02"는 VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실되고, sPD1-Fc 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스를 의미한다.
- [75] 또한, 본 발명의 일 실시예에서 사용된 용어 "IHD-W-VV03"은 VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실되고, PH20 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스를 의미한다.
- [76] 또한, 본 발명의 일 실시예에서 사용된 용어 "IHD-W-VV04"는 VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실되고, IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스를 의미한다.
- [77] 또한, 본 발명의 일 실시예에서 사용된 용어 "IHD-W-VV05"는 VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실되고, sPD1-Fc 및 PH20 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W

백시니아 바이러스를 의미한다.

- [78] 또한, 본 발명의 일 실시예에서 사용된 용어 "IHD-W-VV06"은 VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실되고, sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스를 의미한다.
- [79] 구체적으로, 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스의 일 예로는 다음과 같은 것들이 가능하다. WR 백시니아 바이러스의 변이체는 WR 백시니아 바이러스의 VGF, TK 및 K3L 중 1종 이상의 유전자 발현이 억제되고, sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 중 1종 이상의 유전자 발현이 유도된 것일 수 있다.
- [80] 또한, NYVAC 백시니아 바이러스의 변이체는 NYVAC 백시니아 바이러스의 VGF, TK 및 K3L 중 1종 이상의 유전자 발현이 억제되고, sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 중 1종 이상의 유전자 발현이 유도된 것일 수 있다.
- [81] 또한, Wyeth 백시니아 바이러스의 변이체는 Wyeth 백시니아 바이러스의 VGF, TK 및 K3L 중 1종 이상의 유전자 발현이 억제되고, sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 중 1종 이상의 유전자 발현이 유도된 것일 수 있다.
- [82] 또한, Lister 백시니아 바이러스의 변이체는 Lister 백시니아 바이러스의 VGF, TK 및 K3L 중 1종 이상의 유전자 발현이 억제되고, sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 중 1종 이상의 유전자 발현이 유도된 것일 수 있다.
- [83] 또한, Tian tan 백시니아 바이러스의 변이체는 Tian tan 백시니아 바이러스의 VGF, TK 및 K3L 중 1종 이상의 유전자 발현이 억제되고, sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 중 1종 이상의 유전자 발현이 유도된 것일 수 있다.
- [84] 또한, USSR 백시니아 바이러스의 변이체는 USSR 백시니아 바이러스의 VGF, TK 및 K3L 중 1종 이상의 유전자 발현이 억제되고, sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 중 1종 이상의 유전자 발현이 유도된 것일 수 있다.
- [85] 또한, TashKent 백시니아 바이러스의 변이체는 TashKent 백시니아 바이러스의 VGF, TK 및 K3L 중 1종 이상의 유전자 발현이 억제되고, sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 중 1종 이상의 유전자 발현이 유도된 것일 수 있다.
- [86] 또한, IHD-J 백시니아 바이러스의 변이체는 IHD-J 백시니아 바이러스의 VGF, TK 및 K3L 중 1종 이상의 유전자 발현이 억제되고, sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 중 1종 이상의 유전자 발현이 유도된 것일 수 있다.
- [87] 나아가, IHD-W 백시니아 바이러스의 변이체는 IHD-W 백시니아 바이러스의 VGF, TK 및 K3L 중 1종 이상의 유전자 발현이 억제되고, sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 중 1종 이상의 유전자 발현이 유도된 것일 수 있다.
- [88] 본 발명은 다른 측면으로, 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 이때, 재조합 백시니아 바이러스는 상술한 바와 같이 sPD1-Fc, PH20, IL-12 유전자 또는 이들의 조합의 발현이 유도되고, VGF, TK, K3L 유전자 또는 이들의 조합의 발현이 억제된 것일 수 있다. 상기 sPD1-Fc, PH20, IL-12, VGF, TK 및 K3L 유전자는 상술한 바와 같다.

- [89] 본 발명에서 사용한 용어 "암"은 고형암 또는 혈액암일 수 있다. 이때, 상기 고형암은 폐암, 대장암, 전립선암, 갑상선암, 유방암, 뇌암, 두경부암, 섬유육종, 식도암, 피부암, 흉선암, 위암, 결장암, 간암, 난소암, 자궁암, 방광암, 직장암, 담낭암, 담도암, 췌장암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 암은 폐암, 간암, 전립선암, 두경부암, 섬유육종, 뇌암, 유방암, 난소암, 췌장암, 피부암 또는 대장암일 수 있다. 또한, 상기 혈액암은 림프종, 급성 백혈병, 다발성 골수종 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [90] 본 발명의 약학 조성물은 부형제, 율활제, 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제가 추가로 함유될 수 있다.
- [91] 본 발명의 조성물은 통상의 방법에 따라 제형화될 수 있다. 특히 포유동물에 투여된 후 유효성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화될 수 있다. 상기 제형에 따라 본 발명의 조성물은 개체에 적절하게 투여될 수 있다. 상기 투여는 비경구 투여일 수 있고, 그 예로는 종양 내, 진피 내, 근육 내, 복막 내, 정맥 내, 동맥 내, 피하 내, 코안, 경막의 및 구강경로 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제의 형태는 주사제일 수 있다.
- [92] 본 발명은 또 다른 측면으로, 본 발명에 따른 재조합 백시니아 바이러스를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 이때, 상기 암은 상술한 바와 같다.
- [93] 상기 개체는 포유동물일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니나 상기 포유동물은 영장류(예컨대 인간), 소, 양, 염소, 말, 돼지, 개, 고양이, 토끼, 래트, 마우스, 어류, 조류 등일 수 있다. 구체적으로 인간일 수 있다. 본 발명의 조성물은 환자의 나이, 성별, 체중, 병증의 정도, 투여 경로에 따라 통상의 기술자에 의해 적절히 투여될 수 있다. 상기 투여는 1일 1회 또는 1일 수회일 수 있으며, 적절한 주기로 반복하여 투여될 수 있다.
- [94] 본 발명의 재조합 백시니아 바이러스를 포함하는 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 구체적으로, 환자에게 1×10^5 내지 1×10^{18} 의 바이러스 입자(virus particle), 감염능을 가지는 바이러스 단위(TCID₅₀) 또는 플라크 형성 단위(pfu)를 투여하는 것일 수 있고, 바람직하게는 1×10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} 또는 그 이상의 바이러스 입자, 감염능을 가지는 바이러스 단위 또는 플라크 형성 단위를 투여하는 것으로써, 상기 사이에 다양한 수치 및 범위를 포함할 수 있다. 또한, 바이러스 투여량은 0.1 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml 또는 그 이상, 이 사이의 모든 값과 범위를 포함할 수 있다.

- [95] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [96] **I. 재조합 백시니아 바이러스 제조**
- [97] 본 발명자들은 TK, VGF 및 K3L 유전자가 결실 또는 발현이 비활성된 재조합 백시니아 바이러스 플라스미드를 제작하였으며, 이들 플라스미드를 이용하여 상기 유전자들의 발현이 억제된 재조합 백시니아 바이러스를 제조하여 항암 물질로써의 특성을 비교하였다. 또한, 본 발명자들은 상기 재조합 백시니아 바이러스 플라스미드에 sPD1-Fc, PH20, IL-12 유전자가 삽입된 재조합 백시니아 바이러스 플라스미드를 제작하였으며, 이들 플라스미드를 이용하여 상기 유전자들의 발현이 유도된 재조합 백시니아 바이러스를 제조하여 항암 물질로써의 특성을 비교하였다.
- [98] 실시예 1. 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스 제조
- [99] 실시예 1.1. IHD-W-VV01 바이러스 제조
- [100] 실시예 1.1.1. VGF 유전자가 결실된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작
- [101] 먼저, IHD-W 백시니아 바이러스(ATCC, Cat No. VR-1441)의 게놈 DNA에서 VGF 유전자를 중심으로 양옆에 위치한 유전자들을 PCR로 증폭하였다. 이때 VGF 유전자 양옆의 상동한 염기 서열의 증폭에 사용한 프라이머 정보는 하기 표 4에 나타내었다. 이를 통해 VGF-L(IHD-W) 및 VGF-R(IHD-W) 단편을 수득한 후 pGEM-T Easy 플라스미드와 라이게이션하여 pGEM-T Easy-VGF-L(IHD-W) 또는 pGEM-T Easy-VGF-R(IHD-W)을 제작하였다.
- [102] [표4]

이름	서열(5'→3')	서열번호
VGF-L 정방향(IHD-W)	CGAAAGCTTGTAAGATGTTTAGAAAATGGATATT TC	서열번호 1
VGF-L 역방향(IHD-W)	CTGGGATCCTAGGCTAGCGTGTAATAAATAATAAA AATAACAATACAATATTG	서열번호 2
VGF-R 정방향(IHD-W)	CTGGAATTCGATTTAATTAATTTTTATAAATTTTT TTTATGAGTATTTTTACAAAAAA	서열번호 3
VGF-R 역방향(IHD-W)	TAGGGATCCCATCGATAGTACAATAACTTTTATG AAAT	서열번호 4

- [103] 상기 pGEM-T Easy-VGF-R(IHD-W)과 pSP72를 EcoRI 및 BglIII로 각각 처리한 뒤 라이게이션하여 pSP72-VGF-R(IHD-W)을 제작하였다. 제작된 pSP72-VGF-R(IHD-W)과 pGEM-T Easy-VGF-L(IHD-W)을 각각 HindIII 및 BamHI으로 처리하고 라이게이션하여 pSP72-VGF-L-VGF-R(IHD-W)을 제작하였다.
- [104] 다음으로, 상기 pSP72-VGF-L-VGF-R(IHD-W)에 p11 프로모터 및 LacZ 유전자를 도입하기 위하여, 하기 실시예 2.1.1.에서 제작한 WR VGF(i) 셔틀 플라스미드 내 p11-LacZ 발현 카세트 및 pSP72-VGF-L-VGF-R(IHD-W)을 NheI과 PacI으로 처리하고, 라이게이션하여 pSP72-VGF-L-p11-LacZ-VGF-R(IHD-W)(이하, "IHD-W VGF 셔틀 플라스미드")를 제작하였다.
- [105] 실시예 1.1.2. TK 유전자가 결실된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작
- [106] 먼저, IHD-W 백시니아 바이러스의 게놈 DNA에서 TK 유전자를 중심으로, 양옆에 위치한 유전자들을 확보하기 위하여 PCR을 수행한 결과로 TK-L(IHD-W) 및 TK-R(IHD-W) 단편을 수득하였다. 이때 사용된 프라이머는 하기 표 5에 나타내었다. 확보한 TK-R(IHD-W) 단편 및 pSP72 플라스미드를 각각 EcoRI 및 BglIII로 처리하고 라이게이션하여 pSP72-TK-R(IHD-W)을 제작하였다. 또한, 상기 pSP72-TK-R(IHD-W) 및 TK-L(IHD-W) 단편을 각각 PstI 및 BamHI으로 처리하고 라이게이션하여 pSP72-TK-L-TK-R(IHD-W)을 제작하였다.
- [107] 제작된 pSP72-TK-L-TK-R(IHD-W) 플라스미드 및 하기 실시예 2.1.2.에서 제작한 WR TK(i) 셔틀 플라스미드인 pSP72-TK-L-EGFP-pSE/L-p7.5-TK-R(WR)를 각각 EcoRI 및 NotI으로 처리하고 라이게이션하여 pSP72-TK-L-TF-EGFP-pSE/L-p7.5-Gpt-TK-R(IHD-W)(이하 "IHD-W TK 셔틀 플라스미드")을 최종 제작하였다.

[108] [표5]

이름	서열(5'→3')	서열번호
TK-L 정방향(IHD-W)	GATCTGCAGCCCTCTTCAAGAACCCATTAG	서열번호 5
TK-L 역방향(IHD-W)	TAGGGATCCTAGGCGGCCGCATGACAATAAA GAATTAATTATTGTTCACTT	서열번호 6
TK-R 정방향(IHD-W)	CATGAATTCTATTATATTTTTTATCTAAAAAAC TAAAAATAAACAT	서열번호 7
TK-R 역방향(IHD-W)	AGATCTATCGCTTTAGTAGTAGGAAATGTTTT ATTG	서열번호 8

[109] 실시예 1.1.3. K3L 유전자가 결실된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작

[110] 먼저, IHD-W 백시니아 바이러스의 게놈 DNA에서 K3L 유전자를 중심으로, 양옆에 위치한 유전자들을 PCR한 후 pGEM-T Easy에 각각 삽입하여 pGEM-T Easy-K3L-L(IHD-W), pGEM-T Easy-K3L-R(IHD-W)을 제작하였다. 이때, 사용된 프라이머는 하기 표 6에 나타내었다.

[111] K3L 서플 플라스미드 내부의 유전자 발현 카세트를 제작하기 위하여 하기 실시예 2.1.3.에서 제작한 WR K3L(i) 서플 플라스미드를 주형으로 p7.5-DsRed 유전자 카세트를 PCR로 증폭한 후 pGEM-T Easy에 삽입하여 pGEM-T Easy-p7.5-DsRed를 제작하였다. p7.5 프로모터와 DsRed 유전자의 증폭에 사용한 프라이머 서열은 하기 표 6에 나타내었다.

[112] [표6]

이름	서열(5'→3')	서열번호
K3L-L 정방향(IHD-W)	TCGGTCGACCATATGTTTAAACGACGCATTA TCTG	서열번호 9
K3L-L 역방향(IHD-W)	TCGAAGCTTTTTTTTATACCGAACATAAAAAAT AAGGTTAATTAT	서열번호 10
K3L-R 정방향(IHD-W)	CGCAGATAAAAAATCACTTGTTAACGGGCTCG TAA	서열번호 11
K3L-R 역방향(IHD-W)	AAGCGCTAACATGGATTAGGAAGCGCTAAC ATGG	서열번호 12
p7.5-DsRed 정방향	AGGAAGCTTTCCAAACCCACCCGCTTTTTAT	서열번호 13
p7.5-DsRed 역방향	CGGATATCTTTTTATCTGCGCGGTTAAC	서열번호 14

[113] 제작된 pGEM-T Easy-p7.5-DsRed와 pSP72 플라스미드를 각각 HindIII와 EcoRV로 처리한 후 라이게이션하여 pSP72-p7.5-DsRed를 완성하였다. 또한 제작된 pSP72-p7.5-DsRed와 상기 제작한 pGEM-T Easy-K3L-R(IHD-W)을 EcoRV와 BamHI으로 처리한 후 라이게이션하여 pSP72-p7.5-DsRed-K3L-R(IHD-W)을 제작하였다. 다음으로, 제작된 pSP72-p7.5-DsRed-K3L-R(IHD-W)와 pGEM-T Easy-K3L-L(IHD-W)을 SalI과 HindIII으로 각각 처리한 후 라이게이션하여 pSP72-K3L-L-p7.5-DsRed-K3L-R(IHD-W)(이하, "IHD-W K3L 서틀 플라스미드")를 최종 제작하였다.

[114] 실시예 1.1.4. VGF 유전자가 결실된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스 제조

[115] 상기 실시예 1.1.1.에서 제작한 IHD-W VGF 서틀 플라스미드를 이용하여 다음과 같은 방법으로 VGF 유전자가 결실된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스를 생산하였다.

[116] 재조합 바이러스를 확보하기 위하여, HeLa 세포를 6-웰 플레이트에 3×10^5 세포/웰 조건 및 2% 우태아 혈청이 포함된 MEM 배지 상태로 준비한 후, 상기 IHD-W K3L 서틀 플라스미드 2 μ g을 jetPRIME을 이용하여 형질주입시키고, IHD-W 야생형 백시니아 바이러스 0.05 MOI를 동시 처리하였다. 4시간 배양 후, 세포를 5% 우태아 혈청이 포함된 MEM 배지로 교체한 후 48시간 추가 배양하였다. 최종적으로, 배지 500 μ l와 함께 감염된 세포를 회수한 다음 동결 및 해동을 3회 반복하여 세포를 용해시키고, 크루드 바이러스를 수득하였다. 상기 크루드 바이러스를 이용하여 통상적인 방법으로 플라크 분리를 반복하여 순수

분리된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스 V를 수득하였다.

- [117] 실시예 1.1.5. VGF 및 TK 유전자가 결실된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스 제조
- [118] 상기 실시예 1.1.2.에서 제작한 IHD-W TK 셔틀 플라스미드와 실시예 1.1.4.에서 제작한 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스 V를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4.와 동일한 조건 및 방법으로 VGF 및 TK 유전자가 결실된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스 VT를 수득하였다.
- [119] 실시예 1.1.6. IHD-W-VV01 바이러스 제조
- [120] 상기 실시예 1.1.3.에서 제작한 IHD-W K3L 셔틀 플라스미드와 실시예 1.1.5.에서 제작한 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스 VT를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4.와 동일한 조건 및 방법으로 VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실된 재조합 IHD-W-VV01를 수득하였으며, 유전자 구조는 도 1에 도식화하였다.
- [121] 실시예 1.2. IHD-W-VV02 바이러스 제조
- [122] 실시예 1.2.1. TK 유전자가 결실되고 sPD1-Fc 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작
- [123] TK 셔틀 플라스미드 내부의 유전자 발현 카세트를 제작하기 위하여 pE3.1(EF1a.sPD-1.Fc) 플라스미드(국립암센터 비노생식기암연구과 제공)를 주형으로 sPD1-Fc 유전자를 PCR로 증폭한 후 pGEM-T easy에 삽입하여 pGEM-T easy-sPD1-Fc를 제작하였다. 또한, pGL4.1 p7.5 luciferase 플라스미드를 주형으로 p7.5 프로모터를 PCR로 증폭한 후 pGEM-T easy에 삽입하여 pGEM-T easy-p7.5를 제작하였다. 제작된 pGEM-T easy-p7.5와 pGEM-T easy-sPD1-Fc 플라스미드를 각각 PacI과 NheI으로 처리한 후 라이게이션하여 pGEM-T easy-p7.5-sPD1-Fc를 완성하였다. p7.5 프로모터와 sPD1-Fc 유전자의 증폭에 사용한 프라이머 서열은 하기 표 7에 나타내었다. 실시예 1.1.2.에서 제작한 IHD-W TK 셔틀 플라스미드를 EcoRI 과 SalI 으로 처리 한 후, p7.5-sPD1-Fc 유전자 카세트를 Infusion cloning 방법으로 삽입하여,
pSP72-TK-L-TF-pSE/L-EGFP-TF-TF-sPD1-Fc-p7.5-TK-R(IHD-W)(이하, "IHD-W TK(sPD1-Fc) 셔틀 플라스미드")를 최종 제작하였다. Infusion cloning 과정에 사용한 프라이머 서열은 하기 표 7에 나타내었다.

[124] [표7]

이름	서열(5'→3')	서열번호
sPD1-Fc 정방향	AGTGAATTCAGTGCTAGCAGTAAGCTTATGTGGG TCCGGCAGGTAC	서열번호 15
sPD1-Fc 역방향	ACTTTAATTAATCATTTACCCGGAGTCCGGG	서열번호 16
p7.5 정방향	GAATTCATCGAGCTCTCCAAACCCACCCGCTTTTT A	서열번호 17
p7.5 역방향	ATTAATTAAATACTAGTGATGCTAGCGATGGATC CCCGTGCAATAAATTAGAATATATTTTC	서열번호 18
Infusion 정방향(sPD 1-Fc)	AAATATAATAGAATTTCGATTTGCTAGCTCCAAAC	서열번호 19
Infusion 역방향(sPD 1-Fc)	TGGGCCCTATGTCGACGGATCCCGAGAAA	서열번호 20

- [125] 실시예 1.2.2. VGF 및 K3L 유전자가 결실된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스 제조
- [126] 상기 실시예 1.1.3.에서 제작한 IHD-W K3L 서플라스미드와 실시예 1.1.4.에서 제작한 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스 V를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4.와 동일한 조건 및 방법으로 VGF 및 K3L 유전자가 결실된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스 VK를 수득하였다.
- [127] 실시예 1.2.3. IHD-W-VV02 바이러스 제조
- [128] 상기 실시예 1.2.1.에서 제작한 IHD-W TK(sPD1-Fc) 서플라스미드와 실시예 1.2.2.에서 제작한 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스 VK를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4.와 동일한 조건 및 방법으로 VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실되고 sPD1-Fc 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W-VV02를 수득하였으며, 유전자 구조는 도 2에 도식화하였다.
- [129] 실시예 1.2.4. IHD-W-VV02에서 sPD1-Fc 유전자의 삽입 및 발현 확인
- [130] 상기 실시예 1.2.3.에서 제작한 재조합 IHD-W-VV02의 gDNA를 Nucleospin prep kit(Cat# 740956250)를 이용하여 수득하고, 하기 표 8의 프라이머를 이용하여 재조합 바이러스 gDNA의 구조를 확인하였다. 각 VGF, TK, K3L 위치의 DNA 구조 결과는 도 3에 나타낸 바와 같이 대조군 대비 유전자 삽입 위치의 PCR 조각 사이즈가 변동된 것을 확인하였다.
- [131] 삽입된 sPD1-Fc 유전자가 재조합 바이러스를 매개로 감염 세포에서 발현하는

것을 확인하고자 웨스턴 블롯을 수행하였다. 먼저, HeLa 세포에 재조합 IHD-W-VV02를 0.05 MOI로 44 내지 52시간 처리하였다. 그 후 우태아 혈청이 포함되어 있지 않은 배지로 갈아주어 16 내지 20시간 배양하고, 배지와 세포를 분리하여 각각 단백질을 수득하였다. 준비된 단백질을 브래드포드(Bradford) 어세이방법으로 정량한 후, 웨스턴 블롯을 통해 단백질의 발현 여부를 확인하였다. 이때 사용한 primary antibody는 anti-mPcd1(E-18)(Santacruz, Cat# SC-10299), secondary antibody는 anti-Goat 이며, 발현 결과는 도 4에 나타내었다.

[132] [표8]

이름	서열(5'→3')	서열번호
VGF 정방향	AGGTTCCGTAAGCAAAGAATATAAG	서열번호 21
VGF 역방향	AGGTAAGTAGATTTTACTTTAATATGCCG AA	서열번호 22
TK 정방향	GGAAGGGTCAAACCTAATAAAGGAT	서열번호 23
TK 역방향	ACCGTGTCGCTGTAACCTACTA	서열번호 24
K3L 정방향	GACGCTGAACACGTTAACGATAGT	서열번호 25
K3L 역방향	ACTGCGACGAGATACAACCGGA	서열번호 26

[133] 실시예 1.3. IHD-W-VV03 바이러스 제조

[134] 실시예 1.3.1. TK 유전자가 결실되고 PH20 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작

[135] pGL4.1-pHyb 플라스미드로부터 하기 표 9에 나타난 프라이머를 이용하여 pHyb 프로모터 DNA를 합성한 후, infusion cloning 방법으로 pGEM-T easy 벡터에 삽입하여 pGEM-T easy-pHyb를 제작하였다. 제작한 pGEM-T Easy-pHyb에 PH20 유전자를 삽입하기 위해 A549 세포의 gDNA로부터 PCR 과정을 통해 PH20 Exon2, Exon3, Exon4를 각각 합성하였다. 이때 사용된 프라이머는 하기 표 9에 나타내었다.

[136] 먼저 PH20-Exon2를 삽입하기 위해 pGEM-T easy-pHyb 플라스미드를 SpeI으로 처리하였다. PCR 과정을 통해 PH20-Exon2를 합성한 후, 선형화된 pGEM-T easy-pHyb에 infusion cloning 방법으로 삽입하여 pGEM-T easy-pHyb-PH20-Exon2 플라스미드를 제작하였다. 제작한 pGEM-T Easy-pHyb-PH20-Exon2 플라스미드를 SacI으로 처리하고, PCR 과정을 통해 PH20-Exon3, PH20-Exon4를 합성한 후 infusion cloning 방법으로 삽입하여, pGEM-T easy-pHyb-PH20을 제작하였다. 실시예 1.1.2.에서 제작한 IHD-W TK 서플 플라스미드를 EcoRI 과 SalI으로 처리 한 후, pHyb-PH20 유전자 카세트를 Infusion cloning 방법으로 삽입하여, pSP72-TK-L-TF-pSE/L-EGFP-TF-pHyb-PH20-TF-TK-R(IHD-W)(이하, "IHD-W TK(PH20) 서플 플라스미드")를 최종 제작하였다. Infusion cloning

과정에 사용한 프라이머 서열은 하기 표 9에 나타내었다.

[137] [표9]

이름	서열(5'→3')	서열번호
pHyb 프로모터 정방향	TGTCGACCTAGCACGCGTGTTTAAACGTT	서열번호 27
pHyb 프로모터 역방향	CAACAGTACCGGATTGCCAA	서열번호 28
Exon2 정방향	ACTGTTGAATACTAGATGGGAGTGCTAAAATTCAA GCAC	서열번호 29
Exon2 역방향	CCGCGAATTCCTAGAGCTCTTGAGAAAGGAATTT CAAAACTTGAT	서열번호 30
Exon3 정방향	AATTCCTTTCTCAAGATGAACTTGTGTATACATTG GC	서열번호 31
Exon3 역방향	GAGCAAGCAAGATTTTCATACTTCGCATTATACTGA GGGTT	서열번호 32
Exon4 정방향	AAATCTTGCTTGCTCCTAGACAATT	서열번호 33
Exon4 역방향	ATCCAACGCGTTGGGATCCGCATAAAAATGCATA AAAATTTATAGTGTGGAGGGTGAAGCATTG	서열번호 34
Infusion 정방향(PH 20)	TGGGCCCTATGTCGACCTAGCACGCGTGTTTAAA	서열번호 35
Infusion 역방향(PH 20)	AAATATAATAGAATTCGCTAGCGTTGGGATCCGCA TAA	서열번호 36

[138] 실시예 1.3.2. IHD-W-VV03 바이러스 제조

[139] 상기 실시예 1.3.1.에서 제작한 IHD-W TK(PH20) 서플라스미드와 실시예 1.2.2.에서 제작한 제조합 IHD-W 백시니아 바이러스 VK를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4.와 동일한 조건 및 방법으로 VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실되고 PH20 유전자의 발현이 유도된 제조합 IHD-W-VV03를 수득하였고, 유전자 구조는 도 5에 도식화 하였다.

[140] 실시예 1.3.3. IHD-W-VV03에서 PH20 유전자의 삽입 및 발현 확인

[141] 상기 실시예 1.3.2.에서 제작한 제조합 IHD-W-VV03의 gDNA를 Nucleospin prep

kit(Cat# 740956250)를 이용하여 수득하고, 하기 표 10의 프라이머를 이용하여 재조합 바이러스 gDNA의 구조를 확인하였다. 각 VGF, TK, K3L 위치의 DNA 구조 결과는 도 6에 나타낸 바와 같이 대조군 대비 유전자 삽입 위치의 PCR 조각 사이즈가 변동된 것을 확인하였다.

- [142] 삽입된 PH20 유전자가 재조합 바이러스를 매개로 감염 세포에서 발현하는 것을 확인하고자 웨스턴 블롯을 수행하였다. 먼저, HeLa 세포에 재조합 IHD-W-VV03를 0.05 MOI로 44 내지 52시간 처리하였다. 그 후 우태아 혈청이 포함되어 있지 않은 배지로 갈아주어 16 내지 20시간 배양하고, 배지와 세포를 분리하여 각각 단백질을 수득하였다. 준비된 단백질을 브래드포드(Bradford) 어세이방법으로 정량한 후, 웨스턴 블롯을 통해 단백질의 발현 여부를 확인하였다. 이때 사용한 primary antibody는 anti-hPH20(LsBio, Cat# LS-C331909), secondary antibody는 anti-Rabbit이며, 발현 결과는 도 7에 나타내었다.

- [143] [표10]

이름	서열(5'→3')	서열번호
VGF 정방향	AGGTTCCGTAAGCAAAGAATATAAG	서열번호 37
VGF 역방향	AGGTAAGTAGATTTTACTTTAATATGCCG AA	서열번호 38
TK 정방향	GGAAGGGTCAAACCTTAATAAAGGAT	서열번호 39
TK 역방향	ACCGTGTCTGCTGTAACCTTACTA	서열번호 40
K3L 정방향	GACGCTGAACACGTTAACGATAGT	서열번호 41
K3L 역방향	ACTGCGACGAGATACAACCGGA	서열번호 42

- [144] 실시예 1.4. IHD-W-VV04 바이러스 제조

- [145] 실시예 1.4.1. K3L 유전자가 결실되고 IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작

- [146] pGL4.1-pIIL-B19R 플라스미드를 DNA 주형으로 하기 표 11의 프라이머로 증폭하여 pIIL-B19R 프로모터 DNA를 합성한 후, Infusion cloning 방법으로 삽입하여 pGEM-T Easy-pIIL-B19R 플라스미드를 제작하였다. 상기 플라스미드에 단일 펩타이드의 IL-12 유전자를 삽입하기 위해, pVAX1-IL-12 플라스미드를 DNA 주형으로 IL-12 p40과 p35 서브유닛 유전자를 하기 표 11의 프라이머로 증폭하였다. 이때, p40의 역방향 프라이머 5' 말단과 p35의 정방향 프라이머 3' 말단에 링커를 구성하는 서열을 삽입하였다. 상기에서 증폭한 IL-12 유전자를 XhoI으로 선형화시킨 pGEM-T Easy-pIIL-B19R 플라스미드에 infusion cloning 방법으로 삽입하여 pGEM-T Easy-pIIL-B19R-IL-12 플라스미드를 제작하였다. 상기 제작한 pGEM-T Easy-pIIL-B19R-IL-12 플라스미드와 상기 실시예 1.1.3.에서 제작한 IHD-W K3L 서플 플라스미드에 각각 NotI으로 처리한

후 라이게이션하여 pSP72-K3L-L-p7.5-DsRed-pI1L-B19R-IL-12-TF-TF-K3L-R 플라스미드를 제작하였다.

- [147] DH1 gDNA로부터 하기 표 11의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하고 수득한 gusA 표시유전자를 pGEM-T easy에 삽입하여 pGEM-T easy-gusA를 제작하였다. 상기 플라스미드를 주형으로 하기 표 11의 primer를 이용하여 gusA 단편을 수득하고, 상기 제작한 pSP72-K3L-L-p7.5-DsRed-pI1L-B19R-IL-12-TF-TF-K3L-R 플라스미드를 BamHI과 SacII으로 처리한 후 infusion cloning으로 pSP72-K3L-L-p7.5-gusA-TF-pI1L-B19R-IL-12-TF-TF-K3L-R(이하, "IHD-W K3L(IL-12) 셔틀 플라스미드")를 최종 제작하였다. 상기 과정에서 사용한 프라이머 서열은 하기 표 11에 나타내었다.

[148] [표11]

이름	서열(5'→3')	서열번호
pI1L-B19R 프로모터 정방향	ACTGTCGACTTTGTATTTAAAAGTTGTTTGG TGAACCTT	서열번호 43
pI1L-B19R 프로모터 역방향	GTATCTCGAGTAGGCCTTTATACGGCACTA AAATATTTATATAATATC	서열번호 44
Infusion 정방향(IL-12 P40)	TAAAGGCCTACTCGACATGTGTCCTCAGAA GCTAACCATC	서열번호 45
Infusion 역방향(IL-12 P40)	CGACCCACCACCGCCCGAGCCACCGCCACC GGATCGGACCCTGCAGGGA	서열번호 46
Infusion 정방향(IL-12 P35)	GGCGGTGGTGGGTTCGGGTGGCGGCGGATCT AGGGTCATTCCAGTCTCTGGAC	서열번호 47
Infusion 역방향(IL-12 P35)	GTGATTGTATCTCGAGTAGTCGACCTATAA AAACCTATAAAAACTCAGGCGGAGCTCAG ATAGC	서열번호 48
PCR 정방향(gusA)	ATCTGCAGAAGCTTCAATACTCGAGATGTT ACGTCCTGTAGAAACCC	서열번호 49
PCR 역방향(gusA)	CGTTCTAGAGTTAATTAATCATTGTTTGCCT CCCTGCTG	서열번호 50
Infusion 정방향(gusA)	TATTGCACGGGGATCAGCTCGAGATGTTAC GTCCT	서열번호 51
Infusion 역방향(gusA)	AGTAATCGAATTCCAgaaaaatTCATTGTTTG CCTCC	서열번호 52

[149] 실시예 1.4.2. IHD-W-VV04 바이러스 제조

[150] 상기 실시예 1.4.1.에서 제작한 IHD-W K3L(IL-12) 서플라스미드와 실시예 1.1.5.에서 제작한 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스 VT를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4.와 동일한 조건 및 방법으로 VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실되고 IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W-VV04를 수득하였고, 유전자 구조는 도 8에 나타내었다.

[151] 실시예 1.4.3. IHD-W-VV04에서 IL-12 유전자의 삽입 및 발현 확인

[152] 상기 실시예 1.4.2.에서 제작한 재조합 IHD-W-VV04의 gDNA를 Maxwell purification kit(Cat# AS1330)를 이용하여 수득하고, 하기 표 12의 프라이머를

이용하여 재조합 바이러스 gDNA의 구조를 확인하였다. 각 VGF, TK, K3L 위치의 DNA 구조 결과는 도 9에 나타난 바와 같이 대조군 대비 유전자 삽입 위치의 PCR 조각 사이즈가 변동된 것을 확인하였다.

- [153] 삽입된 IL-12 유전자가 재조합 바이러스를 매개로 감염 세포에서 발현하는 것을 확인하고자 웨스턴 블롯을 수행하였다. 먼저, HeLa 세포에 재조합 IHD-W-VV04를 0.05 MOI로 44 내지 52시간 처리하였다. 그 후 우태아 혈청이 포함되어지 않은 배지로 갈아주어 16 내지 20시간 배양하고, 배지와 세포를 분리하여 각각 단백질을 수득하였다. 준비된 단백질을 브래드포드(Bradford) 어세이방법으로 정량한 후, 웨스턴 블롯을 통해 단백질의 발현 여부를 확인하였다. 이때 사용한 primary antibody는 anti-mIL-12/IL-23 p40(R&D systems, Cat# MAB4991), secondary antibody는 anti-Rat이며, 발현 결과는 도 10에 나타내었다.

- [154] [표12]

이름	서열(5'→3')	서열번호
VGF 정방향	AGGTTCCGTAAGCAAAGAATATAAG	서열번호 53
VGF 역방향	AGGTAAGTAGATTTTACTTTAATATGCCG AA	서열번호 54
TK 정방향	GGAAGGGTCAAACCTTAATAAAGGAT	서열번호 55
TK 역방향	ACCGTGTCTGCTGTAACCTTACTA	서열번호 56
K3L 정방향	CGAATAGCCAAACGGCGAGAAG	서열번호 57
K3L 역방향	ACGGATACATGTGGAGCATCTATTA	서열번호 58

- [155] 실시예 1.5. IHD-W-VV05 바이러스 제조

- [156] 실시예 1.5.1. TK 유전자가 결실되고 sPD1-Fc 및 PH20 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작

- [157] 실시예 1.1.2.에서 제작한 IHD-W TK 서틀 플라스미드와 pGEM-T Easy-p7.5-sPD1-Fc 플라스미드를 NheI과 SalI으로 처리한 후 라이게이션하여 pSP72-TK-L-TF-TF-sPD1-Fc-p7.5-TK-R(IHD-W) 플라스미드를 제작하였다. 상기 플라스미드와 pGEM-T Easy-pHyb-PH20 플라스미드를 SalI과 BamHI으로 처리하고 라이게이션하여 pSP72-TK-L-TF-pHyb-PH20-TF-TF-sPD1-Fc-p7.5-TK-R(IHD-W)을 제작하였다. 상기 플라스미드에 표지유전자 EGFP를 삽입하기 위하여, IHD-W TK 서틀 플라스미드를 주형으로 PCR 과정을 통해 pSE/L-EGFP 유전자를 합성하였다. 이때 사용한 프라이머는 하기 표 13에 나타내었다. pSP72 TK-L-TF-pHyb-PH20-TF-TF-sPD1-Fc-p7.5-TK-R(IHD-W) 서틀 플라스미드를 PacI으로 처리하고, 상기 합성된 pSE/L-EGFP 유전자를 Infusion cloning 방법으로

삽입하여

pSP72-TK-L-TF-pSE/L-EGFP-TF-pHyb-PH20-TF-TF-sPD1-Fc-p7.5-TK-R(IHD-W)(이하, "IHD-W TK(sPD1-Fc+PH20) 셔틀 플라스미드")를 제작하였다.

[158] [표13]

이름	서열(5'→3')	서열번호
pSE/L-E GFP 정방향	CAGATAAAAATTAATTAATAAAATTGAAATTTTATT TTTTTTTTTTTGGGAATATAA	서열번호 59
pSE/L-E GFP 역방향	AGAGCTCAGATTAATATCGATTACTTGTACAGCTC GTCCATG	서열번호 60

[159] 실시예 1.5.2. IHD-W-VV05 바이러스 제조

[160] 상기 실시예 1.5.1.에서 제작한 IHD-W TK(sPD1-Fc+PH20) 셔틀 플라스미드와 실시예 1.2.2.에서 제작한 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스 VK를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4.와 동일한 조건 및 방법으로 VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실되고 sPD1-Fc 및 PH20 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W-VV05를 획득하였고, 유전자 구조는 도 11에 나타내었다.

[161] 실시예 1.5.3. 재조합 IHD-W 백시니아 IHD-W-VV05에서 sPD1-Fc 및 PH20 유전자의 삽입 및 발현 확인

[162] 상기 실시예 1.5.2.에서 제작한 재조합 IHD-W-VV05의 gDNA를 Nucleospin prep kit(Cat# 740956250)를 이용하여 획득하고, 하기 표 14의 프라이머를 이용하여 재조합 바이러스 gDNA의 구조를 확인하였다. 각 VGF, TK, K3L 위치의 DNA 구조 결과는 도 12에 나타낸 바와 같이 대조군 대비 유전자 삽입 위치의 PCR 조각 사이즈가 변동된 것을 확인하였다.

[163] 삽입된 sPD1-Fc 및 PH20 유전자가 재조합 바이러스를 매개로 감염 세포에서 발현하는 것을 확인하고자 웨스턴 블롯을 수행하였다. 먼저, HeLa 세포에 재조합 IHD-W-VV05를 0.05 MOI로 44 내지 52시간 처리하였다. 그 후 우태아 혈청이 포함되지 않은 배지로 갈아주어 16 내지 20시간 배양하고, 배지와 세포를 분리하여 각각 단백질을 획득하였다. 준비된 단백질을 브래드포드(Bradford) 어세이방법으로 정량한 후, 웨스턴 블롯을 통해 단백질의 발현 여부를 확인하였다. 이때 사용한 sPD1-Fc 유전자의 primary antibody는 anti-mPdcd1(E-18)(Santacruz, Cat# SC-10299), secondary antibody는 anti-Goat이고, PH20 유전자의 primary antibody는 anti-hPH20(LsBio, Cat# LS-C331909), secondary antibody는 anti-Rabbit이며, 발현 결과는 도 13에 나타내었다.

[164] [표14]

이름	서열(5'→3')	서열번호
VGF 정방향	AGGTTCCGTAAGCAAAGAATATAAG	서열번호 61
VGF 역방향	AGGTAACTAGATTTTACTTTAATATGCCG AA	서열번호 62
TK 정방향	GGAAGGGTCAAACCTTAATAAAGGAT	서열번호 63
TK 역방향	ACCGTGTCGCTGTAACCTACTA	서열번호 64
K3L 정방향	GACGCTGAACACGTTAACGATAGT	서열번호 65
K3L 역방향	ACTGCGACGAGATACAACCGGA	서열번호 66

[165] 실시예 1.6. IHD-W-VV06 바이러스 제조

[166] 실시예 1.6.1. VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실되고 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W 백시니아 바이러스 제조

[167] 상기 실시예 1.4.1.에서 제작한 IHD-W K3L(IL-12) 서틀 플라스미드와 실시예 1.5.2.에서 제작한 IHD-W-VV05를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4.와 동일한 조건 및 방법으로 VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실되고 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W-VV06을 수득하였고, 유전자 구조는 도 14에 나타내었다.

[168] 실시예 1.6.2. IHD-W-VV06에서 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자의 삽입 및 발현 확인

[169] 상기 실시예 1.6.1.에서 제작한 재조합 IHD-W-VV06의 gDNA를 Maxwell purification kit(Cat# AS1330)를 이용하여 수득하고, 하기 표 15의 프라이머를 이용하여 재조합 바이러스 gDNA의 구조를 확인하였다. 각 VGF, TK, K3L 위치의 DNA 구조 결과는 도 15에 나타낸 바와 같이 대조군 대비 유전자 삽입 위치의 PCR 조각 사이즈가 변동된 것을 확인하였다.

[170] 삽입된 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자가 재조합 바이러스를 매개로 감염 세포에서 발현하는 것을 확인하고자 웨스턴 블롯을 수행하였다. 먼저, HeLa 세포에 재조합 IHD-W-VV06을 0.05 MOI로 44 내지 52시간 처리하였다. 그 후 우태아 혈청이 포함되지 않은 배지로 갈아주어 16 내지 20시간 배양하고, 배지와 세포를 분리하여 각각 단백질을 수득하였다. 준비된 단백질을 브래드포드(Bradford) 어레이방법으로 정량한 후, 웨스턴 블롯을 통해 단백질의 발현 여부를 확인하였다. 이때 사용한 sPD1-Fc 유전자의 primary antibody는 anti-mPdcd1(E-18)(Santacruz, Cat# SC-10299), secondary antibody는 anti-Goat이고, PH20 유전자의 primary antibody는 anti-hPH20(LsBio, Cat# LS-C331909), secondary antibody는 anti-Rabbit이고, IL-12 유전자의 primary antibody는 anti-mIL-12/IL-23 p40(R&D systems, Cat# MAB4991), secondary antibody는

anti-Rat이며, 발현 결과는 도 16에 나타내었다.

[171] [표15]

이름	서열(5'→3')	서열번호
VGF 정방향	AGGTTCCGTAAGCAAAGAATATAAG	서열번호 67
VGF 역방향	AGGTAACTAGATTTTACTTTAATATGCCG AA	서열번호 68
TK 정방향	GGAAGGGTCAAACCTTAATAAAGGAT	서열번호 69
TK 역방향	ACCGTGTCGCTGTAACCTACTA	서열번호 70
K3L 정방향	CGAATAGCCAAACGGCGAGAAG	서열번호 71
K3L 역방향	ACGGATACATGTGGAGCATCTATTA	서열번호 72

[172] 실시예 2. 재조합 WR 백시니아 바이러스 제조

[173] 실시예 2.1. WR-VV01 바이러스 제조

[174] 실시예 2.1.1. VGF 유전자 발현이 비활성화된 재조합 WR 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작

[175] WR 백시니아 바이러스(ATCC, Cat No. VR-1354) 의 게놈 DNA에서 VGF 유전자를 중심으로 양옆에 위치한 유전자들을 PCR로 증폭한 후, 각각 pGEM-T Easy에 삽입하여 pGEM-T Easy-VGF-L(WR), pGEM-T Easy-VGF-R(WR)을 제작하였다. VGF 유전자 양옆의 상동한 염기 서열의 증폭에 사용한 프라이머 정보는 하기 표 16에 나타내었다.

[176] [표16]

이름	서열(5'→3')	서열번호
VGF-L 정방향(WR)	CGCAGCTGTGTTATCGATTGATAGTGGTGTC CT	서열번호 73
VGF-L 역방향(WR)	CTGCAGCGCTAGCACCGCATAATCTGATAGC TGGAATA	서열번호 74
VGF-R 정방향(WR)	CGGGATCCGTTAATTAACTCGACGAACTAA ACTACCTATAC	서열번호 75
VGF-R 역방향(WR)	CGATATCGGAAAATGTCTGTAGTAAATAAC CATC	서열번호 76
p11 프로모터 정방향	CGGCTAGCTCTAGAAGCGATGCTACGCTAG	서열번호 77
p11 프로모터 역방향	CAAGCTTCGGTTGCCTCGAGGAATTCATTTA TAGCATAGAA	서열번호 78
LacZ 정방향	CGCTCGAGGGATCCCGTCGTTTTACAACGTC	서열번호 79
LacZ 역방향	AAGCTTCTTAATTAAGGATCCCCCCTGCCCG GTTATTATTATTTTGGACACCAGACCAACT	서열번호 80

[177] VGF 유전자 위치에 재조합이 일어난 바이러스를 선별하기 위한 표지자로 p11 프로모터에 의해 발현이 조절되는 LacZ를 이용하였다. WR gDNA내의 p11 프로모터 부위를 PCR로 증폭하고 pAAV-LacZ(Stratagene, Cat No. 240071-52)내의 LacZ 유전자를 PCR로 증폭한 후 각각 pGEM-T Easy 및 pGEM-T에 삽입하여 pGEM-T Easy-p11 및 pGEM-T-LacZ를 각각 제작하였다. p11 프로모터와 LacZ의 증폭에 사용한 프라이머 정보는 표 19에 나타내었다.

[178] VGF 유전자의 기능이 일부 결실된 서틀 플라스미드를 제작하기 위하여 pGEM-T Easy-VGF-L(WR)에 PvuII와 PstI을 처리하고, pSP72(Promega, Cat No. P2191)에 PvuII와 PstI을 처리한 벡터와 라이게이션하여 pSP72-VGF-L(WR)을 제작하였다. 또한 pGEM-T Easy-VGF-R(WR)을 EcoRV와 BamHI으로 처리하고, 위에서 제작한 pSP72-VGF-L(WR)을 EcoRV와 BamHI으로 처리한 벡터와 라이게이션함으로써 pSP72-VGF-L-VGF-R(WR)을 확보하였다. LacZ 발현 카세트를 도입하기 위하여 pGEM-T Easy-p11은 SalI과 NheI로 처리하고, pSP72-VGF-L-VGF-R(WR)을 SalI과 NheI으로 처리한 벡터와 라이게이션하여 pSP72-VGF-L-p11-VGF-R(WR)을 제작하였다. 제작된 pSP72-VGF-L-p11-VGF-R(WR)을 EcoRI과 PacI으로 처리한 후 앞서 제작한 pGEM-T-LacZ를 EcoRI과 PacI으로 자르고 라이게이션하여 VGF 서틀

플라스미드인 pSP72-VGF-L-p11-LacZ-VGF-R(WR)(이하 “WR VGF(i) 셔틀 플라스미드”)을 완성하였다.

- [179] 실시예 2.1.2. TK 유전자 발현이 비활성화된 재조합 WR 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작
- [180] WR 백시니아 바이러스의 게놈 DNA에서 TK 유전자를 중심으로 양옆에 위치한 유전자들을 확보하기 위하여, WR의 gDNA를 PCR로 증폭한 후 TK 유전자의 왼쪽과 오른쪽에 상동한 염기 서열 조각을 각각 pGEM-T Easy에 삽입하여 pGEM-T Easy-TK-L(WR), pGEM-T Easy-TK-R(WR)을 제작하였다. TK 유전자의 양쪽과 상동한 염기 서열의 증폭에 사용한 프라이머 정보는 하기 표 17에 나타내었다.

[181] [표17]

이름	서열(5'→3')	서열번호
TK-L 정방향(WR)	AGGTCGACTTGCGATCAATAAATGGAT CACAAAC	서열번호 81
TK-L 역방향(WR)	TTAGCTGCAGTATGCGGCCGCAACAAT GTCTGGAAAGAACTGTCC	서열번호 82
TK-R 정방향(WR)	CGGAATTCTGTGAGCGTATGGCAA	서열번호 83
TK-R 역방향(WR)	TCGGGATCCTCAGTCTCATGTTCTCACC GG	서열번호 84
p7.5 프로모터 정방향	AGGAAGCTTTCCAAACCCACCCGCTTTT TAT	서열번호 85
p7.5 프로모터 역방향	GAATTCGCACTAGTTCCGATCGCCGTGC AATAAATTAGAATATACCC	서열번호 86
EGFP 정방향	CGCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGG	서열번호 87
EGFP 역방향	TGAGATCTTTACTTGTACAGCTCGTCCA TG	서열번호 88
Gpt 정방향	CGACTAGTACACAAGACAGGCTTGCGA G	서열번호 89
Gpt 역방향	CGGAATTCGGCCCACTCATAAATCCAG TT	서열번호 90
pSE/L 프로모터 정방향	CGAGCTGCAGATAAAAATTAATTAATT ACCCGGGTACCAGGCCTAGATCTGTCTG ACTCGAGCTTATTTATATTCCAAAAAAA AAAAATAAAATTTCAATTTTAAAGCTTC GGGATCCGCAA	서열번호 91
pSE/L 프로모터 역방향	TTGCGGATCCCGAAGCTTAAAAATTGA AATTTTATTTTTTTTTTTTGGGAATATAAA TAAGCTCGAGTCGACAGATCTAGGCCT GGTACCCGGGTAATTAATTAATTTTAT CTGCAGCTCG	서열번호 92
TF 정방향	ATCGGCGGCCGCTTTTATCTGCGCGGT TAACCGCCTTTTATCCATCAGGTGATC TGTTTTTATTGTGGAGCTGCAGCGAT	서열번호 93

TF 역방향	ATCGCTGCAGCTCCACAATAAAAACAG ATCACCTGATGGATAAAAAGGCGGTTA ACCGCGCAGATAAAAAGCGGCCGCGCA T	서열번호 94
--------	--	---------

- [182] TK 유전자 위치에 재조합이 일어난 바이러스를 선별하기 위한 표지자로 pSE/L 프로모터에 의해 발현이 조절되는 EGFP와 p7.5 프로모터에 의해 발현이 조절되는 Gpt를 이용하였다. WR gDNA를 주형으로 PCR 하여 p7.5 프로모터 부위를 증폭하였고, pEGFP-N3(Clontech, Cat No. 6080-1)내의 EGFP 유전자와 DH5α(Takara, Cat No. 9057)내의 Gpt 유전자 또한 PCR로 증폭한 후 각각을 pGEM-T Easy에 삽입하여 pGEM-T Easy-p7.5, pGEM-T Easy-EGFP 및 pGEM-T Easy-Gpt를 각각 제작하였다. 또한 프라이머 어닐링을 통해 pSE/L 프로모터 및 TF를 제작하였다. 실험에 사용한 프라이머 서열은 상기 표 17에 나타내었다.
- [183] pGEM-T Easy-p7.5와 어닐링한 pSE/L 프로모터를 각각 BamHI와 PstI으로 처리하고 라이게이션하여 pGEM-T Easy-pSE/L-p7.5를 제작하였다. 제작된 pGEM-T Easy-pSE/L-p7.5와 pGEM-T Easy-EGFP를 각각 BglII와 XhoI으로 처리한 후 라이게이션하여 pGEM-T Easy-EGFP-pSE/L-p7.5를 제작하였다.
- [184] TK 유전자의 기능이 일부 결실된 서틀 플라스미드를 제작하기 위하여 pSP72를 EcoRI과 BglII로 처리하고, pGEM-T Easy-TK-R(WR)은 EcoRI과 BamHI으로 처리한 후 라이게이션하여 pSP72-TK-R(WR)을 제작하였다. 제작된 pSP72-TK-R(WR)을 XhoI과 PstI으로 처리하고, SalI과 PstI으로 처리한 pGEM-T Easy-TK-L과 라이게이션하여 pSP72-TK-L-TK-R(WR)을 제작하였다. EGFP 발현 카세트의 도입을 위하여, 제작된 pSP72-TK-L-TK-R(WR)과 pGEM-T Easy-EGFP-pSE/L-p7.5를 각각 EcoRI와 PstI으로 처리하고 라이게이션하여 pSP72-TK-L-EGFP-pSE/L-p7.5-TK-R(WR)을 제작하였다.
- [185] 또한, 제작된 pSP72-TK-L-EGFP-pSE/L-p7.5-TK-R(WR)과 어닐링한 TF 올리고머를 각각 PstI과 NotI으로 처리하고 라이게이션하여 pSP72-TK-L-TF-EGFP-pSE/L-p7.5-TK-R(WR)을 제작하였다. Gpt 발현 카세트를 도입하기 위하여, 제작된 pSP72-TK-L-TF-EGFP-pSE/L-p7.5-TK-R(WR)과 pGEM-T Easy-Gpt를 각각 EcoRI과 SpeI으로 처리한 후 라이게이션하여 TK 서틀 플라스미드인 pSP72-TK-L-TF-EGFP-pSE/L-p7.5-Gpt-TK-R(WR)을(이하 “WR TK(i) 서틀 플라스미드”) 최종 제작하였다.
- [186] 실시예 2.1.3. K3L 유전자 발현이 비활성화된 재조합 WR 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작
- [187] WR 백시니아 바이러스의 게놈 DNA에서 K3L 유전자를 중심으로 왼쪽에 위치한 유전자와 K3L 유전자 일부를 PCR로 증폭하였다. 이때 K3L 유전자의 시작 코돈은 K3L-L 서열 바로뒤에 두어 증폭하였으며, K3L 유전자 왼쪽의 상동한 염기서열 증폭에 사용된 프라이머는 하기 표 18에 나타내었다. 이때, K3L

유전자의 시작 코돈을 제외한 이후 부분을 포함하여 증폭한 K3L-L-K3Li(WR) 단편을 수득한 후 pGEM-T Easy 벡터와 라이게이션하여 pGEM-T Easy-K3L-L-K3Li(WR)를 제작하였다.

[188] [표18]

이름	서열(5'→3')	서열번호
K3L-Li 정방향	TGTACGTATATTTAGATGTTTTTCAGCT	서열번호 95
K3L-Li 역방향	ATAAGCTTCTTGCATTTTGTATTTCGT	서열번호 96
K3L-Ri 정방향	CGCAGATAAAAACATATCCTTGTTAAC	서열번호 97
K3L-Ri 역방향	GTTAACAAGGATATGTTTTTATCTGCG	서열번호 98

- [189] 실시예 1.1.3.에서 제작한 IHD-W K3L 서틀 플라스미드와 pGEM-T Easy-K3L-L-K3Li(WR)을 SnaBI 과 HindIII로 처리하고, 라이게이션을 통해 pSP72-K3L-L-K3Li-p7.5-DsRed-TF-K3L-R(WR)을 제작하였다. 제작된 pSP72-K3L-L-K3Li-p7.5-DsRed-TF-K3L-R(WR)에 K3L의 시작 코돈을 도입하기 위해 상기 표 18에 나타난 프라이머를 이용하여 point mutation을 수행하였으며, 최종적으로 pSP72-K3L-L-K3Li-p7.5-DsRed-TF-K3L_{ATG}-K3L-R(WR)(이하 “WR K3L(i) 서틀 플라스미드”)을 제작하였다.
- [190] 실시예 2.1.4. VGF 및 TK 유전자의 발현이 비활성화된 재조합 WR 백시니아 바이러스 제조
- [191] 먼저, WR VGF(i) 서틀 플라스미드와 WR 야생형 바이러스를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4과 동일한 조건 및 방법으로 VGF 유전자의 발현이 비활성화된 재조합 WR 백시니아 바이러스 Vi를 수득하였다. 그 후, WR TK(i) 서틀 플라스미드 및 재조합 WR 백시니아 바이러스 Vi를 이용한 것을 제외하고는, 상기와 동일한 방법으로 VGF 및 TK 유전자의 발현이 비활성화된 재조합 WR 백시니아 바이러스 ViTi를 수득하였다.
- [192] 실시예 2.1.5. WR-VV01 바이러스 제조
- [193] 먼저, WR K3L(i) 서틀 플라스미드와 재조합 WR 백시니아 바이러스 ViTi를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4과 동일한 조건 및 방법으로 VGF, TK, 및 K3L 유전자의 발현이 비활성화된 재조합 WR 백시니아 바이러스 WR-VV01를 수득하였으며, 유전자 구조는 도 17에 도식화하였다.
- [194] 실시예 2.2. WR-VV06 바이러스 제조
- [195] 실시예 2.2.1. TK 유전자 발현이 비활성화되고 sPD1-Fc 및 PH20 유전자의 발현이 유도된 재조합 WR 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작
- [196] 먼저, 실시예 2.1.2.에서 제작한 WR TK(i) 서틀 플라스미드와 실시예 1.2.1.에서 제작한 IHD-W TK(sPD1-Fc) 서틀 플라스미드를 각각 BamHI과 EcoRI으로 처리한 후 라이게이션하여 pSP72-TK-L-TF-TF-EGFP-pSE/L-TF-sPD1-Fc-p7.5-TK-R(WR)(이하, “WR

- TKi(sPD1-Fc) 서플 플라스미드")를 제작하였다. 이후, 실시예 1.3.1.에서 제작한 IHD-W TK(PH20) 서플 플라스미드를 각각 BamHI과 PacI으로 처리한 후 라이게이션하여 pSP72-TK-L-TF-pSE/L-EGFP-TF-pHyb-PH20-TF-TF-sPD1-Fc-p7.5-TK-R(WR)(이하, "WR TKi(sPD1-Fc+PH20) 서플 플라스미드")를 최종 제작하였다.
- [197] 실시예 2.2.2. K3L 유전자 발현이 비활성화되고 IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 WR 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작
- [198] WR K3Li 서플 플라스미드 내부의 유전자 발현 카세트를 제작하기 위하여 실시예 2.1.3.에서 제작한 WR K3Li 서플 플라스미드와 실시예 1.4.1.에서 제작한 IHD-W K3L(IL-12) 서플 플라스미드를 SalI 처리하고 라이게이션하여 pSP72 K3L-L-p7.5-DsRed-TF-pIIL-B19R-IL-12-TF-TF_K3L-R(WR)(이하, "WR K3Li(IL-12) 서플 플라스미드")를 최종 제작하였다.
- [199] 실시예 2.2.3. WR-VV06 바이러스 제조
- [200] 먼저, 상기 실시예 2.1.3.에서 제작한 WR K3Li 서플 플라스미드와 실시예 2.1.4.에서 제작한 재조합 WR 백시니아 바이러스 Vi를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4.와 동일한 조건 및 방법으로 VGF 및 K3L 유전자 발현이 비활성화된 재조합 WR 백시니아 바이러스 ViKi를 수득하였다.
- [201] 상기 실시예 2.2.1.에서 제작한 WR TKi(sPD1-Fc+PH20) 서플 플라스미드와 재조합 WR 백시니아 바이러스 ViKi를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4.와 동일한 조건 및 방법으로 VGF, TK 및 K3L 유전자 발현이 비활성화되고 sPD1-Fc 및 PH20 유전자의 발현이 유도된 재조합 WR 백시니아 바이러스 WR-VV05를 수득하였다.
- [202] 상기 실시예 2.2.2.에서 제작한 WR K3Li(IL-12) 서플 플라스미드와 재조합 WR-VV05를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4.와 동일한 조건 및 방법으로 VGF, TK 및 K3L 유전자 발현이 비활성화되고 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 WR-VV06을 수득하였고, 유전자 구조는 도 18에 나타내었다.
- [203] 실시예 2.2.4. WR-VV06에서 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자의 삽입 및 발현 확인
- [204] 상기 실시예 2.2.2.에서 제작한 재조합 WR-VV06의 gDNA를 Maxwell purification kit(Cat# AS1330)를 이용하여 수득하고, 하기 표 19의 프라이머를 이용하여 재조합 바이러스 gDNA의 구조를 확인하였다. 각 VGF, TK, K3L 위치의 DNA 구조 결과는 도 19에 나타낸 바와 같이 대조군 대비 유전자 삽입 위치의 PCR 조각 사이즈가 변동된 것을 확인하였다.
- [205] 삽입된 sPD1-Fc 및 PH20 유전자가 재조합 바이러스를 매개로 감염 세포에서 발현하는 것을 확인하고자 웨스턴 블롯을 수행하였다. 먼저, HeLa 세포에 재조합 WR-VV06을 0.05 MOI로 44 내지 52시간 처리하였다. 그 후 우태아 혈청이 포함되지 않은 배지로 갈아주어 16 내지 20시간 배양하고, 배지와 세포를

분리하여 각각 단백질을 수득하였다. 준비된 단백질을 브래드포드(Bradford) 어세이방법으로 정량한 후, 웨스턴 블롯을 통해 단백질의 발현 여부를 확인하였다. 이때 사용한 sPD1-Fc 유전자의 primary antibody는 anti-mPdc1(E-18)(Santacruz, Cat# SC-10299), secondary antibody는 anti-Goat이고, PH20 유전자의 primary antibody는 anti-hPH20(LsBio, Cat# LS-C331909), secondary antibody는 anti-Rabbit이며, 발현 결과는 도 20a에 나타내었다.

- [206] 또한 삽입된 IL-12 유전자가 재조합 바이러스를 매개로 감염 세포에서 발현하는 것을 확인하고자 ELISA를 수행하였다. 먼저, HeLa 세포에 재조합 WR-VV06을 0.05 MOI로 처리하고 44 내지 52시간 후 배지만 분리하여 발현된 단백질을 수득하였다. 준비된 단백질을 Mouse IL-12 p70 Quantikine ELISA kit(R&D Systems, Cat# M1270)를 이용하여 단백질의 발현량을 확인하였다. 이때, 단백질 원액을 1/5,000으로 희석하여 사용하였고 측정 결과는 도 20b에 나타내었다.

- [207] [표19]

이름	서열(5'→3')	서열번호
VGF 정방향	AGGTTCCGTAAGCAAAGAATATAAG	서열번호 99
VGF 역방향	AGGTAAGTAGATTTTACTTTAATATGCCG AA	서열번호 100
TK 정방향	GGAAGGGTCAAACCTAATAAAGGAT	서열번호 101
TK 역방향	ACCGTGTCGCTGTAACCTACTA	서열번호 102
K3L 정방향	CGAATAGCCAAACGGCGAGAAG	서열번호 103
K3L 역방향	ACGGATACATGTGGAGCATCTATTA	서열번호 104

- [208] 실시예 3. 재조합 **Lister** 백시니아 바이러스 제조
- [209] 실시예 3.1. **Lister-VV01** 바이러스 제조
- [210] 실시예 3.1.1. VGF 유전자가 결실된 재조합 **Lister** 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작
- [211] 먼저, **Lister** 백시니아 바이러스(ATCC, VR-1549)의 게놈 DNA에서 VGF 유전자를 중심으로 양 옆에 위치한 유전자들을 PCR로 증폭한 후, 각각 pGEM-T easy에 삽입하여 pGEM-T Easy-VGF-L(**Lister**), pGEM-T Easy-VGF-R(**Lister**)를 제작하였다. VGF 유전자 양 옆의 상동한 염기 서열의 증폭에 사용한 프라이머 정보는 하기 표 20에 나타내었다.

- [212] pSP72 벡터와 pGEM-T Easy-VGF-L(Lister)를 각각 HindIII 및 SalI으로 처리하고 라이게이션하여 pSP72-VGF-L(Lister)을 제작하였다. 또한, 상기 pSP72-VGF-L(Lister) 및 pGEM-T Easy-VGF-R(Lister)를 각각 PacI 및 KpnI으로 처리하고 라이게이션하여 pSP72-VGF-L-VGF-R(Lister)를 제작하였다.
- [213] 제작된 pSP72-VGF-L-VGF-R(Lister) 벡터 및 실시예 1.1.1.에서 제작한 IHD-W VGF 서플라스미드를 각각 NheI 및 PacI으로 처리하고 라이게이션하여 pSP72-VGF-L-p11-LacZ-VGF-R(Lister)(이하 "Lister VGF 서플라스미드")을 최종 제작하였다.

[214] [표20]

이름	서열(5' → 3')	서열번호
VGF-L 정방향(Lister)	ATGAAGCTTTAAACTTGTCTGTATATGTAAGAT GTTT	서열번호 105
VGF-L 역방향(Lister)	ACCCGGGTTTAATTAACATGCTAGCGTGTAAT AATATAAAAATAACAATACAATATTG	서열번호 106
VGF-R 정방향(Lister)	GCTTAATTAAGGCGGCCGCTTTTTATAAATTTTT TTTATGAGTATTTTTACAAAAAT	서열번호 107
VGF-R 역방향(Lister)	TCCCGGGCATCGATAGTACAATAACTTTTATGAA AT	서열번호 108

- [215] 실시예 3.1.2. TK 유전자가 결실된 재조합 **Lister** 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작
- [216] Lister 백시니아 바이러스(ATCC, VR-1549)의 게놈 DNA에서 TK 유전자를 중심으로 양 옆에 위치한 유전자들을 PCR로 증폭한 후, 각각 pGEM-T Easy에 삽입하여 pGEM-T Easy-TK-L(Lister), pGEM-T Easy-TK-R(Lister)를 제작하였다. TK 유전자 양 옆의 상동한 염기 서열의 증폭에 사용한 프라이머 정보는 하기 표 21에 나타내었다.
- [217] pGEM-T Easy-TK-L(Lister) 벡터와 pGEM-T Easy-TK-R(Lister)를 각각 BamHI 및 XmaI으로 처리하고 라이게이션하여 pGEM-T Easy-TK-L-TK-R(Lister)을 제작하였다. 또한, pSP72 벡터와 pGEM-T Easy-TK-L-TK-R(Lister)을 각각 SpeI 및 XmaI으로 처리하고 라이게이션하여 pSP72-TK-L-TK-R(Lister)을 제작하였다.
- [218] 제작된 pSP72-TK-L-TK-R(Lister) 벡터 및 실시예 1.1.2.에서 제작한 IHD-W TK 서플라스미드를 각각 NotI 및 SalI으로 처리하고 라이게이션하여 pSP72-TK-L-TF-pSE/L-EGFP-TK-R(Lister)(이하 "Lister TK 서플라스미드")을

최종 제작하였다.

[219] [표21]

이름	서열(5' → 3')	서열번호
TK-L 정방향(Liste r)	CCCCGGGATAGGATCCATAGTCGACTTTAATTA ATGCGGCCGCATGACAATAAAGAATTAATTATT GTTCAC	서열번호 109
TK-L 역방향(Liste r)	AGACTAGTCCCTCTTCAAGAACCCATTAG	서열번호 110
TK-R 정방향(Liste r)	CCCCGGGGCTTTAGTAGTAGGAAATGTTTTATTG	서열번호 111
TK-R 역방향(Liste r)	TAAGGATCCTCTGCTAGCTATTATATTTTTATCT AAAAAACTAAAAATAAACAT	서열번호 112

[220] 실시예 3.1.3. K3L 유전자가 결실된 재조합 **Lister** 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작

[221] 상기 실시예 1.1.3.에서 제작한 IHD-W K3L 서열 플라스미드를 BglII과 EcoRV으로 처리하고, **Lister** 백시니아 바이러스의 게놈(ATCC, VR-1549) DNA에서 K3L 유전자의 오른쪽에 위치한 유전자들(R-arm)을 PCR로 증폭한 후 Infusion cloning 방법으로 삽입하여 pSP72-p7.5-DsRed-TF-TF-K3L-R(Lister)을 제작하였다.

[222] 제작된 pSP72-p7.5-DsRed-TF-TF-K3L-R(Lister)을 XhoI와 HindIII으로 처리하고, **Lister** 백시니아 바이러스의 게놈 DNA에서 K3L 유전자의 왼편에 위치한 유전자들(L-arm)을 PCR로 증폭한 후 Infusion cloning 방법으로 삽입하여 pSP72-K3L-L-p7.5-DsRed-TF-TF-K3L-R(Lister)(이하, "**Lister** K3L 서열 플라스미드")를 최종 제작하였다. Infusion cloning 과정에 사용한 프라이머 서열은 하기 표 22에 나타내었다.

[223] [표22]

이름	서열(5'→3')	서열번호
K3L-L 정방향(Lister)	CACTATAGAACTCGAGCATATGTTTAAAC GACGCATTATCTG	서열번호 113
K3L-L 역방향(Lister)	TGGGTTTGGAAAGCTTTTTTTATACCGAAC ATAAAAATAAGG	서열번호 114
K3L-R 정방향(Lister)	CGCAGATAAAAAGATATCCTTGTTAACGG GCTCGTAAATTG	서열번호 115
K3L-R 역방향(Lister)	GGAGACCGGCAGATCTTGATAATACACAT ATTTATTAGGAAGCG	서열번호 116

[224] 실시예 3.1.4. VGF 유전자가 결실된 재조합 **Lister** 백시니아 바이러스 제조[225] **Lister** 야생형 백시니아 바이러스와 상기 실시예 3.1.1.에서 제작한 **Lister** VGF 서플라스미드를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4와 동일한 조건 및 방법으로 VGF 유전자가 결실된 재조합 **Lister** 백시니아 바이러스 V를 수득하였다.[226] 실시예 3.1.5. VGF 및 TK 유전자가 결실된 재조합 **Lister** 백시니아 바이러스 제조[227] 상기 실시예 3.1.4.에서 제작한 재조합 **Lister** 백시니아 바이러스 V와 상기 실시예 3.1.2.에서 제작한 **Lister** TK 서플라스미드를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4와 동일한 조건 및 방법으로 VGF 및 TK 유전자가 결실된 재조합 **Lister** 백시니아 바이러스 VT를 수득하였다.[228] 실시예 3.1.6. **Lister-VV01** 바이러스 제조[229] 상기 실시예 3.1.5.에서 제작한 재조합 **Lister** 백시니아 바이러스 VT와 상기 실시예 3.1.3.에서 제작한 **Lister** K3L 서플라스미드를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4와 동일한 조건 및 방법으로 VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실된 재조합 **Lister-VV01**을 수득하였으며, 유전자 구조는 도 21에 도식화하였다.[230] 실시예 3.2. **Lister-VV06** 바이러스 제조[231] 실시예 3.2.1. TK 유전자가 결실되고 sPD1-Fc 및 PH20 유전자의 발현이 유도된 재조합 **Lister** 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작

[232] 실시예 3.1.2.에서 제작된 pSP72-TK-L-TK-R(Lister) 벡터 및 실시예 1.5.1에서 제작한 IHD-W TK(sPD1-Fc+PH20) 서플라스미드를 각각 NotI 및 NheI으로 처리하고 라이게이션하여

pSP72-TK-L-TF-pSE/L-EGFP-pHyb-PH20-TF-TF-sPD1-Fc-p7.5-TK-R(Lister)(이하 "Lister TK(sPD1-Fc+PH20) 서플라스미드")을 최종 제작하였다.

[233] 실시예 3.2.2. K3L 유전자가 결실되고 IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 **Lister** 백시니아 바이러스의 플라스미드 제작

- [234] Lister K3L 서플라스미드 내부의 유전자 발현 카세트를 제작하기 위하여 실시예 3.1.3.에서 제작한 Lister K3L 서플라스미드와 실시예 1.4.1.에서 제작한 IHD-W K3L(IL-12) 서플라스미드를 SalI 처리하고 라이게이션하여 pSP72 K3L-L-p7.5-DsRed-TF-p11L-B19R-IL-12-TF-TF-K3L-R(Lister)(이하, "Lister K3L(IL-12) 서플라스미드")를 최종 제작하였다.
- [235] 실시예 3.2.3. Lister-VV06 바이러스 제조
- [236] 먼저, 상기 실시예 3.1.4.에서 제작한 재조합 Lister 백시니아 바이러스 V와 상기 실시예 3.1.3.에서 제작한 Lister K3L 서플라스미드를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4와 동일한 조건 및 방법으로 VGF 및 K3L 유전자가 결실된 재조합 Lister 백시니아 바이러스 VK를 수득하였다.
- [237] 상기 실시예 3.2.1.에서 제작한 Lister TK(sPD1-Fc+PH20) 서플라스미드와 재조합 Lister 백시니아 바이러스 VK를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4.와 동일한 조건 및 방법으로 VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실되고 sPD1-Fc 및 PH20 유전자의 발현이 유도된 재조합 Lister 백시니아 바이러스 Lister-VV05를 수득하였다.
- [238] 상기 실시예 3.2.2.에서 제작한 Lister K3L(IL-12) 서플라스미드와 재조합 Lister-VV05를 이용한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1.1.4.와 동일한 조건 및 방법으로 VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실되고 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 Lister-VV06을 수득하였고, 유전자 구조는 도 22에 나타내었다.
- [239] 실시예 3.2.4. Lister-VV06에서 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자의 삽입 및 발현 확인
- [240] 상기 실시예 3.2.3.에서 제작한 재조합 Lister-VV06의 gDNA를 Maxwell viral total nucleic acid purification kit(Promega, Cat# AS1330)를 이용하여 수득하고, 하기 표 23의 프라이머를 이용하여 재조합 바이러스 Lister-VV06의 gDNA 구조를 확인하였다. 각 VGF, TK, K3L 위치의 DNA 구조 결과는 도 23에 나타낸 바와 같이 대조군 대비 유전자 삽입 위치의 PCR 조각 사이즈가 변동된 것을 확인하였다. 삽입된 sPD1-Fc 유전자가 재조합 바이러스를 매개로 감염 세포에서 발현하는 것을 확인하고자 웨스턴 블롯을 수행하였다. 먼저, HeLa 세포에 재조합 Lister-VV06을 0.05 MOI로 감염시켜 44 내지 52시간 후 우태아 혈청이 포함되어지 않은 배지로 갈아주어 16 내지 20 시간 배양한 뒤 배지와 세포를 분리하여 각각 단백질을 수득하였다.
- [241] 준비된 단백질을 브래드포드(Bradford) 어세이방법으로 정량한 후, 웨스턴 블롯을 통해 단백질의 발현 여부를 확인하였다. 이때 사용한 primary antibody는 anti-mPcd1(E-18)(SantaCruz, Cat# SC-10299), secondary antibody는 anti-Goat이었다. 또한, 삽입된 PH20 유전자가 재조합 바이러스를 매개로 감염 세포에서 발현하는 것을 확인하고자 웨스턴 블롯을 수행하였다. 이때 사용한 primary antibody는 각 anti-hPH20(LsBio, Cat# LS-C331909), secondary antibody는

anti-Rabbit이며, 발현 결과는 도 24a에 나타내었다. 또한 삽입된 IL-12 유전자가 재조합 바이러스를 매개로 감염 세포에서 발현하는 것을 확인하고자 ELISA를 수행하였다. 먼저, HeLa 세포에 재조합 Lister-VV06을 0.05 MOI로 감염시킨 후 44 내지 52시간 후에 배지만 분리하여 발현된 단백질을 수득하였다. 준비된 단백질을 Mouse IL-12 p70 Quantikine ELISA kit(R&D Systems, Cat# M1270)를 이용하여 단백질의 발현량을 확인하였다. 이때, 단백질 원액을 1/5,000으로 희석하여 사용하였고 측정 결과는 도 24b에 나타내었다.

[242] [표23]

이름	서열(5' → 3')	서열번호
VGF 정방향	AGGTTCCGTAAGCAAAGAATATAAG	서열번호 117
VGF 역방향	AGGTAAGTAGATTTTACTTTAATATGCCGAA	서열번호 118
TK 정방향	GGAAGGGTCAAACCTAATAAAGGAT	서열번호 119
TK 역방향	ACCGTGTCGCTGTAACCTACTA	서열번호 120
K3L 정방향	GACGCTGAACACGCTAACGATAGT	서열번호 121
K3L 역방향	ACTGCGACGAGATACAACCGGA	서열번호 122

[243] **II. In vivo** 에서 재조합 백시니아 바이러스의 종양 살상능 확인

[244] 실험예 1. VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실되고 sPD1-Fc 또는 PH20 또는 IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 IHD-W strain 백시니아 바이러스의 동물모델 암 억제 효능 확인

[245] 실험예 1.1. IHD-W-VV02, IHD-W-VV03 및 IHD-W-VV05 바이러스의 동물모델 암 억제 효능 확인

[246] 상기 실시예 1에서 제작한 재조합 IHD-W-VV02, IHD-W-VV03 및 IHD-W-VV05간 항종양 효과를 마우스 모델에서 비교하였다.

[247] 대장암 모델

[248] 먼저, 대장암 세포주인 CT26.WT를 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 배지에 배양하여 준비하였다. 37°C 및 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양 중이던 세포가 dish의 70-80%가 될 때 암세포 접종을 위한 준비를 하였다. 준비된 암세포를 4°C, 1,500rpm 으로 5분간 원심분리하여 상등액을 모두 제거하고, 부형제(RPMI 배지)를 첨가하여 세포를 준비하였다. 준비된 세포 1x10⁶개를

BALB/c 마우스(BALB/cAnHsd; Koatech, Korea)의 오른쪽 측면 피하에 주입하여 대장암 마우스 모델을 제작하였다. 일주일 후, 종양의 부피가 70 내지 100 mm³ 정도 성장하였을 때 제작된 마우스 모델을 각 그룹당 4마리씩 PBS, IHD-W-VV02, IHD-W-VV03 및 IHD-W-VV05 투여군으로 분리한 후 PBS(Welgene, Cat No. LB001-02) 50 ul 혹은 각 바이러스를 1x10⁷ TCID₅₀/50 ul로 종양 내 단회 투여하였다. 바이러스 투여 후 종양의 부피를 확인한 결과를 도 25에 나타내었다.

- [249] 도 25에 나타난 바와 같이 바이러스 처리 후 14일차 암세포 크기 측정 결과, IHD-W-VV02 투여군, IHD-W-VV03 투여군 및 IHD-W-VV05 투여군의 종양 부피가 PBS 투여군의 종양 부피에 비해 작은 것을 확인하였다. 바이러스 투여군간 종양 부피를 비교했을 때, IHD-W-VV05 투여군의 종양 부피가 IHD-W-VV02 투여군, IHD-W-VV03 투여군의 종양 부피에 비해 작은 것을 확인하였다.
- [250] **실험예 1.2. IHD-W-VV01 및 IHD-W-VV05 바이러스의 동물모델 암 억제 효능 확인**
- [251] 상기 실시예 1에서 제작한 제조합 IHD-W-VV01 및 IHD-W-VV05간 항종양 효과를 마우스 모델에서 비교하였다.
- [252] **피부암 모델**
- [253] 다음으로, 피부암 세포주인 B16F10을 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM 배지에 배양하여 준비하였다. 37°C 및 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양 중이던 세포가 dish의 70-80%가 될 때 암세포 접종을 위한 준비를 하였다. 준비된 암세포를 4°C, 1,500rpm 으로 5분간 원심분리하여 상등액을 모두 제거하고, 부형제(DMEM 배지)를 첨가하여 세포를 준비하였다. 준비된 세포 5x10⁵개를 C57BL/6N 마우스(C57BL/6NHsd; Koatech, Korea)의 오른쪽 측면 피하에 주입하여 피부암 마우스 모델을 제작하였다. 일주일 후, 종양의 부피가 70 내지 100 mm³ 정도 성장하였을 때 제작된 마우스 모델을 각 그룹당 6마리씩 PBS, IHD-W-VV01 및 IHD-W-VV05 투여군으로 분리한 후 PBS(Welgene, Cat No. LB001-02) 50 ul 혹은 각 바이러스를 1x10⁶ TCID₅₀/50 ul로 종양 내 단회 투여하였다. 바이러스 투여 후 종양의 부피를 확인한 결과를 도 26에 나타내었다.
- [254] 도 26에 나타난 바와 같이 바이러스 처리 후 12일차 종양 부피 측정 결과, IHD-W-VV05 투여군의 종양 부피가 IHD-W-VV01 투여군의 종양 부피 비해 작은 것을 확인하였다. PBS 투여군의 경우, 바이러스 투여 12일차 전 이미 종양 부피가 평균 2,000 mm³ 에 도달하였기에 안락사함으로써 제외되었다.
- [255] **폐암 모델**
- [256] 다음으로, 폐암 세포주인 LLC1을 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine 및 1% antibiotics-antimycotics(GIBCO, Cat No. 15240-062)로 조성된 DMEM 배지를 이용하여 37°C 및 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 세 번의 계대배양

후 마지막 계대 배양 시 세포가 배양 plate의 70-80%의 면적만큼 차지했을 때 세포를 수확하였다. 수확한 세포의 상등액을 제거하고, 부형제(DMEM)를 첨가하여 세포의 농도가 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 가 되도록 준비하였다. 준비된 세포 1×10^6 개가 포함된 세포 현탁액을 C57BL/6N 마우스(C57BL/6NHsd; Koatech, Korea)의 오른쪽 측면 피하에 주입하여 폐암 마우스 모델을 제작하였다. 일주일 후, 종양의 부피가 70 내지 100 mm³ 정도 성장하였을 때 제작된 마우스 모델을 각 그룹당 6마리씩 PBS 투여군, IHD-W-VV01 투여군과 IHD-W-VV05 투여군으로 분리하였다. 이후 PBS(Welgene, Cat No. LB001-02) 50 μl 혹은 각 바이러스를 1×10^6 TCID₅₀/50 μL 로 종양 내 단회 투여하였다. 바이러스 투여 후 종양의 부피를 확인한 결과를 도 27에 나타내었다.

[257] 도 27에 나타난 바와 같이 바이러스 처리 후 14일차 암세포 크기 측정 결과, IHD-W-VV01 투여군, IHD-W-VV05 투여군의 종양 부피가 PBS 투여군의 종양 부피에 비해 작은 것을 확인하였다. 바이러스 투여 군간 종양 부피를 비교했을 때, IHD-W-VV05 투여군의 종양 부피가 IHD-W-VV01 투여군의 종양 부피 비해 작은 것을 확인하였다.

[258] 실험예 1.3. IHD-W-VV02, IHD-W-VV03, IHD-W-VV04 및 IHD-W-VV06 바이러스의 동물모델 암 억제 효능 확인

[259] 상기 실시예 1에서 제작한 제조합 IHD-W-VV02, IHD-W-VV03, IHD-W-VV04 및 IHD-W-VV06간 항종양 효과를 마우스 모델에서 비교하였다.

[260] 대장암 모델

[261] 먼저, 대장암 세포주인 CT26.WT를 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 배지에 배양하여 준비하였다. 37°C 및 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양 중이던 세포가 dish의 70-80%가 될 때 암세포 접종을 위한 준비를 하였다. 준비된 암세포를 4°C, 1,500rpm 으로 5분간 원심분리하여 상등액을 모두 제거하고, 부형제(RPMI 배지)를 첨가하여 세포를 준비하였다. 준비된 세포 1×10^6 개를 BALB/c 마우스(BALB/cAnHsd; Koatech, Korea)의 오른쪽 측면 피하에 주입하여 대장암 마우스 모델을 제작하였다. 일주일 후, 종양의 부피가 70 내지 100 mm³ 정도 성장하였을 때 제작된 마우스 모델을 각 그룹당 4마리씩 PBS, IHD-W-VV02, IHD-W-VV03, IHD-W-VV04 및 IHD-W-VV06 투여군으로 분리한 후 PBS(Welgene, Cat No. LB001-02) 50 μl 혹은 각 바이러스를 1×10^7 TCID₅₀/50 μl 로 종양 내 단회 투여하였다. 바이러스 투여 후 종양의 부피를 확인한 결과를 도 28에 나타내었다.

[262] 도 28에 나타난 바와 같이 바이러스 처리 후 14일차 종양 부피 측정 결과, IHD-W-VV02 투여군, IHD-W-VV03 투여군, IHD-W-VV04 투여군 및 IHD-W-VV06 투여군의 종양 부피가 PBS 투여군의 종양 부피에 비해 작은 것을 확인하였다. 바이러스 투여 군간 종양 부피를 비교했을 때, IHD-W-VV06 투여군의 종양 부피가 IHD-W-VV02 투여군, IHD-W-VV03 투여군 및 IHD-W-VV04 투여군의 종양 부피 비해 작은 것을 확인하였다.

[263] 폐암 모델

[264] 다음으로, 폐암 세포주인 LLC1을 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine 및 1% antibiotics-antimycotics(GIBCO, Cat No. 15240-062)로 조성된 DMEM 배지를 이용하여 37°C 및 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 세 번의 계대배양 후 마지막 계대 배양 시 세포가 배양 plate의 70-80%의 면적만큼 차지했을 때 세포를 수확하였다. 수확한 세포의 상등액을 제거하고, 부형제(DMEM)를 첨가하여 세포의 농도가 1x10⁷/mL가 되도록 준비하였다. 준비된 세포 1x10⁶개가 포함된 세포 현탁액을 C57BL/6N 마우스(C57BL/6NHsd; Koatech, Korea)의 오른쪽 측면 피하에 주입하여 폐암 마우스 모델을 제작하였다. 일주일 후, 종양의 부피가 70 내지 100 mm³ 정도 성장하였을 때 제작된 마우스 모델을 각 그룹당 6마리씩 IHD-W-VV02 투여군, IHD-W-VV03 투여군, IHD-W-VV04 투여군 및 IHD-W-VV06 투여군으로 분리하였다. 이후 PBS(Welgene, Cat No. LB001-02) 50 ul 혹은 각 바이러스를 1x10⁶ TCID₅₀/50 uL로 종양 내 단회 투여하였다. 바이러스 투여 후 종양의 부피를 확인한 결과를 도 29에 나타내었다.

[265] 도 29에 나타난 바와 같이 바이러스 처리 후 14일차 암세포 크기 측정 결과, IHD-W-VV02 투여군, IHD-W-VV03 투여군, IHD-W-VV04 투여군 및 IHD-W-VV06 투여군의 종양 부피가 PBS 투여군의 종양 부피에 비해 작은 것을 확인하였다. 바이러스 투여 군간 종양 부피를 비교했을 때, IHD-W-VV06 투여군의 종양 부피가 IHD-W-VV02 투여군, IHD-W-VV03 투여군 및 IHD-W-VV04 투여군의 종양 부피 비해 작은 것을 확인하였다.

[266] **실험예 1.4. IHD-W-VV05 및 IHD-W-VV06 바이러스의 동물모델 암 억제 효능 확인**

[267] 상기 실시예 1에서 제작한 제조합 IHD-W-VV05 및 IHD-W-VV06의 항종양 효과를 마우스 모델에서 비교하였다.

[268] 대장암 모델

[269] 먼저, 대장암 세포주인 CT26.WT를 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 배지에 배양하여 준비하였다. 37°C 및 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양 중이던 세포가 dish의 70-80%가 될 때 암세포 접종을 위한 준비를 하였다. 준비된 암세포를 4°C, 1,500rpm 으로 5분간 원심분리하여 상등액을 모두 제거하고, 부형제(RPMI 배지)를 첨가하여 세포를 준비하였다. 준비된 세포 1x10⁶개를 BALB/c 마우스(BALB/cAnHsd; Koatech, Korea)의 오른쪽 측면 피하에 주입하여 대장암 마우스 모델을 제작하였다. 일주일 후, 종양의 부피가 70 내지 100 mm³ 정도 성장하였을 때 제작된 마우스 모델을 각 그룹당 4마리씩 PBS, IHD-W-VV05 및 IHD-W-VV06 투여군으로 분리한 후 PBS(Welgene, Cat No. LB001-02) 50 ul 혹은 각 바이러스를 1x10⁷ TCID₅₀/50 ul로 종양 내 단회 투여하였다. 바이러스 투여 후 종양의 부피를 확인한 결과를 도 30에 나타내었다.

[270] 도 30에 나타난 바와 같이 바이러스 처리 후 14일차 종양 부피 측정 결과,

IHD-W-VV05 투여군 및 IHD-W-VV06 투여군의 종양 부피가 PBS 투여군의 종양 부피에 비해 작은 것을 확인하였다. 바이러스 투여 군간 종양 부피를 비교했을 때, IHD-W-VV06 투여군의 종양 부피가 IHD-W-VV05 투여군의 종양 부피 비해 작은 것을 확인하였다.

[271] 피부암 모델

[272] 다음으로, 피부암 세포주인 B16F10을 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM 배지에 배양하여 준비하였다. 37°C 및 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양 중이던 세포가 dish의 70-80%가 될 때 암세포 접종을 위한 준비를 하였다. 준비된 암세포를 4°C, 1,500rpm 으로 5분간 원심분리하여 상등액을 모두 제거하고, 부형제(DMEM 배지)를 첨가하여 세포를 준비하였다. 준비된 세포 5x10⁵개를 C57BL/6N 마우스(C57BL/6NHsd; Koatech, Korea)의 오른쪽 측면 피하에 주입하여 피부암 마우스 모델을 제작하였다. 일주일 후, 종양의 부피가 70 내지 100 mm³ 정도 성장하였을 때 제작된 마우스 모델을 각 그룹당 6마리씩 PBS, IHD-W-VV05 및 IHD-W-VV06 투여군으로 분리한 후 PBS(Welgene, Cat No. LB001-02) 50 ul 혹은 각 바이러스를 1x10⁶ TCID₅₀/50 ul로 종양 내 단회 투여하였다. 바이러스 투여 후 종양의 부피를 확인한 결과를 도 31에 나타내었다.

[273] 도 31에 나타난 바와 같이 바이러스 처리 후 12일차 종양 부피 측정 결과, IHD-W-VV06 투여군의 종양 부피가 IHD-W-VV05 투여군의 종양 부피 비해 작은 것을 확인하였다. PBS 투여군의 경우, 바이러스 투여 12일차 전 이미 종양 부피가 평균 2,000 mm³ 에 도달하였기에 안락사함으로써 제외되었다.

[274] 폐암 모델

[275] 다음으로, 폐암 세포주인 LLC1을 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine 및 1% antibiotics-antimycotics(GIBCO, Cat No. 15240-062)로 조성된 DMEM 배지를 이용하여 37°C 및 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 세 번의 계대배양 후 마지막 계대 배양 시 세포가 배양 plate의 70-80%의 면적만큼 차지했을 때 세포를 수확하였다. 수확한 세포의 상등액을 제거하고, 부형제(DMEM)를 첨가하여 세포의 농도가 1x10⁷/mL가 되도록 준비하였다. 준비된 세포 1x10⁶개가 포함된 세포 현탁액을 C57BL/6N 마우스(C57BL/6NHsd; Koatech, Korea)의 오른쪽 측면 피하에 주입하여 폐암 마우스 모델을 제작하였다. 일주일 후, 종양의 부피가 70 내지 100 mm³ 정도 성장하였을 때 제작된 마우스 모델을 각 그룹당 6마리씩 PBS, IHD-W-VV05 및 IHD-W-VV06 투여군으로 분리하였다. 이후 PBS(Welgene, Cat No. LB001-02) 50 ul 혹은 각 바이러스를 1x10⁶ TCID₅₀/50 ul로 종양 내 단회 투여하였다. 바이러스 투여 후 종양의 부피를 확인한 결과를 도 32에 나타내었다.

[276] 도 32에 나타난 바와 같이 바이러스 처리 후 14일차 암세포 크기 측정 결과, IHD-W-VV05 투여군 및 IHD-W-VV06 투여군의 종양 부피가 PBS 투여군의 종양 부피에 비해 작은 것을 확인하였다. 바이러스 투여 군간 종양 부피를 비교했을

때, IHD-W-VV06 투여군의 종양 부피가 IHD-W-VV05 투여군의 종양 부피 비해 작은 것을 확인하였다.

- [277] 실험예 2. VGF, TK 및 K3L 유전자가 결실 또는 발현이 비활성화 되고 sPD1-Fc 또는 PH20 또는 IL-12 유전자의 발현이 유도된 다양한 재조합 백시니아 바이러스의 동물모델 암 억제 효능 확인
- [278] 실험예 2.1. IHD-W-VV01 및 IHD-W-VV06 바이러스의 동물모델 암 억제 효능 확인
- [279] 상기 실시예 1에서 제작한 재조합 IHD-W-VV01 및 IHD-W-VV06의 항종양 효과를 마우스 모델에서 비교하였다
- [280] 피부암 모델
- [281] 다음으로, 피부암 세포주인 B16F10을 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM 배지에 배양하여 준비하였다. 37°C 및 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양 중이던 세포가 dish의 70-80%가 될 때 암세포 집종을 위한 준비를 하였다. 준비된 암세포를 4°C, 1,500rpm 으로 5분간 원심분리하여 상등액을 모두 제거하고, 부형제(DMEM 배지)를 첨가하여 세포를 준비하였다. 준비된 세포 5x10⁵개를 C57BL/6N 마우스(C57BL/6NHsd; Koatech, Korea)의 오른쪽 측면 피하에 주입하여 피부암 마우스 모델을 제작하였다. 일주일 후, 종양의 부피가 70 내지 100 mm³ 정도 성장하였을 때 제작된 마우스 모델을 각 그룹당 4마리씩 PBS, IHD-W-VV01 및 IHD-W-VV06 투여군으로 분리한 후 PBS(Welgene, Cat No. LB001-02) 50 ul 혹은 각 바이러스를 1x10⁶ TCID₅₀/50 ul로 종양 내 단회 투여하였다. 바이러스 투여 후 종양의 부피를 확인한 결과를 도 33에 나타내었다.
- [282] 도 33에 나타난 바와 같이 바이러스 처리 후 14일차 종양 부피 측정 결과, IHD-W-VV01 투여군의 종양 부피가 IHD-W-VV06 투여군의 종양 부피 비해 작은 것을 확인하였다. PBS 투여군의 경우, 바이러스 투여 12일차 전 이미 종양 부피가 평균 2,000 mm³ 에 도달하였기에 안락사함으로써 제외되었다.
- [283] 폐암 모델
- [284] 다음으로, 폐암 세포주인 LLC1을 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine 및 1% antibiotics-antimycotics(GIBCO, Cat No. 15240-062)로 조성된 DMEM 배지를 이용하여 37°C 및 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 세 번의 계대배양 후 마지막 계대 배양 시 세포가 배양 plate의 70-80%의 면적만큼 차지했을 때 세포를 수확하였다. 수확한 세포의 상등액을 제거하고, 부형제(DMEM)를 첨가하여 세포의 농도가 1x10⁷/mL가 되도록 준비하였다. 준비된 세포 1x10⁶개가 포함된 세포 현탁액을 C57BL/6N 마우스(C57BL/6NHsd; Koatech, Korea)의 오른쪽 측면 피하에 주입하여 폐암 마우스 모델을 제작하였다. 일주일 후, 종양의 부피가 70 내지 100 mm³ 정도 성장하였을 때 제작된 마우스 모델을 각 그룹당 6마리씩 PBS, IHD-W-VV01 및 IHD-W-VV06 투여군으로 분리하였다. 이후 PBS(Welgene, Cat No. LB001-02) 50 ul 혹은 각 바이러스를 1x10⁶ TCID₅₀/50

μL로 종양 내 단회 투여하였다. 바이러스 투여 후 종양의 부피를 확인한 결과를 도 34에 나타내었다.

- [285] 도 34에 나타난 바와 같이 바이러스 처리 후 14일차 암세포 크기 측정 결과, IHD-W-VV01 투여군 및 IHD-W-VV06 투여군의 종양 부피가 PBS 투여군의 종양 부피에 비해 작은 것을 확인하였다. 바이러스 투여 군간 종양 부피를 비교했을 때, IHD-W-VV06 투여군의 종양 부피가 IHD-W-VV01 투여군의 종양 부피 비해 작은 것을 확인하였다.

- [286] **실험예 2.2. WR-VV01 및 WR-VV06 바이러스의 동물모델 암 억제 효능 확인**

- [287] 상기 실시예 2에서 제작한 재조합 WR-VV01 및 WR-VV06의 항종양 효과를 마우스 모델에서 비교하였다.

- [288] **폐암 모델**

- [289] 먼저, 폐암 세포주인 LLC1을 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine 및 1% antibiotics-antimycotics(GIBCO, Cat No. 15240-062)로 조성된 DMEM 배지를 이용하여 37°C 및 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 세 번의 계대배양 후 마지막 계대 배양 시 세포가 배양 plate의 70-80%의 면적만큼 차지했을 때 세포를 수확하였다. 수확한 세포의 상등액을 제거하고, 부형제(DMEM)를 첨가하여 세포의 농도가 1x10⁷/mL가 되도록 준비하였다. 준비된 세포 1x10⁶개가 포함된 세포 현탁액을 C57BL/6N 마우스(C57BL/6NHsd; Koatech, Korea)의 오른쪽 측면 피하에 주입하여 폐암 마우스 모델을 제작하였다. 일주일 후, 종양의 부피가 70 내지 100 mm³ 정도 성장하였을 때 제작된 마우스 모델을 각 그룹당 6마리씩 PBS, WR-VV01 및 WR-VV06 투여군으로 분리하였다. 이후 PBS(Welgene, Cat No. LB001-02) 50 μl 혹은 각 바이러스를 1x10⁶ TCID₅₀/50 μL로 종양 내 단회 투여하였다. 바이러스 투여 후 종양의 부피를 확인한 결과를 도 35에 나타내었다.

- [290] 도 35에 나타난 바와 같이 바이러스 처리 후 14일차 암세포 크기 측정 결과, WR-VV01 투여군 및 WR-VV06 투여군의 종양 부피가 PBS 투여군의 종양 부피에 비해 작은 것을 확인하였다. 바이러스 투여 군간 종양 부피를 비교했을 때, WR-VV06 투여군의 종양 부피가 WR-VV01 투여군의 종양 부피 비해 작은 것을 확인하였다.

- [291] **실험예 2.3. Lister-VV01 및 Lister-VV06 바이러스의 동물모델 암 억제 효능 확인**

- [292] 상기 실시예 3에서 제작한 재조합 Lister-VV01 및 Lister-VV06의 항종양 효과를 마우스 모델에서 비교하였다.

- [293] **폐암 모델**

- [294] 먼저, 폐암 세포주인 LLC1을 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine 및 1% antibiotics-antimycotics(GIBCO, Cat No. 15240-062)로 조성된 DMEM 배지를 이용하여 37°C 및 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 세 번의 계대배양 후 마지막 계대 배양 시 세포가 배양 plate의 70-80%의 면적만큼 차지했을 때

세포를 수확하였다. 수확한 세포의 상등액을 제거하고, 부형제(DMEM)를 첨가하여 세포의 농도가 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 가 되도록 준비하였다. 준비된 세포 1×10^6 개가 포함된 세포 현탁액을 C57BL/6N 마우스(C57BL/6NHsd; Koatech, Korea)의 오른쪽 측면 피하에 주입하여 폐암 마우스 모델을 제작하였다. 일주일 후, 종양의 부피가 70 내지 100 mm³ 정도 성장하였을 때 제작된 마우스 모델을 각 그룹당 6마리씩 PBS, Lister-VV01 및 Lister-VV06 투여군으로 분리하였다. 이후 PBS(Welgene, Cat No. LB001-02) 50 μL 혹은 각 바이러스를 1×10^6 TCID₅₀/50 μL 로 종양 내 단회 투여하였다. 바이러스 투여 후 종양의 부피를 확인한 결과를 도 36에 나타내었다.

- [295] 도 36에 나타난 바와 같이 바이러스 처리 후 14일차 암세포 크기 측정 결과, Lister-VV06 투여군의 종양 부피가 PBS 투여군의 종양 부피에 비해 작은 것을 확인하였다. 바이러스 투여 군간 종양 부피를 비교했을 때, Lister-VV06 투여군의 종양 부피가 Lister-VV01 투여군의 종양 부피 비해 작은 것을 확인하였다.
- [296] **III. VGF, TK 및 K3L 유전자의 발현이 비활성화되거나 결실되고 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 백시니아 바이러스의 in vitro 세포 살상능 확인**
- [297] **실험예 1. IHD-W-VV06, WR-VV06, Lister-VV06 투여에 따른 암세포 살상 효능 확인**
- [298] 상기 실시예 1에서 생산한 재조합 백시니아 바이러스 IHD-W-VV06, 실시예 2에서 생산한 재조합 백시니아 바이러스 WR-VV06, 실시예 3에서 생산한 재조합 백시니아 바이러스 Lister-VV06이 다양한 종류의 암세포를 대상으로 살상능을 나타내는지 확인하기 위하여 CCK-8 분석을 수행하였다.
- [299] 다양한 쥐(mouse) 암세포주에서 재조합 바이러스의 세포 살상능을 확인하기 위하여 하기 표 24에 나타난 바와 같이 암 세포주를 준비하고, 37°C 및 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양한 후, 이를 96-웰 플레이트에 분주하였다.

[300] [표24]

암종	세포주	사용 배지(배양 배지: 우태아 혈청 10% 포함)
대장암	CT26-WT	2% 우태아 혈청과 2 mM 엘-글루타민이 포함된 RPMI 배지
신장암	Renca	2% 우태아 혈청과 2 mM 엘-글루타민이 포함된 RPMI 배지
간암	Hep-55.1C	2% 우태아 혈청과 4 mM 엘-글루타민이 포함된 DMEM 배지
폐암	LLC1	2% 우태아 혈청과 2 mM 엘-글루타민이 포함된 DMEM 배지
유방암	JC	2% 우태아 혈청과 2 mM 엘-글루타민이 포함된 RPMI 배지
유방암	4T1	2% 우태아 혈청과 2 mM 엘-글루타민이 포함된 RPMI 배지
직장암	CMT93	2% 우태아 혈청과 4 mM 엘-글루타민이 포함된 DMEM 배지
흑색종	B16F10	2% 우태아 혈청과 4 mM 엘-글루타민이 포함된 DMEM 배지

[301] 이때, 웰당 세포수는 CT26-WT, Hep-55.1C는 2×10^4 개, Renca, LLC1, 4T1, CMT93 및 B16F10은 1×10^4 개, JC는 2×10^3 개가 되도록 분주하였다. 배양 24시간 후, 각 재조합 바이러스의 야생형 바이러스가 갖는 세포 살상능을 고려하여 다음과 같이 재조합 백시니아 바이러스 IHD-W-VV06 를 1 MOI, WR-VV06 를 1 MOI, Lister-VV06 를 10 MOI가 되도록 상기 세포주에 감염시켰다. 이때, 각 대조군으로는 바이러스를 처리하지 않은 세포를 사용하였다. 3일 후, CCK-8(Dojindo, Cat No. CK04) 용액으로 세포를 염색하여 암세포주 생존율을 확인한 결과를 도 37에 나타내었다

[302] 도 37에 나타낸 바와 같이, 백시니아 종(strain)에 관계 없이 VGF, TK 및 K3L 유전자의 발현이 비활성화되거나 결실되고 sPD1-Fc, PH20 및 IL-12 유전자의 발현이 유도된 재조합 백시니아 바이러스가 다양한 종류의 암세포에 대한 살상능이 있음을 확인하였다.

청구범위

- [청구항 1] sPD-1(soluble programmed cell death protein-1)을 코딩하는 유전자, 히알루로니다아제(hyaluronidase)를 코딩하는 유전자, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 재조합 백시니아 바이러스.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 sPD-1은 서열번호 131 또는 서열번호 133의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 재조합 백시니아 바이러스.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 sPD-1을 코딩하는 유전자는 서열번호 132 또는 서열번호 134의 염기 서열을 포함하는 것인, 재조합 백시니아 바이러스.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 히알루로니다아제는 서열번호 135의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 재조합 백시니아 바이러스.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 히알루로니다아제를 코딩하는 유전자는 서열번호 136의 염기서열을 포함하는 것인, 재조합 백시니아 바이러스.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 백시니아 바이러스는 IL(interleukin)-12를 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는, 재조합 백시니아 바이러스.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 IL-12는 서열번호 137의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 재조합 백시니아 바이러스.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 IL-12를 코딩하는 유전자는 서열번호 138 내지 서열번호 140 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 것인, 재조합 백시니아 바이러스.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 백시니아 바이러스는 K3L를 코딩하는 유전자, TK(thymidine kinase)를 코딩하는 유전자, VGF(vaccinia growth factor)를 코딩하는 유전자 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 발현이 억제된 것인, 재조합 백시니아 바이러스.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 백시니아 바이러스는 웨스턴 리저브(Western Reserve, WR), NYVAC(New York Vaccinia Virus), Wyeth(The New York City Board of Health), LC16m8, 리스트(Lister), 코펜하겐(Copenhagen), 티안탄(Tian Tan), USSR, 타쉬켄트(TashKent), 에반스(Evans), IHD-J(International Health Division-J), IHD-W(International Health Division-White), 이들의 변이체 및

- 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인, 재조합
백시니아 바이러스.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 백시니아 바이러스는 IHD-W인, 재조합 백시니아 바이러스.
- [청구항 12] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 재조합 백시니아 바이러스를
유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 암은 고형암 또는 혈액암인, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 고형암은 폐암, 대장암, 전립선암, 갑상선암, 유방암, 뇌암, 두경부암,
식도암, 피부암, 흉선암, 위암, 결장암, 간암, 난소암, 자궁암, 방광암,
직장암, 담낭암, 담도암, 췌장암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터
선택된 어느 하나인, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 15] 제13항에 있어서,
상기 혈액암은 림프종, 급성 백혈병, 다발성 골수종 및 이들의 조합으로
이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인, 암의 예방 또는 치료용 약학
조성물.
- [청구항 16] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 재조합 백시니아 바이러스를
유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는,
암의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 암은 고형암 또는 혈액암인, 암의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 18] 제17항에 있어서,
상기 고형암은 폐암, 대장암, 전립선암, 갑상선암, 유방암, 뇌암, 두경부암,
식도암, 피부암, 흉선암, 위암, 결장암, 간암, 난소암, 자궁암, 방광암,
직장암, 담낭암, 담도암, 췌장암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터
선택된 어느 하나인, 암의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 19] 제17항에 있어서,
상기 혈액암은 림프종, 급성 백혈병, 다발성 골수종 및 이들의 조합으로
이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인, 암의 예방 또는 치료 방법.