



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년07월04일
 (11) 등록번호 10-1279748
 (24) 등록일자 2013년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *C12N 5/16* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2006-7010775
 (22) 출원일자(국제) 2004년10월29일
 심사청구일자 2009년10월23일
 (85) 번역문제출일자 2006년06월02일
 (65) 공개번호 10-2006-0125783
 (43) 공개일자 2006년12월06일
 (86) 국제출원번호 PCT/JP2004/016089
 (87) 국제공개번호 WO 2005/042737
 국제공개일자 2005년05월12일
 (30) 우선권주장
 JP-P-2003-00374808 2003년11월04일 일본(JP)
 JP-P-2004-00187028 2004년06월24일 일본(JP)
 (56) 선행기술조사문헌
 CH Jin 등. Gene Therapy. 2003.02. Vol. 10,
 No. 3, 272-277.*
 Hidetoshi Sumimoto 등. Journal of
 Immunological Methods. 2002. Vol. 271, Issues
 1-2, 페이지 153-165.*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
가부시키키가이샤 디나백크 겐큐쇼
 일본국 이바라키 쓰쿠바시 간논다이 1-25-11
 (72) 발명자
오카노 신지
 일본국 후쿠오카 후쿠오카시 하카타쿠 요시즈카
 4-15-3-301
요네미쯔 요시카즈
 일본국 후쿠오카 후쿠오카시 히가시쿠 나지마
 5-31-3
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
서종완

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 유전자 도입된 수상세포의 제조방법

(57) 요약

본 발명은, 마이너스 가닥 RNA 바이러스를 수상세포를 접촉시키는 공정을 포함하는, 수상세포에 유전자를 도입하는 방법을 제공한다. 또한 본 발명은, 유전자가 도입된 수상세포의 제조방법으로서, 마이너스 가닥 RNA 바이러스와 수상세포를 접촉시키는 공정을 포함하는 방법을 제공한다. 또한 본 발명은, 이 방법에 의해 제조된 유전자가 도입되어 수상세포를 제공한다. 더욱이 본 발명은, 마이너스 가닥 RNA 바이러스와 수상세포를 접촉시키는 공정을 포함하는, 수상세포를 활성화시키는 방법을 제공한다. 본 발명에 의해, 수상세포로의 효율적인 유전자 송달이 가능해졌다. 항원 유전자 또는 사이토카인 유전자가 도입된 수상세포는 백신으로서 유용하다.

(72) 발명자

스에이시 가즈오

일본국 후쿠오카 후쿠오카시 미나미쿠 오이케
1-29-22

시바타 사토코

일본국 후쿠오카 후쿠오카시 히가시쿠 하코마쓰
2-14-15-701

하세가와 마모루

일본국 이바라키 쓰쿠바시 간논다이 1-25-11 가부
시키가이샤디나벡크 겐큐쇼 내

특허청구의 범위

청구항 1

유전자 도입된 성숙 수상세포의 제조방법으로서, (i) 미성숙 수상세포에 파라믹소바이러스 벡터를 접촉시키는 공정, 또는 (ii) 수상세포의 전구세포에 파라믹소바이러스 벡터를 접촉시켜, 상기 전구세포를 미성숙 수상세포로 분화시키는 공정을 포함하고, 상기 파라믹소바이러스에 의해 상기 수상세포가 성숙화하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 미성숙 수상세포에 파라믹소바이러스 벡터를 접촉시키는 공정을 포함하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, $CD34^+$ 세포에 파라믹소바이러스 벡터를 접촉시켜, 상기 세포를 미성숙 수상세포로 분화시키는 공정을 포함하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 접촉 전 또는 후의 세포를 GM-CSF 및 IL-4 존재하에서 배양하는 공정을 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 벡터가 사이토카인 유전자를 가지는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 사이토카인이 인터페론 β 인 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 있어서, 파라믹소바이러스 벡터가 센다이 바이러스 벡터인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 세포가 인간세포인 방법.

청구항 11

제1항의 방법에 의해 제조된, 상기 벡터를 보유하는 세포.

청구항 12

제11항에 있어서, 성숙 수상세포인 세포.

청구항 13

제11항의 수상세포를 종양부위에 투여하는 공정을 포함하는, 인간을 제외한 대상의 종양 증식을 억제하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 수상세포에 종양항원을 접촉 또는 발현시키는 공정을 추가로 포함하는 방법.

청구항 15

제4항에 있어서, 접촉 전 또는 후의 세포를 GM-CSF 및 IL-4 존재하에서 배양하는 공정을 추가로 포함하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 수상세포에 유전자를 도입하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은, 암 및 감염증 등에 대한 백신의 제조를 위해 이용할 수 있다.

배경기술

[0002] 수상세포(dendritic cell; DC)는 말초혈액, 피부, 림프기관 및 흉선 등에 존재하는 항원제시세포(antigen-presenting cell)(APT)의 하나로서, 림프조직 및 비림프조직에 널리 분포되어 있다(Steinman, R. M. 1991, Ann. Rev. Immunol. 9:271; Banchereau, J. B. 및 R. M. Steinman, 1998, Nature 392: 245 참조). 수상세포는 강력한 항원제시능을 가지고, 수상세포상의 클래스 I, 클래스 II에 항원 펩티드를 발현시켜, 각각 CD4, CD8 T 세포를 활성화시킨다. 이것에 의해 특정 항원(병원 미생물의 항원, 종양관련 항원, 이식항원 등)에 대한 생체 내의 면역 응답을 유도한다.

[0003] 수상세포의 유전자 개변은, 임상상의 여러 가지의 유익한 효과를 가져온다. 예를 들면, T세포 응답에 필요한 보조자극을 유도하는 분자(CD80, CD86 등)를 발현하는 성숙 수상세포를 제작하면, 이 수상세포를 사용하여 항원에 대한 강력한 적응면역의 부활화(activation)(예를 들면, 바이러스나 종양에 대한 백신 등)가 가능하고, 보조자극을 유도하는 분자가 없거나, 또는, 억제성 자극을 부여하는 분자를 발현하는 수상세포를 사용하면, 항원에 대한 면역관용(immune tolerance)(예를 들면, 이식 항원이나 자기면역성 질환의 원인이 되는 항원에 대한 불응답성의 획득 등)을 유도할 수 있다. 이들의 적용예로서, 예를 들면, 수상세포로의 인터류킨(interleukin)(IL)-12 유전자의 도입에 의한 면역 부활화(Gene Therapy 2000; 7,2113-2121), 및 Fas 리간드 유전자의 도입에 의한 항원특이적 T세포의 제거(J Immunol. 2000: 164; 161-167) 등이 보고되고 있다. 또한 종양 면역치료에 관해서는, 수상세포에 종양항원을 유전자 도입함으로써, 종양에 대한 면역을 유도하는 것을 기대할 수 있다.

- [0004] 비특허문헌 1: Steinman, R. M., 1991, Ann. Rev. Immunol. 9: 271
- [0005] 비특허문헌 2: Banchereau, J. B. 및 R. M. Steinman, 1998, Nature 392: 245
- [0006] 비특허문헌 3: Akiyama, Y. et al., 2000, Gene Therapy, 7: 2113-2121
- [0007] 비특허문헌 4: Min, W. P., 2000, J. Immunol., 164: 161-167
- [0008] 비특허문헌 5: Hsu, F. J. et al., 1996, Nat. Med. 2, 52-58
- [0009] 비특허문헌 6: Nestle, F. O., et al., 1998, Nat. Med. 4, 328-332
- [0010] 비특허문헌 7: Camporeale, A., et al., 2003, Cancer. Res. 63, 3688-3694
- [0011] 비특허문헌 8: Bon, L. A., et al., 2003, Nat. Immunol. 4, 1009-1015
- [0012] 비특허문헌 9: Xia, D. J., et al., 2002, Gene therapy, 9, 592-601
- [0013] 비특허문헌 10: Mullins, D. W. et al., 2003, J. Exp. Med. 198, 1023-1034
- [0014] 비특허문헌 11: Okada, T. et al., 2003, Gene therapy 10, 1891-1902
- [0015] 비특허문헌 12: Nakahara, S. et al., 2003, Cancer Res. 63, 4112-4118
- [0016] 비특허문헌 13: Teitz-Tennenbaum, S. et al., 2003, Cancer Res. 63, 8466-8475
- [0017] 비특허문헌 14: Imboden, M. et al., 2001, Cancer Res. 61, 1500-1507
- [0018] 비특허문헌 15: Goldszmid, R. S. et al., 2003, J. Immunol. 171, 5940-5947
- [0019] 비특허문헌 16: Strome, S. E. et al., 2002, Cancer Res. 62, 1884-1889

발명의 상세한 설명

- [0020] 발명의 개시
- [0021] 발명이 해결하고자 하는 과제
- [0022] 본 발명은, 수상세포에 유전자를 도입하는 방법을 제공한다. 또한 본 발명은, 유전자가 도입된 수상세포의 제조 방법을 제공한다. 또한 본 발명은, 본 발명의 방법에 의해 유전자 도입된 수상세포의 이용을 제공한다. 또한 본 발명은, 본 발명의 방법에 의해 유전자가 도입된 수상세포를 제공한다. 더욱이 본 발명은, 수상세포로의 유전자 도입을 위한 바이러스 벡터를 제공한다. 또한 본 발명은, 수상세포를 활성화시키는 방법을 제공한다.
- [0023] 과제를 해결하기 위한 수단
- [0024] 본 발명자들은, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는 수상세포로의 유전자 도입을 위한 매우 우수한 벡터인 것을 발견하였다. 유전자 도입 효율은, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 단시간 수상세포에 접촉시키는 것 만으로 좋고, 발현은 장기에 걸쳐 검출 가능하였다. 또한, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 수상세포에 감염시키는 것 만으로, 수상세포를 활성화시킬 수 있었다.
- [0025] 수상세포로의 유전자 도입은 여러 가지의 면역요법으로의 적용이 기대되고 있지만, 지금까지 수상세포로의 유전자 도입수법은 번잡하거나, 도입 효율이 충분하지 않았다. 본 발명에 의해, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 사용하여, 매우 단순한 순서로 수상세포에 외래 유전자를 도입할 수 있는 것이 실증되었다. 본 발명의 방법을 사용하면, 수상세포로의 유전자 송달을 효율적으로 실시하는 것이 가능해져, 면역요법에 있어서의 수상세포의 유전자 개변으로의 적용이 기대된다.
- [0026] 즉 본 발명은, 수상세포에 유전자를 도입하는 방법 등에 관한 것이고, 보다 구체적으로는, 청구항의 각 항에 기재된 발명에 관한 것이다. 또한 동일한 청구항을 인용하는 청구항에 기재된 발명의 하나 또는 복수의 조합으로 되는 발명은, 그들의 청구항에 기재된 발명에 이미 의도되어 있다. 즉, 본 발명은,
- [0027] [1] 유전자 도입된 수상세포의 제조방법으로서, 수상세포 또는 그의 전구세포(precursor cell)에 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 접촉시키는 공정을 포함하는 방법,
- [0028] [2] 성숙 수상세포의 제조방법으로서, 수상세포 또는 그의 전구세포에 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 접촉시키는 공정을 포함하는 방법,
- [0029] [3] [1] 또는 [2] 에 있어서, 접촉공정이 미성숙 수상세포에 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 접촉시키는 공정인 방법,
- [0030] [4] [1] 내지 [3] 중 어느 하나에 있어서, 접촉공정이 CD34⁺ 세포에 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 접촉시키는 공정인 방법,
- [0031] [5] [1] 내지 [4] 중 어느 하나에 있어서, 접촉 전 또는 후의 세포를 GM-CSF 및 IL-4 존재하에서 배양하는 공정을 추가로 포함하는 방법,
- [0032] [6] [1] 내지 [5] 중 어느 하나에 있어서, 상기 벡터가 사이토카인 유전자를 가지는 방법,
- [0033] [7] [6] 에 있어서, 사이토카인이 인터페론 β (interferon β)인 방법,
- [0034] [8] [1] 내지 [7] 중 어느 하나에 있어서, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터가 파라믹소바이러스 벡터(paramyxovirus vector)인 방법,
- [0035] [9] [8] 에 있어서, 파라믹소바이러스 벡터가 센다이 바이러스 벡터(Sendai virus vector)인 방법,
- [0036] [10] [1] 내지 [9] 중 어느 하나에 있어서, 세포가 인간세포인 방법,
- [0037] [11] [1] 내지 [10] 중 어느 하나의 방법에 의해 제조된, 상기 벡터를 보유하는 세포,
- [0038] [12] [11] 에 있어서, 성숙 수상세포인 세포,
- [0039] [13] [11] 또는 [12] 의 수상세포를 종양부위에 투여하는 공정을 포함하는, 종양증식을 억제하는 방법,
- [0040] [14] [13] 에 있어서, 수상세포에 종양항원을 접촉 및/또는 발현시키는 공정을 추가로 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0041] 발명의 효과

- [0042] 수상세포는 높은 면역 유도능을 갖기 때문에, 본 발명의 방법에 의해 목적의 항원 유전자 또는 면역 활성화 유전자를 수상세포에 도입함으로써, 암 및 감염증 등의 면역치료에 유용한 수상세포(DC) 백신을 제조하는 것이 가능해진다. 예를 들면, 종양 면역치료에 관해서는, 수상세포에 종양항원을 제시시키기 위해, 종양세포의 세포 용해물(cell lysate)과 혼합하는 방법, 펩티드 펄스하는 방법(peptide pulse method), 및 수상세포에 종양항원 유전자를 도입하는 방법 등을 사용할 수 있다. 이들 중에서도 수상세포에 종양항원을 유전자 도입하는 방법은, 종양 용해물(tumor lysate) 및 펩티드 펄스보다도 in vivo에서의 종양 항원제시시간의 연장을 기대할 수 있고, 더욱이 HLA의 제한(펩티드의 경우; 펩티드는 항원 유래의 어떤 펩티드를 사용하지만, HLA와의 결합 관계상, HLA의 종류가 바뀌면, 그 항원 중 사용하는 펩티드의 부위가 변화한다) 등을 받지 않게 되는 이점을 갖는다.
- [0043] 수상세포에 유전자를 도입하는 벡터로서, 플라스미드를 도입하는 리포솜법(liposome method), 전기천공법(electroporation) 등이 있지만, 도입효율이 낮아, 비실용적으로 간주되고 있다(Cancer gene Ther 1997, 4, 17-25s). 실용적인 벡터로서, 이하의 3종류의 벡터가 있다. i) 아데노바이러스 벡터(adenoviral vector)(J. Immunotherapy 2002; 25; 445-454, Gene therapy 2000; 7; 249-254), ii) 레트로바이러스 벡터(retroviral vector)(J. Leuko. Biol., 1999; 263-267., Br. J. Haematol. 2000; 108; 817-824), iii) 렌티바이러스 벡터(lentiviral vector)(J. Gene Med. 2001; 3; 311-320, J. Immunol. Meth. 2002; 153-165, Mol. Ther., 2002; 283-290, Cancer Gene Therapy 2002; 9; 715-724).
- [0044] 이들 중, ii)의 레트로바이러스 벡터는 증식기의 세포에 밖에 도입할 수 없다. 또한, 세포상해성이 있는 폴리브렌(polybrene) 등의 도입 보조인자가 필요하여, 도입에 시간이 걸린다. 그 때문에, 세포의 생존성(viability)이 저하되기 쉽다고 하는 결점이 있다. 또한, 말초혈로부터 유도된 수상세포로는 도입 효율이 더욱 안정기 때문에, 일반적으로 CD34 양성의 세포에 벡터를 도입한 후에, 수상세포로 분화 유도한다고 하는 방법이 사용된다. 이 때, 골수세포나 제대혈(cord blood)이나 G-CSF로 고정화(immobilization)시킨 말초혈이 필요해지기 때문에, 매우 환자에게 침습적(invasive)이다. 또한, 수상세포로의 레트로바이러스 벡터의 도입은, 수상세포의 활성화 상태를 높일 수 없다. 또한, 레트로바이러스 벡터는, 바이러스 핵산을 세포의 계놈에 삽입하기 때문에, 계놈 손상이 우려된다. 또한, 일반적으로 도입 효율이 낮고, 소팅(sorting) 등에 의해 벡터 도입 세포의 선택성이 필요하다.
- [0045] iii)의 렌티바이러스 벡터도, 레트로바이러스 벡터와 동일하게, 벡터의 도입에 시간이 걸린다. 그 때문에 세포의 생존성(viability)이 저하될 가능성이 있다. 렌티바이러스는 정지기의 세포(resting cell)에도 유전자를 도입하는 것으로 알려져 있지만, 수상세포가 어느 정도 분화하고, 증식활성을 잃었을 때의 효율은, 추가 한정(postentry restriction)(J. Virol.; 75; 5448-5456) 때문에 대체로 매우 안정다(수%). 또한, 말초혈로부터 유도된 수상세포로는 도입 효율이 더욱 안정기 때문에, CD34 양성의 줄기세포(stem cell)에 도입한 후에 in vitro에서 수상세포를 얻는다고 하는 방법으로 밖에 사용할 수 없다(이 때, 골수세포나 제대혈이나 G-CSF로 고정화시킨 말초혈이 필요해져, 환자에게 침습적이다). 이 문제는 최근의 벡터 개변기술에 의해 극복되고 있고, SIV의 경우, 헬퍼 컨스트럭트(helper construct)에 있어서 vpx(proviral DNA의 핵내 이행을 촉진한다)를 남김으로써, 또는, HIV로 DNA-flap 시퀀스를 삽입(이것도 proviral DNA의 핵내 이행을 촉진한다)함으로써, 말초혈 유래 단구 및 분화된 수상세포로의 유전자 도입이 가능해졌다(Mol. Ther. 2002; 283-290). 그러나, 또한, 단구로부터 수상세포를 분화시키는 조기의 단계에서 감염시킬 필요가 있기 때문에, 수상세포의 분화가 삽입 유전자에 의해 장애를 받을 가능성이 있다. 또한, 도입 효율이 도너(donor) 사이에서 불균일하다. 또한, 벡터의 도입은 수상세포의 활성화 상태를 높일 수 없다. 또한, 상기 레트로바이러스 벡터와 동일하게, 계놈 손상, 악성 종양 발생의 위험성이 있어, 현시점에서 실용화의 장벽이 되고 있다. 또한, 도입 효율이 낮고, 일반적으로 선택성이 필요하거나, 도입 효율의 개선을 위해 도입에 높은 농도의 역가(titer)가 필요하여, 임상응용에 적용하기 어렵다. 또한, 원심 등의 보조조작 또는 폴리브렌 등의 보조인자가 필요해져, 도입 기술이 번잡하고, 장기간이 필요하다. 또한, 벡터의 정제에 비용이 드는 문제도 있다.
- [0046] 한편, i)의 아데노바이러스에 관해서는, 그의 도입 효율(약 80%)과 분화된 수상세포로 직접 유전자 도입할 수 있기 때문에, 수상세포 유전자 도입용 벡터로서 기대되고 있지만, 도입 소요시간은 시간 의존성으로 최대 도입 효율을 얻기 위해 72시간 정도 필요하다(J. Immunotherapy 2002; 25; 445-454). 추가로, 마이너스 가닥 RNA 바이러스와 비교하여, 10배~100배의 역가가 필요하다. 더욱 결정적인 것으로는, 유전자 도입 효율을 높게 하는 MOI에서는 알로 T세포(allo T cell)의 혼합 림프구 반응(mixed lymphocyte reaction; MLR)을 저하시키는 면역억제작용이 있는(Gene Therapy 2000; 7; 249-254) 것이 문제가 되고 있다(특히 높은 DC: T의 비율로). 또한, 에피솜(episome)의 회석을 위해, CD34 양성 세포 등의 줄기세포에 유전자 도입 후에 수상세포를 분화시키는 방법이 곤란해지는 경우가 있다.

[0047] 수상세포로의 유전자 도입을 위해 필요한 조건으로서는, 높은 도입 효율, 유전자 도입의 기술적 안정성, 간편성, 임상적 안전성, 수상세포의 T세포 활성화 능력 보유 등을 들 수 있지만, 지금까지 이들의 조건을 모두 겸비한 벡터가 존재한다고는 말하기 어려웠다. 이에 대하여 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 사용한 경우, 유전자 도입은 매우 단기간의 접촉으로 종료되고, 100%에 가까운 도입 효율을 얻을 수 있으며, 또한 알로 T세포 응답의 억제 정도는 비교적 경도하여, T세포의 자극성이 유지되었다. 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는, 세포질 내에서 단백 발현능력을 소지하고, 핵 내로의 이행이나 게놈으로의 유전자 삽입의 필요성이 없어 안전한 것을 고려하면, 상기 모든 조건을 만족한 벡터라고 할 수 있다. 또한, 면역 부활(종양 면역 등)에 사용함에 있어서, 상기의 i)에서 iii)의 벡터에서는 유전자 도입에 의해 수상세포의 활성화 상태가 변화하지 않지만, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 유전자 도입은 수상세포의 활성화를 야기하기 때문에, 도입 후의 사이토카인 등에서의 활성화처리의 공정이 생략 가능하고, 세포의 생존성 유지나 비용 삭감, 더 나아가서는 ex vivo에서의 조작 시간의 삭감에 기여하는 것으로 생각되어진다. 또한, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터로 유전자 도입된 수상세포를 사용하여, T세포 이입요법에 필요한 활성화 T세포, 특히 종양 특이적 세포상해성 T세포 등을 ex vivo에서 효율적으로, 단기간, 간단하게 유도할 수 있는 것도 확인되었다. 더 나아가서는, 벡터를 줄기세포에 유전자 도입 후에 수상세포를 분화시킨 경우의 도입 효율도 약 70% 가까이 달하여, 렌티바이러스 벡터에 필적하였다. 이들의 특징은, 임상응용에 있어서의 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 적용범위를 확대시킨다.

[0048] 도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은, 말초혈 단구 농축세포의 단핵세포에 유래하는 수상세포의 표현형을 나타내는 도면이다. PI로 판별할 수 있었던 생세포에 게이트(gate)를 달아, 항CD11c-PE 결합항체 및 항HLA-class II(DR, DP, DQ) FITC 결합항체를 사용하여, CD11c 및 HLA-class II(DR, DP, DQ)의 발현을 관찰하였다(왼쪽 매트릭스). 추가로 CD11c 및 HLA-class II(DR, DP, DQ)가 모두 양성 게이트를 선택하여, 1) 항CD14-APC 결합항체, 2) 항CD1a-APC 결합항체, 3) 항CD80-비오틴(biotin) 결합항체(2차적으로 스트렙토아비딘(streptavidin)-APC로 염색)를 사용하여, 각각의 발현 레벨을 CD11c와의 도트 플롯(dot plot)으로 나타내었다(오른쪽 3개의 매트릭스). 또한, 실시예 중의 "Class II"는 HLA-DR, DQ, DP를 모두 인식하는 항체를 사용한 결과를, "HLA-DR"은 HLA-DR을 특이적으로 인식하는 항체를 사용한 결과를 나타낸다.

[0050] 도 2는, SeV-GFP를 도입한 DC에 있어서의 GFP 및 보조자극분자(costimulatory molecules)의 발현을 나타내는 도면이다.

[0051] 도 3은, 인간 단구 유래 수상세포로의 SeV-GFP의 도입 효율과 수상세포의 활성화를 나타내는 도면이다(감염 후 2일째).

[0052] 도 4는, 인간 단구 유래 수상세포로의 SeV-GFP의 도입 효율과 수상세포의 활성화를 나타내는 도면이다(감염 후 4일째).

[0053] 도 5는, 인간 단구 유래 수상세포로의 SeV-GFP의 도입 효율과 수상세포의 활성화를 나타내는 도면이다(감염 후 8일째).

[0054] 도 6은, SeV-GFP 도입 후의 DC수의 변화를 나타내는 도면이다.

[0055] 도 7은, SeV-GFP 도입 후의 GFP 발현기간을 나타내는 도면이다.

[0056] 도 8은, 인간 DC로의 SeV-GFP 도입 효율에 있어서의 LPS 자극의 효과를 나타내는 도면이다.

[0057] 도 9는, 인간 DC로의 SeV-GFP 도입 효율에 있어서의 LPS 자극의 효과를 나타내는 도면이다.

[0058] 도 10은, DC로의 유전자 도입에 있어서의 인큐베이션 시간의 검토결과를 나타내는 도면이다.

[0059] 도 11은, 제대혈 유래의 DC로의 유전자 도입을 나타내는 도면이다.

[0060] 도 12는, 제대혈 유래의 DC로의 유전자 도입을 나타내는 도면이다.

[0061] 도 13은, 유전자 도입 후의 보조자극분자의 발현을 나타내는 도면이다(LPS 자극과의 비교).

[0062] 도 14는, 유전자 도입 후의 보조자극분자의 발현을 나타내는 도면이다(LPS 자극과의 비교).

[0063] 도 15는, 유전자 도입 후의 보조자극분자의 발현을 나타내는 도면이다(LPS 자극과의 비교).

[0064] 도 16은, 유전자 도입 후의 식세포능(phagocytic ability)을 나타내는 도면이다.

- [0065] 도 17은, 유전자 도입 후의 식세포능을 나타내는 도면이다.
- [0066] 도 18은, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 도입 후의 단구 유래 DC의 사이토카인 생산을 나타내는 도면이다.
- [0067] 도 19는, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 도입 후의 수상세포상의 마커 단백질의 발현을 나타내는 도면이다.
- [0068] 도 20은, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 도입 후의 수상세포상의 마커 단백질의 발현을 나타내는 도면이다.
- [0069] 도 21은, SeV-GFP를 도입한 DC의 알로 T세포 자극능을 나타내는 도면이다.
- [0070] 도 22는, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 도입에 의해, MART-1 특이적 CTL을 인 비트로(in vitro)에서 유도한 결과를 나타내는 도면이다.
- [0071] 도 23은, 피하 접종된 B16 흑색종 세포(melanoma cell)의 증식곡선을 나타내는 도면이다.
- [0072] 도 24는, YAC-1 타겟 세포의 ⁵¹Cr 방출 어세이의 결과를 나타내는 도면이다.
- [0073] 도 25는, TRP2 펩티드+EL-4의 ⁵¹Cr 방출 어세이의 결과를 나타내는 도면이다.
- [0074] 발명을 실시하기 위한 최선의 형태
- [0075] 본 발명은, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 사용하여 유전자 도입된 수상세포를 제조하는 방법을 제공한다. 이 방법은, 도입하려는 목적의 유전자를 보유하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를, 수상세포 또는 그의 전구세포에 접촉시키는 공정을 포함하는 방법이다. 본 발명자 등은, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터가 매우 높은 효율로 수상세포로 유전자를 도입할 수 있는 것을 발견하였다. 또한 벡터의 도입은 수상세포를 활성화시켜, 사이토카인으로 자극하지 않고 성숙 수상세포로 분화시켰다. 얻어진 성숙 수상세포는, T세포를 활성화시키는 능력을 보유하고 있었다. 본 발명의 방법은, 수상세포에 목적의 항원을 제시시키거나, 또는 수상세포에서 목적의 사이토카인 또는 그 밖의 생리활성인자를 발현시키는데 유용하다. 본 발명의 방법에 의해 유전자 개변된 수상세포는 면역계를 활성화시키는 높은 능력을 가지고 있어, 감염증, 암, 기타, 면역 유도에 의해 유익한 효과를 기대할 수 있는 목적 질환의 예방 및 치료에 있어서 적합하게 사용될 수 있다. 벡터와 수상세포와의 접촉은, in vivo 또는 in vitro에서 행할 수 있고, 예를 들면, 배양액, 생리식염수, 혈액, 혈장, 혈청, 체액 등의 목적의 생리적 수용액 중에서 실시하면 된다.
- [0076] 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 도입 효율은, 수상세포가 비활성화 상태(미성숙 상태)인 쪽이, 성숙 수상세포에 대한 것 보다도 현저하게 높다. 따라서, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는, 미성숙 수상세포에 접촉, 또는 미성숙 수상세포를 포함하는 세포 분획(cell fraction)과 혼합하는 것이 바람직하다. 이와 같은 방법도, 본 발명에 있어서의 수상세포에 유전자를 도입하는 방법에 포함된다. 수상세포는, 세균 또는 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide)(LPS), 이중 가닥 RNA(double-stranded RNA) 등과의 접촉에 의해 활성화된다. 유전자 도입하는 수상세포를 이와 같은 방법으로 별도 활성화시키는 경우는, 활성화한 후 벡터를 도입해도 되지만, 벡터의 도입 효율이 저하되지 않도록 하기 위해, 활성화의 조작을 벡터의 도입 전이 아니라, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터에 의해 유전자를 도입한 후(또는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 수상세포에 접촉시키는 것과 동시에) 행하는 것이 바람직하다.
- [0077] 단순한 기술에 의해 높은 효율로 유전자 송달이 일어나는 것은, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 매개로 한 수상세포로의 유전자 송달의 중요한 우위성의 하나이다. 레트로바이러스 벡터 등을 매개로 한 수상세포로의 유전자 송달은 효율이 낮고, 추가로 유전자 도입시에 폴리브렌 등의 독성이 있는 약제를 필요로 하는 경우가 있다. 한편으로 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는 특별한 약제를 필요로 하지 않고, 단순히 수상세포를 포함하는 용액 중에 벡터를 첨가하는 것만으로 보다 우수한 유전자 송달을 달성할 수 있었다. 추가로, 수상세포로의 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 매개로 하는 유전자 송달은, 매우 짧은 폭로(exposure)(30분 이하)로 최적 효율을 달성할 수 있었다. 임상 장소를 생각하면, 이들의 특징은, 수상세포의 ex vivo 및 in vivo 등에 있어서의 유전적 개변을 단순화하여, 조작에 의존한 세포 생존성의 상실 등의 악영향을 최소화할 수 있는 것이다.
- [0078] 벡터와 수상세포와의 접촉에 있어서는, MOI(다중감염도; 세포 하나당 감염 바이러스수)는 1~500 사이로 하는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 2~300, 더욱 바람직하게는 3~200, 더욱 바람직하게는 5~100, 더욱 바람직하게는 7~70이다. 벡터와 수상세포와의 접촉은 짧은 시간으로도 충분하고, 예를 들면, 1분 이상, 바람직하게는 3

분 이상, 5분 이상, 10분 이상, 또는 20분 이상 접촉시키면 되고, 예를 들면, 1~60분 정도, 보다 특정하면 5분~30분 정도면 된다. 물론, 그 이상의 시간을 접촉시켜도 되고, 예를 들면, 수일간 또는 그 이상 접촉시켜도 된다. 접촉은 체내에서도 체외에서도 실시할 수 있다. 예를 들면, 체내에서 추출한 수상세포 또는 그의 전구세포를 체외에서 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터와 접촉시켜, 벡터를 도입 후에 체내로 되돌리는 ex vivo 유전자 도입에 있어서, 본 발명의 방법은 적합하게 사용된다.

[0079] 또한, 본 발명의 방법의 특징 중 하나는, 수상세포로 유전자를 도입한 후, 장기간에 걸쳐 도입 유전자의 발현이 지속되는 것이다. 본 발명의 방법에 의해, 벡터를 수상세포에 감염시킨 후 2일간 이상, 예를 들면 3일간 이상, 5일 이상, 10일 이상, 14일 이상, 30일 이상, 50일 이상, 추가로 60일 이상에 걸쳐, 도입 세포에 있어서 도입 유전자의 발현이 검출된다.

[0080] 또한 본 발명은, 미성숙 수상세포에 선택적으로 유전자를 도입하는 방법으로서, 상기 유전자를 보유하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를, 미성숙 수상세포 및 성숙 수상세포를 포함하는 세포 집단 중에 공존시키는 공정을 포함하는 방법을 제공한다. 미성숙 수상세포에 선택적이라는 것은, 성숙 수상세포에 비하여 미성숙 수상세포로 현저하게 높은 비율로 유전자가 도입되는 것을 말한다. 즉, 전체 성숙 수상세포 중에서 벡터가 도입된 성숙 수상세포의 비율보다도, 전체 미성숙 수상세포 중에서 벡터가 도입된 미성숙 수상세포의 비율 쪽이 현저하게 높다. 예를 들면, 본 발명은, 도입하려는 유전자를 보유하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를, 미성숙 수상세포 및 성숙 수상세포를 포함하는 세포 집단 중에 첨가하는 공정을 포함하는 방법을 제공한다. 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는, 성숙 수상세포에 비하여 미성숙 수상세포로 우선적으로 유전자를 도입하기 때문에, 이 방법에 의해 미성숙 수상세포에 선택적으로 유전자를 도입할 수 있다. 이들의 방법도, 본 발명에 있어서의 수상세포에 유전자를 도입하는 방법에 포함된다.

[0081] 수상세포(Dendritic cell; DC)란, 성숙 상태에 있어서 수지상 형태를 취하고, 항원을 제시하여 T세포를 활성화시키는 능력을 갖는 세포이다. 수상세포에는, 생체내 각종 조직기관에 분포하는 골수세포 유래의 수지상 형태를 취하는 세포군, 및 골수 또는 혈액 유래의 줄기세포로부터, in vitro에서 사이토카인 등을 이용하여 분화 유도를 가한 생체 내 조직기관에 분포하는 수지상 형태를 취하는 세포와 동등한 세포군이 포함된다. 구체적으로는, 수상세포에는, 예를 들면 림프구계 수상세포(Th2로의 유도 또는 면역 관용을 유도하는 것이어도 된다), 골수구계 수상세포(일반적으로 사용되는 수상세포. 미숙 수상세포 및 성숙 수상세포를 포함한다), 랑게르한스 세포(langerhans cell)(피부의 항원제시세포에서 중요한 수상세포), 상호 연결세포(림프절, 비장의 T세포 영역에 있고, T세포로의 항원제시에 작용하고 있다고 생각되어지는 세포), 여포 수상세포(follicular dendritic cell)(B세포로의 항원제시세포로서 중요, 항원과 항체 복합체, 항원과 보체(complement) 복합체를 항체 리셉터(antibody receptor), 보체 리셉터에 의해, 수상세포상에 제시함으로써, B세포에 항원제시하고 있다.) 등을 포함하는 것으로, 바람직하게는, MHC 클래스 I 및 클래스 II를 고발현(高發現)하고 있고, 더욱 바람직하게는 CD11c를 발현하고 있는 세포이다.

[0082] 또한, 수상세포는, 수지상 형태를 가지고, CD11c, HLA-class II(HLA-DR, -DP, 또는 -DQ), CD40, 및 CD1a로 이루어진 군으로부터 선택되는 표면 마커의 두개 이상이 양성 세포여도 된다. 본 발명에 있어서의 수상세포는, 보다 바람직하게는, HLA-class II⁺ 및 CD11c⁺의 세포, 보다 바람직하게는 CD1a⁺, HLA-class II⁺, 및 CD11c⁺의 세포이고, 또한 T세포 마커(CD3), B세포 마커(CD19, CD20), NK세포 마커(CD56), 호중구 마커(neutrophil marker)(CD15), 단구 마커(CD14)를 발현하고 있지 않는 세포이다. 벡터의 도입에 사용되는 수상세포 집단의 CD14⁺의 비율은, 예를 들면, 10% 이하, 바람직하게는 5% 이하, 더욱 바람직하게는 1% 이하가 좋다.

[0083] 또한, 본 발명에 있어서 수상세포에는 성숙 수상세포 및 미성숙 수상세포가 포함된다. 미성숙 수상세포란, T세포 활성화능력이 낮은 수상세포를 말한다. 구체적으로는, 미성숙 수상세포는, LPS(1 micro-g/ml)를 첨가하여 2일간 배양하고 성숙을 유도한 수상세포에 비하여, 항원제시능이 1/2 미만, 바람직하게는 1/4 미만인 것이어도 된다. 항원제시능은, 예를 들면, 알로 T세포 활성화능(혼합 림프구 시험; 알로 T세포와 수상세포의 혼합 배양으로, T세포 대 수상세포의 비율은 1:10으로 배양, 바람직하게는 그 비율을 변화시켜서 배양한 것이고, 배양종료 8시간 전에 ³H-thymidine을 첨가하여, 그 T세포의 DNA 내의 흡수량에 의해, T세포 증식능력을 정량한 것: 도 21 참조; 문헌 Gene Therapy 2000; 7; 249-254), 또는 펩티드를 사용한 특이적 세포상해성 T세포(CTL)의 유도능 시험(수상세포에, 어느 항원의 어느 Class I 구속성의 기지의 펩티드를 첨가하여, 수상세포를 채취한 것과 동일한 건강한 정상인 말초혈의 T세포를 공배양(3일째 이후는 IL-2를 25 U/ml, 바람직하게는 100 U/ml)(바람직하게는 21일간 3회의 수상세포에 의한 자극, 더욱 바람직하게는 14일간 2회의 수상세포의 자극)하여, 얻어진 이펙터

세포(effector cell) 를 ⁵¹Cr로 라벨된 타겟 세포(class I 구속성의 펩티드 양성 종양세포)를 20:1, 10:1, 5:1, 2.5:1, 바람직하게는 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1로 4시간 혼합 배양하고 타겟 세포의 ⁵¹Cr 유출량(遊出量)으로 정량한 것; 도 22 참조; 문헌 Arch Dermatol Res 2000; 292; 325-332)에 의해 정량할 수 있다. 또한 미성숙 수상세포는, 바람직하게는 항원 식세포능을 가지고, 더욱 바람직하게는 T세포 활성화를 위한 보조자극을 유도하는 수용체의 발현이 저발현(예를 들면 상기와 같이 LPS 유도한 성숙 DC에 비하여 현저하게) 또는 음성이다. 한편으로, 성숙 수상세포란 T세포 활성화 등을 위한 항원제시능력이 높은 수상세포를 말한다. 구체적으로는, 성숙 수상세포는, LPS(1 microp-g/ml)를 첨가하고 2일간 배양하여 성숙을 유도한 수상세포의 항원제시능의 1/2 이상, 바람직하게는 동등 이상의 항원제시능을 갖는 세포여도 된다. 또한 성숙 수상세포는, 바람직하게는 항원 식세포능이 낮거나, 또는 갖지 않고, 더욱 바람직하게는 T세포 활성화를 위한 보조자극을 유도하는 수용체의 발현이 높은 것을 말한다. 또한, 수상세포의 활성화란, 미성숙 수상세포로부터 성숙 수상세포로의 이행을 말하고, 활성화 수상세포에는 성숙 수상세포 및 활성화 자극에 의한 보조자극을 유도하는 CD80, CD86의 발현을 상승시키고 있는 도중 경과의 수상세포가, 그의 범주에 포함된다. CD11c 양성인 수상세포에 있어서는, CD83 양성이 성숙 수상세포의 지표가 된다.

[0084] 예를 들면, 성숙 수상세포는, 바람직하게는 CD40, CD80, CD86 및 HLA-class II의 발현이 강하게 양성인 (strongly positive) 세포여도 된다. 더욱 바람직하게는, 성숙 수상세포는 CD83를 발현한다. 예를 들면, CD80, CD83, 및 CD86로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커를 토대로, 미성숙 수상세포와 성숙 수상세포를 분별할 수 있다. 미성숙 수상세포에서는 이들의 마커는 약하거나, 바람직하게는 음성이지만, 성숙 수상세포에서는 양성이다.

[0085] 상기와 같이, 미성숙 수상세포는, 통상 높은 식세포능을 보유하고 있다. 수상세포에 LPS(1 micro-g/ml)를 첨가하여 2일간 배양하면, 수상세포는 활성화되어 식세포능은 저하된다. 식세포능은, 수상세포 내로의 소분자의 흡수량 또는 흡수 세포(uptaking cell)의 비율을 측정하여 알 수 있다. 바람직하게는, 식세포능은, 수상세포 내로의 소분자의 흡수량으로 결정된다. 예를 들면, 1 micro-m 정도의 착색 비즈를 사용하여, 수상세포 내로의 비즈의 흡수를 측정할 수 있다. 4°C에서 양성이 되는 백그라운드를 빼고 정량한다. 높은 식세포능이란, 수상세포 내로의 소분자의 흡수량이, 수상세포를 상기와 같이 LPS(1 micro-g/ml)로 2일간 자극한 수상세포의 4배 이상, 보다 바람직하게는 5배 이상, 보다 바람직하게는 6배 이상의 식세포능을 말한다. 또는, 소분자의 흡수 세포의 비율이 2배 이상, 보다 바람직하게는 3배 이상이다. 낮은 식세포능이란, 수상세포 내로의 소분자의 흡수량이, LPS(1 micro-g/ml)로 2일간 자극한 수상세포의 4배 미만, 보다 바람직하게는 2배 미만, 보다 바람직하게는 1.5배 미만이다. 또한, 소분자의 흡수 세포의 비율로 측정된 경우에, 2배 미만, 보다 바람직하게는 1.5배 미만이다.

[0086] 성숙 수상세포의 판별은 당업자가 통상 행하고 있고, 상기의 각 마커 및 그의 발현의 측정방법도 당업자에게 주지이다. 예를 들면, CD11c는 약 150 kD의 접착 당단백(p150, 인테그린 알파 사슬(integrin alpha chain))이다. CD11c는 CD18과 결합하여 CD11c/CD18 복합체를 형성하고, 피브리노겐(fibrinogen)으로의 결합력을 가지며, 또한, iC3b 및 ICAM-1의 수용체가 되는 것이 보고되어 있다. 또한, CD11c/CD18은 자극을 받은 상피의 수용체에 결합하는 접착분자로서 작용할 수 있는 것이 보고되어 있다(Knapp, W. et al., eds., 1989, Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens, Oxford University Press, New York; Barclay, N. A. et al., eds., 1993, The Leucocyte Antigen FactsBook, CD11 Section, Academic Press Inc., San Diego, California, p. 124; Stacker, S. A. and T. A. Springer, 1991, J. Immunol. 146: 648).

[0087] CD1a는 약 49 kD의 폴리펩티드로 베타2 마이크로글로불린(beta2 microglobulin)과 결합한다. CD1a는 MHC class I 항원과 구조적으로 유사하여, 항원제시에 기능하는 것으로 간주된다(Knapp, W. et al., eds., 1989, Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens, Oxford University Press, New York; Schlossman, S. et al., eds., 1995, Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press, New York; Hanau, D. et al., 1990, J. Investigative Dermatol. 95: 503; Calabi, F. and A. Bradbury., 1991., Tissue Antigens 37: 1).

[0088] CD14은 53-55 kD의 글리코실포스파티딜이노시톨(glycosylphosphatidylinositol)(GPI) 앵커형 단쇄 당단백(anchored single-chain glycoprotein)으로, 세망 수상세포(dendritic reticulum cell) 및 어느 종의 랑게르한스 세포에서 발현한다. CD14은 LPS와 혈청 LPS 결합 단백질(LPB)의 복합체에 대한 고친화성 표면 수용체로서 동정되었다(McMichael, A. J. et al., eds., 1987, Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens, Oxford University Press, New York; Knapp, W. et al., eds., 1989, Leucocyte Typing IV: White

Cell Differentiation Antigens, Oxford University Press, New York; Schlossman, S. et al., eds., 1995, Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press, New York; Wright, S. D. et al., 1990, Science 249: 1434).

- [0089] CD40는 45-48 kD의 I형 막 감입형 단백질(type I integral membrane glycoprotein)로서, CD40는 세포 마커로서 자주 사용되고 있다(Schlossman, S. et al., eds., 1995, Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press, New York; Galy, A. H. M.; and H. Spits, 1992, J. Immunol. 149: 775; Clark, E. A. and J. A. Ledbetter, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 4494; Itoh, H. et al., 1991, Cell 66: 233, Barclay, N. A. et al., 1993, The Leucocyte Antigen Facts Book., Academic Press).
- [0090] CD80는 약 60 kD의 막관통형 당단백으로서 Ig 초유전자군(supergene family)의 일원이다. CD80는 T세포에서 발현하는 CD28 및 CD152(CTLA-4)의 리간드이다(Schlossman, S. et al., eds., 1995, Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press, New York; Schwartz, R. H., 1992, Cell 71: 1065; Azuma, M. et al., 1993, J. Exp. Med. 177: 845; Koulova, L. et al., 1991, J. Exp. Med. 173: 759; Freeman, G. J. et al., 1998, J. Immunol. 161: 2708; Behrens, L. et al., 1998, J. Immunol., 161(11): 5943; Guesdon, J. -L. et al., 1979, J. Histochem. Cytochem. 27: 1131-1139).
- [0091] CD83는 약 45 kD의 막 관통 단백질로 Ig 상과(superfamily)의 일원이다. CD83는 단쇄(short chain)의 V형 Ig의 세포의 도메인과 C 말단의 세포질 꼬리(cytoplasmic tail)를 갖는다. CD83는 주로 여포 수상세포, 순환 수상세포, 림프 조직의 상호 연결(interdigitating) 수상세포, in vitro에서 생성시킨 수상세포, 및 흉선 수상세포에 발현한다(Zhou, L-J., and T. F. Tedder, 1995, J. Immunol. 154. 3821; Zhou, L-J. et al., 1992, J. Immunol. 149: 735; Summers, K. L. et al., 1995, Clin Exp. Immunol. 100: 81; Weissman, D. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci USA. 92: 826; Hart, D. N. J., 1997, Blood 90; 3245).
- [0092] CD86(B70/B7-2)는 약 75 kD의 세포 표면 단백질에서 CD28 및 CTLA-4의 제2의 리간드로서 초기 면역 응답에 있어서의 T세포의 보조자극에 중요한 역할을 갖는다(Azuma, M. et al., 1993, Nature 366: 76; Nozawa Y. et al., 1993, J. Pathology 169: 309; Engle, P. et al. 1994., Blood 84: 1402; Engel, P. et al., CD86 Workshop Report. In: Leukocyte Typing V. Schlossman, S. F. et al. eds., 1994, Oxford University Press; Yang, X. F. et al., 1994, Upregulation of CD86 antigen on TPA stimulated U937 cells, 1994, (abstract). American Society of Hematology, Nashville, TN; Guesdon, J. -L. et al., 1979, J. Histochem. Cytochem. 27: 1131-1139).
- [0093] CCR7은 BLR-2, EBI-1, 및 CMKBR7이라고도 불리우는 7회 막 관통형 G 단백질 결합 수용체로서, CC 케모카인(chemokine)인 MIP-3beta/Exodus 3/ELC/CCL19 및 6CKine/Exodus 2/SLC/TCA4/CCL21의 수용체이다(Sallusto, F. et al., 1999, Nature 401: 708-12; Lipp, M. et al., 2000, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 251: 173-9; Birkenbach, M. et al., 1993, J. Virol. 67: 2209-20; Schweickart, V. L. et al., 1994, Genomics 23: 643-50; Burgstahler, R. et al., 1995, Biochem. Biophys. Res. Commun. 215: 737-43; Yoshida, R. et al., 1997, J. Biol. Chem. 272: 13803-9; Yoshida, R et al., 1998, J. Biol. Chem. 273: 7118-22, Yoshida, R. et al., 1998, Int. Immunol. 10: 901-10; Kim, C. H. et al., 1998, J. Immunol. 161: 2580-5; Yanagihara, S. et al., 1998, J. Immunol. 161: 3096-102).
- [0094] HLA-class II는 DR, DP, 및 DQ가 있고, 그 모두에 결합하는 항체에 의해 망라적으로 검출할 수 있다(Pawelec, G. et al., 1985, Human Immunology 12: 165; Ziegler, A. et al., 1986, Immunobiol. 171: 77). HLA-DR은 MHC의 인간 class II 항원의 하나로 알파 사슬(alpha chain)(36 kDa)과 베타 서브유닛(beta subunit)(27 kDa)으로 되는 막관통 당단백질이다. 피부의 랑게르한스 세포에서는 CD1a 항원과 공발현한다. CD1a는 항원제시에 있어서 세포의 상호 작용에 주요한 역할을 한다(Barclay, N. A. et al., 1993, The Leucocyte Antigen Facts Book. p. 376. Academic Press).
- [0095] 또한 인간 이외의 포유동물에 관해서도, 상기 마커 유전자의 상동 유전자 산물을 지표로 수상세포를 특정할 수 있다. 이들의 마커에 대한 항체는, 예를 들면, BD Biosciences사(BD PharMingen)로부터 입수할 수 있고, 그의 상세는 동사 또는 판매 대리점의 웹사이트에서 알 수 있다.
- [0096] 또한, 수상세포 마커에 관해서는, 이하의 Kiertscher 등 및 Oehler 등의 문헌도 참조할 것(Kiertscher SM, Roth MD, Human CD14⁺ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4, J. Leukoc. Biol., 1996, 59(2): 208-18; Oehler, L. et al.,

Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics., J. Exp. Med., 1998, 187(7): 1019-28). 또한, 플로우 사이토메트리(flow cytometry)에 관해서는, Okano 등, 및 Stites 등의 문헌을 참조할 수 있다(Okano, S. et al., Recombinant Sendai virus vectors for activated T lymphocytes., Gene Ther., 2003, 10(16): 1381-91; Stites, D. et al., Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in AIDS using monoclonal antibodies and simultaneous dual immunofluorescence., Clin. Immunol. Immunopathol., 1986, 38: 161-177). 각 마커의 발현에 대해서는, 예를 들면, isotype control antibody로 염색했을 때에, 양성률이 1% 이하인 형광강도를 경계로 하여, 그 이상은 양성, 그 미만은 음성으로 판단된다.

[0097] 수상세포 또는 그의 전구세포의 조제는, 공지의 방법에 따라 또는 준하여 행할 수 있다. 예를 들면, 혈액(예를 들면, 말초혈 또는 제대혈), 골수, 림프절, 기타 림프기관, 비장, 피부 등으로부터 분리할 수 있다. 바람직하게는, 수상세포는, 본 발명에 사용하기 위해 혈액 또는 골수로부터 얻어진다. 또한, 본 발명에서 사용되는 수상세포는, 피부의 랑게르한스 세포, 수입 림프관(afferent lymphatic)의 베일 세포(veiled cell), 여포 수상세포, 비장의 수상세포, 및 림프기관의 지상 돌기세포(interdigitating cell) 등이어도 된다. 또한 본 발명에서 사용되는 수상세포는, CD34⁺ 유래 수상세포, 골수 유래 수상세포, 단구 유래 수상세포, 비장세포(splenic cell) 유래 수상세포, 피부 유래 수상세포, 여포 수상세포, 및 배중심 수상세포(germinal center dendritic cell)로 이루어진 군으로부터 선택되는 수상세포가 포함된다. CD34⁺ 유래 수상세포는, 제대혈 또는 골수 등으로부터 얻은 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell) 또는 조혈모세포(hematopoietic progenitor cell) 등으로부터, 과립구 콜로니 자극인자(granulocyte colony stimulating factor)(G-CSF), 과립구 매크로파지 콜로니 자극인자(granulocyte macrophage colony stimulating factor)(GM-CSF), 종양 nek로시스 팩터(tumor necrosis factor)(TNF)-alpha, IL-4, IL-13, 줄기세포 팩터(stem cell factor)(SCF), Flt-3 리간드, c-kit 리간드, 또는 그의 조합 등에 의해 분화시킬 수 있다. 예를 들면, 말초혈의 단구를 GM-CSF 및 IL-4에 의해 미성숙 수상세포로 분화시키고, 추가로 TNF-alpha로 자극함으로써 성숙 수상세포로 분화시킬 수 있다.

[0098] 수상세포 및 그 이외의 세포를 포함하는 조성물로부터 수상세포를 선택(또는 농축)하는 경우는, 수상세포 이외의 세포를 제거하는 이른바 네거티브 셀렉션을 실시하는 것이 바람직하다. 네거티브 셀렉션을 사용함으로써, DC-과립구(granulocytes)의 전구체(precursor)(J. Exp. Med., 1998, 187: 1019-1028; Blood, 1996, 87: 4520-4530)가 제거되지 않고 남아, 접착성 CD14 세포로부터 분화된 DC 뿐만 아니라, 그들의 전구체(precursor)로부터 분화된 DC를 합쳐서 회수하는 것이 가능하다고 생각되어진다. 이에 따라, 백터 도입에 의한 세포상해성을 경감하는 것을 기대할 수 있다.

[0099] 예를 들면, T세포, NK세포, B세포 등에 특이적인 항체를 사용하여, 이들의 세포를 제거함으로써, 수상세포를 농축하는 것이 가능하다. 구체적으로는, 예를 들면, CD2, CD3, CD8, CD19, CD56, CD66b로부터 선택되는 표면 마커 또는 그 임의의 조합의 발현이 낮거나 또는 음성의 세포(low or negative cell)를 얻는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, CD2, CD3, CD8, CD19, CD56, 및 CD66b의 전부가 낮거나 또는 음성의 세포이다. 그 때문에, 이들의 마커에 대한 항체를 사용하여, 이들의 마커를 발현하는 세포를 제거하면 된다(Hsu 등(1996) Nature Med. 2: 52). 또한, 네거티브 셀렉션에 있어서는, 본 실시예에 나타내어지고 있는 것과 같은 다가항체(polyvalent antibody)를 사용하여 행할 수 있고, 또는 자기세포 분리(magnetic cell separation)(MACS)를 위해 비즈 등을 사용해도, 동일한 셀렉션을 실시하는 것이 가능하다. 혈구 분리 등을 사용하여 단핵구를 채취하는 등, 세포를 대량으로 조정하는 경우는 비즈를 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들면, 생체로부터 얻은 세포용액으로부터 단구를 농축(enrich)하고, 이에 대하여 네거티브 셀렉션을 행하여 조제한 수상세포를 본 발명에 있어서 적합하게 사용할 수 있다.

[0100] 또한, 마이너스 가닥 RNA 바이러스를 도입하기 전에 접착세포에 의해 얻어진 말초혈 단구를 수상세포로 분화시킨 것을 선택하면, 백터의 도입 효율이 저하되는 경우가 있다. 본 발명에서 사용되는 수상세포는 이것에 한정되는 것은 아니지만, 미성숙 수상세포의 비율을 저하시키지 않도록, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 백터를 접촉시키기 전의 세포배양은, 고체 지지체(solid support)(예를 들면, 배양 접시 또는 병 등의 배양용기)에 접촉된 세포를 선택하는 공정을 포함하지 않는 것이 바람직하다. 즉, 본 발명은, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 백터와 수상세포와의 접촉 전의 24시간 이내에, 고체 지지체에 부착된 세포를 선택하는 공정을 포함하지 않는 방법을 제공한다. 보다 바람직하게는, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 백터와 수상세포와의 접촉 전의 2일, 3일, 5일, 또는 7일 이내에, 고체 지지체에 부착된 세포를 선택하는 공정을 포함하지 않도록 하면 된다.

[0101] 또한, 이것에 한정되는 것은 아니지만, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 백터를 접촉시키기 전에, CD14⁺ 세포를 선

택하는 공정을 포함하지 않는 것이 바람직하다. 즉, 본 발명은, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터와 수상세포와의 접촉 전의 24시간 이내에, CD14⁺ 세포를 선택하는 공정을 포함하지 않는 방법을 제공한다. 보다 바람직하게는, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터와 수상세포와의 접촉 전의 2일, 3일, 5일, 또는 7일 이내에, CD14⁺ 세포를 선택하는 공정을 포함하지 않도록 하면 된다.

[0102] 수상세포의 구체적인 단리방법은, 예를 들면, Cameron et al., 1992, Science 257: 383, Langhoff et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7998, Chehimi et al., 1993, J. Gen. Viol. 74: 1277, Cameron et al., 1992, Clin. Exp. Immunol. 88: 226, Thomas et al., 1993, J. Immunol. 150: 821, Karhumaki et al., 1993, Clin. Exp. Immunol. 91: 482 등에 기재되어 있다. 또한, 플로우 사이토메트리에 의한 수상세포의 단리에 대해서는, 예를 들면, Thomas et al., 1994, J. Immunol. 153: 4016, Ferbas et al., 1994, J. Immunol. 152: 4649, 및 O'Doherty et al., 1994, Immunology 82: 487에 기재되어 있다. 또한, 자기세포 선별에 대해서는, 예를 들면, Miltenyi et al., 1990, Cytometry 11: 231-238에 기술되어 있다.

[0103] 또한, 예를 들면, 인간 수상세포의 단리 및 증식에 관해서는, Macatonia et al., 1991, Immunol. 74: 399-406, O'Doherty et al., 1993, J. Exp. Med. 178: 1067-1078, Markowicz et al., 1990, J. Clin. Invest. 85: 955-961, Romani et al., 1994, J. Exp. Med. 180: 83-93, Sallusto et al., 1994, J. Exp. Med. 179: 1109-1118, Bernhard et al., 1995, J. Exp. Med. 55: 1099-1104 등에 기재된 방법을 사용해도 된다. 또한, 골수, 제대혈, 또는 말초혈 등으로부터 얻어지는 CD34⁺ 세포 및 말초혈 유래의 단핵세포로부터의 수상세포 형성에 대해서는 Van Tendeloo et al., 1998, Gene Ther. 5: 700-707에 기재된 방법을 사용하여 실시해도 된다.

[0104] 본 발명에 있어서는, 수상세포 또는 그의 전구세포(예를 들면, CD11c⁺ 세포 또는 CD34⁺ 세포)를 고농도로 포함하는 세포 분획에 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 혼합하는 것이 바람직하다. 전구세포란, 적당한 사이토카인(즉 G-CSF, GM-CSF, TNF-alpha, IL-4, IL-13, SCF, Flt-3 리간드, c-kit 리간드, 또는 그들의 조합)의 존재하에서 수상세포로 분화시킬 수 있는 세포를 말하고, 바람직하게는 4주일 이내, 보다 바람직하게는 20일 이내, 보다 바람직하게는 18일 이내, 보다 바람직하게는 16일 이내에 수상세포로 분화시킬 수 있는 세포이다. 이와 같은 세포에는, CD34⁺ 줄기세포를 들 수 있다. 수상세포로의 분화는, 예를 들면, SCF(50 ng/ml), GM-CSF(500 U/ml), TNF-alpha(50 ng/ml)의 존재하에서 3일간 정도 배양 후, SCF(50 ng/ml), GM-CSF(500 U/ml), IL-4(250 U/ml), TNF-alpha(50 ng/ml)의 존재하에서 배양함으로써 실시하면 된다. 또한 세포 분획이란, 세포의 분리(또는 분획)에 의해 얻어진 세포 집단이다. 세포 분획은, 세포 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물이어도 된다. 담체로서는, 생리식염수, 인산 완충 생리식염수(PBS), 배양액, 혈청 등, 생세포를 현탁할 수 있는 목적의 용액을 들 수 있다. 본 발명의 방법에 있어서 벡터의 접촉에 사용되는 세포 분획은, 전체 생세포 중의 수상세포 및/또는 그의 전구체의 비율이, 예를 들면, 30% 이상, 바람직하게는 40% 이상, 바람직하게는 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 바람직하게는 70% 이상이다.

[0105] 또한, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터에 접촉시키는 수상세포 중에는, 미성숙 수상세포가 포함되는 것이 바람직하다. 벡터를 혼합하는 수상세포를 포함하는 세포 분획은, 전체 생세포 중의 미성숙 수상세포의 비율이, 예를 들면, 10% 이상, 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 보다 바람직하게는 40% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상, 보다 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상이다.

[0106] 마이너스 가닥 RNA 바이러스를 사용하는 본 발명의 방법은, 여러 가지의 이점을 가지고 있다. 예를 들면, 마이너스 가닥 RNA 바이러스를 사용하면, 벡터의 감염만으로 활성화 수상세포가 얻어져, 나중의 성숙 수상세포를 얻기 위한 공정을 생략할 수 있다. 수상세포를 면역 부활에 사용하기 위해서는 활성화가 필요하기 때문에, 벡터의 감염만으로 활성화를 일으키는 것에는 이점이 있다. 또한, 이 성질을 이용하여, in vitro에서 T세포 이입요법에 필요한 활성화 T세포, 특히 세포상해성 T세포 등을 효율적으로 단기간에 유도할 수 있다. 마이너스 가닥 RNA 바이러스를 도입하고 있지 않은 수상세포로는 CTL을 유도할 수 없고, 다른 벡터에서 지금까지 보고되어 있는 성질로부터, 다른 벡터의 유전자 도입만으로는 in vitro에서의 CTL 유도는 곤란하다. 따라서, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는, 벡터의 도입만으로 T세포를 활성화(CTL 유도)가 가능하다고 하는 이점을 가지고 있다(도 22 참조). 또한, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는, 높은 도입 효율, 유전자 도입의 안정성, 간편성, 안전성, 수상세포의 T세포 활성화능력 보유를 모두 겸비한 벡터라는 점에서, 다른 벡터에 비해 우수하다.

[0107] 또한, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는, 줄기세포에 유전자 도입한 후에, 수상세포를 분화시키는 경우에도 유용하다. 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 줄기세포에 유전자 도입한 후에, 수상세포로의 분화를 유도한 경

우, 유전자 도입 효율은 70% 가까이에 달한다. 이것은, 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터의 개변형에 필적한다. 아데노바이러스 벡터는, 도입 후의 에피솜의 희석에 의해 발현이 저하되기 때문에, 줄기세포부터 유전자 도입하는 것은 곤란하다. 마이너스 가닥 RNA 바이러스는, 줄기세포에 도입 후에 수상세포 분화를 행하는 방법, 및, 말초혈 단핵구로부터 분화시킨 수상세포에 유전자를 도입하는 방법, 의 양자에 적용이 가능하다.

[0108] 또한, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는, MOI를 높게(예를 들면, 10 이상, 바람직하게는 20 이상, 보다 바람직하게는 30 이상, 예를 들면, 40 이상, 더 나아가서는 50 이상)하면, 세포상해성에 현저한 영향 없이, 안정되게 거의 100%의 도입 효율로 세포에 도입하는 것이 가능하다. 더욱이, 마이너스 가닥 RNA 바이러스는 숙주 계층에 유전자를 삽입하지 않기 때문에, 종양 발생 등의 리스크가 낮다고 하는 이점도 가지고 있다.

[0109] 본 발명에 있어서 마이너스 가닥 RNA 바이러스란, 마이너스 가닥(바이러스 단백질을 코딩하는 센스 가닥(sense strand)에 대한 안티센스 가닥(antisense strand)의 RNA를 계층으로서 포함하는 바이러스이다. 마이너스 가닥 RNA는 음성 가닥 RNA라고도 불리운다. 본 발명에 있어서 사용되는 마이너스 가닥 RNA 바이러스로서는, 특히 단일 가닥 마이너스 가닥 RNA 바이러스(비분절형(non-segmented) 마이너스 가닥 RNA 바이러스라고도 한다))를 들 수 있다. 「단일 가닥 음성 가닥 RNA 바이러스」란, 단일 가닥 음성 가닥 「즉, 마이너스 가닥」 RNA를 계층에 갖는 바이러스를 말한다. 마이너스 가닥 RNA 바이러스로서는, 파라믹소바이러스(Paramyxoviridae; Paramyxovirus, Morbillivirus, Rubulavirus, 및 Pneumovirus속 등을 포함한다), 라브도바이러스(Rhabdoviridae; Vesiculovirus, Lyssavirus, 및 Ephemerovirus속 등을 포함한다), 필로바이러스(Filoviridae), 오르토믹소바이러스(Orthomyxoviridae; Influenza virus A, B, C, 및 Thogoto-like viruses 등을 포함한다), 분야바이러스(Bunyaviridae; Bunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, 및 Phlebovirus속 등을 포함한다), 아레나바이러스(Arenaviridae) 등의 과(科)에 속하는 바이러스가 포함된다.

[0110] 또한, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터란, 마이너스 가닥 RNA 바이러스를 베이스로 하는 감염력을 가지는 바이러스 입자로서, 유전자를 세포에 도입하기 위한 담체이다. 여기에서 「감염력」이란, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터가 세포로의 정착능을 보유하고 있어, 정착된 세포의 내부에 벡터에 포함되는 유전자를 도입할 수 있는 능력을 말한다. 바람직한 태양에서는, 본 발명의 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는, 벡터의 계층 RNA 중에 외래 유전자를 발현할 수 있도록 삽입되어 있다. 본 발명의 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는, 전파능(propagation ability)을 가지고 있어도 되고, 전파능을 갖지 않는 결손형 벡터여도 된다. 「전파능을 가진다」라는 것은, 바이러스 벡터가 숙주세포에 감염된 경우, 상기 세포에 있어서 바이러스가 복제되어, 감염성 바이러스 입자가 생산되는 것을 가리킨다.

[0111] 재조합 바이러스란, 재조합 폴리뉴클레오티드(polynucleotide)를 매개로 하여 생성된 바이러스, 또는 그의 바이러스의 증폭 산물을 말한다. 재조합 폴리뉴클레오티드란, 양쪽 말단 또는 한쪽 말단이 자연 상태와 동일하게는 결합되어 있지 않은 폴리뉴클레오티드를 말한다. 구체적으로는, 재조합 폴리뉴클레오티드는, 인간의 손에 의해 폴리뉴클레오티드 사슬의 결합이 개변(절단 및/또는 결합)된 폴리뉴클레오티드이다. 재조합 폴리뉴클레오티드는, 폴리뉴클레오티드 합성, 뉴클레아제 처리(nuclease treatment), 리가아제 처리(ligase treatment) 등을 조합시켜, 공지의 유전자 재조합 방법에 의해 생성시킬 수 있다. 재조합 바이러스는, 유전자 조작에 의해 구축된 바이러스 계층을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시켜, 바이러스를 재구성함으로써 생성할 수 있다. 예를 들면, 바이러스 계층을 코딩하는 cDNA로부터, 바이러스를 재구성하는 방법이 알려져 있다(Y. Nagai, A. Kato, Microbiol. Immunol., 43, 613-624(1999)).

[0112] 본 발명에 있어서 유전자란 유전물질을 가리키고, 전사되는 서열을 센스 또는 안티센스에 포함하는 핵산을 말한다. 유전자는 RNA여도 DNA여도 된다. 본 발명에 있어서 단백질을 코딩하는 핵산은, 상기 단백질의 유전자라고 부른다. 또한 유전자는 단백질을 코딩하고 있지 않아도 되고, 예를 들면, 유전자는 리보자임(ribozyme) 또는 안티센스 RNA 등의 기능적 RNA를 코딩하는 것이어도 된다. 유전자는 천연 유래 또는 인위적으로 설계된 서열일 수 있다. 또한, 본 발명에 있어서의 「DNA」란, 단일 가닥 DNA 및 이중 가닥 DNA를 포함한다. 또한, 단백질을 코딩한다는 것은, 폴리뉴클레오티드가 상기 단백질을 적당한 조건하에서 발현할 수 있도록, 상기 단백질의 아미노산 서열을 코딩하는 ORF를 센스 또는 안티센스에 포함하는 것을 말한다.

[0113] 본 발명에 있어서 적합하게 사용되는 마이너스 가닥 RNA 바이러스로서는, 예를 들면 파라믹소바이러스과(Paramyxoviridae) 바이러스의 센다이 바이러스(Sendai virus), 뉴캐슬병 바이러스(Newcastle disease virus), 유행성 이하선염 바이러스(Mumps virus), 홍역 바이러스(Measles virus), RS 바이러스(Respiratory syncytial virus), 우역 바이러스(rinderpest virus), 디스토펜 바이러스(distemper virus), 원숭이 파라인플루엔자 바이러스(simian parainfluenza virus)(SV5), 인간 파라인플루엔자 바이러스 1, 2, 3형(human parainfluenza

virus), 오르토믹소바이러스과(Orthomyxoviridae)의 인플루엔자 바이러스(Influenza virus), 라브도바이러스과(Rhabdoviridae)의 수포성 구내염 바이러스(Vesicular stomatitis virus), 광견병 바이러스(Rabies virus) 등을 들 수 있다.

[0114] 본 발명에 있어서 사용할 수 있는 바이러스를 추가로 예시하면, 예를 들면, Sendai virus(SeV), human parainfluenza virus-1(HPIV-1), human parainfluenza virus-3(HPIV-3), phocine distemper virus(PDV), canine distemper virus(CDV), dolphin morbillivirus(DMV), peste-des-petits-ruminants virus(PDPR), measles virus(MV), rinderpest virus(RPV), Hendra virus(Hendra), Nipah virus(Nipah), human parainfluenza virus-2(HPIV-2), simian parainfluenza virus 5(SV5), human parainfluenza virus-4a(HPIV-4a), human parainfluenza virus-4b(HPIV-4b), mumps virus(Mumps), 및 Newcastle disease virus(NDV) 등이 포함된다. 보다 바람직하게는, Sendai virus(SeV), human parainfluenza virus-1(HPIV-1), human parainfluenza virus-3(HPIV-3), phocine distemper virus(PDV), canine distemper virus(CDV), dolphin morbillivirus(DMV), peste-des-petits-ruminants virus(PDPR), measles virus(MV), rinderpest virus(RPV), Hendra virus(Hendra), 및 Nipah virus(Nipah)로 이루어진 군으로부터 선택되는 바이러스를 들 수 있다.

[0115] 보다 바람직하게는, 파라믹소바이러스 아과(Paramyxoviridae)(레스피로바이러스속(Respirovirus), 루블라바이러스속(Rubulavirus), 및 모빌리바이러스속(Morbillivirus)을 포함한다)에 속하는 바이러스 또는 그의 유도체로서, 보다 바람직하게는 레스피로바이러스속(genus Respirovirus)(파라믹소바이러스속(Paramyxovirus)이라고도 한다)에 속하는 바이러스 또는 그의 유도체이다. 유도체에는, 바이러스에 의한 유전자 도입을 손상시키지 않도록, 바이러스 유전자가 개변된 바이러스, 및 화학 수식된 바이러스 등이 포함된다. 본 발명을 적용 가능한 레스피로바이러스속 바이러스로서는, 예를 들면, 인간 파라인플루엔자 바이러스 1형(HPIV-1), 인간 파라인플루엔자 바이러스 3형(HPIV-3), 소 파라인플루엔자 바이러스 3형(bovine parainfluenza virus-3)(BPIV-3), 센다이 바이러스(Sendai virus; 마우스 파라인플루엔자 바이러스 1형이라고도 불리운다), 및 원숭이 파라인플루엔자 바이러스 10형(SPIV-10) 등이 포함된다. 본 발명에 있어서 파라믹소바이러스는, 가장 바람직하게는 센다이 바이러스이다. 이들의 바이러스는, 천연주(natural strain), 야생주(wild strain), 변이주(mutant strain), 라보 계대주(laboratory-passaged strain), 및 인위적으로 구축된 주(strain) 등에 유래하여도 된다.

[0116] 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는 게놈 RNA에 탑재 유전자를 안티센스에 코드하고 있다. 게놈 RNA란, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 바이러스 단백질과 함께 리보뉴클레오프로테인(ribonucleoprotein)(RNP)을 형성하고, 상기 단백질에 의해 게놈 중의 유전자가 발현하여, 이의 RNA가 복제되어 딸 RNP(daughter RNP)가 형성되는 기능을 가지는 RNA이다. 일반적으로 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 게놈은, 3' 리더 영역(3'-leader region)과 5' 트레일러 영역(5'-trailer region) 사이에, 바이러스 유전자가 안티센스서열로서 배열된 구성을 하고 있다. 각 유전자의 ORF의 사이에는, 전사종결서열(transcription ending sequence)(E 서열)-개재서열(intervening sequence)(I 서열)-전사개시서열(transcription starting sequence)(S 서열)이 존재하고, 이것에 의해 각 유전자의 ORF를 코드하는 RNA가 각각의 시스트론(cistron)으로서 전사된다.

[0117] 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 바이러스 단백질을 코드하는 유전자로서는, NP, P, M, F, HN, 및 L 유전자가 포함된다. 「NP, P, M, F, HN, 및 L 유전자」란, 각각 뉴클레오캡시드(nucleocapsid), 포스포(phospho), 매트릭스(matrix), 퓨전(fusion), 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin-neuraminidase), 및 라지 단백질(large-protein)을 코드하는 유전자를 가리킨다. 파라믹소바이러스 아과에 속하는 각 바이러스에 있어서의 각 유전자는, 일반적으로 다음과 같이 표기된다. 일반적으로, NP 유전자는 「N 유전자」로 표기되는 경우도 있다.

[0118] 레스피로바이러스속 NP P/C/V M F HN - L

[0119] 루블라바이러스속 NP P/V M F HN (SH) L

[0120] 모빌리바이러스속 NP P/C/V M F H - L

[0121] 예를 들면, 센다이 바이러스의 각 유전자 염기서열의 데이터베이스 액세스번호(accession number)는, NP 유전자에 대해서는 M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, X17218, P 유전자에 대해서는 M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, X17008, M 유전자에 대해서는 D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, X53056, F 유전자에 대해서는 D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152, X02131, HN 유전자에 대해서는 D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, X56131, L 유전자에 대해서는 D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, X58886을 참조할 것. 또한, 그 밖의 바이러스가 코드하는 바이러스 유전자를 예시하면, N 유전자에 대

해서는, CDV, AF014953; DMV, X75961; HPIV-1, D01070; HPIV-2, M55320; HPIV-3, D10025; Mapuera, X85128; Mumps, D86172; MV, K01711; NDV, AF064091; PDPR, X74443; PDV, X75717; RPV, X68311; SeV, X00087; SV5, M81442; 및 Tupaia, AF079780, P 유전자에 대해서는, CDV, X51869; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, X04721; HPIV-4a, M55975; HPIV-4b, M55976; Mumps, D86173; MV, M89920; NDV, M20302; PDV, X75960; RPV, X68311; SeV, M30202; SV5, AF052755; 및 Tupaia, AF079780, C 유전자에 대해서는, CDV, AF014953; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, D00047; MV, AB016162; RPV, X68311; SeV, AB005796; 및 Tupaia, AF079780, M 유전자에 대해서는 CDV, M12669; DMV Z30087; HPIV-1, S38067; HPIV-2, M62734; HPIV-3, D00130; HPIV-4a, D10241; HPIV-4b, D10242; Mumps, D86171; MV, AB012948; NDV, AF089819; PDPR, Z47977; PDV, X75717; RPV, M34018; SeV, U31956; 및 SV5, M32248, F 유전자에 대해서는 CDV, M21849; DMV, AJ224704; HPN-1, M22347; HPIV-2, M60182; HPIV-3, X05303, HPIV-4a, D49821; HPIV-4b, D49822; Mumps, D86169; MV, AB003178; NDV, AF048763; PDPR, Z37017; PDV, AJ224706; RPV, M21514; SeV, D17334; 및 SV5, AB021962, HN(H 또는 G) 유전자에 대해서는 CDV, AF112189; DMV, AJ224705; HPIV-1, U709498; HPIV-2, D000865; HPIV-3, AB012132, HPIV-4A, M34033; HPIV-4B, AB006954; Mumps, X99040; MV, K01711; NDV, AF204872; PDPR, Z81358; PDV, Z36979; RPV, AF132934; SeV, U06433; 및 SV-5, S76876를 예시할 수 있다. 단, 각 바이러스는 복수의 주가 알려져 있고, 주의 차이에 의해 상기에 예시한 것 이외의 서열로 되는 유전자도 존재한다.

[0122] 이들의 바이러스 단백질을 코딩하는 ORF 및 외래 유전자의 ORF는, 게놈 RNA에 있어서 상기의 E-I-S 서열을 매개로 하여 안티센스로 배치된다. 게놈 RNA에 있어서 가장 3'에 가까운 ORF는, 3' 리더 영역과 상기 ORF와의 사이에 S 서열만이 필요하고, E 및 I 서열은 필요 없다. 또한 게놈 RNA에 있어서 가장 5'에 가까운 ORF는, 5' 트레일러 영역과 상기 ORF와의 사이에 E 서열만이 필요하고, I 및 S 서열은 필요 없다. 또한 2개의 ORF는, 예를 들면, IRES 등의 서열을 사용하여 동일 시스템으로서 전사시키는 것도 가능하다. 이와 같은 경우는, 이들 2개의 ORF의 사이에는 E-I-S 서열은 필요 없다. 예를 들면, 야생형의 파라믹소바이러스의 경우, 전형적인 RNA 게놈은, 3' 리더 영역에 계속해서, N, P, M, F, HN, 및 L 단백질을 안티센스에 코딩하는 6개의 ORF가 순서대로 배열되어 있고, 이에 계속해서 5' 트레일러 영역을 다른 쪽 말단에 갖는다. 본 발명의 게놈 RNA에 있어서는, 바이러스 유전자의 배치는 이것에 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는, 야생형 바이러스와 동일하게, 3' 리더 영역에 계속해서, N, P, M, F, HN, 및 L 단백질을 코딩하는 ORF가 순서대로 배열되어 있고, 이에 계속해서 5' 트레일러 영역이 배치되는 것이 바람직하다. 어떤 종의 바이러스에 있어서는, 바이러스 유전자가 상이하지만, 그와 같은 경우일지라도 상기와 동일하게 각 바이러스 유전자를 야생형과 동일한 배치로 하는 것이 바람직하다. 일반적으로 N, P, 및 L 유전자를 보유하고 있는 벡터는, 세포 내에서 자율적으로 RNA 게놈으로부터 유전자가 발현되어, 게놈 RNA가 복제된다. 추가로 F 및 HN 유전자 등의 엔벨로프(envelope) 단백질을 코딩하는 유전자, 및 M 유전자의 작용에 의해, 감염성 바이러스 입자가 형성되고, 세포 밖으로 방출된다. 따라서, 이와 같은 벡터는 전파능을 가지는 바이러스 벡터가 된다. 수상세포에 도입하려는 외래 유전자는, 후술하는 바와 같이, 이 게놈 중의 단백질 비코드 영역에 삽입하면 된다.

[0123] 또한, 본 발명의 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는, 야생형 바이러스가 가지는 유전자 중 어느 하나를 결손한 것이어도 된다. 예를 들면, M, F, 또는 HN 유전자, 또는 그들의 조합이 포함되어 있지 않은 바이러스 벡터도, 본 발명에 있어서 적합하게 사용할 수 있다. 이와 같은 바이러스 벡터의 재구성은, 예를 들면, 결손되어 있는 유전자 산물을 외래적으로 공급함으로써 행할 수 있다. 이와 같이 하여 제조된 바이러스 벡터는, 야생형 바이러스와 동일하게 숙주세포에 접촉하여 세포융합을 일으키지만, 세포에 도입된 벡터 게놈은 바이러스 유전자에 결손을 가지기 때문에, 처음과 동일한 감염력을 가지는 딸 바이러스 입자는 형성되지 않는다. 이 때문에, 1회 한정의 유전자 도입력을 가지는 안전한 바이러스 벡터로서 유용하다. 게놈으로부터 결손시키는 유전자로서는, 예를 들면, F 유전자 및/또는 HN 유전자를 들 수 있다. 예를 들면, F 유전자가 결손된 제조된 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터 게놈을 발현하는 플라스미드를, F 단백질의 발현 벡터 및 NP, P, 및 L 단백질의 발현 벡터와 함께 숙주세포에 트랜스펙션함으로써, 바이러스 벡터의 재구성을 행할 수 있다(W000/70055 및 W000/70070; Li, H. -0. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569(2000)). 또한, 예를 들면, F 유전자가 염색체에 삽입된 숙주세포를 사용하여 바이러스를 제조하는 것도 가능하다. 이들의 단백질군은, 그의 아미노산서열은 바이러스 유래의 서열 그대로가 아닐지라도, 핵산의 도입에 있어서의 활성이 천연형의 그것과 동등하거나 그 이상이면, 변이를 도입하거나, 또는 다른 바이러스 상동 유전자로 대응해도 된다.

[0124] 또한, 본 발명에 있어서 사용되는 바이러스 벡터로서, 벡터 게놈이 유래하는 바이러스의 엔벨로프 단백질을 상이한 단백질을 엔벨로프에 포함하는 벡터를 제작하는 것도 가능하다. 예를 들면, 바이러스 재구성시에, 벡터의 베이스가 되는 바이러스의 게놈이 코딩하는 엔벨로프 단백질 이외의 엔벨로프 단백질을 세포에서 발현시킴으로써, 목적의 엔벨로프 단백질을 가지는 바이러스 벡터를 제조할 수 있다. 이와 같은 단백질에 특별히 제한은

없다. 세포로의 감염능을 부여하는 목적의 단백질이 사용된다. 예를 들면, 다른 바이러스의 엔벨로프 단백질, 예를 들면, 수포성 구내염 바이러스(Vesicular stomatitis virus; VSV)의 G 단백질(VSV-G)을 들 수 있다. VSV-G 단백질은, 임의의 VSV주에 유래하는 것이어도 된다. 예를 들면, 인디애나 혈청형 주(Indiana serotype strain)(J. Virology 39: 519-528(1981)) 유래의 VSV-G 단백질을 사용할 수 있지만, 이것에 한정되지 않는다. 또한 본 발명의 벡터는, 다른 바이러스 유래의 엔벨로프 단백질을 임의로 조합시켜 포함할 수 있다. 예를 들면, 이와 같은 단백질로서, 인간 세포에 감염되는 바이러스에 유래하는 엔벨로프 단백질이 적합하다. 이와 같은 단백질로서는, 특별히 제한되지 않지만, 레트로바이러스의 암포트로픽 엔벨로프 단백질(amphotropic envelope protein) 등을 들 수 있다. 레트로바이러스의 암포트로픽 엔벨로프 단백질로서는, 예를 들면, 마우스 백혈병 바이러스(MuLV) 4070A주 유래의 엔벨로프 단백질을 사용할 수 있다. 또한, MuMLV 10A1 유래의 엔벨로프 단백질을 사용하는 것도 가능하다(예를 들면, pCL-10A1(Imgenex)(Naviaux, R. K. et al., J. Virol. 70: 5701-5705(1996)). 또한, 헤르페스바이러스과(Herpesviridae)의 단백질로서는, 예를 들면, 단순 헤르페스바이러스의 gB, gD, gH, gp85 단백질, EB 바이러스의 gp350, gp220 단백질 등을 들 수 있다. 헤파드나바이러스과(Hepadnaviridae)의 단백질로서는, B형 간염 바이러스의 S 단백질 등을 들 수 있다. 이들의 단백질은, 세포의 도메인을 F 단백질 또는 HN 단백질의 세포내 도메인과 결합시킨 융합 단백질로서 사용해도 된다. 이와 같이 본 발명에 있어서 사용되는 바이러스 벡터에는, VSV-G 단백질 등과 같이, 게놈이 유래하는 바이러스 이외의 바이러스에 유래하는 엔벨로프 단백질을 포함하는 슈도타입 바이러스 벡터(pseudotype viral vector)가 포함된다. 바이러스의 게놈 RNA에는 이들의 엔벨로프 단백질을 게놈에 코드되지 않도록 설계하면, 바이러스 입자가 세포에 감염된 후에는, 바이러스 벡터로부터 이 단백질이 발현되는 경우는 없다.

[0125] 또한, 본 발명에 있어서 사용되는 바이러스 벡터는, 예를 들면, 엔벨로프 표면에 특정의 세포에 접촉할 수 있는 접착인자, 리간드, 수용체 등의 단백질, 항체 또는 그의 단편(斷片), 또는 이들의 단백질을 세포의 영역에 가지고, 바이러스 엔벨로프 유래의 폴리펩티드를 세포내 영역에 가지는 키메라 단백질 등을 포함하는 것이어도 된다. 이것에 의해, 벡터의 수상세포로의 특이성을 제어할 수 있다. 이들은 바이러스 게놈에 코드되어 있어도 되고, 바이러스 벡터의 재구성시에, 바이러스 게놈 이외의 유전자(예를 들면, 다른 발현 벡터 또는 숙주 염색체 상 등에 있는 유전자)의 발현에 의해 공급되어도 된다.

[0126] 또한 바이러스 벡터는, 예를 들면, 바이러스 단백질에 의한 면역원성(Immunogenicity)을 저하시키기 위해, 또는 RNA의 전사 효율 또는 복제 효율을 높이기 위해, 벡터에 포함되는 임의의 바이러스 유전자가 야생형 유전자로부터 개변되어 있어도 된다. 구체적으로는, 예를 들면, 복제인자인 N, P, 및 L 유전자 중 적어도 하나를 개변하여, 전사 또는 복제의 기능을 높이는 것이 생각되어진다. 또한, 엔벨로프 단백질의 하나인 HN 단백질은, 적혈구 응집소인 헤마글루티닌(hemagglutinin) 활성과 뉴라미니다아제(neuraminidase) 활성과의 양자의 활성을 갖지만, 예를 들면, 전자의 활성을 약하게 할 수 있다면, 혈액 중에서의 바이러스의 안정성을 향상시키는 것이 가능할 것이고, 예를 들면, 후자의 활성을 개변함으로써, 감염능을 조절하는 것도 가능하다. 또한, F 단백질을 개변함으로써 막 융합능(membrane fusion ability)을 조절하는 것도 가능하다. 또한, 예를 들면, 세포 표면의 항원 분자가 될 수 있는 F 단백질 및/또는 HN 단백질의 항원제시 에피토프(epitope) 등을 해석하고, 이것을 이용하여 이들의 단백질에 관한 항원제시능을 약하게 한 바이러스 벡터를 제작하는 것도 가능하다.

[0127] 또한, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는, 액세서리 유전자(accessory gene)가 결손된 것이어도 된다. 예를 들면, SeV의 액세서리 유전자의 하나인 V 유전자를 녹아웃(knock out)시킴으로써, 배양세포에 있어서의 유전자 발현 및 복제는 장애받지 않고, 마우스 등의 숙주에 대한 SeV의 병원성이 현저하게 감소한다(Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71: 7266-7272; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587; Curran, J. et al., W001/04272, EP1067179). 이와 같은 약독화 벡터(attenuated vector)는, in vivo 또는 ex vivo에 있어서의 독성이 없는 유전자 도입용 바이러스 벡터로서 특히 유용하다.

[0128] 마이너스 가닥 RNA 바이러스는 유전자 도입 벡터로서 우수하고, 숙주세포의 세포질에서만 전사·복제를 행하여, DNA 페이즈(DNA phase)를 갖지 않기 때문에 염색체로의 통합(integration)은 일어나지 않는다(Lamb, R. A. and Kolakofsky, D., Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (eds). Fields of virology. Vol. 2. Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, 1996, pp. 1177-1204). 이 때문에 염색체 이상에 의한 암화(癌化) 및 불사화(immortalization) 등의 안전면에 있어서의 문제가 발생하지 않는다. 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 이 특징은, 벡터화했을 때의 안전성에 크게 기여하고 있다. 이 중 유전자 발현의 결과에서는, 예를 들면, 센다이 바이러스(SeV)를 연속 다대 계대(multiple continuous passage)해도 거의 염기의 변이가 인정되지 않고, 게놈의 안정성이 높으며, 삽입 이중 유전자를 장기간에 걸쳐 안정하게 발현하는 것이 나타나 있다(Yu, D. et al., Genes Cells 2, 457-466(1997)). 또한, 캡시드(capsid)

구조 단백질을 가지지 않는 것에 의한 도입 유전자의 사이즈 또는 패키징(packaing)의 유연성(flexibility) 등 성질상의 이점이 있다. 이와 같이, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는, 인간의 유전자 치료를 위한 고효율 벡터의 새로운 클래스가 되는 것이 시사된다. 전과능을 가지는 SeV 벡터는, 외래 유전자를 적어도 4 kb까지 도입 가능하고, 전사 유닛(transcriptional unit)을 부가함으로써 2종류 이상의 유전자를 동시에 발현하는 것도 가능하다.

[0129] 또한 센다이 바이러스는, 설치류(rodent)에 있어서는 병원성으로 폐렴을 일으키는 것이 알려져 있지만, 인간에 대해서는 병원성이 없다. 이것은 또한, 야생형 센다이 바이러스의 경비적 투여(nasal administration)에 의해 비인간 영장류에 있어서 심각한 유해작용을 나타내지 않는다고 하는 지금까지의 보고에 의해서도 지지되고 있다 (Hurwitz, J. L. et al., Vaccine 15: 533-540, 1997). 센다이 바이러스의 이들 특징은, 센다이 바이러스 벡터가 인간의 치료에 응용할 수 있는 것을 시사하고, 센다이 바이러스 벡터가 인간 수상세포를 표적으로 한 유전자 치료의 유망한 선택지의 하나가 된다는 것을 결론지은 것이다.

[0130] 바이러스 벡터는, 게놈 RNA 중에 외래 유전자를 코드할 수 있다. 외래 유전자를 포함하는 재조합 바이러스 벡터는, 상기의 바이러스 벡터의 게놈에 외래 유전자를 삽입함으로써 얻어진다. 외래 유전자로서는, 표적으로 하는 수상세포에 있어서 발현시키려는 목적의 유전자를 사용할 수 있다. 외래 유전자는 천연형 단백질을 코드하는 유전자여도 되고, 또는 결실, 치환 또는 삽입에 의해 천연형 단백질을 개변한 단백질을 코드하는 유전자여도 된다. 외래 유전자의 삽입 위치는, 예를 들면, 바이러스 게놈의 단백질 비코드 영역의 목적의 부위를 선택할 수 있고, 예를 들면, 게놈 RNA의 3' 리더 영역과 3' 말단에 가장 가까운 바이러스 단백질 ORF와의 사이, 각 바이러스 단백질 ORF의 사이, 및/또는 5' 말단에 가장 가까운 바이러스 단백질 ORF와 5' 트레일러 영역의 사이에 삽입할 수 있다. 또한, F 또는 HN 유전자 등을 결실하는 게놈에서는, 그의 결실 영역에 외래 유전자를 코드하는 핵산을 삽입할 수 있다. 파라믹소바이러스에 외래 유전자를 도입하는 경우는, 게놈으로의 삽입 단편의 폴리뉴클레오티드의 쇠장(chain length)이 6의 배수가 되도록 삽입하는 것이 바람직하다(Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 4822-4830, 1993). 삽입한 외래 유전자와 바이러스 ORF와의 사이에는, E-I-S 서열이 구성되도록 한다. E-I-S 서열을 매개로 하여 2 또는 그 이상의 유전자를 직렬로 배열하여 삽입할 수 있다.

[0131] 벡터에 탑재하는 외래 유전자의 발현 레벨은, 그의 유전자의 상류(음성 가닥의 3'측)에 부가하는 전사개시서열의 종류에 따라 조절할 수 있다(W001/18223). 또한, 게놈상의 외래 유전자의 삽입 위치에 의해 제어할 수 있어, 음성 가닥의 3' 가까이 삽입할수록 발현 레벨이 높고, 5' 가까이 삽입할수록 발현 레벨이 낮아진다. 이와 같이, 외래 유전자의 삽입 위치는, 상기 유전자의 목적의 발현량을 얻기 위해, 또한 전후의 바이러스 단백질을 코드하는 유전자와의 조합이 최적이 되도록 적절히 조절할 수 있다. 일반적으로, 외래 유전자의 높은 발현이 얻어지는 것이 유리하다고 생각되어지기 때문에, 외래 유전자는 효율이 높은 전사개시서열에 연결하고, 음성 가닥 게놈의 3' 말단 가까이 삽입하는 것이 바람직하다. 구체적으로는, 3' 리더 영역과 3'에 가장 가까운 바이러스 단백질 ORF와의 사이에 삽입된다. 또는, 3'에 가장 가까운 바이러스 유전자의 ORF와 2번째 유전자의 ORF 사이에 삽입해도 된다. 야생형 파라믹소바이러스에 있어서는, 게놈의 3'에 가장 가까운 바이러스 단백질 유전자는 N 유전자이고, 2번째의 유전자는 P 유전자이다. 반대로, 도입 유전자의 고발현이 바람직하지 않은 경우는, 예를 들면, 벡터에 있어서의 외래 유전자의 삽입 위치를 음성 가닥의 되도록 5'측에 설정하거나, 전사개시서열을 효율이 낮은 것으로 하는 등으로 하여, 바이러스 벡터로부터의 발현 레벨을 낮게 억제함으로써 적절한 효과가 얻어지도록 하는 것도 가능하다.

[0132] 마이너스 가닥 바이러스 벡터를 제조하기 위해서는, 포유동물세포에 있어서, 바이러스의 성분인 RNP의 재구성에 필요한 바이러스 단백질, 즉, N, P, 및 L 단백질의 존재하, 바이러스의 게놈 RNA를 코드하는 cDNA를 전사시킨다. 전사에 의해 음성 가닥 게놈(즉 바이러스 게놈과 동일한 안티센스 가닥)을 생성시켜도 되고, 또는 양성 가닥(바이러스 단백질을 코드하는 센스 가닥)을 생성시켜도, 바이러스 RNP를 재구성할 수 있다. 벡터의 재구성 효율을 높이기 위해서는, 바람직하게는 양성 가닥을 생성시킨다. RNA 말단은, 천연의 바이러스 게놈과 동일하게 3' 리더 서열과 5' 트레일러 서열의 말단을 되도록 정확하게 반영시키는 것이 바람직하다. 전사산물의 5' 말단을 정확하게 제어하기 위해서는, 예를 들면, 전사개시부위로서 T7 RNA 폴리머라아제 인식서열을 이용하여, 상기 RNA 폴리머라아제를 세포 내에서 발현시키면 된다. 전사산물의 3' 말단을 제어하기 위해서는, 예를 들면, 전사산물의 3' 말단에 자기 절단형 리보자임을 코드시켜 두고, 이 리보자임에 의해 정확하게 3' 말단이 절려내어지도록 할 수 있다(Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997, Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 및 Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466).

[0133] 예를 들면, 외래 유전자를 가지는 재조합 센다이 바이러스 벡터는, Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997, Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 및 Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2:

457-466의 기재 등에 준하여, 다음과 같이 하여 구축할 수 있다.

- [0134] 먼저, 목적의 외래 유전자의 cDNA 염기서열을 포함하는 DNA 시료를 준비한다. DNA 시료는, 25 ng/micro-L 이상의 농도로 전기영동적으로 단일한 플라스미드라고 확인할 수 있는 것이 바람직하다. 이하, NotI 부위를 이용하여 바이러스 게놈 RNA를 코딩하는 DNA에 외래 유전자를 삽입하는 경우를 예로서 설명한다. 목적으로 하는 cDNA 염기서열 중에 NotI 인식부위가 포함되는 경우는, 부위 특이적 변이 도입법 등을 사용하여, 코딩하는 아미노산 서열을 변화시키지 않도록 염기서열을 개변하고, NotI 부위를 미리 제거해 두는 것이 바람직하다. 이 시료로부터 목적의 유전자 단편을 PCR에 의해 증폭하여 회수한다. 2개의 프라이머(primer)의 5' 부분에 NotI 부위를 부가해 둬으로써, 증폭된 단편의 양쪽 말단을 NotI 부위로 한다. 바이러스 게놈상에 삽입된 후의 외래 유전자의 ORF와 그의 양쪽 바이러스 유전자의 ORF와의 사이에 E-I-S 서열이 배치되도록, 프라이머 중에 E-I-S 서열을 포함하도록 설계한다.
- [0135] 예를 들면, 포워드측(forward side) 합성 DNA 서열은, NotI에 의한 절단을 보증하기 위해 5'측에 임의의 2 이상의 뉴클레오티드(바람직하게는 GCG 및 GCC 등의 NotI 인식부위 유래의 서열이 포함되지 않는 4 염기, 더욱 바람직하게는 ACTT)를 선택하여, 그의 3'측에 NotI 인식부위 gcggccgc를 부가하고, 추가로 그의 3'측에 스페이서 서열(spacer sequence)로서 임의의 9 염기 또는 9에 6의 배수를 더한 수의 염기를 부가하고, 추가로 그의 3'측에 목적의 cDNA의 개시 코돈 ATG(initiation codon ATG)로부터 이것을 포함하여 ORF의 약 25 염기 상당의 서열을 부가한 형태로 한다. 마지막 염기는 G 또는 C가 되도록 상기 목적의 cDNA로부터 약 25 염기를 선택하여 포워드 측 합성 올리고 DNA의 3'의 말단으로 하는 것이 바람직하다.
- [0136] 리버스측(reverse side) 합성 DNA 서열은 5'측으로부터 임의의 2 이상의 뉴클레오티드(바람직하게는 GCG 및 GCC 등의 NotI 인식부위 유래의 서열이 포함되지 않는 4 염기, 더욱 바람직하게는 ACTT)를 선택하여, 그의 3'측에 NotI 인식부위 gcggccgc를 부가하고, 추가로 그의 3'측에 길이를 조절하기 위한 삽입 단편 올리고 DNA를 부가한다. 이 올리고 DNA의 길이는, 최종적인 PCR 증폭 산물의 NotI 단편의 쇄장이 6의 배수가 되도록 염기수를 설계한다(이른바 「6의 룰(rule of six)」; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72: 891-899, 1998; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67: 4822-4830, 1993; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67: 4822-4830, 1993). 이 프라이머에 E-I-S 서열을 부가하는 경우에는, 삽입 단편의 올리고 DNA의 3'측에 쉐다이 바이러스의 S 서열, I 서열, 및 E 서열의 상보가닥 서열, 바람직하게는 각각 5'-CTTTCACCT-3'(서열번호: 1), 5'-AAG-3', 및 5'-TTTTTCTTACTACGG-3'(서열번호: 2)를 부가하고, 추가로 그의 3'측에 목적의 cDNA 서열의 종지 코돈(termination codon)으로부터 반대로 세어서 약 25 염기 상당의 상보가닥의 마지막 염기가 G 또는 C가 되도록 길이를 선택하여 서열을 부가하고, 리버스측 합성 DNA의 3'의 말단으로 한다.
- [0137] PCR은, Taq 폴리머라아제 또는 그 밖의 DNA 폴리머라아제를 사용하는 통상적인 방법을 사용할 수 있다. 증폭한 목적 단편은 NotI로 소화한 후, pBluescript 등의 플라스미드 벡터의 NotI 부위에 삽입한다. 얻어진 PCR 산물의 염기서열을 시퀀서(sequencer)로 확인하여, 올바른 서열의 플라스미드를 선택한다. 이 플라스미드로부터 삽입 단편을 NotI로 잘라내고, 게놈 cDNA를 포함하는 플라스미드의 NotI 부위에 클로닝한다. 또한 플라스미드 벡터를 매개로 하지 않고 게놈 cDNA의 NotI 부위에 직접 삽입하여, 재조합 쉐다이 바이러스 cDNA를 얻는 것도 가능하다.
- [0138] 예를 들면, 재조합 쉐다이 바이러스 게놈 cDNA인 경우, 문헌에 기재된 방법에 준하여 구축할 수 있다(Yu, D. et al., Genes Cells 2: 457-466, 1997; Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997). 예를 들면, NotI 제한부위를 가지는 18 bp의 스페이서 서열(5'-(G)-CGGCCGAGATCTCACG-3')(서열번호: 3)을, 클로닝된 쉐다이 바이러스 게놈 cDNA(pSeV(+))의 리더 서열과 N 단백질의 ORF와의 사이에 삽입하고, 델타 간염 바이러스(delta hepatitis virus)의 안티게놈 가닥(antigenomic strand) 유래의 자기개열 리보자임 부위(auto-cleavage ribozyme site)를 포함하는 플라스미드 pSeV18⁺b(+))를 얻는다(Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820). pSeV18⁺b(+))의 NotI 부위에 외래 유전자 단편을 삽입하고, 목적의 외래 유전자가 삽입된 재조합 쉐다이 바이러스 cDNA를 얻을 수 있다.
- [0139] 이와 같이 하여 제작한 재조합 바이러스의 게놈 RNA를 코딩하는 DNA를, 상기의 바이러스 단백질(L, P, 및 N) 존재하에서 세포 내에서 전사시킴으로써, 바이러스 벡터를 재구성할 수 있다. 본 발명은, 수상세포 도입용 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 제공한다. 또한 본 발명은, 유전자가 도입된 수상세포의 제조에 있어서, 마이너스 가닥 바이러스 벡터의 사용, 및 성숙 수상세포의 제조에 있어서, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 사용에 관한 것이다. 또한 본 발명은, 수상세포 도입용 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 제조를 위한, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터의 바이러스 게놈 RNA를 코딩하는 DNA를 제공한다. 또한 본 발명은, 본 발명의 벡터의 제조에

적용하기 위한, 상기 벡터의 게놈 RNA를 코드하는 DNA의 사용에 관한 것이다. 재조합 바이러스의 재구성은 공지
의 방법을 이용하여 행할 수 있다(WO97/16539; WO97/16538; Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-
332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al.,
1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et
al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271;
Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404). 이들의 방법에 의해,
파라인플루엔자, 수포성 구내염 바이러스, 광견병 바이러스, 홍역 바이러스, 우역 바이러스, 샌다이 바이러스
등을 포함하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스를 DNA로부터 재구성시킬 수 있다. 이들의 방법에 준하여, 본 발명의
벡터를 재구성시킬 수 있다. 바이러스 벡터 DNA에 있어서, F 유전자, HN 유전자, 및/또는 M 유전자를 결실시킨
경우에는, 그대로는 감염성 바이러스 입자를 형성하지 않지만, 숙주세포에 이들을 결실시킨 유전자 및/또는 다
른 바이러스의 엔벨로프 단백질을 코드하는 유전자 등을 별도로 세포에 도입하여 발현시킴으로써, 감염성 바이
러스 입자를 형성시키는 것이 가능하다.

[0140] 구체적인 순서는, (a) 마이너스 가닥 RNA 바이러스 게놈 RNA(음성 가닥 RNA) 또는 그의 상보가닥(양성 가닥)을
코드하는 cDNA를, N, P, 및 L 단백질을 발현하는 세포에서 전사시키는 공정, (b) 생성한 마이너스 가닥 RNA 바
이러스를 포함하는 배양상청을 회수하는 공정에 의해 제조할 수 있다. 전사를 위해, 게놈 RNA를 코드하는 DNA는
적당한 프로모터의 하류에 연결된다. 전사된 게놈 RNA는 N, L, 및 P 단백질의 존재하에서 복제되어 RNP 복합체
를 형성한다. 그리고 M, HN, 및 F 단백질의 존재하에서 엔벨로프에 싸여진 바이러스 입자가 형성된다. 게놈 RNA
를 코드하는 DNA는, 예를 들면, T7 프로모터의 하류에 연결시켜, T7 RNA 폴리머라아제에 의해 RNA에
전사시킨다. 프로모터로서는, T7 폴리머라아제의 인식서열을 포함하는 것 이외에도 목적의 프로모터를 이용할
수 있다. 또는, 인 비트로에서 전사시킨 RNA를 세포에 트랜스펙트해도 된다.

[0141] DNA로부터의 게놈 RNA의 최초의 전사에 필요한 T7 RNA 폴리머라아제 등의 효소는, 이것을 발현하는 플라스미드
또는 바이러스 벡터의 도입에 의해 공급할 수 있고, 또는, 예를 들면, 세포의 염색체에 RNA 폴리머라아제 유전
자를, 발현을 유도할 수 있도록 삽입해 두고, 바이러스 재구성에 발현을 유도함으로써 공급하는 것도 가능하
다. 또한 게놈 RNA, 및 벡터 재구성에 필요한 바이러스 단백질은, 예를 들면, 이들을 발현하는 플라스미드의 도
입에 의해 공급한다. 이들의 바이러스 단백질의 공급에 있어서, 야생형 또는 어떤 종의 변이 마이너스 가닥 RNA
바이러스 등의 헬퍼 바이러스(helper virus)를 사용하는 것도 가능하다.

[0142] 게놈 RNA를 발현하는 DNA를 세포 내에 도입하는 방법으로는, 예를 들면, 다음과 같은 방법, (i) 목적의 세포를
내재시킬 수 있는 DNA 침전물을 만드는 방법, (ii) 목적의 세포에 의한 내재화(internalization)에 적합하고,
또한 세포독성이 적은 양전하 특성을 가지는 DNA를 포함하는 복합체를 만드는 방법, (iii) 목적의 세포막에, DNA
분자가 빠져나갈 수 있을 만큼 충분한 구멍을 전기 펄스(electric pulse)에 의해 순간적으로 뚫는 방법 등이 있
다.

[0143] (ii)로서는, 여러 가지의 트랜스펙션 시약을 이용할 수 있다. 예를 들면, DOTMA(Roche), Superfect(QIAGEN
#301305), DOTAP, DOPE, DOSPER(Roche #1811169) 등을 들 수 있다. (i)로서는 예를 들면 인간갈습을 사용한
트랜스펙션법을 들 수 있고, 이 방법에 의해 세포 내에 든 DNA는 식포(phagosome)에 내재되지만, 핵 내에도 충
분한 양의 DNA가 들어가는 것이 알려져 있다(Graham, F. L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456;
Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223). Chen 및 Okayama는 트랜스퍼 기술의 최적화를 검토하
여, 1) 세포와 공침전물의 인큐베이션 조건을 2~4% CO₂, 35°C, 15~24시간, 2) DNA는 직쇄상(直鎖狀)보다 환상
(環狀)의 것이 활성이 높고, 3) 침전 혼액 중의 DNA 농도가 20~30 micro-g/ml일 때 최적의 침전이 얻어진다고
보고하고 있다(Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745). (ii)의 방법은, 일과적인 트랜스
펙션에 적합하다. 예전부터 DEAE-덱스트란(Sigma #D-9885 M. W. 5×10⁵) 혼액을 목적의 DNA 농도비로 조제하고,
트랜스펙션을 행하는 방법이 알려져 있다. 복합체의 대부분은 엔도솜(endosome) 중에서 분해되어 버리기
때문에, 효과를 높이기 위해 클로로퀸(chloroquine)을 첨가하는 것도 가능하다(Calos, M. P., 1983, Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015). (iii)의 방법은 전기천공법으로 불리우는 방법으로, 세포 선택성이 없다고 하
는 점에서 (i) 또는 (ii)의 방법에 비하여 범용성이 높다. 효율은 펄스 전류의 지속시간, 펄스의 형태, 전계
(전극간의 겹, 전압)의 세기, 버퍼(buffer)의 도전을, DNA 농도, 세포밀도의 최적 조건하에서 좋다고 여겨지고
있다.

[0144] 이상, 3개의 카테고리 중에서 (ii)의 방법은 조작성이 간편하고 다량의 세포를 사용하여 다수의 검체를 검토할 수

있기 때문에, 벡터 재구성을 위한 DNA의 세포로의 도입에는, 트랜스펙션 시약이 적합하다. 적합하게는 Superfect Transfection Reagent(QIAGEN, Cat No. 301305), 또는 DOSPER Liposomal Transfection Reagent(Roche, Cat No. 1811169)가 이용되지만, 이들에 제한되지 않는다.

- [0145] cDNA로부터의 바이러스의 재구성은 구체적으로는 예를 들면 이하와 같이 하여 행할 수 있다.
- [0146] 24웰(well)에서 6웰 정도의 플라스틱 플레이트 또는 100 mm 페트리 접시(petri dish) 등에서, 10% 소 태아 혈청(FCS) 및 항생물질(100 units/ml 페니실린 G 및 100 micro-g/ml 스트렙토마이신(streptomycin))을 포함하는 최소 필수배지(MEM)를 사용하여 원숭이 신장 유래 세포주 LLC-MK2(ATCC CCL-7)를 거의 100% 컨플루언트(confluent)가 될 때까지 배양하고, 예를 들면, 1 micro-g/ml 소랄렌(psoralen) 존재하, 자외선(UV) 조사처리를 20분 처리로 불활성화시킨, T7 RNA 폴리머라아제를 발현하는 재조합 백신시아 바이러스(vaccinia virus) vTF7-3(Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986, Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996)를 2 PFU/세포로 감염시킨다. 소랄렌의 첨가량 및 UV 조사시간은 적절히 조절할 수 있다. 감염 1시간 후, 2~60 micro-g, 보다 바람직하게는 3~20 micro-g의 재조합 센다이 바이러스의 게놈 RNA를 코딩하는 DNA를, 바이러스 RNP의 생성에 필수인 트랜스에 작용하는 바이러스 단백질을 발현하는 플라스미드(0.5~24 micro-g의 pGEM-N, 0.25~12 micro-g의 pGEM-P, 및 0.5~24 micro-g의 pGEM-L)(Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996)와 함께 Superfect(QIAGEN사)를 사용한 리포펙션법(lipofection method) 등에 의해 트랜스펙션한다. N, P, 및 L을 코딩하는 발현 벡터의 양비는 예를 들면, 2:1:2로 하는 것이 바람직하고, 플라스미드량은, 예를 들면 1~4 micro-g의 pGEM-N, 0.5~2 micro-g의 pGEM-P, 및 1~4 micro-g의 pGEM-L 정도로 적절히 조정한다.
- [0147] 트랜스펙션을 행한 세포는, 목적에 따라 100 micro-g/ml의 리팜피신(rifampicin)(Sigma) 및 시토신 아라비노사이드(cytosine arabinoside)(Arac), 보다 바람직하게는 40 micro-g/ml의 시토신 아라비노사이드(Arac)(Sigma)만을 포함하는 혈청이 포함되지 않은 MEM에서 배양하고, 백신시아 바이러스에 의한 세포독성을 최소로 억제하여, 바이러스의 회수율을 최대로 하도록 약제의 최적 농도를 설정한다(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579). 트랜스펙션으로부터 48~72시간 정도 배양 후, 세포를 회수하고, 동결 용해를 3회 반복하여 세포를 파쇄한 후, RNP를 포함하는 파쇄물을 LLC-MK2 세포에 재차 트랜스펙션하여 배양한다. 또는, 배양상청을 회수하고, LLC-MK2 세포의 배양액에 첨가하여 감염시켜 배양한다. 트랜스펙션은, 예를 들면, 리포펙타민(lipofectamine) 또는 폴리카티온 리포솜(polycationic liposome) 등과 함께 복합체를 형성시켜 세포에 도입하는 것이 가능하다. 구체적으로는, 여러 가지의 트랜스펙션 시약을 이용할 수 있다. 예를 들면, DOTMA(Roche), Superfect(QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER(Roche #1811169) 등을 들 수 있다. 엔도솜 중에서의 분해를 막기 위해, 클로로퀸을 첨가하는 것도 가능하다(Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015). RNP가 도입된 세포에서는, RNP로부터의 바이러스 유전자의 발현 및 RNP의 복제의 과정이 진행되어 벡터가 증폭된다. 얻어진 바이러스 용액을 희석(예를 들면, 10⁶배)하여 재증폭을 반복함으로써, 백신시아 바이러스 vTF7-3는 완전히 제거할 수 있다. 재증폭은, 예를 들면, 3회 이상 반복한다. 얻어진 벡터는 -80℃에서 보존할 수 있다. 엔벨로프 단백질을 코딩하는 유전자를 결손한 전파능을 가지지 않는 바이러스 벡터를 재구성시키기 위해서는, 엔벨로프 단백질을 발현하는 LLC-MK2 세포를 트랜스펙션에 사용하거나, 또는 엔벨로프 발현 플라스미드를 함께 트랜스펙션하면 된다. 또한, 트랜스펙션을 행한 세포에 엔벨로프 단백질을 발현하는 LLC-MK2 세포를 중층하여 배양함으로써 결손형 바이러스 벡터를 증폭하는 것도 가능하다(국제공개번호 W000/70055 및 W000/70070 참조).
- [0148] 회수된 바이러스의 역가는, 예를 들면 CIU(Cell-Infected Unit) 측정 또는 적혈구 응집 활성(hemagglutination activity)(HA)을 측정함으로써 결정할 수 있다(W000/70070; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999). 또한, GFP(녹색 형광 단백질(green fluorescent protein)) 등의 마커 유전자를 탑재한 벡터에 대해서는, 마커를 지표로 직접적으로 감염 세포를 카운트함으로써 역가를 정량할 수 있다(예를 들면, GFP-CIU로서). 이와 같이 하여 측정된 역가는, CIU와 동일하게 취급할 수 있다(W000/70070).
- [0149] 바이러스 벡터가 재구성되는 한, 재구성에 사용하는 숙주세포는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들면, 센다이 바이러스 벡터 등의 재구성에 있어서는, 원숭이 신장 유래의 LLC-MK2 세포 및 CV-1 세포, 햄스터 신장 유래의 BHK 세포 등의 배양세포, 인간 유래 세포 등을 사용할 수 있다. 이들의 세포에 적당한 엔벨로프 단백질을 발현시킴으로써, 그 단백질을 엔벨로프에 가지는 감염성 바이러스 입자를 얻는 것도 가능하다. 또한, 대량으로 센다이 바이러스 벡터를 얻기 위해, 상기의 숙주로부터 얻어진 바이러스 벡터를 발육 계란에 감염시켜, 상기 벡터를 증

폭시킬 수 있다. 계란을 사용한 바이러스 벡터의 제조방법은 이미 개발되어 있다(나카니시 등 편, (1993), 「신경과학연구의 첨단기술 프로토콜 III, 분자 신경세포 생리학」, 코세이샤, 오사카, pp. 153-172). 구체적으로는, 예를 들면, 수정란을 배양기에 넣고 9~12일간 37~38℃에서 배양하여, 배(embryo)를 성장시킨다. 바이러스 벡터를 요막강(allantoic cavity)으로 접종하고, 수일간(예를 들면, 3일간) 알을 배양하여 바이러스 벡터를 증식시킨다. 배양기간 등의 조건은, 사용하는 재조합 센다이 바이러스에 의해 변할 수 있다. 그 다음, 바이러스를 포함한 요액(allantoic fluid)을 회수한다. 요액으로부터의 센다이 바이러스 벡터의 분리·정제는 통상적인 방법에 따라서 행할 수 있다(다시로 마비토, 「바이러스 실험 프로토콜」, 나가이, 이시하마 감수, 메티컬 뷰사, pp. 68-73, (1995)).

[0150] 예를 들면, F 유전자를 결실한 센다이 바이러스 벡터의 구축과 조제는, 이하와 같이 행할 수 있다(W000/70055 및 W000/70070 참조).

[0151] <1> F 유전자 결실형 센다이 바이러스 계놈 cDNA 및 F 발현 플라스미드의 구축

[0152] 센다이 바이러스(SeV) 전장(full-length) 계놈 cDNA, pSeV18⁺ b(+)(Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820)(「pSeV18⁺ b(+)」는 「pSeV18⁺」라고도 한다)의 cDNA를 SphI/KpnI로 소화하여 프래그먼트(fragment)(14673 bp)를 회수하고, pUC18에 클로닝하여 플라스미드 pUC18/KS로 한다. F 유전자 결손부위의 구축은 이 pUC18/KS상에서 행한다. F 유전자의 결손은, PCR-라이게이션 방법의 조합으로 행하고, 결과로서 F 유전자의 ORF(ATG-TGA=1698 bp)를 제거하고, 예를 들면, atgcatgccggcagatga(서열번호: 4)에서 연결하여, F 유전자 결실형 SeV 계놈 cDNA(pSeV18⁺/△F)를 구축한다. PCR은, F의 상류에는 [forward: 5'-gttgagtactgcaagagc/서열번호: 5, reverse: 5'-tttccggcatgcatgtttcccaaggggagagttttgcaacc/서열번호: 6], F 유전자의 하류에는 [forward: 5'-atgcatgccggcagatga/서열번호: 7, reverse: 5'-tgggtgaatgagagaatcagc/서열번호: 8]의 프라이머 쌍을 사용한 PCR의 산물을 EcoT22I로 연결한다. 이와 같이 얻어진 플라스미드를 SacI와 SalI로 소화하고, F 유전자 결손부위를 포함하는 영역의 단편(4931 bp)을 회수해서 pUC18에 클로닝하여, pUC18/dFSS로 한다. 이 pUC18/dFSS를 DraIII로 소화하고, 단편을 회수하여 pSeV18⁺의 F 유전자를 포함하는 영역의 DraIII 단편과 치환하며, 라이게이션하여 플라스미드 pSeV18⁺/△F를 얻는다.

[0153] 외래 유전자는, 예를 들면, pUC18/dFSS의 F 유전자 결실부위에 있는 제한효소 NsiI 및 NgoMIV 부위에 삽입한다. 이를 위해서는, 예를 들면, 외래 유전자 단편을, NsiI-tailed 프라이머 및 NgoMIV-tailed 프라이머로 증폭하면 된다.

[0154] <2> SeV-F 단백을 유도 발현하는 헬퍼 세포의 제작

[0155] 센다이 바이러스의 F 유전자(SeV-F)를 발현하는 Cre/loxP 유도형 발현 플라스미드의 구축은 SeV-F 유전자를 PCR로 증폭하고, Cre DNA 리코비나아제(recombinase)에 의해 유전자 산물이 유도 발현되도록 설계된 플라스미드 pCALNdLw(Arai, T. et al., J. Virology 72, 1998, p1115-1121)의 유니크 사이트 SwaI 부위에 삽입하여, 플라스미드 pCALNdLw/F를 구축한다.

[0156] F 유전자 결손 계놈으로부터 감염 바이러스 입자를 회수하기 위해, SeV-F 단백을 발현하는 헬퍼 세포주를 수립한다. 세포는, 예를 들면, SeV의 증식에 자주 사용되고 있는 원숭이 신장 유래 세포주 LLC-MK2 세포를 사용할 수 있다. LLC-MK2 세포는, 10%의 열처리한 불활성화 소 태아 혈청(FBS), 페니실린 G 나트륨 50 단위/ml, 및 스트렙토마이신(streptomycin) 50 micro-g/ml를 첨가한 MEM으로 37℃, 5% CO₂에서 배양한다. SeV-F 유전자 산물은 세포상해성을 가지기 때문에, Cre DNA 리코비나아제에 의해 F 유전자 산물이 유도 발현되도록 설계된 상기 플라스미드 pCALNdLw/F를, 인산칼슘법(mammalian transfection kit(Stratagene))에 의해, 주지의 프로토콜에 따라서 LLC-MK2 세포에 도입한다.

[0157] 10 cm 플레이트를 사용하여, 40% 컨플루언트까지 생육한 LLC-MK2 세포에 10 micro-g의 플라스미드 pCALNdLw/F를 도입 후, 10 ml의 10% FBS를 포함하는 MEM 배지에, 37℃의 5% CO₂ 인큐베이터 중에서 24시간 배양한다. 24시간 후에 세포를 벗겨, 10 ml 배지에 현탁 후, 10 cm 살레 5장을 사용하여, 5 ml 1장, 2 ml 2장, 0.2 ml 2장에 뿌리고, G418(GIBCO-BRL)을 1200 micro-g/ml를 포함하는 10 ml의 10% FBS를 포함하는 MEM 배지에 배양을 행하여, 2일마다 배지를 교환하면서, 14일간 배양하고, 유전자의 안정 도입주의 선택을 행한다. 상기 배지에 의해 생육되어온 G418에 내성을 나타내는 세포는 클로닝 링(cloning ring)을 사용하여 회수한다. 회수한 각 클론은 10 cm 플레이트에서 컨플루언트가 될 때까지 확대 배양을 계속한다.

- [0158] F 단백질의 발현 유도는, 세포를 6 cm 살레에 컨플루언트까지 생육시킨 후, 아테노바이러스 AxCANCre를 사이트 등의 방법(Saito et al., Nucl. Acids Res. 23: 3816-3821(1995); Arai, T. et al., J. Virol 72, 1115-1121(1998))에 의해, 예를 들면, moi=3으로 감염시켜 행할 수 있다.
- [0159] <3> F 유전자 결실 SeV 바이러스의 재구축 및 증폭
- [0160] 상기 pSeV18⁺/△F의 외래 유전자가 삽입된 플라스미드를 이하와 같이 하여 LLC-MK2 세포에 트랜스펙션한다. LLC-MK2 세포를 5×10⁶ cells/dish로 100 mm의 살레에 뿌린다. T7 RNA 폴리머라아제에 의해 게놈 RNA의 전사를 행하게 하는 경우에는, 세포 배양 24시간 후, 소랄렌(psoralen)과 장파장 자외선(365 nm)으로 20분간 처리한 T7 RNA 폴리머라아제를 발현하는 재조합 백시니아 바이러스(recombinant vaccinia virus)(PLWUV-VacT7: Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126(1986))를 MOI 2 정도로 실온에서 1시간 감염시킨다. 백시니아 바이러스의 자외선 조사에는, 예를 들면, 15 와트 벌브(watt bulb) 5개가 장비된 UV Stratalinker 2400(카탈로그 번호 400676(100 V), 스트라타진사, La Jolla, CA, USA)을 사용할 수 있다. 세포를 무혈청의 MEM으로 세정한 후, 게놈 RNA를 발현하는 플라스미드, 및 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 각각 N, P, L, F, 및 HN 단백질을 발현하는 발현 플라스미드를, 적당한 리포펙션 시약을 사용하여 이의 세포에 트랜스펙트한다. 플라스미드의 양비는, 이것에 한정되지 않지만, 적합하게는 순서대로 6:2:1:2:2로 할 수 있다. 예를 들면, 게놈 RNA를 발현하는 플라스미드, 및 N, P, L, F 및 HN 단백질을 발현하는 발현 플라스미드(pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L 및 pGEM/F-HN; W000/70070, Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579(1996))를, 각각 12 micro-g, 4 micro-g, 2 micro-g, 4 micro-g 및 4 micro-g/dish의 양비로 트랜스펙트한다. 수시간 배양 후, 혈청을 포함하지 않는 MEM으로 세포를 2회 세정하여, 40 micro-g/ml의 Cytosine β-D-arabinofuranoside(AraC: Sigma, St. Louis, MO) 및 7.5 micro-g/ml의 Trypsin(Gibro-BRL, Rockville, MD)을 포함하는 MEM에서 배양한다. 이들의 세포를 회수하여, 펠렛(pellet)을 OptiMEM에 현탁한다(10⁷ cells/ml). 동결 용해를 3회 반복하여 리포펙션시약(lipofection reagent) DOSPER(Boehringer mannheim)와 혼합하고(10⁶ cells/25 micro-L DOSPER) 실온에서 15분 방치한 후, 상기에서 클로닝한 F 발현 헬퍼 세포에 트랜스펙션(10⁶ cell/well 12-well-plate)하여, 혈청을 포함하지 않는 MEM(40 micro-g/ml AraC, 7.5 micro-g/ml 트립신을 포함한다)에서 배양하고, 상청을 회수한다. F 이외의 유전자, 예를 들면, HN 또는 M 유전자를 결손한 바이러스도 이것과 동일한 방법으로 조제할 수 있다.
- [0161] 바이러스 유전자 결손형 벡터를 조제하는 경우, 예를 들면, 벡터에 포함되는 바이러스 게놈상에서 결손되어 있는 바이러스 유전자가 상이한 2 종류 또는 그 이상의 벡터를 동일한 세포에 도입하면, 각각에서 결손하는 바이러스 단백질이, 다른 벡터로부터의 발현에 의해 공급되기 때문에, 서로 상보하여 감염력이 있는 바이러스 입자가 형성되고, 복제 사이클이 돌아 바이러스 벡터가 증폭된다. 즉, 2종류 또는 그 이상의 본 발명의 벡터를, 바이러스 단백질을 상보하는 조합으로 접종하면, 각각의 바이러스 유전자 결손형 바이러스 벡터의 혼합물을 대량 또한 저비용으로 생산할 수 있다. 이들의 바이러스는, 바이러스 유전자가 결손되어 있기 때문에, 바이러스 유전자를 결손하고 있지 않은 바이러스에 비해 게놈 사이즈가 작아져, 사이즈가 큰 외래 유전자를 보유할 수 있다. 또한, 바이러스 유전자의 결손에 의해 증식성이 없는 이들의 바이러스는 세포 밖에서 회석되어 공감염의 유지가 곤란하여 멸균화하기 때문에, 환경 방출 관리상의 이점이 있다.
- [0162] 마이너스 가닥 RNA 바이러스에 의해 도입하는 외래 유전자로서는, 특별히 제한은 없지만, 천연의 단백질로서는, 예를 들면, 호르몬, 사이토카인, 증식인자, 수용체, 세포내 시그널 분자, 효소, 펩티드 등을 들 수 있다. 단백질은 분비 단백질, 막 단백질, 세포질 단백질, 핵 단백질 등일 수 있다. 인공적인 단백질로서는, 예를 들면, 키메라 독소 등의 융합 단백질, 도미넌트 음성 단백질(dominant negative protein)(수용체의 가용성 분자 또는 막 결합형 도미넌트 음성 수용체를 포함한다), 결실형 세포 접착분자 및 세포 표면분자 등을 들 수 있다. 또한, 분비 시그널, 막 국재화 시그널(membrane-localization signal), 또는 핵 이행 시그널 등을 부가한 단백질이어도 된다. 도입 유전자로서 안티센스 RNA 분자 또는 RNA 절단형 리보자임 등을 발현시켜, 특정 유전자의 기능을 억제하는 것도 가능하다. 외래 유전자로서 환자의 치료용 유전자를 사용하여 바이러스 벡터를 조제하면, 이 벡터를 투여하여 유전자 치료를 행하는 것이 가능해진다. 본 발명의 바이러스 벡터의 유전자 치료로의 응용으로서, 직접투여에 의한 유전자 발현, 간접(ex vivo)투여에 의한 유전자 발현 중 어느 하나의 방법에 의해서도, 치료 효과를 기대할 수 있는 외래 유전자 또는 환자의 체내에서 공급이 부족한 내재 유전자 등을 수상 세포로부터 발현시키는 것이 가능하다. 또한, 본 발명의 벡터는 재생의료에 있어서의 유전자 치료 벡터로서도 이용할 수 있다.

- [0163] 본 명세서에 기재한 바이러스 제조방법에 따르면, 본 발명의 바이러스 벡터는, 예를 들면, 1×10^5 CIU/ml 이상, 바람직하게는 1×10^6 CIU/ml 이상, 보다 바람직하게는 5×10^6 CIU/ml 이상, 보다 바람직하게는 1×10^7 CIU/ml 이상, 보다 바람직하게는 5×10^7 CIU/ml 이상, 보다 바람직하게는 1×10^8 CIU/ml 이상, 보다 바람직하게는 5×10^8 CIU/ml 이상의 역가로 바이러스 생산세포의 세포외액 중에 방출시키는 것이 가능하다. 바이러스의 역가는, 본 명세서 및 그 외에 기재된 방법에 의해 측정할 수 있다(Kiyotani, K. et al., Virology 177(1), 65-74(1990); W000/70070).
- [0164] 회수한 바이러스 벡터는 실질적으로 순수하게 되도록 정제할 수 있다. 정제방법은 여과(filtration), 원심분리, 흡착, 및 칼럼 정제 등을 포함하는 공지의 정제·분리방법 또는 그의 임의의 조합에 의해 행할 수 있다. 「실질적으로 순수」란, 벡터를 포함하는 용액 중에서 벡터의 성분이 주요한 비율을 차지하는 것을 말한다. 예를 들면, 실질적으로 순수한 바이러스 벡터 조성물은, 용액 중에 포함되는 전체 단백질(단, 캐리어(carrier)나 안정제로서 첨가한 단백질은 제외한다) 중, 바이러스 벡터의 성분으로서 포함되는 단백질의 비율이 10%(중량/중량) 이상, 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상을 차지함으로써 확인할 수 있다. 예를 들면, 파라믹소바이러스 벡터인 경우, 구체적인 정제방법으로서는, 셀룰로오스 황산 에스테르 또는 가교 폴리사카라이드 황산 에스테르를 사용하는 방법(일본국 특허공고 제(소)62-30752호 공보, 일본국 특허공고 제(소)62-33879호 공보, 및 일본국 특허공고 제(소)62-30753호 공보), 및 푸코오스 황산 함유 다당 및/또는 그의 분해물에 흡착시키는 방법(W097/32010) 등을 예시할 수 있지만, 이들에 제한되지 않는다.
- [0165] 벡터를 포함하는 조성물의 제조에 있어서는, 벡터는 필요에 따라 약리학적으로 허용되는 목적의 담체 또는 매체와 조합시킬 수 있다. 「약학적으로 허용되는 담체 또는 매체」란, 벡터와 함께 투여하는 것이 가능하고, 벡터에 의한 유전자 도입을 두드러지게 방해하지 않는 재료이다. 이와 같은 담체 또는 매체로서는, 예를 들면, 탈이온수, 멸균수, 염화나트륨 용액, 덱스트로오스 용액(dextrose solution), 덱스트로오스 및 염화나트륨, 유산 함유 링거 용액, 배양액, 혈청, 인산 완충 생리식염수(PBS) 등을 들 수 있고, 이들과 벡터를 적절히 조합시켜 제제화하는 것이 생각되어진다. 또한, 리포솜의 막 안정화제(예를 들면, 콜레스테롤 등의 스테롤류)를 포함하고 있어도 된다. 또한, 항산화제(예를 들면, 토코페롤 또는 비타민 E 등)를 포함하고 있어도 된다. 추가로, 그 밖에도 식물유, 현탁제, 계면활성제, 안정제, 살생물제 등이 함유되어 있어도 된다. 또한 보존제나 그 밖의 첨가제를 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 수용액, 캡슐, 현탁액, 시럽 등의 형태일 수 있다. 또한 본 발명의 벡터 조성물은 용액, 동결 건조물, 또한 에어졸(aerosol) 형태의 조성물이어도 된다. 동결 건조물의 경우는 안정화제로서 소르비톨(sorbitol), 수크로오스(sucrose), 아미노산 및 각종 단백질 등을 포함하고 있어도 된다. 본 발명의 벡터를 포함하는 조성물은 수상세포에 유전자를 도입하기 위한 시약으로서, 더욱이 수상세포를 표적으로 하는 유전자 치료에 사용하는 의약으로서 유용하다. 또한 벡터 용액은 백신으로서 유용하다(J. I. Mayordomo et al., Nature Med. 1(12), 1279-1302, (1995)). 또한, 본 발명의 벡터에 의해 수상세포에서 항원 펩티드를 발현시키면, 이 펩티드를 제시하는 세포는 백신으로서 사용할 수 있다. 백신 조성물은, 면역원성을 높이기 위해, 사이토카인, 콜레라 독소, 살모넬라 독소 등의 면역 촉진제를 첨가하는 것도 가능하다. 또한, 백신에는 백반, 불완전 프로인트의 애쥬번트(incomplete freund's adjuvant), MF59(오일 에멀전), MTP-PE(마이코박테리아(mycobacteria) 세포벽 유래의 muramyl tripeptide), 및 QS-21(soapbark tree *Quilaja saponaria* 유래) 등의 애쥬번트를 조합시키는 것도 가능하다.
- [0166] 또한, 조성물의 투여시에는, 애쥬번트 효과를 높이는 사이토카인류를 조합시키는 것도 유효하다. 이와 같은 유전자로서는, 예를 들면, i) IL-2와 단일가닥 IL-12와의 조합(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(15): 8591-8596, 1999), ii) IL-2와 인터페론- γ (미국특허 제5,798,100호), iii) 단독으로 사용되는 과립구 콜로니 자극인자(GM-CSF), iv) GM-CSF와 IL-4의 조합(J. Neurosurgery 90(6), 1115-1124(1999)) 등을 들 수 있다.
- [0167] 수상세포에 제시시키는 항원은, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터에 코드시키거나, 또는 벡터를 도입한 수상세포에 첨가(즉, 펄스)하거나, 또는 다른 목적의 벡터로 발현시킬 수 있다. 항원으로서는, 감염 미생물, 바이러스, 기생충, 병원체, 및 암 등에 관련된 목적의 항원을 들 수 있다. 이들은, 구조 단백질 또는 비구조 단백질이어도 된다. 이와 같은 항원(또는 그의 프로세스된 펩티드)은, 수상세포 표면의 MHC 분자에 결합하여 세포 표면에 제시되어, 면역 응답이 유도된다.
- [0168] 백신으로서 사용하는 경우, 예를 들면, 종양, 감염증, 및 그 밖의 일반적인 질환에 대하여 적용할 수 있다. 감염증의 치료로서는, 예를 들면, 감염성 미생물의 항원 단백질의 에피토프를 해석하여, 이것을 수상세포에서 발현

또는 제시시킬 수 있다.

[0169] 예를 들면, 병원체 유래의 항원으로서, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 델타형 간염 바이러스, 유두종 바이러스 항원(papilloma virus antigen), 단순 헤르페스 바이러스(herpes simplex virus)(HSV), 수두-대상 포진 바이러스(varicella-zoster virus)(VZV), 엡스테인-바 바이러스(Epstein-Barr virus), 사이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus)(CMV), HIV, 및 말라리아 등이 가지는 단백질 또는 그의 부분 펩티드를 들 수 있다. 이들의 항원 단백질을 코딩하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스는, 예방적 및 치료적으로 사용할 수 있다. 구체적으로는, 예를 들면 인플루엔자에 있어서는, 강독주(highly-virulent strain) H5N1형 등의 엔벨로프, 일본뇌염에 있어서는, 예를 들면, 일본뇌염 바이러스의 엔벨로프 단백질(Vaccine, vol. 17, No. 15-16, 1869-1882(1999)), 에이즈에 있어서는, 예를 들면, HIV gag 또는 SIV gag 단백질(J. Immunology(2000) vol. 164, 4968-4978), HIV 엔벨로프 단백질, Nef 단백질, 그 밖의 바이러스 단백질 등을 들 수 있다. 콜레라에 있어서는, 예를 들면, 콜레라 독소의 B 서브유닛(CTB)(Arakawa T, et al., Nature Biotechnology(1998) 16(10): 934-8, Arakawa T. et al., Nature Biotechnology(1998) 16(3): 292-7), 광견병에 있어서는, 예를 들면, 광견병 바이러스의 당단백(Lodmell DL et al., 1998, Nature Medicine 4(8): 949-52), 자궁경암(cervical carcinoma)에 있어서는, 인간 유두종 바이러스 6형(human papilloma virus 6 type)의 캡시드 단백질 L1(J. Med. Virol, 60, 200-204(2000)) 등을 들 수 있다. 또한, 그 밖의 병원성 바이러스의 항원 단백질을 벡터로부터 발현시키는 것도 가능하다. 또한, 일본뇌염 바이러스의 JE-E 항원 단백질(일본국 특허공개 제(소)64-74982, 일본국 특허공개 제(평)1-285498), 인간 단순 헤르페스 바이러스의 gD2 단백질(일본국 특허공개 제(평)5-252965), C형 간염 바이러스 유래 폴리펩티드(일본국 특허공개 제(평)5-192160), 가성 광견병 바이러스(pseudorabies virus) 유래 폴리펩티드(일본국 특허공표 제(평)7-502173) 등을 사용하는 것도 가능하다. 예를 들면, 이들의 병원성 미생물에 감염된 환자 유래의 세포를 해석하고, 항원제시세포(APC)에 있어서 제시된 항원 단백질의 에피토프를 동정하여, 이것을 사용해도 된다. HLA형을 적절히 선택함으로써, 목적의 HLA형에 대한 에피토프를 동정하여 사용하는 것도 바람직하다.

[0170] 종양에 대한 면역 응답을 특이적으로 촉진시키기 위해서는, 1 이상의 종양항원을 발현하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 수상세포에 도입, 또는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터로 활성화시킨 수상세포에 종양항원을 펄스한다. 종양항원은 종양세포에 특이적인 것(즉, 종양세포에 존재하지만, 비종양세포에는 존재하지 않는 것)이어도, 동일한 타입의 비종양세포보다도 종양세포에 높은 레벨로 존재하는 것이어도 된다. 이 수상세포를 투여함으로써 면역계가 자극된다. CTL이 주요한 이펙터(effector)로서 작용하는 경우는, 항원으로서의 세포 내외에 발현하는 목적의 종양항원을 사용할 수 있다. 수상세포를 사용하여, CD4 T세포의 활성화로부터 계속되는 B세포의 활성화에 의한 항체 생산을 야기하여, 항체를 이펙터로서 작용시키는 경우에는, 항원으로서의 세포 표면에 표출하는 것이 바람직하고, 예를 들면, 세포 표면 수용체 또는 세포 접착 단백질을 사용할 수 있다. 종양항원의 예로서는, 난소암 등으로 하는 Muc-1 또는 Muc-1 유사 뮤신 탠덤 리피트 펩티드(mucin tandem repeat peptide)(미국특허 제5,744,144호), 자궁경암을 일으키는 인간 유두종 바이러스 단백질 E6 및 E7, 흑색종 항원 MART-1, MAGE-1, -2, -3, gp 100 및 티로시나아제(tyrosinase), 전립선암 항원 PSA, 그 밖에도, CEA(Kim, C. et al., Cancer Immunol. Immunother. 47(1998) 90-96), 및 Her2neu(HER2p63-71, p780-788; Eur. J. Immunol. 2000; 30: 3338-3346) 등을 들 수 있다.

[0171] 본 발명에 의해 조제되는 수상세포는, 암 및 감염증에 대한 유효한 면역요법에 있어서 유용하고, 종양항원 또는 감염증 관련 항원의 유전자가 도입된 수상세포 또는 그의 수상세포에서 자극된 T세포에 의한 면역감작은, 환자에 있어서 항종양 또는 항감염증 면역을 유도하는 유효한 방법이 된다. 본 발명은, 본 발명의 방법에 의해 얻어진 수상세포의 면역반응의 유도에 있어서의 사용에도 관한 것이다. 즉, 본 발명은, 본 발명의 방법에 의해 얻어진 수상세포의, 면역요법에 있어서의 사용, 구체적으로는, 예를 들면, 종양 또는 감염증의 치료에 있어서의 사용에 관한 것이다. 또한, 본 발명은, 본 발명의 방법에 의해 얻어진 수상세포의, 면역 활성화제의 제조에 있어서의 사용에 관한 것이다. 즉, 본 발명은, 본 발명의 방법에 의해 얻어진 수상세포의, 면역치료제의 제조에 있어서의 사용, 구체적으로는, 예를 들면 항종양제(종양 증식억제제) 또는 감염증 치료약의 제조에 있어서의 사용에 관한 것이다.

[0172] 또한, 일반병으로의 적용도 생각되어진다. 당뇨병에 있어서는, 예를 들면, I형 당뇨병 모델 동물에 있어서, 인슐린 단편의 펩티드를 에피토프로서 이용하는 것이 생각되어진다(Coon, B. et al., J. Clin. Invest., 1999, 104(2): 189-94).

[0173] 또한, 수상세포로부터 사이토카인류를 발현시키면, 면역계를 자극하여 감염 미생물 또는 암에 대한 면역 응답을 높이기 때문에, 사이토카인을 코딩하는 유전자를 도입한 수상세포일지라도, 암과 그 밖의 사이토카인 치료가 유

효하다고 생각되어지는 환자의 치료에 있어서 유용하다. 면역자극성 사이토카인을 코드하는 유전자를 탑재하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터가 도입된 수상세포는 효과적인 면역유도제가 된다. 예를 들면, 면역자극성 사이토카인으로서, 인터류킨(예를 들면, IL-1alpha, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-23, IL-27), 인터페론(예를 들면, IFN-alpha, IFN-beta, IFN-gamma), 종양 괴사인자(TNF), 트랜스포밍 증식인자(TGF)-beta, 과립구 콜로니 자극인자(G-CSF), 마크로파지 콜로니 자극인자(M-CSF), 과립구 마크로파지 콜로니 자극인자(GM-CSF), 인슐린 유사 증식인자(IGF)-I, IGF-2, Flt-3 리간드, Fas 리간드, 및 c-kit 리간드, 및 다른 면역조절 단백질(케모카인(chemokines) 및 보조자극분자(costimulatory molecule) 등)이 포함된다.

[0174] 이들 사이토카인의 아미노산서열은 당업자에게는 주지이고, IL-4에 대해서는, 예를 들면, Arai 등(1989), J. Immunol. 142(1) 274-282, IL-6에 대해서는, 예를 들면, Yasukawa 등(1987), EMBO J., 6(10): 2939-2945, IL-12는 예를 들면, Wolf 등(1991), J. Immunol. 146(9): 3074-3081, IFN-alpha는 예를 들면, Gren 등(1984) J. Interferon Res. 4(4): 609-617, 및 Weismann 등(1982) Princess Takamatsu Symp. 12: 1-22, TNF는 예를 들면, Pennica 등(1984) Nature 312: 724-729, G-CSF는 예를 들면, Hirano 등(1986) Nature 324: 73-76, GM-CSF는 예를 들면, Cantrell 등(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82(18): 6250-6254를 참조할 수 있다. 보다 구체적으로는, GM-CSF를 코드하는 핵산서열로서는 Accession number NM_000758의 84~461번째 서열(아미노산 서열은 NP_000749의 18~144번째)을 포함하는 서열을 들 수 있다. IL-4를 코드하는 핵산 서열로서는, Accession number NM_000589의 443~829번째 서열(아미노산서열은 NP_000580의 25~153번째)을 포함하는 서열을 들 수 있다. 이들 사이토카인을 코드하는 천연의 유전자 또는 유전자 암호의 축중(縮重)을 이용하여, 기능적 사이토카인을 추가로 코드하는 변이 유전자를 포함하는 벡터를 설계하고, 수상세포에 도입할 수 있다.

[0175] 또한, 이들 사이토카인의 개변체를 발현하도록 유전자 개변해도 된다. 예를 들면, 전구체 및 성숙체의 2개의 형태를 가지는 사이토카인(예를 들면, 시그널 펩티드의 절단에 의해 활성 프래그먼트(active fragment)를 생성하는 것, 또는 단백질의 한정분해에 의해 활성 프래그먼트를 생성하는 것 등)에 대해서, 전구체 또는 성숙체 중 어느 하나를 발현하도록 유전자 개변해도 된다. 그 밖의 개변체(예를 들면, 사이토카인의 활성 프래그먼트과 이중 서열(예를 들면, 이중 시그널 펩티드)과의 사이의 융합 단백질)를 사용해도 된다.

[0176] 예를 들면, 실시예에 나타내는 바와 같이, IFN-beta 유전자를 탑재한 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 도입한 수상세포는, 세포상해성 T 림프구를 매우 강하게 활성화시켜, 항원인 종양의 증식을 현저하게 억제한다. 수상세포는 벡터의 도입에 의해 활성화되기 때문에, 독성이 있는 LPS 등으로 수상세포를 자극할 필요도 없다. 이와 같이, IFN-beta 유전자를 탑재한 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 도입한 수상세포는, 항종양 면역치료를 위해 유망한 치료약이 된다. IFN-beta 유전자는 인간 및 마우스를 포함하는 대부분의 영장류, 포유류에서 주지이고, 예를 들면, IFN-beta 유전자는 서열번호: 12(성숙형 폴리펩티드는 서열번호: 13의 21~187번째), 마우스 IFN-beta는 서열번호: 14(성숙형 폴리펩티드는 서열번호: 15의 21~182번째)를 들 수 있다(Derynck, R. et al., Nature 285, 542-547(1980); Higashi, Y. et al., J. Biol. Chem. 258, 9522-9529(1983); Kuga, T. et al., Nucleic Acids Res. 17, 3291(1989)). 시그널 펩티드는, 적절히 다른 단백질의 시그널 서열에 치환해도 된다.

[0177] IFN-beta 유전자는, 상기의 기지의 IFN-beta cDNA 및 단백질의 서열을 토대로 상동성(homology) 검색 등에 의해 찾을 수 있다(예를 들면, BLAST; Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410). 또는, 기지의 IFN-beta cDNA 염기서열을 토대로 설계한 프라이머를 사용한 RT-PCR에 의해 얻는 것도 가능하고, 또는 IFN-beta cDNA를 프로브(probe)로 하여 스트린젠트한(stringent) 조건에 있어서의 하이브리다이제이션(hybridization)에 의해, 인간, 마우스, 랫트, 및 그 밖의 포유동물 cDNA 라이브러리를 스크리닝(screening)함으로써 얻는 것도 용이하다. 하이브리다이제이션의 조건은, IFN-beta cDNA의 코드 영역을 포함하는 핵산, 또는 하이브리다이제의 대상으로 하는 핵산의 어느 한쪽으로부터 프로브를 조제하고, 그것이 다른 쪽의 핵산에 하이브리다이제이션 하는지를 검출함으로써 동정할 수 있다. 프로브는 상기 핵산의 단편이면 되고, 그 길이는 통상 20 염기 이상, 바람직하게는 30 염기 이상, 보다 바람직하게는 50 염기 이상이다. 스트린젠트한 하이브리다이제이션의 조건은, 예를 들면, 5×SSC(1×SSC는 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate를 포함한다), 7%(W/V) SDS, 100 micro-g/ml 변성 연어 정자 DNA, 5×덴하르트액(Denhardt's solution)(1×덴하르트 용액은 0.2% 폴리비닐 피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 0.2% 소 혈청 알부민, 및 0.2% 피콜(Ficoll)을 포함한다)을 포함하는 용액 중, 48℃, 바람직하게는 50℃, 보다 바람직하게는 52℃에서 하이브리다이제이션을 행하고, 그 다음 하이브리다이제이션과 동일한 온도, 보다 바람직하게는 60℃, 더욱 바람직하게는 65℃, 가장 바람직하게는 68℃에서 2×SSC 중, 바람직하게는 1×SSC 중, 보다 바람직하게는 0.5×SSC 중(예를 들면, 0.1×SSC 중)에서, 진탕(shaking)시키면서 2시간 세정하는 조건이다.

- [0178] 포유동물 IFN-beta의 염기서열 또는 아미노산서열은, 일반적으로 기지의 IFN-beta의 서열(예를 들면, 서열번호: 12~15의 성숙 단백질에 대응하는 서열)과 높은 상동성을 가지는 서열을 포함하고 있다. 높은 상동성이란, 70% 이상, 바람직하게는 75% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상의 동일성(identity)을 가지는 서열이다. 서열의 동일성은, 예를 들면, BLAST 프로그램에 의해 결정할 수 있다(Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410). 구체적으로는, 염기서열의 동일성을 결정하기 위해서는 blastn 프로그램, 아미노산서열의 동일성을 결정하기 위해서는 blastp 프로그램을 사용하고, 예를 들면, NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST의 웹 페이지(web page)에 있어서 「Low complexity」 등의 필터의 설정은 전체 OFF로 하고, 디폴트의 파라미터(default parameter)를 사용하여 계산을 행한다(Altschul, S. F. et al. (1993) Nature Genet. 3: 266-272; Madden, T. L. et al. (1996) Meth. Enzymol. 266: 131-141; Altschul, S. F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402; Zhang, J. & Madden, T. L. (1997) Genome Res. 7: 649-656). 파라미터의 설정은, 예를 들면, 오픈 갭(open gap)의 코스트는 뉴클레오티드는 5이고 단백질은 11, 익스텐드 갭(extend gap)의 코스트는 뉴클레오티드는 2이고 단백질은 1, 뉴클레오티드 미스매치(nucleotide mismatch)의 패널티는 -3, 뉴클레오티드 매치의 보수는 1, 기대값(expect value)은 10, 워드사이즈(wordsize)는 뉴클레오티드는 11이고 단백질은 2, Dropoff(X) for blast extensions in bits는 blastn에서는 20이고 다른 프로그램에서는 7, X dropoff value for gapped alignment(in bits)는 blastn 이외에서는 15, final X dropoff value for gapped alignment(in bits)는 blastn에서는 50이고 다른 프로그램에서는 25로 한다. 아미노산서열의 비교에 있어서는, 스코어를 위한 매트릭스(scoring matrix)로서 BLOSUM62를 사용할 수 있다. 두개의 서열의 비교를 행하는 blast2sequences 프로그램(Tatiana A et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174: 247-250)에 의해, 두개의 서열의 얼라인먼트(allignment)를 작성하여, 서열의 동일성을 결정할 수 있다. 갭은 미스매치와 동일하게 취급하여, IFN-beta의 성숙 단백질의 코드 서열(CDS)의 바깥쪽 갭은 무시하고, IFN-beta의 성숙 단백질의 CDS 전체(예를 들면, 서열번호: 12의 64~561번째 또는 14의 64~546번째) 또는 아미노산서열 전체(예를 들면, 서열번호: 13의 22~187번째 또는 서열번호: 15의 22~182번째)에 대한 동일성의 값을 계산한다.
- [0179] 또한, IFN-beta에는 다형(polymorphism) 및 배리언트(variant)가 존재한다. 야생형 IFN-beta와 동등한 활성이 유지된 배리언트를 적절히 사용할 수 있다. 야생형 IFN-beta와 동등한 활성이란, 항바이러스 활성을 들 수 있고, 예를 들면, 수포성 구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus)에 의한 세포독성을 저해하는 활성 어세이(assay)에 의해 측정할 수 있다. 구체적으로는, WISH 세포(CCL-25; A. T. C. C. (American Type Culture Collection), Manassas, VA, U. S. A)에 vesicular stomatitis-Indiana-virus[VR-1238AF; A. T. C. C.]를 접종하여, 바이러스에 의한 세포사(cell death)를 검출하고, IFN-beta에 의한 방어를 측정한다(측정조건은, Knezic, Z., et al. (1993) Antiviral Res. 25, 215-221에 따른다). 바이러스에 의한 세포사의 50% 억제농도는, 1 international unit(IU)라고 정의된다. 야생형 IFN-beta와 동등한 항바이러스 활성을 가지는 폴리펩티드는, 바람직하게는 1×10^6 IU/mg protein 이상, 보다 바람직하게는 5×10^6 IU/mg protein 이상, 보다 바람직하게는 1×10^7 IU/mg protein 이상의 비활성(比活性)을 나타낸다. 또한, 야생형 IFN-beta와 동등한 항바이러스 활성을 가지는 폴리펩티드는, 바람직하게는 야생형 IFN-beta의 1/10 이상의 비활성으로 항바이러스 활성을 나타낸다.
- [0180] IFN-beta의 다형 및 배리언트는, 일반적으로 어느 1개의 IFN-beta 분자종(예를 들면, 서열번호: 12~15)의 염기서열 또는 아미노산서열에 있어서 1 또는 복수의 잔기가 치환, 결실, 및/또는 삽입된 서열을 포함할 수 있다. 공지의 IFN-beta의 서열과의 상이함은, 통상 30 잔기 이내, 바람직하게는 20 잔기 이내, 바람직하게는 10 잔기 이내, 보다 바람직하게는 5 잔기 이내, 보다 바람직하게는 3 잔기 이내, 보다 바람직하게는 2 잔기 이내이다. 아미노산의 치환은 보존적 치환이어도 된다. 보존적으로 치환한 단백질은 활성이 유지되기 쉽다. 보존적 치환은, 예를 들면, 염기성 아미노산(예를 들면, 리신(lysine), 아르기닌(arginine), 히스티딘(histidine)), 산성 아미노산(예를 들면, 아스파라긴산, 글루타민산), 비하전극성 아미노산(non-charged polar amino acid)(예를 들면, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 아미노산(non-polar amino acid)(예를 들면, 알라닌(alanine), 발린(valine), 류신(leucine), 이소류신(isoleucine), 프롤린(proline), 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판(tryptophan)), β 분지 아미노산(예를 들면, 트레오닌, 발린, 이소류신), 및 방향족 아미노산(예를 들면, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘) 등의 각 그룹 내의 아미노산간의 치환 등을 들 수 있다.
- [0181] 즉, IFN-beta 유전자로서는, 이하에 기재된 핵산을 들 수 있다.

- [0182] (a) 서열번호: 13의 22~187번째 또는 서열번호: 15의 22~182번째에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산.
- [0183] (b) 서열번호: 12의 64~561번째, 서열번호: 14의 64~546번째, 또는 그들의 상보서열을 포함하고, 서열번호: 13의 22~187번째 또는 서열번호: 15의 22~182번째에 기재된 서열을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산.
- [0184] (c) 서열번호: 12의 64~561번째, 서열번호: 14의 64~546번째, 또는 그들의 상보서열의 핵산 단편과 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 핵산으로서, 야생형 IFN-beta와 동등한 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산.
- [0185] (d) 서열번호: 13의 22~187번째 또는 서열번호: 15의 22~182번째에 기재된 아미노산 서열에 있어서 1 또는 복수의 아미노산이 치환, 결실, 및/또는 삽입된 서열을 포함하고, 야생형 IFN-beta와 동등한 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산.
- [0186] (e) 서열번호: 12의 64~561번째, 서열번호: 14의 64~546번째, 또는 그들의 상보서열과 높은 상동성을 가지는 서열을 포함하는 핵산으로서, 야생형 IFN-beta와 동등한 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산.
- [0187] (f) 서열번호: 13의 22~187번째 또는 서열번호: 15의 22~182번째와 높은 상동성을 가지는 서열을 포함하고, 야생형 IFN-beta와 동등한 활성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산.
- [0188] 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터에 의해 유전자 개변된 수상세포는, 환자 자신의 T세포를 *in vivo*에서 자극하는 데에 유용하고, 또는 이 유전자 개변 수상세포는 T세포를 *in vitro*에서 자극하는 것에도 유용하다. 감염된 T세포를 환자에게 투여하고, 엑스 비보(*ex vivo*) 면역요법을 매개로 하여 환자의 면역계를 자극하는 것도 가능하다.
- [0189] 본 발명은, 수상세포에 의해 자극된 T세포의 제조방법으로서, (a) 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 수상세포 또는 그의 전구세포에 접촉시키는 공정, (b) 상기 세포를 성숙 수상세포에 분화시키는 공정, (c) 상기 성숙 수상세포를 T세포에 접촉시키는 공정, 을 포함하는 방법에 관한 것이다. 수상세포에서 제시시키는 항원은, 벡터로부터 발현시킨 단백질(또는 그의 프로세스된 산물)이어도 되고, 바깥으로부터 수상세포에 펄스해도 된다. 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 도입한 수상세포는 T세포를 활성화시켜, CTL을 유도한다.
- [0190] 또한 본 발명은, 본 발명의 방법에 의해 제조한 수상세포를 사용하여, 면역계를 자극하는 방법에 관한 것이다. 예를 들면, 감염증 또는 암 등을 앓고 있는 환자에 있어서 면역계를 자극하는 치료를 행할 수 있다. 이 방법은, 수상세포 또는 T세포를 투여하는 공정을 포함하는 방법이다. 구체적으로는, (a) 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터가 도입된 수상세포의 치료상 유효량을 환자에게 투여하는 공정, 또는 (b) 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터가 도입된 수상세포에 의해 자극된, 치료상 유효량의 T세포를 환자에게 투여하는 공정, 을 포함하는 방법이다. 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는, 외래 유전자를 가지지 않는 것이어도 되고, 또는 환자에게 관련되는 항원 또는 사이토카인의 하나 또는 복수를 코딩하는 유전자를 가지는 것이어도 된다. 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터는, 수상세포에 감염시킴으로써 수상세포를 활성화시키기 때문에, 외래 유전자를 가지지 않는 벡터를 감염시킨 수상세포일지라도, 환자의 면역계를 활성화시킬 수 있다. 이 수상세포에 항원 펩티드를 펄스하여, 목적의 항원을 제시시킴으로써, 보다 효과가 높은 수상세포를 얻을 수 있다. 또한, 인 비트로(*in vitro*)에서 T세포와 수상세포를 접촉시키는 경우, 환자로 부터 T세포를 채취하여, 엑스 비보 투여를 행하는 것이 바람직하다.
- [0191] 벡터의 인 비보에서의 투여량은, 질환, 환자의 체중, 연령, 성별, 증상, 투여목적, 투여 조성물의 형태, 투여방법, 도입 유전자 등에 따라 다르지만, 당업자라면 적절히 결정하는 것이 가능하다. 투여경로는 적절히 선택할 수 있지만, 예를 들면, 경피적(*percutaneous*), 비강내적(*intranasal*), 경기관지적(*transbronchial*), 근육내적(*intramuscular*), 복강내(*intraperitoneal*), 정맥내(*intravenous*), 관절내(*intraarticular*), 또는 피하 등에 행하여질 수 있다. 투여는 국소 또는 전신이어도 된다. 투여되는 벡터는 바람직하게는 약 10^5 CIU/ml~약 10^{11} CIU/ml, 보다 바람직하게는 약 10^7 CIU/ml~약 10^9 CIU/ml, 가장 바람직하게는 약 1×10^8 CIU/ml~약 5×10^8 CIU/ml의 범위 내의 양을 약학상 용인 가능한 담체 중에서 투여하는 것이 바람직하다. 인간에 있어서는 1회당 투여량은 2×10^5 CIU~ 2×10^{11} CIU가 바람직하고, 투여 횟수는 1회 또는 임상상 용인 가능한 부작용의 범위에서 복수회 가능하며, 1일의 투여 횟수에 대해서도 동일하다. 인간 이외의 동물에 대해서도, 예를 들면, 목적의 동물과 인간과의 체중비 또는 투여 표적부위의 용적비(예를 들면 평균값)로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다. 또한, 전파성의 마이너스 가닥 RNA 바이러스 벡터를 개체 또는 세포에 투여 후, 치료가 완료되는 등의 바이러스 벡터의 증식을 억제할 필요가 발생했을 때에는, RNA 의존성 RNA 폴리머라아제 저해제를 투여하면, 숙주에

장해를 부여하지 않고, 바이러스 백터의 증식만을 특이적으로 억제하는 것도 가능하다.

- [0192] 엑스 비보 투여의 경우는, 체외(예를 들면 시험관 또는 살레 내)에서 수상세포에 백터를 접촉시킨다. MOI는 1~500의 사이에서 투여하는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 2~300, 더욱 바람직하게는 3~200, 더욱 바람직하게는 5~100, 더욱 바람직하게는 7~70이다. 백터의 투여대상으로는 특별히 제한은 없지만, 예를 들면, 닭, 메추라기, 마우스, 랫트, 개, 돼지, 고양이, 소, 토끼, 양, 염소, 원숭이, 및 인간 등을 포함하는 조류, 포유동물(인간 및 비인간 포유동물), 및 그 밖의 척추동물을 들 수 있다.
- [0193] 백터를 도입한 수상세포를 투여하는 경우는, 일반적으로는, 근육내, 복강내, 피하 또는 정맥내 주사, 또는, 림프절로의 직접 주입에 의해 주입할 수 있다. 바람직하게는 피하, 복강내 주사 또는 림프절로의 직접 주입에 의해 환자에게 투여한다. 형질 도입된 수상세포는, 일반적으로는 $10^5 \sim 10^9$ 세포, 바람직하게는 $10^6 \sim 10^8$ 세포, 보다 바람직하게는 약 10^7 세포를 환자에게 투여할 수 있다.
- [0194] 마이너스 가닥 RNA 바이러스 백터가 도입된 수상세포는, 항종양제로서 유용하다. 예를 들면, 백터를 도입한 수상세포를 종양부위에 투여함으로써, 종양의 증식을 억제할 수 있다. 종양부위란, 종양 또는 그의 주위(예를 들면 종양으로부터 5 mm 이내, 바람직하게는 3 mm 이내)의 영역을 말한다. 백터는 외래 유전자를 탑재하고 있지 않아도 항종양 효과를 기대할 수 있지만, IFN-beta 유전자를 백터에 탑재시킴으로서 보다 높은 효과가 얻어진다. 수상세포를 종양에 투여하기 전에, 수상세포에 종양항원을 접촉시키면 보다 높은 효과를 얻을 수 있다. 수상세포로의 종양항원의 접촉은, 수상세포와 종양세포의 세포 용해물(cell lysate)을 혼합하는 방법, 종양항원 펩티드를 수상세포에 펄스하는 방법, 또는 수상세포에 종양항원 유전자를 도입하여 발현시키는 방법 등을 사용할 수 있다. 또한, IFN-beta 또는 IFN-beta 유전자를 탑재하는 백터를 종양에 직접 주입함으로써도 항종양 효과가 얻어진다. 예를 들면, IFN-beta 유전자를 탑재하는 마이너스 가닥 RNA 바이러스 백터는, 항종양제로서 우수하다. 마이너스 가닥 RNA 바이러스 백터를 도입한 수상세포의 투여와, IFN-beta 유전자를 탑재하는 백터의 종양부위로의 주입을 조합하면, 보다 높은 항종양 효과가 발휘된다.

- [0195] 수상세포에 의해 활성화된 T세포를 투여하는 경우는, 예를 들면, T세포는 1 m²의 체표면적당 약 $10^5 \sim 10^9$ 세포, 바람직하게는 $10^6 \sim 10^9$ 세포, 보다 바람직하게는 $10^8 \sim 10^9$ 세포의 용량으로, 정맥내 주입에 의해 투여될 수 있다 (Ridell 등, 1992, Science 257: 238-241을 참조). 주입은, 목적의 간격(예를 들면, 매일)으로 반복될 수 있다. 투여 후의 레시피언트(recipient)는, 필요에 따라 임의의 부작용에 대해서, T세포 주입의 사이 또는 주입 후에 모니터링되어도 된다. 이 때, T세포는 수상세포를 얻은 환자와 동일한 환자로부터 얻는 것이 바람직하다. 또는, T세포를 환자로 부터 채취하고, T세포를 자극하기 위해 사용하는 수상세포는, HLA 적합성의 건강한 정상인 도너(donor)에 유래해도 된다. 또는 반대로, 수상세포를 환자로 부터 채취하고, T세포는 HLA 적합성의 건강한 정상인 도너에 유래해도 된다.

- [0196] 본 발명에 의해 제조되는 백신의 유효성분인 수상세포를 포함하는 세포는, 인간 체내에 치료용 백신으로서 접종하기 때문에, 세포 증식성을 없애 놓으면 보다 안전하다. 예를 들면, 제대혈 유래의 단구는 분화 유도함으로써 증식능이 극도로 저하되는 것이 알려져 있지만, 세포 백신으로서 보다 안전하게 이용하기 위해, 가열처리, 방사선처리, 또는 마이토마이신 C(mitomycin C) 처리 등으로 처리하고, 백신으로서의 기능을 남긴 채, 증식성을 없앨 수 있다. 예를 들면, X선 조사를 이용하는 경우, 총방사선량 1000~3300 Rad로 조사할 수 있다. 마이토마이신 C 처리법은, 예를 들면, 수상세포에 25~50 micro-g/ml의 마이토마이신 C를 첨가하여, 37℃, 30~60분간 보온처리할 수 있다. 열에 의한 세포처리방법은, 예를 들면, 50~65℃에서 20분간 가열처리를 행할 수 있다.

실시예

- [0197] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 더욱 상세하게 설명하겠지만, 본 발명은 이들 실시예에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 명세서 중에 인용된 문헌은, 전체 본 명세서의 일부로서 포함된다.

[0198] A. 도입 효율의 검토

[0199] (실험 1)

[0200] 건강한 정상인으로부터 단구를 네거티브 선택션으로 농축(enrichment)하였다. 단구의 농축을 위한 네거티브 선택션은, RosetteSep™-human monocyte enrichment cocktail(Stem Cell Technology Inc.)을 사용하였다. 즉, tetrameric antibody(항체 2분자가 결합되어 있는 항체로, 한쪽은 적혈구를 인식하는 항글리코포린 A 항체

(anti-glycophorin A antibody), 다른 쪽이 단핵구의 표면 항원을 인식하는 항체로 되어 있다)를 사용하여, 제거하려는 세포를 적혈구에 결합시키고, Ficoll Paque™ Plus(Pharmacia Biotech Inc.)로 제거함으로써 실시하였다. 이 네거티브 셀렉션에 의해, CD2, CD3, CD8, CD19, CD56, CD66b를 발현하고 있는 세포가 제거되고, 남은 세포를 단구 농축세포로서, 다음의 DC의 분화 유도에 사용하였다. 이 때의 CD14⁺ 세포는 65-80%였다. 단구 농축 세포에 GM-CSF(500 U/ml)와 IL-4(250 U/ml)를 첨가하여, endotoxin free RPMI+10% FCS로 배양 후, DC의 작성을 행하였다. 3-4일째에 절반의 배양상청을 동일한 조성의 새로운 배양액으로 배양액 교환을 행하였다. 보조자극분자(Costimulatory molecule), 및 CD11c, HLA-class II(DR, DP, DQ), 및 CD1a의 발현이 양성인 것을 확인하고, 그 밖의 리니지 마커(lineage marker)(CD3, CD56, CD19, CD15 및 CD14)를 표출하고 있지 않는 것도 확인하였다(도 1 및 비제시 데이터). 이 세포를 사용하여, 백터의 도입 효율을 검토하였다. 이 시점에서, 생세포의 90-98%가 DC 마커(CD11c, HLA-class II(DR, DP, DQ))를 발현하고 있었다.

[0201] 또한, 본 실시예에 있어서의 셀렉션은 상기 키트(kit)를 사용하였지만, 항체로 코트된 자기 비즈를 사용해도, 동일한 셀렉션을 실시하는 것이 가능하다. 혈구분리 등을 사용하여 단핵구를 채취하는 등, 세포를 대량으로 조제하는 경우는, 비즈를 사용하는 것이 바람직하다.

[0202] (실험 2)

[0203] 실험 1로부터 얻어진 DC(분화 유도 후 7일째)에, 녹색 형광 단백질(GFP)을 발현하는 센다이 바이러스 백터(SeV-GFP)(전과형, W000/70070)를 MOI를 다양하게 감염시켜, 경시적으로 세포수의 변화, GFP의 발현, 보조자극분자(costimulatory molecules)의 발현 정도에 대해서 검토하였다. 그 결과, MOI에 대해서는, MOI 20 이상에서 %GFP는 최대가 되었다(도 2~5). GFP의 평균 형광강도(mean fluorescence intensity; MFI)에 대해서는, MOI 100까지 높임으로써 더욱 상승시키는 것이 가능하다(비제시 데이터). 또한, 8일째까지 GFP의 MFI는 상승하였다. 보조자극분자(CD 80 및 CD 86)에 대해서는, 전체적으로 MOI 20 이상에서 최대가 되었다. 세포수의 감소에 대해서는, MOI에서 1~20의 사이는 그다지 변화가 없지만, MOI 50에서는 아주 조금 감소하는 경향이 보였지만 현격한 차는 없었다(도 6).

[0204] (실험 3)

[0205] MOI 20에서 DC에 SeV-GFP를 감염시켜, 경시적으로 FACS를 사용하여, GFP의 발현을 검토하였다. 그 결과, 2주 이후는 발현이 저하되지만(세포수도 감소), 2개월까지는 발현세포를 확인할 수 있었다(도 7). 이하의 실시예에서 나타내는 바와 같이, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 백터의 감염으로 DC는 활성화된다. 따라서, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 백터를 사용한 DC로의 유전자 도입은 임상응용으로서, 백신으로의 응용이 가능하다. 투여는 인 비보에서도 엑스 비보에서도 가능하지만, 예를 들면, 엑스 비보 투여에 의해 백터를 감염시킨 DC를 여러번 투여함으로써, 장기에 걸쳐 체내에 있어서의 유전자 발현을 지속시키는 것이 가능하다.

[0206] (실험 4)

[0207] 활성화와 감염 효율을 검토하였다. 활성화의 유무로 백터의 감염 효율이 변화하는지 여부의 검토를 행하였다. 7일간 배양 후의 DC에 2일간 LPS(1 micro-g/ml)로 자극한 후, SeV-GFP를 MOI 30에서 감염, 2일 후에 FACS로 GFP를 해석하였다. 반대로 SeV-GFP 감염 2일 후에 LPS 자극(2일간)을 동일한 조건에서 시행하였다.(도 8 및 9)

[0208] 결과; 인간에서는, LPS로 활성화시킨 후에, %GFP에 있어서 60% 가가이의 양성을 인정하였다. 이것에 대하여 마우스 DC에서는 양성률은 매우 낮았다(비제시 데이터). 그러나 인간에게 있어서도 MFI는 매우 낮고, 활성화시킨 후의 DC에는 유전자 도입 효율의 극단적인 저하를 인정하였다. 이것에 대하여, 백터를 도입 후에 LPS로 자극해도, 유전자 도입 효율은 변화하지 않았다. 이 결과는, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 백터로 DC에 유전자 도입하는 경우는, 미성숙 DC, 즉 활성화를 받고 있지 않은 DC를 사용하는 것이 바람직한 것을 나타내고 있다.

[0209] (실험 5)

[0210] 감염에 필요한 접촉시간의 검토를 행하였다(도 10). 그 결과, 약 30분 이하에서 유전자 도입이 가능한 것이 판명되었다.

[0211] (실험 6)

[0212] 다른 바이러스 백터에서의 보고에서 CD34 세포에 유전자 도입하여, DC 분화 유도로 유전자 도입 DC 제작에 성공한 보고가 있다(J. Immunol. Meth. 2002; 153-165). SeV-GFP로도 동일한 방법을 시도하였다. 인간 체대혈로부터 CD34 마이크로비즈를 사용하여, CD34 양성 줄기세포를 분리(CD34>90%)하고, MOI 0, 10, 100에서 감염시킨

후, 깨끗이 세정하였다. 그 세포를 RPMI+10% FCS에 SCF(50 ng/ml), GM-CSF(500 U/ml), TNF-alpha(50 ng/ml)를 첨가하여, 3일간 배양 후, SCF(50 ng/ml), GM-CSF(500 U/ml), IL-4(250 U/ml), TNF-alpha(50 ng/ml)를 첨가한 배지에서 계대(절반량의 배지를 3~4일에 교환)한 것을 백터의 감염으로부터 13일째에 GFP의 발현을 검토하였다. 그 결과, 유전자 도입 효율은 65~70%에 달하고, 다른 백터 이상으로 GFP의 발현 효율이 좋은 DC가 제작되었다. 감염 후의 DC는 보조자극분자의 발현의 해석으로부터, 감염시키지 않은 것과 비교하여 활성화를 받고 있는 것이 회수되었다(도 11 및 12).

[0213] 이상의 실시예로부터, 마이너스 가닥 RNA 바이러스는 렌티바이러스, 레트로바이러스에 비교하여, 도입 효율은 현격히 우수하고, 아데노바이러스에 뒤지지 않는 도입 효율을 매우 간편하고 신속하게 얻을 수 있는 것이 실증되었다. 또한, 다른 백터에서는 활성화 마커는 변동하지 않지만, 마이너스 가닥 RNA 바이러스의 감염에 의해 DC의 활성화를 유도할 수 있는 것이 판명되었다.

[0214] B. 도입 후의 DC 기능의 평가

[0215] (실험 1)

[0216] DC에 SeV-GFP를 MOI 30~50에서 감염시켜, 1일 후에 LPS로 자극(2일간)하고, 그 다음, 보조자극분자의 발현을 검토하였다. 대조로서, LPS 자극만, SeV-GFP 감염만, 및 LPS 자극도 SeV-GFP 감염도 없는 조건에 대해서 비교 검토하였다.

[0217] 결과; 얻어진 결과로부터, SeV 감염만으로도 DC의 활성화가 일어나는 것이 나타내어졌다.

[0218] LPS와 필적하는 것; CD80(+) HLA-DR(-) CD83(-)

[0219] LPS보다 강한 것; CD86(+) CCR7(-)

[0220] LPS보다 약한 것; CD40(-)

[0221] (+)는 LPS+SeV로 상승 효과가 있는 것을 나타낸다. (도 13-15)

[0222] (실험 2)

[0223] MOI 30에서 DC에 SeV-GFP를 감염(감염 후 3일째, 감염 후 1일째에, 어떤 그룹은 LPS로 자극)시켜, 실험 1과 동일한 군에 대해서, 식세포능력을 검토하였다(1 micro-m PCV-RED latex-microspheres를 사용. 막대 그래프는 4℃에서 양성이 되는 백그라운드(background)를 뺀 것).

[0224] 결과; 활성화 마커에서도 본 바와 같이, SeV로 감염시킨 것은, 활성화 때문에, 식세포능의 저하가 보였다. 특히, GFP의 발현이 높은 것일수록 식세포능이 낮았다. 따라서, 예를 들면, DC로 종양항원을 제시시키기 위해 종양의 용해물(lysate)을 사용하는 경우는, 마이너스 가닥 RNA 바이러스 백터를 DC에 도입하기 전에 용해물(lysate)과 DC를 공배양하는 것이 바람직하다(도 16-17).

[0225] (실험 3)

[0226] SeV에 의한 수상세포의 활성화에 수반되는 수상세포 사이토카인 생산능을 검토하기 위해, 7일간의 배양으로 얻어진 단구 유래 수상세포(MoDC)를 12웰의 플레이트에서 48시간($8 \times 10^5 / 2 \text{ ml/well}$: 배지는 X-vivo15TM+2% 자기혈청+GM-CSF(500 U/ml)+IL-4(250 U/ml), 이하의 군의 조건에서 배양한 상청 중의 TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, IL-8의 값을 LuminexTM system으로 측정하였다. SeV의 감염은 MOI 30에서 2일간 배양하였다.

[0227] 자극받지 않은 군(Unstimulated group): 배지만의 군

[0228] 요액군(Allantoic fluid group): SeV의 부유액인 계란 요액(SeV는 포함하지 않는다) 60 micro-L 첨가한 군

[0229] UV-SeV-GFP군: SeV-GFP 용액을 자외선 조사하여, 복제(replication) 능력을 제거한 용액 60 micro-L 첨가한 군

[0230] SeV-GFP: SeV-GFP 용액을 60 micro-L 첨가한 군(replication-competent SeV)

[0231] 결과: replication-competent SeV로 GFP를 유전자 도입한 수상세포만 TNF-alpha, IL-1beta, IL-6을 생산, IL-8의 생산을 증대하였다(도 18). 이 때의 수상세포상의 CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR의 발현 상승은 replication-competent SeV만으로 유도되었다(도 19 및 20). 이것은, SeV를 수상세포에 유전자 도입하는 것 만으로, 면역 응답시에 중요한 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 수상세포에 의한 생산을 야기할 수 있는 것을 의미하고 있다. 또한, 수상세포 유전자 도입시에 있어서의 수상세포의 막상의 리셉터와 SeV의 접

축에 의한 수상세포의 활성화라기보다도, SeV의 감염 후에 발생하는 SeV의 RNA의 증폭 과정이 수상세포의 활성화에 중요하다는 것도 시사하고 있다.

[0232] (실험 4)

[0233] 동일한 실험군에 대해서, 그들의 DC를 3000 rad의 방사선을 조사한 후, T세포의 활성화능력에 대해서 검토하였다. (dose를 다양한 DC와 순화(CD3⁺ >95%)의 알로 또는 신제닉 T세포(syngenic T cell)와 3일간 공배양하였다). SeV-GFP에 대한 반응의 지표로서, 신제닉 T세포를 사용하였다.

[0234] 결과; DC비와 T세포의 양이 적어 차가 비교적 현저하지 않지만, SeV 감염 단독으로 LPS에 필적하는 알로 T세포 자극성을 가지고 있는 것이 나타내어졌다(도 21). 또한, DC는 방사선 조사를 하지 않고 사용하는 것도 가능하다.

[0235] C. 암 항원 특이적 CTL의 유도

[0236] A에 기재된 방법으로 인간 말초혈(HLA-A 0201의 건강한 정상인 도너)로부터, CD14⁺ 세포를 농축하여, x-vivo 15TM(Cambrex사제)+2% 자가혈청(autologous serum)을 배지로서, GM-CSF(500 U/ml), IL-4(250 U/ml)를 첨가(3~4일에 한번, 반량의 배지를 교환), 미숙 수상세포를 제작하였다. 제작한 미숙 수상세포를 다음의 3군으로 나누고, 추가로 48시간 GM-CSF(500 U/ml), IL-4(250 U/ml)의 존재하에 배양하였다.

[0237] 1군 아무것도 첨가하지 않는다

[0238] 2군 SeV-GFP의 감염(MOI 30)

[0239] 3군 사이토카인의 콕테일(IL-1 β 50 ng/ml, IL-6 500 ng/ml, IFN- α 2500 U/ml, TNF- α 100 ng/ml, PGE2 20 micro-M)에 의한 자극

[0240] 그 다음, 수상세포를 회수하여, MART-1 펩티드(EAAGIGILTV(서열번호: 9))를 펄스(50 micro-g/ml; 3시간)하고, 수상세포를 채취한 것과 동일한 건강한 정상인 말초혈의 T세포를 네거티브 셀렉션으로 농축(CD3⁺ >97%)하여, 펩티드 펄스한 상기 3군의 수상세포와 7일간 배양하였다(X-vivo 15TM+2% 자가혈청)(3~4일마다, 또는 배지의 황변시에 절반량의 배지를 교환하였다. 최초의 자극시는 IL-2 없이 T세포와 수상세포를 혼합 배양하고, 3일째부터 IL-2를 100 U/ml 첨가 개시하였다.). 이것을 2회 반복하여, 각각의 혼합 배양으로부터 세포를 회수하고, CTL 어셈블리의 이펙터 세포로서 사용하였다.

[0241] 타겟 세포(target cell)는, T2세포(HLA-A2⁺의 인간으로부터 얻어진 T세포-B세포 하이브리도마로 TAP 결손 세포주)를 사용하였다. 이 세포는, TAP(class I로의 트랜스포터(transporter)가 없기 때문에, 세포질 내의 단백질 분해에 의해 생산된 펩티드를 Class I에 유도할 수 없는 것으로부터, 펩티드를 외래로부터 첨가하면 그 펩티드가 Class I에 로드(load)되어, Class I의 발현이 일어난다. 이 타겟을 변이 MART-1 펩티드(ELAGIGILTV(서열번호: 10))(상기의 자극에서 사용한 펩티드에 대하여 T세포 리셉터 인식부는 변화없이, HLA-A2의 결합을 강하게 한 것)를 펄스한 것, 인플루엔자의 펩티드(Flu; third party로서의 펩티드; GILGFVFTL(서열번호: 11))를 펄스한 것을 제작하여, Cr로 세포를 라벨하고, 상기 3군의 이펙터 T세포와 이 2종류의 타겟을 20:1, 10:1, 5:1, 2.5:1로 4시간 혼합 배양하여 CTL 활성을 조사하였다.

[0242] 이하에 실험의 조합을 정리하였다.

이펙터 세포	타겟 세포	도면의 기호
1군의 이펙터 T세포	변이 MART1 펩티드 + T2세포	실선의 검정 사각
2군의 이펙터 T세포	변이 MART1 펩티드 + T2세포	실선의 검정 삼각
3군의 이펙터 T세포	변이 MART1 펩티드 + T2세포	실선의 검정 역삼각
1군의 이펙터 T세포	Flu 펩티드 + T2세포	점선의 검정 마름모
2군의 이펙터 T세포	Flu 펩티드 + T2세포	점선의 검정 동그라미
3군의 이펙터 T세포	Flu 펩티드 + T2세포	점선의 흰 사각

[0243]

[0244] 결과; 상기 3군의 DC로 활성화를 시키지 않은 DC(MART1 펩티드+)로 T세포를 자극하여도, MART-1 특이적 CTL은 유도할 수 없지만, 양성 대조(positive control)로서 사이토카인으로 활성화(현재 종양 면역의 수상세포 요법에서 가장 강하게 활성화할 수 있는 방법)시킨 수상세포로, T세포를 자극하면 MART-1 특이적 CTL을 유도할 수 있었다(타겟에 펄스하는 변이 MART-1 펩티드로 바꿔, 자극에 사용한 MART-1 펩티드를 사용해도 동일한 결과가 얻어졌다). SeV로 유전자 도입한 수상세포를 사용한 경우, 양성 대조와 동일한 정도의 CTL 활성이 얻어졌다(도 22). 즉, CTL 어세이로 판정한 경우, SeV를 감염시키는 것만으로 수상세포는 활성화되어, 사이토카인으로 활성화시킨 수상세포와 동일한 레벨로 in vitro에서 CTL을 유도할 수 있는 것이 나타내어졌다. T세포 부활화로서 SeV를 사용하면, 표적 유전자의 도입과 함께 활성화가 일어날 수 있기 때문에, 사이토카인 등의 활성화 인자를 첨가할 필요가 없어져, 비용 절감, 시간 절감, 세포의 생존성의 유지에 기여한다.

[0245] D. 면역자극성 사이토카인 유전자의 도입 효과

[0246] SeV에 의해 활성화시킨 수상세포가 항종양 면역을 발휘할 수 있는지를 인 비보에서 검토하였다. 종양 모델로서, MHC Class I를 매우 낮은 레벨로 밖에 발현하지 못하고 면역원성이 부족한 B16 흑색종의 이식 모델을 채용하였다. 종양 모델 마우스에는, C57BL/6 마우스(6~8주령, 암컷)(일본 찰스 리버)를 사용하고, 수상세포는 C57BL/6 마우스(8주령, 암컷)(일본 찰스 리버)로부터 채취하였다. 수상세포는, C57BL/6 마우스의 대퇴골로부터 골수를 채취하여, SpinSep™, murine hematopoietic progenitor enrichment cocktail(항CD5 항체, 항CD45R 항체, 항CD11b 항체, 항Gr-1 항체, 항TER119 항체, 항7/4 항체, StemCell technology)을 사용하여, T세포를 제거한 후, IL-4 및 GM-CSF를 첨가하여 1주간 배양하여 얻었다. $1 \times 10^5 / 100$ micro-L의 B16 흑색종 세포를 day 0에 마우스의 복부 피하(s. c.) 접종하였다. Day 10, 17, 및 24에 활성화 자극을 첨가하지 않은 수상세포, LPS로 활성화시킨 수상세포(LPS DC), 또는 SeV-GFP 또는 마우스 인터페론(mouse interferon) β 를 발현하는 SeV-IFN β 를 도입하여 활성화시킨 수상세포(각각 SeV GFP DC 또는 SeV IFN β DC)를 종양 주위에 투여하였다. 이 때, 수상세포에 종양항원(B16의 냉동과 해동(freeze and thaw)에 의한 종양 용해물)을 펄스한 후 투여하는 실험도 행하였다. 이들과는 별도로, 종양 접종 후 10일째(day 10)에 SeV-IFN β 를 직접, 종양내 주입(intratumoral injection)하여 항종양 효과를 조사하는 실험도 행하였다.

[0247] 수상세포로의 SeV의 도입에서는, 상기와 같이 1주간 배양한 수상세포에 SeV-IFN β 를 MOI 40에서 감염시켜 8시간 배양하였다. 종양항원을 펄스하는 경우는, 상기와 같이 1주간 배양한 수상세포를 회수하여, 종양항원이 되는 종양 용해물(tumor lysate)을 펄스(DC: tumor lysate=1:3)하고, 18시간 배양한 후, SeV-IFN β 를 MOI 40에서 감염시켜 8시간 배양하였다. 그 다음, 이들의 수상세포를 회수하여, $5 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 세포수를 마우스의 종양 주위에 투여하였다.

[0248] 도 23에 나타내는 바와 같이, SeV-IFN β 의 직접 종양내 주입에서는, 주입 후 2주간은 종양 증식을 억제하였지만, 그 후의 재증식이 명확하였다. DC/SeV-GFP를 사용한 경우, 현저한 항종양 효과가 인정되고, DC/LPS로 처리한 마우스, 및 DC/SeV-IFN β 로 처리한 마우스에 있어서, 가장 강한 종양 억제가 관찰되었다.

[0249] 상기의 각 치료군에 있어서의 항종양 효과를 보다 상세하게 검토하였다. 내츄럴 킬러(natural killer)(NK) 세포 활성을 어세이하기 위해, 상기의 각 치료군에 대해서, 3회의 DC 요법 종료 7일 후의 마우스로부터 비장을 적출하여 이펙터 세포를 작성하였다. 타겟으로서 Yac-1을 사용하여, ^{51}Cr 방출 어세이를 행하였다. 또한, T 림프구의

세포상해성을 어세이하기 위해, 상기의 NK세포 활성화 어세이에 사용한 비장세포의 나머지를 사용하고, B16의 종양항원인 TRP-2 펩티드와 함께, 5일간 배양한 세포를 이펙터 세포로서 사용하며, mTRP-2 펩티드를 펄스한 EL-4 타겟 세포와 공배양하여, ⁵¹Cr 방출 어세이를 행하였다. 특이적 ⁵¹Cr 방출의 비율은 이하와 같이 계산하였다.

[0250] [(시료의 cpm-자발 방출의 cpm)/(최대 방출의 cpm-자발 방출의 cpm)]×100

[0251] 여기에서, 최대 방출은 1% triton X와 함께 인큐베이트한 타겟 세포, 자발 방출은 배양액만으로 인큐베이트한 타겟 세포를 사용하였다.

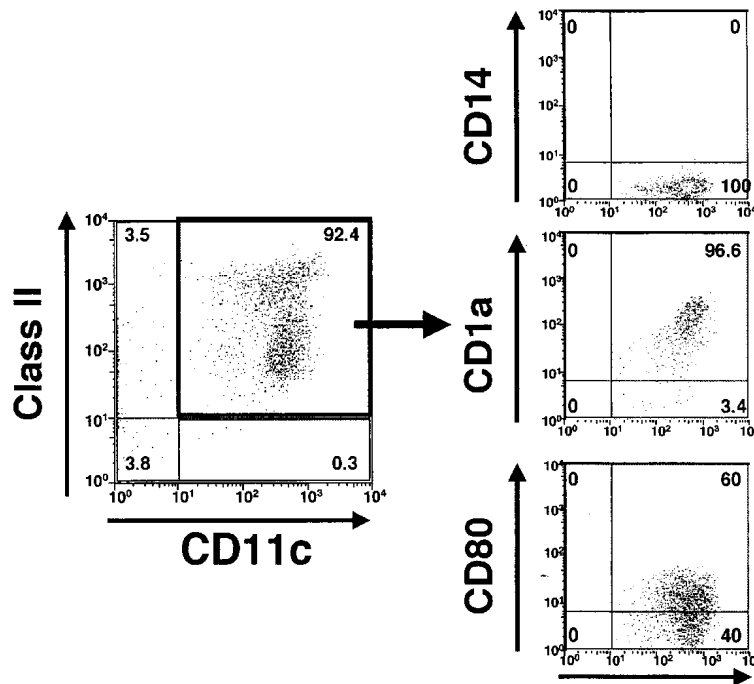
[0252] 내츄럴 킬러(NK) 세포의 활성화는, 직접 백터를 주입한 마우스에만 보이고, 수상세포 투여군에서는 검출되지 않았다(도 24). 이것에 대하여, 세포상해성 T 림프구(cytotoxic T-lymphocytes, CTL)의 활성화는, DC/LPS 처리군 및 DC/SeV-IFN β 로 처리한 마우스에서 가장 강하고, DC/SeV-GFP 처리군에서는 그것보다도 약간 약하며, SeV-IFN β 의 직접 주입군에서는 검출되지 않았다(도 25). 종양 용해물의 펄스는, 종양 증식에도 CTL 응답에도 두드러지게 영향을 끼치지 않았다. 이와 같이, SeV에 의해 면역자극성 사이토카인 유전자를 도입한 수상세포를 사용한 종양 면역치료는, 항종양치료 효과를 발휘하는 것이 나타내어졌다. DC/LPS 처리군과 DC/SeV-IFN β 처리군의 사이에서 CTL 활성화에 약간의 상이함이 있음에도 불구하고, 동일한 정도의 항종양 효과가 보였다. IFN β 발현 백터의 직접 주입과, 수상세포를 매개로 한 IFN β 의 발현에 의해 유도되는 항종양 기구에는 상이함이 있는 것으로부터, 이들을 조합시킨 치료는 보다 효과를 발휘하는 것이 기대된다.

산업상 이용 가능성

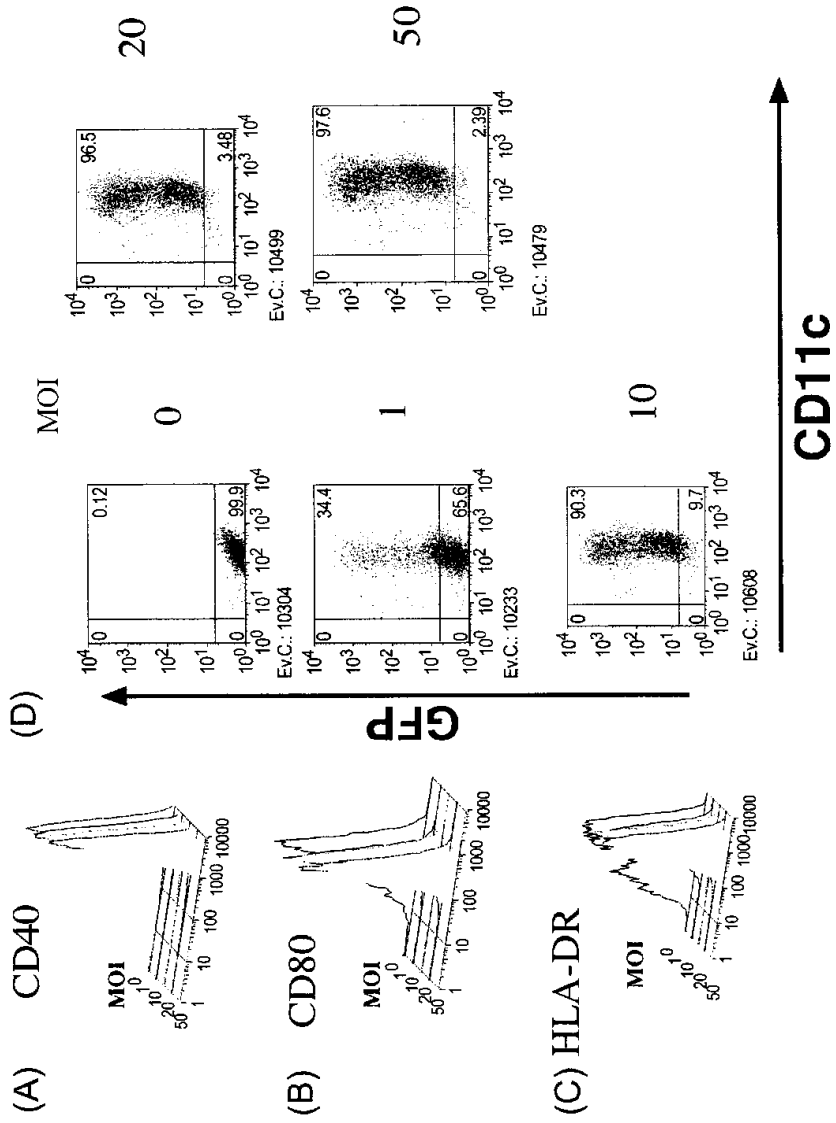
[0253] 본 발명에 의해, 수상세포에 효율적으로 유전자를 도입하는 것이 가능해졌다. 본 발명의 백터는, 바이러스나 박테리아 등의 감염증에 대한 방어 면역의 유도, 및 암에 대한 면역요법 등에 적합하게 사용된다. 수상세포는 높은 면역 유도작용을 가지기 때문에, 본 발명의 방법에 의해 목적의 항원 유전자 또는 면역활성화 유전자를 수상세포에 도입함으로써, 항원 특이적 세포성 면역을 유도하는 DC 백신을 제조하는 것이 가능해진다.

도면

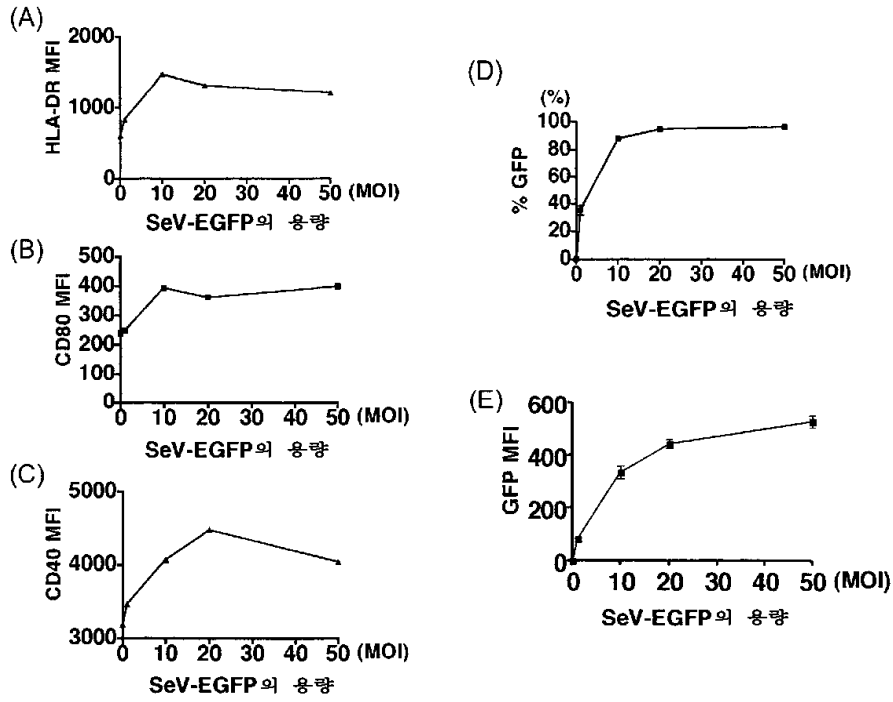
도면1



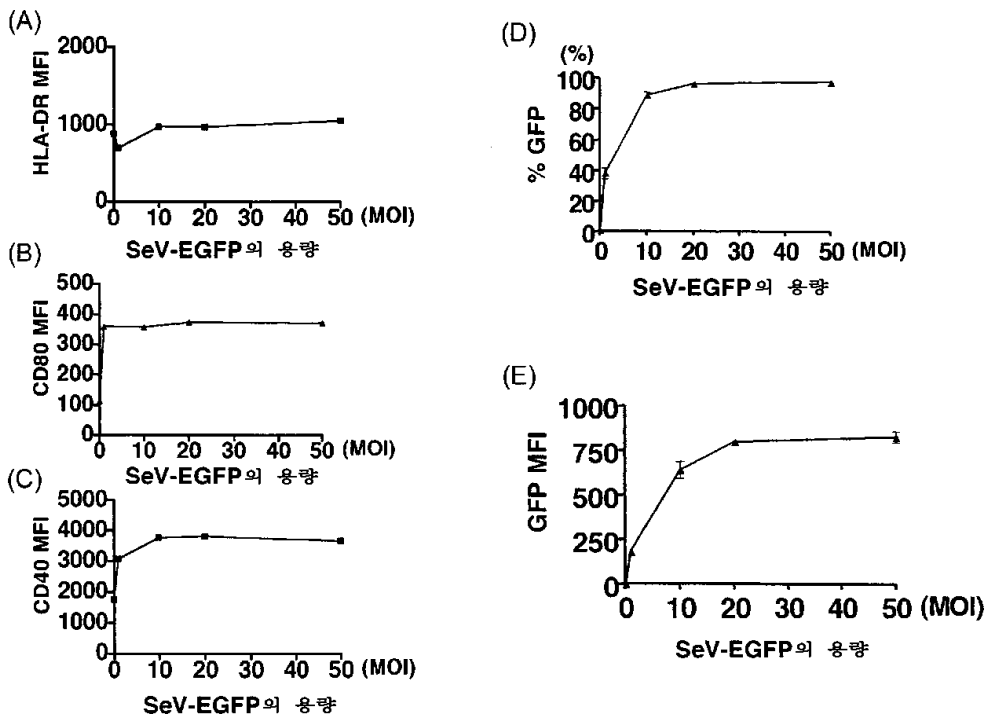
도면2



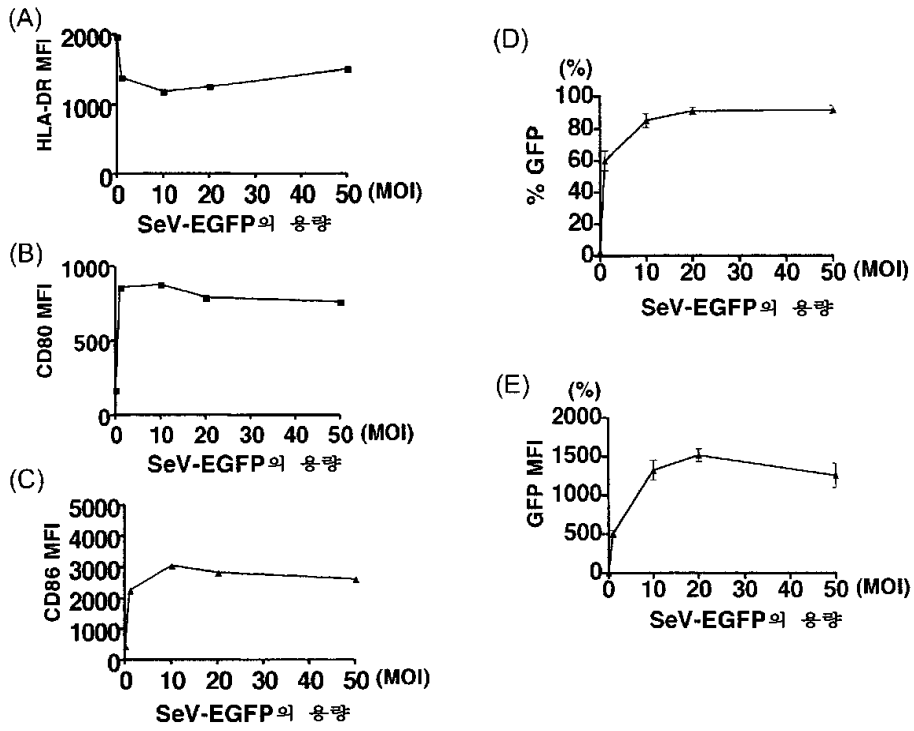
도면3



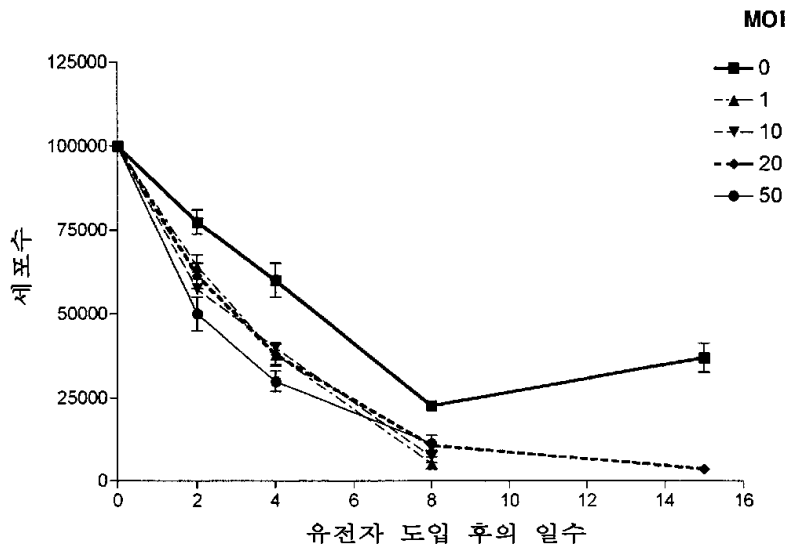
도면4



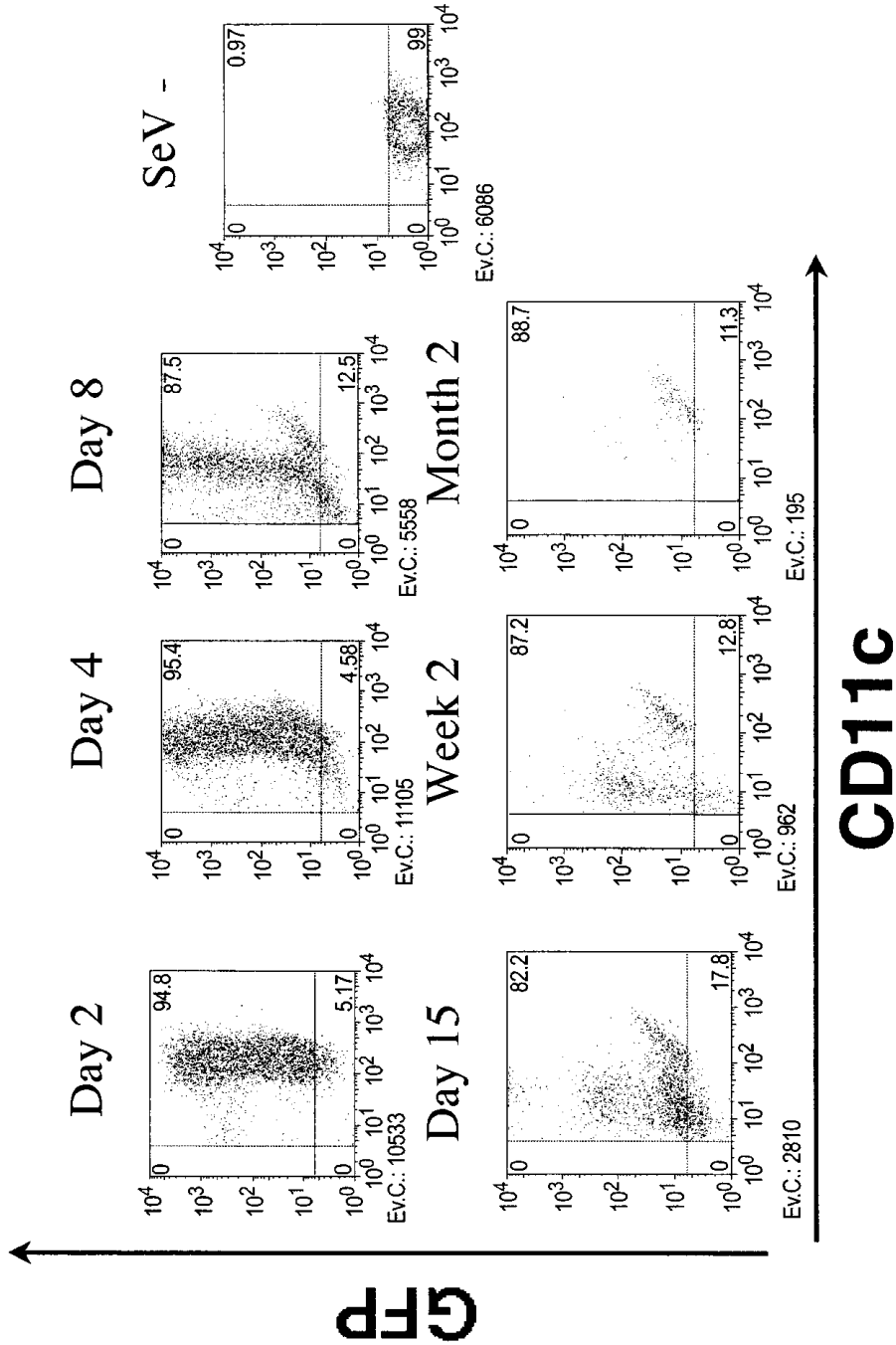
도면5



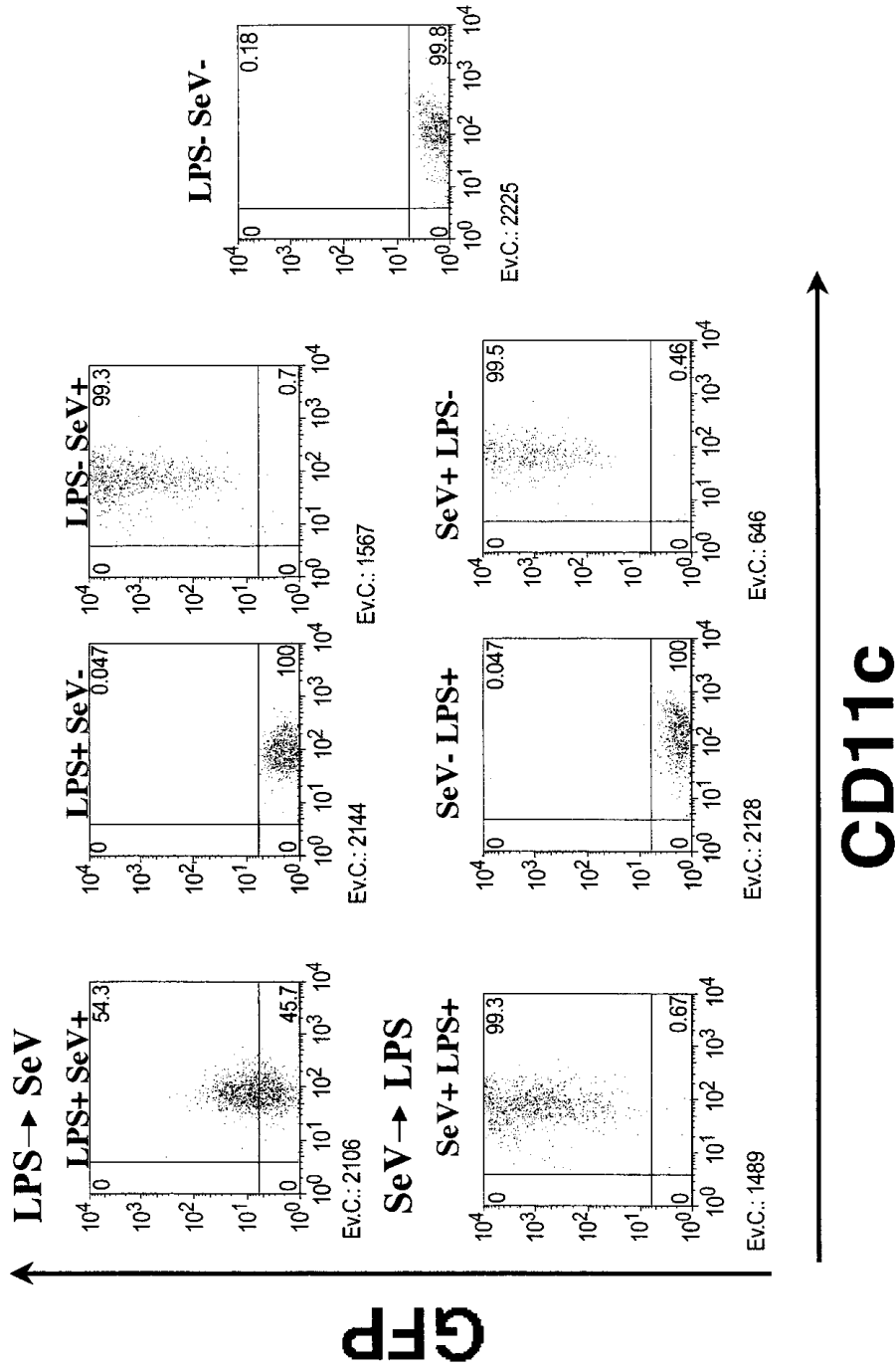
도면6



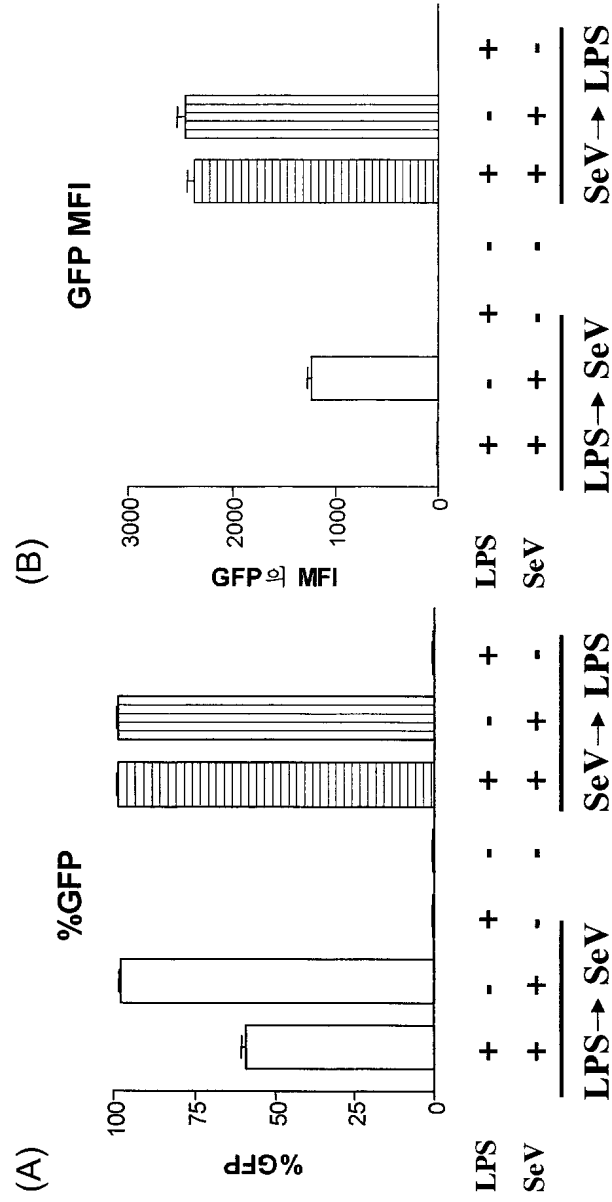
도면7



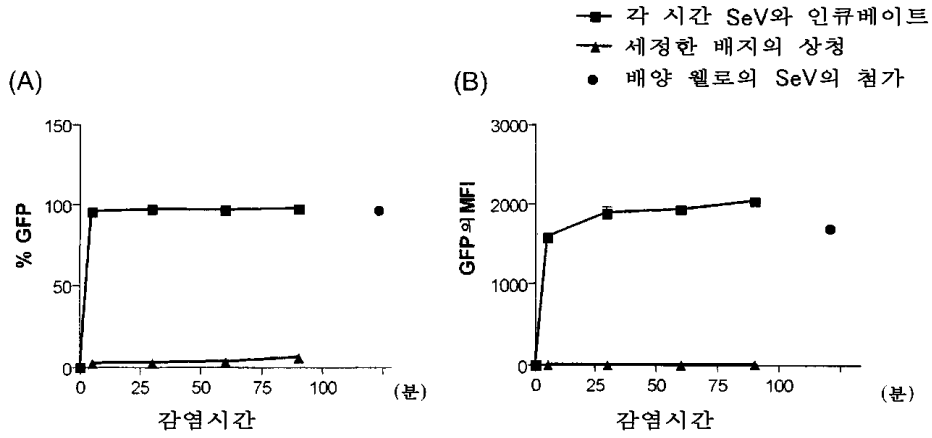
도면8



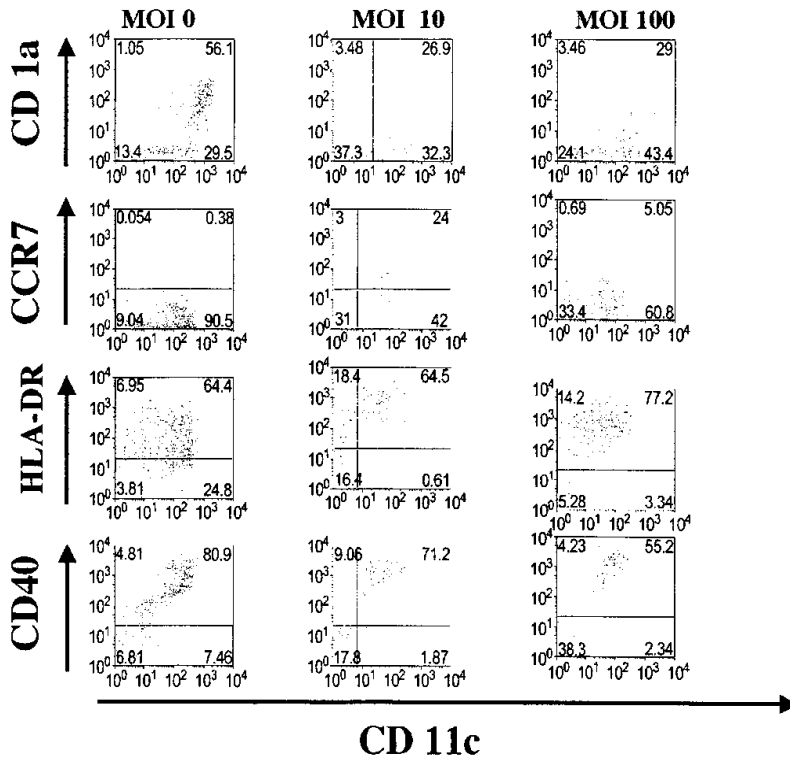
도면9



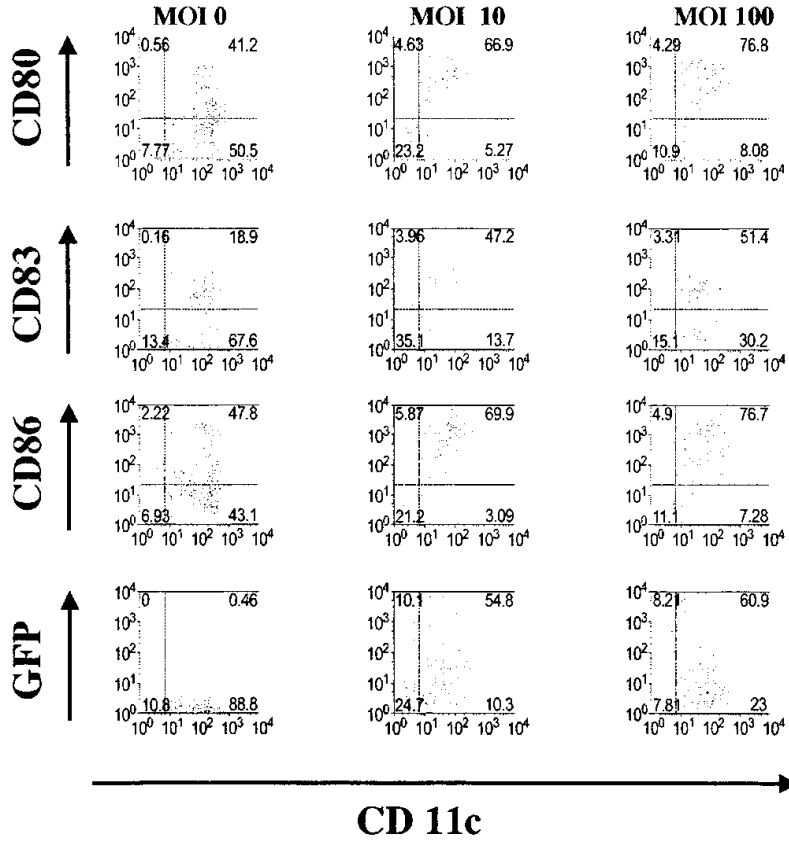
도면10



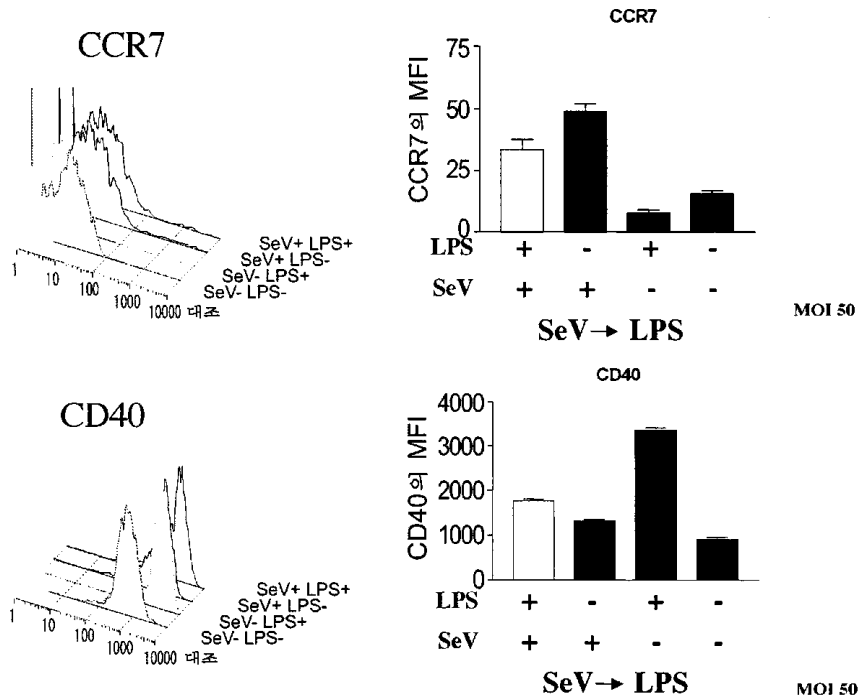
도면11



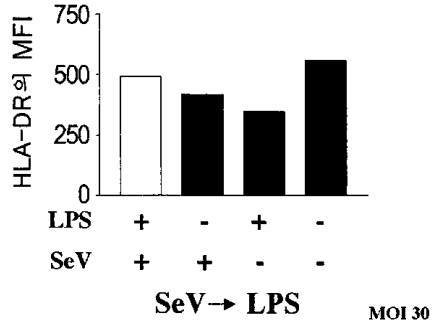
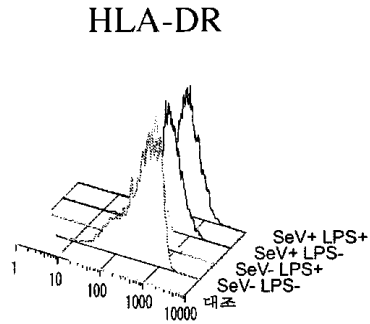
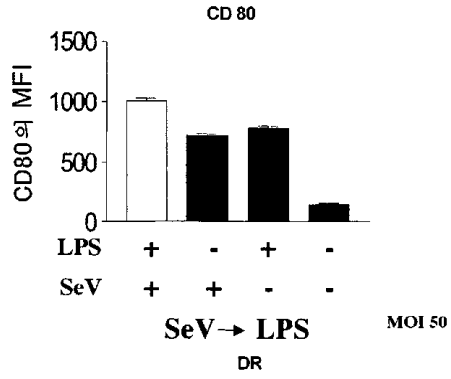
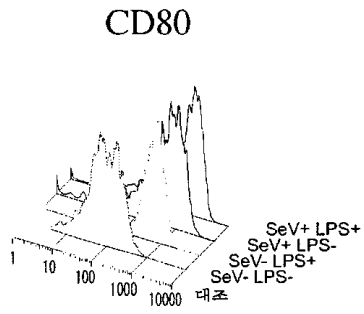
도면12



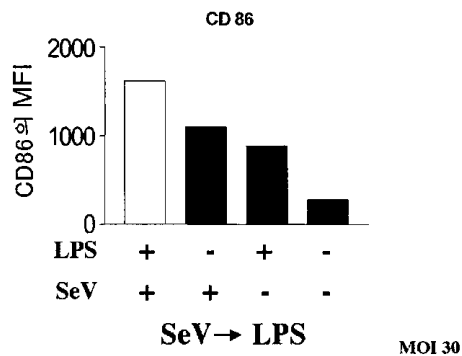
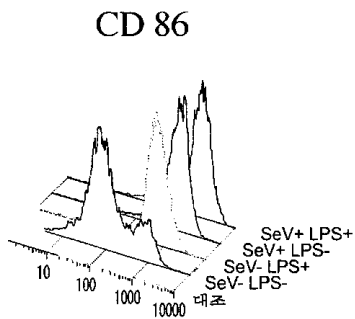
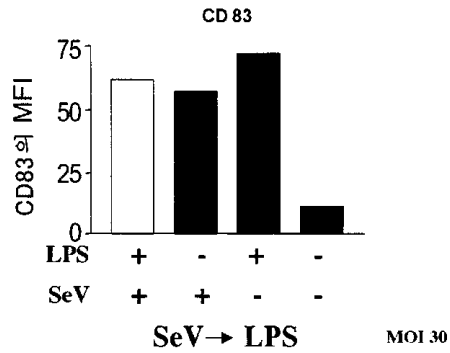
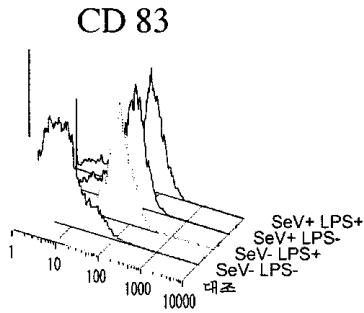
도면13



도면14

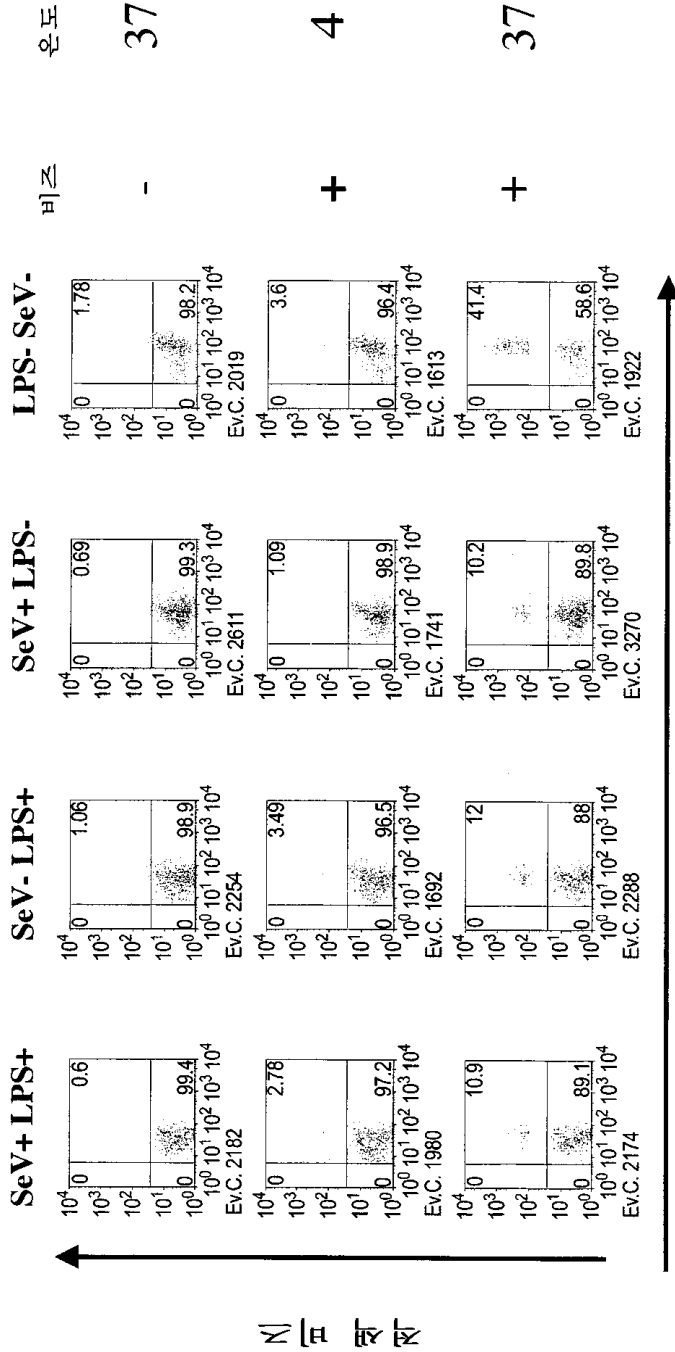


도면15



도면16

SeV → LPS



비즈

온도

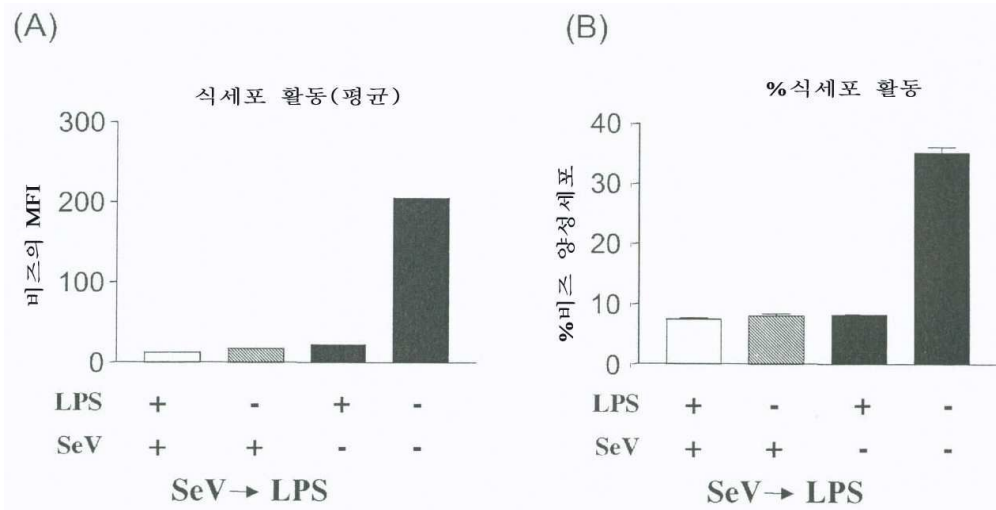
37

4

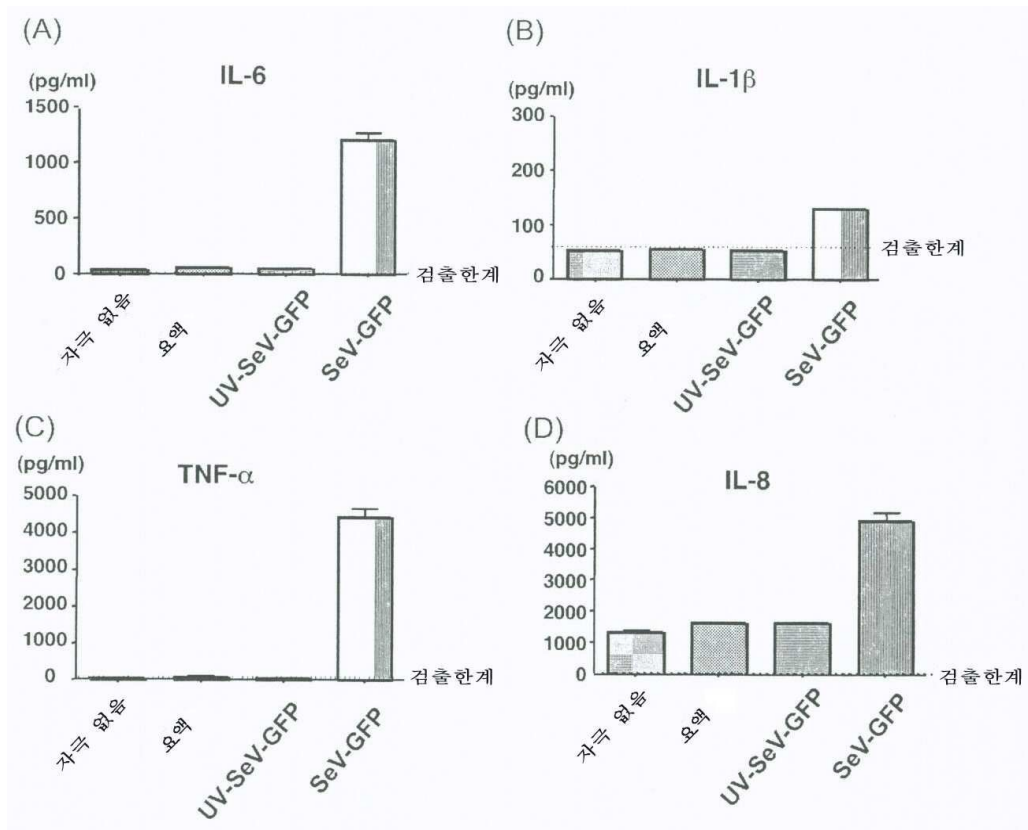
37

CD 11c

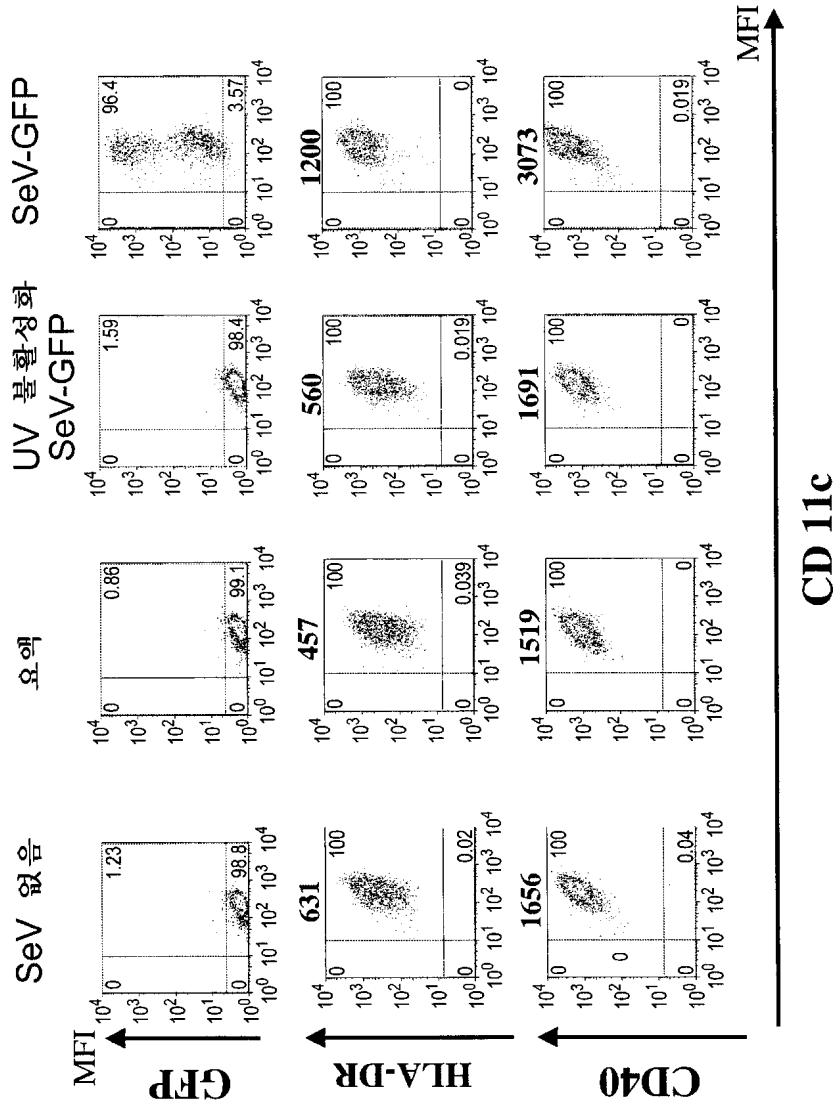
도면17

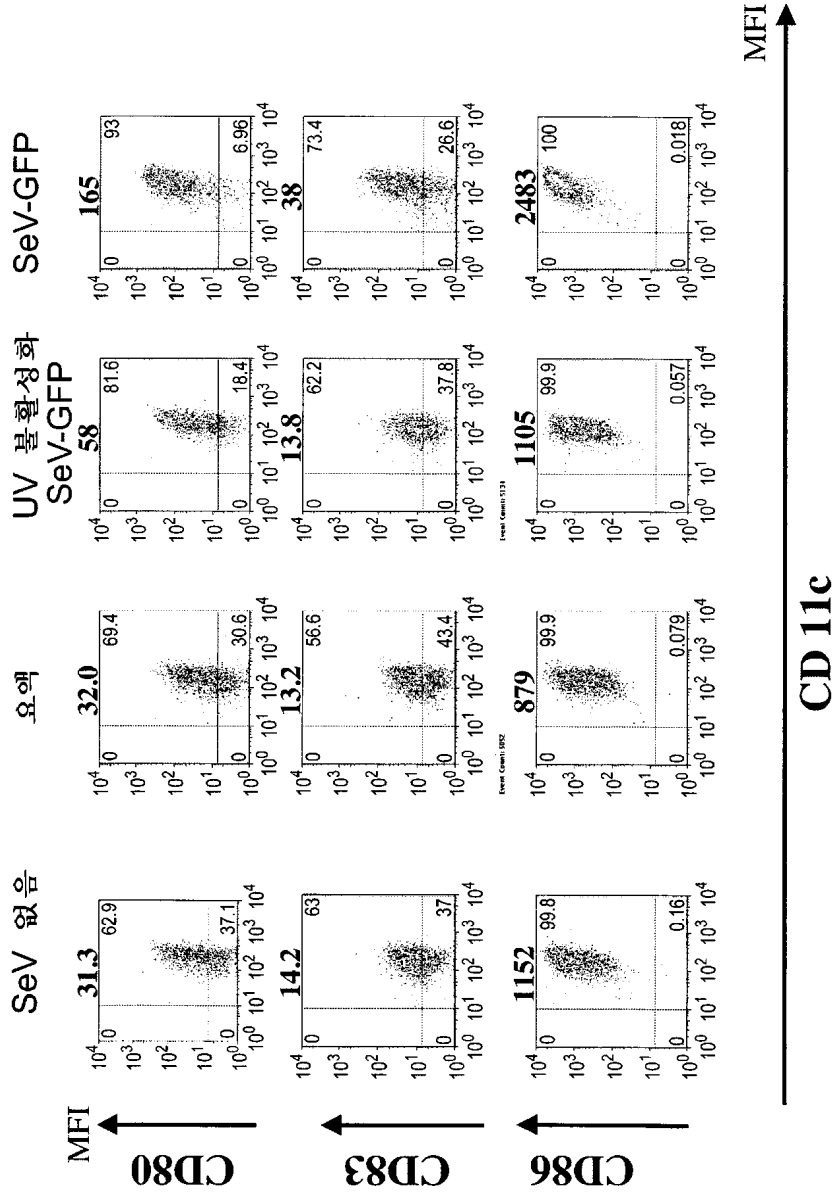


도면18



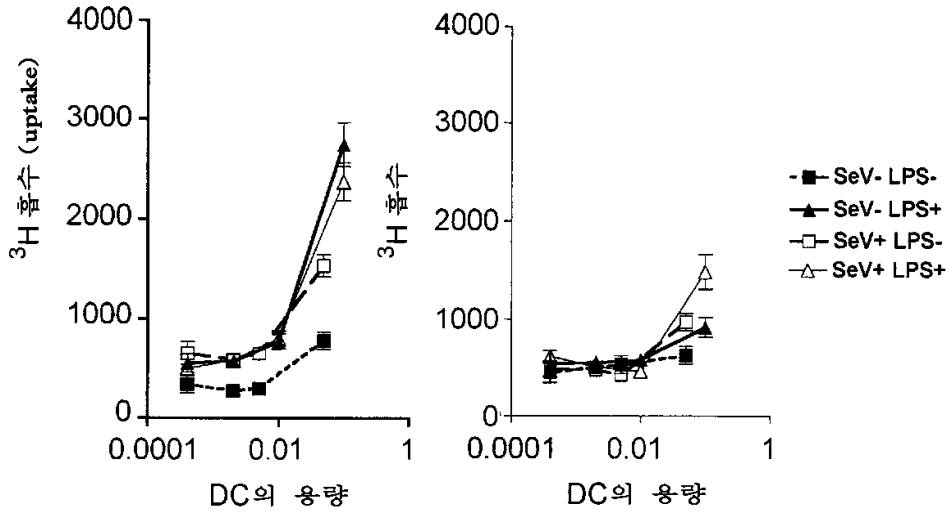
도면19



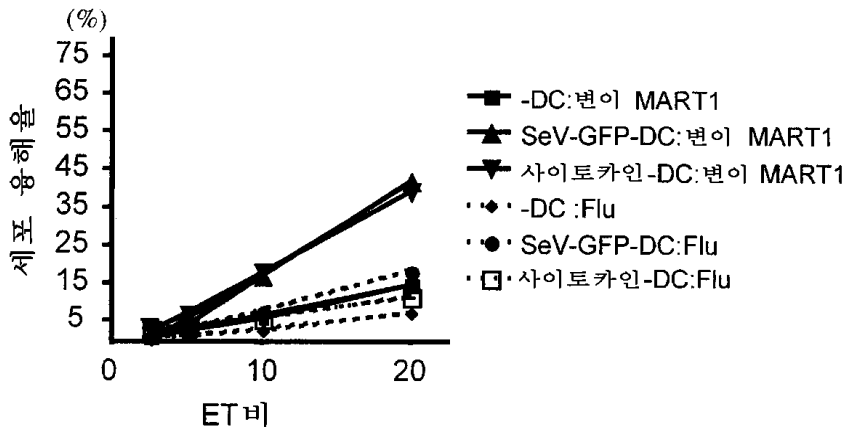


도면21

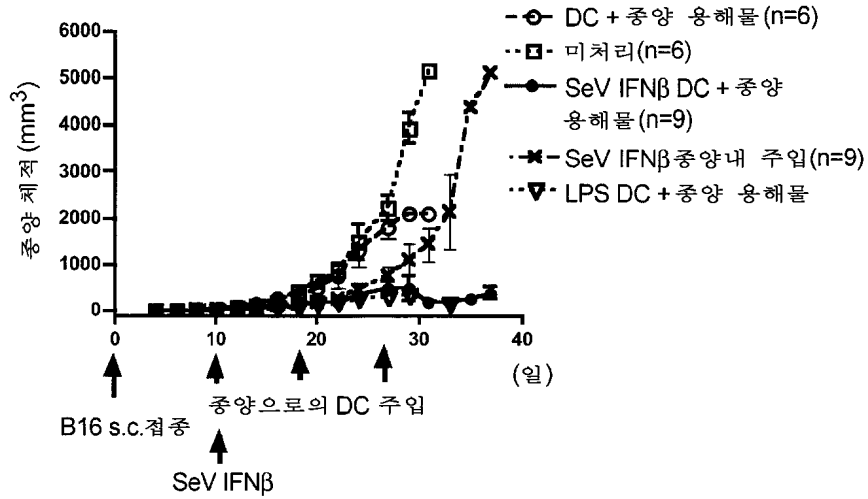
(A) 알로제닉 T세포 응답 (B) 3일 신제닉 응답



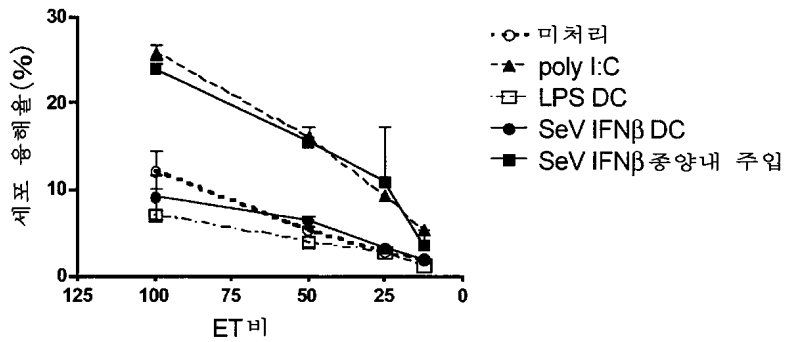
도면22



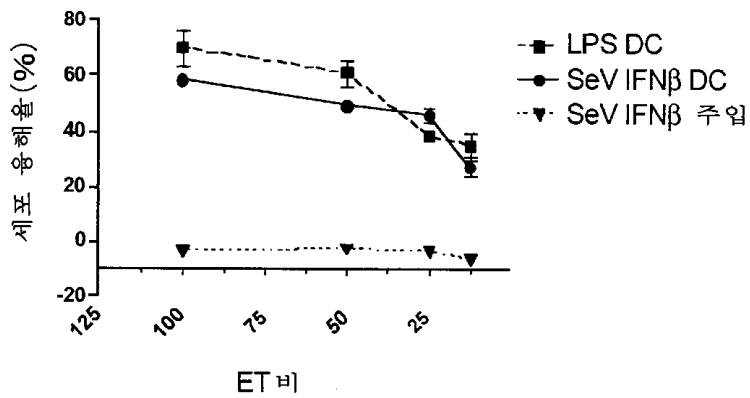
도면23



도면24



도면25



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC RESEARCH INC.

<120> Method for producing transgenic dendritic-cells

<130> D3-A0307Y1P

<140>

<141>

<150> JP 2003-374808

<151> 2003-11-04

<160> 15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence

<400> 1

ctttcaccct

10

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence

<400> 2

tttttcttac tacgg

15

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence

<400> 3

cggccgcaga tcttcacg

18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence

<400> 4

atgcatgccg gcagatga

18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence

<400> 5

gttgagtact gcaagagc

18

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence

<400> 6

tttgccggca tgcattttc ccaaggggag agttttgcaa cc

42

<210> 7

<211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> artificially synthesized sequence

<400> 7
 atgcatgccg gcagatga 18

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> artificially synthesized sequence

<400> 8
 tgggtgaatg agagaatcag c 21

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> an artificially synthesized peptide

<400> 9

Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5 10

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> an artificially synthesized peptide

<400> 10

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5 10

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> an artificially synthesized peptide

<400> 11

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
 1 5

<210> 12
 <211> 561
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(561)
 <223>

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(21)
 <223>

<400> 12
 atg acc aac aag tgt ctc ctc caa att gct ctc ctg ttg tgc ttc tcc 48
 Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
 1 5 10 15

act aca gct ctt tcc atg agc tac aac ttg ctt gga ttc cta caa aga 96
 Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 20 25 30

agc agc aat ttt cag tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg aat ggg agg 144
 Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg

35

40

45

ctt gaa tat tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac atc cct gag gag 192
 Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
 50 55 60

att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca ttg acc atc 240
 Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
 65 70 75 80

tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga caa gat tca tct 288
 Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
 85 90 95

agc act ggc tgg aat gag act att gtt gag aac ctc ctg gct aat gtc 336
 Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
 100 105 110

tat cat cag ata aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa aaa ctg gag 384
 Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
 115 120 125

aaa gaa gat ttt acc agg gga aaa ctc atg agc agt ctg cac ctg aaa 432
 Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
 130 135 140

aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag gag tac agt 480
 Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
 145 150 155 160

cac tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agg aac ttt tac 528
 His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
 165 170 175

ttc att aac aga ctt aca ggt tac ctc cga aac 561
 Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 180 185

<210> 13
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
 1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 20 25 30

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
 35 40 45

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
 50 55 60

Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
 85 90 95

Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
 100 105 110

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
 115 120 125

Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
 130 135 140

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
 145 150 155 160

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
 165 170 175

Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 180 185

<210> 14
 <211> 546
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(546)

<223>

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(21)

<223>

<400> 14

atg aac aac agg tgg atc ctc cac gct gcg ttc ctg ctg tgc ttc tcc 48
Met Asn Asn Arg Trp Ile Leu His Ala Ala Phe Leu Leu Cys Phe Ser
1 5 10 15

acc aca gcc ctc tcc atc aac tat aag cag ctc cag ctc caa gaa agg 96
Thr Thr Ala Leu Ser Ile Asn Tyr Lys Gln Leu Gln Leu Gln Glu Arg
20 25 30

acg aac att cgg aaa tgt cag gag ctc ctg gag cag ctg aat gga aag 144
Thr Asn Ile Arg Lys Cys Gln Glu Leu Leu Glu Gln Leu Asn Gly Lys
35 40 45

atc aac ctc acc tac agg gcg gac ttc aag atc cct atg gag atg acg 192
Ile Asn Leu Thr Tyr Arg Ala Asp Phe Lys Ile Pro Met Glu Met Thr
50 55 60

gag aag atg cag aag agt tac act gcc ttt gcc atc caa gag atg ctc 240
Glu Lys Met Gln Lys Ser Tyr Thr Ala Phe Ala Ile Gln Glu Met Leu
65 70 75 80

cag aat gtc ttt ctt gtc ttc aga aac aat ttc tcc agc act ggg tgg 288
Gln Asn Val Phe Leu Val Phe Arg Asn Asn Phe Ser Ser Thr Gly Trp
85 90 95

aat gag act att gtt gta cgt ctc ctg gat gaa ctc cac cag cag aca 336
Asn Glu Thr Ile Val Val Arg Leu Leu Asp Glu Leu His Gln Gln Thr
100 105 110

gtg ttt ctg aag aca gta cta gag gaa aag caa gag gaa aga ttg acg 384
Val Phe Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Gln Glu Glu Arg Leu Thr
115 120 125

tgg gag atg tcc tca act gct ctc cac ttg aag agc tat tac tgg agg 432
Trp Glu Met Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Lys Ser Tyr Tyr Trp Arg
130 135 140

gtg caa agg tac ctt aaa ctc atg aag tac aac agc tac gcc tgg atg 480

Val Gln Arg Tyr Leu Lys Leu Met Lys Tyr Asn Ser Tyr Ala Trp Met
 145 150 155 160

gtg gtc cga gca gag atc ttc agg aac ttt ctc atc att cga aga ctt 528
 Val Val Arg Ala Glu Ile Phe Arg Asn Phe Leu Ile Ile Arg Arg Leu
 165 170 175

acc aga aac ttc caa aac 546
 Thr Arg Asn Phe Gln Asn
 180

<210> 15
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 15
 Met Asn Asn Arg Trp Ile Leu His Ala Ala Phe Leu Leu Cys Phe Ser
 1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Ile Asn Tyr Lys Gln Leu Gln Leu Gln Glu Arg
 20 25 30

Thr Asn Ile Arg Lys Cys Gln Glu Leu Leu Glu Gln Leu Asn Gly Lys
 35 40 45

Ile Asn Leu Thr Tyr Arg Ala Asp Phe Lys Ile Pro Met Glu Met Thr
 50 55 60

Glu Lys Met Gln Lys Ser Tyr Thr Ala Phe Ala Ile Gln Glu Met Leu
 65 70 75 80

Gln Asn Val Phe Leu Val Phe Arg Asn Asn Phe Ser Ser Thr Gly Trp
 85 90 95

Asn Glu Thr Ile Val Val Arg Leu Leu Asp Glu Leu His Gln Gln Thr
 100 105 110

Val Phe Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Gln Glu Glu Arg Leu Thr
 115 120 125

Trp Glu Met Ser Ser Thr Ala Leu His Leu Lys Ser Tyr Tyr Trp Arg
 130 135 140

Val Gln Arg Tyr Leu Lys Leu Met Lys Tyr Asn Ser Tyr Ala Trp Met
145 150 155 160

Val Val Arg Ala Glu Ile Phe Arg Asn Phe Leu Ile Ile Arg Arg Leu
 165 170 175

Thr Arg Asn Phe Gln Asn
 180