

HIV-1 유래 렌티바이러스 벡터의 복제가능 바이러스 검출과 역가측정 분석방법 비교

장석기 · 오일웅 · 정자영 · 안광수 · 손여원*

식품의약품안전청 생명공학의약품과

(Received February 21, 2005; Revised March 29, 2005)

Comparison of Analysis Methods for Detection of Replication Competent Virus and Functional Titers of HIV-1 Based Lentivirus Vector

Seok Kee Chang, Il Ung Oh, Jayoung Jeong, Kwang Soo Ahn and Yeowon Sohn*

Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

Abstract — Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) based lentivirus vector has demonstrated great potential as gene therapy vectors mediating efficient gene delivery and long-term transgene expression in both dividing and nondividing cells. However, for clinical studies it must be confirmed that vector preparations are safe and not contaminated by replication competent lentivirus (RCL) related to the parental pathogenic virus, HIV-1. In this study, we would like to establish the method for titration and RCL detection of lentivirus vector. The titration was determined by vector expression containing the green fluorescent protein, GFP in transduced cells. The titer was 1×10^7 Transducing Unit/ml in the GFP expression assay and 8.9×10^7 molecules/ml in the real-time PCR. Also, for the detection of RCL, we have used a combination method of PCR and p24 antigen detection. First, PBS/psi and VSV-G region in the genomic DNA of transduced cells was detected by PCR assay. Second, transfer and expression of the HIV-1 gag gene was detected by p24 ELISA. In an attempt to amplify any RCL, the transduced cells were cultured for 3 weeks (amplification phase) and the supernatant of amplified transduced cell was used for the second transduction to determine whether a true RCL was present (indicator phase). Analysis of cells and supernatant at day 6 in indicator phase were negative for PBS/psi, VSV-G, and p24 antigen. These results suggest that they are not mobilized and therefore there are no RCL in amplification phase. Thus, real-time PCR is a reliable and sensitive method for titration and RCL detection of lentivirus vector.

Keywords □ gene therapy, lentivirus vector, safety, replication competent lentivirus, titer

유전자치료 분야에서 벡터의 선정은 치료효과 측면에서 매우 중요한 결정사항이다. 유전자치료를 사용되는 벡터는 전달 유전자의 장기간 발현을 위해 목적세포의 염색체 내로 안정적인 삽입이 가능하여야 하며, 대부분의 바이러스성 유전자는 전달되지 않아야 한다. 그래야만 체내에 존재하는 세포독성 T 세포에 의해 감염된 세포가 파괴되는 것을 막을 수 있다. 특히 렌티바이러스의 경우는 분열하지 않는 세포에도 감염될 수 있기 때문에 분열하는 세포에 한정된 Moloney murine Leukemia Virus (MMLV) 계열 레트로바이러스 벡터가 가지는 단점을 극복할 수

있어 최근 관심이 집중되고 있다. 레트로바이러스는 유사분열시 핵막의 분열이 일어날 때 유일하게 핵으로 들어갈 수 있으며 이런 경우 유전자 전달은 세포주기에 의존적이 되기 때문에 뇌, 망막, 골격근, 간, 조혈모세포 등에서의 사용이 매우 제한적이다. 반면에 렌티바이러스는 핵 이동 신호를 가지고 있어 세포분열의 간기 동안에도 핵공을 통하여 효과적인 유전자 전달이 가능하며 특히 중추신경계와 같이 이미 분화가 정지된 신경세포로의 유전자 전달에 있어서는 렌티바이러스 벡터가 강력한 도구로 사용된다.^{1,4)} 그러나 유전자 전달에서 보여주는 렌티바이러스 벡터의 유용성에도 불구하고 이러한 벡터의 임상시도를 위해서는 안전성 측면에서 그 위해 가능인자가 평가되어야만 한다. 렌티바이러스 벡터를 비롯해서 유전자치료를 사용되는 모든 바이러스 벡터는 안전성 확보를 위하여 자체적으로 복제가 불가능하도록 고안되어

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-380-1740 (팩스) 02-380-1342
(E-mail) ywsohn@kfda.go.kr

있다. 그러나 복제 가능성이 있는 바이러스의 출현을 완전히 배제할 수 없으며 이러한 복제가능 바이러스(Replication Competent Viruse, RCV)에 대한 문제들이 유전자치료용 벡터의 안전성에 있어서 가장 주요한 관심사가 되고 있다.⁵⁾ 특히 HIV-1 유래 렌티바이러스 벡터의 경우, 벡터를 생산하는 동안 복제가능 렌티바이러스(Replication Competent Lentivirus, RCL)의 예기치 못한 오염 가능성이 항상 존재하며 원 바이러스인 HIV-1가 AIDS를 일으키는 심각한 병원체라는 점에서 안전성에 대한 더욱 많은 문제점들을 내포하고 있다. 결과적으로 임상시도에 있어서 부딪히는 많은 어려움과 제약들은 아직까지 RCL을 정확히 파악하고 검증할 수 있는 효과적인 분석방법의 확립이 이루어지지 않았기 때문이다.⁶⁾

한편, 안전성에 관한 내용과 더불어 중요하게 고려되어야 할 사항으로 바이러스 벡터에 대한 정확한 기능적 역가 측정이 이루어져야 한다. 바이러스 벡터를 이용하여 유전자 치료를 실시하거나 임상실험 연구를 진행하는데 있어서 벡터의 기능적 역가는 매우 중요하고 필수적인 사항이기 때문이다. 현재 바이러스 벡터의 역가를 측정하기 위한 다양한 방법들이 사용되고 있으나 렌티바이러스 벡터의 경우에는 아직까지 역가 측정법의 확립이 명확하게 이루어지지 않은 실정이며 따라서 최근 이에 대한 폭넓은 연구가 진행되고 있다.⁷⁾

현재 RCL의 생성을 검토하기 위한 다양한 방법들이 사용되고 있는데 대표적인 방법으로 p24 detection assay, PCR assay, syncytia formation assay 그리고 marker rescue assay 등이 사용되고 있다.⁸⁾ 본 연구에서는 그 중 가장 용이하게 접근할 수 있는 방법인 p24 ELISA와 PCR 분석법을 선택하여 RCL 검출방법을 확립하고자 하였다. p24 ELISA는 배양상등액을 재료로 하여 HIV-1 gag 유전자의 전달과 발현을 모니터 하는 방법이며⁹⁾ PCR의 경우는 transduction된 세포의 genomic DNA를 이용하여 바이러스 서열의 특정부분에 대한 primer를 제작하고 이 서열들의 이동을 검토함으로써 RCL의 유무를 판정하는 방법이다.¹⁰⁾ 한편, 벡터의 기능적 역가를 측정하는 방법에 있어서도 DNA titer 나 RNA titer와 같이 real-time PCR을 이용하는 방법과 flow cytometer나 적절한 염색 등을 통하여 특정 표식 유전자의 발현을 분석함으로써 기능적 역가를 결정하는 방법들이 사용되고 있다. 본 실험에서는 Green Fluorescent Protein(GFP)의 발현정도를 flow cytometer로 분석¹¹⁾함으로써 벡터의 GFP titer를 결정하고자 하였고, 또한 real-time PCR을 이용하여 DNA titer를 측정함으로써 두 역가측정법을 상호 비교하여¹²⁾ 유전자치료용 렌티바이러스 벡터의 효율적인 역가측정법을 조사하고자 하였다.

실험 방법

실험재료

DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), EMEM(Eagle

Minimum Essential Medium), FBS(Fetal Bovine Serum), PBS(Phosphate Buffered Saline), trypsin-EDTA 등은 Gibco BRL (Grand Island, NY, U.S.A.) 제품을 사용하였고 Lipofectamine 2000TM은 Invitrogen(Carlsbad, CA, U.S.A.) 제품을 사용하였다. DNeasy Tissue Kit는 QIAGEN(Hilden, Germany) 제품을 사용하였고 Polybrene(1,5-Dimethyl-1,5-Diazaundecamethylene-Poly-methobromide)과 AZT(3'-Azido-3'-deoxythymidine)는 Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.) 제품을 사용하였다. PCR에 사용되는 Taq polymerase, MgCl₂, PCR buffer, dNTP 등은 Promega (Madison, WI, U.S.A.) 제품을, HIV-1 p24 antigen ELISA Test kit는 Vironostika(Organon Teknika, U.S.A.)의 제품을 사용하였다. Flow cytometer는 Beckman Coulter의 Cytomics FC 500, real-time PCR은 Applied Biosystems의 9700HT를 사용하였다.

세포주와 배양조건

세포주로는 293T(ATCC CRL-11268), HeLa(ATCC CCL-2) 등을 American Type Culture Collection(Rockville, MD)으로부터 구입하여 사용하였고 각각의 세포주를 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1% antibiotics(penicillin-streptomycin)가 첨가된 DMEM과 EMEM에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 계대배양하여 사용하였다.

렌티바이러스 벡터의 생산

렌티바이러스 벡터는 transient transfection법으로 생산하였다. 실험 하루 전, 10-cm dish에 2×10⁶개의 293T 세포를 준비하였다. 다음날, 벡터생산에 필요한 4가지 플라스미드인 transfer 벡터(pRRSIN.cPPT.PGK/GFPWPPE), packaging 플라스미드(pMDLg.pRRE), rev 발현 플라스미드(pRSV.Rev), envelope 플라스미드(pMD.G) 등을 Lipofectamine2000을 사용하여 transfection시켰다. Transfection을 실시한 후, 6시간 후에 새로운 배지로 교체하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양을 실시하였다. 배양 후 벡터가 포함되어 있는 배양 상등액을 확보하고 0.45 μm filter로 여과한 후, 다음 실험이 진행될 때 까지 -70°C에 보관하였다.

렌티바이러스 벡터의 역가결정

GFP titer 결정 - 실험 하루 전, 2×10⁵ cells/well의 HeLa 세포를 6 well plate에 준비하였다. 다음날, 6 well 중 하나의 well을 trypsin 처리하고 trypan blue 염색을 실시하여 살아있는 세포의 수를 기록하였다. Mock을 포함한 모든 well에 transduction의 효율을 높여주기 위하여 8 μg/ml의 polybrene을 넣어주었다. 추가적으로 pseudo-transduction을 시험하기 위해 지정된 well에는 벡터를 넣기 30분 전에 5 mM AZT를 10 μl/ml(50 μM)로 처리하여 주었다. 보관해 두었던 벡터 상등액을 10배씩 단계별 희

석하여(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) 2개씩 준비하고 Mock과 AZT를 제외한 나머지 well에 넣어주었다. AZT를 처리한 well에는 희석하지 않은 백터 상등액 1 ml을 넣어주었다. 다음날, 기존 배지를 새로운 배지로 교체해주고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 추가적으로 2일 동안 배양하였다. 2일이 경과한 후, 각 well의 세포를 trypsin 처리하여 400 g에서 5분간 원심분리하고 세포를 얻었다. FACS buffer 0.5 ml을 이용하여 단일세포로 부유 시킨 후, Flow cytometer를 이용하여 각각의 샘플마다 5,000 live events로 GFP positive 세포의 %를 측정하였다.

GFP-positive 세포에 의한 GFP titer는 다음의 방정식 Titer = (%EGFP+cells/100) × [the number of cells (cells/ml)] / (volume of vector add[ml])을 이용하여 구하였다.¹³⁾

DNA titer 결정 - 다음으로 DNA titer를 결정하기 위해서 transfer 백터의 PBS/psi 부분에 대한 primer와 probe를 제작하였다. FPLV(5'-CGCGCACGGCAAGAG-3'), RPLV(5'-GCCTC-CGCTAGTCAAAATTTTGG-3'), LV(FAM-CCAGTCGCCG-CCCT) (Applied Biosystems, U.S.A.). GFP titer와 같은 방법으로 HeLa 세포에 transduction과 배양을 실시한 후, DNeasy tissue kit를 이용하여 세포의 genomic DNA를 얻었다. 역가결정에 필요한 standard 곡선은 transfer 백터를 10배씩 단계별 희석하여 준비하고 primer, probe와 함께 50°C에서 2분 1 cycle, 95°C에서 10분 1 cycle, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분의 조건으로 40 cycle 동안 real-time PCR을 수행하여 결정하였다.

HeLa 세포에서의 RCL 증폭

실험 하루 전, 6 well plate에 2×10^5 cells/well로 HeLa 세포를 준비하였다. 다음날, 보관해 두었던 백터 상등액을 MOI가 2.5~0.0025가 되게 하여 8 µg/ml의 polybrene과 함께 넣어주었다. 다음날, 기존 배지를 새로운 배지로 교체해주고 37°C, 5%의 CO₂ 배양기에서 추가적으로 21일 동안 배양하였다(amplification stage). 배양기간 동안 7, 14, 21일차 에서의 PCR 분석과 p24

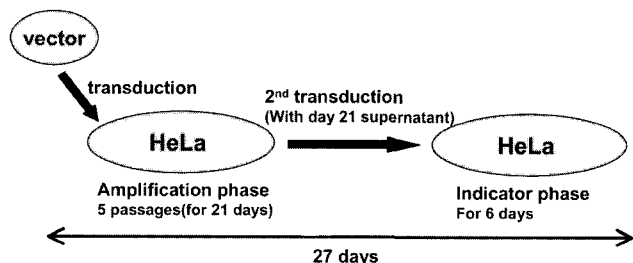
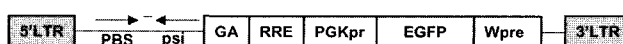
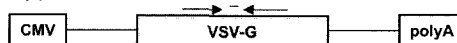


Fig. 1 - RCL assay scheme for lentivirus vector. Vector stock is used to transduce HeLa cells, which is maintained in culture for 21 days (amplification phase). After cultivation, supernatants are used for the second transduction on HeLa cells, which is cultured for an additional 7 days.

A) pRRL-PGK-GFP



B) pMD.G



→ ← : Primer & Probe region of Real Time PCR

Fig. 2 - PCR primers for detection of PBS/psi and VSV-G sequences. A) Primers (FLV, RLV) were designed to amplify the entire PBS/psi region in the transfer vector (pRRL-PGK-GFP). B) Primers (FVSV, RVSV) were designed to detect VSV-G sequences in the plasmid pMD.G. PBS : Primer Binding Site, psi : packaging signal, GA : truncated gag sequences, RRE : Rev-response element, Wpre : post-transcriptional regulatory element of woodchuck hepatitis virus.

ELISA 분석을 위하여 각각 HeLa 세포의 genomic DNA와 배양 상등액을 확보하였다. 또한 true RCL의 확인을 위하여 21일차에서 얻은 배양상등액으로 HeLa 세포에 2차 transduction을 실시하였으며 추가적으로 6일 동안 배양하였다(indicator stage). 마지막 날에 역시 genomic DNA와 배양 상등액을 확보하였다 (Fig. 1).

PBS/psi와 VSV-G 서열에 대한 PCR

본 실험에서 실시한 PCR은 두개의 영역을 검출하기 위해서 제작되었다. 먼저 transfer 백터의 PBS/psi 부분을 검출하기 위해 FLV(5'-ACCTGAAAGCGAAAGGGAAAC-3')와 RLV(5'-CACCCATCTCTCTCCTTCTAGCC-3')를 제작하였고 다음으로 envelope 플라스미드 DNA의 VSV-G 부분을 검출하기 위해서 FVSV(5'-CGAGATGGCTGATAAGGATCTC-3')와 RVSV(5'-ATTGATTATGGTGAAAGCAGGAC-3')를 제작하였다(Fig. 2). 위의 primer를 이용하여 PCR을 수행하였을 때 PCR의 검출 민감도가 어느 정도 인지를 알아보고자 하였다. 먼저 각각의 백터를 10배씩 단계별 희석하여 준비하였으며 1×PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTP, 1 µM forward와 reverse primer, 0.5 U/µl Taq polymerase를 재료로 하여 94°C에서 5분 1 cycle, 94°C에서 1분, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초의 조건으로 35 cycle, 마지막으로 72°C에서 7분으로 1 cycle을 반응시켰다. 각각의 PCR 산물은 ethidium bromide가 함유된 agarose gel 전기영동을 통해서 확인하였다.^{5,12)}

p24 ELISA

p24 존재여부의 확인은 HIV-1 p24 antigen ELISA kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 실험을 수행하였다. Amplification 기간과 indicator 기간에서 확보한 각각의 배양 상등액을 재료로 하여 p24 항원을 검출함으로써 RCL 존재의 여부를 확인하였다.

결 과

렌티바이러스 벡터의 역가결정

렌티바이러스 벡터의 역가를 결정하기 위하여 GFP 유전자를 포함하는 렌티바이러스 벡터(Fig. 2A)를 flow cytometer를 이용하여 GFP titer를 측정하였다(Fig. 3). 벡터의 양을 10배씩 단계별 희석(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3})하여 HeLa 세포에 transduction한 후

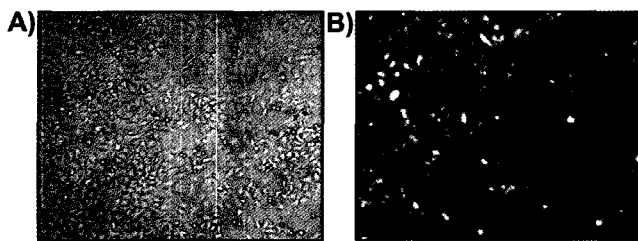


Fig. 3 - Transduction of HeLa cells with lentivirus vector. Transduction was carried out with lentivirus vector (MOI of 2.5) into 4×10^5 HeLa cells. After 3 days, GFP expression can be seen in transduced using 488 nm blue laser scanning fluorescence microscopy. A) optical image, B) fluorescence image.

flow cytometer로 측정된 결과, 10^{-1} 에서는 65.6%, 10^{-2} 에서는 20.5%, 마지막으로 10^{-3} 에서는 2.1%의 GFP positive events를 나타내었다(Fig. 4A, 4B). 이 중에서 GFP의 %값이 1~25% 범위 안에 포함되는 10^{-2} 과 10^{-3} 의 희석배수를 역가 결정에 사용하였으며 각각의 %값과 세포수, 그리고 들어간 벡터의 양을 이용하여 역가를 구하였다. 본 실험에 사용된 렌티바이러스 벡터의 GFP titer는 1×10^7 TU/ml로 조사되었다.

GFP titer의 경우 GFP의 비특이적인 흡착이나 플라스미드 DNA로부터의 일시적인 발현에 의해 flow cytometer 상에서 인위적으로 증가된 GFP의 발현을 나타낼 수 있다. 즉, 인위적으로 높아진 transduction 효율을 나타낼 수 있는데, 이러한 pseudo-transduction을 테스트하기 위해 transduction을 실시하기 30분 전 역전사 효소의 활성억제 물질인 AZT($50 \mu\text{M}$)를 처리해주고 높은 농도의 벡터(MOI=20)를 넣어 줌으로써 확인할 수 있다. 처리전후의 flow cytometer를 분석한 결과, AZT를 처리한 세포에서 transduction 효율이 약 90% 이상 감소되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 4C). 이러한 실험을 통하여 transduction된 세포에서의 GFP 발현은 바이러스 벡터에 의한 reverse transcription의 결과임을 확인할 수 있었다.¹⁴⁾

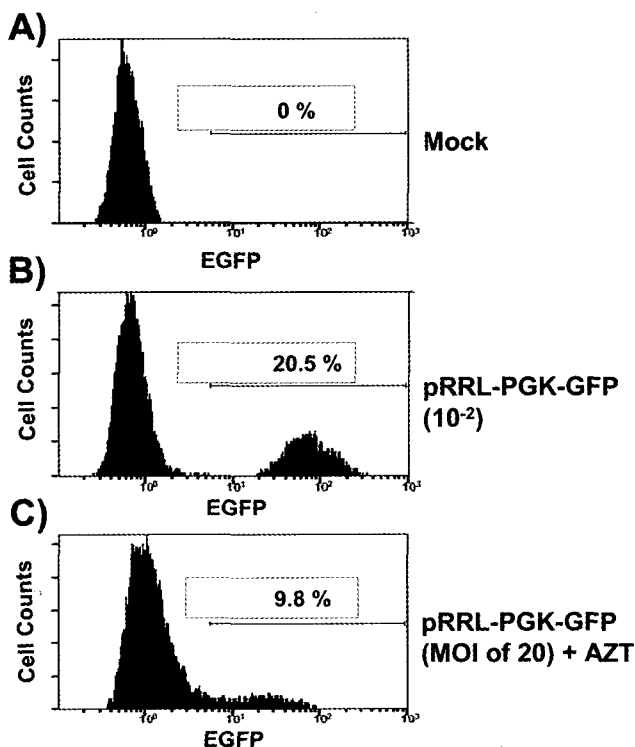


Fig. 4 - EGFP expression in transduced HeLa cell with pRRL-PGK-GFP vector. Flow cytometer analysis were performed in HeLa cells after transduction. A) Mock-transduced cells; B) HeLa cells transduced with pRRL-PGK-GFP vector (10^{-1} dilution); C) HeLa cells transduced with pRRL-PGK-GFP vector (MOI of 20) in the presence of $50 \mu\text{M}$ AZT.

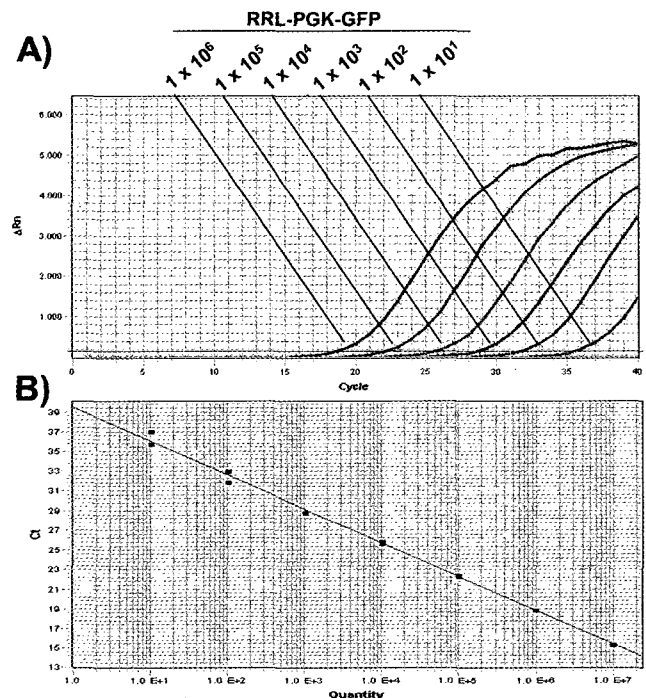


Fig. 5 - Estimation of number of pRRL-PGK-GFP DNA molecules in the genomic DNA of transduced HeLa cells (DNA titer) by real-time PCR. A) Amplification of the pRRL-PGK-GFP vector plasmid. Serial dilutions of pRRL-PGK-GFP plasmid corresponding to $1 \sim 1 \times 10^6$ were amplified with the PBS/psi primer and probe. B) Standard curve was generated from the amplification plot shown in A). All experiments were triplicated.

Table I – Comparison of p24 titer in vector stock and GFP, DNA titer in transduced HeLa cells

p24 (ng/ml)	GFP titer		DNA titer		DNA titer/ GFP titer
	TU/ml	TU/ng p24	molecules/ml	molecules/ng p24	
262.5	1×10^7	3.8×10^4	8.9×10^7	3.4×10^5	8.9

GFP and DNA titer at each vector volume after transduction are shown. The amounts of p24 of vector stock measured by p24 ELISA was 262.5 ng/ml. The GFP titer are presented as number of GFP positive cells/ml of vector stock and was determined by FACS analysis of transduced cells. DNA titer are presented as the number of vector DNA molecules/ml vector supernatant and were calculated by real-time PCR using pRRL-PGK-GFP vector plasmid as a standard.

다음으로 real-time PCR을 이용하여 DNA titer를 결정 하였다. 실험에 필요한 primer와 probe를 제작하기 위해서 렌티바이러스 벡터에 필수적인 부분인 PBS/psi 에 대한 primer와 probe를 제작하였다. Transfer 벡터를 10배씩 단계별 희석($1 \times 10^6 \sim 1$)하여 standard 곡선을 그리고 이를 이용하여 transduction된 HeLa 세포의 genomic DNA에 대한 역가를 결정하였다(Fig. 5). 그 결과 DNA titer는 8.9×10^7 molecules/ml을 나타내었다.

추가적으로 벡터 상등액 내의 p24 단백질의 양을 측정하여 벡터의 물리적 역가를 측정할 수 있다. 이를 기능적 역가인 GFP titer, DNA titer와 비교하여 둘 사이의 관계를 알아보려고 하였다. 먼저 벡터 상등액에 대한 p24 ELISA를 실시하고 벡터 상등액 내의 p24 양을 측정한 결과 262.5 ng/ml의 값을 나타내었다. 따라서 GFP titer의 경우 p24(ng) 당 3.8×10^4 TU/ml의 관계가 있었으며 DNA titer의 경우는 p24(ng) 당 3.4×10^5 molecules/ml의 관계가 있음을 확인하였다(Table I). 현재까지 Transducing Unit(TU)를 결정하는 표준 분석법은 아직 확립되어 있지 않은 상태이다. 따라서 p24(ng) 당 TU의 값은 각 실험실마다 매우 다양하게 나타날 수 있다.¹⁵⁾

PBS/Psi와 VSV-G에 대한 PCR 민감도

본 실험에서는 렌티바이러스 벡터에 의한 유전자 전달과 RCL의 존재여부를 확인하기 위하여 일반 PCR과 real-time PCR을 사용하였으며 이를 비교하고자 하였다. 두 PCR 간의 민감도 차이를 알아보려고 transfer 벡터 DNA와 envelope 플라스미드 DNA의 copy 수에 따른 PCR을 수행하였다. Transfer 벡터 DNA($1 \times 10^5 \sim 1$ copy)와 envelope 플라스미드 DNA($1.6 \times 10^5 \sim 1.6$ copy)를 10배씩 단계별로 희석하고 PCR을 실시한 결과 검출 민감도는 두 PCR 모두에서 각각 10 copy와 16 copy임을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 이러한 결과로 볼 때 copy수에 따른 두 PCR 간의 민감도는 큰 차이를 나타내지 않았으며 따라서 본 실험에서는 RCL 검출을 위하여 두 PCR을 모두 사용하여 진행하였다. 이러한 검출 민감도를 토대로 amplification과 indicator 기간에서 얻은 genomic DNA에 대한 PCR 분석을 통하여 RCL의 존재여부를 확인하고자 하였다.

PCR 분석을 통한 RCL 존재여부 확인

본 실험에서 사용한 렌티바이러스 벡터 안전성 시험의 전체적

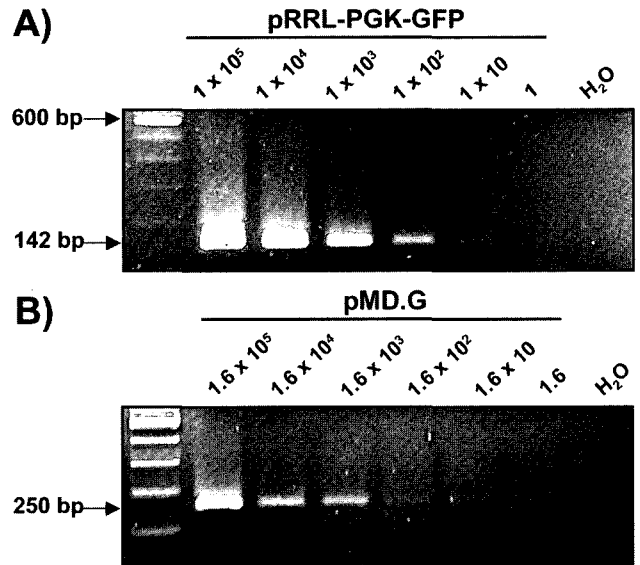


Fig. 6 – Sensitivity of detection of PBS/psi and VSV-G sequences. A) Serial dilutions of the transfer vector, pRRL-PGK-GFP, corresponding to $1 \sim 1 \times 10^5$ copies were amplified using standard PCR; B) Serial dilutions of the envelope plasmid, pMD.G, corresponding to $1.6 \sim 1.6 \times 10^5$ copies were amplified using standard PCR. Each product was analyzed by agarose gel electrophoresis and staining with ethidium bromide. All experiments were triplicated.

인 방향은 레트로바이러스 벡터에 대한 FDA의 가이드라인을¹⁶⁾ 모델로 하여 세포배양 방법 및 기간을 설정하였다. 먼저 벡터를 처리한 후 3주간에 걸쳐 amplification 기간을 설정함으로써 RCL이 생성될 수 있는 충분한 배양기간을 확보하였고 마지막 배양일(21일)에서 얻은 배양 상등액을 2차 transduction에 사용하였다. 2차 transduction 후에는 추가적으로 6일간의 indication 기간을 설정하였으며 특정 바이러스 유전자의 이동에 의한 RCL 형성 가능성에 대해 확인 하고자 하였다.¹⁷⁾

Fig. 7과 Table II에서 보는 바와 같이, 렌티바이러스 벡터에 의해 transduction된 세포에서는 3주간의 amplification 기간 동안 모든 MOI에서 PBS/psi 서열을 검출 할 수 있었다. 이것은 모든 MOI에서 목적세포로 유전자의 전달이 제대로 이루어졌으며 가장 적은 0.0025의 MOI에서도 21일차까지 유전자의 전달이 온전히 이루어졌음을 의미한다. 이와 반대로 VSV-G 서열은 이 기

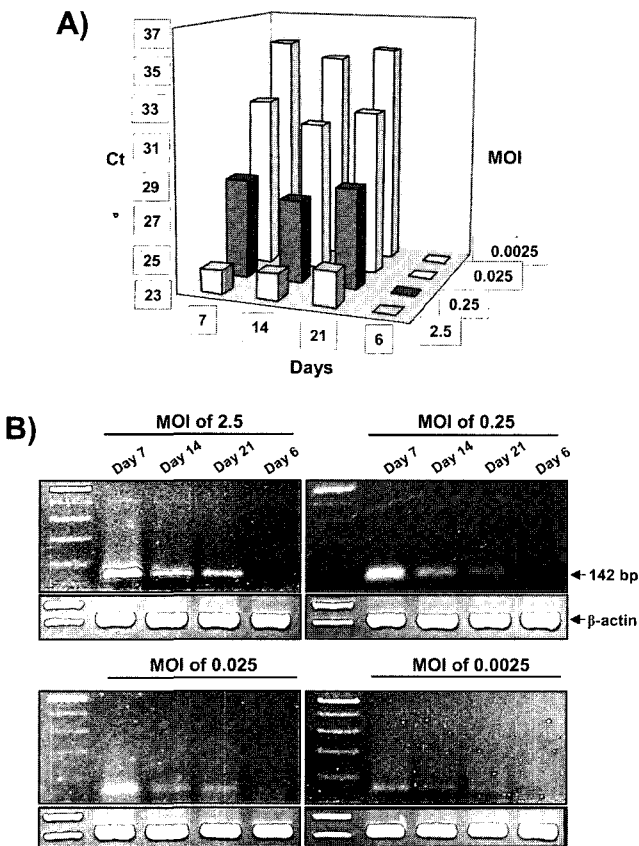


Fig. 7 – RCL screening of lentivirus vector by real-time and standard PCR. Real-time PCR (A) and standard PCR (B) carried out on amplification phase (for 21 days) and indicator phase (for 6 days) with each MOI. Genomic DNA from indicator cells (day 6) were negative for PBS/psi PCR product. The Ct (Threshold Cycle) values represent the mean of three independent experiments.

간 동안 어느 MOI에서도 검출되지 않았는데 이는 transfer 벡터를 제외한 나머지 플라스미드에는 packaging 신호가 포함되어 있어 envelope의 유전자가 바이러스 입자 안으로 삽입 될 수 없기 때문이다. 그러나 transfer 벡터 이외의 유전자가 바이러스 입자 안으로 co-packaging 되는 경우가 생길 수 있으며 따라서 VSV-G 서열이 목적 세포로 전달되었는지의 여부를 확인함으로

써 RCL의 존재 가능성을 판단하여야 한다. 마찬가지로 21일차에서 얻은 배양 상등액을 이용하여 2차 transduction을 실시한 경우 상등액 내의 RCL 존재여부에 따라 indicator 기간 후에 실시하는 PCR의 결과는 상이하게 나올 것으로 예상할 수 있다. Fig. 7에서 확인할 수 있는 바와 같이 indicator 기간에서는 VSV-G는 물론 PBS/psi 서열도 검출할 수 없었으며 결론적으로 이러한 유전자의 이동이 이루어지지 않았고 따라서 true RCL이 존재하지 않음을 입증할 수 있었다.

본 실험에 덧붙여 3주간의 amplification 기간 동안 진행되는 계대배양의 빈도가 RCL 검출시험의 결과에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. 각각 3회와 5회로 나누어 계대기간을 설정하고 amplification 배양을 진행하였다. 그 결과 PCR과 p24 ELISA 모두에서 3회와 5회 사이에 뚜렷한 차이를 확인할 수 없었으며 따라서 amplification 기간동안의 계대배양의 빈도는 실험결과에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

p24 ELISA assay를 통한 RCL 존재여부 확인

본 실험에서 PCR과 함께 RCL 검출방법으로 사용된 p24 ELISA는 배양 상등액을 재료로 사용하여 gag에 포함된 p24 유전자의 발현으로 생기는 capsid 단백질을 검출하는 분석법이다. 본 실험에 사용된 p24 ELISA kit는 5~160 pg/ml의 검출 범위를 가지는데 이와 같이 p24 ELISA 분석법은 일반적으로 검출범위가 좁다는 단점에도 불구하고 쉽고 매우 표준화된 방법으로 널리 사용되고 있다.¹⁸⁾

그러나 바이러스 벡터는 바이러스 자체에 정상적으로 p24를 포함하고 있기 때문에 배양 상등액을 이용하여 RCL을 검출하는 p24 ELISA의 경우 몇 가지 필요한 사항들이 있다. 먼저 transduction 후 남아있는 바이러스 벡터가 완전히 제거될 수 있도록 확실한 세척 과정이 필요하며 목적세포에 대해서는 일정 기간동안 계대배양을 거쳐야 한다. 본 실험에서 진행한 3주간의 amplification 기간으로 위의 문제점을 해결하기에 충분한 계대배양과 세척 과정을 이행하였다. Amplification 기간 동안 얻은 7, 14, 21일 차의 배양 상등액과 indication 기간에서 얻은 6일차의 배양 상등액을 이용하여 ELISA를 실시하였다. p24 ELISA 분석

Table II – RCL screening by PCR assay of lentivirus vector

Genomic DNA of transduced HeLa cells	MOI	Amplification phase						Indicator phase	
		PBS/psi			VSV-G			PBS/psi	VSV-G
		Day 7	Day 14	Day 21	Day 7	Day 14	Day 21	Day 6	Day 6
	2.5	+	+	+	-	-	-	-	-
	0.25	+	+	+	-	-	-	-	-
	0.025	+	+	+	-	-	-	-	-
	0.0025	+	+	+	-	-	-	-	-

HeLa cells were transduced with lentivirus vector at each MOI for 21 days (amplification phase). Genomic DNA from transduced cells were analyzed at day 7, 14 and 21 for PBS/psi and VSV-G sequences by PCR. The day 21 supernatants from amplification phase were used for second transduction (indicator phase) and DNA was analyzed 6 days posttransduction by PCR.

Table III – RCL screening by p24 ELISA of lentivirus vector

Supernatant of transduced HeLa cells	MOI	Amplification phase			Indicator phase
		Day 7	Day 14	Day 21	Day 6
	2.5	7.35±0.45			
	0.25		RCL Negative	RCL Negative	RCL Negative
	0.025	RCL Negative			
	0.0025				

HeLa cells were transduced with lentivirus vector at each MOI for 21 days (amplification phase) and the day 21 supernatants from amplification phase were used for second transduction (indicator phase). The supernatants at these time points were analyzed by p24 ELISA assay. The p24 values are shown in pg/ml and were measured in duplicate. The Cutoff Value (CV) for p24 was 5.4 pg/ml. A positive p24 signal was only detected at day 7, MOI of 2.5.

에서는 샘플의 p24 농도가 cutoff value(CV) 이하 일 때 RCL이 없다고 판정하며 본 실험에서 설정한 CV값은 5.4 pg/ml이었다. 실험 결과, amplification 기간 중 7일차에 MOI가 2.5인 샘플에서 7.35±0.45 pg/ml의 p24가 검출되었다. 이를 제외한 나머지 샘플에서는 날짜와 MOI에 관계없이 모두 CV값 이하의 결과를 나타냄으로써 p24가 검출되지 않음을 확인하였다(Table III). Transfer 벡터에 포함되어있는 start gag 부분은 전체 gag의 일 부분으로써 온전한 gag가 발현될 수 없고 계대배양이 이루어진 14, 21일차에서는 높은 MOI(MOI=2.5)에서도 검출되지 않는 것으로 보아 7일차(MOI=2.5)에서의 p24 검출은 높은 MOI와 짧은 배양기간으로 인해 배양 상등액에 바이러스 벡터가 남아있어 검출된 것으로 생각된다. 위의 내용을 토대로 다음의 결과를 도출할 수 있었다. 처음 벡터를 처리할 때 MOI가 2.5에 해당하는 p24의 농도는 26.3 pg/ml이다. 다음으로 7일차까지 배양이 이루어지는 동안 transduction 다음날 세척이 1회 이루어지며 첫 번째 계대배양은 4일째 되는 날 실시된다. 따라서 7일 동안 1회의 세척과 1회의 계대배양을 실시한 후의 p24 농도는 약 3배(18.9 pg/ml) 정도의 비율로 희석됨을 알 수 있었다. 결과적으로 MOI가 2.5 이상으로 벡터를 처리할 경우 상등액에 남아 있는 벡터를 완전히 제거하기 위해서는 7일 이상의 배양기간이 요구됨을 확인할 수 있었다.

고 찰

본 연구에서는 렌티바이러스 벡터 유래 유전자치료제의 품질 관리 중 가장 중요한 두 가지 요소인 벡터의 복제가능 바이러스 검출(RCL)과 역가측정에 관한 시험법을 설정하였다.

RCL에 관한 안전성 평가에 있어서 본 연구에서는 PCR과 p24 ELISA를 함께 사용하여 이를 확립하고자 하였다. Wild type 바이러스와 달리 RCL은 그 특성상 아주 느린 속도로 증폭된다고 가정할 수 있다.¹⁰⁾ 따라서 RCL이 증폭될 수 있는 충분한 배양기간이 요구되는데 본 연구에서는 3주간의 amplification 기간을 두고 실험을 진행하였다. True RCL은 amplification 기간에서 indicator 기간으로 특정 바이러스 유전자가 이동된 것이라 정의

할 수 있다. PCR 분석을 이용하여 true RCL이 없음을 판단하기 위해서는 특정 primer로 수행한 PCR이 indicator 기간에서 얻은 genomic DNA에서는 검출되지 않아야 함을 의미한다. VSV-G의 경우 벡터를 생산할 때 바이러스 입자 안으로 삽입 되지 못하기 때문에 indicator 기간에서는 물론 amplification 기간에서도 검출되지 않아야 하나 특별한 경우 endogeneous retrovirus와 pseudotype되는 경우가 생길 수 있으며 이에 대한 검증이 필요하다. 반면에 PBS/psi의 경우는 amplification 기간에서는 검출되지만 indicator 기간에서는 검출되지 않음을 보이기 위해 실시하였다. 즉 amplification 기간에서 검출된 서열이 indicator phase로 이동되지 않았음을 증명하였다.

본 연구에서 RCL의 안전성 평가를 위하여 사용한 두 번째 방법은 p24 ELISA 분석이다. 이 분석법은 매우 표준화된 방법으로 널리 사용되지만 몇 가지 문제점을 내포하고 있다. 바이러스 입자는 자체적으로 p24 항원을 가지고 있기 때문에 높은 농도의 벡터를 처리했을 경우 이것이 배양 상등액에 계속 남아 있게 되며 RCL의 경우 느린 속도로 증폭되기 때문에 p24 ELISA 분석으로는 남아있는 p24 항원과 RCL을 구별할 수 없게 된다. 따라서 남아있는 바이러스 입자를 완전히 제거할 수 있는 추가적인 단계가 요구되며 이러한 요구는 충분한 계대배양을 통해 해결할 수 있었다. 이러한 단점에도 불구하고 PCR 분석법의 경우는 RCL의 생성 가능성을 DNA 수준에서 추정하는 것과 달리 p24의 경우 이미 생성된 RCL을 검출하기 때문에 더욱 실제적인 RCL 검출법이라 할 수 있다. 결론적으로 PCR과 p24 ELISA는 각각의 장단점을 가지고 있으며 따라서 두 분석법을 서로 병행하여 사용함으로써 더욱 정확한 RCL 검증이 이루어질 것으로 생각된다.

다음으로 역가측정 실험에 있어서 벡터 상등액에 대한 p24 농도 측정과 같은 물리적인 역가와는 달리 기능적인 역가는 목적 세포에 대한 transduction 효율에 밀접한 관련이 있다. 따라서 벡터 상등액이 아닌 transduction 된 세포에 대한 접근이 필요하며 이러한 기능적 역가측정을 위하여 GFP titer와 DNA titer를 사용하였다. GFP titer의 경우 벡터 자체에 GFP 유전자를 포함해야 하는 제약이 있으나 기능적 역가를 비교적 정확하고 간단하

게 구할 수 있어 널리 사용되고 있다. 그러나 flow cytometer가 분석하는 GFP 발현은 전적으로 프로모터에 의존적이며 또한 낮은 수준의 GFP 발현은 flow cytometer에서 검출하지 못하는 경우가 발생하여 실질적인 기능적 역가보다 낮은 수치의 역가를 보일 수 있다.¹⁰⁾ 따라서 이러한 단점을 극복하고자 real-time PCR을 이용한 역가측정법(DNA titer 측정법)이 개발되었으며 본 연구에서 비교 실험한 결과 GFP titer 보다 더욱 정확한 역가를 얻을 수 있었다.¹²⁾ 다만 DNA titer의 경우 벡터 상등액에 남아 있는 플라스미드 DNA가 역가에 영향을 줄 수 있다는 내용이 보고 되었으며 따라서 플라스미드 DNA의 제거에 대한 연구가 추가로 진행되어야 한다고 사료된다.

본 연구에서 언급한 유전자치료용 벡터의 품질평가 방법들은 향후 벡터의 RCL 및 역가측정을 검토하기 위한 가장 기본적인 방법들이다. 따라서 앞으로 개발될 다양한 HIV-1 유래 렌티바이러스 벡터의 품질관리를 위해 매우 중요한 자료가 될 것이며, 많은 활용이 예상된다.

감사의 말

본 연구에 사용된 플라스미드를 친절하게 제공하여 주신 카톨릭의대 오일환 교수님께 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Trono, D. : Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene Ther.* **7**, 20 (2000).
- 2) Naldini, L. and Verma, I. M. : Lentiviral vectors. *Adv. Virus Res.* **55**, 599 (2000).
- 3) Naldini, L., Blomer, U., Galloway, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M. and Trono, D. : *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263 (1996).
- 4) VandenDriessche, T., Thorrez, L., Naldini, L., Follenzi, A., Moons, L., Berneman, Z., Collen, D. and Chuah, M. K. : Lentiviral vectors containing the human immunodeficiency virus type-1 central polypurine tract can efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen-presenting cells *in vivo*. *Blood*. **100**, 813 (2002).
- 5) Escarpe, P., Zayek, N., Chin, P., Borellini, F., Zufferey, R., Veres, G. and Kiermer, V. : Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in large-scale HIV-based vector preparations. *Mol. Ther.* **8**, 332 (2003).
- 6) Herry, I. S., Yoo, E. S. and Sutton, R. E. : Characterization and detection of artificial replication-competent lentivirus of altered host range. *Mol. Ther.* **8**, 118 (2003).
- 7) Enca, M. R., Linda, J. W., Anna, O., Kyriacos, A. M. and Nicholas, D. M. : New methods to titrate EIAV-based lentiviral vectors. *Mol. Ther.* **5**, 566 (2002).
- 8) Delenda, C., Audit, M. and Danos, O. : Biosafety issues in lentivector production. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **261**, 123 (2002).
- 9) Farson, D., Witt, R., McGuinness, R., Dull, T., Kelly, M., Song, J., Radeke, R., Bukovsky, A., Consiglio, A. and Naldini, L. : A new generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **12**, 981 (2001).
- 10) Sastry, L., Xu, Y., Johnson, T., Desai, K., Rissing, D., Marsh, J. and Cornetta, K. : Certification assays for HIV-1-based vectors : Frequent passage of Gag sequences without evidence of replication-competent viruses. *Mol. Ther.* **8**, 830 (2003).
- 11) Wu, X., Wakefield, J. K., Liu, H., Xiao, H., Kralovics, R., Prchal, J. T. and Kappes, J. C. : Development of a novel trans-lentiviral vector that affords predictable safety. *Mol. Ther.* **2**, 47 (2000).
- 12) Sastry, L., Johnson, T., Hobson, M. J., Smucker, B. and Cornetta, K. : Titering lentiviral vectors : comparison of DNA, RNA and marker expression methods. *Gene Ther.* **9**, 1155 (2002).
- 13) Gatlin, J., Ohlmayer, M. I. and Garcia, J. V. : Detection and titration of lentivirus vector preparations. In *Lentivirus gene engineering protocols* Vol. 229, M. Federico, Humana Press. Totowa, New Jersey, p57 (2003).
- 14) Evans, J. T. and Garcia, J. V. : Lentivirus vector mobilization and spread by human immunodeficiency virus. *Hum. Gene Ther.* **11**, 2331 (2000).
- 15) Armin, B. : Lentiviral and MLV based retroviral vectors for *ex vivo* and *in vivo* gene transfer. *Methods* **33**, 164 (2004).
- 16) Guidance for industry : Supplemental guidance on testing for replication competent retrovirus in retroviral vector based gene therapy products and during follow-up of patients in clinical trials using retroviral vectors, U.S. Department of health and human services, FDA, CBER (1999).
- 17) Wilson, C. A., Ng, T. H. and Miller, A. E. : Evaluation of recommendations for replication-competent retrovirus testing associated with use of retroviral vector. *Hum. Gene Ther.* **8**, 869 (1997).
- 18) Klein, S. A., Karsten, S., Ruster, B., Klebba, C., Pape, M., Ottmann, O. G., Hoelzer, D. and Roth, W. K. : Comparison of TaqMan real-time PCR and p24 ELISA for quantification of *in vitro* HIV-1 replication. *J. Virol. Methods* **107**, 169 (2003).