

Study on the Safety of Firefly Luciferase in Human as a Transient Reporter Gene of Oncolytic Virotherapy

Young Mi Hong¹, Woong Hee Yoon², You Ra Lee², Soo Ji Kim², Daniel Ngabire², Badrinath Narayanasamy³, Mefotse Saha Cyrelle Ornella³, Myunghee Kim², Euna Cho², Bora Lee² and Tae-Ho Hwang^{1,2,3*}

¹Liver Center, Pusan National University Yangsan Hospital, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Pusan National University, Yangsan 50612, Korea

²Bionox Inc., Parkview Tower #1905, 248 Jeongjail-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13554, Korea

³Medical Research Center, School of Medicine, Pusan National University, Yangsan 50612, Korea

Received October 15, 2021 / Revised October 22, 2021 / Accepted October 25, 2021

Firefly luciferase (FLuc) can function as an efficient marker in the gene and viral therapies. Nonetheless, its clinical translation has been unaccomplished with the concerns on its exogenous nature and the similarity with human fatty acyl-CoA synthetase. In this study, we aimed to show safety of FLuc by conducting a set of preclinical experiments and a human use. Initially, FLuc permeability across the plasma membrane was investigated by delivering the FLuc-carrying viral vector, OTS-412, or the FLuc recombinant protein. After *in vitro* infection of OTS-412 into different cancer cell lines, FLuc activity was detected only in the cell lysates, but not in culture media. In addition, recombinant FLuc protein further showed the impermeability against the plasma membrane. Similar result was also observed in the *in vivo* experiment. After being injected into the VX2 tumor-bearing rabbit, the FLuc exclusively resided within the tumor tissue without being detected in the blood plasma or other organs. Human cancer cell lines originated from various organs were lysed and treated to the FLuc, and none of the human substrates was reactive against the FLuc. As a final step, FLuc recombinant protein was intravenously injected into a human. The luciferase was degraded with the half-life of 20 to 30 minutes in blood, and was untraceable from 1.5 hr after the injection. In addition, the blood plasma was nonresponsive against the fatty acids. Hematological analysis was also comparable between the pre- and post-injection. Altogether, our study collectively demonstrates the safety of the firefly luciferase.

Key words : Firefly luciferase, human trial, oncolytic virus, OTS-412, reporter gene

서 론

보고 유전자 이미징(reporter gene imaging, RGI)은 관찰하고자 하는 세포나 조직을 비침습적으로 읽어낼 수 있는 기법이다[25]. RGI는 관찰 대상에서 보고 유전자를 발현시키는 원리에 기반하며, 작동 양식(modality)에 따라 방사성 동위원소의 분해에 기반한 심부 조직 이미징(deep tissue imaging)과, 빛의 파장에 기반한 광학 이미징(optical imaging)으로 구분된다[1]. 이들은 각각의 특성에 따라 인체 내 특정 위치를 관찰하는 의학 이미징과, 생체 내 추적 연구(longitudinal study)에서 높은 활용성을 보이고 있다. RGI는 외부에서 유전자를 도입하는 것에 기반하기 때문에 임상적 안전성을 증명해야 하며, 이는 RGI의 높은 임상적 효용성에도 불구하고 실제 적용에 있어

서 제한이 될 수 있다. 심부 조직 이미징의 경우, 이미 NIS [7]와 HSV-tk [5]에 대한 임상 허가를 받아 의학 이미징에서 활용되고 있는 반면, 광학 이미징의 임상적 활용은 현재 증가 추세에 있다.

루시페레이스(luciferase)는 생체발광 이미징(bioluminescence imaging)의 대표적인 사례로, 발광 물질인 루시페린(luciferin)을 아데노신 삼인산(ATP) 및 망간 이온(Mg^{2+})과 같은 조효소와 함께 산소화루시페린(oxyluciferin)으로 변환시키는 과정에서 자연 발광을 유도한다[4]. 반딧불이 루시페레이스(firefly luciferase, FLuc)는 루시페레이스의 대표적인 사례로, 세포 독성이 없고, 관찰 대상에 표적 유전자를 지속적으로 발현시킴으로써 대상에 추가적인 자극이나 영향을 가하지 않아, 장기간에 걸친 추적 연구를 용이하게 수행할 수 있다는 장점이 있다[23]. 또한, 10^{-20} mol의 미량으로 검출이 될 만큼 바이오 마커 중 가장 높은 민감도를 갖는다[6]. 이러한 특성으로 현재 활발하게 연구되고 있는 유전자 치료(gene therapy) [15], 세포 치료(adoptive cell therapy) [11, 20] 그리고 항암 바이러스 치료(oncolytic virus therapy) [16]와 같이 외부 주입 인자들의 생체 내 분포와 활성을 추적하는 연구에 접목되어 활용되고 있다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-7551, Fax : +82-51-510-7558

E-mail : thhwang@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

하지만 FLuc의 사람에서의 안전성은 아직 확인되지 않았다. FLuc은 인간의 지방산 아실-CoA 합성 효소(fatty acyl-CoA synthetase, FACS)와 유사성으로 인해 인체에 영향을 미칠 수 있는 우려가 있기 때문이다[17]. 인체 내 전달 과정이 바이러스나 치료용 세포를 통해 이루어지기 때문에, 해당 유전자가 체 내에서 비특이적으로 전달 또는 흡수될 수 있다는 우려가 남아있다. 그러나, 현재까지 보고된 전임상 모델에서의 연구들은 FLuc의 안전성을 보여주고 있다[22]. 인간의 정상 세포와 암세포에 FLuc을 도입하였을 때 특이한 생물학적 활성이 관찰되지 않았고[13], 또한 원숭이 배아에 유전자 삽입을 통해 FLuc를 수년간 발현시켰을 때에도 어떠한 독성도 관찰되지 않았기 때문이다[22]. 나아가, 국제 의약품 규제 조화위원회(ICH)에서는 이미 2009년에 항암 바이러스의 임상 실험에 있어서 약물 동역학(pharmacodynamics)과 약물 동태학(pharmacokinetics)의 목적으로 표적 유전자의 사용 가능성을 게재하였다[24].

따라서, 본 연구는 FLuc에 대해 제기될 수 있는 문제들을 생체 외, 동물, 그리고 인체실험을 통해 점검하였다. FLuc의 유전자와 재조합 단백질을 이용했으며, 유전자 전달에는 기존에 개발된 OTS-412가 이용됐다[10]. 비임상 모델 연구를 통해 FLuc는 세포의 막 투과성이나 비 특이적 확산 가능성이 없고, FACS 효소와의 기능적 유사성은 생체 내 환경에서는 관찰되지 않으며, 인간 유래 기질과의 반응성에서 활성을 띠지 않음을 확인했다. 인체 실험을 통해 혈장 내에서 1.5시간 이내에 모두 사라지고 FACS와의 유사성이 없다는 것과, 혈액(hematology) 및 혈액화학(hematochemistry) 검사를 통해 인체 내에서의 유해성이 없다는 것을 확인할 수 있었다.

재료 및 방법

OTS-412 바이러스

OTS-412는 와이어스 주(Wyeth strain) 백시니아 바이러스의 티미딘 키나아제(thymidine kinase, VV-tk) 유전자를 1형 헤르페스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus, HSV)의 자연변이 티미딘 키나아제(HSV-tk) 유전자와 firefly luciferase (FLuc) 유전자로 치환한 항암 바이러스이다.

세포 배양 및 바이러스 감염

여러 암 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, USA) 함유된 DMEM 배지(Hyclone)에 배양을 하였다. 배양한 세포들은 바이러스 감염 하루 전 적절한 세포 수로 well plate에 seeding 하였다. OTS-412 바이러스는 2% FBS 배지에 각 농도 바이러스를 희석 후 세포에 2시간 감염 후 배양 배지로 교체하였다. 이후 시간대별로 샘플을 회수 후 luciferase assay를 하였다.

실험동물에 바이러스 투여 및 샘플 채취

뉴질랜드 화이트 토끼(하나 바이오, 한국)는 그룹당 암수 3마리씩(총 12마리) 분량을 받아 양산부산대학교병원 전임상 시험 교육센터에서 1주일간 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다(PNUYH-2018-054). 대조군과 실험군으로 암수 각각 3마리 토끼에 VX2 종양 식립 후 2주일째 대조군은 생리식염수를 실험군은 5×10^8 pfu의 OTS-412 바이러스를 토끼 귀 정맥으로 전신투여 했다. 동물 실험에는 Hydroxyurea (HU, Sigma, USA)를 면역조절제로 이용하여 OTS-412 주입 하루 전에 80 mg/kg, 주입 후부터 7일간 60 mg/kg/day의 용량으로 투여했다(mOTS-412). 이후 시간대별로 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였고, 투여 후 5일째 각 주요장기를 적출하여 일부는 냉동 보관(-70°C)하였고, 다른 나머지는 10% formaldehyde (pH 7.4 인산 완충용액으로 용해) 용액에 48시간 고정 후 분석에 사용하였다.

재조합 firefly Luciferase (rFLuc)

재조합 firefly luciferase (rFLuc)은 Promega사의 rFLuc (Quantilum® Recombinant Luciferase)을 사용하였다. rFLuc은 배양 배지에 0.1 mg로 희석하여 여러 암세포에서 사용을 하였으며, 연구대상자에게 투여한 rFLuc은 생물안전캐비닛(BSC) 내에서 총 60 mg의 rFLuc을 개봉하여 주사용 생리식염수(중의제약) 22 ml에 희석 후 0.2 µm의 주사용 필터(Satorious, USA)에 필터 후 50 ml 코니칼 튜브에 투여 전까지 밀봉하였다.

재조합 firefly Luciferase 단백질 인체내 투여

재조합 FLuc (rFLuc)은 Day 1에 2회로 나누어서 정맥 내(IV) 투여하였다. 멸균 생리식염수(0.9% NaCl) 7 ml에 희석된 rFLuc 15 mg의 부하 용량(loading dose)을 약 1분 동안 IV bolus injection 하였고, 이후 멸균 생리식염수 500 ml에 rFLuc 45 mg이 혼합된 용액을 정맥 내(IV)로 2시간 동안 유지용량을 잠적 투여(infusion)할 예정이었으나, 실제 투여 시작 후 1.5시간 동안 약 200 ml 정도만 투여가 되어, 나머지 rFLuc 용액 300 ml는 약 1시간 동안 5 ml/min 속도로 주사하였다. 따라서 투여 시작 후 총 2.5시간 이내에 투여가 완료되었다.

Firefly Luciferase (FLuc) 활성 측정

FLuc활성 측정은 Promega사의 Luciferase Assay System (Promega, USA)을 사용하였으며 제조사의 매뉴얼에 따라서 진행을 하였다. 각각 암세포와 백혈구는 luciferase assay system에 동봉된 용해 완충액(1× lysis buffer)을 사용하여 세포막을 완전히 녹이고 원심분리 후 세포의 lysates을 회수하였다. 제조사의 매뉴얼에 따라 각각 샘플을 20 µl씩 분주한 뒤 luciferin mixture 100 µl를 첨가 후 luminometer (Tecan, Swiss)에서 측정하였다. 또한, 가시광선 하에서 연구대상자 혈장의

rFLuc 활성을 시각적으로 확인하기 위해서 연구대상자에게서 분리한 혈장 20 μ l를 1.5 ml 튜브에 넣고 luciferin mixture 100 μ l를 첨가하여 암실에서 일반 카메라로 촬영하였다.

인체 검체 수집 및 처리

연구대상자의 말초 정맥을 확보 후 혈액을 채취하였다. rFLuc 투여 전, 투여 시작 후 5분, 30분, 1.5시간, 2시간, 2.5시간, 투여 종료 후 1.5시간, 20시간에 시험대상자의 전혈을 채취하여 혈액보관튜브(BD, USA)에 담은 뒤 원심 분리하여 혈장을 분리하였고, 전혈의 혈액세포 중 적혈구 세포를 용혈(RBC lysis buffer, Gibco, USA)하여 원심분리 후 PBS (Hyclone, USA)로 2회 수세(washing) 후 백혈구만 따로 분리하였다. 채취한 연구대상자 혈액의 일반검사(혈액학, 혈청학)는 양산부 산대학병원 진단검사의학과에서 진행하였다.

연구대상자의 혈액에서 acyl-CoA-synthetase 활성 측정

Acyl-CoA-synthetase 활성 측정은 Acyl-CoA Synthetase Activity Assay Kit (PromoCell, Germany)를 사용하였다. 1×10^6 세포 수의 인간 간세포 유래 간암세포주(HepG2)와 시간대별로 수집된 연구대상자의 1×10^6 백혈구(WBC)를 균질화 과정(homogenize)을 통하여 세포막을 터트린 후 원심분리를 하여 상층액을 회수하였다. 양성대조군인 간암세포주(HepG2) lysate, 연구대상자의 백혈구 lysates과, 혈장(Plasma)을 Acyl-CoA-Synthetase Assay Kit내에 동봉된 버퍼(ACS buffer)를 이용하여 희석 후 검정 96 well plate에 샘플 당 2 well에 각각 50 μ l씩 넣은 뒤 assay kit의 반응혼합액(reaction mix)과 배경 혼합액(background mix)을 50 μ l씩 가한 후 Multimode Microplate Reader (Tecan, Swiss)의 자극파장 535 nm, 방출파장 587 nm 하에서 kinetic 방법으로 30분간 측정하였다. 결과는 Acyl-CoA Synthetase Activity Assay Kit의 사용자 매뉴얼에 따라서 정량화 하였다.

통계 분석

모든 실험한 결과의 통계 분석은 Prism 8 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA) 이용하여 나타냈고, 그룹 간의 통계적 유의성 검정은 unpaired two-tailed t-tests을 통하여 확인하였다.

결 과

OTS-412 감염 항암세포 주에서 firefly luciferase의 세포 외 유출(release)

OTS-412에 감염된 항암세포에 발현된 FLuc의 세포 밖으로 유출을 확인하기 위하여 여러 항암 세포주에 여러 농도의 OTS-412바이러스를(10 MOI~0.0001 MOI) 감염 후 Luciferase assay 하였다. 세포용해물(lysate)과 세포배양액에서 FLuc의

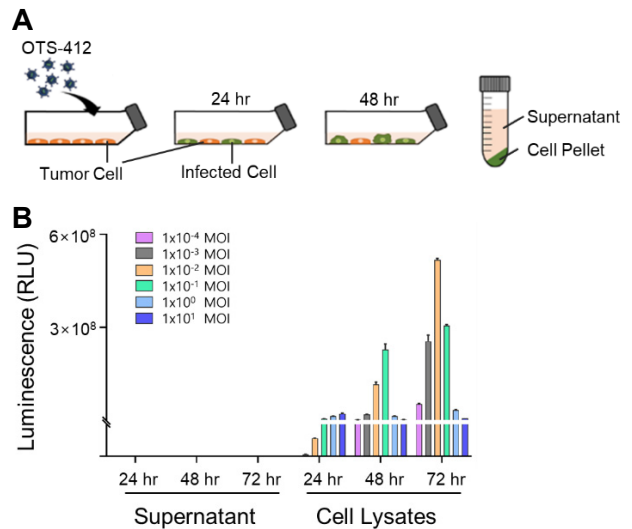


Fig. 1. Extracellular FLuc release of OTS-412 infected cancer cell. Schematic of OTS-412 infection into tumor cell (A), various concentration of OTS-412 infected in Hela cell. Cell supernatant and pellet after OTS-412 infection collected at 24 hr, 48 hr, 72 hr. Luciferase activity of supernatant and cell pellet measured in OTS-412 infected tumor cell (B).

활성 측정 결과 세포 용해물에서만 활성이 나타났다(Fig. 1). OTS-412 감염 후 발현된 FLuc는 세포 내에만 존재하여 세포 밖으로 유출이 되지 않음을 확인할 수 있었다.

여러 항암세포주에서 재조합 firefly luciferase의 세포내로 유입(uptake)

OTS-412에 의하여 발현된 FLuc이 세포밖으로 유출이 되지 않음을 확인하였으나 OTS-412에 항암효과(세포용해)로 세포 밖으로 유출된 FLuc가 다른 세포로 유입될 가능성을 확인하고자 rFLuc를 배양 배지에 첨가하여 시간대별로 FLuc의 활성을 확인하였다. 사람 대장암 세포(HCT-116)와 사람 자궁경부암 세포(Hela)배양 시 rFLuc를 배양배지에 첨가 후 1시간, 4시간, 24시간 후에 세포를 회수하여 세포용해물에서 luciferase의 활성을 측정하였다. 그 결과 모든 시간대 샘플에서 luciferase의 활성을 보이지 않았다(Fig. 2A). 따라서 rFLuc이 세포내로 유입을 없음을 확인하였다. 또한 여러 항암세포에서 세포의 용해물(cell lysate)에서 Fluc과 유사 기질이 있는지 확인하기 위하여 여러 세포 용해물(cell lysate)에 luciferase의 활성을 측정하였고 그 결과 여러 항암 세포 용해물에서 luciferase 활성은 나타나지 않았다(Fig. 2B). 이를 통해 FLuc는 세포 내로 세포 내로 유입이 되지 않으며 또한 여러 기원 세포의 용해물에 FLuc의 유사기질이 없음을 알 수 있었다.

중앙 토끼 동물의 혈청과 조직에서 firefly luciferase 활성 확인

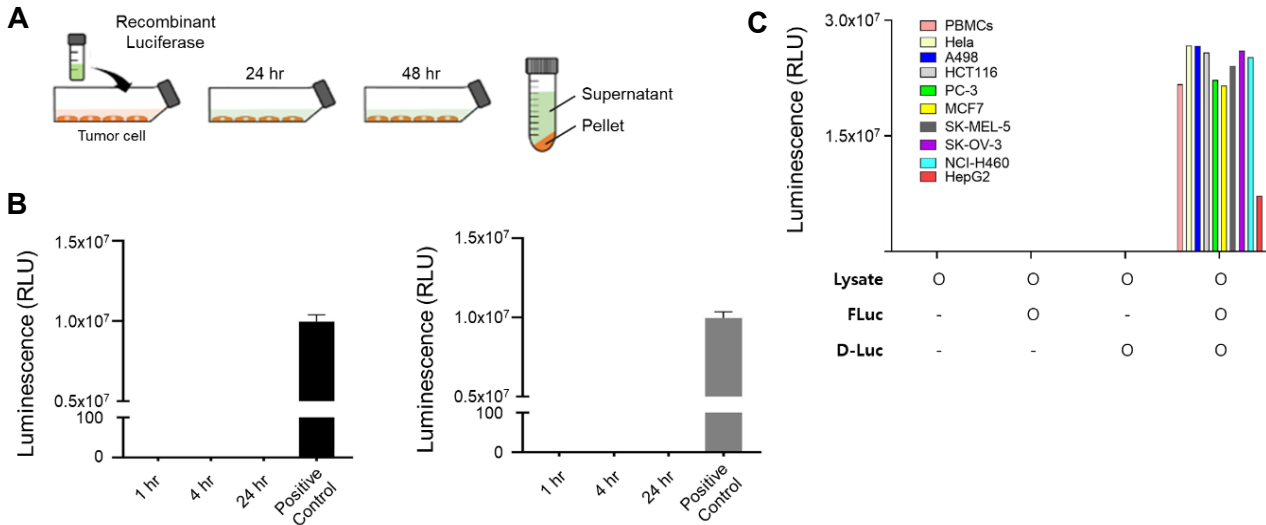


Fig. 2. rFLuc uptake into tumor cell and FLuc activity in various cell lysate. Schematic of rFLuc uptake procedure in tumor cell (A). 0.1 μ g of rFLuc was added into culture media, and the luciferase activity of cell pellet was measured after 1 hr, 4 hr, and 24 hr (B). Luciferase activity test of various organ cell pellet. There is no similar substrate of FLuc in various organ cell pellet (C).

생체 내 투여된 mOTS-412에 의하여 발현된 FLuc의 생체내 분포 및 활성을 확인하기 위해 VX2 종양 토끼 동물에서 mOTS-412를 전신투여 후 혈청과 주요장기에서 FLuc의 활성을 확인하였다. mOTS-412 투여 후 1일, 8일, 16일, 22일, 28일, 36일, 42일째 혈청에서 FLuc의 활성은 나타나지 않았다(Fig. 3A). 또한 mOTS-412 투여 후 5일째 주요 장기에서 FLuc의 활성은 종양을 제외한 나머지 조직에는 없었다(Fig. 3B). 항암 바이러스 특이적인 항체를 사용하여 각 주요장기의 면역염색 결과 종양조직에만 mOTS-412의 선택적인 분포를 확인하였다

(Fig. 3C). mOTS-412를 VX종양토끼모델에 전신 정맥 투여하였고, 투여 후 mOTS-412에 의하여 발현된 FLuc는 투여 후 1일째부터 혈청에 활성이 나타나지 않았으며, 또한 종양이외의 어떠한 장기에서도 FLuc의 활성이 없는 것으로 나타났다. 따라서 mOTS-412에 의하여 발현된 FLuc는 종양을 제외한 주요 조직에 어떠한 영향도 없는 것으로 보인다.

피시험자의 혈장과 백혈구 세포 용해물에서 rFLuc 약동학 측정

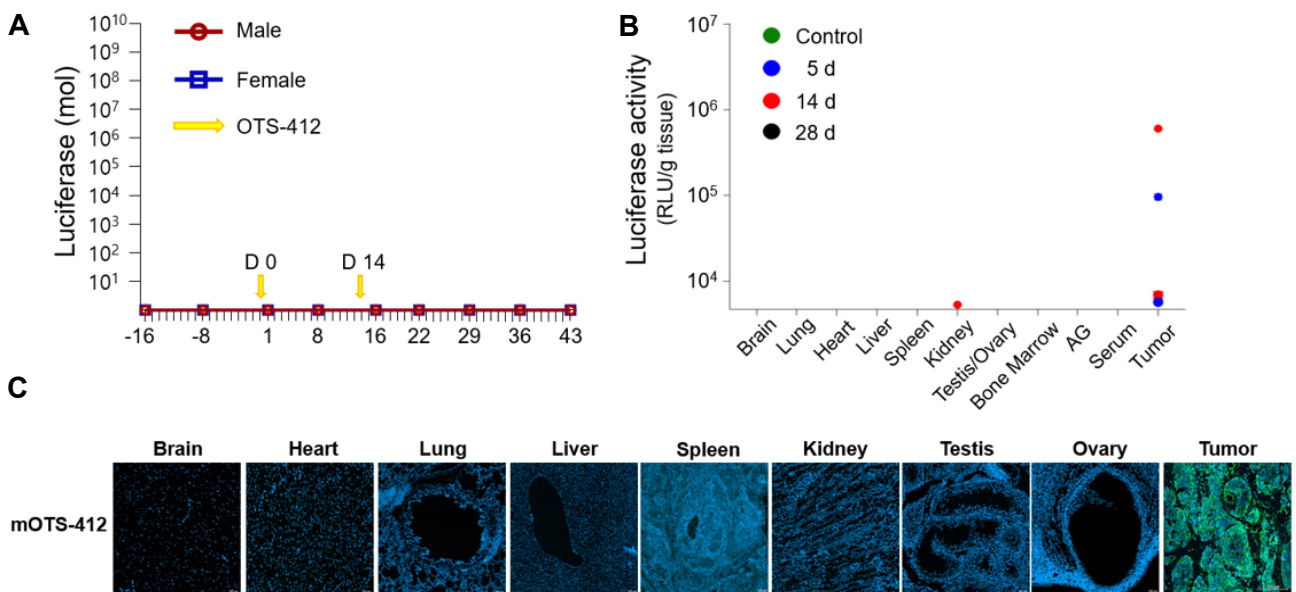


Fig. 3. FLuc activity of mOTS-412 (OTS-412 with HU) injected VX2 rabbit model. FLuc activity of mOTS-412 injected VX2 rabbit serum (A), major tissue lysates (B), and immunofluorescence staining of A27 for mOTS-412 biodistribution (C).

FLuc가 혈액 내 존재 시 인체 안전성을 확인하기 위하여 생물학적 활성을 가질 수 있는 고용량 15 mg의 rFLuc인 부하 용량과 45 mg 유지용량으로 나누어서 총 60 mg을 2시간 30분에 걸쳐 연구대상자에게 전신 투여 후 임상적 생화학적 평가를 하였다. 부하용량 투여 직후 5분, 30분에 rFLuc 활성 측정이 되었다. 저 용량의 유지 용량을 투여 시에도 rFLuc 활성이 관찰되지 않다가 고용량의 유지 용량 투여시에는 투여 시간동안 (2시간, 2.5시간) 채혈한 혈청에서 관찰되었다. 혈액세포 용해물(lysates)에 luciferase 활성을 측정된 결과 활성이 나타나지 않았다(Fig. 4A). 가시광선 하에 재조합 luciferase 투여한 연구대상자의 혈장(plasma)의 자체 발광을 암실에서 관찰한 결과 rFLuc 투 후 5분, 10분에 수집된 연구대상자의 혈장에서 발광이 관찰되었고, 이후 1.5시간에서는 발광이 나타나지 않았다. 이후 2시간, 2.5시간 수집된 연구대상자의 혈장에서 발광이 관찰되었고 투여종료 후 1.5시간, 20시간의 연구대상자의 혈장에서는 발광이 관찰되지 않았다(Fig. 4B).

사람의 혈장과 백혈구 lysates에서 fatty acyl-CoA-synthetase (FACS) 활성 측정

Fluc는 구조적으로 fatty acyl-CoA-synthetase (FACS)와 유사하며 FACS와 유사한 활성을 할 수 있는 것으로 보고되어 있어 이를 확인하기 위하여 연구대상자에 rFLuc 전신 투여 후 혈장(plasma)에서 FACS의 활성을 측정하였다. 부하 용량 투여 직후인 5분, 30분의 혈장에서 luciferase 활성이 감지되었지만, FACS의 활성은 전혀 나타나지 않았다. 그러나, ATP가 충분히 있고, CoA가 혈청보다는 많은 백혈구 lysate에서 FACS

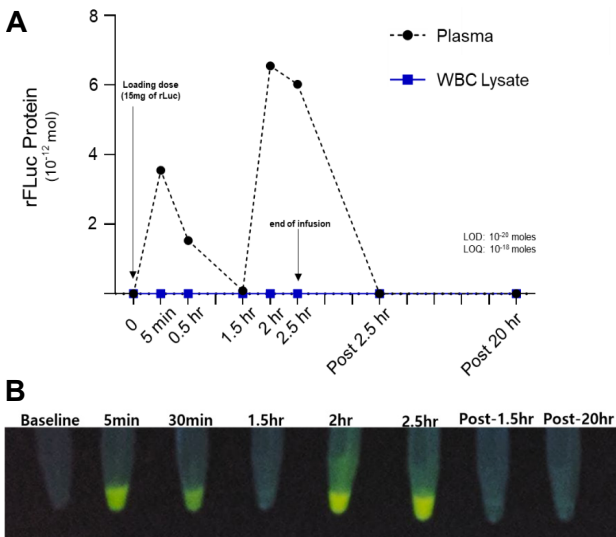


Fig. 4. FLuc activity in human plasma and WBC. FLuc activity measured in human plasma and WBC lysate at 5 min, 30 min, 1.5 hr, 2 hr, 2.5 hr, post-1.5 hr, post-20 hr after rFLuc injection (A). Visible observation of FLuc activity in human plasma as time course (B).

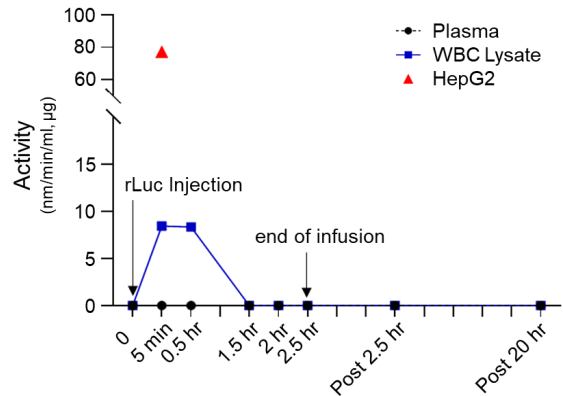


Fig. 5. Activity of acyl-CoA-Synthetase in human plasma and WBC acly-CoA-Synthetase activity measured in human plasma and WBC lysate at 5 min, 30 min, 1.5 hr, 2 hr, 2.5 hr, post-1.5 hr, post-20 hr after rFLuc injection.

의 활성이 일시적으로 LOD 이상(LOQ 이하) 미량 검출되었다. 인간의 간세포에서 유래한 HepG2 간암세포주에서는 백혈구 용해물(lysate)에서 보다 10배 이상 활성이 나타났다. 이후 1.5시간, 2시간, 2.5시간, 및 투여종료 후 1.5시간과 20시간의 연구대상자의 혈장과 혈구에서는 FACS의 활성은 없었다(Fig. 5).

임상적 안전성 모니터링

연구대상자에 재조합 FLuc 투여 전 후 안전성 모니터링을 위해 신체검진, 활력징후(혈압, 맥박수, 체온) 측정, 및 실험실 검사가 시행되었다. rFLuc 투여 전, 후에 신체검진 상에 변화는 없었고, 활력징후는 모두 정상 범위였으며(Table 1), rFLuc 투여 전과 후로 어떠한 이상반응도 나타나지 않았다. 실험실 검사는 혈액학, 혈액화학, 혈액응고, 소변 검사가 시행되었다. 대부분의 실험실 결과는 투여 전과 후에 정상범위 내에 있었고, hematocrit, uric acid, phosphorus, HDL-cholesterol, triglyceride, urine pH 검사 수치가 정상범위에서 약간 벗어나긴 하였지만, 임상적으로 유의하지 않았다(not clinically significant, NCS). 또한, 투여 전 수치와 비교하여 큰 차이를 보이지 않아 rFLuc의 투여와는 관련 없는 변화로 판단된다(Fig. 6, Table 2-5).

고 찰

보고 유전자 이미징(RGI)은 생체의 내부를 실시간, 비침습

Table 1. The vital signs of pre/post rFLuc infusion

	Time point	
	Pre-infusion	Infusion 2.5 hr (End of infusion)
Blood pressure	110/60 mmHg	110/70 mmHg
Heart rate	96 bpm	88 bpm
Body temperature	36.5°C	36.4°C

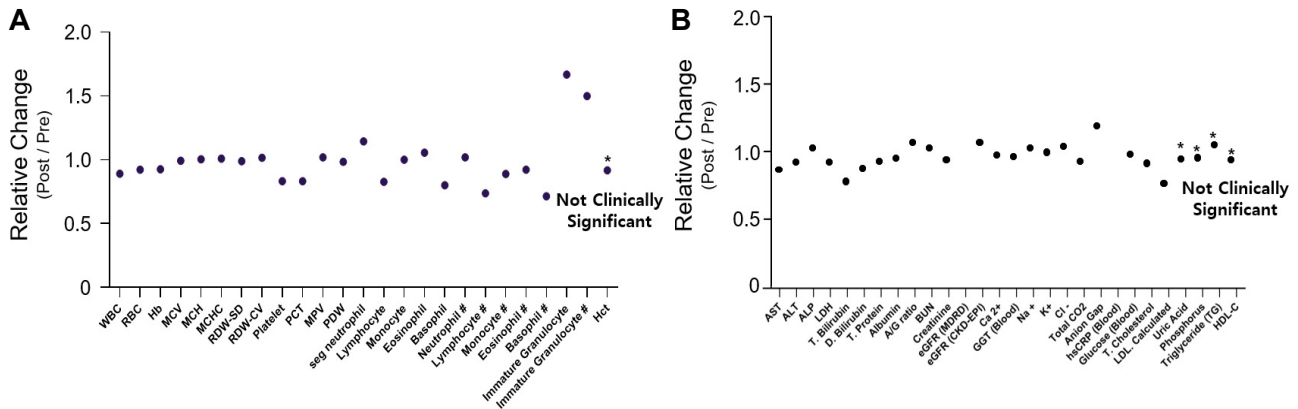


Fig. 6. Hematology and chemistry changes in human blood after rFLuc infusion. The Changes of hematology (A) and biochemistry (B) ratio after rFLuc infusion. There were no hematology and biochemistry changes in pre and post infusion (* not clinically significant, NCS).

적으로 관찰할 수 있는 기법으로, 의학은 물론이고 기초연구 분야에서도 매우 중요한 가치를 갖는다. 1982년 처음 개발된 이래로 각종 비임상 실험 기법은 물론이고 의학 이미징에 결

쳐 활용되어 왔다. RGI의 임상적 활용은 주로 심부 조직 이미징을 비롯한 의료 분야에 제한적이다. 심부 조직 이미징 기법은 1935년 네이처(Nature)지에 보고된 인-32(³²Phosphorus)의

Table 2. Hematology result comparison of pre and post rFLuc protein injection

Hematology	Time point		Unit
	Pre-infusion	Post-20 hr	
WBC	7.12	6.34	10 ³ cells/ml
RBC	4.92	4.54	10 ⁶ cells/ml
Hb	14.7	13.6	g/dL
Hct	42.2	38.7	%
MCV	85.8	85.2	fL
MCH	29.9	30.0	Pg
MCHC	34.8	35.1	g/ml
RDW-SD	39.8	39.4	fL
RDW-CV	12.8	13.0	%
Platelet	286	238	10 ³ cells/ml
PCT	0.30	0.25	%
MPV	10.5	10.7	fL
PDW	12.5	12.3	%
seg neutrophil	49.7	56.9	%
Lymphocyte	41.2	34.1	%
Monocyte	6.3	6.3	%
Eosinophil	1.8	1.9	%
Basophil	1.0	0.8	%
Neutrophil #	3.54	3.61	10 ³ cells/ml
Lymphocyte #	2.93	2.16	10 ³ cells/ml
Monocyte #	0.45	0.40	10 ³ cells/ml
Eosinophil #	0.13	0.12	10 ³ cells/ml
Basophil #	0.07	0.05	10 ³ cells/ml
Immature Granulocyte	0.3	0.5	%
Immature Granulocyte #	0.02	0.03	10 ³ cells/ml

Table 3. Hemato-chemistry result comparison of pre and post rFLuc protein injection

Chemistry	Time point		Unit
	Pre-infusion	Post-20 hr	
AST	37	30	IU/L
ALT	51	45	IU/L
ALP	77	78	IU/L
LDH	205	181	U/L
T. Bilirubin	1.0	0.7	mg/dl
D. Bilirubin	0.17	0.14	mg/dl
T. Protein	8.2	7.3	gm/dl
Albumin	4.9	4.5	g/dl
A/G ratio	1.5	1.6	-
BUN	12.5	12.7	mg/dl
Creatinine	0.92	0.83	mg/dl
eGFR (MDRD)	>60	>60	mL/min/1.72m ²
eGFR (CKD-EPI)	91	97	mL/min/1.72m ²
Uric Acid	8.9	8.1	mg/dl
Ca	9.8	9.3	mg/dl
P	2.6	2.4	mg/dl
GGT (Blood)	45	42	IU/L
Na	138	140	mmol/L
K+	3.9	3.8	mmol/L
Cl	102	105	mmol/L
Total CO2	27	24	mmol/L
Anion Gap	9	11	mmol/L
hsCRP (Blood)	0.06	0.26	mg/dl
Glucose (Blood)	100	96	mg/dl
T. Cholesterol	139	121	mg/dl
Triglyceride (TG)	256	267	mg/dl
HDL-C	43	39	mg/dl
LDL-C Calculated	44	30	mg/dl

Table 4. Blood coagulation test in human blood after rFLuc infusion

Test	Time point		Unit
	Pre-infusion	Post-infusion 20 hr	
PT time	13.2	13.2	sec
PT percent	103	103	%
PT INR	0.99	0.98	-
aPTT (Blood)	41.8	42.2	sec

Table 5. Urine test after rFLuc infusion

Test	Time point		Unit
	Pre-infusion	Post-infusion 20 hr	
pH	6.5	7.5	-
Urine protein	-	-	mg/dl
Urine glucose	-	-	-
Urine Ketone	-	-	-
Urine Bilirubin	-	-	-
Urine urobilinogen	Normal	Normal	mg/dl
Urine OB	-	-	-
Urine Color	Straw	Straw	Yellow
Urine Clarity	Clear	Clear	Clear
Urine RBC	0-2	0-2	/HPF
Urine WBC	0-2	0-2	/HPF
Urine Epi	0-2	0-2	/HPF
Urine Crystal	-	-	-
Urine Cast	-	-	-
Urine Bacteria	-	-	-
Urine yeast like cell	-	-	-
Urine sperm	-	-	-
Urine RBC	5.8	2.2	cells/μl
Urine WBC	2.4	1.2	cells/μl
Urine Epi	0.7	0.1	cells/μl

발견 이래로 지속적으로 발전을 거듭해온 방사성 동위원소 기술과 접목되어 의학 이미징 분야에서 다양한 임상적 활용이 가능하기 때문이다[21]. 대표적으로, 오늘날 활발하게 이용되고 있는 PET과 SPECT에도 적용되었으며, 외인성 유전자(exogenous gene)로 인한 부작용의 가능성을 배제하기 위해 내인성 유전자(endogenous gene)에 대한 개발 또한 왕성하게 이뤄지고 있다. 그에 반해 광학 이미징 기법은 의학적 활용이 매우 드물고, 오늘날까지의 주된 적용은 비임상 모델이나 생체 외 분석과 같은 기초 연구 분야에 한정적이었다. 광학 이미징에는 대표적으로 발광(bioluminescence), 형광(fluorescence), 광음향(photoacoustic)과 같은 기법들이 있으며, 이들은 모두 적외선, 가시광선, 자외선과 같이 관찰이 용이한 파장대의 빛을 방출한다. 하지만 이들은 의학 이미징에 이용되고 있는 양성자나 감마선에 비해 투과율이 현저히 낮아, 인체 내부의 종양과 장기의 비침습적 활용이 필요한 의료 영역에서는 적합하

지 않다.

오늘날에는 질환 치료의 목적으로 외부에서 주입하는 세포, 유전자, 바이러스 치료제에 대한 연구가 왕성하게 이뤄지고 있으며, 그에 따른 광학 이미징의 필요성이 대두되고 있다. 도입 물질이 생체 내 어느 곳에 위치하는지, 활성 및 대사과 같은 정상 기능을 보이는지, 등 지속적인 관찰이 필요하기 때문이다. 특정 시점에 국한하여 관찰하는 것이 아니라, 주입 인자에 대한 영향 없이 장기적인 추적 연구가 필요하기 때문에, 광학 이미징 기법이 지대한 유효성을 가지고 있다. 구성발현을 통해 도입 유전자를 지속적으로 발현시키고, 분석이 필요한 시점에 루시페린을 도입시켜 관찰이 가능하기 때문이다. 본 연구에서 이용된 항암 바이러스의 경우, 항암 치료제 개발을 위한 왕성한 연구에도 불구하고, 현재 임상적으로 활용 가능한 보고 유전자는 지극히 제한적이다. 한편, 국제 의약품 규제 조화 위원회(ICH)는 이미 항암 바이러스의 추적을 위해 보고 유전자의 사용 가능성을 시사했다[24]. 초기 임상에서 항암 바이러스의 위치 추적과 효과 및 활성 관찰을 위해 반드시 필요하기 때문이다. 추적뿐만 아니라, FLuc는 해당 바이러스의 인체 내 비 특이적인 확산(shedding)여부를 확인하는 데에도 꼭 필요하다. 이러한 현상을 관찰하기 위해 현재에는 qPCR 기법이 이용되고 있다. 하지만, 또다른 ICH의 보고에 따르면 기존에 이용되는 qPCR 기법은 정확도가 떨어지므로, 특이성, 민감성, 재현성이 높은 시험법이 필요하다는 점이 제기되었다[4]. 혈액 내 항암바이러스 유전자의 검출량은 매우 적어서 qPCR 기법은 적합하지 않기 때문이다. 본 연구에서는 혈액에 존재하는 미량의 바이러스를 FLuc를 이용하여 검출할 수 있었으므로, 임상적 활용 가능성을 다시금 시사한다. 따라서 FLuc는 추적 이외에도 치료제의 안전성을 확인하는 데에도 유용하게 활용될 수 있다.

이러한 장점에 기반하여, FLuc의 임상 사용의 필요성은 매우 시급하나, 인체 내안전성에 대한 우려로 임상에서의 사용은 매우 드물게 이뤄지고 있다. 현재까지 임상적으로 진행된 루시페라이즈는 바다팬지에서 유래된 renilla luciferase가 유일하다[14]. 이외에 임상실험이 진행된 사례가 LacZ 효소가 전부임을 고려하면[18], 광학 영상 기반 물질의 임상적 허용은 매우 제한적임을 알 수 있다. FLuc는 LacZ, 및 renilla luciferase와 마찬가지로 외래 유전자이지만, 이미 각종 비임상 연구를 통해 안전성에 대한 확인이 이루어졌다. 또한 FLuc를 기반으로 한 각종 비임상 연구와 실험기법 등, 참고할 수 있는 연구 기법이 다양하여 보다 더 높은 연구적 활용성을 갖는다. 안전성에 대한 재확인을 위해 본 연구에서도 FLuc의 무작위적 확산이나 비 특이적 대사작용에 대한 실험을 진행했고, 생체 외 실험과 동물 실험에서 안전성을 확인했다. FLuc 유전자를 보유한 바이러스는 감염의 대상이 되는 세포에만 머무르며 배양액에 무작위적으로 떠다니지 않았고, 인체 유래 세포 용해물과 FLuc의 반응 여부 관찰 실험을 통해 FLuc이 무작위적으로

확산되지 않으며, 대상 세포에 특이적으로 감염된다는 현상을 확인할 수 있었다. 생체에서의 확인을 위해 토끼에 주입된 항암 바이러스 OTS-412 또한 토끼의 혈액에서 관찰되지 않아, 비 특이적 감염 및 확산이 일어나지 않음을 확인했다. 이러한 결과는 FLuc 유전자가 임상에서 추적물질로 유용하게 활용될 수 있음을 나타낸다.

더 나아가, 우리는 인체실험을 통해 FLuc의 인체 내에서의 안전성을 확인했다. 이전 비임상 결과에서 독성에 대한 아무런 근거가 나타나지 않아 인체에서의 안전성은 이미 충분히 유추할 수 있었으나, 외래물질에 대한 기관의 인증을 기대하기 어려웠으므로, 인체실험은 자가실험(self-experimentation)의 원리 하에 별도의 기관 승인 없이 진행됐다[3, 9]. 자가실험은 역사적으로 수많은 유의미한 발견을 낳게 해준 방법으로, 실험 책임자 본인이 안전성이나 연구의 필요성에 대한 실험적 근거와 확신을 기반으로 본인 스스로를 대상으로 진행하는 실험을 의미한다. 본 연구에서도 FLuc의 안전성을 명확히 보여주는 결과가 도출되었으므로 자가실험을 진행하여 FLuc의 인체 내 안전성을 증명하고자 했다. 우선, FLuc의 인체 내 반감기 관찰을 위해 높은 용량의 FLuc 재조합 단백질을 정맥 주사(injection)와 점적 투여(infusion)했다. 주입된 FLuc이 매우 높은 용량이었음에도 불구하고, 두 경우 모두 주사 후 1.5시간 이내에 혈액에서 관찰할 수 없었다. 이는 비 임상실험 결과와 같아, FLuc 단백질이 혈액 내에 지속적으로 떠돌거나, 비 특이적으로 체 내 장기를 감염시킬 가능성이 없음을 의미한다. 또한, 기존 보고와 달리 FLuc 단백질의 반감기는 불과 30분 이내인 것으로 확인되어 체내 안전성에 대한 근거를 더했다[19]. 주입 5분 후에는 혈액 내에 FLuc의 활성이 매우 높았음에도 불구하고, 혈장 샘플에서 FACS 효소의 기능을 할 수 없음을 확인했다. FLuc의 대사과정에는 ATP와 Mg²⁺와 같은 조효소가 필요하여 주로 세포 내부에서 이루어지나, 혈장에는 이러한 조효소가 충분히 없기 때문이다[23]. 독성이나 대사과정상의 영향 여부를 위해 진행한 혈액학 검사와 혈액 화학 검사에서도 FLuc 재조합 단백질이 혈액에 거의 영향을 주지 않음을 확인하여, FLuc 재조합 단백질의 임상적 안전성을 증명할 수 있는 것으로 사료된다. 체 내 잔존, 비특이적 확산, 독성 유발, 및 대사과정에 관한 연구에서 어떠한 단서가 도출되지 않았기 때문이다.

FLuc는 수많은 연구적 배경과 비 임상에서의 안전성에 대한 보고에도 불구하고 아직 임상 허용이 제한적 이어왔다. 하지만, 세포, 유전자, 바이러스 치료제의 중요성이 대두됨에 따라, 점점 더 임상적 필요성이 증가할 것으로 예상된다. 이러한 필요성을 배경으로, 본 연구는 FLuc에 대한 임상 실험을 처음으로 진행한 사례로, 향후 FLuc의 임상 실험의 초석이 될 수 있기를 기대한다.

감사의 글

과제는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Badr, C. E. and Tannous, B. A. 2011. Bioluminescence imaging: progress and applications. *Trends Biotechnol.* **29**, 624-633.
2. Chievitz, O. and Hevesy, G. 1935. Radioactive indicators in the study of phosphorous metabolism in rats. *Nature* **136**, 754-755.
3. Davis, J. K. 2003. Self-experimentation. *Account. Res.* **10**, 175-187.
4. European Medicines Agency. 2009. ICH considerations – general principles to address virus and vector shedding.
5. Gambhir, S. S., Bauer, E., Black, M. E., Liang, Q., Kokoris, M. S., Barrio, J. R., Iyer, M., Namavari, M., Phelps, M. E. and Herschman, H. R. 2000. A mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene shows improved sensitivity for imaging reporter gene expression with positron emission tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 2785-2790.
6. Gould, S. J. and Subramani, S. 1988. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal. Biochem.* **175**, 5-13.
7. Groot-Wassink, T., Aboagye, E. O., Glaser, M., Lemoine, N. R. and Vassaux, G. 2002. Adenovirus biodistribution and noninvasive imaging of gene expression *in vivo* by positron emission tomography using human sodium/iodide symporter as reporter gene. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1723-1735.
8. Guggino, W. B., Benson, J., Seagrave, J., Yan, Z., Engelhardt, J., Gao, G., Conlon, T. J. and Cebotaru, L. 2017. A preclinical study in rhesus macaques for cystic fibrosis to assess gene transfer and transduction by AAV1 and AAV5 with a dual-luciferase reporter system. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* **28**, 145-156.
9. Hanley, B. P., Bains, W. and Church, G. 2019. Review of scientific self-experimentation: ethics history, regulation, scenarios, and views among ethics committees and prominent scientists. *Rejuvenation Res.* **22**, 31-42.
10. Islam, S. M., Lee, B., Jiang, F., Kim, E. K., Ahn, S. C. and Hwang, T. H. 2020. Engineering and characterization of oncolytic vaccinia virus expressing truncated herpes simplex virus thymidine kinase. *Cancers* **12**, 228.
11. Kim, J. B., Urban, K., Cochran, E., Lee, S., Ang, A., Rice, B., Bata, A., Campbell, K., Coffee, R., Gorodinsky, A., Lu, Z., Zhou, H., Kishimoto, T. K. and Lassota, P. 2010. Non-invasive detection of a small number of bioluminescent cancer

cells *in vivo*. *PLoS One* **5**, e9364.

12. Kim, J. E., Kalimuthu, S. and Ahn, B. C. 2015. *In Vivo* Cell Tracking with Bioluminescence Imaging. *Nucl. Med. Mol. Imaging* **49**, 3-10.
13. Leng, L., Wang, Y., He, N., Wang, D., Zhao, Q., Feng, G., Su, G., Su, W., Xu, Y., Han, Z., Kong, D., Cheng, Z., Xiang, R. and Li, Z. 2014. Molecular imaging for assessment of mesenchymal stem cells mediated breast cancer therapy. *Biomaterials* **35**, 5162-5170.
14. Mell, L. K., Brumund, K. T., Daniels, G. A., Advani, S. J., Zakeri, K., Wright, M. E., Onyeama, S. J., Weisman, R. A., Sanghvi, P. R., Martin, P. J. and Szalay, A. A. 2017. Phase I trial of intravenous oncolytic vaccinia virus (GL-ONC1) with cisplatin and radiotherapy in patients with locoregionally advanced head and neck carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **23**, 5696-5702.
15. Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., Viale, A., Olshen, A. B., Gerald, W. L. and Mas-sagué, J. 2005. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* **436**, 518-524.
16. O'Leary, M. P., Warner, S. G., Kim, S. I., Chaurasiya, S., Lu, J., Choi, A. H., Park, A. K., Woo, Y., Fong, Y. and Chen, N. G. 2018. A novel oncolytic chimeric orthopoxvirus encoding luciferase enables real-time view of colorectal cancer cell infection. *Mol. Ther.* **9**, 13-21.
17. Oba, Y., Ojika, M. and Inouye, S. 2003. Firefly luciferase is a bifunctional enzyme: ATP-dependent monooxygenase and a long chain fatty acyl-CoA synthetase. *FEBS Lett.* **540**, 251-254.
18. Park, B. H., Hwang, T., Liu, T. C., Sze, D. Y., Kim, J. S., Kwon, H. C., Oh, S. Y., Han, S. Y., Yoon, J. H., Hong, S. H., Moon, A., Speth, K., Park, C., Ahn, Y. J., Daneshmand, M., Rhee, B. G., Pinedo, H. M., Bell, J. C. and Kirn, D. H. 2008. Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *Lancet Oncol.* **9**, 533-542.
19. Pozzo, T., Akter, F., Nomura, Y., Louie, A. Y. and Yokobayashi, Y. 2018. Firefly Luciferase Mutant with Enhanced Activity and Thermostability. *ACS Omega* **3**, 2628-2633.
20. Rabinovich, B. A., Ye, Y., Etto, T., Chen, J. Q., Levitsky, H. I., Overwijk, W. W., Cooper, L. J. N., Gelovani, J. and Hwu, P. 2008. Visualizing fewer than 10 mouse T cells with an enhanced firefly luciferase in immunocompetent mouse models of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 14342-14346.
21. Serganova, I. and Blasberg, R. G. 2019. Molecular imaging with reporter genes: has its promise been delivered? *J. Nucl. Med.* **60**, 1665-1681.
22. Tarantal, A. F. and Lee, C. C. I. 2010. Long-term luciferase expression monitored by bioluminescence imaging after adeno-associated virus-mediated fetal gene delivery in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Hum. Gene Ther.* **21**, 143-148.
23. Thorne, N., Inglese, J. and Auld, D. S. 2010. Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem. Biol.* **17**, 646-657.
24. Tietje, C. and Brouder, A. 2010. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. *Handb. Transl. Econ. Gov. Regimes* 1041-1053.
25. Youn, H. and Chung, J. K. 2013. Reporter gene imaging. *AJR. Am. J. Roentgenol.* **201**, W206-W214.

초록 : 항암 바이러스 치료제의 보고유전자로써 반딧불이 루시퍼레이즈의 인체 내 안전성에 대한 연구

홍영미¹ · 윤웅희² · 이유라² · 김수지² · 다니엘 엔가베레² · 바드리나트 나라야나사미³ ·
 메포세 사하 시헬레 오닐라³ · 김명희² · 조은아² · 이보라² · 황태호^{1,2,3*}

(¹부산대학교 의과대학 양산부산대병원 간센터, ²㈜바이오녹스, ³부산대학교 의과대학 의과학연구소(MRC))

반딧불이 루시퍼레이즈(FLuc)는 유전자나 바이러스 치료제에 있어서 효과적인 표적으로 이용될 수 있다. 하지만, 외래 물질이라는 것과 acyl-CoA와의 유사성으로 인하여 FLuc의 임상적 적용은 아직까지 이뤄지지 않았다. 본 연구에서, 우리는 FLuc의 안전성을 보여주기 위한 목적으로 일련의 전임상 실험과 인체실험을 수행했다. 우선, FLuc의 세포막 투과성을 점검하기 위해 FLuc 유전자를 담지한 OTS-412와 FLuc 재조합 단백질을 이용했다. OTS-412를 다양한 세포에 감염시켰을 때, FLuc의 활성은 세포 용해물에서만 관찰됐고, 세포를 배양한 배지에서는 관찰되지 않았다. 재조합 단백질 역시 세포막을 투과하지 못했다. 동물실험에서도 이와 유사한 결과가 관찰됐다. VX-2 종양세포에 처리된 토끼에 OTS-412를 처리했을 때, FLuc의 활성은 오직 종양조직에서만 발견됐고, 다른 장기나 혈액에서는 관찰되지 않았다. FLuc의 인체 반응성을 조사하기 위해 각기 다른 장기에서 유래된 세포 용해물을 FLuc에 반응시켰으나 아무런 활성이 관찰되지 않았다. 마지막으로, FLuc 재조합 단백질을 인체에 정맥주사 방식으로 투여했다. FLuc는 혈액에서 20에서 30분의 반감기를 가지고 분해됐으며, 주사한지 1시간 30분 후에는 검출되지 않았다. 또한, 혈장 샘플이 지방산과 반응을 보이지 않았다. FLuc의 접종 전과 후의 결과를 비교했을 때에도 임상적으로 유의미한 변화가 없었다. 따라서, 본 연구는 FLuc의 안전성에 대한 우려를 종합적으로 불식시킨다.