

명세서

발명의 명칭: 유전자 전달용 세포 시트

기술분야

- [1] 본 발명은 유전자 전달용 세포 시트에 관한 것이다.
[2]

배경기술

- [3] 암 치료제의 급속한 발전에도 불구하고, 암은 여전히 전세계적으로 사망률이 높은 질환 중의 하나이다. 기존의 임상적으로 사용되고 있는 주요 암 치료 방법은 외과적 수술, 방사선 치료, 항암제 치료 방법으로 또는 이를 병행하는 치료로서 최대한 암세포를 환자에게서 제거해 내는 방법들이다. 하지만, 이러한 치료는 비교적 초기 암으로서, 전이가 되지 않은 상태에서 암세포를 완전히 제거했을 때에만 치료 효과를 보이는 문제가 있다.
- [4] 특히, 간세포성 암종(Hepatocellular carcinoma, HCC)은 세계에서 다섯 번째로 많이 발생하는 암으로 암 관련 사망 원인 중 3 번째로 많은 것으로 알려져 있다. B형 간염 및 C형 간염 바이러스 감염과 같은 만성 간질환 및 이로 인한 간경화는 모든 간암 발생의 80-90%를 차지한다. HCC의 핵심 특성 중 하나는 종종 다병소성 종양 병변 (다발성/다핵성/간내 전이성)을 동시에 발병하며 이 다병소성 간세포는 높은 재발률, 약물 내과적 특성 및 이환율에 기여한다는 것이다. 중요하게, 장기간의 코호트 연구는 간경변과 다발성/다병소성 간세포 암종 사이의 강한 양의 상관관계를 보여주었다. 만성 바이러스 감염은 반복적인 간세포 괴사와 밀접하게 관련되어 있으며, 그 다음에 재생이 일어난다. 그러한 가속화된 세포주기는 많은 간 부위에서 종양을 발생시키는 간에서의 유전적 오류의 축적과 관련이 있을 수 있으며, 이들 환자를 다병소성 간세포 암종으로 분류할 수 있다.
- [5] HCC의 현재 표준 치료법에는 선택적 내부 방사선 요법 및 화학 요법제를 이용한 전신 요법이 포함된다. 그러나, 암 특이성이 결여된 이러한 치료 양상은 간에 대해 매우 독성이 있으며, 이것은 간 기능 장애를 나타내는 대다수의 간세포 암 환자에게 심각한 문제를 일으키므로, 종양을 박멸하기에 충분한 양의 약물을 투여하기가 어렵다. 전술한 이유들로 인하여 외과적 절제가 우선적인 치료법으로 남아 있지만, 다발성 경화증 및 간경화와 같은 다양한 이유로 간세포 암 환자의 대부분(70% 미만)은 절제가 불가능하다 [El-Serag, H.B., et al., *Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2008. **134**(6): p. 1752-63; Belghiti, J. and R. Kianmanesh, *Surgical treatment of hepatocellular carcinoma*. HPB (Oxford), 2005. **7**(1): p. 42-9; Ziser, A., et al., *Morbidity and mortality in cirrhotic patients undergoing anesthesia and surgery*. Anesthesiology, 1999. **90**(1): p. 42-53].

- [6] 치유적 절제술을 시행한다고 하더라도 환자의 높은 재발률은 간세포 암 치료에 중요한 과제로 남아 있다.
- [7] 다양한 임상 시험에서 강력하고 암 특이적인 세포 살상 효능을 입증한 종양 살상 요법은 소분자 화학 요법과 관련된 표적 세포 독성을 극복하기 위한 유망한 후보자가 될 수 있다.
- [8] 여러 가지 종양 살상 벡터 중에서 아데노바이러스(Ad)는 삽입 돌연변이 유발 위험이 없으며, 고 역가에서의 용이한 생산 및 높은 전이 유전자 발현 수준과 같은 몇 가지 유익한 특성을 가지고 있어 암 유전자 치료에 유리하다. 유망한 전임상 결과에도 불구하고, 임상 시험에서 최적의 항종양 효능을 이끌어 내기 위해서는 부적절한 전달 및 불충분한 수준의 치료 유전자 전달 또는 바이러스 복제와 같은 몇 가지 장애물을 극복해야 한다. 중요한 것은, 안전 문제와 전신 투여된 비리온의 효능 제한으로 인해 임상 시험에서 바람직한 투여 경로로서 제시되는 비리온의 종양 내 집중은 다병소성 종양의 경우에는 가능하지 않을 수 있음을 의미한다. 현재 종양 살상 바이러스로 여러 종양을 동시에 치료하는 효과적이고 표준화된 프로토콜이 부족하다. 전신 투여가 다른 표준 치료법으로 이러한 한계를 피할 수 있지만, 종양 살상 바이러스의 면역원성이 강하고 환자에 Ad에 대한 기존의 면역력이 높으면 이러한 접근법은 클리닉에서는 비실용적이다.
- [9] 다병소성 간세포 암종에 대한 표준 치료 요법과 종양 살상 요법의 내재적 한계를 극복하기 위해 다발성 간세포 암종에서 종양 살상 Ad의 효능을 향상시킬 유망한 후보로서 세포 시트를 연구하였다.
- [10] 전통적으로, 세포 시트는 주로 손상된 조직의 기능을 대체하거나 복원하기 위해 조직 공학에 사용되었다. 세포 시트의 주요 강점은 생체 적합성, 내구성 있는 생착 유도 능력, 합성 항체 보다 불리한 염증 반응의 위험을 낮추는 것이다. 하지만 이러한 세포 시트를 유전자 전달을 위해 사용한 연구는 보고된 바 없다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명자들은 유전자 전달 시스템의 전신 투여의 문제점을 해결하기 위하여, 국소적 유전자 전달 플랫폼으로 세포 시트를 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[13]

과제 해결 수단

- [14] 본 발명은
- [15] 둘 이상의 세포층을 포함하고,
- [16] 그 중 하나 이상의 세포층에 유전자 전달 시스템이 도입되어 있는,
- [17] 세포 시트를 제공한다.

- [18] 또한, 본 발명은
 [19] 온도감응성 폴리머를 포함하는 온도 반응성 배양접시에,
 [20] 둘 이상의 세포층을 포함하는 세포 시트를 형성하고,
 [21] 그 중 하나 이상의 세포층에 유전자 전달 시스템을 도입하고,
 [22] 온도 반응성 배양접시로부터 상기 세포 시트를 분리하는 것을
 [23] 포함하는 세포 시트의 제조 방법을 제공한다.
 [24] 또한, 본 발명은
 [25] 상기 세포 시트를 포함하는 유전자 치료제를 제공한다.
 [26] 또한, 본 발명은
 [27] 암 제거 수술 부위 또는 암 치료가 필요한 부위에 상기 세포 시트를 이식하는
 [28] 것을 포함하는 암 재발 방지 방법 또는 암 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [29] 본 발명에 따른 세포 시트는 기존의 조직 재생 용도로 사용된 세포 시트와는 달리 국소적 유전자 전달 시스템으로서 활용 가능하다. 특히, 유전자 전달 시스템으로서 바이러스를 사용할 경우, 바이러스를 세포 시트 내에서 증식시킬 수 있고, 바이러스가 치료 부위에서만 국소적으로 작용하게 되므로, 바이러스의 전신 투여 또는 종양 내 투여와 비교하여, 바이러스 투여량을 현저히 낮추더라도, 암 예방 또는 치료, 암 재발 또는 암 전이 방지, 특히 다병소성 종양 치료에 탁월하다.

[30]

도면의 간단한 설명

- [31] 도 1은 온도 반응성 배양 접시에서 분리된 oAd-DCN/CFCS의 외관(a), 헤마톡실린 및 에오신 염색에 의한 oAd-DCN/CFCS의 조직학적 분석 결과(b) 및 PBS-처리된 대조 CFCSs (c) 및 oAd-DCN/CFCSs (d)에서 Ad E1A 단백질의 면역 염색에 의한 검출을 나타낸 것이다 [스케일 바: 1cm (a) 및 2 μ m (b-d)].
- [32] 도 2는 oAd-DCN / CFCS의 바이러스 생산 및 치료 유전자 발현 프로파일을 나타낸 것이다[(a) CFCS에 감염된 oAd-DCN의 바이러스 생성. CFCSs는 0.5의 MOI로 naked oAd-DCN에 감염되었다. 감염 후 4, 12, 24, 48, 72 및 96 시간에 CFCS 및 상등액을 수확한 후 실시간 정량 PCR에 의해 바이러스 게놈 복사를 측정하였다. (b) oAd-DCN/CFCSs에서의 DCN 발현. 평균 $\pm$ SD로 나타내는 1 MOI 데이터에서 oAd-DCN으로 감염 후 48 시간에 수확한 세포 용해액 및 상등액을 사용하는 DCN의 대표적인 웨스턴블랏. * P < 0.05, ** P < 0.01].
- [33] 도 3은 간내 이식 후 생체 내 oAd-DCN/CFCSs의 바이러스 지속성에 대한 분해 프로파일 및 평가를 나타낸 것이다 [(a) 세포 시트의 분해 프로파일. CFCSs는 섬유아세포와 반딧불이 루시페라제 발현 암세포 (CFCSs/Fluc)로 만들었다. 이어서 CFCS/Fluc에 oAd-DCN을 감염시킨 후 동소 HCC 종양이 있는 누드

- 마우스의 왼쪽 간엽에 이식하였다. (b) oAd-DCN/CFCS의 이식 후 바이러스 지속성 평가. CFCS를 반딧불이 루시퍼라제 발현 oAd-DCN (oAd-DCN/Fluc/CFCSs)에 감염시킨 다음 종양 보유 마우스의 왼쪽 간엽 표면에 이식하였다. 생물발광(Bioluminescence) 이미징은 이식 후 매일 모니터링되었다].
- [34] 도 4는 다병소성 간세포 암종(HCC)의 조직학 결과를 나타낸 것이다 [PBS로 처리한 군에서 종양 세포 주사 후 21일째에 다병소성 간암 조직의 단면을 얻었으며, 헤마톡실린과 에오신으로 염색하였다. 원래 배율: $\times 40$. 흰색 점선: 종양].
- [35] 도 5는 oAd-DCN/CFCS의 강력한 항종양 효능을 나타낸 것으로,
- [36] 도 5a는 Hep3B 동소 종양 모델에서 oAd-DCN/CFCS의 항종양 효능을 나타낸 것이다[동소 간 종양은 마우스의 왼쪽 간엽에 1×10^6 개의 반딧불이 루시퍼라제를 발현하는 Hep3B 세포를 주입함으로써 확립되었다. 세포 주사 직후에 세포 주입 부위를 PBS 또는 스프레이에 의해 3×10^8 VP oAd-DCN (스프레이) 처리되거나 PBS 처리된 CFCS 또는 oAd-DCN/CFCS ($n=6$)로 이식하여 처리하였다. 또한 6 마리의 마우스에게 Hep3B 세포 주사 후 꼬리 정맥을 통해 3×10^8 VP를 전신적으로 주사하였다. 종양 성장은 처리 후 2, 5, 7, 14 및 21 일에 모니터링하였다].
- [37] 도 5b는 background subtraction 후의 각 치료군으로부터 HCC로부터의 생물 발광 신호를 나타낸 것이다[데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차로 나타내었다. * $P < 0.05$].
- [38] 도 6은 PBS, oAd-DCN 혈관 내 주사, oAd-DCN 복강 내 주사, CFCS 단독 또는 oAd-DCN/CFCS로 처리한 마우스의 종양 조직의 조직학적 분석 결과이다[처리된 다병소성 간세포 암의 단면은 PBS, oAd-DCN 혈관 내 주사, oAd-DCN 복강 내 주사, CFCS 단독 또는 oAd-DCN/CFCS로 치료 후 14일째에 얻어졌다. 원래 배율: $\times 50$, 검은 색 점선: 종양].
- [39] 도 7은 oAd-DCN/CFCS를 형성하는 과정을 도식화한 것이다.
- [40] 도 8은 종양 선택적 살상 아데노바이러스를 탑재한 세포 시트로부터 복제된 아데노바이러스의 생물학적 활성을 확인한 것이다.
- [41] 도 9는 종양 제거 수술 후, 종양 선택적 살상 아데노바이러스가 탑재된 세포 시트를 부착 후, 종양의 재발 여부를 확인한 것이다.
- [42] 도 10은 벡시니아 바이러스가 탑재된 세포 시트의 형성을 확인한 것이다.
- [43] 도 11은 벡시니아 바이러스가 탑재된 세포 시트의 벡시니아 바이러스 복제능을 확인한 것이다.
- [44] 도 12는 벡시니아 바이러스가 탑재된 세포 시트의 벡시니아 바이러스 세포 사멸을 확인한 것이다.
- [45] 도 13은 방사선을 조사한 암세포의 세포 생존능을 확인한 것이다.
- [46] 도 14는 방사선 조사된 암세포를 포함한 세포 시트에서의 아데노바이러스 복제능을 확인한 것이다.
- [47]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [48] 본 발명은
- [49] 둘 이상의 세포층을 포함하고,
- [50] 그 중 하나 이상의 세포층에 유전자 전달 시스템이 도입되어 있는,
- [51] 세포 시트를 제공한다.
- [52] 본 발명에서, 세포 시트는 국소적 유전자 전달을 위해 사용된다. 즉, 유전자 전달 시스템을 유전자 치료가 필요한 체내 부위로 국소 전달해 줄 수 있는 일종의 캐리어로서 역할을 하게 된다.
- [53] 상기 세포 시트는 제조 및 체내 이식의 과정에서 사용자의 핸들링에 적합한 기계적 물성을 갖는 것이 바람직하다.
- [54] 이를 위해, 상기 세포 시트는 세포층 중 하나로 지지체로서 작용하는 세포층을 포함한다.
- [55] 일 구체예에서, 상기 세포 시트는 지지체로서 체세포를 포함하는 세포층을 포함한다.
- [56] 체세포를 포함하는 세포층은 유전자 전달 시스템이 도입되는 세포층의 지지체 역할을 하며, 체내 환경과 유사하여 다양한 세포의 부착, 증식, 분화 및 배양을 할 수 있는 환경을 제공할 수 있다.
- [57] 이와 같은 역할을 하기에 적합한 체세포라면 어떠한 것이든 사용할 수 있으며, 특별히 그 종류가 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 체세포는 섬유아세포, 연골세포, 상피세포, 근상피세포(myoepithelial cell), 진피세포(dermal cell), 상피 케라틴세포(epithelial keratinocyte), 슈만세포(schwann cell), 신경교세포(glial cell), 골아세포(osteoblast), 심근세포(cardiomyocyte), 거대세포(megakaryocyte), 지방세포, 줄기 세포(예, 중간엽 줄기세포) 및 암세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [58] 본 발명에 있어서, 유전자 치료에 사용할 수 있는 것으로 알려진 어떠한 유전자 전달 시스템이라도 사용 가능하다.
- [59] 예를 들어, 본 발명의 유전자 전달 시스템은 (i) 내이키드 (naked) 재조합 DNA 분자, (ii) 플라스미드, (iii) 바이러스 벡터 및 (iv) 상기 내이키드 재조합 DNA 분자 또는 플라스미드를 내포하는 리포솜 또는 니오솜의 형태일 수 있다.
- [60] 통상적인 유전자 치료에 이용되는 모든 유전자 전달 시스템이 본 발명에 따른 세포 시트에 적용될 수 있으며, 바람직하게는 플라스미드, 아데노바이러스 (Lockett LJ, et al., Clin. Cancer Res. 3:2075-2080(1997)), 아데노-관련 바이러스 (Adeno-associated viruses: AAV, Lashford LS., et al., Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations Ed. A. Meager, 1999), 레트로바이러스 (Gunzburg WH, et al., Retroviral vectors. Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations Ed. A. Meager, 1999), 렌티바이러스 (Wang G. et al., J. Clin. Invest. 104(11):R55-62(1999)), 헤르페스 심플렉스 바이러스 (Chamber R., et al., Proc.

Natl. Acad. Sci USA 92:1411-1415(1995)), 백시니아 바이러스 (Puhlmann M. et al., Human Gene Therapy 10:649-657(1999)), 리포솜 (Methods in Molecular Biology, Vol 199, S.C. Basu and M. Basu (Eds.), Human Press 2002) 또는 니오솜이 사용될 수 있다.

[61] i. 아데노바이러스

[62] 아데노바이러스는 중간 정도의 지놈 크기, 조작의 편의성, 높은 타이터, 광범위한 타깃세포 및 우수한 감염성 때문에 유전자 전달 벡터로서 많이 이용되고 있다. 지놈의 양 말단은 100-200 bp의 ITR (inverted terminal repeat)를 포함하며, 이는 DNA 복제 및 패키징에 필수적인 시스 엘리먼트이다. 지놈의 E1 영역 (E1A 및 E1B)은 전사 및 숙주 세포 유전자의 전사를 조절하는 단백질을 코딩한다. E2 영역 (E2A 및 E2B)은 바이러스 DNA 복제에 관여하는 단백질을 코딩한다.

[63] 현재 개발된 아데노바이러스 벡터 중에서, E1 영역이 결여된 복제 불능 아데노바이러스가 많이 이용되고 있다. 한편, E3영역은 통상적인 아데노바이러스 벡터에서 제거되어 외래 유전자가 삽입되는 자리를 제공한다 (Thimmappaya, B. et al., Cell, 31:543-551(1982); 및 Riordan, J. R. et al., Science, 245:1066-1073(1989)). 따라서, 세포내로 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열은 결실된 E1 영역 (E1A 영역 및/또는 E1B 영역, 바람직하게는 E1B 영역) 또는 E3 영역에 삽입되는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 결실된 E1 영역에 삽입된다. 본 명세서에서 바이러스 지놈 서열과 관련하여 사용되는 용어, "결실"은 해당 서열이 완전히 결실된 것뿐만 아니라, 부분적으로 결실된 것도 포함하는 의미를 가진다.

[64] 아데노바이러스는 42개의 상이한 혈청형 및 A-F의 서브그룹을 갖는다. 이 중에서, 서브그룹 C에 속하는 아데노바이러스 타입 2 및 타입 5가 본 발명의 아데노바이러스 벡터를 얻기 위한 가장 바람직한 출발물질이다. 아데노바이러스 타입 2 및 타입 5에 대한 생화학적 및 유전적 정보는 잘 알려져 있다.

[65] 아데노바이러스에 의해 운반되는 외래 유전자는 에피솜과 동일한 방식으로 복제되며, 이에 숙주세포에 대해 유전적 독성이 매우 낮다. 따라서, 본 발명의 아데노바이러스 유전자 전달 시스템을 이용한 유전자 치료가 매우 안전한 것으로 판단된다.

[66] ii. 레트로바이러스

[67] 레트로바이러스는 자신의 유전자를 숙주의 지놈으로 삽입시키고, 대량의 외래 유전 물질을 운반할 수 있으며, 감염시킬 수 있는 세포의 스펙트럼이 넓기 때문에 유전자 전달 벡터로서 많이 이용되고 있다.

[68] 레트로바이러스 벡터를 구축하기 위하여, 세포내로 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열은 레트로바이러스의 서열 대신에 레트로바이러스 지놈에 삽입되어 복제 불능의 바이러스를 생산한다. 바이리온을 생산하기 위하여, gag,

pol 및 env 유전자를 포함하지만 LTR (long terminal repeat)와 Ψ 서열은 없는 패키징 세포주를 구축한다 (Mann et al., Cell, 33:153-159(1983)). 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열, LTR 및 Ψ 서열을 포함하는 재조합 플라스미드를 상기 세포주에 이입하면, Ψ 서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체의 생산을 가능하게 하며, 이 전사체는 바이러스로 패키징되고, 바이러스는 배지로 배출된다 (Nicolas and Rubinstein "Retroviral vectors," In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez and Denhardt (eds.), Stoneham: Butterworth, 494-513(1988)). 재조합 레트로바이러스를 함유하는 배지를 수집하고 농축하여 유전자 전달 시스템으로 이용한다.

- [69] 2세대 레트로바이러스 벡터를 이용한 유전자 전달이 발표되었다. Kasahara et al. Science, 266:1373-1376(1994))은 폴로니 뮤라인 류케미아 바이러스 (MMLV)의 변이체를 제조하였고, 여기에서 EPO (erythropoietin) 서열을 엔벨로프 부위에 삽입하여 새로운 결합 특성을 갖는 키메라 단백질을 생산하였다. 본 발명의 유전자 전달 시스템도 이와 같은 2세대 레트로바이러스 벡터의 구축 전략에 따라 제조할 수 있다.
- [70] iii. AAV 벡터
- [71] 아데노-관련 바이러스 (AAV)는 비분열 세포를 감염시킬 수 있고, 다양한 종류의 세포에 감염할 수 있는 능력을 갖고 있기 때문에 본 발명의 유전자 전달 시스템으로 적합하다. AAV 벡터의 제조 및 용도에 대한 상세한 설명은 미국 특허 제5,139,941 호 및 제 4,797,368 호에 상세하게 개시되어 있다.
- [72] 유전자 전달 시스템으로서의 AAV에 대한 연구는 LaFace et al, Virology, 162:483-486(1988), Zhou et al., Exp. Hematol. (NY), 21:928-933(1993), Walsh et al, J. Clin. Invest., 94:1440-1448(1994) 및 Flotte et al., Gene Therapy, 2:29-37(1995)에 개시되어 있다.
- [73] 전형적으로, AAV 바이러스는 두 개의 AAV 말단 리피트가 옆에 위치되어 있는 목적의 유전자 서열 (세포 내로 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열)을 포함하는 플라스미드 (McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963-1973(1988); 및 Samulski et al., J. Virol., 63:3822-3828(1989)) 및 말단 리피트가 없는 야생형 AAV 코딩 서열을 포함하는 발현 플라스미드 (McCarty et al., J. Virol., 65:2936-2945(1991))를 동시형질전환시켜 제조된다.
- [74] iv. 다른 바이러스 벡터
- [75] 다른 바이러스 벡터들도 본 발명의 유전자 전달 시스템으로 이용할 수 있다. 백시니아 바이러스 (Puhlmann M. et al., Human Gene Therapy 10:649-657(1999); Ridgeway, "Mammalian expression vectors," In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses. Rodriguez and Denhardt, eds. Stoneham: Butterworth, 467-492(1988); Baichwal and Sugden, "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," In: Kucherlapati R, ed. Gene transfer. New York: Plenum Press, 117-148(1986) 및 Coupar et al., Gene,

- 68:1-10(1988)), 렌티바이러스 (Wang G. et al., J. Clin. Invest. 104(11):R55-62(1999)) 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스 (Chamber R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:1411-1415(1995))로부터 유래된 벡터들도, 목적 뉴클레오타이드 서열을 세포내로 운반할 수 있는 운반 시스템으로 이용할 수 있다.
- [76] 이외에도, 바이러스 벡터로는 리오바이러스, 폭스바이러스, 쉼리키 포리스트 바이러스 및 미즐즈 바이러스 (Measles virus) 등이 있다.
- [77] v. 리포솜
- [78] 리포솜은 수상에 분산된 인지질에 의해 자동적으로 형성된다. 외래 DNA 분자를 리포솜으로 성공적으로 세포 내로 운반한 예는 Nicolau 및 Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190(1982) 및 Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176(1987)에 개시되어 있다. 한편, 리포솜을 이용한 동물세포의 형질전환에 가장 많이 이용되는 시약으로는 리포펙타민(Lipofectamine, Gibco BRL)이 있다. 운반하고자 하는 목적 뉴클레오타이드 서열을 내포한 리포솜은 엔도사이토시스, 세포 표면에서의 흡착 또는 플라스마 세포막과의 융합 등의 기전을 통해 세포와 상호작용하여 세포내로 목적 뉴클레오타이드 서열을 운반한다.
- [79]
- [80] 하나 이상의 세포층에 유전자 전달 시스템을 도입하는 방법은, 세포층을 이루는 세포와 상기 유전자 전달시스템을 접촉시키는 것에 의해 수행된다.
- [81] 본 발명에서, 유전자 전달 시스템이 바이러스 벡터에 기초하여 제작된 경우에는, 상기 접촉시키는 단계는 당업계에 공지된 바이러스 감염 방법에 따라 실시된다. 바이러스 벡터를 이용한 숙주 세포의 감염은 상술한 인용문헌에 기재되어 있다.
- [82] 본 발명에서 유전자 전달 시스템이 내이키드 (naked) 재조합 DNA 분자 또는 플라스미드인 경우에는, 미세 주입법 (Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479(1980); 및 Harland와 Weintraub, *J. Cell Biol.* 101:1094-1099(1985)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973); 및 Chen과 Okayama, *Mol. Cell. Biol.* 7:2745-2752(1987)), 전기 천공법 (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982); 및 Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718(1986)), 리포솜-매개 형질감염법 (Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980); Nicolau 및 Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190(1982); 및 Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176(1987)), DEAE-텍스트란 처리법 (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)) 방법에 의해 유전자를 세포내로 도입시킬 수 있다.
- [83] 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명에 따른 세포 시트는 바이러스 복제가 가능한 국부적인 전달 플랫폼으로 사용된다. 종양 살상 바이러스는 표적 종양 부위를 커버하고 종양 살상 바이러스를 사용하여 종양 제거에 유리한 특정 유전자(예,

데코린 등)를 발현시키며, 종양 살상 바이러스 및 치료 유전자의 효과적인 복제를 가능하게 한다. 또한 세포 시트가 체내에서 완전히 분해될 때까지 세포 시트와 종양 조직 모두에서 비리온의 활성 복제를 가능하게 함으로써 종양 조직에서 종양 살상 바이러스의 장기 유지를 가능하게 한다.

- [84] 이로 인해 세포 시트가 종양 내 투여된 기존 종양 살상 바이러스 보다 더 강력한 항종양 효과를 이끌어 내고 다병소성 암종 형성을 효과적으로 예방할 수 있게 된다. 또한, 종양 살상 바이러스의 세포 시트-매개 전달은 종양 부위에 국소화되므로 정상 조직으로의 비리온의 비특이적 배출을 방지한다. 세포 시트에 탑재한 종양 살상 바이러스의 투여가 종양 내 국소화를 동시에 강화하고 바이러스의 비특이적 방출을 방지함으로써 안전성 프로파일을 향상시킬 뿐만 아니라 바이러스의 치료 효능을 연장, 증폭 및 강화시킬 수 있다.
- [85] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 유전자 전달 시스템은 재조합 아데노바이러스일 수 있다.
- [86] 유전자 전달 벡터로서 재조합 아데노바이러스의 여러 가지 장점들이 부각되면서 암 유전자 치료에서 그 사용빈도는 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 특히, 유전자 치료제로 암을 치료하고자 할 경우, 장기적이고 지속적인 치료 유전자의 발현이 필요하지 않은 장점이 있다. 또한, 벡터로 사용되는 바이러스에 의해 유도되는 숙주의 면역반응이 크게 문제되지 않거나 오히려 이점으로 작용할 수 있기 때문에 재조합 아데노바이러스는 암 치료용 유전자 전달체로 각광을 받고 있다.
- [87] 상기 재조합 아데노바이러스는 복제불능 아데노바이러스 또는 종양 살상 아데노바이러스일 수 있다.
- [88] 복제불능 아데노바이러스는 아데노바이러스의 복제에 필수적인 E1 유전자(전부 또는 일부) 대신에 치료용 유전자를 삽입하여 재조합된 것으로, 아데노바이러스가 도입된 세포 내에서 복제되지 못하도록 만든 것이다.
- [89] 종양 살상 아데노바이러스는 E1B 55kDa 유전자가 부분적으로 결손된 아데노바이러스로 p53이 기능적으로 비활성화된 세포에서만 증식이 가능하다. p53의 기능이 억제되어 있는 암세포에서는 바이러스의 증식이 활발하게 일어나게 되는 반면 정상세포에서는 바이러스의 증식이 억제된다. 따라서, 종양 살상 아데노바이러스는 정상세포에는 영향을 주지 않고, 암세포만 선택적으로 사멸시킬 수 있어 암 치료에 있어 특히 유리하다.
- [90] 본 발명의 일 구체예에서, 재조합 아데노바이러스는 비활성화된 E1B 19kDa 유전자, E1B 55kDa 유전자 또는 E1B 19kDa/E1B 55kDa 유전자를 가지며, 바람직하게는 비활성화된 E1B 19kDa 및 E1B 55kDa 유전자를 갖는다.
- [91] 본 명세서에서, 유전자와 관련하여 사용되는 용어 "비활성화"는 그 유전자의 전사 및/또는 해독이 정상적으로 이루어지지 아니하여, 그 유전자에 의해 코딩되는 정상적인 단백질의 기능이 나타나지 않는 것을 의미한다. 예를 들어, 비활성화 E1B 19kDa 유전자는 그 유전자에 변이 (치환, 부가, 부분적 결실 또는

전체적 결실)가 발생되어 활성의 E1B 19 kDa 단백질을 생성하지 못하는 유전자이다. E1B 19kDa 유전자가 결여되는 경우에는 세포고사능을 증가시킬 수 있고, E1B 55kDa 유전자가 결여된 경우에는 종양세포 특이성을 갖게 한다 (참조: 대한민국 특허출원 제 2002-0023760 호).

- [92] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 활성의 E1A 유전자를 포함할 수 있다. E1A 유전자를 포함하는 재조합 아데노바이러스는 복제 가능한 특성을 갖게 된다. 본 발명의 보다 바람직한 구체예에 따르면, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 비활성화된 E1B 19kDa/E1B 55kDa 유전자 및 활성의 E1A 유전자를 포함한다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 E1B 19kDa/E1B 55kDa 유전자가 결실되고, 활성의 E1A 유전자를 포함하며, 데코린-인코딩 뉴클레오타이드 서열은 결실된 E1 영역에 삽입되어 있는 것이다.
- [93]
- [94] 본 발명의 일 구체예에서,
- [95] 유전자 전달 시스템이 도입되는 세포층은 암세포 또는 줄기세포를 포함할 수 있다.
- [96] 유전자 전달 시스템으로서 종양 살상 아데노바이러스를 사용하는 경우, 유전자 전달 시스템이 도입되는 세포층은 암세포를 포함할 수 있다. 앞서 설명한 바와 같이, 종양 살상 아데노바이러스는 암세포에서만 증식하고, 암세포를 포함하는 세포층 이외의 정상 세포에서는 이의 복제가 억제된다. 따라서, 세포 시트를 장기간 배양하더라도 지지체 역할을 하는 세포층의 사멸에 의한 기계적 물성 저하를 염려할 필요가 없다. 또한, 세포 시트의 체내 이식 후 종양 살상 아데노바이러스에 의해 암세포 자체가 사멸하므로, 암세포의 체내 잔존을 염려하지 않아도 된다.
- [97] 종양 살상 아데노바이러스가 아닌 다른 유전자 전달 시스템을 사용하더라도 암세포는 방사선 조사시켜 암세포 자체의 복제능을 상실시킬 수 있기 때문에, 유전자 전달 시스템이 도입되는 세포층으로 사용하는데 아무런 문제가 없다. 본 발명의 일 구체예에서, 상기 세포 시트는 유전자 전달 시스템이 도입되어 있는, 암세포를 포함하는 세포층을 포함하며, 상기 암세포는 방사선이 조사된 것일 수 있다.
- [98] 상기 암세포는 구체적으로 교모세포종, 후두암, 췌장암, 폐암, 비소세포성 폐암, 결장암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 난소암, 자궁암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계(central nervous system, CNS) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 간암, 기관지암, 비인두암, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진

군에서 선택된 하나 이상의 암으로부터 유래한 암세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [99] 다른 구체예에서, 유전자 전달 시스템이 도입되는 세포층은 줄기세포를 포함할 수 있다. 줄기세포는 중앙 표적능을 갖고 있기 때문에, 본 발명의 세포 시트를 암 환자에 사용할 경우 특히 유리할 수 있다. 다만, 일반적으로 줄기세포는 아테노바이러스의 감염율이 낮은 것으로 알려져 있기 때문에, 줄기세포 도입능이 개선된 재조합 아테노바이러스를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 유전자 전달 시스템이 도입되는 세포층에 줄기세포를 포함할 경우, 혈청형 35의 파이버(fiber) 노브(knob)를 포함하는 줄기세포 도입능이 개선된 재조합 아테노바이러스를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 혈청형 35의 파이버(fiber) 노브(knob)를 포함하는 재조합 아테노바이러스의 경우, 중간엽 줄기세포로의 도입 효율이 현저히 우수하고, 낮은 바이러스 농도에서도 잘 도입될 수 있는 특징을 갖는다.
- [100] 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 재조합 아테노바이러스는 비활성화된 E1B 19kDa 유전자, E1B 55kDa 유전자 또는 E1B 19kDa/E1B 55kDa 유전자를 갖으며, 바람직하게는 비활성화된 E1B 19kDa 및 E1B 55kDa 유전자를 갖는다.
- [101] 본 명세서에서, 유전자와 관련하여 사용되는 용어 "비활성화"는 그 유전자의 전사 및/또는 해독이 정상적으로 이루어지지 아니하여, 그 유전자에 의해 코딩되는 정상적인 단백질의 기능이 나타나지 않는 것을 의미한다. 예를 들어, 비활성화 E1B 19kDa 유전자는 그 유전자에 변이 (치환, 부가, 부분적 결실 또는 전체적 결실)가 발생되어 활성의 E1B 19 kDa 단백질을 생성하지 못하는 유전자이다. E1B 19kDa 유전자가 결여되는 경우에는 세포고사능을 증가시킬 수 있고, E1B 55kDa 유전자가 결여된 경우에는 중앙세포 특이성을 갖게 한다 (참조: 대한민국 특허출원 제 2002-0023760 호).
- [102] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 아테노바이러스는 활성의 E1A 유전자를 포함한다. E1A 유전자를 포함하는 재조합 아테노바이러스는 복제 가능한 특성을 갖게 된다. 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 아테노바이러스는 비활성화된 E1B 19kDa/E1B 55kDa 유전자 및 활성의 E1A 유전자를 포함한다. 본 발명의 가장 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 아테노바이러스는 E1B 19kDa/E1B 55kDa 유전자가 결실되고, 활성의 E1A 유전자를 포함하며, 테코린-인코딩 뉴클레오타이드 서열은 결실된 E1 영역에 삽입되어 있는 것이다.
- [103] 본 발명에서 이용되는 재조합 아테노바이러스는 동물세포, 바람직하게는 포유동물 세포에서 작동 가능한 프로모터를 포함한다. 본 발명에 적합한 프로모터는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, CMV (Cytomegalovirus) 프로모터, U6 프로모터 및 H1 프로모터, MLV (Murine Leukemia Virus) LTR

(Long terminal repeat) 프로모터, 아데노바이러스 초기 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터, 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터, inducible 프로모터, 암세포 특이적 프로모터 (예컨대, TERT 프로모터, modified TERT 프로모터, PSA 프로모터, PSMA 프로모터, CEA 프로모터, Survivin프로모터, E2F 프로모터, modified E2F 프로모터, AFP 프로모터, modified AFP 프로모터, E2F-AFP hybrid 프로모터, 및 E2F-TERT hybrid 프로모터) 및 조직 특이적 프로모터 (예컨대, 알부민 프로모터), 인간 포스포글리세레이트 키나아제 (PGK) 프로모터, 마우스 포스포글리세레이트 키나아제 (PGK) 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는, CMV 프로모터이다. 트랜스 유전자를 발현시키기 위한 발현 컨스트럭트에서 트랜스 유전자의 다운스트림에 폴리아데닐화 서열이 결합되어 있는 것이 바람직하다. 상기 폴리아데닐화 서열은, 소성장 호르몬 터미네이터 (Gimmi, E. R., et al., NucleicAcids Res. 17:6983-6998(1989)), SV40 유래 폴리 아데닐화 서열 (Schek, N, et al., Mol. Cell Biol. 12:5386-5393(1992)), HIV-1 polyA(Klasens, B. I. F., et al., Nucleic Acids Res. 26:1870-1876(1998)), β 글로빈 polyA(Gil, A., et al, Cell 49:399-406(1987)), HSV TK polyA (Cole, C. N. and T. P. Stacy, Mol. Cell. Biol. 5:2104-2113(1985)) 또는 폴리오마바이러스 polyA (Batt, D. B and G. G. Carmichael, Mol. Cell. Biol. 15:4783-4790(1995))를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [104] 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 선택표지로서 항생제 내성 유전자 및 리포터 유전자 (예컨대, GFP(green fluorescence protein), 루시퍼라아제 및 β 글루쿠로니다아제)를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 항생제 내성 유전자는 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 젠타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있고, 바람직하게는 네오마이신 내성 유전자이다.
- [105] 본 발명에 따른 세포 시트 내 탑재되는 바이러스 벡터(예, 재조합 아데노바이러스)는 0.1 내지 500 MOI (Multiplicity of infection)의 양으로 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 0.1 내지 200 MOI, 0.1 내지 100 MOI, 0.1 내지 50 MOI, 0.1 내지 10 MOI, 0.1 내지 5 MOI, 0.5 내지 200 MOI, 0.5 내지 100 MOI, 0.5 내지 50 MOI, 0.5 내지 10 MOI 또는 0.5 내지 5 MOI로 탑재될 수 있다. 이는 기존 종양 치료법에서 사용된 종양 살상 바이러스 양 1×10^{10} VP 내지 5×10^{10} VP 에 비해 현저히 적은 양을 사용하여도 암세포에서 증식시킬 수 있기 때문에 기존 종양 살상 바이러스를 사용한 종양 치료법에 비해 바이러스 탑재량을 현저히 낮출 수 있으며, 의사의 부담감을 현저히 줄일 수 있다.

- [106] 또한, 본 발명은
- [107] 온도감응성 폴리머를 포함하는 온도 반응성 배양접시에,
- [108] 둘 이상의 세포층을 포함하는 세포 시트를 형성하고,
- [109] 그 중 하나 이상의 세포층에 유전자 전달 시스템을 도입하고,
- [110] 온도 반응성 배양접시로부터 상기 세포 시트를 분리하는 것을
- [111] 포함하는 세포 시트의 제조 방법을 제공한다.
- [112] 상기에서 세포 시트와 관련하여 기술한 모든 내용이 세포 시트의 제조방법에 그대로 적용 또는 준용될 수 있다.
- [113] 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명에 따른 세포 시트의 제조 방법은 예를 들어, 다음과 같은 단계를 포함하여 수행될 수 있다:
- [114] 온도감응성 폴리머를 포함하는 온도 반응성 배양접시에 체세포를 배양하여 체세포를 포함하는 제1세포층을 형성시키는 단계;
- [115] 상기 제1세포층에 암세포를 배양하여 암세포를 포함하는 제2세포층을 형성시켜 세포시트를 제조하는 단계;
- [116] 상기 제2세포층에 종양 살상 바이러스를 접종시키는 단계; 및
- [117] 온도 반응성 배양접시로부터 상기 세포시트를 분리하는 단계.
- [118] 상기 예를 구체적으로 설명하면,
- [119] 먼저, 온도감응성 폴리머를 포함하는 온도 반응성 배양접시에 실리콘링을 올려놓고, 실리콘링 안쪽에 지지체 역할을 하는 체세포를 분주하여 항온장치에서 배양하여 체세포를 포함하는 제1세포층을 형성시킨다.
- [120] 상기 온도 감응형 배양접시는 표면의 하한임계온도(lower critical solution temperature, LCST) 이상에서는 세포가 부착하여 세포시트를 형성하고, 하한임계온도 이하에서는 폴리머가 팽윤하여 세포를 시트 형태로 회수할 수 있다.
- [121] 상기 온도감응성 폴리머는 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드), 폴리(N-비닐카프로락탐), 폴리카프로락톤(PCL) 및 폴리락테이트-co-글라이콜레이트(PLGA)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 온도 감응성을 지닌 폴리머라면 제한 없이 사용할 수 있다.
- [122] 다음으로, 상기 제1세포층 상에 암세포를 분주하여 항온장치에서 배양하여 암세포를 포함하는 제2세포층을 형성시켜 세포시트를 제조한다.
- [123] 특히, 상기 제2세포층에 세포 시트를 구성하는 암세포로 인한 발암 가능성을 제거하기 위해 방사선을 조사하는 단계를 추가로 포함시킬 수 있다.
- [124] 다음으로, 상기 제2세포층에 종양 살상 바이러스를 접종시켜 세포 시트에 바이러스를 탑재시킨다.
- [125] 이때, 종양 살상 바이러스를 0.1 내지 500 MOI의 양(보다 바람직하게 0.1 내지 200 MOI, 0.1 내지 100 MOI, 0.1 내지 50 MOI, 0.1 내지 10 MOI, 0.1 내지 5 MOI, 0.5 내지 200 MOI, 0.5 내지 100 MOI, 0.5 내지 50 MOI, 0.5 내지 10 MOI 또는 0.5 내지 5 MOI의 양)으로 상기 세포 시트 형성 후 12시간 내지 1일 쯤 접종시킨다.

일정 시간 간격을 두고 집중시켜야 세포가 시트를 형성할 수 있으며, 또한 세포의 개수 당 바이러스의 탑재 양 계산이 가능하다. 이러한 종양 살상 바이러스를 집중시킴으로써, 암세포는 일정 기간(집중 후 12시간 내지 7일) 후에 자연히 소멸된다. 또한, 종양 살상 바이러스가 암세포로 인해 증폭이 가능하여 적은 양을 투여함으로써 암세포 치료가 가능하다.

- [126] 마지막으로, 온도 반응성 배양접시로부터 상기 세포시트를 분리시킨다.
- [127] 상기 온도 감응형 배양접시는 표면의 하한임계온도 이하에서는 폴리머가 팽윤하므로 세포 시트가 배양접시로부터 탈착시킬 수 있다. 이때, 바이러스 집중 후 6 시간 내지 1일 쯤 세포시트를 배양접시로부터 분리시키는 것이 탑재한 바이러스의 복제에 의한 세포 시트 분해가 일어나지 않으면서 견고한 세포 시트의 형태로 떼어낼 수 있으므로 바람직하다.
- [128]
- [129] 또한, 본 발명은 본 발명의 세포 시트를 유효성분으로 포함하는, 유전자 치료제를 제공한다.
- [130] 본 발명의 용어 "유전자 치료제는 질병 치료 등을 목적으로 유전물질 또는 유전물질을 이입한 담체(carrier)를 대상체에 투여하는 세포 또는 의약품"을 의미한다. 또한, 대상체의 손상된 유전자에 정상 유전자 혹은 치료 효과를 지닌 유전자를 주입시켜 유전적 결함을 치료하거나 예방하는 목적으로 사용되는 의 pharm을 의미한다.
- [131] 유전자 치료제로서 적용될 수 있는 약학적으로 허용 가능한 담체는 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다.
- [132] 바람직하게는 본 발명의 유전자 치료제는 암 예방 또는 치료, 암 재발 또는 암 전이 방지를 위한 이용될 수 있다.
- [133] 상기 암은 다병소성 간세포 암종, 뇌교종, 교모세포종, 후두암, 췌장암, 폐암, 비소세포성 폐암, 결장암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 난소암, 자궁암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계(central nervous system, CNS) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 간암, 기관지암, 비인두암, 뇌간 신경교종 및

뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

- [134] 본 발명의 세포 시트를 암(종양) 제거된 수술 부위, 또는 암이 발생한 부위에 투여함으로써, 암을 치료하거나 암 전이 또는 재발을 방지할 수 있다. 본 발명의 세포치료제의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있으며, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [135] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 세포 시트의 투여에 의해 암(종양)을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [136] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 세포 시트의 투여에 의해 암(종양)에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [137] 본 발명에서 사용되는 용어, "전이"란 악성 종양이 발병한 장기에서 떨어진 다른 조직으로 전파한 상태를 의미한다.
- [138] 본 발명에서 사용되는 용어, "재발"이란, 종양(腫瘍)이 수술적 적출 또는 방사선조사 등에 의해서 일단 소실된 뒤에 똑같은 종양이 다시 발육되는 것. 남은 종양세포가 증식하는 것 또는 종양세포가 완전히 소실되고 새로이 종양이 발생하는 것을 의미한다.
- [139] 또한, 본 발명은 대상체의 암 제거 수술 부위에 본 발명에 따른 세포 시트를 이식하는 단계를 포함하는 암 재발 방지 방법을 포함한다.
- [140] 또한, 본 발명은 대상체의 암 치료가 필요한 부위에 본 발명에 따른 세포 시트를 이식하는 단계를 포함하는 암 치료 방법을 포함한다.
- [141] 본 발명에서 "대상체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 설치류(랫트, 마우스, 기니피그 등), 개, 고양이, 말, 소, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양 등의 포유류를 의미한다.
- [142] 본 발명에 따른 세포 시트는 이식 후에 일정 기간(6일 내지 10일) 후에 암세포층은 바이러스의 복제에 의해 파괴되므로 자연히 소멸된다.
- [143] 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 세포 시트를 표적 부위에 이식시키는 방법은 예를 들어, 다음과 같은 단계를 포함하여 수행될 수 있다:
- [144] 온도 반응성 배양 접시에서 형성한 바이러스를 감염시킨 세포 시트에 배양액을 제거하고, PBS로 세척한다. 멤브레인을 세포 시트 상에 올려 놓은 채로, 온도를 낮추어, 세포 시트를 떼어내면, 멤브레인에 세포 시트가 부착된 채로 세포 시트를 얻을 수 있다. 세포 시트가 부착된 멤브레인을 표적(병변) 부위에 올려놓고, 조심스럽게 멤브레인을 떼어내면 세포 시트는 표적 부위에 부착되고, 멤브레인을 제거함으로써 세포 시트를 표적 부위에 이식 가능하다.

[145]

발명의 실시를 위한 형태

- [146] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나

하기의 실시예에는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[147]

[148] [실시예]

[149] 실험방법

[150] 세포주 및 세포 배양

[151] 모든 세포주는 10% 소 태아 혈청 (FBS, Gibco BRL)과 페니실린-스트렙토마이신 (100IU/mL, Gibco BRL)이 첨가된 Dulbecco 's modified Eagle 's 배지 (DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY USA)에서 배양하였다.

[152] HEK293 (Ad E1 영역을 발현하는 인간 배아 신장 세포주), A549 (폐암 세포주), Hep3B (간세포 암종 세포주), U343 (교모세포종 세포주) 및 NIH3T3 (섬유아세포 세포주) 세포주는 아메리칸 타입 배양 컬렉션(ATCC, Manassas, VA)에서 구입하였다.

[153] 모든 세포주를 5% CO₂의 가습 분위기에서 37 °C로 유지시켰다.

[154]

[155] **oAd-DCN (테코린-발현 종양살상 Ad) 제작**

[156] pCA14/DCN을 Bgl II 제한효소로 잘라 DCN 발현 cassette을 얻고, 이와 BamHI 제한효소로 cutting한 pdE1sp1B(p)-HRE-mTERT-Rd19를 ligation하여 pdE1sp1B(p)-HRE-mTERT-Rd19/DCN E1 shuttle vector를 제작하였다.

[157] 상기의 벡터를 *XmnI* 제한효소를 처리하여 단일가닥으로 만들고, 아데노바이러스의 knob을 Ad35 의 것으로 치환한 벡터인 dl324-k35를 *BstBI* 제한효소 처리하여 단일가닥을 만들어, 두 벡터를 대장균 BJ5183에 동시에 형질 전환시켜 유전자 상동 재조합(homologous recombination)을 유도함으로써 DCN-발현하는 oAd 벡터(HmT-Rd19-k35/DCN, oAd-DCN)을 제작하였다.

[158]

[159] **Ad- 탈재된 암세포/섬유아세포 세포 시트(oAd/CFCs)**

[160] 섬유 아세포 제1세포층과 암세포 제2세포층으로 구성된 세포 시트(CFCS)는 온도 반응성 배양 접시(TRCD; UpCell; NUNC, Tokyo, Japan)를 사용하여 제작하였다.

[161] 이중 층의 세포 시트를 만들기 위해 NIH3T3 세포 (3 X 10⁵)를 35mm TRCD에 실리콘 링 (반경 1.8cm)의 속이 빈 내부 층에 넣고 37 °C에서 배양하였다. 배양 48시간 후, U343 세포 (3 X 10⁵)를 실리콘 링 한정 영역에 첨가하여 세포 시트의 제 2 층을 형성하고 24시간 동안 배양하였다. 각 접시의 배지를 5% FBS가 함유된 신선한 DMEM으로 교환한 후, 세포를 0.5 또는 5의 다중 감염(MOI)으로 테코린-발현 종양살상 Ad (oAd-DCN)로 감염시켰다. Ad-DCN-감염 암세포/섬유아세포 세포 시트(oAd-DCN/CFCs)를 배양 온도를 실온으로 30분 동안 낮추어 감염 4시간 후 접시에서 분리하였다.

[162]

[163] **조직학**

[164] oAd-DCN CFCS는 oAd-DCN의 5 MOI를 사용하여 상기 기술된 바와 같이 생성되었고, 대조군 CFCS는 세포 시트를 인산 완충 식염수(PBS)로 처리함으로써 생성되었다.

[165] 30분 동안 배양 온도를 실온으로 낮추고 24시간 동안 4% 파라포름알데히드로 고정시킴으로써 처리 후 12시간째 종양 살상 Ad 탑재 또는 PBS 처리된 CFCS를 수거 하였다. 고정된 샘플을 파라핀에 끼워 넣고 5 μ m 단면으로 자르고 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색을 위해 파라핀을 제거하였다.

[166]

[167] **바이러스 생산 분석**

[168] 세포 시트에서 종양 살상 Ad의 바이러스 생산을 평가하기 위해 CFCS를 12-well plate에 넣고 oAd-DCN으로 0.5 MOI로 감염시켰다. 감염 4시간 후, 웰을 PBS로 세척하고 5% FBS를 함유하는 신선한 DMEM으로 교환하였다.

[169] 감염 4, 12, 24, 48, 72 및 96 시간 후, 상등액과 세포 시트 모두를 수집하고, 실시간 정량 PCR(Q-PCR, TaqMan PCR 검출, Applied Biosystems, CA, USA)에 의해 Ad 입자의 수를 평가하였다.

[170]

[171] **웨스턴 블랏팅 분석**

[172] oAd-DCN/CFCSs에서 종양 살상 Ad-매개 DCN 발현의 수준을 평가하기 위해, 시트를 MOI가 1 인 oAd-DCN으로 감염시키고 48시간 동안 배양 하였다. 이어서, 시트를 프로테이나제 억제제 각테일 (Sigma, MO, USA)이 들어있는 빙냉 RIPA 버퍼(Elipis Biotech, Taejeon, Korea)에서 균질화하고 생성된 균질액을 13,200 rpm으로 10분간 원심 분리하였다.

[173] 총 단백질 농도는 BCA 단백질 분석법(Pierce, Rockford, IL, USA)에 의해 측정되었고, 동등한 단백질 양 (시료 당 200 μ g)을 전기영동을 위해 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에 올려 놓았다. 단백질을 폴리비닐리덴 플루오라이드 멤브레인으로 옮기고 염소 항-DCN 항체 (Ab, R & D Systems, MN, USA) 또는 토끼 항- β -액틴 항체(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)와 함께 배양하였다.

[174] 막을 2차 Ab로 서양 고추냉이 퍼옥시다아제-결합된 마우스 항-염소 IgG Ab 또는 염소 항-토끼 IgG (세포 시그널링)와 함께 배양하고, 면역반응성 밴드를 강화된 화학 발광(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 통해 시각화하였다.

[175] DCN의 발현 수준은 ImageJ 소프트웨어(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 준(semi)-정량 분석하였다.

[176]

[177] **MTT 분석**

[178] 시험관 내에서 CFCS의 바이러스 복제 매개 분해를 평가하기 위해, CFCS를 48-

웰 플레이트에 놓은 다음 MOI가 5인 oAd-DCN으로 감염시켰다.

- [179] 감염 4, 12, 24, 48, 72, 96시간 후 배지를 제거하고 CFCSs를 500 μ L의 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐-테트라졸륨 브로마이드 (MTT, Sigma, MO, USA)로 처리하였다. 이어서 플레이트를 540 nm에서 마이크로플레이트 리더로 판독하였다. PBS-처리군으로부터의 흡광도를 100% 생존능으로 설정하였다.
- [180]
- [181] **oAd-DCN/CFCS의 생체 내 분해 프로파일 및 바이러스 지속성**
- [182] 생체 내에서 CFCSs의 분해 및 바이러스 지속성을 평가하기 위해 2가지 다른 유형의 세포 시트를 제작하였다.
- [183] CFCS의 분해 프로파일은 섬유아세포와 반딧불이 루시퍼라제(fluc) 발현 암세포 (CFCSs/fluc)로 구성된 CFCS를 이용하여 평가한 후 MOI가 5인 oAd-DCN에 감염되어 oAd-DCN/CFCSs/fluc을 생성시킴으로써 평가되었다.
- [184] 세포 시트의 바이러스 지속성을 평가하기 위해 섬유아세포와 fluc 유전자를 발현하지 않은 암세포를 이용하여 MOI가 5인 반딧불이 루시퍼라제 발현 oAd-DCN (oAd-DCN-fluc)에 감염시켜 CFCS를 만들었다. oAd-DCN-fluc/CFCSs, Oad-DCN/CFCSs/fluc와 oAd-DCN-fluc/CFCS는 모두 감염 후 4시간에 HCC를 가진 마우스의 가장 큰 간엽에 이식되었다. 이식 후 2, 4, 6, 8 및 10 일에, IVIS 영상 시스템(Xenogen, Alameda, CA, USA)을 통해 oAd-DCN/CFCS/fluc의 분해 및 oAd-DCN-fluc/CFCS의 종양 살상 Ad의 지속성을 평가하기 위해 산소에서 2% 이소플루란으로 채워진 챔버에서 마취시키고 D-루시퍼린(150 mg/kg, Caliper, Hopkinton, MA)을 복강 내 주사하였다.
- [185]
- [186] **인 비보 항종양 효능**
- [187] oAd-DCN의 항종양 효과를 평가하기 위해, CFCSs, oAd-DCN/CFCSs를 동소(orthotopic) HCC 이종 이식 모델에서 6~7주령 흉선 누드 마우스(OrientBioInc., Seongnam, Korea)에서 간엽의 가장 큰 엽에 1x10⁶ fluc-발현 Hep3B 세포(Hep3B/fluc)를 주입하였다.
- [188] 종양 세포 주사 직후, 간 주사 부위를 트립신으로 5분간 처리한 후 CFCS군 (CFCS 또는 oAd-DCN/CFCS)을 이식하거나 PBS 또는 oAd-DCN (5 MOI)을 분사하였다. 마지막으로, 치료군 중 하나가 꼬리 정맥 (다른 oncolytic Ad 포함 군과 동일한 양의 바이러스 투여)을 통해 oAd-DCN으로 전신 투여되었다.
- [189] 세포 주입 2일 후, 마우스를 산소 중 2% 이소플루란으로 채워진 챔버에서 마취시키고, IVIS 이미징 시스템(Xenogen)을 통해 Hep3B/fluc 세포의 성공적인 이식을 확인하기 위해 D-루시퍼린(150 mg/kg; Caliper, MA, Hopkinton, MA)을 복강 내 주사하였다.
- [190] 생체 내 생물 발광 신호 강도는 치료 후 2일, 5일, 7일, 14일 및 21일에 관심의 대상 신체 부위(종양)에서 초당 포톤(photons/second [p/s])으로 얻어졌다.
- [191]

- [192] **조직학적 및 면역조직화학적 분석**
- [193] Hep3B-HCC 종양 조직을 HCC 세포 주사 후 21일째에 수확하고, 10 % 포르말린에 고정시키고, 파라핀 매입 처리하고, 5 μ m 단면으로 절단하였다. 절편을 H&E로 염색하고 광학 현미경으로 검사하였다. 종양 조직에서 Ad 입자를 검출하기 위해, 종양 절편을 토끼 항-Ad E1A 폴리클로날 항체(Santa Cruz Biotechnology)로 면역 염색하였다.
- [194] 또한, 종양 절편은 종양 세포 증식 또는 처리 후 세포 사멸 유도를 평가하기 위해 증식하는 세포 핵 항원 (PCNA) 특이 항체(Dako, Glostrup, Denmark) 또는 말단 테옥시뉴클레오티딜 전이효소 dUTP Nick End Labeling (TUNEL)으로 면역 염색되었다. 그런 다음 2차 항체로 서양 고추냉이 퍼옥시다아제-결합된 염소 항-랫트 IgG(BD Biosciences Pharmingen) 또는 서양 고추냉이 퍼옥시다아제-결합된 염소 항-마우스 IgG(Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)로 처리하였다.
- [195] 디아미노벤지딘/수소 퍼옥시다아제 (DAKO)를 크로모젠 기질로 사용하였다. 모든 슬라이드는 메이어(Mayer)의 헤마톡실린으로 대조 염색되었다.
- [196]
- [197] **통계 분석**
- [198] 데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차(SD)로 표시되었다. 통계적 유의성은 two-tailed Student T-test 또는 One-way Anova test (SPSS 13.0 소프트웨어, SPSS, Chicago, IL)에 의해 측정되었다. 0.05 미만의 P 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.
- [199]
- [200] **방사선을 조사한 암세포의 세포 생존능 확인**
- [201] U343 세포주에 다양한 세기의 방사선을 조사 (1, 5, 10, 15, 30, 50 Gy)한 후, 방사선 조사 암세포의 세포 생존능(cell viability)을 확인하기 위하여, 방사선을 조사한 U343 세포주를 96 well plate에 seeding하고 9일째까지 MTT assay를 수행하였다.
- [202]
- [203] **방사선을 조사한 암세포를 이용한 세포시트로부터 바이러스 복제능 확인**
- [204] 섬유아세포 제1세포층과 암세포 제2세포층으로 구성된 세포 시트(CFCS)는 온도 반응성 배양 접시(TRCD; UpCell; NUNC, Tokyo, Japan)를 사용하여 제작하였다.
- [205] 이중 층의 세포 시트를 만들기 위해 NIH3T3 세포 (3×10^5)를 35mm TRCD에 실리콘 링 (반경 1.8cm)의 속이 빈 내부 층에 넣고 37 °C에서 배양하였다. 배양 48시간 후, 방사선을 조사하지 않은 U343 세포 (대조군). 또는 5 Gy로 방사선을 조사한 U343 세포 (3×10^5)를 실리콘 링 한정 영역에 첨가하여 세포 시트의 제 2 층을 형성하고 24시간 동안 배양하였다. 각 접시의 배지를 5% FBS가 함유된 신선한 DMEM으로 교환한 후, 세포를 0.5의 다중 감염(MOI)으로 DCN-발현

종양살상 Ad (oAd-DCN)로 감염시켰다. 이후, 4시간째 감염되지 않은 바이러스를 제거하기 위해 배양액을 fresh한 것으로 바꿔주고, 4, 24, 48 시간 켜, 배양액과 세포를 수거하여 그 중 존재하는 바이러스를 Q-PCR을 통해 확인하였다.

[206]

[207] **세포 시트를 종양 제거 수술(표적)부위에 이식 후 생물학적 활성 및 종양 발생 여부 확인**

[208] 도 7과 같이, 온도 반응성 배양 접시에 NIH3T3을 분주하여 제 1층을 형성하고, 3일 뒤 U343 세포주를 분주하여 제 2층을 형성, 48 시간 뒤 종양 선택적 살상 아테노 바이러스를 감염시키고 24 시간 후 온도반응성 배양 접시의 온도를 20°C로 낮추어 세포시트를 떼어내었다.

[209] 온도 반응성 배양 접시에서 형성한 바이러스를 감염시킨 세포시트에 배양액을 제거하고, 1X PBS를 이용하여 3회 세척하였다. membrane을 세포 시트 위에 올려놓은 채로, 온도를 20°C로 낮추어, 세포시트가 부착된 상태의 membrane을 얻었다.

[210] H460 폐암 피하 종양을 가지고 있는 마우스 모델의 종양을 외과적 수술로서 제거하고, 세포 시트가 부착된 membrane을 종양 제거 수술 부위에 올려놓은 뒤, 조심스럽게 membrane을 떼어내어 세포 시트를 종양 제거 수술 부위에 부착시켰다. 이후, 수술 부위를 봉합하고 종양의 재발 여부를 30일째까지 관찰하였다.

[211]

[212] **세포 시트에서 생산된 바이러스의 생물학적 활성 분석**

[213] 세포 시트에서 복제된 종양 살상 아테노바이러스의 생물학적 활성을 평가하기 위해 CFCS를 12-well plate에 넣고 0.5 MOI의 oAd-DCN으로 감염시켰다. 감염 4시간 후, 웰을 1X PBS로 세척하고 5% FBS를 함유하는 신선한 DMEM으로 교환하였다. 감염 4, 12, 24, 48, 및 72 시간 후, 상등액과 세포 시트 모두를 수집하였다.

[214] A549 세포주를 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 seeding하고, 수집한 샘플에서 각각 25, 50, 100 μ L를 취하여 세포에 처리한 뒤, 48 시간째 MTT assay를 수행함으로써 세포시트에서 생산된 바이러스의 암세포 살상능을 확인하였다.

[215]

[216] **바이러스를 탑재한 세포 시트 제작**

[217] 벡시니아 바이러스 또는 아테노바이러스를 복제 또는 전달하기 위한 세포 시트를 제작하기 위하여, 온도 반응성 배양 접시(TRCD)에 안쪽 지름이 1.8 mm인 실리콘 링을 얹고, 실리콘 링 안쪽에 NIH3T3 세포주를 3×10^5 개 분주하고 48시간 뒤, U343 세포주 3×10^5 개를 분주하여 세포 시트를 제작하였다.

[218] 24시간 뒤, 벡시니아 바이러스 또는 아테노바이러스를 세포 시트에 감염시켰다. 일정 시간 뒤 온도 반응성 배양 접시로부터 바이러스가 감염된 세포

시트의 배양액 및 실리콘 링을 제거하고, 1X PBS로 3회 세척한 후, 2 mL의 새로운 1X PBS를 넣고, 20 °C에서 떼어내어 세포 시트 형성을 확인하였다.

[219]

[220] 실험결과

[221] *oAd-DCN/CFCS의 생성 및 특성 규명*

[222] Ad 복제를 허용할 수 있는 CFCS를 제작하기 위해, 인간 두뇌 교모세포종 세포주 (U343) 및 마우스 섬유아세포 세포주(NIH3T3)로 구성된 이중층 세포 시트를 이용하였다.

[223] CFCS는 온도 반응성 배양 접시(TRCD)에서 생성되었으며 MOI가 5인 oAd-DCN에 감염되어 종양 살상 Ad 감염된 CFCS (oAd-DCN/CFCSs)를 생성하였다. 감염 12시간 후, 30분 동안 플레이트 온도를 실온으로 낮춤으로써 oAd-DCN/CFCS를 TRCD로부터 분리시켰다. 도 1a에 도시된 바와 같이, 균일한 크기의 원형 시트가 TRCD로부터 쉽게 분리되었다. 시트의 H&E 염색은 암세포와 정상 섬유아세포 성분이 시트 층(도 1b)에 존재함을 나타내었다.

[224] 중요하게, 세포 시트의 Ad E1A 염색은 적색 스팟에서 볼 수 있는 종양 살상 Ad의 광범위한 분포를 나타내었다 (도 1d). 반면, PBS-처리된 대조 시트는 검출 가능한 스팟이 없었다 (도 1c). 주목할 점은 PBS와 종양 살상 Ad-타제된 CFCS가 감염 후 12 시간에서 유사한 구조와 모양을 보였다는 것이다. 함께, 이러한 결과는 종양 살상 Ad가 세포 시트에 탑재할 수 있으며 세포 시트의 전반적인 구조적 무결성에 해가 되지 않는 것을 보여주었다.

[225]

[226] *oAd-DCN/CFCS 내에서의 바이러스 복제 및 유전자 발현 프로파일*

[227] 시트의 암세포 층이 종양 살상 Ad 감염에 대해 허용 가능한지를 평가하기 위해, 바이러스 복제 및 치료 유전자 발현 프로파일을 각각 Q-PCR 및 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다.

[228] 도 2a에 도시된 바와 같이, 종양 살상 Ad는 감염 후 72시간까지 시간에 따라 세포 시트 내에서 효과적으로 복제하여 세포 시트가 종양 살상 Ad 복제를 허용한다는 것을 입증하였다. (4시간제는 세포 시트 내로 감염된 virus의 양을 detection하는 것인데, 적은 MOI를 사용하였기 때문에 Q-PCR 상의 detection limit 아래의 값으로, 분석이 되지 않았음).

[229] 처리 후 96시간에, oAd-DCN의 종양 살상 활성으로 인해 Ad량의 약간의 감소가 관찰되었고, 처리 후 96 시간에서 세포 시트의 현저한 분해를 유도하였다. 이러한 결과에 따라, 웨스턴 블랏 분석에 의해 oAd-DCN은 oAd-DCN/CFCS 내에서 효과적으로 DCN을 생성할 수 있음을 밝혔다 (도 2b).

[230] 함께, 이러한 결과는 세포 시트가 종양 살상 Ad 감염에 영향을 받기 쉽고 궁극적으로 시트가 바이러스 복제 및 치료 유전자 발현을 허용하는 전달 스캐폴드로서 기능할 수 있음을 입증하였다.

[231]

- [232] **생체 내 oAd-DCN/CFCSs의 분해 프로파일 및 바이러스 지속성**
- [233] CFCS에서 세포 시트의 분해 및 탑재된 종양 살상 Ad의 지속성을 모니터링하고 시각화하기 위해, HCC 이종 이식 생쥐에게 oAd-DCN-loaded fluc-발현 CFCSs(oAd-DCN/CFCSs/Fluc) (도 3a) 또는 fluc-발현 oAd-DCN(oAd-DCN-Fluc/CFCSs)에 감염된 CFCSs (리포터 유전자 없음)를 이식하였다(도 4b).
- [234] 도 3a에 도시된 바와 같이, 세포 시트의 루시페라제 신호는 시간 의존적으로 감소하였고, 이식 후 10 일까지 완전히 사라졌다.
- [235] 또한, 이식 후 10일째에 마우스를 희생시키고, 이식된 모든 CFCS가 간에서 완전히 분해되었음을 육안으로 확인하였다.
- [236] 유사하게, 종양 살상 Ad 바이러스의 신호는 또한 시간 의존적 방식으로 감소하여 10일 동안 세포 시트처럼 루시페라제 발현 패턴에서 유사한 시간 의존적 감소를 보였다 (도 3b).
- [237]
- [238] **다병소성 간세포 암종에 대한 oAd-DCN/CFCS의 강력한 항종양 효능**
- [239] 동소(orthotopic) 종양 모델은 임상 관련성 때문에 중요한 암 연구 모델 중 하나로 부상하고 있다. HCC의 multifocality는 클리닉에서 성공적인 치료를 향한 중요한 도전이므로, 우리는 루시페라제를 발현하는 Hep3B 세포로 간에서 가장 큰 엽에 다중 주사를 하여 다병소성 간세포 동소 종양 모델을 확립하였다.
- [240] 도 4에 도시된 바와 같이, HCC 병변은 PBS로 처리한 마우스의 간에서 검출되었으며, 동소 다병소성 HCC이 성공적으로 확립되었음을 확인하였다.
- [241] 도 5a에 나타난 바와 같이, oAd-DCN/CFCS 처리는 치료 후 21일째 다른 어떤 치료군 보다 현저히 높은 항종양 활성을 나타내어 PBS ($7.2 \times 10^8 \pm 4.5 \times 10^8$), PBS 처리된 CFCS ($1.7 \times 10^8 \pm 9.3 \times 10^7$), 또는 oAd-DCN (sprayed) ($1.2 \times 10^8 \pm 1.3 \times 10^8$) 보다 각각 20.4 배, 4.7 배 또는 3.5 배 더 큰 종양 성장 억제를 보였다 (도 5b).
- [242] 또한, 모든 oAd-DCN/CFCSs 처리 마우스는 간에 다병소성 간세포 암을 보이지 않아 CFCS가 매개하는 종양 살상 Ad의 전달이 다병소성 종양 형성을 예방할 수 있음을 시사한다. (도 6).
- [243] 함께, 이러한 결과는 세포 시트에 탑재된 oAd-DCN이 강력한 항종양 효능을 이끌어 내고 다병소성 간세포 암의 형성을 예방하기 위해 종양 조직으로 효과적으로 전달될 수 있음을 시사한다.
- [244]
- [245] **다병소성 간세포 암에 대한 oAd-DCN/CFCS의 조직학적 분석**
- [246] 추가로 치료 효과를 조사하기 위해, 각 군 (PBS, oAd-DCN 혈관 내 주사, oAd-DCN 복강 내 주사, CFCS 단독 또는 oAd-DCN/CFCS)으로 처리한 후 2주에 종양 조직을 수확하고, 조직학적 및 면역조직학적 분석을 통해 분석하였다.
- [247] 도 6에 도시된 바와 같이, H&E 염색은 PBS-처리, oAd-DCN 혈관 내 주사, oAd-DCN 복강 내 주사, CFCSs 단독 처리된 조직 또는 대식세포에서의 증식하는

종양 세포의 큰 다병소 영역을 나타내었다.

- [248] oAd-DCN/CFCS에서는 종양 세포의 작은 영역과 다발성 종양이 관찰되지 않았다. 종합하면, oAd 국소 전달에 CFCS를 사용하면 항종양 효능이 향상되고 다병소성 종양 성장을 예방한다는 것을 입증한다.

[249]

- [250] **세포 시트를 종양 제거 수술(표적)부위에 이식 후 생물학적 활성 및 종양 발생 여부 확인**

- [251] 도 8은 종양 선택적 살상 아데노바이러스를 탑재한 세포 시트로부터 복제된 아데노바이러스의 생물학적 활성을 확인한 것으로, 복제된 바이러스의 양이 많은 late time의 sample일수록 세포살상능이 증가하는 것을 확인함으로써 세포 시트로부터 복제된 아데노바이러스의 생물학적 활성이 있음을 입증하였다.

- [252] 도 9는 종양 제거 수술 후, 종양 선택적 살상 아데노바이러스가 탑재된 세포 시트를 부착 후, 종양의 재발 여부를 확인한 것으로, 종양 제거 수술 후, 세포 시트를 부착하지 않은 대조군에서는 수술 30일 이후 종양의 재발이 관찰된 반면, 세포 시트를 부착하고 봉합한 실험군에서는 종양의 재발이 일어나지 않았음을 확인하였다.

[253]

- [254] **백시니아 바이러스가 감염된 세포 시트 형성 확인**

- [255] 바이러스의 감염 여부와 상관없이 세포 시트가 잘 형성됨을 확인하였다.

- [256] 도 10은 온도 반응성 배양 접시의 세포 시트에 백시니아 바이러스를 0.5 MOI로 감염시키고, 6시간 뒤의 세포 시트의 사진(a), 세포 시트를 온도반응성 배양 접시로부터 떼어내기 위해, 실리콘링을 제거하고, 1X PBS로 3회 세척한 후의 세포 시트 사진(b), 온도 반응성 배양접시를 20°C에서 15분간 반응 후, 세포 시트를 떼어내고 바이러스를 감염시키지 않은 세포 시트 사진(c) 및 백시니아 바이러스를 0.5 MOI로 감염시킨 세포 시트 사진(d)을 나타낸 것이다.

[257]

- [258] **세포 시트에서의 백시니아 바이러스 복제능 확인**

- [259] 세포 시트의 암세포 층에서 백시니아 바이러스의 복제능을 평가하기 위해, 도 11a에 나타난 바와 같이 섬유아세포 제1세포층과 암세포 제2세포층으로 구성된 세포 시트를 형성하고, 백시니아 바이러스를 0.1 MOI로 감염시킨 뒤, 4시간째 감염되지 않은 백시니아 바이러스를 모두 세척하여 제거한 뒤, 24시간, 48시간, 72시간째에 세포 배양액과 세포 시트로부터 Q-PCR을 통해 백시니아 바이러스를 확인하였다.

- [260] 도 11b에 도시된 바와 같이, 백시니아 바이러스는 감염 후 72시간까지 시간에 따라 세포 시트 내에서 효과적으로 복제하여 세포 시트가 백시니아 바이러스의 복제를 허용한다는 것을 입증하였다.

[261]

- [262] **백시니아 바이러스에 의한 세포시트의 세포 사멸 확인**

- [263] 바이러스 감염에 의한 세포 시트의 세포사멸을 확인하기 위하여, 도 11a에 나타낸 바와 같이 섬유아세포 제1세포층과 암세포 제2세포층으로 구성된 세포 시트를 형성하고, 벡시니아 바이러스를 2 또는 5 MOI로 감염시킨 뒤, 사멸한 세포를 붉은 색으로 염색할 수 있는 7-AAD dye를 첨가하여 시간에 따른 세포 사멸을 확인하였다.
- [264] 도 12a에서 보는 바와 같이, 2 또는 5 MOI로 벡시니아 바이러스를 감염시킨 세포 시트 모두에서 시간에 따라 사멸된 세포의 수가 증가됨을 확인하였고, 사진에서의 붉은 색을 띠는 면적을 정량화 하였다 (도 12b).
- [265] 도 11과 도 12의 결과를 종합하면, 세포 시트는 아데노바이러스 뿐 아니라 벡시니아 바이러스의 감염도 가능하고, 그 복제가 가능하게 하며, 바이러스의 복제에 따라 세포 시트가 생분해성을 갖음을 입증하였다.
- [266]
- [267] **방사선을 조사한 암세포의 세포 생존능 확인**
- [268] 다양한 세기의 방사선을 조사 (1, 5, 10, 15, 30, 50 Gy)한 U343 세포의 cell viability를 MTT assay를 통해 확인하였다. 1 Gy의 방사선을 조사한 U343 세포주는 방사선을 조사하지 않은 세포 (대조군)와 비슷한 정도로 세포가 분열하였고, 5Gy의 방사선을 조사한 경우, 세포의 분열 속도가 대조군에 비해 늦어지고 7일째 이후에는 세포가 사멸하기 시작하였다. 10 - 50 Gy의 방사선을 조사한 U343의 경우, 세포의 분열이 거의 일어나지 않으면서 6일째 모두 사멸하였다(도 13).
- [269]
- [270] **방사선 조사된 암세포를 포함한 세포 시트에서의 아데노바이러스 복제능 확인**
- [271] 세포 시트의 방사선이 조사된 암세포 층에서 바이러스의 복제능을 평가하기 위해, 도 11a에 나타낸 바와 같이 섬유아세포 제1세포층과 암세포 제2세포층으로 구성된 세포 시트를 형성하고, 아데노바이러스를 0.5 MOI로 감염시킨 뒤, 4시간째 감염되지 않은 아데노바이러스를 모두 세척하여 제거한 뒤, 24시간, 48시간, 72시간째에 세포 배양액과 세포 시트로부터 Q-PCR을 통해 아데노 바이러스를 확인하였다. 그 결과 방사선이 조사된 암세포에서도 아데노바이러스의 복제가 일어남을 확인하였다 (도 14).
- [272]
- [273] **토의**
- [274] 간장 만성 스트레스로 인해 흔히 발생하는 다발성 간세포 암종은 돌연변이가 크고 많은 간장을 덮어 대부분의 환자에서 치유 절제술을 시행하기 어렵다.
- [275] 절제술을 받는 환자들조차도 재발율이 높기 때문에 5 년 생존율이 50 % 인 예후가 좋지 않다.
- [276] 또한 이 환자들에서 광범위한 간 손상은 이들 약물이 심한 간독성을 일으키기 때문에 적절한 양의 화학 요법제를 전신 투여하지 못하게 한다.
- [277] 전통적인 HCC 치료 옵션의 이러한 한계를 해결하기 위해 HCC의 다병소성

동소에 종양 살상 Ad를 효율적으로 전달하기 위해 생분해성 및 Ad 복제 허용 세포 시트를 생성하였다.

- [278] 세포 시트 전달 플랫폼의 바이러스 복제 허용 성질은 다른 통상적인 치료 경로 (oncolytic Ad의 대부분의 지역 및 전신 투여에는 $1-5 \times 10^{10}$ VP가 필요함)와 비교하여 비교적 낮은 바이러스 용량을 갖는 다병소성 간세포 암의 효과적인 치료를 가능하게 한다.
- [279] 동등한 바이러스 용량에서, oc-DCN/CFCS 치료는 장기적인 종양 살상 Ad 방출로 이어져 naked oAd-DCN의 전신 또는 국소 투여 보다 우수한 종양 성장 억제 및 다발성 간세포 암 형성 예방을 보여줍니다 (도 6).
- [280] 이것에 대한 설명 중 하나는 바이러스 복제를 매개로 하는 세포 용해 및 CFCS에서 방출된 종양에 도달하는 대부분의 비리온이 다병소성 종양 부위의 넓은 영역을 감염시킬 수 있다는 것이다.
- [281] 궁극적으로, 장시간 동안 치료용 바이러스의 감염성을 유지하는 것은 임상 시험에서 주요한 장애물로 남아 있다. 하이드로 겔, 패치 및 치료제의 국소화 및 치료 효능을 향상시키기 위해 현재 개발되고 있는 종양 내 주사와 같은 몇 가지 다른 국소 전달 플랫폼이 있다 [Pesonen, S., L. Kangasniemi, and A. Hemminki, *Oncolytic adenoviruses for the treatment of human cancer: focus on translational and clinical data*. Mol Pharm, 2011. **8**(1): p. 12-28; Wang, C., et al., *Enhanced Cancer Immunotherapy by Microneedle Patch-Assisted Delivery of Anti-PD1 Antibody*. Nano Lett, 2016. **16**(4): p. 2334-40; Kasala, D., et al., *Evolving lessons on nanomaterial-coated viral vectors for local and systemic gene therapy*. Nanomedicine (Lond), 2016. **11**(13): p. 1689-713]. 이러한 플랫폼의 주된 문제점 중 하나는 폴리머, 리포솜 및 나노 입자와 같은 합성 성분을 자주 사용한다는 것이며, 분해 생성물은 염증 및 기타 부작용을 유발할 수 있다는 것이다. 하지만, 본 발명의 종양 살상 바이러스가 탑재된 세포 시트(예, oAd-DCN/CFCS)는 기존의 다른 국소 전달 플랫폼과 달리 합성 성분이 전혀 포함되어 있지 않기 때문에 생체 적합성 및 분해성이 뛰어나다. 클리닉에서 CFCS 접근법에 대한 중요한 관심과 장애물 중 하나는 다른 종양을 생성할 수 있으므로 바이러스 복제를 지원하는 암세포 층을 사용하는 것이다. 이러한 우려를 해소하기 위해 방사선 조사된 암세포를 이용하여 CFCS를 생성시켜 초기 이식 후 암세포 층의 박멸을 유도하여 바이러스 복제를 지원하였다 (도 13). 또한, 방사선 조사는 세포 시트 층으로 바이러스 복제를 강화시켰다 (도 14).
- [282] 이러한 결과는 방사선에 의한 DNA 손상과 보조적인 방사선 치료를 통해 종양 살상 Ad의 복제가 향상될 수 있다는 것을 보여주며, DNA 복구를 가속화하면 에피솜성 아데노바이러스 DNA의 복제를 더 크게 할 수 있다.
- [283] 더욱이, 방사선 조사된 암세포는 현재 암 백신의 유망한 후보로 평가되고 있다. 종양 백신과 종양 살상 Ad의 동시 전달을 위한 유망한 면역 요법 플랫폼이 될 수 있는 잠재성을 보여주는 종양 특이적 면역 반응을 인지하고 유도하는 숙주

면역계에 대한 종양 관련 항원을 제공할 수 있기 때문이다.

[284] 종양 살상 Ad (oncolytic Ads)의 CFCS 매개 전달의 잠재적인 면역학적 조절은 현재 미래 연구로 평가되고 있다.

[285]

[286] 결론

[287] 본 발명의 일부 실시예는, 종양 살상 바이러스와 세포 시트를 결합하여 다병소성 종양 치료를 위한 효율적인 전달 시스템을 만들었으며, 이러한 시스템은 효율적인 증폭과 지속적인 방출을 보였으며 허용 세포 시트에 의한 oAd의 비특이적 배출을 방지하였다.

[288] 결론적으로 본 발명의 일부 실시예는 기존의 암 유전자 치료법의 한계를 극복함으로써 종양 살상 바이러스/세포 시트 시스템의 사용이 종양 살상 바이러스의 치료 효과를 극대화할 수 있음을 보여준다.

[289]

[290] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 특히, 본원에서 기술한 실시예에서는 일부 바이러스에 대한 사용만을 예시하고 있을 뿐 다른 바이러스 시스템으로도 변경 가능하다.