(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[7]
C12Q 1/68

(45) 공고일자 2004년07월19일
(11) 등록번호 10-0440852
(24) 등록일자 2004년07월08일

(21) 출원번호 10-2001-0025476
(22) 출원일자 2001년05월10일

(65) 공개번호 10-2002-0085940
(43) 공개일자 2002년11월18일

(73) 특허권자 주식회사 바이로메드
서울특별시 관악구 봉천동 1510-8

(72) 발명자 김종묵
서울특별시관악구봉천7동296현대아파트202-1603

조홍찬
서울특별시관악구봉천4동915-10

심수민
서울특별시관악구봉천6동23-52

김선영
서울특별시용산구이촌동300-127한강맨션아파트18-302

(74) 대리인 이현실
장성구

심사관 : 한형미

(54) 레트로바이러스에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프라이머및 이를 이용한 레트로바이러스 농도 측정 방법

요약

본 발명은 레트로바이러스에 특이적인 올리고뉴클레오티드 및 상기 올리고뉴클레오티드를 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)의 프라이머로 이용하여 레트로바이러스 농도 (titer)를 측정하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 레트로바이러스의 LTR (long terminal repeat) 일부 영역에 특이적인 서열번호 6 및 서열번호 11의 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드와 패키징 시그널 (packaging signal)에 특이적인 서열번호 16 및 서열번호 17의 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드, 그리고 상기 올리고뉴클레오티드 쌍을 정량적 PCR 반응의 프라이머로 사용하여 레트로바이러스의 게놈 DNA 혹은 RNA를 정량함으로써 바이러스 농도를 측정하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 레트로바이러스 게놈에만 특이성적으로 혼성화되고 인간 세포의 게놈에 대해서는 비특이적인 반응을 거의 나타내지 않으므로 레트로바이러스 농도의 정확하고 신속한 측정을 위한 실시간 정량 PCR 등의 프라이머로서 효과적으로 이용될 수 있다.

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 레트로바이러스 3' LTR 부근의 염기서열 (GenBank #J02255 염기서열의 1-145 및 7774-8332의 서열)과 이에 특이적으로 제작된 본 발명의 올리고뉴클레오티드들의 인식부위를 나타낸 것이고,
도 2는 뮤린류케미아 바이러스 (murine leukemia virus; MLV)의 게놈에 존재하는 패키징 시그널의 염기서열 (GenBank #J02255 염기서열의 451-600의 서열)과 이에 특이적으로 제작된 본 발명의 올리고뉴클레오티드들의 인식부위를 나타낸 것이고,
도 3은 서열번호 6 및 서열번호 11의 올리고뉴클레오티드 프라이머 쌍을 이용하여 실시간 정량 PCR로 표준 세포 샘플에 대해 숙주세포 내에 삽입된 레트로바이러스 게놈 DNA를 정량한 분석 결과를 나타낸 것이고,
도 4는 서열번호 16 및 서열번호 17의 올리고뉴클레오티드 프라이머 쌍을 이용하여 실시간 정량 PCR로 바이러스 샘플 용액 내에 존재하는 레트로바이러스 게놈 RNA를 정량한 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 레트로바이러스에 특이적인 올리고뉴클레오티드 및 상기 올리고뉴클레오티드를 중합효소 연쇄반응의 프라이머로 이용하여 레트로바이러스 농도를 측정하는 방법에 관한 것이다.
레트로바이러스 (retrovirus)는 여러 가지 유전자치료용 벡터 중 가장 많이 사용되고 있는 유전자전달체로 전 세계적으로 허가를 받은 유전자치료의 임상 시험의 약 40%에서 레트로바이러스 벡터가 사용되고 있다 (Yu *et al*., *Gene Therapy* 7:797-804, 2000). 레트로바이러스 벡터를 유전자치료에 사용함에 있어 가장 중요한 요소 중 하나는 바이러스의 농도 (titer)를 측정하는 것이다. 유전자치료용으로 레트로바이러스 벡터를 사용하기 위해서는 일정 수준 (10^5 ~ 10^6 /㎖) 이상의 바이러스 농도가 요구되며, 일정 수준 이하의 바이러스 농도에서는 유전자 전달 효율이 너무 낮아 적절한 치료효과를 기대하기 어렵다. 따라서, 유전자치료용 레트로바이러스를 생산하는 세포주를 평가하거나 서로 다른 종류의 레트로바이러스 벡터를 비교하는 경우에 바이러스의 농도 측정은 반드시 필요하다.
또한, 유전자치료용 레트로바이러스에 일부 오염되어 있을 수 있는 복제가능 레트로바이러스 (replication-competent retrovirus, RCR)의 검출에 있어서 바이러스의 농도 측정기술이 매우 유용하게 사용될 수 있다. 일반적으로 유전자치료에 사용되는 대부분의 레트로바이러스 벡터는 뮤린류케미아 바이러스 게놈을 기본 게놈으로 사용하고 있으나, 안전성 등에서 아직도 여러 가지 문제점이 지적되고 있다. 즉, 레트로바이러스 벡터는 바이러스성 벡터이므로 세포에서 복제가능 레트로바이러스로 변할 수 있는 가능성이 항상 제기되어 왔으며, 그 중에서도 특히 유사 염기서열끼리 유전정보를 교환하는 동종 재조합 (homologous recombination)에 의한 RCR의 생산이 가장 우려되어 왔다. 유전자치료용 레트로바이러스는 주요 바이러스 유전자들을 모두 제거하였기 때문에 표적세포에 감염된 후에는 생활사가 중지되어 더 이상 바이러스 생산이 이루어지지 않는다. 그러나, RCR이 오염되어 있는 경우에는 포장 세포주 (packaging cell line)가 아닌 표적 세포에서도 바이러스가 생산될 수 있는데 이를 검출하고 평가하기 위하여 바이러스의 농도 측정이 필요하다.
이와 관련하여, 현재 사용되고 있는 레트로바이러스 벡터들 중 대다수는 상당한 길이의 바이러스 코딩 염기서열을 가지고 있는데, 이러한 코딩 염기서열은 벡터가 바이러스로 포장되어 나올 수 있는 패키징 세포의 게놈 상에도 존재하기 때문에 바이러스 코딩 염기서열과 패키징 세포 게놈간의 동종 재조합 가능성이 높고 실제로 RCR의 생산이 보고된 바 있다 (Miller *et al*., *Human Gene Ther.*, 1:5, 1990). 따라서, 유전자치료에서 유전자전달체로 사용될 레트로바이러스 벡터가 일정 수준 이상으로 적정하게 생산되는지 혹은 RCR에 오염되어 있는지를 조사하기 위하여 레트로바이러스의 농도를 정량적으로 측정하는 것은 매우 중요한 일이다.
이를 위하여 지금까지 다양한 레트로바이러스의 농도를 측정하는 방법이 개 발되어 왔는데, 이들 방법들은 크게 하기와 같이 세 가지로 분류될 수 있다.
첫 번째 방법은 역전사 효소 (reverse transcriptase) 활성도 혹은 닷 블럿 혼성화 (dot blot hybridization) 반응이나 반-정량적 RT-PCR (semi-quantitative RT-PCR) 방법을 이용하여 바이러스의 게놈 RNA 양을 측정함으로써 세포 배양 상등액 내 바이러스의 양을 측정하는 방법이다. 이러한 방법은 최근까지 개발된 반응조건에서는 정량성이 떨어지며 세포에 치료 유전자를 전달할 수 있는 능력을 지닌 레트로바이러스의 수를 측정하는 것이 아니라 결손 바이러스 (defective virus)를 포함한 전체 바이러스의 수를 측정하는 것이라는 점에서 한계를 지닌다.
두 번째 방법은 레트로바이러스에 의해 도입된 유전자의 표적세포 내 발현을 측정하여 간접적으로 바이러스의 농도를 측정하는 방법이다. 이와 같은 방법에서는 유전자가 도입된 세포와 그렇지 않은 세포를 구별할 수 있는 다양한 표지 유전자를 이용하여 특정 약물이 포함된 배양액에서 표적세포를 선택적으로 배양하여 콜로니 (colony)의 수를 세거나 표적세포를 염색하여 감염된 세포의 수를 결정함으로써 바이러스의 농도를 측정한다. 상기 방법에 사용되는 유전자로는 네오마이신 내성 유전자 (neomycin phosphotransferase; *Neo*), 하이그로마이신 내성 유전자 (hygromycin B phosphotransferase; *Hygro*), 베타-갈락토시다제 유전자 (β-galactosidase; *LacZ*), 베타-글루큐로니다제 유전자 (β-glucuronidase; *GUS*) 등이 있다. 하지만 이러한 유전자 산물들이 동물모델 혹은 임상시험에서 면역반응을

일으킬 수 있는 가능성이 제기됨에 따라, 최근에는 레트로바이러스 벡터에서 치료 목적의 유전자를 제외한 표지 유전자를 제거하려는 경향이 있다. 따라서, 상기 방법 들은 치료 목적의 유전자만을 지닌 레트로바이러스의 농도를 측정하는 데에는 사용할 수 없다는 단점을 지닌다.
세 번째 방법은 표적세포의 게놈 내로 삽입된 레트로바이러스 게놈 DNA의 양을 측정하여 레트로바이러스의 농도를 측정하는 방법이다. 이를 위해 일반적으로 서던 분석법 (Southern blot analysis)이 이용되고 있다. 상기 방법은 레트로바이러스의 감염성을 측정할 수 있으며 혼성화 반응에 사용하는 프로브 (probe)를 선택함으로써 삽입된 유전자에 관계없이 일반적인 레트로바이러스의 농도를 측정하는데 적용할 수 있다는 장점이 있다. 하지만 서던 분석법은 정확한 정량성을 얻기 힘들며 시간이 많이 소요되고 번거롭다는 단점을 지닌다.
이러한 문제점들을 해결하기 위하여, 최근에 개발되어 신속하고 정량적인 RNA 혹은 DNA 분석을 가능하게 한 실시간 정량 PCR 방법 (real time quantitative PCR)을 상기 방법들 중 첫 번째 방법과 세 번째 방법에 적용하려는 시도가 진행되고 있다 (Klein, D. *et al* ., *Gene Therapy* , 458-463, 2000; Sanburn, N and Cornetta, K., *Gene Therapy* , 1340-1345, 1999). 하지만 상기 문헌에서는 바이러스 게놈에 특이적인 프라이머가 아닌 표지 유전자로 사용된 EGFP (enhanced green fluorescence protein) 혹은 *Neo* 유전자에 대한 프라이머를 사용하여 실시간 정량 PCR을 이용한 농도 측정방법의 가능성만을 탐색하였다. 따라서, 실제로 실시간 정량 PCR을 다양한 레트로바이러스의 농도 측정에 이용하기 위해서는 표적세포인 인간세포의 게놈에 대해서는 비특이적인 반응을 나타내지 않으면서 바이러스 게놈에만 특이적으로 결합하는 프라이머 서열의 개발과 적절한 PCR 반응조건의 확립이 요 구되고 있는 실정이다. 적절한 PCR용 프라이머와 그의 반응조건이 확립되지 않으면 인간세포의 게놈 DNA 혹은 RNA에 대한 비특이적 반응으로 인하여 바이러스의 농도를 측정하는 것이 불가능하기 때문이다.
이에 본 발명에서는 숙주세포의 게놈 내에 삽입되어 있는 레트로바이러스 게놈 DNA를 정량적으로 분석하거나 혹은 레트로바이러스를 포함한 용액 내에 존재하는 레트로바이러스 게놈 RNA를 정량적으로 분석하는데 사용할 수 있는 적절한 프라이머용 올리고뉴클레오티드를 제공하고, 이를 이용하여 레트로바이러스의 농도를 신속하게 정량적으로 측정할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 레트로바이러스의 게놈 DNA 혹은 RNA를 특이적이며 정량적으로 신속하게 측정하는데 있어 적절한 프라이머로 이용될 수 있는 올리고뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
본 발명의 또 다른 목적은 상기 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 이용하여 레트로바이러스 농도를 신속하고 정량적으로 측정할 수 있는 레트로바이러스 농도 측정방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 레트로바이러스에 특이적인 프라이머로 적합하며 서열번호 6, 서열번호 11, 서열번호 16 및 서열번호 17로 기재되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
또한, 본 발명은 상기 올리고뉴클레오티드를 실시간 정량 PCR의 프라이머로 이용하여 레트로바이러스 게놈 DNA 또는 RNA를 신속하고 정량적으로 측정하는 레트로바이러스 농도 측정방법을 제공한다.
이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
본 발명에서 '레트로바이러스 특이적인 프라이머'라 함은, 바이러스를 포함하는 숙주세포 게놈과 혼성화시키는 경우 숙주세포 게놈과는 결합하지 않으면서 바이러스 게놈에는 효율적으로 결합하여, PCR 반응의 프라이머로 사용하였을 때 바이러스 게놈만을 증폭시킬 수 있는 성질을 가진 올리고뉴클레오티드를 말한다.
본 발명에서 제공되는 서열번호 6의 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1로 기재되는 레트로바이러스 3' LTR 부근의 염기서열 (GenBank #J02255; Shinnick, T.M. *et al* ., *Nature,* 293:543-548, 1981) 중에서 U3 영역의 상류 부분 81-100번째 염기를 특이적으로 인식하며, 서열번호 11의 올리고뉴클레오티드는 R 영역과 U5 영역의 경계 부분 550-570번째 염기를 특이적으로 인식하도록 고안되었다 (도 1 참조).
또한, 서열번호 16의 올리고뉴클레오티드는 서열번호 2로 기재되는 MLV 패키징 시그널의 염기서열 중 19-43번째 염기를, 서열번호 17의 올리고뉴클레오티드는 72-89번째 염기를 특이적으로 인식하도록 고안되었다 (도 2 참조).
최근 개발되고 있는 레트로바이러스 벡터들은 포장세포주 (packaging cell line) 내에서 재조합에 의해 복제가능 레트로바이러스 (Replication-competent retrovirus)가 생성되는 것을 방지하기 위하여, 벡터로서 기능하는데 필요한 최소 한의 염기서열을 제외한 대부분의 바이러스 유래서열을 제거하여 제작되고 있다. 따라서 이와 같은 레트로바이러스 벡터를 포함한 다양한 유형의 레트로바이러스 모두에 적용 가능한 프라이머를 개발하려면 현재 사용되고 있는 대부분의 레트로바이러스 벡터에 공통적으로 존재하는 바이러스 염기서열에 대해 특이적인 프라이머가 개발되어야 한다. 그렇지 않을 경우 숙주세포의 게놈 DNA 혹은 RNA에 대한 비특이적인 반응으로 인하여 바이러스의 농도를 정확하게 측정하는 것이 불가능하기 때문이다.
이에 본 발명자들은 약 31억 개로 구성된 인간세포 게놈 DNA에는 비특이적으로 반응하면서 다양한 종류의 레트로바이러스를 모두 검출할 수 있는 프라이머의 개발을 위해 다양한 올리고뉴클레오티드들을 제조하여 분석하였다. 그 결과, 인간세포 게놈 DNA에는 비특이적으로 반응하면서 레트로바이러스에 공통적으로 존재하는 LTR의 일부 영역을 특이적으로 인식하며 서열번호 6 및 서열번호 11로 기재되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드와, 모든 뮤린류케미아 바이러스의 RNA에 공통적으로 존재하는 패키징 시그널 (packaging signal)을 특이적으로 인식하며 서열번호 16 및 서열번호 17로 기재되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 개발하였다 (표 1, 도 1 및 도 2 참조).

상기 올리고뉴클레오티드를 이용한 레트로바이러스 농도 측정 방법은 바람직하게는 RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction), 반정량적 (semi-quantitative) RT-PCR, QC-PCR (quantitative competitive PCR) 또는 실시간 정량 PCR (real time quantitative PCR) 등의 방법이 사용될 수 있으며, 보다 바람 직하게는 증폭과정 동안 형성된 PCR 산물의 양을 실시간으로 측정할 수 있는 실시간 정량 PCR 방법을 이용할 수 있다.
본 발명의 올리고뉴클레오티드를 이용한 바람직한 레트로바이러스 농도 측정 방법의 예로서, 상기 올리고뉴클레오티드를 실시간 정량 PCR의 프라이머로 사용하여 숙주세포의 게놈에 삽입되어 있는 레트로바이러스 게놈 DNA를 정량적으로 측정하거나, 레트로바이러스를 포함하는 용액 내에 존재하는 레트로바이러스 게놈 RNA로부터 역전사 반응으로 DNA를 합성한 후 실시간 정량 PCR을 통해 용액 내의 바이러스 게놈을 정량적으로 분석할 수 있다.
구체적으로, 실시간 정량 PCR 방법을 이용하여 숙주세포의 게놈에 삽입되어 있는 레트로바이러스 게놈 DNA를 정량적으로 분석하는 방법은,
1) 레트로바이러스를 표적세포에 감염시키는 단계;
2) 바이러스가 감염된 표적세포의 게놈 DNA를 순수 분리하는 단계;
3) 상기 DNA를 주형으로 하고 바이러스 게놈 DNA의 염기서열에 특이적인 프라이머를 사용하여 이를 증폭하는 단계; 및
4) 단위 표적세포 게놈 DNA 당 포함되어 있는 바이러스 게놈 DNA의 양을 측정하여 바이러스의 농도를 결정하는 단계를 포함한다.
한편, 실시간 정량 PCR 방법을 이용하여 용액 내의 레트로바이러스 게놈 RNA를 정량적으로 분석하는 방법은,
1) 바이러스가 포함된 세포배양액 혹은 기타 용액으로부터 바이러스의 게놈 RNA를 추출¡분리하는 단계;
2) 역전사 효소를 이용하여 상기 RNA로부터 DNA를 합성하는 단계;
3) 상기 DNA를 주형으로 하고 바이러스 게놈의 염기서열에 특이적인 프라이머를 사용하여 이를 증폭하는 단계; 및
4) 증폭된 결과를 정량적으로 분석하여 PCR의 주형인 시료 내 바이러스 게놈 RNA의 상대적인 양을 결정하는 단계를 포함한다.
본 발명의 올리고뉴클레오티드를 이용한 레트로바이러스의 농도 측정방법은 표적세포의 게놈 내에 삽입된 레트로바이러스 DNA 또는 용액 내의 레트로바이러스 게놈 RNA를 특이적이며 정량적으로 신속하게 측정할 수 있어 유전자치료용 레트로바이러스 벡터의 농도 측정, 유전자치료용 레트로바이러스 조성물로부터 오염된 복제가능 레트로바이러스 (replication competent retrovirus)의 검출, 야생형 레트로바이러스의 진단 등에 효과적으로 사용될 수 있다.
본 발명의 레트로바이러스 농도 측정방법을 이용하여 복제가능 레트로바이러스를 검출하는 방법은 기본적으로 BAG 이동성 측정방법 (BAG mobilization method) 등에 적용할 수 있는데 (Pear, W. S. *et al* ., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 8392-8396, 1993), 간략히 설명하면 테스트하고자 하는 레트로바이러스 벡터 용액을 야생형 레트로바이러스가 복제될 수 있는 세포주에 감염시켜 수 차례 계대 배양을 한 뒤, 세포 배양액의 상등액에 대해 상기 PCR 방법을 수행하여 레트로바이러스 게놈 RNA를 검출하는 방법이다. 앞서 설명한 바와 같이 유전자치료용 레트로바이러스 벡터는 주요 바이러스 유전자 코딩서열이 결손되어 야생형 레트로바이러스가 복제할 수 있는 세포주에서도 성장할 수 없다. 따라서 이와 같은 과정에 의해 검출되 는 레트로바이러스는 복제가능 레트로바이러스로 판단할 수 있다. 또한, 본 발명의 레트로바이러스 농도 측정방법을 이용하여 유전자치료를 받은 환자 혹은 여러 동물들의 혈액 샘플로부터 야생형 레트로바이러스를 진단하는데 이용할 수 있다.
본 발명의 바람직한 예로서 올리고뉴클레오티드를 실시간 정량 PCR의 프라이머로 이용한 레트로바이러스 농도 측정 방법의 구체적인 과정은 다음과 같다.
실시간 정량 PCR
실시간 정량 PCR은 특정 PCR 산물의 실시간 검출을 위하여 이중으로 염색 표지된 프로브 (double dye-labeled probe)를 사용하여 PCR하는 방법으로, 그 상세한 방법 및 원리는 하이드 등 (Heid, C. A. *et al* ., *Genome Res* ., 986-994, 1996)을 참조할 수 있다.
상기 프로브는 증폭될 부분의 단편에 결합한 후 증폭과정의 신장기 (extension phase) 동안 변형되어 증폭된 PCR 산물의 양을 간접적으로 나타내는 검출가능한 신호를 형성하게 되고, 이 신호를 측정함으로써 PCR 산물의 형성을 실시간으로 검출할 수 있다. 상기 프로브는 증폭시키고자 하는 유전자의 5' 및 3' PCR 프라이머 결합부위 사이의 지역에 혼성화되는데, 5'→3' 뉴클리아제 활성을 가지고 있는 DNA 중합효소가 신장 반응 동안 상기 프로브를 분해하여 프로브의 구조 또는 형태에 일어나는 변형에 의해 발생하는 흡광도 변화와 같은 검출가능한 신호를 형성하게 된다. 상기 프로브는 두 개의 표지 (labels)를 포함하는데, 이중 하나는 5' 말단에 표지된 리포터 염료 (reporter dye, R)이고 다른 하나는 3' 말단에 표지된 흡광 염료 (quencher dye, Q)이다.
리포터 염료로는 6-카복시플루오르세인 (6-carboxyfluorescein, FAM), 2',4',5',7'-테트라클로로-4,7-디클로로플루오르세인 (2',4',5',7'-tetrachloro
-4,7-dichlorofluorescein, TET), 2',7'-디메톡시-4',5'-디클로로-6-카복시로다민 (2',7'-dimethoxy-4',5'-dichloro-6-carboxyrhodamine, JOE) 및 VIC ™ (PE Biosystems사, USA) 등이 사용될 수 있고, 흡광 염료로는 6-카복시테트라메틸 로다민 (6-carboxytetramethyl rhodamine, TAMRA) 또는 (4-디메틸아민)아조벤젠 설폰산 ([4-dimethylamine]azobenzene sulfonic acid, DABSYL) 등이 사용될 수 있다.
본 발명에서는 바람직한 실시예로서 6-카복시플루오르세인 (FAM)이 리포터 염로로, 6-카복시테트라메틸 로다민 (TAMRA)이 흡광 염료로 이중 표지되고 레트로바이러스의 LTR 부분에 상보적인 염기서열을 갖는 FAM-서열번호 13-TAMRA로 기재되는 프로브 또는 VIC ™ 가 리포터 염로로, TAMRA가 흡광 염료로 이중 표지되고 레트로바이러스의 패키징 시그널에 상보적인 염기서열을 갖는 VIC ™ -서열번호 19-TAMRA로 기재되는 프로브를 실시간 PCR에 사용하였다.

상기 두 그룹의 화합물이 용액 내에 존재하는 경우 이들은 혼성화되어 고리 구조 (hairpin loop)를 형성하여 서로 충분하게 근접하게 되기 때문에 흡광 염료가 리포터 염료의 방출 스펙트럼 (emission spectra)을 흡광함으로써 리포터 염료에 대한 흡광체로서 작용하게 된다.
그러나, PCR의 주형으로 사용되는 목적 유전자에 혼성화된 프로브는 선형화된 (linearlized) 형태로 존재하게 된다. 이때 DNA 중합효소가 중합반응에 의해 상부쪽 프라이머 (upstream primer)의 신장을 수행하면서 주형에 혼성화된 프로브와 만나게 되면 DNA 중합효소의 5' 엑소뉴클리아제 (5' exonuclease) 활성에 의해 프로브의 5' 말단 부분이 분해되어 리포터 염료에 대한 흡광 (quenching) 기능이 상실됨으로써 형광 (fluorescence)의 양이 증가하게 된다. 따라서, 반응액 내 형광의 양은 특정 PCR 반응산물의 양과 비례하게 된다.
여기서, Ct (Threshold cycle) 값은 형광이 역치값 (Threshold value)에 도달하는 반응횟수를 지칭하며, 역치값은 반응 횟수 1에서 15 사이에 관찰되는 기저 방출 (baseline emission)의 평균값의 표준편차에 10배를 곱한 값이다.
이러한 원리를 바탕으로 하는 실시간 정량 PCR은 기존에 PCR 산물을 정량하기 위한 방법에 비하여 이론적으로 PCR 반응이 지수적 (exponential)으로 일어나는 반응 횟수 영역을 검출하여 횟수와 주형 DNA 수의 상관관계를 $2^{-\Delta Ct}$ 를 통해 정량적으로 결정할 수 있다는 장점이 있다 (Heid, C. A. *et al* ., *Genome Res* ., 986-994, 1996).

숙주세포 게놈 내에 삽입된 레트로바이러스 농도(titer) 측정방법

구체적으로 실시간 정량 PCR을 이용하여 바이러스 농도를 측정하기 위해서는, 한 복제수의 레트로바이러스가 게놈 내에 삽입되어 있는 표적세포주가 필요하다. 먼저, 농도를 측정하고자 하는 레트로바이러스를 패키징 세포주에 감염시켜 무세포 바이러스 상등액을 얻은 후, MOI (multiplicity of infection)가 0.1, 바람직하게는 0.05 이하가 되도록 하여 숙주세포에 형질도입 (transduction)한다. 24 시간 뒤 제한희석법을 통해 플레이트에 단일 세포 클론을 형성시킨다. 바이러스가 감염된 클론을 선별하여 배양하고, 게놈 DNA를 순수분리한 후, 서던 블럿 분석을 수행하여 한 복제수의 레트로바이러스가 표적세포주의 게놈에 삽입되어 있는지 확인한다. 상기 세포주를 100% 감염세포로 정하고 정상 표적세포의 게놈 DNA와 적당한 비율로 혼합하여 다양한 감염비율을 나타내는 숙주세포 게놈 DNA를 제조한 후 이를 기준으로 사용하는 데, 시료에 대해 실시간 정량 PCR을 수행한 후 기준 감염비율과 비교하여 몇 %의 표적세포가 감염되어 있는지를 결정할 수 있어 레트로바이러스에 의한 유전자 전달효율과 바이러스의 농도를 계산할 수 있다.
상기와 같은 방법으로 한 복제수의 레트로바이러스가 삽입된 숙주세포 게놈 DNA와 바이러스가 감염되지 않은 순수 숙주세포 게놈 DNA를 순수분리한 후, 제한효소로 처리하여 정량한다. 상기 두 DNA를 일정 비율로 혼합하여 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 1%, 0.5% 및 0%의 감염비율을 반영하는 기준 게놈 DNA를 만든다.
상기 기준 게놈 DNA에 대해 실시간 정량 PCR을 수행하여 감염비율에 따른 Ct 값의 변화를 도표로 나타내어 기준곡선으로 삼고, 농도를 측정하고자 하는 실험군 세포주에 대해서도 게놈 DNA를 분리하여 동일한 방법으로 실시간 정량 PCR 반응을 수행하고 Ct 값을 측정하여 상기 기준곡선과 비교함으로써 정확한 농도(titer)를 계산할 수 있다.
상기에서 실시간 정량 PCR 조건은 5 ㎕의 게놈 DNA와 각 1 ㎕의 서열번호 6과 서열번호 11의 프라이머 쌍, 2 ㎕의 이중 염색 표지 프로브를 포함하는 PCR 반응액 25 ㎕에 대해 50℃에서 2분, 95℃에서 10분간 반응한 후 [95℃에서 15초 → 60℃에서 1분 30초]의 반응을 40회 내지 45회 반복하는 것이 바람직하다.
본 발명에서는 바람직한 실시예로서 한 복제수의 MT5-IDUA 레트로바이러스가 감염되어 있는 인간 HT1080 세포주를 제조하여 사용하였다. MT5-IDUA 레트로바이러스는 본 발명자들에 의해 특허 출원된 MT5 레트로바이러스 벡터 (대한민국 특허출원공개 제1998-24847호; KCCM-10205)에 인간 이두로니다제 (iduronidase) 유전자를 삽입하여 제조한 벡터이다. 상기 실험 결과, 감염비율이 증가함에 따라 형광이 역치값에 도달하는 반응횟수를 나타내는 Ct 값이 일정하게 감소하여 감염비율과 Ct 값은 높은 상관관계 (r^2 =0.998)를 나타냄을 확인하였다.

레트로바이러스를 포함하는 용액 내 레트로바이러스 농도 측정방법

표적세포의 게놈에 삽입된 레트로바이러스의 게놈 DNA를 측정하는 상기 방법은 실제 감염된 바이러스를 측정한다는 장점이 있으나, 형질도입 과정을 거쳐야 하는 번거로움이 있다. 따라서, 보다 간편한 바이러스 농도 측정 방법으로서 용액 내 전체 바이러스 RNA를 측정하는 방법을 이용할 수 있으며, 이 경우 서열번호 16 및 서열번호 17의 올리고뉴클레오티드가 프라이머로 이용될 수 있다.
먼저, 바이러스 용액 자체 또는 이로부터 분리된 바이러스 게놈 RNA에 대해 역전사 효소 반응으로 DNA를 합성한다. 여기서 바이러스 용액 자체를 이용하는 경우에는, 역전사 효소 반응 초기에 고온 변성화 과정을 거침으로써 별도의 RNA 추출과정을 생략하여 비용 절감과 높은 효율성을 얻을 수 있다.
역전사 반응을 통해 합성된 cDNA는 앞서 언급한 방법과 마찬가지로 실시간 정량 PCR의 주형으로 사용되며, 이때 패키징 시그널을 특이적으로 인식하는 서열번호 16 및 서열번호 17의 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드가 프라이머로 이용된다.
본 발명의 또 다른 실시예에서는 MT5-IDUA 레트로바이러스 벡터를 포함한 용액에 대해 본 발명의 방법을 이용하여 바이러스 농도를 측정한 결과, Ct 값이 용액 내의 레트로바이러스의 양과 유의미한 상관관계 (r^2 =0.9993)를 나타내어, 실시간 정량 PCR을 통해 측정된 Ct 값으로부터 cDNA의 상대적인 양을 측정할 수 있음을 확인하였다.
최근에 실시간 정량 PCR을 수행할 수 있는 기기 (ABI7700, PE Biosystems, Foster City, US)가 개발되어 PCR에 사용된 주형 DNA의 양을 정량적으로 분석하는 것이 가능하게 되었지만, 상기 PCR 기기 혹은 기타 정량적 분석이 가능한 PCR 기기들을 이용하여 바이러스의 농도를 분석하기 위해서는 바이러스 게놈에 특이적인 프라이머의 개발이 요구된다. 이에 본 발명자들은 상기에서 개발된 인간세포 게놈 DNA에는 비특이적으로 반응하면서 레트로바이러스에 특이적으로 반응하는 서열번호 6 및 서열번호 11과 서열번호 16 및 서열번호 17로 기재되는 올리고뉴클레오티드를 프라이머 쌍으로 이용하여 실시간 정량 PCR 반응을 수행하였고, 본 발명의 프라이머 쌍을 이용한 실시간 정량 PCR 방법이 표적세포의 게놈 내 삽입된 레트로바이러스 게놈 DNA 또는 바이러스 용액 내에 존재하는 레트로바이러스 게놈 RNA 검출에 유용하게 적용될 수 있음을 확인하였다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 한 복제수의 레트로바이러스가 감염된 인간세포주의 제조

(1-1) MT5-IDUA 레트로바이러스 벡터의 제조

다양한 종류의 레트로바이러스를 모두 검출할 수 있는 프라이머를 제조하기 위해서는 다양한 종류의 레트로바이러스에 공통적으로 존재하는 염기서열만을 가진 레트로바이러스 벡터를 표적으로 이용하는 것이 바람직하다. 본 발명자들에 의해 개발된 MT5 벡터 (대한민국 특허출원공개 제1998-24847호, KCCM-10205)는 유전자전달체로서 필요한 최소한의 바이러스 염기서열을 제외한 나머지 서열은 모두 제거한 레트로바이러스 벡터이다. 본 발명에서는 MT5 벡터에 인간 이두로니다제 (iduronidase) 유전자를 삽입한 MT5-IDUA 벡터를 제조하여 사용하였다. 인간 이두로니다제 유전자는 정상인 포경 포피 섬유세포 (human foreskin fibroblast; HFF)로부터 RNA를 추출하여 cDNA을 얻은 후 이를 주형으로 PCR하여 클로닝하였다.

먼저, HFF 세포로부터 트라이졸 (Tryzol; Gibco BRL, USA) 방법을 이용하여 RNA를 추출하고 추출된 RNA로부터 역전사 효소 (reverse transcriptase) 중합 반응을 통해 cDNA를 얻었다. 이후 상기 cDNA를 PCR 주형으로 하고, 서열번호 3 및 서열번호 4의 합성 올리고뉴클레오타이드 (인간 이두로니다제 유전자 염기서열 GenBank #M74715의 76-96, 2041-2061 부분을 각각 인식)를 프라이머로 이용한 PCR을 통해 인간 이두로니다제 유전자를 포함하는 DNA 절편을 얻었다. 상기 PCR 반응 조건으로는 주형 DNA 1 ㎕, 10 ㎊/㎕ 프라이머 각 1 ㎕, 10 mM dNTP 10 ㎕, 확장 고성능 효소 (Expand High Fidelity enzyme; Gibco BRL, USA) 3.5 유닛과 효소용 완충용액 10 ㎕를 혼합하여 총 100 ㎕의 반응액을 만든 후 이를 94℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분 30초의 반응으로 30회 반복하였다. 이로부터 증폭된 약 2,000 bp 크기의 PCR 산물을 pGEM T easy 벡터 (Promega, WI, USA)에 삽입하여 pGEM T easy-IDUA 벡터를 제조하였다. 이후 상기 pGEM T easy-IDUA 벡터에 *Bam* HI 제한효소를 처리하여 1,986 bp 크기의 인간 이두로니다제 유전자 절편을 얻고 이를 MT5 (KCCM-10205) 벡터의 *Bam* HI 제한효소 자리에 삽입하여 MT5-IDUA 벡터를 제조하였다.

(1-2) 한 복제수의 레트로바이러스가 감염된 인간세포주의 제조

본 발명자들은 한 복제수의 레트로바이러스가 감염된 세포주를 제조하기 위하여 상기 MT5-IDUA 벡터를 포함하는 레트로바이러스를 제조하였다.

먼저, 상기 실시예 <1-1>에서 제조된 MT5-IDUA 벡터 DNA를 뮤린류케미아 바이러스 (murine leukemia virus; MLV)의 *gag-pol* 유전자를 발현하는 pVM-gp 플라스미드 DNA (TAKARA SHUZO사, Japan) 및 VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus-G) 단백질을 발현하는 pRV67 플라스미드 DNA (Mitrophanous, K.A. *et al*., *Gene Therapy* , 6: 1808-1818, 1999)와 함께 293T 세포 (Yu, S. S. *et al*., *Gene Therapy* , 797-804, 2000)에 형질감염 (transfection)시킨 후 8시간 뒤에 새로운 배지로 교환하였다. 이를 다시 48시간 동안 배양하여 얻은 세포 배양액을 0.45 ㎛ 여과지로 여과하여 무세포 바이러스를 얻었다.

상기에서 생산한 MT5-IDUA 레트로바이러스를 HT1080 세포주 (ATCC #CCL-121)에 MOI (multiplicity of infection) = 0.05 이하 조건의 적은 바이러스를 이용하여 형질도입 (transduction)하였다. 이로부터 24시간 경과한 후 표적세포들을 96 웰 플레이트 (well plate)에 웰 당 0.3개의 세포가 들어가도록 희석하여 하나의 세포로 구성된 클론상태로 만든 뒤 14일 동안 G418 (1 ㎍/㎕, Gibco BRL, USA)을 처리하여 레트로바이러스가 도입된 세포주 클론만을 선별하여 배양하였다. 이상과 같이 선별 배양된 세포주 클론 중 하나를 선택하여 게놈 DNA를 순수분리한 후 패키징 시그널의 염기서열 부위를 프로브로 한 서던 혼성화 분석을 수행하여 한 복제수의 레트로바이러스가 표적세포주의 게놈에 삽입되어 있음을 확인하였다.

상기 한 복제수의 레트로바이러스 벡터 MT5-IDUA가 게놈에 삽입된 세포주 클론을 HT1080:MT5-IDUA라 명명하였다.

<실시예 2> 숙주세포의 게놈에 삽입된 레트로바이러스의 게놈 DNA 염기서열에 특이적인 프라이머 개발

본 발명자들은 상기 실시예 1에서 제조된 한 복제수의 MT5-IDUA가 게놈에 삽입된 HT1080:MT5-IDUA 세포주와 대조군 HT1080 세포주의 게놈 DNA를 이용하여 레트로바이러스 게놈 DNA에 특이적이며 인간세포의 게놈 DNA에는 비특이적으로 반응하는 프라이머 쌍을 찾기 위하여, 다양한 올리고뉴클레오티드를 제조하여 PCR 반응을 수행하였다.

먼저 HT1080 세포주로부터 전체 게놈 DNA를 순수분리하기 위하여, HT1080 세포 침전물에 TES (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 0.7 % SDS) 완충용액을 첨가한 후 단백질 분해효소 K (proteinase K; 400 g/㎖)를 처리하고 50℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 페놀/클로로포름 추출과 에탄올 침전을 통해 HT1080 세포주로부터 전체 게놈 DNA를 순수분리하였다. 상기와 같이 순수분리한 게놈 DNA를 *Eco* RI 제한효소로 처리하고 정량한 후 1 ㎍의 게놈 DNA에 대해 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응은 주형 DNA 1 ㎍, 200 nM 프라이머 각 1 ㎕, 10 mM dNTP 5 ㎕, Taq 중합효소 (Taq polymerase; TAKARA SHUZO사, Japan) 5 유닛과 효소용 완충용액 5 ㎕를 혼합하여 총 50 ㎕의 반응액을 만든 후 이를 94℃에서 1분, 60℃에서 1분, 72℃에서 1분 30초의 반응을 30회 반복하였다.

상기 PCR 반응조건 하에서 본 발명에서 제작한 여러 쌍의 프라이머를 이용하여 조사한 결과, 인간세포의 게놈 DNA에는 비특이적인 반응을 나타내지 않으면서 레트로바이러스 게놈 DNA에만 특이적인 반응을 보이는 서열번호 6 및 서열번호 11로 기재되는 프라이머 쌍을 발굴하였다 (도 1). 본 발명에서 제작한 다양한 올리고뉴클레오티드 서열과 이를 이용한 PCR 반응결과는 하기 표 1에 나타내었다.

[표 1]

프라이머 조합		반응결과		평 가
전방향	역반향	바이러스 게놈	인간세포 게놈	
서열번호 5	서열번호 9	-	+	부적합
서열번호 5	서열번호 11	-	+	부적합
서열번호 5	서열번호 12	-	+	부적합
서열번호 6	서열번호 9	+	+	부적합
서열번호 6	서열번호 10	+	+	부적합
서열번호 6	서열번호 11	+	-	적합
서열번호 6	서열번호 12	+	+	부적합
서열번호 7	서열번호 9	+	+	부적합
서열번호 7	서열번호 10	+	+	부적합
서열번호 7	서열번호 11	+	+	부적합
서열번호 8	서열번호 9	+	+	부적합
서열번호 8	서열번호 10	+	+	부적합
서열번호 8	서열번호 11	+	+	부적합
+; 반응이 유발됨, -; 반응이 유발되지 않음				

상기 실험 결과를 통하여 본 발명의 서열번호 6 및 서열번호 11로 기재되는 프라이머 쌍은 숙주세포의 게놈에 삽입된 레트로바이러스 게놈 DNA에서 공통적으로 나타나는 LTR을 표적으로 하므로 LTR 구조를 갖는 모든 레트로바이러스의 검출에 이용될 수 있음을 확인하였다.

<실시예 3> 실시간 정량 PCR을 이용한 숙주세포에 삽입된 레트로바이러스 게놈 DNA 정량

상기 실시예 2에서 개발한 프라이머 쌍을 실시간 정량 PCR에 적용하여 숙주세포에 삽입된 레트로바이러스 게놈 DNA를 정량할 수 있는지 조사하기 위하여 본 발명자들은 하기와 같은 실험을 수행하였다.

먼저, 상기 실시예 <1-2>에서 확보한 본 발명의 HT1080:MT5-IDUA 세포주와 대조군 HT1080 세포주로부터 각각 게놈 DNA를 순수분리하여 *Eco* RI 제한효소로 처리하고 정량하였다. 그 후 상기 DNA를 일정한 비율로 혼합하여 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0% 등의 감염비율을 반영하는 기준 게놈 DNA를 만들고 실시간 정량 PCR 분석이 상기 감염비율을 정확하게 반영하는 결과를 나타내는지 조사하였다.

정량 PCR은 TaqMan ™ 분석방법 (Heid C.A. *et al* ., *Genome Res* ., 986-994, 1996)을 이용하고 실시간 정량 PCR 기기 (ABI7700, PE Biosystems, Foster City, US)를 사용하여 수행하였다. 상기 실시예 2에서 개발한 프라이머 쌍과 함께 5' 말단에는 형광 리포터 염료 (fluorescence reporter dye, R)로서 6-카복시플루오르세 인 (FAM)이, 3' 말단에는 흡광 염료 (quencher dye, Q)로서 6-카복시테트라메틸 로다민 (TAMRA)이 이중으로 표지되어 있으며 레트로바이러스의 LTR 부분에 상보적인 염기서열을 갖는 FAM-서열번호 13-TAMRA로 기재되는 프로브를 사용하였다.

PCR 반응은 5 ㎕의 게놈 DNA, 25 ㎕의 TaqMan 완충용액 (2 ¡), 1 ㎕의 상기 프로브 (2 ㎛M), 각각 1 ㎕씩의 상기 프라이머들 (200 nM), 17 ㎕의 증류수로 구성된 전체 50 ㎕의 PCR 반응액을 50℃에서 2분, 95℃에서 10분간 반응시킨 후 95℃에서 15초, 60℃에서 1분 30초의 반응을 45회 반복하였다. 동량의 게놈 DNA가 사용되었는지에 대한 대조군으로 인간 베타 액틴 (β-actin) 유전자를 검출할 수 있는 서열번호 14 및 서열번호 15로 기재되는 프라이머 쌍과 VIC ™ -서열번호 18-TAMRA으로 기재되는 액틴용 프로브를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다.

그 결과, 감염비율이 0%, 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 100%로 증가함에 따라 형광이 역치값 (Threshold value)에 도달하는 반응횟수를 나타내는 Ct 값이 일정하게 감소하는 것으로 나타나, 감염비율과 Ct (Threshold cycle) 값 사이에 유의미한 상관관계 (r^2 =0.998)가 있음을 확인하였다 (도 3). 이와 같이 Ct 값은 주형 DNA의 상대적인 양을 정확하게 반영하므로, 상기 실시예 2에서 개발된 프라이머는 실시간-정량 PCR을 이용한 바이러스 게놈 DNA 검출에 효과적으로 적용될 수 있다.

<실시예 4> 실시간 정량 PCR을 이용한 레트로바이러스 농도 측정방법과 MDR 선택표지 유전자를 이용한 측정방법의 비교

(4-1) MTM-GC 레트로바이러스를 생산하는 PG13 세포주의 제조

상기 실시예 3에서 수행한 실시간 정량 PCR을 이용한 레트로바이러스 농도 측정방법을 기존의 MDR (Multi-drug resistance) 표지 유전자를 이용한 레트로바이러스 농도 측정방법과 비교하기 위해, 우선 MDR 유전자를 지닌 레트로바이러스를 생산하는 세포주를 제조하였다. 이를 위해 본 발명에서는 MTM-GC 레트로바이러스 벡터를 사용하였는데, 상기 벡터는 본 발명자들이 개발한 MTM 벡터 (대한민국 특허출원공개 제1998-24847호, 다클로닝 부위 하류에 IRE

S [internal ribosomal entry site]와 연결된 MDR 유전자 염기서열을 포함하고 있어서 원하는 유전자와 함께 MDR 유전자를 발현할 수 있음)에 인간 글루코세르브로시다제 (glucocerbrosidase) 유전자를 삽입하여 제조하였다.
MTM-GC를 생산하는 PG13 생산 세포주를 제조한 방법은 하기와 같다. 구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에서 기술한 바와 같이 MTM-GC 벡터 DNA를 뮤린류케미아 바이러스 (murine leukemia virus; MLV)의 *gag-pol* 유전자를 발현하는 pVM-gp 플라스미드 DNA (TAKARA SHUZO사, Japan) 및 VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus-G) 단백질을 발현하는 pRV67 플라스미드 DNA (Mitrophanous, K.A. *et al*., *Gene Therapy*, 6:1808-1818, 1999)와 함께 293T 세포에 형질감염 (transfection)시킨 후 8시간 뒤에 새로운 배지로 교환하였다. 48시간 동안 배양하여 얻은 세포 배양액을 0.45 ㎛ 여과지로 여과하여 무세포 바이러스를 얻었다.
상기에서 생산된 MTM-GC 레트로바이러스를 PG13 세포주 (ATCC CRL10686, MD, USA)에 형질도입 (transduction)시키고 24시간 경과한 후 표적세포들을 96 웰 플레 이트에 제한 희석법을 수행하여 하나의 세포로 구성된 클론상태로 만든 뒤 14일간 빈크리스틴 (vincristine; 25 ng/㎖)을 처리하여 레트로바이러스가 도입된 세포주 클론만을 선별 배양하였다.
이상과 같이 선별 배양된 세포주 클론 중 바이러스 농도가 높은 하나를 선택하여 PG13:MTM-GC 세포주를 제조하였다.

(4-2) 실시간-정량 PCR 방법과 MDR 유전자를 이용한 레트로바이러스 농도 측정방법의 비교

상기 실시예 <4-1>에서 제조한 PG13:MTM-GC 세포주로부터 무세포 바이러스를 얻은 후 이를 표적세포주인 HT1080 세포에 형질도입하였다. 24시간 경과한 후 표적세포들을 3개의 세포배양 용기에 나눈 뒤 본 발명의 실시간 정량 PCR 방법과 MDR 유전자를 이용한 방법의 효율을 비교하기 위하여, 각각에 대해 하기와 같은 실험을 실시하였다.
그룹 1은 48시간 더 배양한 후에 표적세포의 게놈 DNA를 순수분리하여 상기 실시예 3에서 기술한 바와 같이 실시간-정량 PCR 방법을 이용하여 몇 %의 표적세포가 MTM-GC 레트로바이러스에 의해 감염되었는지를 조사하였다. 그룹 2는 24시간 더 배양한 후 MDR 단백질에 대해 특이적인 항체 (KAMIYA BIOMEDICAL COMPANY, USA)를 이용한 FACS (Fluorescence activated cell sorter) 분석 (Aran, J. M. *et al*., *Cancer Gene Therapy*, 195-206, 1998)을 수행하여 몇 %의 표적세포가 MDR 유전자를 발현하는지 조사하였다. 그룹 3은 표적세포를 1/100, 1/500, 1/1000, 1/5000 등으로 다양하게 희석한 후 빈크리스틴을 처리하여 MTM-GC 바이러스에 감염된 표적세포 의 콜로니 수를 조사하였고 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[표 2]

바이러스 용액	실시간 정량 PCR법 (그룹 1)		FACS법 (그룹 2)		콜로니측정법 (그룹 3) (x 10^5)
	%	추정 농도 (x 10^5)	%	추정 농도 (x 10^5)	
A	100.5 ± 21.8	> 5.0	65.7 ± 2.9	5.4	2.9 ± 1.2
B	7.8 ± 4.8	0.4	22.4 ± 3.6	1.3	0.7 ± 0.4

그 결과, 상기 실시예 2에서 개발된 본 발명의 프라이머를 이용한 실시간-정량 PCR 방법과 FACS 방법, 빈크리스틴 (vincristine) 저항성 콜로니 측정방법 사이에 높은 상관관계가 있음을 확인하였다.

<실시예 5> 실시간 정량 PCR을 이용한 레트로바이러스 게놈 RNA 측정방법

상기 실시예 3 내지 4에서 제시한 방법은 표적세포의 게놈에 삽입된 레트로바이러스 게놈 DNA를 측정하는 방법이다. 이러한 방법은 실제 표적세포에 감염된 레트로바이러스를 측정한다는 장점이 있으나 형질도입 과정을 거쳐야 하는 번거로움이 있다. 이에 본 발명자들은 감염성이 있는 레트로바이러스의 RNA가 아닌 전체 레트로바이러스의 RNA를 측정한다는 단점이 있지만 보다 간편하다는 장점을 지닌 용액 내 레트로바이러스 게놈 RNA 측정방법을 개발하였다. 약 1×10^6 바이러스/㎖ 농도의 MT5-IDUA 레트로바이러스 벡터를 포함한 용액으로부터 1 ㎕, 0.1 ㎕, 0.01 ㎕, 0.001 ㎕, 0.0001 ㎕를 취하여 원스텝 역전사중합-PCR 키트 (TaqMan Gold One-step RT-PCR kit, PE Applied Biosystems사, USA) 를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 상기 반응을 수행함에 있어 실험의 효율성을 높이고 비용을 절감하기 위하여 RNA 추출과정 없이 바이러스 용액을 직접 이용하여 RT-PCR 반응을 수행하였는데, 이는 상기 RT-PCR 반응의 초기 단계에서 고온 변성화 과정이 있어 바이러스가 변성화되면서 바이러스 게놈 RNA가 용액 내로 유출되기 때문에 가능하다. 또한, 통상적인 방법에 의해 바이러스가 포함된 세포배양액 혹은 기타 용액으로부터 바이러스의 게놈 RNA를 추출¡분리하여 이를 역전사 반응에 사용할 수 있다. 상기 RT-PCR에 의해 유출된 RNA로부터 역전사효소 (reverse transcriptase) 중합 반응을 이용하여 cDNA가 만들어지고 이후 상기 cDNA를 PCR 주형으로 하고, VIC ™-서열번호 19-TAMRA로 기재되는 프로브와 서열번호 16 및 서열번호 17로 기재되는 합성 뉴클레오타이드를 프라이머로 이용한 PCR을 통해 서로 다양한 농도로 레트로바이러스를 포함하고 있는 용액 내 레트로바이러스 게놈 서열을 증폭하였다. 상기 PCR 반응은 ABI7700 PCR 기기를 사용하였다. 역전사 반응과 PCR 반응이 한 튜브 내에서 연속적으로 일어나는 상기 원스텝 RT-PCR 반응 조건은 1 ㎕의 레트로바이러스 용액, 12.5 ㎕의 TaqMan ™ master mix 완충용액 (2¡), 2 ㎕의 상기 프로브 (2 ㎛M), 각각 2 ㎕씩의 상기 프라이머들 (10 ㎮/㎕), 0.5 ㎕의 40¡ MultiScribe and RNase Inhibitor Mix, 5 ㎕의 증류수로 구성된 전체 25 ㎕의 PCR 반응액을 48℃에서 30분, 95℃에서 10분간 반응시킨 후 95℃에서 15초, 60℃에서 1분의 반응을 40회 반복하였다.

그 결과, 용액 내 상대적인 바이러스 농도가 증가할수록 형광이 역치값에 도 달하는 반응횟수를 나타내는 Ct 값이 일정하게 감소하여 용액 내 레트로바이러스 양과 Ct 값 사이에 유의미한 상관관계 (r^2=0.9993)과 있음을 나타내었다 (도 4). 도 4에서 X축의 log[상대적인 바이러스 양]은 1×10^6 바이러스/㎖ 농도의 레트로바이러스 함유 용액을 기준으로 이로부터 1 ㎕, 0.1 ㎕, 0.01 ㎕, 0.001 ㎕, 0.0001 ㎕를 취한 용액 샘플의 형광 측정값을 상대적인 바이러스 양을 나타낸 것이다. 이와 같이 Ct 값은 주형 cDNA의 상대적인 양을 반영함으로써 본 발명의 서열번호 16 및 서열번호 17의 프라이머 쌍이 실시간-정량 PCR을 이용한 바이러스 게놈 RNA 검출에 적용될 수 있음을 보여준다.

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 이용한 레트로바이러스의 농도 측정방법은 표적세포의 게놈 내 삽입된 레트로바이러스 DNA 또는 용액 내 레트로바이러스 게놈 RNA를 특이적이며 정량적으로 신속하게 측정할 수 있어 유전자치료용 레트로바이러스 벡터의 농도 측정, 유전자치료용 레트로바이러스 조성물로부터 오염된 복제가능 레트로바이러스의 검출, 야생형 레트로바이러스의 진단 등에 효과적으로 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
삭제

청구항 2.
레트로바이러스의 게놈에 존재하는 LTR(long terminal repeat)의 일부 영역을 특이적으로 인식하고 서열번호 11로 기재되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드.

청구항 3.
뮤린류케미아 레트로바이러스의 게놈에 존재하는 패키징 시그널 (packaging signal)을 특이적으로 인식하고 서열번호 16으로 기재되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드.

청구항 4.
뮤린류케미아 레트로바이러스의 게놈에 존재하는 패키징 시그널을 특이적으로 인식하고 서열번호 17로 기재되는 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드.

청구항 5.
제 2항 내지 제 4항중 어느 한 항에 따른 올리고뉴클레오티드를 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)의 프라이머로 이용하여 레트로바이러스 게놈 DNA 또는 RNA를 정량적으로 측정하는 레트로바이러스 농도 측정방법.

청구항 6.
제 5항에 있어서, 바이러스 게놈 DNA 또는 RNA의 정량적 측정은 RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction), 반정량적 (semi-quantitative) RT-PCR, QC-PCR (quantitative competitive PCR) 및 실시간 정량 PCR (real time quantitative PCR)로 구성된 군으로부터 선택된 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는 측정방법.

청구항 7.
제 6항에 있어서, 실시간 정량 PCR을 이용한 방법은
1) 레트로바이러스를 표적세포에 감염시키는 단계;
2) 바이러스가 감염된 표적세포의 게놈 DNA를 순수 분리하는 단계;
3) 상기 DNA를 주형으로 하고 서열번호 6 및 서열번호 11로 기재되는 염기서열을 갖는 프라이머 쌍을 사용하여 이를 증폭하는 단계; 및
4) 단위 표적세포 게놈 DNA 당 포함되어 있는 바이러스의 게놈 DNA의 양을 측정하여 바이러스의 농도를 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 측정방법.

청구항 8.
제 6항에 있어서, 실시간 정량 PCR을 이용한 방법은
1) 바이러스가 포함된 세포배양액 혹은 기타 용액으로부터 바이러스의 게놈 RNA를 추출¡분리하는 단계;
2) 역전사 효소를 이용하여 상기 RNA로부터 DNA를 합성하는 단계;
3) 상기 DNA를 주형으로 하고 서열번호 16 및 서열번호 17로 기재되는 염기서열을 갖는 프라이머 쌍을 사용하여 이를 증폭하는 단계; 및
4) 증폭된 결과를 정량적으로 분석하여 PCR의 주형인 시료 내 바이러스 게놈 RNA의 상대적인 양을 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 측정방법.

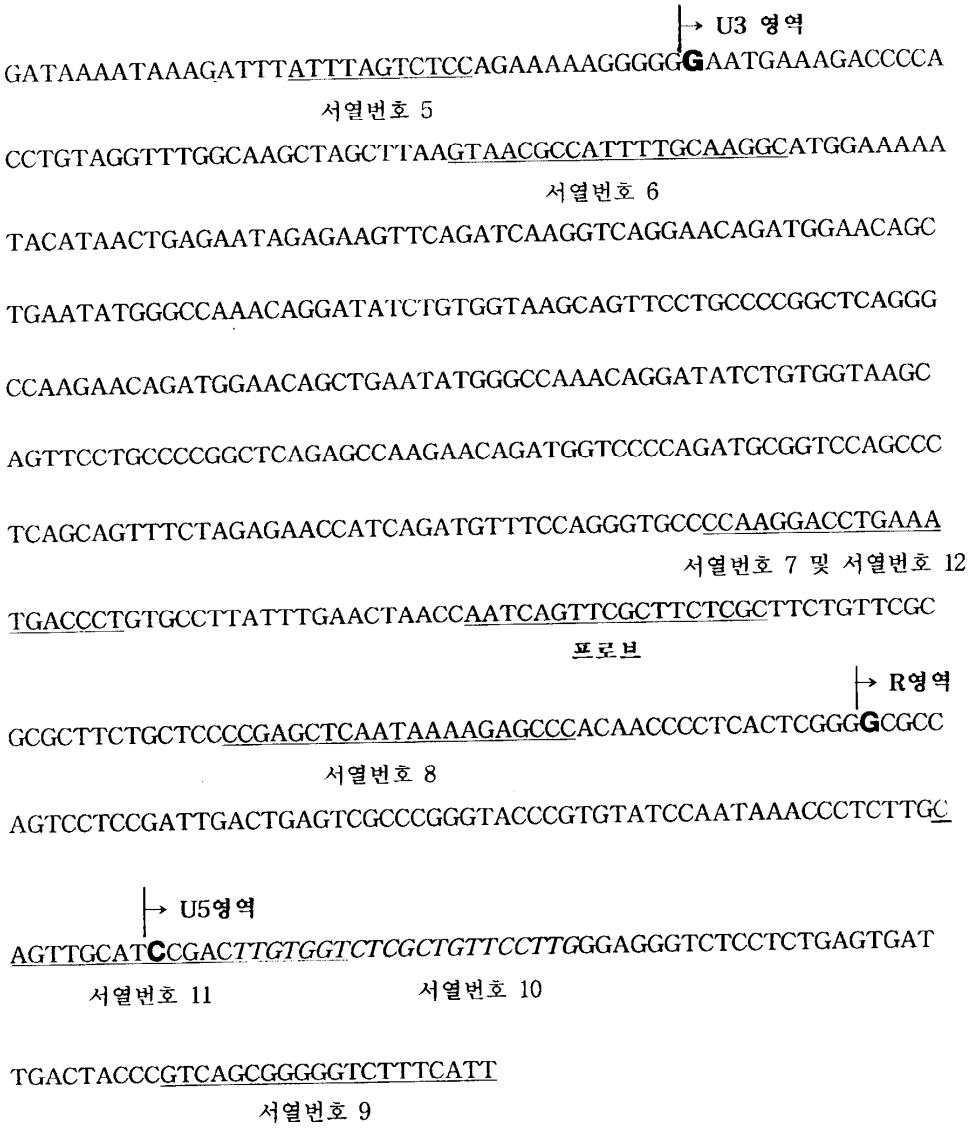
청구항 9.
제 7항 또는 제 8항에 있어서, 바이러스 게놈에 특이적인 프라이머에 더하여 5' 말단에는 리포터 염료 (reporter dye, R)가, 3' 말단에는 흡광 염료 (quencher dye, Q)가 이중으로 표지된 프로브 (probe)를 추가적으로 사용하는 것을 특징으로 하는 측정방법.

청구항 10.
제 9항에 있어서, 리포터 염료는 6-카복시플루오르세인 (6-carboxyfluorescein, FAM), 2',4',5',7'-테트라클로로-4,7-디클로로플루오르세인 (2',4',5',7'-tetrachloro-4,7-dichlorofluorescein, TET) 및 2',7'-디메톡시-4',5'-디클로

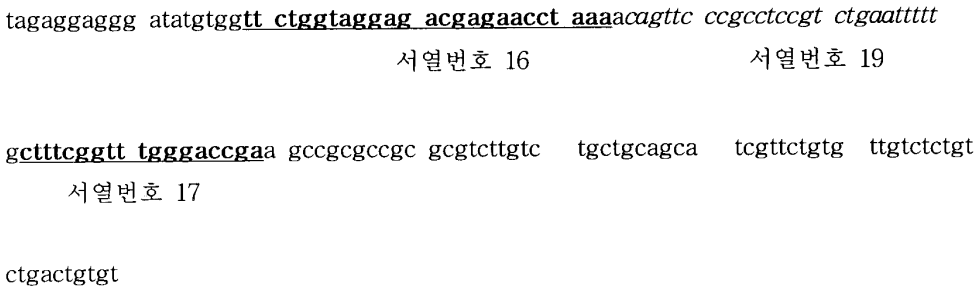
로-6-카복시로다민 (2',7'-dimethoxy-4',5'-dichloro-6-carboxyrhodamine, JOE)으로 구성된 군으로부터 선택되고, 흡광 염료는 6-카복시테트라메틸 로다민 (6-carboxytetramethyl rhodamine, TAMRA) 및 (4-디메틸아민)아조벤젠 설폰산 ([4-dimethylamine]azobenzene sulfonic acid, DABSYL)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 측정방법.

도면

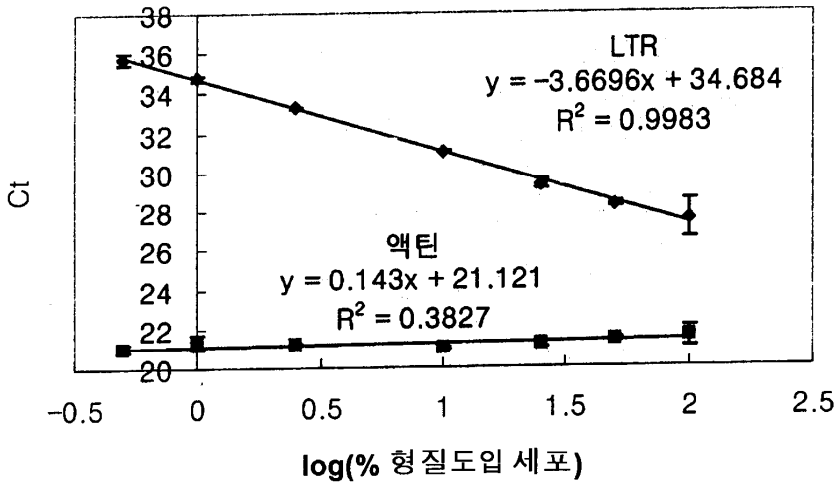
도면1



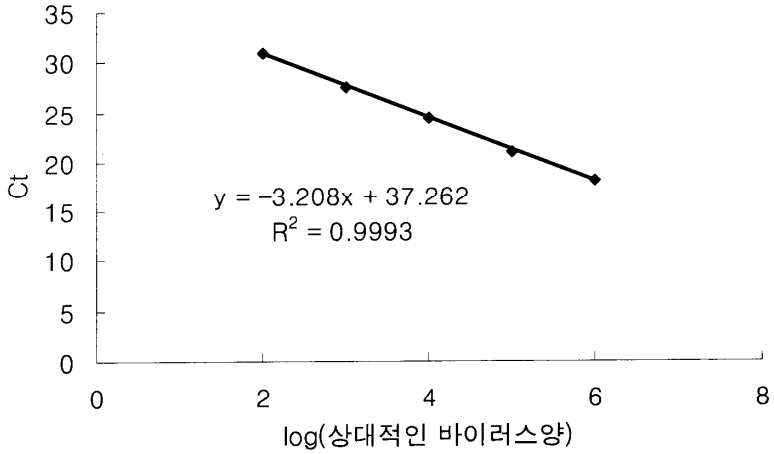
도면2



도면3



도면4



<110> ViroMed. Co. Ltd. <120> Oligonucleotide primers specific for retrovirus and a method for the quantitaion of retroviral titer using same <130> FPD/200103-0055 <160> 19 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 634 <212> DNA <213> Retrovirus 3' LTR <400> 1 gataaaataa agatttattt agtctccaga aaaaggggg aatgaaagac cccacctgta 60 ggtttggcaa gctagcttaa gtaacgccat tttgcaaggc atggaaaaat acataactga 120 gaatagagaa gttcagatca aggtcaggaa cagatggaac agctgaatat gggccaaaca 180 ggatatctgt ggtaagcagt tcctgccccg gctcagggcc aagaacagat ggaacagctg 240 aatatgggcc aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg ccccggctca gagccaagaa 300 cagatggtcc ccagatgcgg tccagccctc agcagtttct agagaaccat cagatgtttc 360 cagggtgccc caaggacctg aaatgaccct gtgccttatt tgaactaacc aatcagttcg 420 cttctcgctt ctgttcgcgc gcttctgctc cccgagctca ataaaagagc ccacaacccc 480 tcactcgggg cgccagtcct ccgattgact gagtcgcccg ggtacccgtg tatccaataa 540 accctcttgc agttgcatcc gacttgtggt ctcgctgttc cttgggaggg tctcctctga 600 gtgattgact acccgtcagc gggggtcttt catt 634 <210> 2 <211> 150 <212> DNA <213> packaging signal of Murine Leukemia Virus <400> 2 tagaggaggg atatgtggtt ctggtaggag acgagaacct aaaacagttc ccgcctccgt 60 ctgaattttt gctttcggtt tgggaccgaa gccgcgccgc gcgtcttgtc tgctgcagca 120 tcgttctgtg ttgtctctgt ctgactgtgt 150 <210> 3 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> specific forward primer for iduronidase <400> 3 ggatccgata tcagcacgcg tggccatgcg tcc 33 <210> 4 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> specific reverse primer for iduronidase <400> 4 ggatccagat cttcagcaca ggctcatgga ttg 33 <210> 5 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> oligonucleotide <400> 5 aaaggatcca tttagtctcc 20 <210> 6 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> oligonucleotide <400> 6 gtaacgccat tttgcaaggc 20 <210> 7 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> oligonucleotide <400> 7 ccaaggacct gaaatgaccc t 21 <210> 8 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> oligonucleotide <400> 8 ccgagctcaa taaaagagcc c

21 <210> 9 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> oligonucleotide <400> 9 gaattcaatg aaagaccccc gctgac 26 <210> 10 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> oligonucleotide <400> 10 caaggaacag cgagaccaca a 21 <210> 11 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> oligonucleotide <400> 11 accacaagtc ggatgcaact g 21 <210> 12 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> oligonucleotide <400> 12 agggtcattt caggtccttg g 21 <210> 13 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> double dye-labeled probe <220> <221> modified_base <222> (1) <223> binding to 6-carboxyfluorescein(FAM) <220> <221> modified_base <222> (28) <223> binding to 6-carboxytetramethyl rhodamine(TAMRA) <400> 13 aatcagttcg cttctcgctt ctgttcgc 28 <210> 14 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> forward primer for human beta-actin <400> 14 tcacccacac tgtgcccatc tacga 25 <210> 15 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> reverse primer for human beta-actin <400> 15 cagcggaacc gctcattgcc aatgg 25 <210> 16 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> oligonucleotide <400> 16 ttctggtagg agacgagaac ctaaa 25 <210> 17 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> oligonucleotide <400> 17 tcggtcccaa accgaaag 18 <210> 18 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> double dye-labeled probe for beta actin <220> <221> modified_base <222> (1) <223> binding to VIC <220> <221> modified_base <222> (26) <223> binding to 6-carboxytetramethyl rhodamine(TAMRA) <400> 18 atgccctccc ccatgccatc ctgcgt 26 <210> 19 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> double dye-labeled probe <220> <221> modified_base <222> (1) <223> binding to VIC <220> <221> modified_base <222> (26) <223> binding to 6-carboxytetramethyl rhodamine(TAMRA) <400> 19 cagttcccgc ctccgtctga attttt 26