

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. A61K 39/44 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년10월18일 10-0635870 2006년10월12일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호 (22) 출원일자 번역문 제출일자 (86) 국제출원번호 국제출원일자	10-2004-7015430 2004년09월24일 2004년09월24일 PCT/JP2003/003694 2003년03월26일	(65) 공개번호 (43) 공개일자  (87) 국제공개번호 국제공개일자	10-2004-0105815 2004년12월16일  WO 2003/082330 2003년10월09일
---	---	---	---

(30) 우선권주장	JP-P-2002-00097424 JP-P-2003-00045088	2002년03월29일 2003년02월21일	일본(JP) 일본(JP)
------------	--	----------------------------	------------------

(73) 특허권자      도꾸리쓰교세이호징 가가꾸 기쥬쓰 신키 기꼬  
                          일본 사이따마켄 가와구찌시 혼쵸 4쵸메 1방 8고

(72) 발명자      쿠로다슈니치  
                          일본 오사카후 카미야마다 수이타시, 7-C-104

                          타니자와카쓰유키  
                          일본 오사카후 토요노군 토요노쵸 기보우가오카, 2-30-2

                          콘도아키히코  
                          일본 효고켄 코베시 나다쿠, 신노하라오바노야마쵸, 1-2-806

                          우에다마사카주  
                          일본 도쿄도 신쥬쿠쿠 난도쵸, 6

                          세노마사하루  
                          일본 오카야마켄 오카야마시 카도타분카마치, 2-10-13

                          오카지마토시히데  
                          일본 오사카후 이케다시 이구치도, 3-3-1-301

(74) 대리인      김성남

심사관 : 임혜준

(54) 항체를 제시하는 단백질 중공 나노입자를 사용하는치료약제 및 단백질 중공 나노입자

요약

특정 세포 또는 조직에 대한 항체를 제시하는 단백질 중공 나노입자를 사용하는 치료약제로서, 동물 실험에 의해 실제로 치료 효과가 인정된 약제, 및 이 약제를 사용한 치료방법을 제공한다. 본 발명에 따른 약제는, 입자 형성능을 갖는 단백질

(예를 들면, 본래의 간 세포에 대하는 감염성을 결실하도록 돌연변이되고, 추가로 항체를 제시하도록 돌연변이된 B형 간염 바이러스 표면 항원 단백질)로 이루어진 중공 나노입자에, 질환치료용의 세포 도입 물질(예를 들면, 암치료용 유전자인 단순 헤르페스바이러스 유래 티미딘키나제 유전자)이 포함된 것이고, 추가로, 상기의 입자 표면에 특정의 암세포 표면에 존재하는 분자를 항원으로서 인식하는 암특이적 항체 등의 항체가 지시된 것이다.

**대표도**

도 10

**색인어**

단백질 중공 나노입자, 항체 제시, 입자 형성능을 갖는 단백질, 돌연변이, 결실, 질환치료용의 세포 도입 물질

**명세서**

**기술분야**

본 발명은 항체를 제시하는 단백질 중공 나노입자를 사용하는 치료약제 및 단백질 중공 나노입자에 관한 것이고, 더 상세하게는 특정의 세포 또는 조직에 대한 항체 등의 생체 인식 분자가 입자 표면에 제시되는 한편, 입자 내부에는 질환 치료용의 세포 도입 물질이 포함되어 있고, 이 세포 도입 물질을 특정 세포 또는 조직내에 특이적으로 도입가능한 약제 및 이 약제에 적합하게 이용될 수 있는 입자에 관한 것이다.

**배경기술**

근래, 의학 분야에 있어서, 환부에 직접 작용하여 높은 효과를 나타내는, 부작용이 적은 약품의 개발이 활발하게 이루어지고 있다. 특히, 약물 전달 시스템(DDS)으로 칭해지는 방법은, 목적 세포 또는 목적 조직에 대해서 특이적으로 약제 등의 유효 성분을 운반하고, 목적 개소에서 유효 성분을 작용시킬 수 있는 방법으로서 주목되고 있다.

또, 최근의 분자세포생물학의 분야에 있어서도 특정 세포로의 유전자 도입은 필요불가결한 기술로서 활발하게 연구되고 있다. 또한, 사람 게놈 계획의 진전에 의해 각종 질환의 유전적인 배경이 명확해져 가는 현재, 이러한 세포 및 조직에 대한 특이성이 높은 유전자 도입법이 확립된다면 유전자치료의 분야에서의 응용도 가능하게 된다.

세포에 유전자를 도입하는 방법으로서, 이제까지는, 유전자를 거대분자화해서 엔도사이토시스에 의해 유전자를 취입시키는 방법(인산 칼슘법, 리포펙타민법)이나, 전기펄스 자극에 의해 세포막에 구멍을 내어 유전자를 유입시키는 방법(일렉트로포레이션법, 유전자총법)이 공지되어 있고, 어느 것이든지 현재까지는 분자생물학적 실험에 있어서, 일반적으로 실시되고 있는 방법이다.

이들 방법은 간편하지만, 세포를 직접, 물리적으로 손상시키고, 유전자 도입부위를 외과적으로 노출시켜야 하기 때문에, 생체내부의 세포나 조직에는 용이하게 적용될 수 없다. 또, 100%에 가까운 도입율을 취득하는 것이 곤란하다.

한편, 안정성이 높은 물질 도입 방법으로서 리포솜법이 공지되고 있다. 이 방법은 세포를 손상시키는 일이 없기 때문에, 생체 내부의 세포나 조직에도 적용하는 것이 가능하다. 그러나, 단순한 지질인 리포솜에 고도한 세포 및 조직 특이성을 부여하는 것은 곤란하고, 또한, 생체내에서의 유전자 도입율은 요구되는 수치에 비해 매우 낮다고 하는 문제가 있다.

최근에 이르러, 바이러스 DNA에 목적 유전자를 조입하고, 감염성 바이러스를 생성시켜 유전자 도입을 행하는 기술이 개발되었다. 이 방법은 도입 부위를 노출시킬 필요없이 개체에도 응용될 수 있고, 도입 효율도 100%에 가까운 획기적인 방법으로서 주목되지만, 바이러스가 광범위한 세포에 비특이적으로 감염되기 때문에 목적 세포 이외에도 유전자가 도입되어 버린다고 하는 중대한 문제가 있다. 또, 바이러스 게놈 본체가 염색체에 조입되고, 장래 예기할 수 없는 부작용을 일으킬 가능성이 있기 때문에, 실제로는 질병의 초기 치료 등에는 사용되지 않고, 말기 환자에 적용되는데 그치고 있는 것이 현재 상황이다.

이와 같이, 종래의 유전자 도입방법은 어느것이나 목적 세포에 대해서 특이적으로 유전자를 운반도입하고, 세포내에서 약제가 되는 단백질을 발현시키는 방법으로서 불충분한 것이었다. 한편, 약제가 되는 단백질을 직접적으로 목적 세포, 또는 목적 조직으로 운반도입하는 방법에 대해서는 아직 유효한 방법이 개발되어 있지 않은 상황에 있다.

이상과 같은 상황을 감안하여, 본 발명자들은 국제공개번호 WO01/64930(공개일 2001년 9월 7일)의 국제출원(이하, 국제공개 「WO01/64930」으로 칭함) 및 일본 특허공개공보 특개 2001-316298(공개일 2001년 11월 13일)에 있어서, 입자 형성능을 갖는 단백질에 생체 인식 분자가 도입된 중공 나노입자를 사용하여, 목적하는 세포나 조직에, 물질(유전자, 단백질, 화합물 등)을 특이적이고 안전하게 운반, 도입하기 위한 방법을 제안하고 있지만, 이 방법을 사용한 특정 세포 또는 조직에 대한 질환(예를 들면 암) 치료용 약제의 개발 등이 되어야 하는 과제가 되어 있다. 특히, 특정의 암세포 또는 암조직 등에 대한 특이적 항체를 제시하는 약제의 개발은 이하과 같은 문제를 극복하는 일로부터도 중요한 과제중의 하나가 되어 왔다.

종래, 약제가 되는 단백질을, 목적으로 하는 세포나 조직에 특이적이고 안전한 운반, 도입하는 것이 곤란했기 때문에, 이러한 단백질 약제를 사용한 치료는 환자에게 큰 부담을 주어왔다.

예를 들면, 바이러스성 간염(특히 C형 간염)의 치료에는, 정맥 주사에 의해, 단백질 약제인 인터페론을 장기간 전신 투여하는 방법을 취해 왔다. 이 방법은 높은 치료효과가 인지됨에도 불구하고, 환부 이외에도 인터페놀이 작용하기 때문에, 투여할 때마다 고열, 탈모, 허탈감, 면역 반응 등의 부작용이 일어난다고 하는 문제를 갖고 있다.

또, 간세포 성장 인자는 간경변 치료에 유효한 것이 알려져 있지만, 정맥 주사로 완전 투여하면, 예측불가능한 부작용이 일어날 가능성이 있기 때문에, 카테테르에 의해 간장에 직접 투여하는 방법을 채용하고 있다. 그러나, 카테테르에 의한 투여를 위해서는, 수술이 필요하고, 장기간 치료에서는 환자에 부담이 되어 왔다.

본 발명은, 상기의 과제를 감안한 것으로서, 그 목적은 항체 등의 생체 인식 분자를 제시하는 단백질 중공 나노입자를 사용한 목적 세포나 조직에 특이적으로 작용하는 약제로서, 동물 실험에 따라 실제 치료 효과가 인정된 약제, 및 이 약제를 사용한 치료 방법, 또한 이들에 사용되는 중공 나노입자를 제공하는 것에 있다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명자들은 예의 검토를 거듭한 결과, 항체를 제시하는 단백질 중공 나노입자를 복수 작제하는데 성공하고, 또한 그 중에서 사람 편평상피암세포에 대한 특이적인 항체를 제시하는 중공 나노입자에 암치료 유전자를 포함시킨 약제를, 실험 동물에 대해서 정맥 주사에 의해 투여한 경우, 실제로 이식암을 치료하는 효과가 있다는 것을 밝혀내어, 본 발명을 완성시키는데 이르렀다.

즉, 본 발명에 따르는 약제는 특정의 세포 또는 조직에 대한 항체가 제시되고, 입자 형성을 갖는 단백질로 이루어진 중공 나노입자에, 질환 치료용의 세포 도입 물질이 포함되어 이루어진 약제이다.

상기 「입자 형성능을 갖는 단백질」로서는, 예를 들면 본래의 간세포에 대한 감염능을 결실하게 되도록 돌연변이시키고, 추가로 항체를 제시하도록 돌연변이된 B형 간염 바이러스 표면 항원 단백질을 들 수가 있다. 이 단백질은, 진핵세포에서 발현되면, 소포체막 위에 막단백질로서 발현, 축적되어, 입자로서 방출된다. 이렇게 수득된 중공 나노입자는, 입자 표면에 항체가 제시되고 있기 때문에, 특정한 세포 또는 조직에 대해서 특이적으로 입자내의 물질을 운반하는 것이 가능하다. 여기서, 「특정의 세포 또는 조직」이라고 하는 것은, 상기 항체에 대한 항원을 세포 표면에 갖고 있기 때문에, 항체와 항원과의 결합을 개입시켜, 상기 중공 나노입자내의 물질이 세포내에 도입될 수 있는 세포, 또는 이러한 세포로부터 구성된 것으로 동물질이 조직내에 도입될 수 있는 조직을 말한다.

B형 간염 바이러스 표면 항원 단백질의 preS 영역(preS1, preS2)은, HBV가 간세포에 결합하는 경우에 각각 중요한 역할을 다하고 있다. 따라서, preS 영역의 아미노산의 일부를 결실하도록 돌연변이시키면, 본래의 간세포에 대한 감염능을 결실하도록 돌연변이되는 것이 가능하다. 이에 따라, 간세포 이외의 세포나 장기로도, 그 내부의 물질을 도입하는 것이 가능하다.

preS 영역의 아미노산의 일부를 결실시켜 간세포에 대한 감염능을 결실하도록 돌연변이시키는 경우, 결실된 아미노산 영역에 따라서, 진핵세포에서의 돌연변이된 B형 간염 바이러스 표면 항원 단백질의 발현량이 달라진다. 이 단백질의 진핵세포에서의 발현량은, 항체를 제시하도록 돌연변이시킨 경우에, 특히 저하하는 경향이 있다.

따라서, 종래의 실시예에 나타난 바와 같이, 진핵세포에서의 발현량을 많게 하기 위해서는, preS 영역(preS1, preS2 영역)의 전체 아미노산 서열 중, 혈청형 y 타입의 경우는, 적어도 N 말단으로부터 1번째 내지 20번째 아미노산 잔기를 보유하도록 돌연변이시키는 것이 바람직하고, 추가로, preS 영역의 전체 아미노산 서열 중, N 말단으로부터 50번째 내지 153

번째의 아미노산을 결실하도록 돌연변이시키는 것이 더 바람직하다. 한편, 혈청형 d 타입의 경우는, 적어도 N 말단으로부터 12번째 내지 31번째 아미노산 잔기를 보유하도록 돌연변이시키는 것이 바람직하고, 추가로, preS 영역의 전체 아미노산 서열 중, N 말단으로부터 61번째 내지 164번째의 아미노산을 결실하도록 돌연변이시키는 것이 더 바람직하다.

이에 따라, 간세포에 대한 감염능을 결실하고, 추가로 항체를 제시하도록 돌연변이시킨 B형 간염 바이러스 표면 항원 단백질이, 진핵세포에서 대량으로 발현된다. 그 결과, 이러한 단백질내의 물질이 특정 세포 또는 조직에 보다 많이 운반되기 때문에, 그 물질에 의한 치료 효과를 비약적으로 상승시키는 것이 가능하다.

상기 항체로서는, 암특이적 항체 또는 항바이러스성 단백질 항체를 들 수 있다. 예를 들면, 암특이적 항체를 제시한 중공 나노입자에, 암을 치료하기 위한 물질(약제)을 포함시킴으로써, 암세포에 대해 특이적이고 효과적으로 유효한 치료약이 된다. 한편, 항바이러스성 단백질 항체를 제시한 경우는 바이러스 감염 세포의 제거에 유효하다.

상기 항체로서는, 일본쇄 항체와 이분쇄 항체를 들 수 있다. 이분쇄 항체는, 그 구조에 기인하여 입자 형성능을 갖는 단백질과 직접 융합한 형태로 입자 표면에 제시시키는 것이 곤란하다. 그래서, 본 발명자들은, 이 이분쇄 항체를 상기 단백질에 간접적으로 결합시킴으로써, 중공 나노입자의 표면에 제시시키는 것에 성공하였다. 구체적으로는, 상기 단백질에, 상기 이분쇄 항체를 갖는 Fc 부위와 특이적으로 결합하는 ZZ 태그를 도입(융합)하고, 이 ZZ 태그와 상기 Fc 부위를 결합시킴으로써 이분쇄 항체를 입자 표면에 제시시키는 것이 가능하다. 또, 상기 단백질에, 스트렙트아비딘(또는 이의 유도체)와 특이적으로 결합하는 스트렙태그를 도입(융합)하고, 이 스트렙태그와 스트렙트아비딘(또는 이의 유도체)와를 결합시키고, 추가로, 스트렙트아비딘(또는 이의 유도체)와 특이적으로 결합하는 비오틴으로 수식된 일본쇄 항체를 결합시킴으로써, 항체를 입자 표면에 제시시키는 것이 가능하다. 한편, 일본쇄는 상기 단백질과 직접 융합되는 형태로 발현시킴으로써, 입자 표면에 제시시키는 것이 가능하다.

항체를 입자 표면에 제시시키는 방법으로서, 상기 각 방법 이외에, 일반적인 화학 수식에 의한 항체와 입자와의 결합법도 가능하다.

또, 상기 단백질로 이루어진 중공 나노입자는, 진핵세포에서 발현됨으로써수득되는 것이 바람직하고, 이 진핵세포로는 효모, 곤충 세포, 또는 포유 동물 등의 동물 세포를 들 수 있다.

상기 중공 나노입자내에 포함된 세포 도입 물질로서는, 예를 들면 암치료용의 유전자를 들 수 있지만, 암치료용 유전자로서, 단순 헤르페스바이러스 유래 티미딘키나제(HSV1 tk) 유전자를 포함시킨 약제를 사용한 경우는, 후술의 실시예에 나타낸 바와 같이, 별도 간세포클로비르를 투여한다.

본 발명의 약제는, 정맥 주사라고 하는 간단한 방법으로 특정의 세포 및 조직에 있어서의 질환을 효과적으로 치료할 수 있고, 종래의 질환의 치료방법과 크게 상이하고, 다량의 약제의 투여 또는 유전자 치료 등에 있어서 외과 수술을 필요로 하지 않고, 부작용의 염려도 극히 적어, 그대로 임상응용 가능한 것이다.

본 발명의 치료방법은, 본 발명의 약제를 투여함에 의한 질환의 치료방법이다.

본 발명의 중공 나노입자는, 입자 형성능을 갖는 동시에, pre-S 영역의 전체 아미노산 서열 중, 적어도 N 말단으로부터 1번째 내지 20번째 아미노산 잔기를 보유하도록 돌연변이시킨 혈청형 y 타입의 B형 간염바이러스 표면 항원 단백질로 이루어진 것을 특징으로 하고, 바람직하게는, 추가로, pre-S 영역의 전체 아미노산 서열 중, N 말단으로부터 50번째 내지 153번째의 아미노산을 결실하도록 돌연변이되어 있는 것을 특징으로 하고 있다.

본 발명의 다른 중공 나노입자는, 입자 형성능을 갖는 동시에, pre-S 영역의 전체 아미노산 서열 중, 적어도 N 말단으로부터 12번째 내지 31번째 아미노산 잔기를 보유하도록 돌연변이시킨 혈청형 d 타입의 B형 간염바이러스 표면 항원 단백질로 이루어진 것을 특징으로 하고, 바람직하게는, 추가로, pre-S 영역의 전체 아미노산 서열 중, N 말단으로부터 61번째 내지 164번째의 아미노산을 결실하도록 돌연변이시키는 것을 특징으로 하고 있다.

이러한 중공 나노입자는 진핵세포에 있어서 특히 발현량이 많고, 생체 인식 분자 제시에 적합한데, 예를 들면, 유전자 치료나 DDS 등에 사용하는 중공 바이오토포입자로서 이용하는 것이 가능하다.

본 발명의 추가의 다른 목적, 특징, 및 우수한 점은, 이하에 나타낸 기재에 의해 충분히 알 수 있을 것이다. 또, 본 발명의 이익은 첨부 도면을 참조로한 다음의 설명으로 명백해 질 것이다.

**도면의 간단한 설명**

- 도 1은 본 발명의 실시예에서, HBsAg 유전자의 각 단백질 영역을 나타내는 개략 모식도이다. 1 내지 8은 표면 항원에 있어서의 각 부위의 작용을 도시하고 있다. 혈청형 y형은 Pre-S1이 108 아미노산 잔기, 혈청형 d형은 Pre-S1이 119 아미노산 잔기이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예에 있어서의 유전자재조합 효모를 사용한 HBsAg 입자의 발현 및 정제조작을 예시한 개략 설명도이다. (a) 유전자재조합 효모의 작제, (b) High-Pi 배지에 있어서의 배양, (c) 8S5N-P400 배지에 있어서의 배양, (d) 과쇄, (e) 밀도구배 원심분리, (f) HBsAg 입자.
- 도 3은 본 발명의 실시예에 있어서의 효모를 사용한 HBsAg-streptag 입자 제조용 플라스미드의 제작공정을 도시한 도이다.
- 도 4는 본 발명의 실시예에 있어서의 곤충 세포를 사용한 HBsAg-streptag 입자 제조용 플라스미드의 제작공정을 도시한 도이다.
- 도 5는 본 발명의 실시예에 있어서의 동물 세포를 사용한 HBsAg-streptag 입자 제조용 플라스미드의 제작공정을 도시한 도이다.
- 도 6은 본 발명의 실시예에 있어서의 효모를 사용한 HBsAg-ZZtag 입자 제조용 플라스미드의 제작공정을 도시한 도이다.
- 도 7은 효모를 사용하여 수득한 상기 HBsAg-ZZtag 입자에 대한 SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅(Western Blotting)의 결과를 도시한 도이다.
- 도 8은 본 발명의 실시예에 있어서의 곤충 세포를 사용한 HBsAg-ZZtag 입자 (또는 일본쇄 항체 A22 또는 3A21을 제시하는 HBsAg-scFv 입자) 제조용 플라스미드의 제작공정을 도시한 도이다.
- 도 9는 본 발명의 실시예에 있어서의 동물 세포를 사용한 HBsAg-ZZtag 입자 (또는 일본쇄 항체 A22 또는 3A21을 제시하는 HBsAg-scFv 입자) 제조용 플라스미드의 제작공정을 도시한 도이다.
- 도 10은 본 발명에 따르는 약제로서 상기 HBsAg-ZZtag 입자를 사용하여, 실험 동물에서 행한 치료 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 11은 상기 HBsAg-scFv 입자에 대한 SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅의 결과를 도시한 도이다.
- 도 12는 본 발명의 실시예에 있어서의 결실형 HBsAg 단백질 발현 유전자를 나타내는 개략모식도이다.
- 도 13은 본 발명의 실시예에 있어서의 PCR법의 반응 조성을 나타낸 도이다.
- 도 14는 본 발명의 실시예에 있어서의 PCR 사이클을 나타낸 도이다.
- 도 15는 본 발명의 실시예에 있어서의 결실형 HBsAg 단백질 발현 유전자와, 그 유전자를 조입한 플라스미드를 나타낸 개략모식도이다.
- 도 16(a)(b)는 본 발명의 실시예에 있어서의 동물 세포에서의 결실형 HBsAg 단백질의 효소 면역 측정의 결과를 나타낸 그래프이고, 도 16(a)는 배지 상층, 도 16(b)는 세포 내부에서의 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 17은 도 16(a)(b)의 결과 데이터를 나타낸 도이다.
- 도 18은 도 16(a)(b)에서의 발현시킨 결실형 HBsAg 단백질의 SDS-PAGE의 결과를 나타낸 도면이고, (a)는 배지 상층, (b)는 세포 내부에서의 결과이다.

도 19는 도 16(a)(b)에서의 발현시킨 결실형 HBsAg 단백질의 웨스턴 블로팅의 결과를 나타낸 도면이고, (a)는 배지 상층, (b)는 세포 내부에서의 결과이다.

도 20은 본 발명의 실시예에 있어서의 효모에 도입하는 결실형 HBsAg 단백질 발현 유전자와, 그 유전자를 조입한 플라스미드를 나타낸 개략모식도이다.

도 21은, 도 20의 플라스미드를 사용한 경우의 결실형 HBsAg L 단백질 발현을 확인하기 위한 도면이고, 효소 면역 측정의 데이터를 나타내는 도이다.

도 22는, 도 20의 플라스미드를 사용한 경우의 결실형 HBsAg L 단백질 발현을 확인하기 위한 도면이고, 효소 면역 측정의 결과를 나타낸 그래프이다.

도 23은 본 발명에 따른 세포 도입 물질의 예를 도시한 도이다.

도 24는 본 발명에 따른 세포 도입 물질의 예를 도시한 도이다.

도 25는 본 발명에 따른 세포 도입 물질의 예를 도시한 도이다.

도 26은 본 발명에 따른 세포 도입 물질의 예를 도시한 도이다.

도 27은 본 발명에 따른 약제에 대해서, 실험 동물에서 행한 치료 효과를 나타내는 표이다.

#### 발명을 실시하기 최량의 형태

본 발명의 약제를 구성하는 중공 나노입자는, 생체 인식 분자(환원하면, 특정의 세포를 인식하는 분자)로서 입자 표면에 항체가 제시되고, 입자 내부에 질환 치료용의 세포 도입 물질이 포함됨으로써, 목적 세포 또는 목적 조직에 특이적으로 물질을 운반하는 것이 가능하다. 상기 중공 나노입자는, 입자 형성능을 갖는 단백질로부터 형성되는 것이 가능하고, 이러한 입자 형성능을 갖는 단백질로서는, 각종의 바이러스로부터 수득된 서브바이러스 입자를 적용하는 것이 가능하다. 구체적으로는, B형 간염바이러스(Hepatitis B Virus: HBV) 표면 항원 단백질 등이 예시된다.

또, 이러한 입자 형성능을 갖는 단백질로부터 이루어진 단백질 입자로서는, 진핵세포에서 단백질을 발현시킴으로써 수득된 것을 들 수 있다. 물론, 진핵세포에서의 입자 형성능을 갖는 단백질을 발현시키면, 동 단백질은, 소포체 막상에 막단백질로서 발현, 축적되어, 입자로서 방출되는 것이다. 이 경우, 진핵세포로서는, 효모, 곤충 세포 또는 포유 세포 등의 동물 세포 등이 적용될 수 있다.

본 발명자들은 후술하는 실시예에 나타낸 바와 같이, 유전자재조합 효모에서의 상기 HBV 표면 항원 L 단백질을 발현시킴으로써, 발현된 HBV 표면 항원 L 단백질로부터 효모 유래의 지질 이중막의 동 단백질이 매립된 단경 약 20nm, 장경 약 150nm의 지렛대원모양 중공 입자가 형성된 것을 밝혀내고, 보고되어 있다(J. Biol. Chem., Vol. 267, No. 3, 1953-1961, 1992). 이러한 입자는 HBV 계통을 전혀 함유하지 않기 때문에, 바이러스로서는 기능하지 않고, 인체로의 안정성이 극히 높다. 또, 상기, HBV 표면 항원 L 단백질을, 본래의 간세포에 대한 감염능을 결실하도록 돌연변이시키고, 추가로 항체(예를 들면, 암특이적 항체)를 입자 표면에 제시하도록 돌연변이시켜 발현시킨 경우는 항체를 입자 표면에 제시하고 있기 때문에 그 항체에 대한 항원을 세포 표면에 갖는 세포 또는 조직(암 특이적 항체를 제시시킨 경우는, 암 세포 또는 암 조직)에 대해 특이적으로 물질을 운반하는 운반체로서의 효과도 높다.

HBV 표면 항원 L 단백질의 preS 영역(preS1, preS2)은, HBV가 간세포에 결합하는 경우에, 각각 중요한 역할을 하고 있다(도 1 참조). 따라서, preS 영역의 아미노산 일부를 결실하도록 돌연변이시키면, 본래의 간 세포에 대한 감염능을 결실하도록 돌연변이시키는 것이 가능하다. 여기서, 「preS 영역의 아미노산 일부를 결실」이라고 하는 것은, preS1 영역의 아미노산 일부, preS2 영역의 아미노산 일부, 또는 이들 둘 다의 영역의 아미노산 일부를 결실시키는 것을 의미한다. 예를 들면, 사람 간세포 인식부위로서 공지되어 있는 preS 영역(더 상세하게는 preS1 영역)의 N 말단으로부터 3번째 내지 66번째(혈청형 y 타입) 또는 14번째 내지 77번째(혈청형 d 타입) 아미노산을 결실시킴으로써, 간세포에 대한 감염능을 결실시키는 것이 가능하다.

preS 영역의 아미노산의 적어도 일부를 결실시켜 간세포에 대한 감염능을 결실하도록 돌연변이시키는 경우, 결실된 아미노산 영역에 따라서, 진핵세포에서의 돌연변이된 B형 간염 바이러스 표면 항원 단백질의 발현량이 상이하다. 당해 단백질의 진핵세포에서의 발현량은, 항체를 제시하도록 돌연변이시킨 경우, 특히 저하하는 경향이 있다.

따라서, 후술하는 실시예에 나타난 바와 같이, preS 영역의 아미노산을 도메인 단위에서 결실시킴으로써, 돌연변이된 B형 간염 바이러스 표면 항원 단백질을 진핵세포에서 대량으로 발현시키는 것이 가능하다. 구체적으로는, 전술한 바와 같이 사람 간세포 인식부위로서 공지되어 있는 preS1 영역의 N 말단으로부터 3번째 내지 66번째(혈청형 y 타입) 또는 4번째 내지 77번째(혈청형 d 타입) 아미노산을 결실시킴으로써, 진핵세포에서의 발현량이 많아지도록 하는 것이 가능하다. 또한, 혈청형 y 타입의 경우는, 적어도 N 말단으로부터 1번째 내지 20번째 아미노산 잔기를 보유하도록 돌연변이, 혈청형 d 타입의 경우는, 적어도 N 말단으로부터 12번째 내지 31번째 아미노산 잔기를 보유하도록 돌연변이시킬 수 있다.

추가로, 발현량이 많아지도록 하는 데는, preS1 영역중에 상기 사람 간세포 인식부위의 일부 아미노산이외에, preS2 영역의 아미노산 일부를 결실시키는 것이 바람직하다.

더 상세하게는, preS 영역(preS1 및 preS2 영역)의 전체 아미노산 서열 중, 혈청형 y 타입의 경우는, pre-S 영역의 전체 아미노산 서열 중, N 말단으로부터 50번째 내지 153번째 아미노산을 결실하도록 돌연변이시키는 것이 바람직하고, 추가로, 적어도 N 말단으로부터 1번째 내지 20번째 아미노산 잔기를 보유하도록 돌연변이시키는 것이 더 바람직하다. 예를 들면, 혈청형 y 타입의 경우는, 후술하는 실시예에 나타난 바와 같이, pre-S 영역의 전체 아미노산 서열 중, N 말단으로부터 153번째 아미노산으로부터 도메인 단위에서 아미노산을 결실시킨, 50번째 내지 153번째, 33번째 내지 153번째, 및 21번째 내지 153번째의 아미노산을 결실하도록 돌연변이시키는 것이 바람직하고, 이 중에서 50번째 내지 153번째의 아미노산을 결실하도록 돌연변이시키는 것이 특히 바람직하다. 또한, 아미노산을 결실시키는 범위는 이에 한정되는 것은 아니다.

한편, 혈청형 d 타입의 경우는, preS 영역(preS1 및 preS2 영역)의 전체 아미노산 서열 중, pre-S 영역의 전체 아미노산 서열 중, N 말단으로부터 61번째 내지 164번째 아미노산을 결실하도록 돌연변이시키는 것이 바람직하고, 추가로, 적어도 N 말단으로부터 12번째 내지 31번째 아미노산 잔기를 보유하도록 돌연변이시키는 것이 더 바람직하다.

이렇게하여, 간세포에 대한 감염능을 결실시키고, 추가로 항체를 제시함으로써 돌연변이된 B형 간염 바이러스 표면 항원 단백질은, 진핵세포에서 대량으로 발현하기 때문에 생산성에 있어서 매우 유리하다. 그 결과, 당해 단백질내의 물질이 특정의 세포 또는 조직에 의해 많이 운반되기 때문에, 그 물질에 의한 치료 효과를 비약적으로 상승시키는 것이 가능하다.

이와 같이 유전자재조합 효모를 사용하여 단백질 입자를 형성하는 방법은 균체내의 가용성 단백질로부터 고효율로 입자가 생성된다는 점에서 적합하다.

한편, 곤충세포는 유전자재조합 효모보다도 고등 동물에 가까운 진핵세포라고 말할 수 있고, 효모에서는 재현되지 않는 당쇄 등의 고차원 결실 구조까지도 재현시킬 수 있다는 점에서 이종 단백질의 대량 생산에 있어서 바람직한 방법으로 칭해진다. 종래 곤충 세포의 계는 바쿨로바이러스(baculovirus)를 사용한 계이고, 바이러스 발현을 수반한 것이었기 때문에, 단백질 발현에 있어서, 세포가 사멸하기도 하고 용해하기도 하였다. 따라서, 단백질 발현을 연속적으로 행하기도 하고, 사멸 세포로부터 유리된 프로테아제에 의해 단백질이 분해하기도 한다는 문제가 있었다. 또, 단백질을 분비발현시킨 경우에는, 배지중에 함유된 대량의 소태아혈청이 혼입하는 것으로, 절각배지중에 분비시켜도 정제가 곤란하였다. 그러나, 최근에 이르러, 바쿨로바이러스를 개입하지 않은 곤충세포계이고, 무혈청배양가능한 것이, 인비트로젠(Invitrogen)사에 의해 개발되고 시판되고 있다. 따라서, 이러한 곤충세포를 사용하면, 정제가 용이하고 고차원 결실 구조까지도 재현시킨 단백질 입자가 수득된다.

본 발명의 단백질 중공 나노입자에서는, 이상과 같은 각종 방법에 의해 수득된 입자 표면에 항체를 제시하고 각종의 물질(DNA, RNA, 단백질, 펩타이드, 및 약제 등)을 입자내에 도입함으로써, 그 항체에 대응하는 항원을 세포표면에 갖는 세포에 극히 높은 특이성으로 물질을 운반, 도입하는 것이 가능하다.

물론, 입자 형성능을 갖는 단백질은, 상기의 돌연변이된 B형 간염바이러스 표면 항원 단백질에 한정되지 않고, 동물 세포, 식물 세포, 바이러스, 균류 등에 유래한 천연 단백질이나, 각종의 합성 단백질 등이 고려된다. 또, 예를 들면 바이러스 유래의 항원 단백질 등이 생체내에 있어서 항체를 야기하는 가능성이 있는 경우 등은, 돌연변이시켜 항원성을 감소시킨 것을 입자 형성능을 갖는 단백질로서 사용할 수도 있다. 예를 들면, 입자 형성능을 갖는 단백질로서는, 국제공개 WO01/64930에 개시된 항원성을 감소시킨 B형 간염 바이러스 표면 항원 단백질일 수도 있고, 당해 국제출원에 개시된 다른 돌연변이형 단백질(B형 간염 바이러스 표면 항원 단백질을, 유전자 조작 기술을 사용하여 돌연변이시킨 단백질)일 수도 있다.

상기 입자 표면에 제시되는 항체로서는, 특정의 세포 표면에 존재하는 분자를 항원으로서 인식하는 것이라면 특별히 제한되지 않고, 예를 들면, 특정의 암 세포 표면에 존재하는 분자를 항원으로서 인식하는 암특이적 항체, 특정의 세포표면에 존재하는 성장 인자 수용체나 사이토카인 수용체 등의 수용체를 항원으로서 특이적으로 인식하는 항체, 그 외의 세포 표면 항원, 조직 특이적 항원 등에 대한 항체 등이 예시된다. 더 구체적으로는, 후술하는 실시예에 있어서 사용된 각 항체 이외에 항 바이러스성 단백질 항체 등을 들 수 있다. 이 중에서, 어느 항체를 제시하는가는, 목적하는 세포 또는 조직에 따라서 적절히 선택할 수 있다.

본 발명에서는 상술한 바와 같은 단백질 중공 나노입자에, 목적의 세포 또는 조직에 도입한 물질(세포 도입 물질)을 내포시킴으로써, 세포특이성을 갖는 물질운반체(약제)가 수득된다. 이 물질운반체에 내포된 세포도입물질이라고 하는 것은 예를 들면, DNA, RNA 등의 유전자, 천연 또는 합성 단백질, 올리고뉴클레오타이드, 펩타이드, 약제, 천연 또는 합성 화합물 등, 어떠한 것도 가능하다.

구체적으로는, 이미 발명자에 의해 보고된 사람 RNAase 1(Jinno H, Ueda M, Ozawa S, Ikeda T, Enomoto K, Psarras K, Kitajima M, Yamada H, Seno M *Life Sci.* 1996; 58(21): 1901-8) 또는 RNAase 3(별명 ECP: eosinophil cationic protein; Mallorqui-Fernandez G, Pous J, Peracaula R, Aymami J, Maeda T, Tada H, Yamada H, Seno M, de Llorens R, Gomis-Ruth FX, Coll M; *J Mol Biol.* 2000 Jul 28;300(5):1297-307.) 등이 적용된다.

이들 단백질 등은, 세포내외에 작용하여 세포상해 활성을 갖는 것이지만, 이들의 RNAase를 본 발명의 물질운반체(약제)에 내포시켜 운반함으로써 세포외에서는 무독화하는 한편, 세포내에서만 작용시키는 것이 가능하기 때문에 부작용이 더 적은 신규한 암 치료방법으로서 기대된다.

또, 상기 세포도입물질로서, 그밖에 도 23 내지 도 26에 나타낸 단백질 또는 당해 단백질을 암호화한 유전자를 들 수 있고, 추가로, 암억제 유전자류(p53 등)나, 인터페론류, 인터로킨류, 사이토카인류, 콜로니자극인자류, 종양괴사인자류, 형질 전환 증식인자  $\beta$ 류, 혈소판 유래 증식인자류, 에리쓰로포이에틴류, Fas 항원류 등의 단백질 또는 당해 단백질을 암호화하는 유전자도 들 수 있다.

또, 이들 세포도입물질을 상기 중공 나노입자에 도입하는 방법로서는 통상의 화학적, 분자생물학적 실험방법에서 사용되는 각종 방법이 적용된다. 예를 들면, 일렉트로포레이션법, 초음파법, 단순확산법 또는 전하를 갖는 지질을 사용하는 방법 등이 예시된다.

또, 이들 단백질 중공 나노입자, 또는 물질운반체를 사용하여, 생체내 또는 실험관내에서 세포, 또는 조직에 특이적으로 물질을 도입하는 것이 가능하게 된다. 추가로는, 상기 RNAase를 사용한 예와 같이, 이상과 같이 단백질 중공 나노입자나 물질운반체를 사용하고, 특정 세포 또는 조직에 물질을 도입하는 것을 각종 질환의 치료법 또는 치료법의 1 단계로서 행하는 것도 가능하게 된다.

본 발명에 따르는 약제에 있어서, 상기 항체를 입자 표면에 제시된 방법으로서, 후술한 실시예에 도시한 바와 같이, ① 입자 형성능을 갖는 단백질에, 이본쇄항체를 갖는 Fc 부위와 특이적으로 결합하는 ZZ 태그를 도입하고(환원하면, 입자 형성능을 갖는 단백질과 ZZ 태그와를 융합시킨 형태로 발현시켜 입자를 형성하고), 이 ZZ 태그를 상기 Fc 부위와를 결합시킴으로써, 이본쇄 항체를 입자 표면에 제시시키는 방법, ② 입자 형성능을 갖는 단백질에, 스트렙타아비딘과 특이적으로 결합하는 스트렙태그를 도입하고(환원하면, 입자 형성능을 갖는 단백질과 스트렙태그와를 융합시킨 형태로 발현시켜 입자를 형성하고), 이 스트렙태그와 스트렙타아비딘(또는 이의 유도체)와를 결합시키고, 추가로, 스트렙타아비딘(또는 이의 유도체)와를 특이적으로 결합시킨 비오틴으로 수식된 이본쇄 항체를 결합시킴으로써, 항체를 입자표면에 제시시키는 방법, ③ 입자 형성능을 갖는 단백질과 이본쇄 항체와를 융합시킨 형태로 발현시킨 입자를 형성시킴으로써, 항체를 입자표면에 제시하는 방법, 또는 ④ 일반적인 가교시약(예를 들면, NHS(N-hydroxysuccinimide)기, Maleimide기, Imidoester기 등을 갖는 화합물. 피어스(PIERCE)사로부터 입수가 가능)을 사용하여, 화학적으로 항체와 입자와를 결합하는 방법 등을 들 수 있고, 추가로, 이들 각각의 방법의 원리를 이용하면서, 그 일부를 변경시킨 변경방법 등을 사용할 수도 있다.

본 발명의 약제에 의한 치료효과에 대해서는, 후술하는 실시예에 나타낸 바와 같이, 동물실험에 의해 실제로 확인되었다. 이 실시예에서는, 사람 편평상피암 유래의 세포를 이식한 누드 래트에 대해서, 이 암세포가 발현하는 상피 성장 인자 수용체(EGF 수용체)를 항원으로서 인식하는 항체를 입자표면에 제시하고, 단순 헤르페스바이러스 유래 티미딘키나제(HSV1 tk) 유전자를 포함시킨 본 발명의 약제를 투여하고, 추가로 간씨클로비르(ganciclovir: GCV)를 투여한 후, 이식된 암조직의 크기를 관찰함으로써 치료효과를 확인하였다. 약제의 투여는 정맥내 투여에 의해 행하였지만, 투여방법으로서는 이외에 경구 투여, 근육내 투여, 복강내 투여, 피하 투여등을 들 수 있다.



이하, 첨부된 도면과 관련하여 실시예를 예시하고, 본 발명의 실시의 형태에 대해서 추가로 상세히 설명한다. 물론, 본 발명은 이하의 예에 한정되는 것이 아니고, 세부에 대해서는 다양한 양태가 가능한 것은 말할 나위도 없다.

또, 실시예에 나타낸 바와 같이, 결실형 HBV 표면 항원 L 단백질의 preS1 영역에 단백질을 조입하는 기술, 진핵세포에서의 고발현에 적합한 결실형 HBV 표면 항원 L 단백질을 제작하는 기술, 당해 결실형 HBV 표면 항원 L 단백질에 제시를 목적으로하여 생체 인식분자(항체)를 조입하는 기술, 및 이를 사용한 유전자치료나 DDS에 응용하는 기술에 대해서는, 전혀 공지되어 있지 않고, 본원 발명자들이 독자적으로 개발한 기술이다.

### 실시예

이하의 실시예에 있어서, HBsAg라고 하는 것은, B형 간염 바이러스 표면 항체(Hepatitis B virus surface Antigen)를 나타낸다. HBsAg는 HBV의 외피 단백질이고, 도 1의 모식도에 나타낸 바와 같이, HBsAg에는 S 단백질, M 단백질, L 단백질의 3 종류가 있다. 이들 중, S 단백질은 3종의 단백질에 공통되는 중요한 외피 단백질이고, M 단백질은 S 단백질의 N 말단측에 55 아미노산(pre-S2 peptide)가 부가된 것이다. 또, L 단백질은 M 단백질의 N 말단측에 108(혈청형 y 타입) 또는 119(혈청형 d 타입) 아미노산(pre-S1 peptide)가 부가된 것이다. 또, 이하의 실시예에서는, 혈청형 y 타입을 사용하였다.

HBsAg L 단백질의 Pres-S 영역(pre-S1, pre-S2)은, HBV가 간세포에 결합하는 경우에 각각 중요한 역할을 부담하는 것이 공지되어 있다. Pre-S1은 간세포에 직접결합하는 부위를 갖고, pre-S2는 혈중의 중합 알부민을 개입시켜 간세포에 결합하는 중합 알부민 수용체를 갖는 것이다.

진핵세포에서 HBsAg를 발현시키면, 동 단백질은, 소포체 막상에 막단백질로서 발현, 축적된다. HBsAg의 L 단백질은 분자사이에서 응집을 일으키고, 소포체막을 취입하면서, 출아 양식으로 루멘측에 입자로서 방출된다.

이하의 실시예에서는, HBsAg의 L 단백질을 사용하였다. 또, 도 2에 이하의 실시예에 기재된 HBsAg 입자의 발현 및 정제 조작의 개략 설명도를 나타내었다.

#### (실시예 A) 유전자재조합 효모에 의한 HBsAg 입자의 발현

본 발명자들에 의해 보고된 J. Biol. Chem., Vol. 267, No. 3, 1953-1961, 1992 기재의 방법에 기초하여, pGLDLIIP39-RcT를 보유한 유전자재조합 효모(*Saccharomyces Cerevisiae* AH22R<sup>-</sup> 주)를, 합성배지 High-Pi 및 8S5N-P400 중에서 배양하고, HBsAg L 단백질 입자를 발현시켰다(도 2a 내지 2c).

정상성장기(약 72시간후)에 있는 유전자재조합 효모로부터, Yeast Protein Extraction Reagent(Pierce Chemical Co. 제품)을 사용하고, 전세포 추출물(whole cell extract)을 준비하고, 도데실 황산나트륨-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)을 사용하여 분리하고, 은염색에 의해 시료중의 HBsAg의 동정을 행하였다.

이에 의해, HBsAg는 분자량 약 52kDa의 단백질인 것으로 판명되었다.

#### (실시예 B) HBsAg 입자의 유전자재조합 효모로부터의 정제

(1) 합성배지 8S5N-P400에서 배양된 유전자재조합 효모(습중량 26g)를 완충(buffer) A 용액(7.5M 요소, 0.1M 인산나트륨, pH 7.2, 15mM EDTA, 2mM PMSF, 0.1% Tween 80) 100ml에 현탁시키고, 유리 비즈를 사용하여 비드비이터(BEAD-BEATER)로 효모를 파쇄하였다. 파쇄 후, 상청을 원심분리하여 회수하였다(도 2d).

(2) 이어서, 상청을 0.75 배용의 33%(w/w) PEG6000과 혼합하고, 30분간 냉장시켰다. 그 후, 원심분리(7000rpm, 30분)를 행하고, 펠릿을 회수하였다. 동 펠릿은 트윈 80을 함유하지 않은 완충 A 용액중에 재현탁시켰다.

(3) 재현탁시킨 액을, 10 내지 40%의 구배를 거친 CsCl에 중층하고, 28000 rpm, 16 시간의 초원심분리를 행하였다. 원심분리 후의 시료를 12회분으로 나누고, 웨스턴 블로팅법(1차 항체는 안티-HBsAg 모노클로날 항체)에 의해 HBsAg를 함유하는 분획을 동정하였다. 추가로, HBsAg를 함유하는 분획을 트윈 80을 함유하지 않는 완충 A 용액으로 투석하였다.

(4) (3)에서 수득된 투석액(12ml)을 5 내지 50% 구배를 거친 수크로스에 중층하고, 28000 rpm, 16 시간의 초원심분리를 행하였다. 원심분리 후, (3)과 동일한 방식으로, HBsAg를 함유하는 분획을 동정하고, HBsAg를 함유하는 분획을 요소와 Tween 80은 함유하지 않고, 대신에 0.85% NaCl을 함유하는 완충 A 용액으로 투석하였다( (2) 내지 (4) : 도 2e).

(5) (4)와 동일한 조작을 반복하고, 투석 후의 시료를 울트라필터(Ultra Filter) Q 2000(아도박텍사) 을 사용하여 농축시키고, 사용하는 때까지 4℃로 냉장 보존하였다( 도 2f).

CsCl 평형 원심분리기 후의 웨스턴 블로팅(3)의 결과로부터, HBsAg는 분자량 52kDa에서 S 항원성을 갖는 단백질인 것으로 판명되었다. 최종적으로, 배지 2.5L 유래, 습중량 26g의 균체로부터 약 24mg의 정제 HBsAg 입자를 수득하였다.

일련의 정제 과정에 있어서의 분획을 은염색 SDS-PAGE로 해석하였다. 또, 정제에 의해 효모 유래의 프로테아제가 제거되어 있음을 확인하기 위해, (5)에서 수득된 HBsAg 입자를 37℃에서 12시간 인큐베이션한 후, SDS-PAGE를 행하고, 은염색에 의해 동정을 행하였다.

그 결과, 효모 유래의 프로테아제는, 일련의 정제 과정에 있어서 완전히 제거되어 있음이 확인되었다.

한편, 상기 HBsAg 입자는 사람 간세포 특이적으로 감염되는 것이 가능하지만, 그 높은 감염성을 부담하는 동 입자 표면에 제시되어 있는 간세포 인식 부위는 pre-S1 영역의 3으로부터 77 아미노산 잔기에 함유되어 있는 것으로 판명되어 있다 (Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P., *J. Virol.* 1999, Mar; 73(3): 2052-7).

이하에서는, 암특이적 항체를 입자 표면에 제시시킨 본 발명의 약제의 제작 방법에 관해서 설명하지만, 하기 제작방법에 있어서는 그 항체의 항원이 되는 분자를 세포 표면에 갖는 특성의 암세포에 대해서만 본 발명의 약제를 작용시키기 때문에, 상기 HBsAg 입자의 본래의 간세포에 대한 높은 감염능은 결실시켰다. 또, 본 발명의 약제로서, ① 스트렙태그를 사용하여 암특이적 항체를 제시한 HBsAg 입자, ② ZZ 태그를 사용하여 암특이적 항체를 제시한 HBsAg 입자, 및 ③ 암특이적인 일본쇄 항체를 HBsAg 단백질과 융합시켜 발현시킴으로써, 입자 표면에 제시된 HBsAg 입자를 각각 삭제하였다.

(실시예 C) 스트렙태그를 사용한 암특이적 항체를 제시하는 HBsAg 입자의 제작

(실시예 C-1) 효모세포에 의한 HBsAg-steptag 입자의 제작

실시예 A에 기재된 pGLDLIIP39-RcT 플라스미드의 사람 간세포 인식 부위를 암호화하는 유전자 영역을 결실시키고, 동시에 제한효소 NotI 부위(gcggccgc)를 삽입하기 위해, 서열번호 1의 올리고뉴클레오타이드와 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드를 PCR용 프라이머로서 사용하고, QuichChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene 사)를 사용한 PCR법을 pGLDLIIP39-RcT 플라스미드에 대하여 행하였다.

구체적으로는, 내열성 DNA 폴리머라제로서 *Pfu* DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하고, PCR 스케줄은 95℃ 30초간의 변성, 55℃ 1분간 어닐링, 68℃ 30분간 합성 반응을 30회 반복하였다. 그 후, PCR 산물을 제한효소 *DpnI*로 처리하고, 대장균 DH5α에 형질전환시키고, 출현 콜로니로부터 벡터 DNA를 추출하고, 염기서열로부터 변이도입된 pGLDLIIP39-RcT 플라스미드를 선별하였다. 이하, pGLDLIIP39-RcT-Null 플라스미드로 칭한다. 또, 도 3이하의 도면에서는 이 플라스미드를 갖고, 상기 사람 간세포 인식부위를 결실한 HBsAg L 단백질을 암호화하는 유전자 영역을 「Null」 이라고 나타내고 있다. 이하에서는 편의상, 이 유전자 영역을 「Null」 영역으로 칭하기로 한다.

도 3에 나타낸 바와 같이, 상기 pGLDLIIP39-RcT-Null 플라스미드에 대해, SacI 부위 및 SalI 부위를 부가하기 위해서, SacI 부위를 부가한 서열번호 3의 올리고뉴클레오타이드와 SalI 부위를 부가한 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드와 PCR용 프라이머로서 사용하고, PCR을 행하였다. 이에 따라, 프로모터(GLDp) 및 터미네이터(PCKt)를 함유한 Null 영역을 증폭시키고, Null 영역을 함유하는 cDNA 단편을 수득하였다.

이어서, pRS405+ 2 $\mu$ m 플라스미드(범용형 효모 벡터(Stratagene사)의 AatII 부위에 효모용 다복제형 2 $\mu$ m 복제부위를 조입함으로써 작제)를 제한효소 SacI 및 SalI에 의해 소화시킨 후, Null 영역을 포함하는 상기 cDNA 단편을 개열한 플라스미드 pRS405+ 2 $\mu$ m에 삽입하고, pRS405+ 2 $\mu$ m - Null 플라스미드를 작제하였다.

이어서, 스트렙태그(strep-tag)를 암호화하는 합성 올리고뉴클레오타이드(서열번호 5 및 이와 상보적인 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드)를 어닐링시키고, 상기 pRS405+ 2 $\mu$ m - Null 플라스미드를 NotI 소화시킨 것에 삽입하고, 스트렙태그를 암호화하는 유전자 영역을 갖는 pRS405+ 2 $\mu$ m-strep-tag 플라스미드를 작제하였다. 여기서, 스트렙태그라고 하는 것은, 스트렙타비딘에 대해서 비오틴과 같이 높은 친화성으로 결합하는 펩타이드이고, N 말단으로부터 순서대로, 1) SAWRHPQFGG(서열번호 27) 또는 2) WSHPQFEK(서열 번호 28)의 서열로 이루어진 것이다. 전자 1)은 단백질 C 말단에서 기능하는 것이고, 본 실시예에서는 후자 2) 서열의 스트렙태그를 사용하였다.

그 후, 상기 pRS405+ 2 $\mu$ m-strep-tag 플라스미드에 의한 효모(*Saccharomyces Cerevisiae* AH22R<sup>-</sup>주)를 형질전환시키고, 수득된 형질전환체를 배양후, 실시예 B에 기재된 방법에 따라서, 배양세포로부터 돌연변이형 HBsAg 입자(상기 사람 간세포 인식 부위를 결실한 HBsAg L 단백질과 스트렙태그와를 융합시킨 형태로 발현시켜 수득된 입자. 이하, 「HBsAg-streptag 입자」라고 칭함)을 정제한 경우, 배지 1.0L 유래의 균체로부터, 약 200 $\mu$ g의 정제 HBsAg-streptag 입자를 수득하였다.

(실시예 C-2) 무혈청배양의 곤충세포에 의한 HBsAg-streptag 입자의 작제

이하에서는, 당쇄 등의 고차원 구조의 재현도 가능한 작제방법으로서, 바쿨로바이러스를 개입하지 않고, 무혈청 배양이 가능한 곤충 세포계를 사용한 HBsAg-streptag 입자의 작제방법에 대해서 설명한다.

도 4에 나타낸 바와 같이, 실시예 C-1에 기재된 상기 pGLDLIIP39-RcT-Null 플라스미드로부터, 서열번호 7의 올리고뉴클레오타이드(*KpnI* 부위 ggtacc를 갖는다) 및 서열번호 8의 올리고뉴클레오타이드(*SacI* 부위 ccgcgg를 갖는다)의 각 프라이머를 사용한 PCR에 의해, 닭 유래 리소자임 분비 시그널 펩타이드의 암호화 영역을 함유하는 상기 Null 영역을 증폭하였다.

PCR 산물을 아가로스 전기영동으로 분리하고, 약 1.3kbp의 목적 바인드의 유전자단편을 회수한 후, 곤충 세포 안정 발현용 벡터-pIZT/V5-His(Invitrogen사)의 *KpnI* 부위와 *SacI* 부위와의 사이에, 상기 유전자단편을 TaKaRa Ligation kit ver.2(TaKaRa 사 제품)을 사용하고, 폐환결합시켰다. 염기배열을 확인한 후, 이 플라스미드를 pIZT-Null로 명명하였다.

이어서, 실시예C-1과 동일한 방식으로, streptag를 암호화한 합성 올리고뉴클레오타이드(서열번호 5 및 이와 상보적인 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드)를 어닐링시키고, 상기 pIZT-Null 플라스미드를 NotI소화시킨 것에 삽입하고, 스트렙태그를 암호화하는 유전자 영역을 갖는 pIZT-streptag 플라스미드를 작제하였다.

한편, 곤충세포 High Five 주(BTI-TN-5B1-4: Invitrogen사)를 약 1개월에 걸쳐 점차로 소태아혈청 함유 배지로부터 무혈청배지(Ultimate Insect Serum-Free Medium: Invitrogen사)로 순화하였다. 이어서, 상기 pIZT-streptag 플라스미드를 유전자도입용 지질 Insectin-Plus (Invitrogen사 제품)을 사용하여 무혈청배지에 순화시킨 High Five 주에 형질전환시켰다. 그 후, 무혈청배지에서 27 $^{\circ}$ C 48시간동안 배양하고, 항생 물질 zeocin(Invitrogen사)을 400 $\mu$ g/ml 함유하는 무혈청배지에서 추가로 세포가 융합성(confluent)이 될 때까지 4 내지 7일간 배양하고, HBsAg-streptag 입자를 수득하였다.

1500 $\times$ g, 5분간 원심에 의해 배양상청을 회수하고, IMx 키트(다이아보트사)에 따라, 배지중의 HBsAg-streptag 입자의 발현 측정후, HBsAg-streptag 입자가 발현되고 있음을 확인하였다. 추가로, 상기 배양상청으로부터 수득한 HBsAg-streptag 입자를 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 항S 항체(발명자들이 작제)에 의한 웨스턴 블로팅 및 효소면역측정 IMx에 의해 해석하였다. 그 결과, 스트렙태그가 융합한 HBsAg-streptag 입자는 분자량 약 42kDa이었다.

이상과 같이 하여 수득한 배양상청 1L을 사용하고, 한외여과기(사용 필터는 UK-200: ADVANTEC사, 배제분자량 200K)에서 농축시킨 후, 음이온 교환 컬럼(DEAE-Toyopearl 650M, 도요소오다사)에 의해 정제한 후, 균일한 HBsAg-streptag 입자 약 1mg을 정제하는 것이 가능하였다.

(실시예 C-3) 동물세포에 의한 HBsAg-streptag 입자의 작제

도 5에 나타낸 바와 같이, 제한효소 XhoI를 사용하고, 상기 pGLDLIIP39-RcT-Null 플라스미드에 있어서의 XhoI 부위에서 터미네이터-(PGKt)를 함유한 Null 영역을 포함하는 단편을 추출하였다. 이어서, pcDNA3.1(Invitrogen사)를 제한효소 XhoI에 의해 소화시킨 후, 상기 단편을 pcDNA3.1에 삽입하고, pcDNA3.1-Null 플라스미드를 작제하였다.

이어서, 실시예 C-1과 동일한 방식으로, streptag 유전자를 암호화하는 합성올리고뉴클레오타이드(서열번호 5 및 이와 상보적인 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드)를 어닐링시키고, 상기 pcDNA3.1-Null 플라스미드를 NotI 소화시킨 것에 삽입하고, 스트렙태그를 암호화하는 유전자 영역을 갖는 pcDNA3.1-streptag 플라스미드를 작제하였다.

상기 pcDNA3.1-streptag 플라스미드를 원숭이 신장 유래 COS7 세포로, 유전자 도입 장치 진펄서(gene pulser; Bio-Rad사)를 사용하여 도입하였다. 도입후, 10% 자소태아혈청을 함유하는 덜베코(Dulbecco) 돌연변이 배지에서 밤새 배양한 후, 배지를 무혈청배지 CHO-SFMII(Gibco-BRL)로 치환하고, 추가로, 1주간 배양하고, 배지로부터 HBsAg-streptag 입자를 정제하였다.

또, 실시예 C-2와 동일한 방식으로, 배양상청으로부터 수득한 HBsAg-streptag 입자를 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 항 S 항체에 의한 웨스턴 블로팅 및 효소면역측정 IMx에 의해 해석하였다. 그 결과, 스트렙태그가 융합한 HBsAg-streptag 입자는 분자량 약 42kDa인 것으로 판명되었다. IMx에 의한 측정치는, pcDNA3.1 벡터를 사용하여 HBsAg L 입자 야생형을 발현시킨 것 : 8.81 (대 컷오프값), HBsAg Null 입자: 3.47, HBsAg-streptag 입자 : 2.41이고, 각각 충분한 생산량을 나타내고 있다.

(실시예 C-4) 스트렙태그를 갖는 HBsAg-streptag 입자에 항체를 제시시키는 방법

상기 실시예 C-1 내지 C-3에서는, 스트렙태그를 갖는 HBsAg-streptag 입자를 작제하였다. 이 스트렙태그는 스트렙트아비딘과 특이적으로 결합한다. 추가로, 이 스트렙트아비딘은 비오틴과 특이적으로 결합한다. 따라서, 상기 HBsAg-streptag 입자와 스트렙트아비딘과를 결합시키고, 그 후, 스트렙아비딘과 비오틴 수식된 항체와를 결합시킴으로써, 입자 표면에 항체가 정렬제시된 HBsAg-streptag 입자(이하, 이렇게 하여 항체가 제시된 HBsAg-streptag 입자를 「HBsAg-streptag-Ab 입자」라고 한다)를 작제하였다.

구체적으로는, 사람 상피 성장인자 수용체(EGFR)에 대한 항체인 항사람 EGFR 마우스 모노클로날 항체 7G7B6(정제품)을 항체에 사용하고, 이 항체에 대하여, NHS-비오틴(Pierce사 제품 EZ-Link(등록상표) NHS-Biotin)에 의해, Pierce사의 설명서의 프로토콜에 따라서 비오틴 표식하였다. 이어서, 상기 정제된 HBsAg-streptag 입자와, 아비딘 단백질(Pierce사 제품 ImmunoPure Avidin)과를, PBS 중 상온에서 30분간, 몰비 HBsAg-streptag 입자(몰 계산은 구성 분자 단위에서 행하였다) 2: 아비딘 단백질 1로 혼합결합시켰다. 그 후, 비오틴 표식된 항사람 EGFR 마우스 모노클로날 항체를 상기 아비딘 단백질이 결합된 HBsAg-streptag 입자에 대해 등몰 가해서 PBS중 상온에서 30분간 반응시켰다. 이에 따라서, 입자 표면에 상기 항체가 제시된 HBsAg-streptag-Ab 입자를 작제하였다.

(실시예 C-5) 상기 HBsAg-streptag-Ab 입자로의 유전자 도입

우선, 국제공개 WO01/64930에 개시된 방법과 동일하게, 상기 HBsAg-streptag-Ab 입자와 녹색형광 단백질 발현 플라스미드(pEGFP-F(Clontech사))와를 혼합하고, 일렉트로포레이션법에 의해, HBsAg-streptag-Ab 입자내에 pEGFP-F를 봉입하였다. 이에 따라, 입자 표면에 항사람 EGFR 항체가 제시되고, 입자내부에 GFP 발현 플라스미드가 포함된 HBsAg-streptag-Ab 입자를 작제하였다.

이어서, 사람 편평상피암 유래 세포 A431 (JCRB9009) 및 음성 대조로서 사람 간암 유래 세포 NUE, 사람 대장암 유래 세포 WiDr을 준비하였다. 상기 A431 및 음성대조(NUE, WiDr)을 각각 3.5cm 유리로 된 아래 샤알레위에 배양하고, 상기 GFP 발현 플라스미드가 포함된 HBsAg-streptag-Ab 입자를 1 $\mu$ g 혼합하고, 4일간 배양을 계속하였다. 그 후, 각 세포내에서의 GFP의 발현의 양자를 공집점 레이저 형광현미경으로 관찰하였다.

그 결과, A431 세포에서는, GFP의 형광이 관찰되었지만, 음성 대조(NUE 세포, WiDr)에서는, GFP의 형광이 관찰되지 않았다.

이상과 같이, 입자 표면에 항사람 EGFR 항체가 제시되고, 입자내부에 GFP 발현 플라스미드가 포함된 HBsAg-streptag-Ab 입자를 사용하고, 배양 세포 레벨에서, 실제로 A431 세포에 대해 극히 높은 특이성과 효율적으로 유전자를 도입하여 발현시키는 것이 가능하였다. 이에 따라, 상기 HBsAg-streptag-Ab 입자에 세포를 치료하는 세포 도입물질을 포함시킴으로써, 특정의 세포 및 조직에 있어서의 질환을 효과적으로 치료할 수 있는 가능성이 나타난 것이다.

(실시예 D) ZZ 태그를 사용한 항체제시형 HBsAg 입자의 작제

(실시예 D-1) 효모세포에 의한 HBsAg-ZZ 입자의 작제

우선, 도 6에 도시한 바와 같이, 실시예 C-1과 동일한 방식으로, pRS405+ 2 $\mu$ m - Null 플라스미드를 작제하였다.

이어서, ZZ태그(ZZtag)를 암호화하는 유전자영역(도면중, 「ZZ」. 이하, 「ZZ 영역」이라 한다)를 갖는 플라스미드 (Staphyrococcus aureus 유래 Protein A 유전자를 기에 ZZ 영역을 삽입하여 작제)에 대하여, NotI 부위를 부가한 서열번호 9 및 서열번호 10의 각 올리고뉴클레오타이드를 PCR 용 프라이머로서 사용하여 PCR을 행하고, ZZ 영역을 포함하는 영역을 증폭시켰다. 상기 ZZ태그라고 하는 것은, 면역글로블린G의 Fc 영역과 결합하는 능력을 갖는 아미노산 서열과 규정된, 다음의 2회 반복한 서열로 이루어진(ZZ 태그의 서열(서열번호 29) : N 말단으로부터, VDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK VDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK).

이어서, pRS405+ 2 $\mu$ m - Null 플라스미드를 제한효소 NotI에 의해 소화시키고, 개열한 당해 플라스미드에 상기 증폭 단편을 삽입하고, pRS405+ 2 $\mu$ m-ZZ 플라스미드를 작제하였다.

실시예 A와 동일한 양식으로 하여, 상기 플라스미드 유전자 pRS405+ 2 $\mu$ m-ZZ를 효모 S.cerevisiae AH22R<sup>-</sup>에 스페로플라스트법에 따라 형질전환시키고, 수득된 형질전환체를 배지 High-Pi3m1에서 30도 3일간, 이어서 8S5N-P400 3ml에서 30도 3일간 배양하고, ZZ 태그를 제시하는 HBsAg 입자를 수득하였다.

그 후, 상기 pRS405+ 2 $\mu$ m-ZZ 플라스미드에 의한 효모(Saccharomyces Cerevisiae AH22R<sup>-</sup>주)를 형질전환시키고, 수득된 형질전환체를 배양후, 실시예 B에 기재된 방법에 따라서, 배양세포로부터 돌연변이형 HBsAg 입자(상기 사람 간세포 인식 부위를 결실한 HBsAg L 단백질과 ZZ 태그와를 융합시킨 형태로 발현시켜 수득된 입자. 이하, 「HBsAg-ZZtag 입자」라고 칭함)을 정제한 경우, 입자의 발현량은 극히 높고, 배지 1.0L 유래의 균체로부터, 약 20mg의 정제 HBsAg-ZZtag 입자를 수득하였다.

추가로, 배양상청으로부터 수득한 HBsAg-ZZtag 입자를 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 항S 항체에 의한 웨스턴 블로팅 및 효소면역측정 IMx에 의해 해석하였다. 도 7에 SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅의 결과를 나타낸다. 또, IMx 결과는, pRS405+ 2 $\mu$ m-백터를 사용하여 HBsAg L 입자 야생형을 발현시킨 것 : 49.43 (대 컷오프값, 100배 희석시), HBsAg-Null 입자: 21.87, HBsAg-ZZtag 입자 : 253.64이고, 각각 충분한 생산량을 나타내고 있다. 이들 결과에 의해, ZZ 태그를 갖는 HBsAg-ZZtag 입자는 분자량 약 56kDa인 것을 알 수 있었다.

(실시예 D-2) 무혈청배양의 곤충세포에 의한 HBsAg-ZZtag 입자의 작제

우선, 도 8에 도시한 바와 같이, 실시예 C-2와 동일한 방법에 따라, pIZT- Null 플라스미드를 작제하였다.

이어서, 실시예 D-1와 동일한 방법에 따라, ZZ 영역을 함유하는 영역을 상기 pIZT- Null 플라스미드에 삽입하고, pIZT-ZZ 플라스미드를 작제하였다.

이어서, 실시예 C-2와 동일한 방법에 따라, 상기 pIZT-ZZ 플라스미드를 곤충세포에 도입하여, HBsAg-ZZtag 입자를 발현하였다.

또, 상기 곤충 세포를 배양후, 배양상청을 회수하고, 배양상청으로부터 수득한 HBsAg-ZZtag 입자를 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 항S 항체(발명자들이 작제, 마우스 폴리클로날 항체)에 의한 웨스턴 블로팅에 의해 해석하였다. 그 결과, ZZ태그를 제시하는 HBsAg-ZZtag 입자는 분자량 약 56kDa인 것임을 알 수 있었다.

또, C-2와 동일한 방법에 의해 배양상청 1L로부터 HBsAg-ZZtag 입자 약 1mg이 수득되었다.

(실시예 D-3) 동물세포에 의한 HBsAg-ZZtag 입자의 작제

우선, 도 9에 나타낸 바와 같이, 실시예 C-3과 동일한 방법에 따라, pcDNA 3.1-Null 플라스미드를 작제하였다.

이어서, 실시예 D-1과 동일한 방법에 따라, ZZ 영역을 함유하는 영역을 상기 pcDNA 3.1-Null 플라스미드에 삽입하고, pcDNA3.1-ZZ 플라스미드를 작제하였다.

이어서, 실시예 C-3과 동일한 방법에 따라, 상기 pcDNA3.1-ZZ 플라스미드를 COS7 세포로 도입하여, HBsAg-ZZtag 입자를 발현시켰다.

또, 상기 COS7 세포를 배양한 후, 배양상청을 회수하고, 배양상청으로부터 수득한 HBsAg-ZZtag 입자를 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 항S 항체(발명자들이 작제, 마우스 폴리클로날 항체)에 의한 웨스턴 블로팅 및 효소면역측정 IMx에 의해 해석하였다. IMx의 결과는, pcDNA3.1 벡터를 사용하여 HBsAg L 입자 야생형을 발현시킨 것 : 8.81 (대 컨트롤값), HBsAg Null 입자: 3.47, HBsAg-ZZtag 입자 : 2.41이고, 각각 상당히 높은 생산량을 나타내고 있다. 그 결과, ZZ 태그를 제시하는 HBsAg-ZZtag 입자는 분자량 약 56kDa임을 알 수 있었다.

(실시예 D-4) 상기 HBsAg-ZZtag 입자에 대한 항체의 제시 방법

상기 ZZ 태그는, 항체분자의 Fc 부분에 대하여 높은 친화성을 갖고 있고, 예를 들면 암특이적 항체인, 사람 EGF 수용체 (EGFR)에 대한 마우스모노클로날 항체 7G7B6, 사람 IL-2수용체(Tac 항원)에 대한 마우스모노클로날 항체 528, 및 사람 대장암에 대한 대장암 특이적 마우스모노클로날 항체 ST-421 등과 특이적으로 결합하는 것이 가능하다. 따라서, 상기 HBsAg-ZZtag 입자와 이들 어느 하나의 항체와를 결합시킴으로써, 입자 표면에 항체가 정렬제시된 HBsAg-ZZtag 입자 (이하, 이렇게 하여 항체가 제시된 HBsAg-ZZtag 입자를 「HBsAg-ZZtag-Ab 입자」라고 한다)를 작제하였다.

구체적으로는, 상기 HBsAg-ZZtag-Ab 입자와, 항사람 EGFR 마우스 모노클로날 항체 7G7B6(정제품)와를 등몰(몰 계산은 구성 분자 단위에서 행하였다) 혼합하고, PBS중에서 약 1시간 반응시켰다. 이에 따라서, 입자 표면에 항사람 EGFR 항체가 제시된 HBsAg-ZZtag-Ab 입자를 작제하는 것이 가능하였다.

(실시예 D-5) 상기 HBsAg-ZZtag-Ab 입자로의 유전자 도입

우선, 국제공개 WO01/64930에 개시된 방법과 동일하게, 상기 HBsAg-ZZtag-Ab 입자와 녹색형광 단백질 플라스미드 (pEGFP-F(Clontech사))와를 혼합하고, 일렉트로포레이션법에 의해, HBsAg-ZZtag-Ab 입자내에 pEGFP-F를 봉입하였다. 이에 따라, 입자 표면에 항사람 EGFR 항체가 제시되고, 입자내부에 GFP 발현 플라스미드가 포함된 HBsAg-ZZtag-Ab 입자를 작제하였다.

이어서, 실시예 C-5와 동일하게하여, 사람 편평상피암 유래 세포 A431 및 음성 대조로서 사람간암 유래 세포 NUE와 HuH-7(JCRB 0403), 사람 대장암 유래 세포 WiDr(ATCC CCL-218)을 준비하였다. 상기 A431 및 NUE, HuH-7, WiDr을 각각 3.5cm 유리로 된 아래 샤알레위에 배양하고, 상기 GFP 발현 플라스미드가 포함된 HBsAg-ZZtag-Ab-GFP 입자를 1 $\mu$ g 혼합하고, 4일간 배양을 계속하였다. 그 후, 각 세포내에서의 GFP의 발현의 양자를 공집점 레이저 형광현미경으로 관찰하였다.

그 결과, A431 세포에서는, GFP의 형광이 관찰되었지만, NUE 세포 등에서는 GFP의 형광이 관찰되지 않았다.

이상과 같이, 입자 표면에 항사람 EGFR 항체가 제시되고, 입자내부에 GFP 발현 플라스미드가 포함된 HBsAg-ZZtag-Ab 입자를 사용하고, 배양 세포 레벨에서, 실제로 A431 세포에 대해 극히 높은 특이성과 효율적으로 유전자를 도입하여 발현되는 것이 가능한 것으로 나타났다.

추가로, 누드 마우스(계통: BALB/c nu/nu, 미생물학적 품질: SPF, 성별: 수컷 5주)의 양측등부분 피하에, 사람 종양주 (A431, HuH-7, WiDr)를 각각 1 $\times$ 10<sup>7</sup> 세포 피하에 주사하고, 이식종양이 직경 2cm 정도의 고형암이 될 때까지 2 내지 4 주간 생육시키고, 담암 마우스를 수득하였다.

이어서, 상기의 GFP 발현 플라스미드가 포함된 HBsAg-ZZtag-Ab 입자를, 마우스복강내에 26G 주사침을 사용하여 투여하였다. 투여후 4일 후에 마우스를 도살하고, 종양부, 간장, 비장, 신장, 장관을 적출하고, GFP용 수지 포리 키트 (Technovit 7100)을 사용하고 조직을 고정·포리하였다.

구체적으로는, 고정은 4% 중화 포르말데하이드에 침지하여 행하고, 탈수는 70% EtOH에서 실온 2시간, 96% EtOH에서 실온 2시간, 100% EtOH에서 실온 1시간, 예비침지는 100% EtOH/Technovit 7100 등량 혼합액에서 실온 2시간 행하였다. 그 후, Technovit 7100에서 실온 24시간 이내의 침지를 행하고, 취출한 후, 실온에서 1시간 및 37°C에서 1시간 정치시켜 중합반응시켰다.

통상적인 방법에 따라서, 절편을 제작하고, 동시에 헤마톡신에 올린 염색(-일반적인 조직 염색)을 행하고, 형광현미경에 의해 각 절편의 GFP에 의한 형광을 비교하였다. 그 결과, 사람 편평상피암 유래 세포 A431에 있어서는, GFP에 의한 형광이 인지되었다. 한편, 동 마우스에 의해 동시에 적출한 간장, 비장, 신장, 장관에 있어서는 형광을 인식할 수 없었다. 이에 대해서, 다른 사람 암유래 세포(HuH-7, WiDr)에 의한 담암 마우스에 있어서는, 종양부에 있어서는 간장, 비장, 신장, 장관에 있어서는 GFP에 유래하는 형광은 인지되지 않았다. 또, 상기 HBsAg-ZZtag 입자를 투여하지 않은 담암 마우스에 있어서는 형광이 인지되지 않았다.

이상과 같이, 입자 표면에 항사람 EGFR 항체가 제시되고, 입자내부에 GFP 발현 플라스미드가 포함된 HBsAg-ZZtag-Ab 입자를 사용하여, 실험 동물 레벨에서, 실제로 A431 세포에 대해서 극히 높은 특성과 효율로 유전자를 도입하여 발현시킬 수 있는 것으로 나타났다.

(실시예 D-6) 상기 HBsAg-ZZtag-Ab 입자에 의한 치료효과

이어서, 상기 각 작제방법 중 효모를 사용하여 작제한 HBsAg-ZZtag-Ab 입자에 암치료용 유전자로서 단순 헤르페스바이러스 유래 티미딘키나제(HSV1 tk) 유전자를 봉입하고, HSV1 tk 유전자가 포함된 본 발명의 약제로서의 HBsAg-ZZtag-Ab 입자를 제조하였다.

상기 HSV1 tk 유전자가 도입된 암세포에서는, 이 HSV1 tk 유전자가 발현됨으로써 간씨클로비르(Ganciclovir:GCV)에 대해서 감수성으로 되고, 간씨클로비르가 투여되면, 강력한 연좌 효과를 야기시키면서, 암세포는 사멸한다. 이와 같이, HSV1 tk 유전자는 암 유전자 치료에 광범위하게 사용되는 유전자의 하나이다.

본 실시예에서는, HBsAg-ZZtag-Ab 입자내로 HSV1 tk 유전자를 봉입하기 때문에, HSV1 tk 유전자를 발현하는 Invivogen사 제품인 벡터-pGT65-hIFN- $\alpha$ 를 사용하고, 이 발현 벡터를 일렉트로포레이션법에 의해 HBsAg-ZZtag-Ab 입자내로 도입함으로써, HSV1 tk 유전자가 포함된 HBsAg-ZZtag-Ab 입자를 작제하였다. 구체적으로는, HBsAg-ZZtag-Ab 입자중의 L 단백질 입자 50 $\mu$ g에 대해, 상기 발현 벡터 10 $\mu$ g 도입하였다. 또 이 경우, PBS 완충액을 사용하고, 일렉트로포레이션 조건은 220V, 950 $\mu$ F에서 4mm의 큐벳트(cuvette)를 사용하여 행하였다.

또, 본 실시예에서는, 실험동물로서 닛뽀 클레아로부터 구입한 누드 래트(계통: F334/NJcl-rnu/rnu, 성별: 암컷)를 사용하고 이 누드 래트의 양측등부분 피하에, 사람 편평상피암 유래 세포 A431 및 음성대조로서 사람 대장암 유래 WiDr 세포를 각각  $1 \times 10^7$  세포 정도 피하에 주사함으로써 이식하고, 이식종양이 직경 2 내지 3cm 정도의 고형암이 될 때까지 약 3주간 생육시켜서 수득하였다.

그 후, 상기 누드 래트에 HSV1 tk 유전자가 포함된 상기 HBsAg-ZZtag-Ab 입자를 10 $\mu$ g 꼬리정맥에 투여하였다(정맥주사하였다). 또, 정맥주사의 5일 후부터, 상기 누드 래트에 대해, 침투압 펌프(alzet osmotic pump; Cat번호 2ML2)를 사용하여 간씨클로비르(GCV)를 50mg/kg/day의 함량으로 투여하였다. 상기 침투압 펌프는 GCV를 함유하는 약제와 함께 상기 누드 래트의 등중 피하에 이식하였다. 이 간씨클로비르의 투여는 최대 14일간 행하였다. 간씨클로비르 투여후, 상기 누드 래트의 종양 조직의 상태(크기)를 경시적으로 관찰하였다. 구체적으로는, 노기스로 종양부분의 단경과 장경과를 측정하고, 종양 용적 근사치(장경 $\times$ 단경 $\times$ 단경/2)를 계산하여 행하였다. 측정은, 모두 쥐 3회로 행하였다 그 결과를 도 10 및 도 27에 나타낸다.

이상의 결과로부터, 입자표면에 항사람 EGFR 항체가 제시되고, 입자내부에 HSV1 tk 유전자가 포함된 HBsAg-ZZtag-Ab 입자를 사용하고, 실험동물 레벨에서, 실제로 A431 세포에 대하여 극히 높은 특이성과 효율로 유전자를 도입하여 발현시킬 수 있고, 암 치료효과가 있는 것으로 확인되었다.

(실시예 E) 일본쇄 항체를 제시하는 HBsAg-scFv 입자의 작제

(실시예 E-1) 효모세포에 의한 HBsAg-scFv 입자의 작제

우선, 도 6에 도시한 바와 같이, 실시예 D-1과 동일한 방법에 따라서, 단 동 실시예에서 사용된 ZZ 영역을 갖는 플라스미드 및 PCR용 프라이머 대신에, 플라스미드로는, 일본쇄 항체 마우스 유래의 항사람 혈청 알부민 항체인 A22를 암호화하는 유전자 영역을 갖는 플라스미드(TOTO 주식회사로부터 분여), 또는 일본쇄 마우스 유래의 사람 RNase 항체인 3A21을 암호화하는 유전자 영역을 갖는 플라스미드(Mol Immunol 1997 Aug-Sep; 34(12-13): 887-90 Katakura Y, Kumamoto T, Iwai Y, Kurokawa Y, Omasa T, Suga K. 및 Mol Immunol 1997 Jul; 34(10): 731-4, Katakura Y, Kumamoto T, Iwai Y, Kurokawa Y, Omasa T, Suga K.에 기재된 방법에 따라 작제)를 사용하고, PCR용 프라이머로는 NotI 부위를 부가한 서열번호 11 및 서열번호 12의 각 올리고뉴클레오타이드(상기 A22의 경우), 또는 NotI 부위를 부가한 서열번호 13 및 서열번호 14의 각 올리고뉴클레오타이드(상기 3A21의 경우)를 사용하여 PCR을 행하고, 상기 항체 A22 또는 3A21을 암호화하는 유전자 영역을 포함하는 영역을 증폭하였다. 상기 일본쇄 항체(single chain antibody, scFv)로는, 본래 2분의 폴리펩타이드로 구성된 항체의 항원인식부위를 일본위 폴리펩타이드 위에 재구성한 의사항체분자인 것이다.

이어서, 상기 PCR에 의해 수득된 증폭단편을 pRS405+ 2 $\mu$ m - Null 플라스미드에 삽입하고, pRS405+ 2 $\mu$ m-A22 플라스미드 또는 pRS405+ 2 $\mu$ m-3A21 플라스미드를 작제하였다. 또, 이들 중 어느 하나의 플라스미드를 효모에 도입하여 발현시킴으로써, 일본쇄 항체 A22 또는 3A21이 HBsAg L 단백질과 융합한 형태로 발현되고, 입자 표면에 제시된 입자(이하, 이렇게 하여 일본쇄 항체 A22 또는 3A21이 제시된 입자를 「HBsAg-scFv 입자」라고 칭함)를 수득하였다.

또, 상기 효모를 배양후, 배양상청을 회수하고, 배양상청으로부터 수득한 HBsAg-scFv 입자를 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 항S 항체에 의한 웨스턴 블로팅 및 효소면역측정 IMx에 의해 해석하였다. 도 11에 SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅의 결과를 나타낸다. IMx 결과는, pRS405+ 2 $\mu$ m-벡터를 사용하여 HBsAg L 입자 야생형을 발현시킨 것 : 49.43 (대 킷오프 값, 100배 희석시), HBsAg-Null 입자: 21.87, A22를 제시하는 HBsAg-scFv 입자 : 2.41, 3A21을 제시하는 HBsAg-scFv 입자 : 4.02이고, 각각 비정상하게 높은 생산량을 나타내고 있었다. 이들 결과에 따라, 항체 A22를 제시하는 HBsAg-scFv 입자는 분자량 약 76kDa이고, 3A21을 제시하는 HBsAg-scFv 입자는 분자량 약 76kDa인 것이 판명되었다. 또, 실시예 C-2와 동일한 방법에 따라, 각각 배지 1.0L 유래 균체로부터, 약 200 $\mu$ g의 정제 HBsAg-scFv 입자를 수득하였다.

(실시예 E-2) 무혈청배양의 곤충세포에 의한 HBsAg-scFv 입자의 작제

우선, 도 8에 도시한 바와 같이, 실시예 D-2와 동일한 방법에 따라서, 단 동 실시예에서 사용된 ZZ 영역을 갖는 플라스미드 및 PCR용 프라이머 대신에, 플라스미드로는, 일본쇄 항체 마우스 유래의 항 사람 혈청 알부민 항체인 A22, 또는 일본쇄 마우스 유래의 사람 RNase 항체인 3A21을 암호화하는 유전자 영역을 갖는 플라스미드를 사용하고, PCR용 플라스미드에는 NotI 부위를 부가한 서열번호 11 및 서열번호 12의 각 올리고뉴클레오타이드(상기 A22의 경우), 또는 NotI 부위를 부가한 서열번호 13 및 서열번호 14의 각 올리고뉴클레오타이드(상기 3A21의 경우)를 사용하여 PCR을 행하고, 상기 항체 A22 또는 3A21을 암호화하는 유전자 영역을 포함하는 영역을 증폭하였다.

이어서, 상기 PCR에 의해 수득된 증폭단편을 pRS405+ 2 $\mu$ m - Null 플라스미드에 삽입하고, pIZT-A22 플라스미드 또는 pIZT-3A21 플라스미드를 작제하였다. 또, 이들 중 어느 하나의 플라스미드를 전기 곤충세포에 도입하여 발현시킴으로써 일본쇄 항체 A22 또는 3A21을 제시하는 HBsAg-scFv 입자를 수득하였다.

또, 상기 곤충세포를 배양후, 배양상청을 회수하고, 배양상청으로부터 수득한 HBsAg-scFv 입자를 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 항S 항체에 의한 웨스턴 블로팅에 의해 해석하였다. 이 결과에 따라, A22를 제시하는 HBsAg-scFv 입자는 분자량 약 76kDa이고, 3A21을 제시하는 HBsAg-scFv 입자는 분자량 약 76kDa인 것을 알 수 있었다.

또, C-2와 동일한 방법에 따라, 각각 배양 배지 1L로부터 HBsAg-scFv 입자 약 1mg을 수득하였다.

(실시예 E-3) 동물세포에 의한 HBsAg-scFv 입자의 작제

우선, 도 9에 나타낸 바와 같이, 실시예 D-3과 동일한 방법에 따라, 단 동 실시예에서 사용된 ZZ 영역을 갖는 플라스미드 및 PCR용 프라이머 대신에, 플라스미드로는, 일본쇄 항체 마우스 유래의 항사람 혈청 알부민 항체인 A22, 또는 일본쇄 마우스 유래의 사람 RNase 항체인 3A21을 암호화하는 유전자 영역을 갖는 플라스미드를 사용하고, PCR용 플라스미드로는 NotI 부위를 부가한 서열번호 11 및 서열번호 12의 각 올리고뉴클레오타이드(상기 A22의 경우), 또는 NotI 부위를 부가한 서열번호 13 및 서열번호 14의 각 올리고뉴클레오타이드(상기 3A21의 경우)를 사용하여 PCR을 행하고, 상기 항체 A22 또는 3A21을 암호화하는 유전자 영역을 포함하는 영역을 증폭하였다.



이어서, 상기 PCR에 의해 수득된 증폭단편을 pcDNA3.1-Null 플라스미드에 삽입하고, pcDNA3.1-A22 플라스미드 또는 pcDNA3.1-3A21 플라스미드를 삭제하였다. 또, 이들 중 어느 하나의 플라스미드를 전기 COS7 세포에 도입하여 발현시킴으로써 일본쇄 항체 A22 또는 3A21을 제시하는 HBsAg-scFv 입자를 수득하였다.

또, 상기 COS7 세포를 배양후, 배양상청을 회수하고, 배양상청으로부터 수득한 HBsAg-scFv 입자를 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 항S 항체에 의한 웨스턴 블로팅에 의해 해석하였다. 이 결과에 따라, A22를 제시하는 HBsAg-scFv 입자는 분자량 약 76kDa이고, 3A21을 제시하는 HBsAg-scFv 입자는 분자량 약 76kDa인 것을 알 수 있었다.

(실시예 E-4) 상기 HBsAg-scFv 입자로의 유전자 도입

상기와 같이, 삭제된 HBsAg-scFv 입자 중, 항체로서 상기 A22를 제시하는 것에 대해서는 사람 혈청 알부민을, 한편, 항체로서 상기 3A21을 제시하는 것에 대해서는 사람 RNase1을, 각각 96 웰 플레이트에 고정시키고, ELISA법에 의해, 결합계수를 측정하였다. 이 경우, 고정상으로 결합된 HBsAg-scFv 입자의 양을, 다이아보트사의 AUSZYME II에 부착되어 있는 HRP 표식 항 HBsAg 폴리클로날 항체로 측정하였다. 그 결과, HBsAg-scFv 입자 단위는 없고, 입자의 부품인 단백질 단위로, HBsAg-scFv 입자(A22의 경우)는 100nM이하의 결합정수, HBsAg-scFv 입자(3A21의 경우)는 50nM이하의 결합정수를 각각 나타내었다. 이들의 수치는, 양방의 HBsAg-scFv 입자가 생체내에서 특정의 부위에 약제 등을 운반할 수 있는 운반체가 될 수 있기 때문에 유효한 수치이다.

이렇게 하여, 항체로서 상기 A22 또는 3A21이 입자표면에 제시된 HBsAg-scFv 입자는, 실제로 A431 세포에 대해서 극히 높은 특이성을 갖는 것이 나타났다.

(실시예 F)

본 실시예에서는, HBsAg L 단백질의 사람 간세포 인식부위인 Pre-S 영역(pre-S1, pre-S2)의 아미노산을 결실시킨, 각종 결실형 HBsAg L 단백질을 발현시키고, 결실된 아미노산 영역의 상위성에 의한, 진핵세포에서의 발현량의 차이와 항원성에 대해서 평가하였다.

(실시예 F-1) 결실형 HBsAg L 단백질 발현 유전자의 작성

이하의 방법으로 PCR을 행하고, 결실형 HBsAg L 단백질 발현 유전자를 작성하였다.

결실형 HBsAg L 단백질로서, Pre-S 영역(pre-S1, pre-S2)의 일부를 결실시킨 하기(a) 내지 (e)에 나타난 5종의 결실형 HBsAg L 단백질을 발현하는 결실형 HBsAg L 단백질 발현 유전자를 작성하였다. 본 실시예에 있어서의 결실형 HBsAg L 단백질은, 구체적으로는, (a) pre-S 영역의 N 말단으로부터 21번째 내지 153번째 아미노산이 결실(도 12에 있어서는, Δ 21-153, 이하 동일한 양태), (b) pre-S 영역의 N 말단으로부터 33번째 내지 153번째 아미노산이 결실(Δ 33-153), (c) pre-S 영역의 N 말단으로부터 50번째 내지 153번째 아미노산이 결실(Δ 50-153), (d) pre-S 영역의 N 말단으로부터 108번째 내지 153번째 아미노산이 결실(Δ 108-153), (e) pre-S 영역의 N 말단으로부터 127번째 내지 153번째 아미노산이 결실(Δ 108-153)되어 있는 것이다.

우선, (a) 내지 (e)에 상당하는 결실형 HBsAg L 단백질 발현 유전자를 증폭시키기 위해서, 진술한 바와 같이 하여, PCR 방법을 pB0477(발명자가 작성한 HBsAg L 단백질 발현 유전자 조입을 마친 플라스미드)에 대해서 행하였다. PCR 용의 프라이머로서는, 서열번호 15 내지 24에 기재된 올리고뉴클레오타이드를 사용하였다. 또, 서열번호 15 내지 24에 기재된 올리고뉴클레오타이드는, 서열번호 15 및 16이 (a)의 결실형 HBsAg L 유전자를 증폭하기 위한 것이고, 마찬가지로, 서열번호 17 및 18이 (b), 서열번호 19 및 20이 (c), 서열번호 21 및 22가 (d), 서열번호 23 및 24가 (e)의 결실형 HBsAg L 유전자를 증폭하기 위한 것이다. 또, 서열번호 15 내지 24의 프라이머중, 홀수가 전방(forward) 프라이머이고, 짝수가 역방(reverse) 프라이머이다.

PCR 반응 조성은, 도 13에 나타난 바와 같이, 내열성 DNA 폴리머라제로서 Pyrobest DNA polymerase(TaKaRa)(0.5μL), PCR 완충액(5μL×10), dNTP 혼합물(10mM, 5μL), 템플레이트(Template) DNA(pB0477)(발명자가 작성한 HBsAg L 단백질 발현 유전자 조입을 마친 플라스미드)(5μL/mL, 2μL), 프라이머 세트(서열번호 15 내지 24)(각 1μL)를 함유하고, 증류수로 전량을 50μL로 하였다.

또, PCR 반응 사이클은, 도 14에 제시된 바와 같이, 98°C 30초간의 변성후, 98°C 30초간의 변성, 55°C 1분간의 어닐링, 및 68°C 30분간의 합성 반응을 30회 반복한 후, 4°C로 냉각하여 반응을 종료하였다. 그 후, 템플레이트 DNA를 절단하기 위해서, PCR 산물에 제한효소 *DpnI*(10U)를 가하고, 37°C에서 1시간 인큐베이션하고, 대장균 JM109주에 형질전환하였다. 이어서, 출현콜로니로부터 플라스미드를 추출하고, 염기배열을 확인하였다.

이어서, 결실형 HBsAg L 단백질 발현 유전자에 제한효소 Not I 부위를 도입하였다. 도 15는 이렇게하여 증폭된 결실형 HBsAg L 단백질 발현 유전자에 제한효소 NotI 부위를 도입한 발현 유전자 및 당해 유전자를 조입한 플라스미드의 모식도이다. 당해 도에 있어서, Oaa는, 결실형 HBsAg L 단백질 발현 유전자의 선두(5' 말단)에 제한효소 NotI 부위를, 25aa는, 5'말단으로부터 25 아미노산 잔기부분 뒤(3' 말단측)의 위치에 NotI 부위를, Δ preS는, S 단백질 발현 유전자의 선두(5' 말단)에 제한효소 NotI 부위를 삽입한 것이다.

이러한, NotI 부위가 삽입된 결실형 HBsAg L 단백질 발현 유전자를, 동물세포 발현용의 플라스미드 pBO477(발명자가 작성한 HBsAg L 단백질 발현 유전자 조입을 마친 플라스미드)에, XhoI에 의해, HBsAg L 단백질 발현 유전자의 재조합을 행하였다.

또, 도 15이하의 도면에 있어서는 예를 들면, Δ127-153은, 도12의 HBsAg L 단백질 발현 유전자에 있어서의 127번째 내지 153번째까지의 아미노산을 암호화하는 유전자가 결실되어 있음을 나타내는 것이다(이하 동일한 양태). 또, Δ preS는, pre-S영역 (pre-S1, pre-S2)의 전체 아미노산을 암호화하는 유전자가 결실되어 있는 것을 나타내는 것이다.

#### (실시예 F-2) 동물세포에 의한 결실형 HBsAg L 단백질의 작제

실시예 F-1에서 구책을 마친 플라스미드(2μg)를 Cos7세포(3 내지 8×10<sup>4</sup>개)에 일렉트로포레이션(300V, 950μF)으로 형질전환시키고, 4일간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 존재하에서 정치배양하였다. 그 후, 배지상청액 및 세포 추출액을 효소면역측정장치 IMx(다이나보트)로 변이형 L 입자(결실형 HBsAg L 단백질)의 생성량을 항원성을 기준으로 하여 측정하였다. 배지상청의 측정에서는, PBS에 의해 등배희석한 것을, 세포내는, Lysis buffer(20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 10mM 2-머캅토에탄올, 1%(v/v) TritonX-100)에 따라, 세포를 용해시키고, 원심 상청을 PBS로 200배 희석하는 것으로 측정하였다.

도 16(a)(b) 및 도 17에 변이형 L 입자의 생성량을 측정한 결과(수치·그래프)를 나타낸다. 또, 도 16(a)(b) 및 도 17에 있어서, S/N 값 및 RATE가 크면 클수록, 항원성이 높다는 것을 나타내고 있다. 역시, Δ21-153, Δ33-153, Δ50-153, 특히, Δ50-153의 결실형 HBsAg L 단백질이 양호한 결과가 수득되었다.

또, 도 18 및 도 19에 나타낸 바와 같이, SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅에 따라서도 발현량을 확인하였다. 이 경우의 1차 항원에는, mouse anti-S 단백질 항체(발명자가 작성)를, 2차 항원에는 anti-mouse IgG 항체 AP 표식(Promega)을 사용하였다. 또, 도 19는 N 결합형 당쇄 제거를 위한 효소 처리(EndH) 후의 웨스턴블로팅의 결과이고, 분자량을 병행해서 기재하고 있다. 또, EndH 처리에 의해서, 생성된 변이형 L 입자의 Pre-S 영역에 N 결합형 당쇄가 부가되어 있다는 것이 판명되었다. 또, 도 19에 있어서의 Δ51-66에 대해서는, 실시예 F-1의 방법에 따라서, 서열번호 25 및 26 기재의 프라이머를 사용하여 작제한 플라스미드를 사용하였다.

이상의 결과, 특히, 상기 (a) 내지 (c)의 결실형 HBsAg L 단백질의 발현량이 양호한 결과를 나타내었다.

#### (실시예 F-3) 상피증식인자(EGF)를 삽입한 결실형 HBsAg L 단백질 입자의 작제

이어서, 발현량이 양호하였던 상기 (a) 내지 (c)의 결실형 HBsAg L 단백질 발현 유전 인자(Δ21-153, Δ33-153, Δ50-153)에 Not I 부위에 따라 EGF 유전자를 삽입하고, 발현시켰다. EGF 유전자는, 발명자들이 작제한 pGLDLIP39-RcT-EGF로부터 제한효소 NotI를 사용하여 절출하여 수득하였다. 이들을 Cos7 세포에 형질전환하고, 혈청배지에 24시간 배양 후, 무혈청 배지로 교환하고, 3일간 배양하였다. 이들의 배지를 회수하고, 한외여과에 따라 농축을 하고, 각 변이형 L 입자(상기 (a) 내지 (c)의 결실형 HBsAg L 단백질)을 수득하였다.

각각의 입자에 녹색형광 단백질 발현 플라스미드(pEGFP-F(Clontech사))를 50V, 750 $\mu$ F의 조건에서 일렉트로포레이션 하고, 입자내부에 GFP 발현 플라스미드를 포함시키고, 간세포 HepG2 및 상피세포 A431에 유전자도입실험을 시도하였다. GFP에 의한 형광을 관찰한 결과, 간세포 HepG2로의 특이성은 소실하고, 상피 세포 A431에 대해서 높은 선택성을 나타내었다. 이와 같이하여, 상피 세포 A431에 대한 재표적화에 성공하였다.

(실시예 F-4) 효모세포로의 형질전환에 의한 결실형 HBsAg L 단백질의 작제

Cos7 세포에서 발현량이 많았던  $\Delta 21-153$ ,  $\Delta 33-153$ ,  $\Delta 50-153$ (상기 (a) 내지 (c)의 단백질)을 발현하는 유전자를 XhoI 부위에 의해 절출하고, 효모발현형 플라스미드 pGLDLIIp39-RcT의 XhoI 부위에 삽입하여 구축하였다(도 20참조). 이들의 효모 발현용 플라스미드를 효모 *S. cerevisiae* AH22R<sup>-</sup>에 스페로플라스트법에 의해 형질전환하고, 형질전환체를 획득하였다. 이들의 형질전환체를 공업용배지 High-Pi3일간, 8S5N-P400 배지 3일간 배양을 행하고, 균체를 회수하였다. 균체를 유리 비즈에 의해 파쇄하고, 세포추출액을 배양효모 효소면역측정장치 IMx(다이나보트)에 의해 항원성을 측정함과 동시에, SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅(1차 항체 anti-S단백질 항체, 2차 항체 AP 표식 anti-mouse IgG 항체 사용)에 의해 발현량을 확인하였다(도 21 내지 도 22 참조).

또, 이전에 사용하고 있는 단백질 A의 ZZ 도메인 유전자를 제시하기 위한 플라스미드, EGF를 제시하기 위한 플라스미드 도 NotI 부위를 사용하여 구축을 행하였다(도 20 참조). 이렇게하여, 결실형 HBsAg L 단백질 고발현 효모균체내 고발현용 플라스미드(pGLDLIIp39-RcT- $\Delta 50-153$ , pGLDLIIp39-RcT- $\Delta 33-153$ , pGLDLIIp39-RcT- $\Delta 21-153$ , pGLDLIIp39-RcT- $\Delta 50-153$ -ZZ, pGLDLIIp39-RcT- $\Delta 33-153$ -ZZ, pGLDLIIp39-RcT- $\Delta 21-153$ -ZZ, pGLDLIIp39-RcT- $\Delta 50-153$ -EGF, pGLDLIIp39-RcT- $\Delta 33-153$ -EGF, pGLDLIIp39-RcT- $\Delta 21-153$ -EGF, 및 대조균용으로 pGLDLIIp39-RcT- $\Delta 3-66$ )를 획득하였다. 이들 효모발현용 플라스미드도 효모 *S. cerevisiae* AH22R<sup>-</sup>에 스페로플라스트법에 의해 형질전환하고, 형질전환체를 획득하였다. 이들을 공업용배지 High-Pi3일간, 8S5N-P400 배지 3일간 배양을 행하고, 균체를 회수하였다. 균체를 유리 비즈에 의해 파쇄하고, 세포추출액을 배양효모 효소면역측정장치 IMx(다이나보트)에 의해 항원성을 측정(도 21 내지 도 22 참조)하는 것에 의해 발현량을 확인하였다.

그 결과, 효소 면역측정에 의해 결실형 입자의 형성이 확인되었다.  $\Delta 21-153$ .,  $\Delta 33-153$ .,  $\Delta 50-153$ . 결실형 HBsAg L 단백질(결실형 HBsAg 입자)의 항원성은, 야생형 입자(도면에서 LAg)에 가까운 수치를 나타내었다(도 21 및 도 22 참조). 한편, 도시되어 있지 않지만, 대조균으로서 작제한  $\Delta 3-66$ . 결실형 HBsAg 입자는 형질전환체로부터 획득되지 않았다. 그 중에서도  $\Delta 50-153$  결실형 HBsAg 입자는, ZZ 도메인을 제시한 결실형 HBsAg 입자( $\Delta 50-153 + ZZ$ )의 발현량도 극히 높기 때문에, 발현량이 야생형보다 많아 생산성에 있어서도 상당히 유리하다.

또, 발명을 실시하기 위한 최량의 형태의 항에 있어서 없는 구체적인 실시 양태는 또는 실시예는 어디까지나 본 발명의 기술내용을 명확하게 하는 것이고, 그러한 구체에로만 한정하여 협의로 해석되어서는 안되고, 본 발명의 취지와 이어서 기재하는 청구의 범위내에서, 여러가지로 변경하여 실시할 수가 있는 것이다.

### 산업상 이용 가능성

이상과 같이, 본 발명에 따는 약제는, 입자 표면에 암특이적 항체 등의 항체가 제시되어 있기 때문에, 정맥주사라고 하는 간편한 방법으로, 특정의 세포 또는 조직에 있어서의 질환을 특이적이고 효과적으로 치료할 수 있고, 종래의 유전자 치료와 크게 상이하고, 외과수술을 필요로하지 않으며, 부작용의 염려가 극히 적어, 그대로 임상 응용이 가능한 것이다.

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1.

암 세포 또는 암 조직에 대한 항체가 제시되고, 돌연변이된 B형 간염 바이러스 표면 항원 단백질로 이루어진 중공 나노입자에, 단순 헤르페스바이러스 유래 티미딘키나제가 포함되어 이루어지고, 상기 돌연변이된 B형 간염 바이러스 표면 항원 단백질은 pre-S 영역의 아미노산 일부를 결실하도록 돌연변이되어 있고 혈청형 y 타입이고, pre-S 영역의 전체 아미노산 서열 중, 적어도 N 말단으로부터 1번째 내지 20번째 아미노산 잔기를 보유하도록 돌연변이되어 있으며, 추가로 pre-S 영역의 전체 아미노산 서열 중, N 말단으로부터 50번째 내지 153번째의 아미노산을 결실하도록 돌연변이되어 있는 약제.

**청구항 2.**

제1항에 있어서, 항체가 암특이적 항체 또는 항바이러스성 단백질 항체임을 특징으로하는 약제.

**청구항 3.**

제1항에 있어서, 항체가 입자 형성능을 갖는 단백질에 융합한 ZZ 태그와의 결합에 의해 입자 표면에 제시됨을 특징으로 하는 약제.

**청구항 4.**

제1항에 있어서, 항체가 비오틴 수식된, 입자 형성능을 갖는 단백질에 융합한 스트랩태그와 결합한 스트렙트아비딘 또는 그 유도체와, 상기 비오틴과의 결합에 의해 입자 표면에 제시됨을 특징으로 하는 약제.

**청구항 5.**

제1항에 있어서, 항체가 입자 형성능을 갖는 단백질에 융합한 일본쇄임을 특징으로 하는 약제.

**청구항 6.**

제1항에 있어서, 중공 나노입자가, 진핵세포에서 발현시킴으로써 수득됨을 특징으로 하는 약제.

**청구항 7.**

제6항에 있어서, 진핵세포가 효모, 곤충세포 또는 동물세포중의 어느 하나임을 특징으로 하는 약제.

**청구항 8.**

삭제

**청구항 9.**

삭제

**청구항 10.**

삭제

**청구항 11.**

삭제

**청구항 12.**

삭제

**청구항 13.**

삭제

청구항 14.

삭제

청구항 15.

삭제

청구항 16.

제1항에 있어서, 정맥 주사에 의해 인체에 투여됨을 특징으로 하는 약제.

청구항 17.

삭제

청구항 18.

입자 형성능을 갖고, pre-S 영역의 전체 아미노산 서열 중, 적어도 N 말단으로부터 1번째 내지 20번째 아미노산 잔기를 보유하도록 돌연변이된 혈청형 y 타입의 B형 간염 바이러스 표면 항원 단백질로 이루어지고 또한 돌연변이된 B형 간염 바이러스 표면 항원 단백질은 추가로 pre-S 영역의 전체 아미노산 서열 중, N 말단으로부터 50번째 내지 153번째의 아미노산을 결실하도록 돌연변이되어 있음을 특징으로 하는 중공 나노입자.

청구항 19.

삭제

청구항 20.

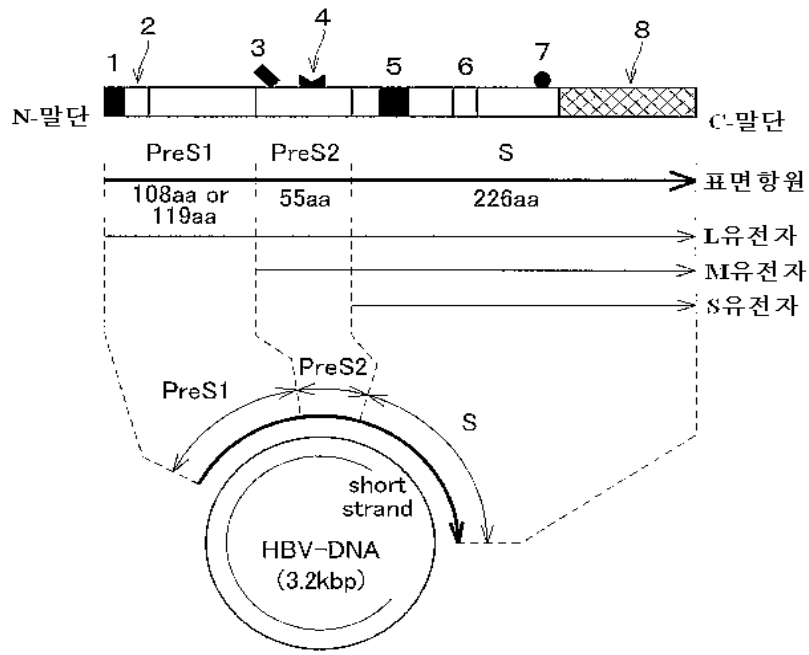
삭제

청구항 21.

삭제

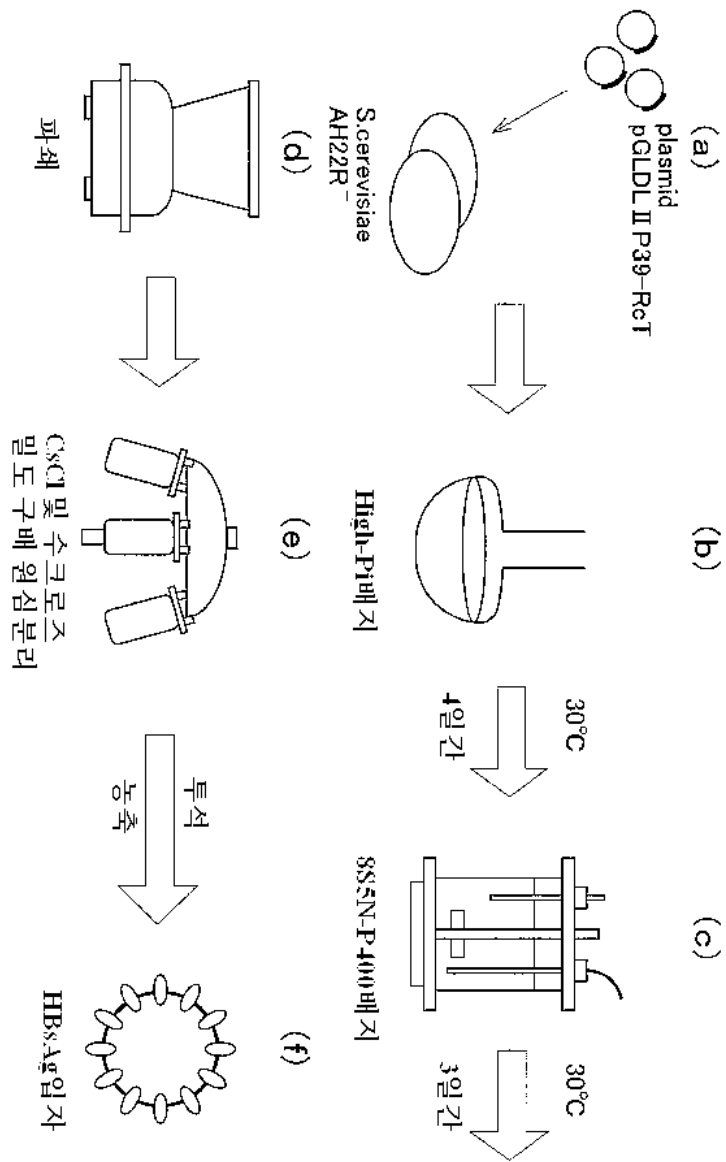
도면

도면1

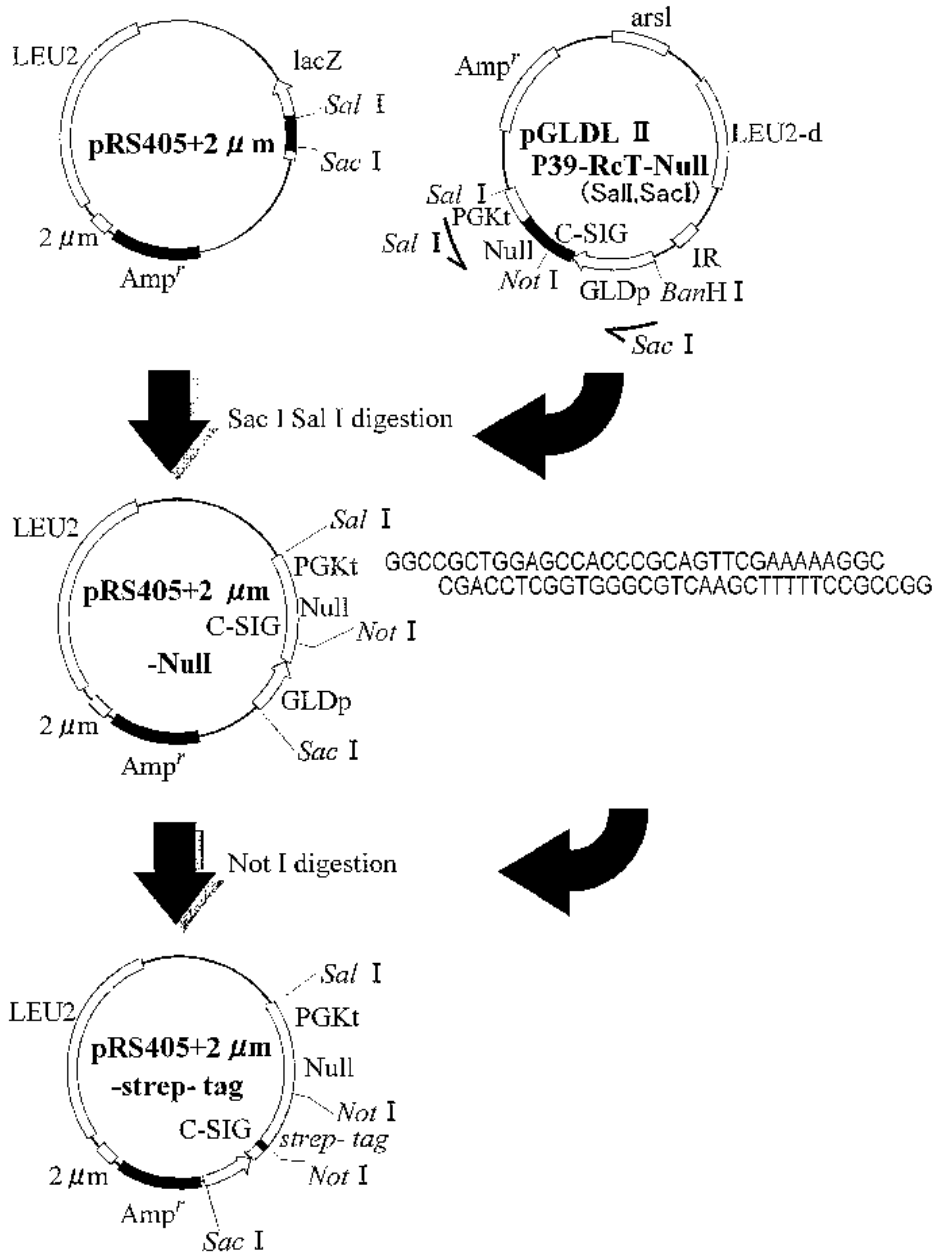


- 1 입자형성 억제 부위
- 2 직접적인 사람 간 세포 특이적 수용체
- 3 당쇄 1
- 4 간접적인 사람 간 세포 특이적 수용체 (중합 사람 혈청 알부민 수용체)
- 5 막 관통 영역 1
- 6 막 관통 영역 2
- 당쇄 2
- 8 막 관통 영역 3

도면2

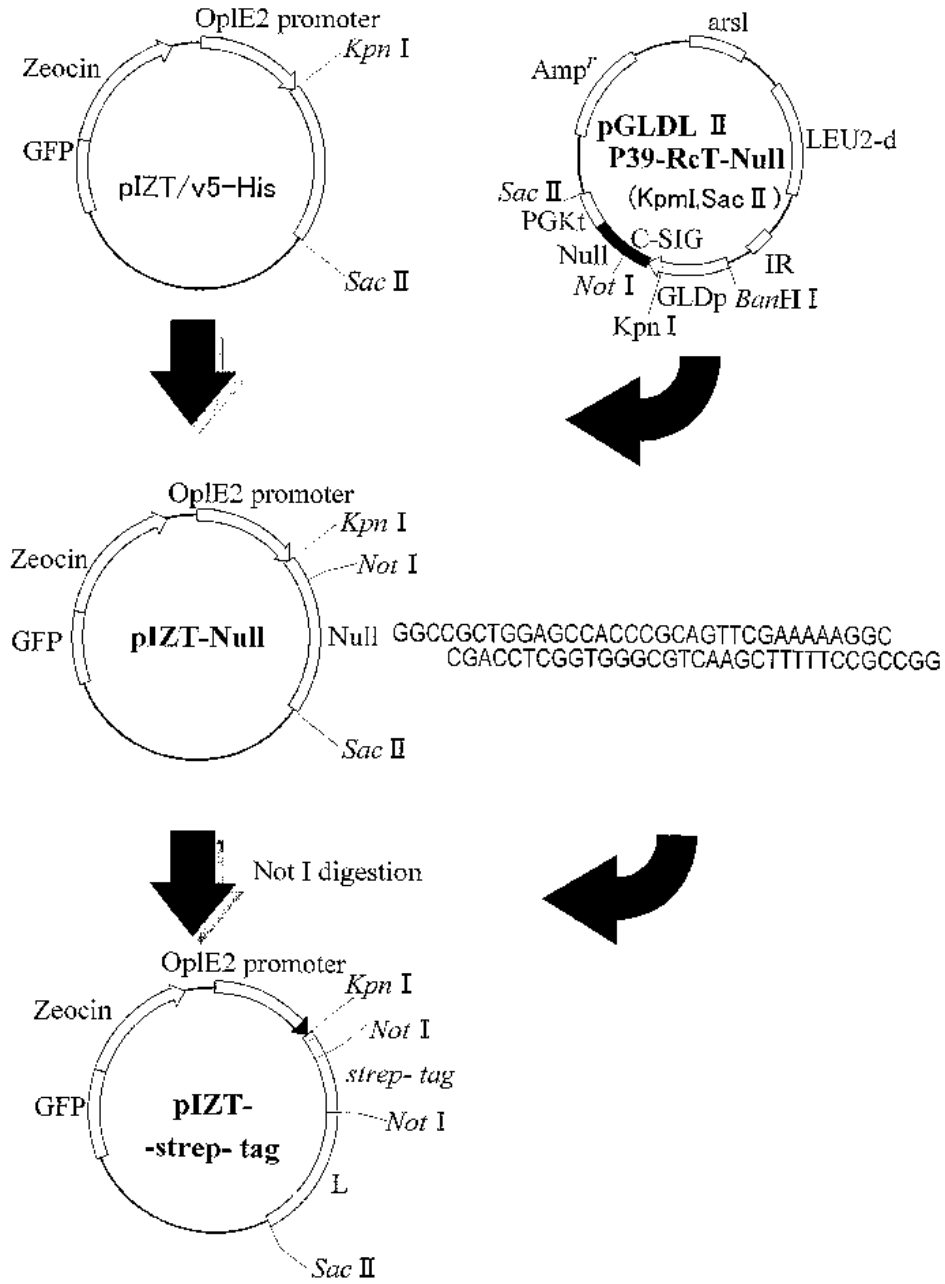


도면3

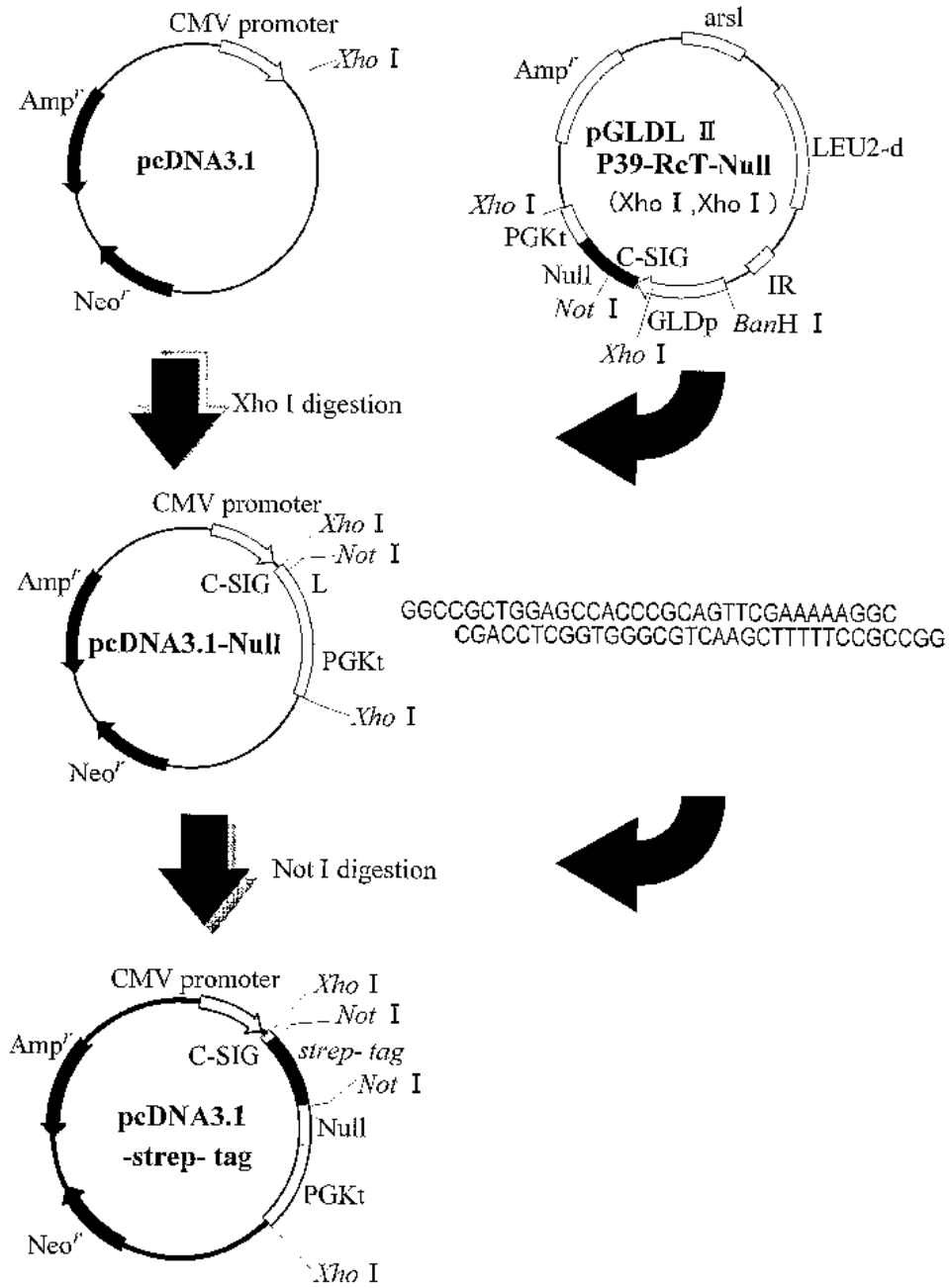




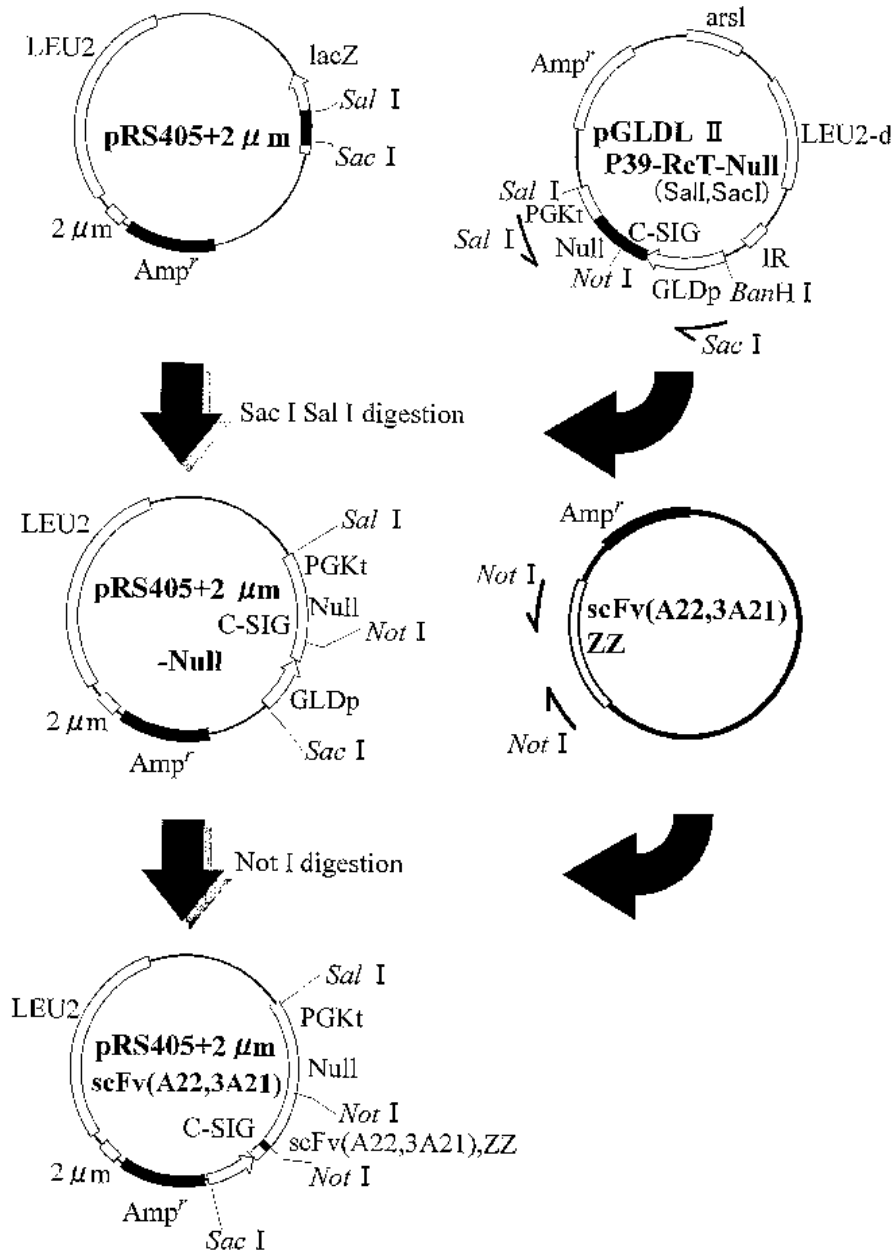
도면4



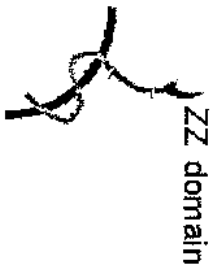
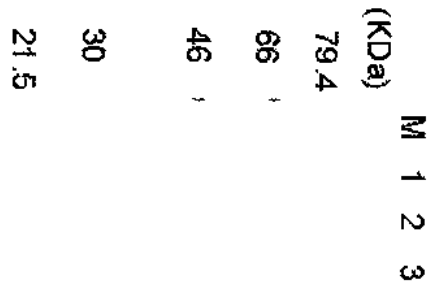
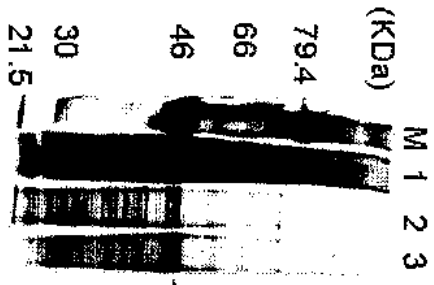
도면5



도면6

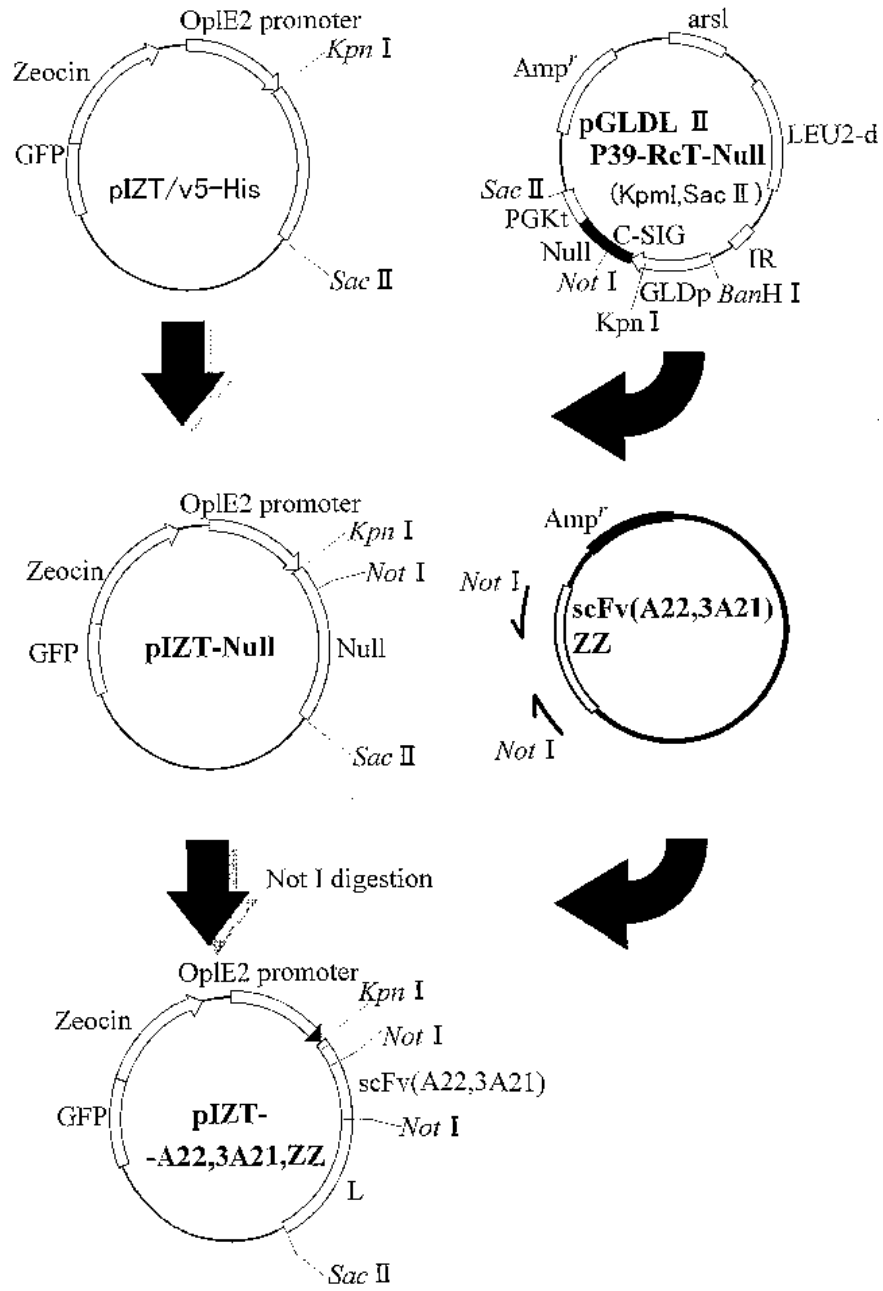


도면7

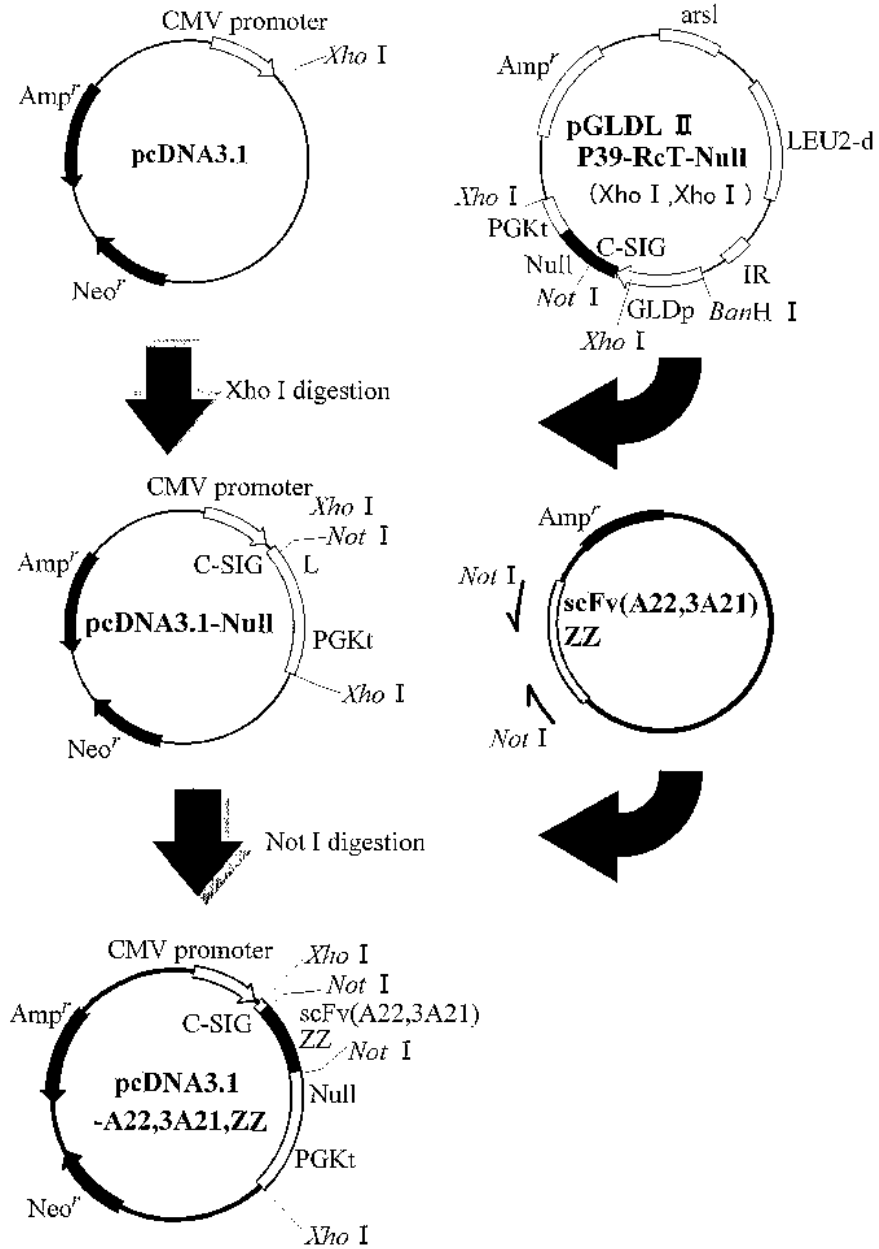


M: 마커  
 1: L입자(52kDa)  
 2: 효모 주출액  
 3: ZZ 도메인 제 시입자(56kDa)

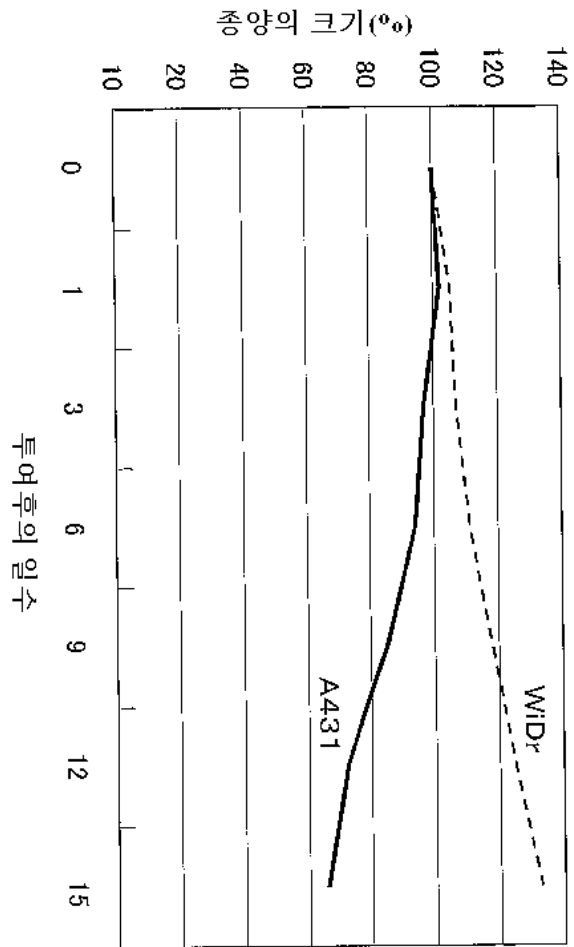
도면8



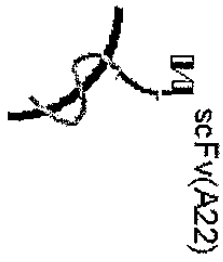
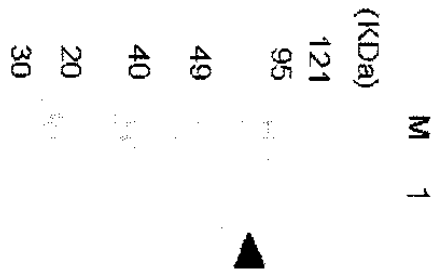
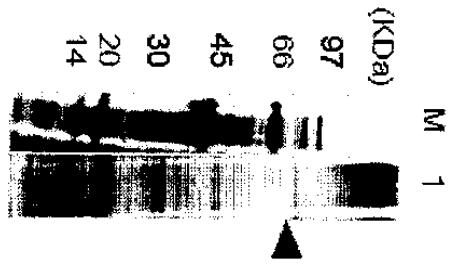
도면9



도면10



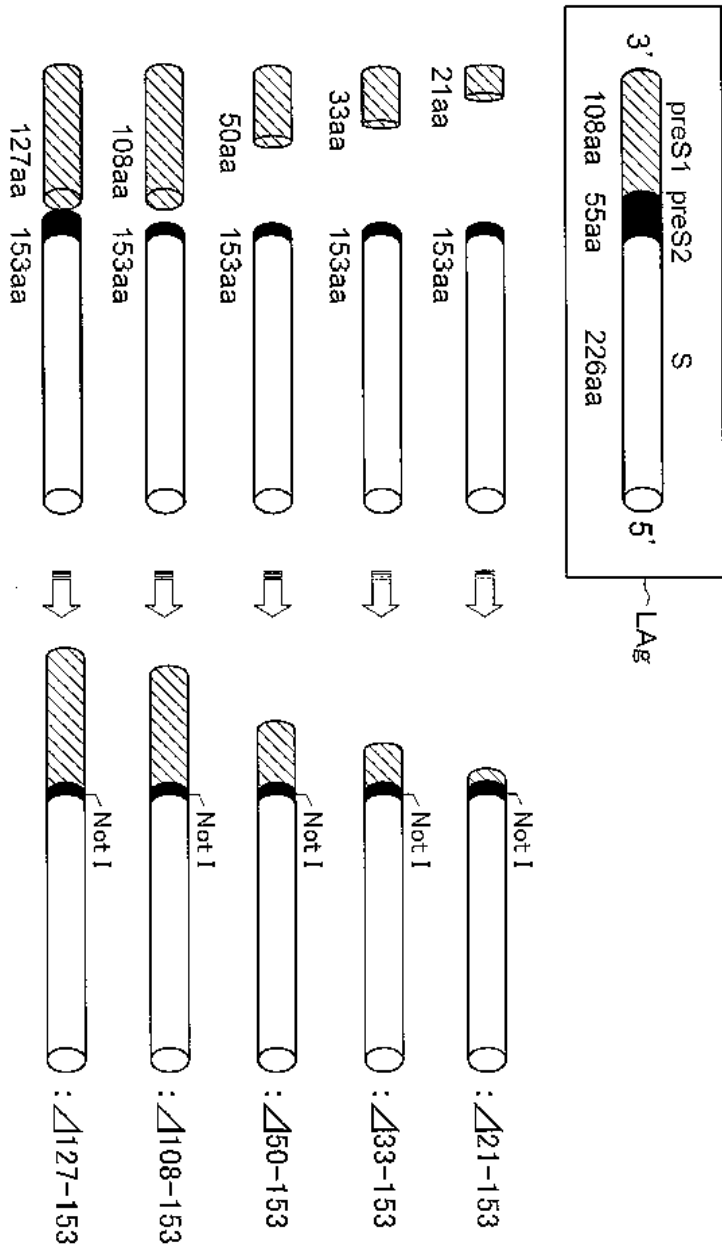
도면11



ME: 마커  
I: A22 제사입자(6kDa)



도면12



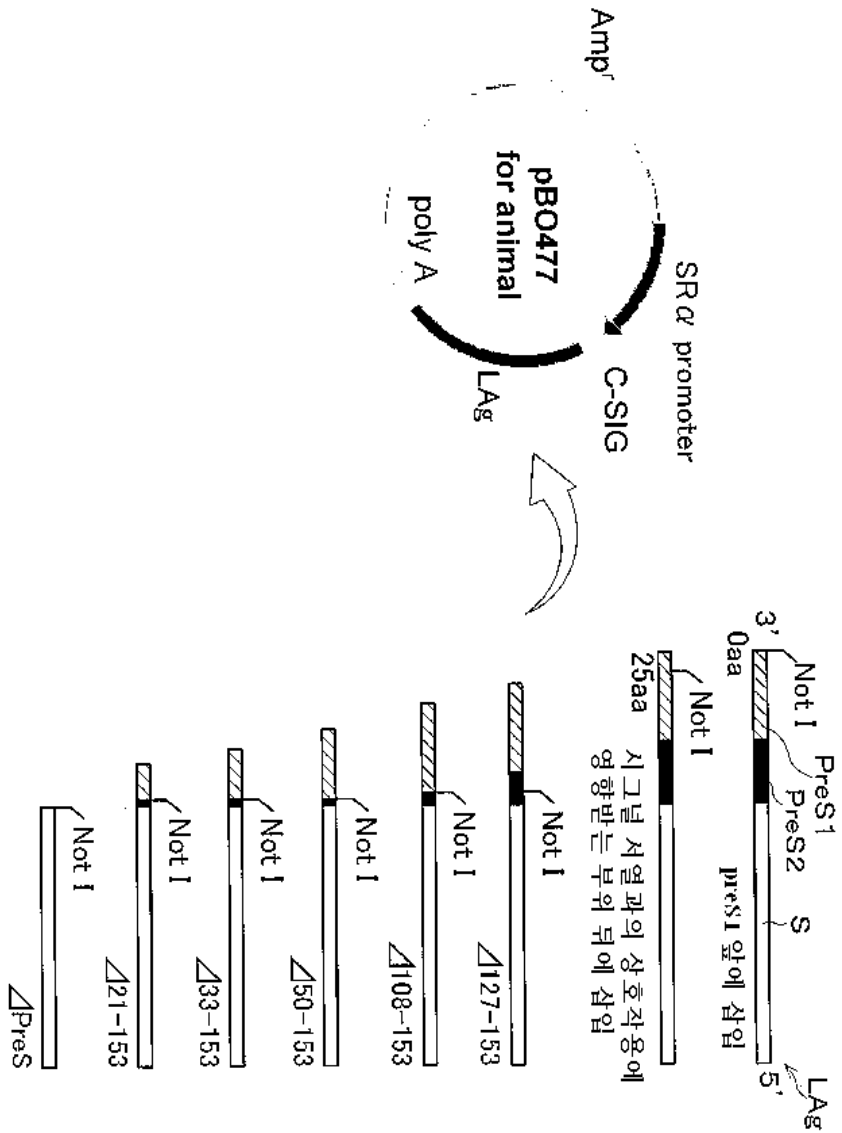
도면13

Pyrobest	DNA 0.5 $\mu$ l
폴리머라제 (TaKaRa)	
10 $\times$ PCR 완충액	5 $\mu$ l
dNTP 혼합물(10mM)	5 $\mu$ l
템플레이트 DNA (5 $\mu$ g/ml)	2 $\mu$ l
프라이머 (F)(100 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
프라이머 (R)(100 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
증류수	35.5 $\mu$ l
전체량	50 $\mu$ l

도면14

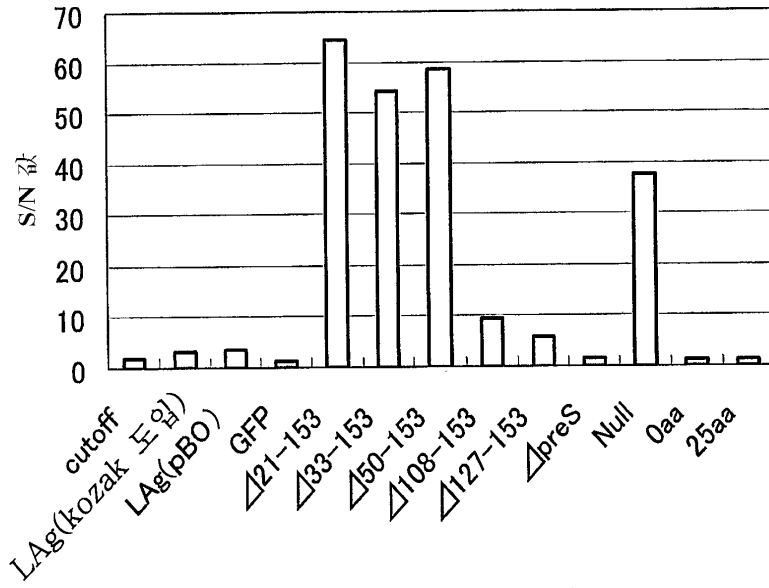
	사이클	온도	시간
1	1	98 $^{\circ}$ C	30 sec.
2	30	98 $^{\circ}$ C	30 sec.
		55 $^{\circ}$ C	1 min.
		68 $^{\circ}$ C	30 min.
3	1	4 $^{\circ}$ C	$\infty$

도면15



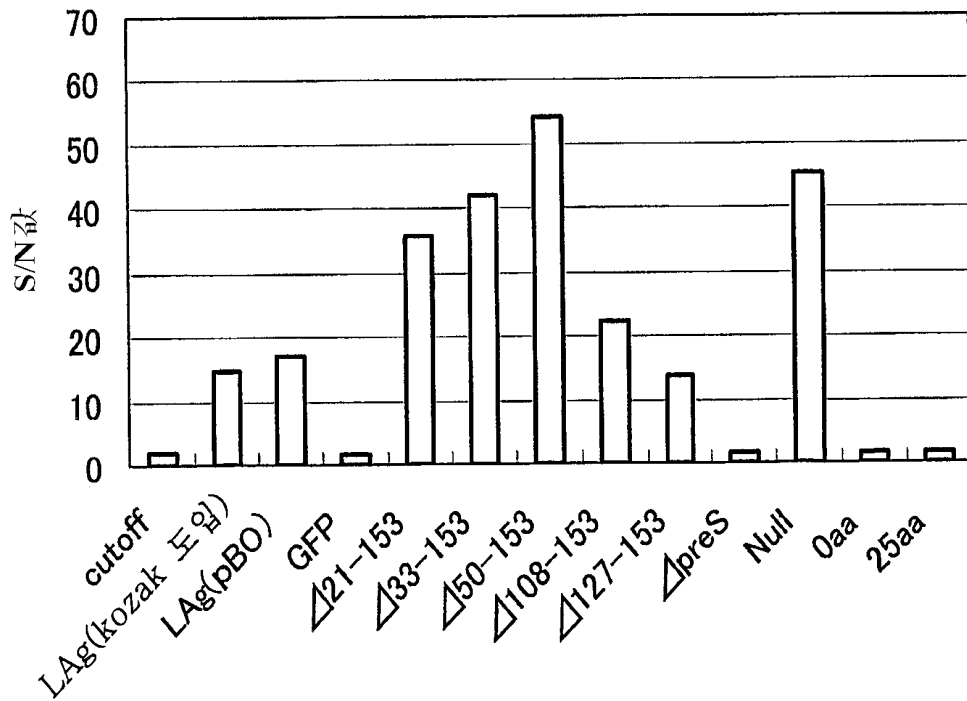
도면16a

배지상청(2배희석)



도면16b

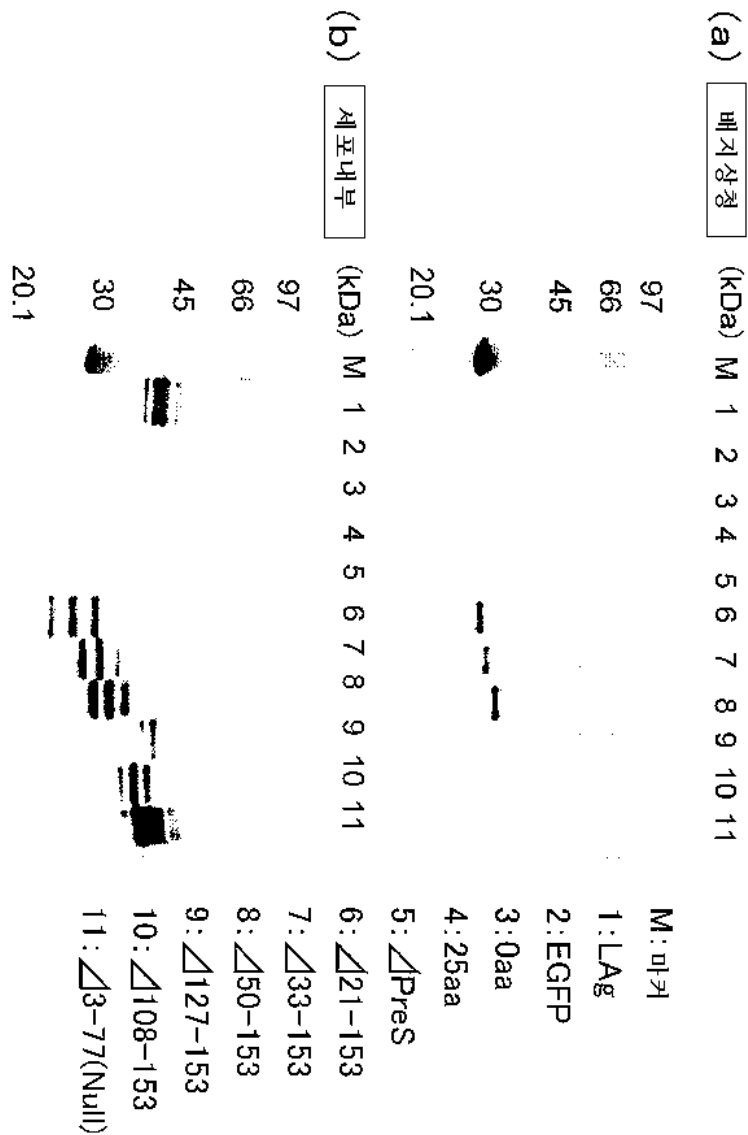
세포내부(200배희석)



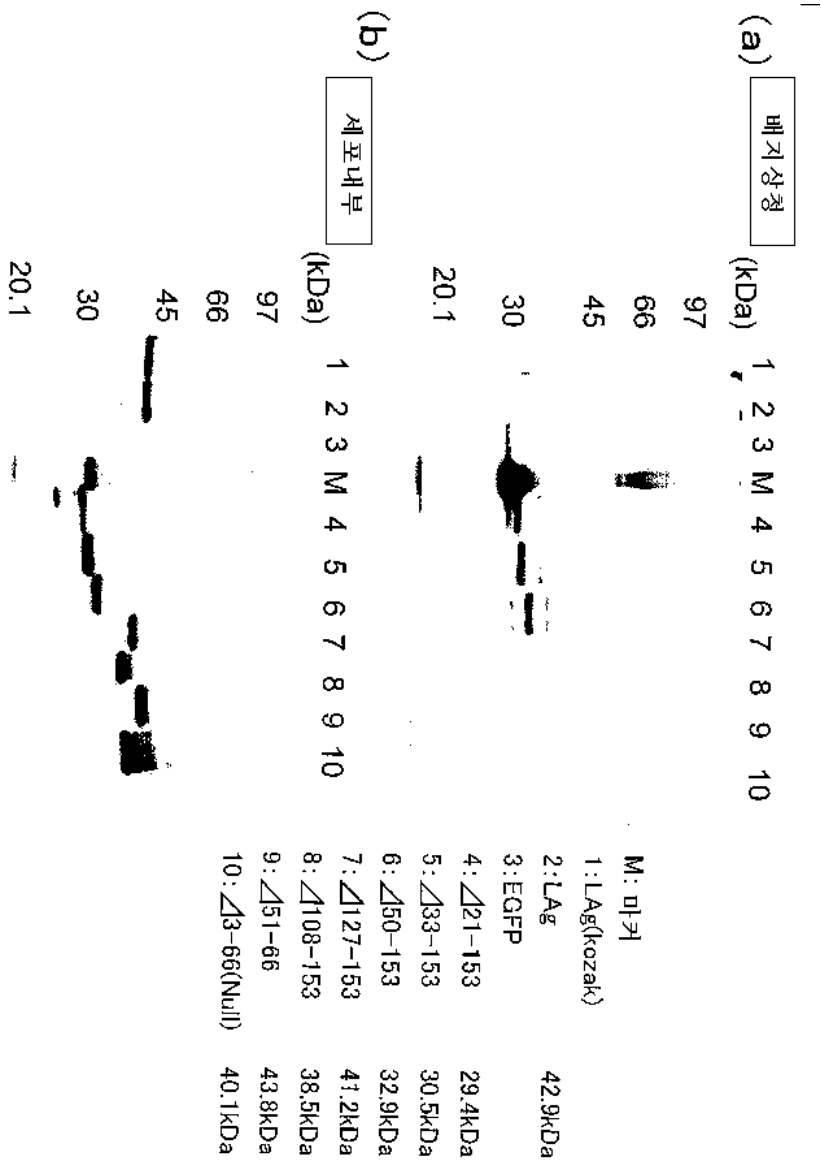
도면17

plasmid	배지상청(2배희석)			세포내(200배희석)		
	S/N	RATE	판정	S/N	RATE	판정
LAg(kozak 도입)	3.13	26.6	R	14.74	115.0	R
LAg(pBO)	3.68	31.3	R	17.00	132.6	R
GFP	1.41	12.0		1.69	13.2	
△21-153	64.54	548.6	R	35.79	279.2	R
△33-153	54.39	462.3	R	42.03	327.8	R
△50-153	58.67	498.7	R	54.19	422.7	R
△108-153	9.58	81.4	R	22.32	174.1	R
△127-153	5.93	50.4	R	13.73	107.1	R
△preS	1.52	12.9		1.59	12.4	
Null	37.73	320.7	R	45.41	354.2	R
Oaa	1.42	12.1		1.65	12.9	
25aa	1.46	12.4		1.6	12.5	

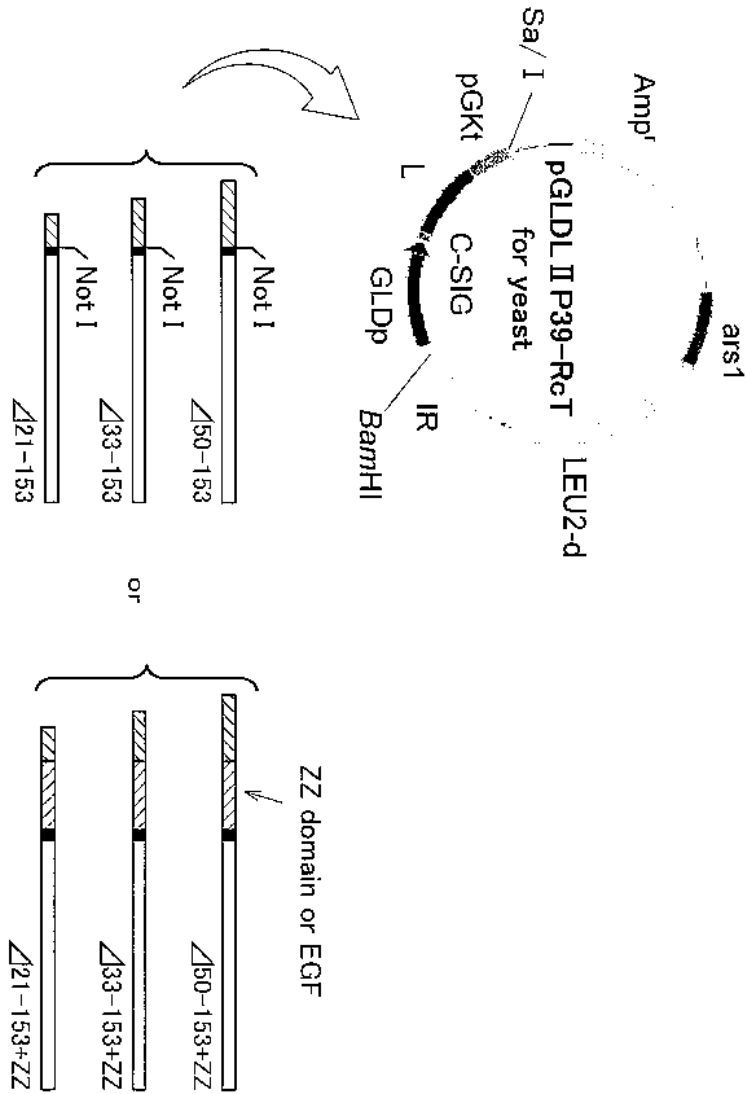
도면18



도면19



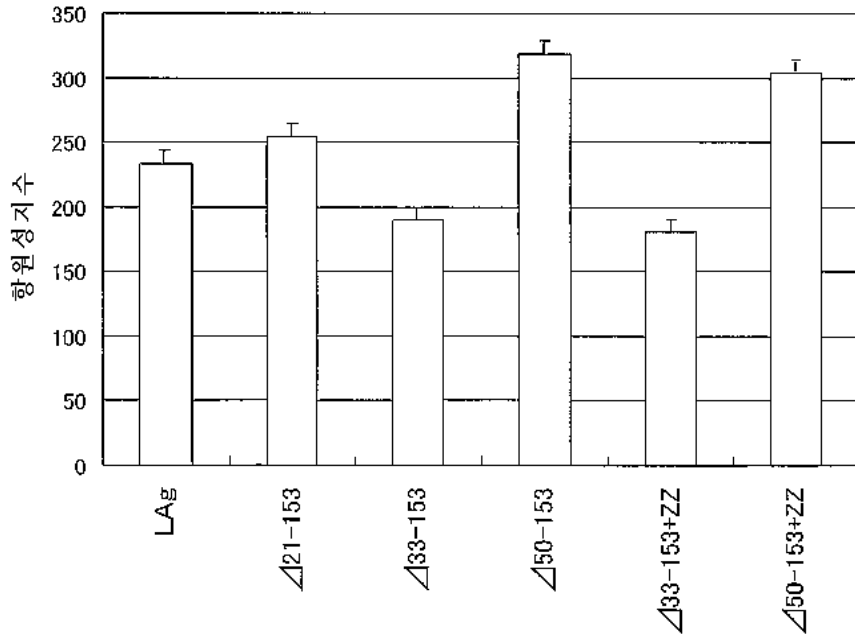
도면20



도면21

균주	S/N
LAg	233
$\Delta 21-153$	255.03
$\Delta 33-153$	189.22
$\Delta 50-153$	318.45
$\Delta 21-153+ZZ$	...
$\Delta 33-153+ZZ$	280.18
$\Delta 50-153+ZZ$	304

도면22





도면23

RNase 등의 세포질 RNA를 공격하는 단백질	Pancreatic type Rnases from vertebrates
	RNase 1 or Bovine RNase A
	Eosinophil derived neurotoxin
	Eosinophil cationic protein
	Liver RNase (RNase 4)
	Angiogenin
	Frog Rnases (Onconase etc.)
막투과를 방해하는 단백질	Streptolysin(Streptococcus pyogenes)
	Cholesterol binding toxins (Streptococcus, Bacillus, Clostridium, Listeria)
	alpha-Toxin (Staphylococcus aureus)
	Delta-Toxin (Staphylococcus aureus) and melittin (Apis mellifera)
	Aerotysin (Aeromonas hydrophila)
	Escherichia coli hemolysin
시그널 전달을 방해하는 단백질	Cholera toxin (Vibrio cholerae)
	Heat-labile enterotoxins (Escherichia ColiD)
	Pertussis toxin (Bordetella pertussis)
	Exoenzyme C3 (Clostridium botulinum)
	Adenylate cyclase toxin (Bordetella sp.)
단백질 합성을 방해하는 단백질	Anthrax edema factor (Bacillus anthracis)
	Diphtheria toxin (Corynebacterium diphtheriae)
	Pseudomonas aeruginosa exotoxin A
	Shiga toxins (Shigella dysenteriae serotype I, Escherichia Coli)
	Ricin (Ricinus communis)
세포 골격을 교란하는 단백질	Ribosome-inactivating proteins
	alpha-Sarcin and related toxins (Aspergillus)
	C2 toxin (Clostridium botulinum type C and D)
	Cytotoxic necrotizing factors (Escherichia coli)
	Enterotoxin A and cytotoxin B (Clostridium difficile)
	ActA (Listeria monocytogenes)
IcsA (Shigella flexneri)	
Zonula occludens toxin (Vibrio cholerae)	

도면24

면역 또는 염증 반응을 억제하는 단백질	Pyrogenic exotoxins (superantigens) (Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes)
	Anthrax lethal toxin (Bacillus anthracis)
	Leukocidins and gamma lysins (Staphylococcus sp.)
막 운송을 교란하는 단백질	Tetanus neurotoxin (Clostridium tetani)
	VAMP-specific botulinum neurotoxins
	Botulinum neurotoxins type A and E (Clostridium botulinum)
	Botulinum neurotoxin type G (Clostridium botulinum)
	Vacuolating cytotoxin (Helicobacter pylori)
나트륨 채널을 교란 단백질	alpha-Scorpion toxins
	beta-Scorpion toxins
	Excitatory insect selective neurotoxins from scorpion venoms
	Depressant insect selective neurotoxins from scorpion venoms
	mu-Conotoxins (Conus geographus)
	mu-Agatoxins (Agelenopsis aperta)
	Anthopleurin-A, -B, and -C (anemone toxin)
	Anemone toxins (type II)
	Calitoxins
칼륨 채널 교란 단백질	Kaliotoxin
	Scyllatoxin (Leiurus quinquestriatus hebraeus)
	Apamin (honey bee Apis mellifera)
	MCD peptide (honey bee Apis mellifera)
	Charybdotoxin and iberiotoxin (Leiurus quinquestriatus var. hebraeus and Buthus tamul us)
	Margatoxin, noxiustoxin, and kaliotoxin (Centruroides margaritatus, Centruroides noxius, Androctonus mauretanicus)
	Dendrotoxins (Dendroaspis species)
	Sea anemone potassium channel toxins

도면25

칼슘 채널 교란 단백질	Omega-Conotoxins ( <i>Conus</i> spp.)
	Omega-Agatoxins ( <i>Agelenopsis aperta</i> )
	Omega-Grammotoxin SIA ( <i>Grammostola spatulata</i> Chilean pink tarantula)
	Hololena toxin ( <i>Hololena curta</i> )
	PLTXII ( <i>Plectreurys tristis</i> )
	Calciseptine ( <i>Dendroaspis polylepis</i> )
	Calcicludeine ( <i>Dendroaspis angusticeps</i> )
	beta-Leptinotarsin-h
	Taicatoxin ( <i>Oxyuranus scutellatus scutellatus</i> )
아세틸콜린 수용체 교란 단백질	alpha-Bungarotoxin ( <i>Bungarus multicinctus</i> )
	alpha-Cobratoxin ( <i>Naja kaouthia</i> )
	Erabutoxins ( <i>Laticauda semifasciata</i> )
	Toxin alpha (' <i>Naja nigricollis</i> ')
	kappa-Bungarotoxin ( <i>Bungarus multicinctus</i> )
	alpha-Conotoxins ( <i>Conus</i> spp.)
	Snake toxins against muscarinic acetylcholine receptors
	Muscarinic toxin-1~5, -7, m1-toxin from green mamba ( <i>Dendroaspis angusticeps</i> )
Muscarinic toxin-alpha, -beta from black mamba ( <i>Dendroaspis polylepis</i> )	
리아노딘 수용체 칼슘 이온 채널 교란 단백질	Helothermine ( <i>Heloderma horridum horridum</i> )

도면26

시냅스전 교란 단백질	beta-Bungarotoxin ( <i>Bungarus multicinctus</i> )
	Rattlesnake venom neurotoxins: crotoxin-related proteins
	Ammodyttoxins ( <i>Vipera ammodytes ammodytes</i> )
	Notoxins ( <i>Notechis scutatus scutatus</i> )
	Textilotoxin ( <i>Pseudonaja textilis textilis</i> )
	Tai poxin
	alpha-Latrotoxin (black widow spider)
	alpha-Latroinsectotoxin ( <i>Latrodectus mactans tred ecimguttatus</i> )
	Pardaxin ( <i>Pardachirus marmoratus</i> )
	Palytoxin (Corals of the spp. <i>Palythoa</i> )
Equinatoxins ( <i>Actinia equina</i> L., sea anemone)	
글루타민산 수용체 교란 단백질	Conantokins ( <i>Conus</i> spp.)

도면27

		G C V 투여후의 일수						
		0	1	3	6	9	1 2	1 5
총양 크기 (%)	A 4 3 1	100	102	97	94	85	72	66
	W i D r	100	105	107	111	118	125	133

서열목록

서열목록 전자파일 첨부