



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년07월23일
(11) 등록번호 10-1167330
(24) 등록일자 2012년07월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 17/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7012618
(22) 출원일자(국제) 2004년11월23일
심사청구일자 2009년11월20일
(85) 번역문제출일자 2006년06월23일
(65) 공개번호 10-2006-0127414
(43) 공개일자 2006년12월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/039633
(87) 국제공개번호 WO 2005/051971
국제공개일자 2005년06월09일
(30) 우선권주장
60/524,993 2003년11월24일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Arch. Ophthalmol. Vol.120(7):941-949 (2002. 7.)*
US20020111304 A1
WO200041647 A1
Journal of Virology Vol.73(6):4983-4990 (1999. 7.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
캔지, 인크.
미국 캘리포니아주 94304 팔로 알토 캘리포니아
애비뉴 901
(72) 발명자
구 단령
미국 캘리포니아 92130 샌디에고 페어윈드 코트
11357
제페다 모니카
미국 캘리포니아 92130 샌디에고 체스터우드 플
레이스 11652
(74) 대리인
서장찬, 최재철, 박병석

전체 청구항 수 : 총 11 항

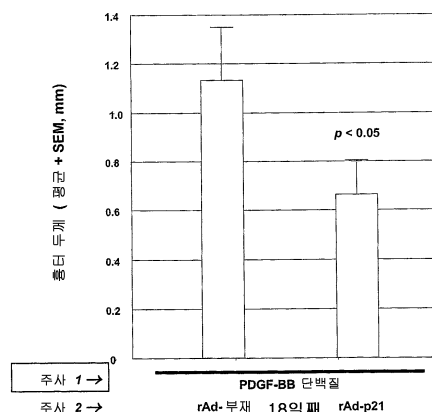
심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 상처 봉합을 억제하지 않으면서 피부 흉터형성을 감소시키기 위한 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 상처 부위에서 p21^{WAF1/Cip1}을 발현시킴으로써 피부 흉터형성을 감소시키거나 억제시키는 방법 및 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

p21^{WAF1/Cip1}를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트(expression cassette)를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 상처가 있는 대상체의 피부에서 상처 봉합을 억제하지 않으면서, 흉터형성을 감소시키기 위한 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, DNA가 벡터의 일부인 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 벡터가 바이러스 벡터인 약제학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 바이러스 벡터가 아데노바이러스 벡터인 약제학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 아데노바이러스 벡터가 복제 결손 아데노바이러스 벡터인 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 조성물의 투여가, 치료하지 않은 상처에서의 흉터형성과 비교하여 상처에서 켈로이드(keloid) 또는 비대 흉터형성을 감소시키는 약제학적 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 아데노바이러스 벡터가 상처 cm^2 당 10^5 내지 10^7 입자 수(PN)의 투여량으로 투여되는 약제학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 벡터가 생적합성 매트릭스 속에서 투여되는 약제학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 매트릭스가 아교질, 금속, 하이드록시아파타이트, 바이오글라스(bioglass), 알루미늄이트, 바이오세라믹 물질, 정제된 단백질 또는 세포의 매트릭스 조성물을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 매트릭스가 콜라겐 매트릭스인 약제학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 피부가 화상을 입은 약제학적 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

명세서

기술 분야

[0001] 본 출원은 모든 목적을 위해 참조로 인용된, 2003년 11월 24일자로 출원된 미국 가 특허원 제60/524,993호에 대한 우선권의 이점을 청구한다.

배경 기술

[0002] 과도한 피하 흉터형성은 만족스럽지 않은 의학적 요구 분야이며 기능적, 미용학적 및 심리학적 질병상태를 유발시킨다[참조: Hunt, T. K., World J Surg, 4(3): 271-7 (1980); Nicolai, J. P., et al., Aesthetic Plast Surg, 11(1):29-32 (1987)]. 임상적인 흉터 관리는 체내 위치를 포함하는 흉터의 지속적인 물리적 평가 및 환자의 선행 흉터 병력 둘다와 치료과정에 걸쳐 흔히 조절되는 임상적 섭생을 고려하는 것을 포함한다. 비대 흉터 및 켈로이드(keloid)에 대한 허용되는 보전적 치료는 수술, 코르티코스테로이드 주사, 방사선치료요법, 실리콘 겔 시이팅(silicone gel sheeting) 및 가압 치료에 한정된다[참조: Mustoe, T. A., et al., Plast Reconstr Surg, 110(2):560-71 (2002)]. 흉터 관리가 최근에 의학자들에게서 새로운 물리요법으로 숙련되고 있다고 해도, 흉터 결과는 여전히 크게 예측불가능하다. 비대 흉터 및 켈로이드에 관여하는 생물학적 메커니즘을 특이적으로 표적하는 치료는 존재하는 치료요법을 보완하고 현재의 흉터 결과를 개선시킬 수 있다.

[0003] 피하 흉터는 정상 피부 구조 및 기능의 육안적 파괴로서 기술되며, 이는 상처 치유의 결과로서 발생하여 섬유 증식 반응으로서 진행된다[참조: Clark, R. A. F., Wound Repair: Overview and General Considerations, in THE MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY OF WOUND REPAIR, (Ed., R. A. F. Clark), 1988, pp. 3-35]. 켈로이드 및 비대 흉터의 병인론적 및 생물학적 프로파일은 완전히 이해되어 있지 않다. 켈로이드는 원래의 외상 부위의 가장자리를 초과하는 성장으로 특징화되며, 가계 소인과 관련되어 있고 드물게 퇴행한다[참조: Tredget, E. E., Ann N Y Acad Sci, 888:165-82 (1999)]. 비대 흉터는 일반적으로 시간에 걸쳐 전환되어 조직의 수축과 관련된 흉반 섬유형성 병변을 유발시킨다[참조: Tredget, E. E., Ann NY Acad Sci, 888:165-82 (1999)]. 켈로이드가 유전적 연관 및 면역학적 매개변수 둘다에 있어서 비대 흉터와 상이하다고 해도, 이들 둘다는 섬유모세포 과증식 및 과도한 세포외 매트릭스(ECM) 침착과 관련되어 있다[참조: Rockwell, W. B., et al., Plast Reconstr Surg, 84(5):827-37 (1989); Tsao, S. S., et al., Semin Cutan Med Surg, 21(1):46-75 (2002); Nemeth, A. J., J Dermatol Surg Oncol, 19(8):738-46 (1993)].

[0004] 명백하게, 흉터형성은 많은 상황을 모면하기가 어려운 문제점을 남긴다. 본 발명은 이러한 문제들 및 다른 문제들에 관한 것이다.

[0005] 발명의 요약

[0006] 본 발명은 흉터형성을 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 당해 방법은, 발현 카세트가 p21^{WAF1/Cip1}을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는, 피부에 대한 발현 카세트를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 투여함을 포함한다. 일부 양태에서, 폴리뉴클레오타이드(임의로 벡터내)는 대상체의 피부상의 상처에 투여된다.

- [0007] 일부 양태에서, DNA는 벡터의 일부로서 투여된다. 일부 양태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 양태에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터이다. 일부 양태에서, 아데노바이러스 벡터는 재조합 결손 아데노바이러스 벡터이다.
- [0008] 일부 양태에서, 투여 단계는 치료하지 않은 상처에서의 흉터형성과 비교하여 상처에서 감소된 켈로이드 또는 비대 흉터형성을 감소시킨다. 일부 양태에서, 아데노바이러스 벡터는 상처 cm^2 당 10^5 내지 10^7 입자 수(PN)의 투여량으로 투여된다.
- [0009] 일부 양태에서, 벡터는 생적합성 매트릭스속에서 투여된다. 일부 양태에서, 매트릭스는 아교질, 금속, 하이드록시아파타이트, 바이오글라스(bioglass), 알루미네이트, 바이오세라믹 물질, 정제된 단백질 또는 세포의 매트릭스 조성물을 포함한다. 일부 양태에서, 매트릭스는 콜라겐 매트릭스이다.
- [0010] 일부 양태에서, 피부는 화상을 당한 피부이다.
- [0011] 본 발명은 또한 발현 카세트와 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하며, 여기서, 당해 조성물은 경구 투여에 적합하고 발현 카세트는 $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ 을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함한다. 일부 양태에서, 발현 카세트(임의로 벡터의 일부)는 생적합성 매트릭스 속에 존재한다.
- [0012] 일부 양태에서, 매트릭스는 발현 카세트를 포함하는 바이러스 벡터를 포함한다. 일부 양태에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터이다. 일부 양태에서, 아데노바이러스 벡터는 복제 결손 아데노바이러스 벡터이다.
- [0013] 일부 양태에서, 매트릭스는 아교질, 금속, 하이드록시아파타이트, 바이오글라스, 알루미네이트, 바이오세라믹 물질, 정제된 단백질 또는 세포의 매트릭스 조성물을 포함한다. 일부 양태에서, 매트릭스는 콜라겐 매트릭스이다.
- [0014] 정의
- [0015] 본원에 사용된 것으로서, " $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ "는 야생형의 완전한 길이의 $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ 단백질, 이의 활성 단편, 이의 활성 변이체, 및 완전한 길이의 $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ 단백질 또는 이의 활성 단편 또는 이의 활성 변이체를 포함하는 융합체를 말하며, 여기서, 융합체는 $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ 활성을 지닌다. 야생형 $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ 단백질은 세포 조절 기능을 지닌 164개 아미노산 단백질이다(참조: 미국 특허 제5,302,706호). $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ 은 또한 과학 문헌에 $p21$, $p21\text{sdi}$, $p21\text{waf1}$, $p21\text{cip1}$ 및 $p21\text{pic1}$ 로서 공지되어 있다. 용어 " $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ 폴리뉴클레오타이드"는 예를 들면 사람 야생형 단백질 및 기타 유기체로부터의 동종 서열, 및 이의 특정 돌연변이 또는 절단서열(truncation), 또는 야생형 $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ 단백질과 필수적으로 동일한 기능을 나타내는 융합체를 포함하는, $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ 을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 말한다.
- [0016] 용어 " $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ " 활성은 $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ 돌연변이를 보완하고 사이클린-의존성 키나제 활성의 억제제[참조: Harper, J. W., et al. Cell 75:805-816 (1993)]로서 작용하고/하거나 세포-주기 진행을 억제하기 위한 능력을 말한다[참조: Harper, J. W., et al., supra; Xiong, Y. et al. Cell 71:505-514 (1992)].
- [0017] 용어 "유전자"는 폴리펩타이드 쇄를 생산하는데 관여하는 DNA의 분절(segment)을 말하며; 이는 암호화 영역의 전 및 후 영역[리더(leader) 및 트레일러(trailer)], 및 개개의 암호화 분절(엑손)간의 중재 서열(인트론)을 포함한다.
- [0018] 용어 "핵산"은 일본쇄 또는 이본쇄 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 및 이의 중합체를 말한다. 특별히 한정하지 않는 한, 당해 용어는 참조 핵산으로서 유사한 결합 특성을 갖는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함하며 천연적으로 존재하는 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사된다. 달리 제시하지 않는 한, 특수 핵산 서열이 또한 이의 보존적으로 변형된 변이체(예: 코돈 치환을 쇄되시키는) 및 상보 서열, 및 명확하게 나타낸 서열을 함축적으로 포함한다. 상세하게는, 퇴화 코돈 치환은, 1개 또는 그 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 제 3 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성시킴으로써 달성할 수 있다[참조: Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081(1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); 및 Cassol et al. (1992); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)].

- [0019] 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 언급하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 당해 용어는, 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연적으로 존재하는 아미노산, 및 천연적으로 존재하는 아미노산 중합체 및 천연적으로 존재하지 않는 아미노산 중합체의 인공의 화학적 모사체인 아미노산 중합체에 적용된다. 본원에 사용된 것으로서, 당해 용어는 완전한 길이의 단백질(즉, 항원)을 포함하는 특정 길이의 아미노산 쇄를 포함하며, 여기서, 아미노산 잔기는 공유 펩타이드 결합에 의해 연결된다.
- [0020] 용어 "아미노산"은 천연적으로 존재하는 아미노산 및 합성 아미노산과, 천연적으로 존재하는 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모사체를 말한다. 천연적으로 존재하는 아미노산은 유전 코드에 의해 암호화된 것들, 및 후에 변형된 아미노산, 예를 들면, 하이드록시프로린, γ -카복시글루타메이트 및 0-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 천연적으로 존재하는 아미노산과 동일한 염기성 화학 구조를 지닌 화합물, 즉 수소에 결합하는 α 탄소, 카복실 그룹, 아미노 그룹, 및 R 그룹, 예를 들면, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설포사이드, 메티오닌 메틸 설포늄을 말한다. 이러한 유사체는 변형된 R 그룹(예를 들면, 노르류신) 또는 변형된 펩타이드 골격을 지니지만, 천연적으로 존재하는 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 보유한다. "아미노산 모사체"는 아미노산의 일반 화학 구조와는 상이한 구조를 지니지만, 천연적으로 존재하는 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 화학 화합물을 말한다.
- [0021] 아미노산은 본원에서 이들의 일반적으로 공지된 3개 문자 기호 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회에 의해 추천되는 1-문자 기호에 의해 언급될 수 있다. 또한, 뉴클레오타이드는 일반적으로 허용되는 1문자 코드에 의해 언급될 수 있다.
- [0022] "발현 카세트"는 숙주 세포내에서 특정 핵산의 전사를 허용하는 일련의 규정된 핵산 성분을 지닌 재조합적으로 또는 합성적으로 생성된 핵산이다. 발현 카세트는 플라스미드, 바이러스 또는 기타 핵산의 일부일 수 있다. 통상적으로, 발현 벡터는 전사될 핵산에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함한다.
- [0023] "생적합성 매트릭스"는, 매트릭스가 투여되는 숙주 대상체에서 심각한 알레르기 반응 또는 기타 부정적 반응을 생성하지 않는 매트릭스를 말한다.
- [0024] 용어 "작동적으로 연결된"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 또는 전사 인자 결합 부위의 배열) 및 제2의 핵산 서열사이의 작동적 연결을 말하며, 여기서, 발현 조절 서열은 제2의 서열에 상응하는 핵산의 전사를 지시한다.
- [0025] 용어 "프로모터" 또는 "조절 성분"은 전사 개시로부터 상부 또는 하부로 위치하고 전사를 개시하기 위한 인지 및 RNA 폴리머라제 및 기타 단백질의 결합에 관여하는 영역 또는 서열 결정인자를 말한다. "구성적" 프로모터는 대부분의 환경 및 발달 조건하에서 활성인 프로모터이다. "유도성" 프로모터는 환경 또는 발달 조절하에서 활성인 프로모터이다.

발명의 상세한 설명

- [0033] I. 도입
- [0034] 본 발명은 상처난 피부에서 흉터형성을 감소시키고 치료하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명은 욕아 조직 및 섬유모세포의 진행을 감소시키기 위한 상처 부위로 $p21^{WAF1/Cip1}$ 의 전달 및 발현을 제공한다. 본 발명의 영역을 제한할 의도없이, $p21^{WAF1/Cip1}$ 는 또한 과도한 흉터형성 및 상처 치유동안 세포 증식을 초래하는 염증 세포(예: 호중구, 대식구 및 림프구, 섬유모세포 등)의 효과를 억제하는 것으로 여겨진다.
- [0035] 본 발명의 방법은 $p21^{WAF1/Cip1}$ 또는 이의 활성 분획을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상처 부위로 전달함을 포함한다. 상처 부위에서 $p21^{WAF1/Cip1}$ 의 발현은 상처 봉합과 함께 또한 발생할 수 있는 흉터형성의 감소를 가져온다. 본 발명은 비대 흉터형성 및 켈로이드의 발달 및 성장을 예방하거나 완화시키는데 특히 유용하다.
- [0036] II. 상처
- [0037] 본 발명은 피부에 대한 어떠한 상처로부터의 흉터형성을 감소시키는데 사용할 수 있다. 본 발명의 영역을 제한함이 없이, 예를 들어, 화상, 창상, 베임 및/또는 찰과상으로부터 초래된 피부 손상은 본 발명의 방법에 따라 치료될 수 있는 상처를 포함한다. 본 발명의 방법은 미용 수술을 포함하는 수술에 이은 흉터형성을 감소

시키는데 유용하다.

[0038] 이상적으로, 상처는, 상처가 발생한 후 가능한 빨리 치료한다. 예를 들어, 일부 경우에, 상처는, 상처가 발생한 후 72, 48, 24, 18, 12, 6, 3 또는 1시간 내에 치료한다. 외과적 흉터의 경우에, 본 발명의 방법 및 조성물을 수술과 동시에 투여한다. 그러나, 항-흉터형성 효과는 상처가 발생 한 이후 연장된 기간 후 치료함에 의해서도 실현될 수 있다. 일반적으로 상처에 적용된 $p21^{WAF1/Cip1}$ 벡터의 양은 상처의 발생 및 벡터의 투여사이의 기간을 보다 길게 증가시킬 수 있다. 유전자가 본원에 예시된 바와 같은 사이토메갈로바이러스 이미디에이트 얼리(cytomegalovirus immediate early: "CMV") 프로모터와 같은 강력한 구성 프로모터의 조절하에 있는 복제 결손 아데노바이러스 벡터의 경우에, 용량은 일반적으로 대략 1×10^5 PN/cm² 내지 1×10^9 PN/cm², 1×10^5 PN/cm² 내지 1×10^8 PN/cm², 또는 1×10^5 PN/cm² 내지 1×10^7 PN/cm²의 범위이다. 대표적인 투여량은 대략 5×10^6 PN/cm²일 수 있다. 상기 참조 투여량은, 상처가 발생한 후 상처 부위에 즉시 투여된다(즉, 1일이내). 아데노바이러스 벡터를 상처가 발생한 후 매우 늦게(예를 들면, 상처가 발생한 후 1주만에) 투여하는 경우, 대략 10 내지 100배 이상의 벡터 투여량에서의 증가가 유사한 효과를 실현시키는데 필수적일 수 있다. 조직에서 대표적인 유효 $p21^{WAF1/Cip1}$ 농도는 WAF1 ELISA 키트[캘리포니아주 샌 디에고 소재의 온코진 리서취 프로덕츠(Oncogene Research Products), 제품 번호 제#QIA18호]에 의해 측정된 바와 같이 대략 50 내지 150 단위의 활성이며, 표적 농도는 대략 80 내지 100 단위의 활성이다.

[0039] 통상적으로, 본 발명의 방법은 흉터형성을 억제하거나 감소시키지만 상처 봉합을 억제하지는 않는다. $p21^{WAF1/Cip1}$ 은 충분한 양으로 발현되는 경우 상처 봉합을 억제할 수 있다. 예를 들어, $p21^{WAF1/Cip1}$ 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 2×10^{11} PN/cm² 아데노바이러스 벡터는 동물 모델에서 재상피화를 지연시키기에 충분하다. 또한, 이러한 투여량에서, 상처의 인장 강도(tensile strength)에 있어서의 효과가 관측된다. 따라서, $p21^{WAF1/Cip1}$ 폴리펩타이드를 포함하는 벡터를 충분한 양으로 사용하여 흉터 형성을 억제하거나 감소시키지만, 재-상피화를 지연시키거나 인장 강도를 적절하게 감소시킬만큼 많은 양을 투여하지 않는 것이 바람직하다.

[0040] III. 유전자 전달

[0041] p21을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 도입시키기 위해, 상처에서 세포내로 p21 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 노출된 플라스미드(naked plasmid)를 도입하는 것이 가능하다. 달리 는, $p21^{WAF1/Cip1}$ 폴리뉴클레오타이드를 바이러스 또는 비-바이러스 전달 시스템내로 도입한 후 상처내로 도입시킨다.

[0042] 1. 비-바이러스 전달 시스템

[0043] $p21^{WAF1/Cip1}$ 폴리뉴클레오타이드의 상처내로의 발현을 지시할 수 있는 비-바이러스 전달 시스템은 발현 플라스미드를 포함한다. 발현 플라스미드는 자가 복제하는 염색체의 환형 DNA 분자이며, 정상 계놈과는 구별되고 표적 세포내에서 DNA 서열을 발현시킬 수 있는 비선택적인 조건하에서 세포 생존에 필수적이지 않다. 플라스미드는 세균내에서 자가 복제하여 세균 생산을 촉진하지만, 사이클린 의존성 키나제 유전자를 함유하는 이러한 플라스미드는 표적 세포내에서 복제하여 치료 효과를 달성한다는 점에서 필수적이지 않다. 전이유전자(transgene)는 또한 조직 특이적인 프로모터 영역의 조절하에 있을 수 있어 특정 세포형(예: 호중구, 대식구 및 림프구와 섬유모세포 및 각질세포를 포함하는 염증 세포)에서만 전이유전자의 발현을 허용할 수 있다. 당해 분야의 숙련가들은 본 발명을 실시하는데 유용할 수 있는 각종 발현 플라스미드에 매우 익숙할 것이다.

[0044] 발현 플라스미드는 또한 프로모터, 인핸서 또는 p21 폴리뉴클레오타이드의 발현을 보조하는 기타 서열을 함유할 수 있다. 비록 CMV와 같은 구성 프로모터를 사용할 수 있다 해도, pFascin과 같은 표적 세포에서 특이 활성을 갖는 프로모터[참조: Sudowe, et al. Molecular Therapy 8(4):567 (2003)] 및 케라틴-12 프로모터[참조: Ikawa, et al., Molecular Therapy 8(4):666 (2003)]를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 화학적 자극 또는 기타 자극에 대한 반응시 특정 조건하에서 작용성인 유도성 프로모터를 또한 사용하여 $p21^{WAF1/Cip1}$ 의 발현을 효과적으로 조절할 수 있다. 유도성 프로모터의 예는 과학 문헌에 공지되어 있다[참조: Yoshida and Hamada, Biochem. Biophys. Res. Comm. 230:426-430 (1997); Iida, et al., J. Virol. 70(9):6054-6059 (1996); Hwang, et al., J. Virol 71(9):7128-7131 (1997); Lee, et al., Mol. Cell. Biol. 17(9):5097-5105 (1997); 및 Dreher, et al., J. Biol. Chem. 272(46):29364-29371 (1997)]. 방사선 유도성 프로모터의 예에는 EGR-1

프로모터를 포함한다[참조: Boothman, et al. (1994) volume 138 supplement pages S68-S71].

[0045] 약물 내성을 암호화하는 것들과 같은 추가의 유전자를 포함시켜 재조합 벡터의 존재에 대해 선별 또는 스크리닝할 수 있다. 이러한 추가의 유전자는 예를 들면, 네오마이신 내성, 다중-약물 내성, 티미딘 키나제, 베타-갈락토시다제, 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 및 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제를 암호화하는 유전자를 포함할 수 있다.

[0046] p21^{WAF1/Cip1} 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 발현 플라스미드를 리포솜내에 봉입시킬 수 있다. 리포솜은 유액, 발포체, 미셀, 불용성 단층, 액정, 인지질 분산액, 라멜라 층 등을 포함한다. 리포솜 담체를 사용하여 표적 세포로 DNA 서열을 전달하는 것은 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 각종 방법이 문헌[참조: Szoka et al. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980), 미국 특허 제4,394,448호; 제4,235,871호; 제4,501,728호; 제4,837,028호; 및 제5,019,369호]에 기술된 바와 같은 리포솜을 제조하는데 유용하다. 본 발명의 실시예에 유용한 리포솜은 하나 이상의 표적 비히클-형성 지질로부터 형성될 수 있으며, 이러한 지질은 일반적으로 중성 및 음성적으로 하전된 인지질 및 콜레스테롤과 같은 스테롤을 포함한다.

[0047] 이러한 비히클 형성 지질의 예는 DC-cho1, DOGS, DOTMA, DOPE, DOSPA, DMRIE, DOPC, DOTAP, DORIE, DMRIE-HP, n-스페르미딘 콜레스테롤 카르바메이트 및 미국 특허 제5,650,096호에 기술된 바와 같은 기타 양이온성 지질을 포함한다. 지질의 선택은 일반적으로, 예를 들면, 리포솜 크기, 산 안정성 및 혈류내 리포솜의 안정성을 고려하여 인도된다. 미국 특허 제5,013,556호 및 제5,213,804호에 기술된 바와 같은 폴리에틸렌 글리콜 피복물[소위 "PEG-화(PEG-ylation)"]와 같은 추가의 성분을 리포솜 제형에 가하여 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다.

[0048] 특정 조직 또는 기관에 대한 치료학적 유전자의 전달을 용이하게 하기 위하여, 성분들을 세포 표적화를 촉진시키는 비-바이러스 전달 시스템내로 도입시키는 것이 유리할 수 있다.

[0049] 2. 바이러스 전달 시스템

[0050] 다른 예에서, DNA 서열은 바이러스 전달 시스템에 의해 전달되며, 여기서, p21^{WAF1/Cip1} 폴리뉴클레오타이드는 표적 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 게놈내로 혼입되고 p21^{WAF1/Cip1} 폴리뉴클레오타이드는 발현 및 조절 서열로 작동적으로 연결됨으로써 폴리뉴클레오타이드가 표적 세포내에서 적절한 조건하에 발현되도록 한다. 본 발명을 실시하는데 유용한 벡터는 또한 바이러스 게놈으로부터 기원할 수 있다. 사용될 수 있는 벡터는 바람직하게는 바쿠로비리다에, 파르보비리다에, 피코르나비리다에, 헤르페스비리다에, 폭스비리다에 또는 아데노비리다에로부터 선택된, 재조합적으로 변형된 엔벨로프되거나 엔벨로프되지 않은 DNA 및 RNA 바이러스를 포함한다. 모 벡터 특성 각각의 유리한 성분을 발휘하는 키메라 벡터를 또한 사용할 수 있다[참조: Feng, et al. Nature Biotechnology 15:866-870 (1997)]. 이러한 바이러스 게놈은 재조합 DNA 기술에 의해 변형시켜 p21^{WAF1/Cip1} 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며 복제 결손의, 조건적으로 복제하거나 복제 적합성(replication competent)이 되도록 가공할 수 있다. 통상적으로, 벡터는 복제 결손 또는 조건적으로 복제한다. 예시적인 벡터는 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스 및 레트로바이러스 게놈으로부터 기원한다. 일부 양태에서, 벡터는 사람 아데노바이러스 게놈으로부터 기원한 복제 비적합성(replication incompetent) 벡터이다. 전이유전자는 또한 특정 세포유형에서만 전이유전자의 발현을 허용하는 조직 특이적인 프로모터 영역의 조절하에 있을 수 있다.

[0051] 다른 예에서, 특정 조직 또는 기관으로 p21^{WAF1/Cip1} 폴리뉴클레오타이드의 효과적인 전달을 보증하기 위해, 성분들을 세포 표적화를 촉진시키는 바이러스 전달 시스템내로 혼입시키는 것이 유리할 수 있다. 본 발명의 작제물을 패키징하기위해 사용된 바이러스 엔벨로프는 수용체 리간드 또는 특정 세포내로 수용체-조절된 세포내 이입을 허용하기 위해 수용체에 대해 특이적인 항체를 첨가시킴으로써 변형시킬 수 있다(예: 제WO 93/20221호, 제WO 93/14188호; 제WO 94/06923호). 본 발명의 일부 양태에서, 본 발명의 DNA 작제물을 아데노바이러스 입자와 같은 바이러스 단백질에 연결시켜 세포내이입을 촉진한다[참조: Curiel, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:8850-8854 (1991)]. 세포형 특이성 또는 세포형 표적화는 또한 바이러스 엔벨로프 단백질의 변형에 의해 특징적으로 광범위한 감염성을 지닌 바이러스로부터 기원한 벡터내에서 달성할 수 있다. 예를 들어, 세포 표적화는 바이러스 게놈 knob 및 섬유 암호화 서열의 선택적인 변형에 의해 아데노바이러스 벡터를 사용하여 달성함으로써 유일한 세포 표면 수용체와 특이적 상호작용하는 변형된 knob 및 섬유 도메인의 발현을 달성한다. 이러한 변형의 예는 문헌[참조: Wickham, et al. J. Virol. 71 (11):8221-8229 (1997)]

(아데노바이러스 섬유 단백질내로 RGD 펩타이드의 혼입); Arnberg, et al. Virology 227:239-244 (1997) (눈 및 생식기 관으로 친화성을 달성하기 위한 아데노바이러스 섬유 유전자의 변형); Harris and Lemoine TIG 12(10):400-405 (1996); Stevenson, et al., J. Virol. 71(6):4782-4790 (1997); Michael, et al. Gene Therapy 2:660-668 (1995) (아데노바이러스 섬유 단백질내로 가스트린 방출 펩타이드 단편의 혼입); 및 Ohno, et al. Nature Biotechnology 15:763-767 (1997)(신드비스 바이러스내로 단백질 A-IgG 결합 도메인의 혼입); 및 미국 특허 제5,721,126호 및 제5,559,099호]에 기술되어 있다. 세포 특이적인 표적화의 다른 방법은 항체 또는 항체 단편을 엔벨로프 단백질에 접합시켜 달성할 수 있다[참조: Michael, et al. J. Biol. Chem. 268:6866-6869 (1993), Watkins, et al. Gene Therapy 4:1004-1012 (1997); Douglas, et al. Nature Biotechnology 14:1574-1578 (1996)]. 또한, 특정 잔기를 바이러스 표면에 접합시켜 표적화를 달성할 수 있다[참조: Nilson, et al. Gene Therapy 3:280-286 (1996)(레트로바이러스 단백질에 대한 EGF의 접합)].

[0052] 전통적인 복제 바이러스 벡터를 사용하여 특정 세포 유형에서 선택적인 발현을 달성하면서 원치않은 광범위한 스펙트럼의 감염을 피할 수 있다. 전통적인 복제 벡터의 예는 문헌[참조: Bischoff, et al. Science 274:373-376 (1996); Pennisi, E., Science 274:342-343 (1996); Russell, S. J. Eur. J. of Cancer 30A(8):1165-1171 (1994)]에 기술되어 있다.

[0053] 일부 예에서, 특히 전통적으로 복제하거나 복제 적합성 벡터를 사용하는 경우, p21^{WAF1/Cip1} 폴리뉴클레오타이드 외에 바이러스 벡터내에 자살 유전자를 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 자살 유전자는 핵산 서열이며, 이의 발현은 세포내에서 독성 상태를 유발시키거나 외부 인자에 의한 사멸에 대해 세포가 민감하도록 한다. 자살 유전자의 잘 공지된 예는 티미딘 키나제(TK) 유전자[참조: 미국 특허 제5,631,236호 및 미국 특허 제 5,601,818호]이며, 여기서, TK 유전자 생성물을 발현하는 세포는 강사이클로비르를 투여함에 의해 선택적인 사멸에 대해 민감하다. 이는 바이러스 벡터 전달 시스템에 "안전성 밸브(safety valve)"를 제공하여 광범위한 감염성의 완전한 복제 적합성 바이러스 벡터의 자연발생적인 생성으로 인한 광범위한 감염을 예방한다.

[0054] 본 발명의 일부 예에서, 벡터는 아데노비리다에 속으로부터 기원한다. 특히 바람직한 벡터는 사람 아데노바이러스 제2형 또는 제5형으로부터 기원한다. 이러한 벡터는 E1a 및/또는 E1b 암호화 영역에서 변형 또는 결실에 의해 복제 결손이다. 특수한 발현 특성을 달성하거나 반복된 투여 또는 보다 낮은 면역 반응을 촉진시키기 위한 바이러스 게놈에 대한 기타 변형이 바람직하다.

[0055] 일부 양태에서, 재조합 아데노바이러스 벡터는 임의로 E4 ORF6 및 ORF 6/7을 보유(또는 결실)하는, E4 암호화 영역의 완전한 또는 부분 결실을 지닌다. E3 암호화 서열은 필수적이지 않은 것으로 입증되어 있으며 아데노바이러스 벡터로부터 결실될 수 있지만 바람직하게는 보유된다. 일부 양태에서, E3의 프로모터 오퍼레이터 영역은 E3의 발현을 증가시켜 치료학적 벡터에 대한 더욱 우세한 면역학적 프로파일을 달성하도록 변형된다. 일부 양태에서, 사용된 벡터는 사이토메갈로바이러스 프로모터 영역의 조절하에서의 p21^{WAF1/Cip1} 폴리뉴클레오타이드 및 CMV 프로모터의 조절하에서 E3를 지니는 3부분의 리더 서열 및 E4 암호화 영역은 결실하고 있으나 E4 ORF6 및 ORF 6/7은 보유하는 사람 아데노바이러스 제5형이다.

[0056] 일부 양태에서, 아데노바이러스 발현 벡터는 단백질 IX의 일부 또는 전체 결실을 포함한다(참조: 미국 특허 공보 제2003/0091534호). 다른 아데노바이러스 벡터는 예를 들면, 미국 특허 공보 제2003/0192066호 및 제 2003/0157688호에 기술된 것들을 포함한다.

[0057] IV. 약제학적 제형

[0058] 본 발명은 또한 투여용 바이러스 또는 비-바이러스 전달 시스템에서 p21^{WAF1/Cip1} 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 약제학적 제형을 제공한다. 본 발명의 조성물은 포유동물 대상체, 바람직하게는 사람에게 투여하기 위해 허용되는 당해 분야에 공지된 방식으로 투여하기 위해 제형화될 것이다. 특히, 전달 시스템은 국소 투여용으로 제형화될 수 있다.

[0059] 본 발명의 조성물은 국소 제형 또는 중합체 매트릭스, 하이드로겔 매트릭스, 중합체 이식체 또는 봉입된 제형으로 투여하여 조성물의 방출을 느리게 하거나 지연시킬 수 있다. p21^{WAF1/Cip1}를 암호화하는 DNA를 함유하는 어떠한 생적합성 매트릭스 물질도 제형화하여 본 발명에 따라 사용할 수 있다.

[0060] 본 발명의 유전자 활성화된 매트릭스는 어떠한 생적합성 물질로부터도 기원할 수 있다. 이러한 물질은 세포 부착 및 성장을 지지하는 스캐폴드(scaffold)내로 제형화된 생분해성 또는 비-생분해성 물질, 분말 또는 겔을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 매트릭스는 합성 중합체 또는 콜라겐과 같은 천연적으로 존재하

는 단백질, 기타 세포의 매트릭스 단백질, 또는 기타 구조적 거대분자로부터 기원할 수 있다.

[0061] 본 발명의 조성물, 장치 및 방법에 사용할 수 있는 매트릭스의 유형은 크게 제한되지 않으며 생물학적 및 합성 매트릭스 둘다를 포함할 수 있다. 매트릭스는 "생적합성"과 일반적으로 관련된 특징 모두를 지닐 것이며, 여기서, 이는 포유동물 숙주에게 투여되는 경우 부작용, 알레르기 반응 또는 기타 원치않는 반응을 생성하지 않는 형태이다. 이러한 매트릭스는 천연 또는 합성 물질로부터 형성될 수 있다. 매트릭스는 통상적으로 생분해성일 것이다. 매트릭스는 스폰지, 삽입체, 튜브, Telfa® 패드, Band-Aid® 브랜드 부착 밴드, 밴드, 패드, 동결건조된 성분, 겔, 패취, 인공 피부, 분말 또는 나노입자의 형태를 취할 수 있다. 또한, 매트릭스는 지속된 방출을 허용하고/하거나 세포가 이주하여 형질도입되는 골격을 제공하고 치유를 촉진시키기 위한 구조적 골격을 제공하도록 설계할 수 있다.

[0062] 사용될 수 있는 생적합성의 생분해가능한 중합체는 당해 분야에 잘 공지되어 있으며 폴리글리콜라이드, 폴리락타이드 및 폴리락트산 폴리글리콜산 중합체("PLGA")와 같은 폴리에스테르[참조: Langer and Folkman, Nature 263:797-800 (1976)]; 폴리카프로락톤("PCL")과 같은 폴리에테르; 폴리하이드라이드; n-부틸 시아노아크릴레이트 및 이소프로필 시아노아크릴레이트와 같은 폴리알킬 시아노아크릴레이트; 폴리아크릴아미드; 폴리(오르토에스테르); 폴리포스파젠; 폴리펩타이드; 폴리우레탄; 및 이러한 중합체의 혼합물을 예로서 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 사이클로덱스트린 및 유도체화된 사이클로덱스트린, 및 콜라겐(재조합체의 천연 공급원으로부터 수득된 것에 상관없이)이 또한 사용될 수 있다.

[0063] 매트릭스로부터 핵산의 방출을 조절하기 위한 하나의 방법은 중합체의 분자량 및 매트릭스의 화학 조성을 조절하는 것을 포함한다. 예를 들어, PLGA 매트릭스의 경우 락트산/글리콜산의 조성 비는 방출 기간에 영향을 미친다. 일반적으로, 예를 들어, 75/25와 같이 락트산/글리콜산의 보다 높은 비는 보다 더 긴 기간 동안의 핵산의 조절된 지속적인 방출을 제공할 것인 반면, 락트산/글리콜산의 보다 낮은 비는 핵산의 더욱 신속한 방출을 제공할 것이다.

[0064] 적합한 물질의 다른 특수 예는 섬유성 콜라겐이며, 이는 조직으로부터 추출 및 부분 정제된 후 멸균에 이어 동결건조될 수 있다. 매트릭스는 또한 예를 들면, 시그마 앤드 콜라겐 코퍼레이션(Sigma and Collagen Corporation)과 같은 각종 시판 공급원으로부터 수득될 수 있는 바와 같이, 힘줄 또는 피부 콜라겐으로부터 제조할 수 있다. 콜라겐 매트릭스는 또한 미국 특허 제4,394,370호 및 제4,975,527호에 기술된 바와 같이 제조할 수 있다.

[0065] 또한, 미국 특허 제4,505,266호 또는 미국 특허 제4,485,097호에 기술된 바와 같은 콜라겐 및 글리코사미노글리칸(GAG)으로 제조된 라텍스를 본 발명을 실행하는데 사용할 수 있다. 콜라겐/GAG 매트릭스는 복구 세포가 이주할 수 있는 "스캐폴딩(scaffolding)" 구조 또는 지지체로서 효과적으로 공급될 수 있다. 미국 특허 제4,485,097호에 기술된 것과 같은 콜라겐 매트릭스도 또한 매트릭스 물질로서 사용될 수 있다.

[0066] 매트릭스를 상처 부위에 적용시키기 전에, 손상된 피부 또는 사멸된 조직을 제거할 수 있다. 본 발명의 매트릭스는 상처 치유를 개선시키고, 염증, 감염 및/또는 증식성 반응을 최소화시키는 추가 인자 또는 화합물들을 함유할 수 있다. 이러한 제제의 예는 질화은 및 항생제를 포함한다.

[0067] V. 담체

[0068] 전달 시스템을 용액 또는 현탁액으로 제형화하는 경우, 전달 시스템은 허용되는 담체, 바람직하게는 수성 담체에 존재한다. 각종의 수성 담체, 예를 들면, 물, 완충된 물, 0.9% 염수, 0.3% 글리신, 하이알루론산 등을 사용할 수 있다. 이들 조성물은 통상의 잘 공지된 멸균 기술에 의해 멸균시키거나 멸균 여과시킬 수 있다. 수득되는 수용액은 자체로서 사용하기 위해 패키징되거나, 또는 동결건조시킬 수 있고, 동결건조시킨 제제는 투여전 멸균 용액과 혼합된다.

[0069] 당해 조성물은 적절한 생리학적 상태, 예를 들면, pH 조절에 필요한 약제학적으로 허용되는 보조 물질, 및 완충제, 강직 조절제 및 습윤제, 예를 들면, 나트륨 아세테이트, 나트륨 락테이트, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트 등을 함유할 수 있다.

[0070] 약제학적 제형중 본 발명의 조성물의 농도는 광범위하게, 즉, 약 0.01%, 일반적으로 약 2 용적% 이상 내지 20% 내지 50 용적% 이상으로 변할 수 있으며, 선택된 특수 투여 모드에 따라서 유액 용적, 점도 등에 의해 주로 선택될 것이다.

[0071] VII. 전달 증진제

[0072] 본 발명의 약제학적 제형은 하나 이상의 전달-증진제를 임의로 포함할 수 있다. 용어 "전달 증진제"는 핵산 또는 단백질 분자를 표적 세포로 전달하는 것을 촉진하는 제제를 포함한다. 이러한 전달 증진제의 예는 세제, 알콜, 글리콜, 표면활성제, 담즙 염, 헤파린 길항제, 사이클로옥시게나제 억제제, 고삼투압 염 용액 및 아세테이트를 포함한다. 알콜은 예를 들면, 이의 교시가 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제5,789,244호에 기술된 바와 같은 에탄올, N-프로판올, 이소프로판올, 부틸 알콜, 아세틸 알콜을 포함한다. 글리콜은 글리세린, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 및 다른 저 분자량 글리콜, 예를 들면, 글리세롤 및 디옥틸리세롤을 포함한다.

[0073] 아세트산, 글루콘산 및 나트륨 아세테이트와 같은 아세테이트는 전달-증진제의 추가의 예이다.

[0074] 표면활성제의 예는 나트륨 도데실 설페이트(SDS) 및 라이소레시틴, 폴리소르베이트 80, 노닐페녹시폴리옥시에틸렌, 라이소포스파티딜콜린, 폴리에틸렌글리콜 400, 폴리소르베이트 80, 폴리옥시에틸렌 에테르, 폴리글리콜 에테르 표면활성제 및 DMSO이다. 타우로콜레이트, 나트륨 타우로-데옥시콜레이트, 데옥시콜레이트, 체노데스 옥시콜레이트, 글리코콜산, 글리코체노데옥시콜산과 같은 담즙 염 및 질산은과 같은 기타 수렴제를 사용할 수 있다. 프로타민 설페이트와 같은 4급 아민과 같은 헤파린-길항제도 또한 사용할 수 있다. 나트륨 살리사이클레이트, 살리사이클산과 같은 사이클로옥시게나제 억제제, 및 인도메타신, 나프록센, 디클로페낙과 같은 비-스테로이드성 소염 약물(NSAIDS)도 사용할 수 있다.

[0075] SYN3은 유전자 전달을 증진시키고 이의 교시 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제 6,392,069호에 기술된 표면활성제-유사 분자이다. 추가의 화합물은 또한 본원에 참조로 인용된 미국 특허 공보 제2003/0170216호에 기술되어 있다.

[0076] 유전자의 전달은, 이의 교시 전체가 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제6,165,779호에 기술된 바와 같은 세제를 사용함으로써 증진시킬 수 있다. 세제는 음이온성, 양이온성, 양쪽성 및 비이온성 세제를 포함한다. 예시적인 세제는 타우로콜레이트, 데옥시콜레이트, 타우로데옥시콜레이트, 세틸피리듐, 벤알코늄 클로라이드, ZWITTERGENT™ 3-14 세제, CHAPS(3-((3-콜아미도프로필)디메틸암모니움)-1-프로판설포네이트 하이드레이트, 제조원 - 알드리히(Aldrich)), Big CHAP, 데옥시 Big CHAP, TRITON™-X-100 세제, C12E8, 옥틸-B-D-글루코피라노사이드, PLURONIC™-F68 세제, TWEEN™ 20 세제 및 TWEEN™ 80 세제(CALBIOCHEM™ 바이오케미칼스)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0077] 전달-증진제의 농도는 사용되는 특수 전달-증진제, 완충제, pH, 표적 조직 또는 기관 및 투여 유형과 같은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 다수의 인자에 따를 것이다. 전달-증진제의 농도는 1% 내지 50%(v/v), 바람직하게는 10% 내지 40%(v/v) 및 가장 바람직하게는 15% 내지 30%(v/v)의 범위일 것이다.

[0078] 포스페이트 완충된 염수(PBS)는 이들 화합물에 대한 가능한 가용화제이다. 그러나, 당해 분야의 숙련가들은, 특정의 추가 부형제 및 첨가제가 각종 약제학적 제형을 위한 이들 제제의 가용성 특성을 달성하기 위해 요구될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 예를 들어, 잘 공지된 가용화제, 예를 들면, 세제, 지방산 에스테르, 표면활성제를 적절한 농도로 첨가하여 사용될 각종 용매중 화합물의 가용성을 촉진시킬 수 있다. 용매가 PBS인 경우, 바람직한 가용화제는 대략 0.15% 농도의 트윈 80이다.

[0079] 이러한 전달-증진 화합물은 단독으로, 서로 함께, 또는 다른 전달-증진제와 함께 사용할 수 있다.

실시예

[0080] 실시예 1

[0081] 본 출원인은, rAd-p21^{WAF1/Cip1}이 사람 주요 섬유모세포의 증식 및 프로-콜라겐 제I형 침착을 효과적으로 약화시킬 수 있음을 입증한다. 또한, 본 출원인은, rAd-p21^{WAF1/Cip1}이 랫트 PVA 스폰지 상처 치유 모델에서 육아 조직 및 ECM 침착을 약화시킴을 입증한다. 본 출원인의 결과는, rAd-p21^{WAF1/Cip1}의 내인성 발현이 과도한 흉터형성을 조절하기 위한 치료학적 선택임을 제안한다.

[0082] 방법 및 물질

[0083] 재조합 아데노바이러스 벡터 작제 및 정제

- [0084] 사람 p21^{WAF1/Cip1}을 함유하는 재조합 아데노바이러스는 이미 기술되어 있다[참조: Perkins, T. W., et al., Arch Ophthalmol. 120(7): 941-9 (2002)]. 요약하면, 구성적 사이토메갈로바이러스 이미디에이트 얼리 프로모터(CMV)의 조절하에서 p21^{WAF1/Cip1} 암호화 영역을 문헌[참조: Wills et. al., Hum Gene Ther. 5(9):1079-88 (1994)]에 기술된 방법을 사용하여 E1/부분적 E3 결실된 재조합 아데노바이러스내로 클로닝하였다. rAd-부재 대조군 아데노바이러스 벡터는, 전이유전자를 발현 카세트내로 가공하지 않은 것을 제외하고는, rAd-p21^{WAF1/Cip1}과 유사한 양식으로 작제하였다. rAd-PDGF-B는 E1-결실된 부위내로 클로닝된, CMV-PDGF-B 발현 카세트를 함유하는 E1/부분 E3 결실된 아데노바이러스 벡터이다. PDGF-B cDNA는 사람의 태반 cDNA 라이브러리 [제조원: 캘리포니아주 팔로 알토 소재의 클론테크(Clonetech)]로부터 PCR 증폭되었으며, 100% 상동성은 유전자은행 클론 M12738에 대한 서열 정렬로 확인하였다. 당해 cDNA를 CMV 프로모터 및 E1BpIX폴리-A 발현 카세트를 함유하는 아데노바이러스 E1 이전 플라스미드내로 클로닝하였다. 차르티에(Charrier) 등의 방법에 의해 이. 콜라이(E. coli) 균주 BJ5183내 동종 재조합을 사용하여 감염성 바이러스 DNA를 생성시키고, 이를 후속적으로 사람 신장 293 세포내로 형질감염시켜 바이러스를 생성시키고 증식시켰다[참조: Chartier, C., et al., J Virol, 70(7):4805-10 (1996)]. 바이러스 입자를 컬럼 크로마토그래피[참조: Shabram, P. W., et al., Hum Gene Ther, 8(4):453-65 (1997)]하고, 정량하며, 식품 의약국으로부터의 안내서(Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy, Center for Biologics Evaluation and Research, March 1998)를 기초로 하여 입자 수(PN)에 의해 투여하였다.
- [0085] **세포.** 정상인 성인 사람 피부 섬유모세포는 캄브렉스 바이오 사이언스(Cambrex Bio Science: 미국 뉴저지주 루터포드 소재)로부터 입수하여 추천된 성장 배지속에서 유지시켰다. 실험은 계대 수 ≤4에서의 세포를 사용하여 수행하였다.
- [0086] **아데노바이러스 감염 및 세포의 브로모데옥시우리딘 펄스-표지**
- [0087] 세포를 2일 동안 태아 소 혈청(FBS)이 결여된 배지에 플레이팅함으로써 G0/G1기를 동시에 진행시키고 후속적으로 다양한 투여량(1×10^8 - 3×10^9 PN/ml)의 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 또는 rAd-부재를 FBS가 결여된 배지속에서 처리하였다. 24시간 후, 배지를 제거하고 20% FBS를 함유하는 배지를 가하여 G0/G1 정지로 부터 세포를 해방시켰다. 세포를 해방 후 24시간째에 $10 \mu\text{M}$ 브로모데옥시우리딘[BrdU; 제조원 - 미국 인디애나주 인디아노폴리스 소재의 베링거-만하임(Boehringer-Mannheim)]으로 4시간 동안 펄스-표지시키고 70% 에탄올속에서 고정시킨 후 0.08% 펄신으로 37℃에서 30분 동안 분해함으로써 비바리에이트 BrdU/DNA 유동 세포분석을 위해 수거하였다. 세포를 1500 RPM에서 원심분리하고, 2N HCl속에 재현탁시키고 37℃에서 20분 동안 항온처리하였다. 1M 나트륨 보레이트를 가하고 세포를 IFA/트윈 20(0.01 M HEPES, 0.005% 나트륨 아지드, 0.5% Tween 20, 5% FBS, 0.15M NaCl) 속에서 세척하고 30분 동안 1:10으로 희석된 항-BrdU 항체[제조원 - 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재의 벡톤-딕킨슨(Becton-Dickinson)]와 함께 트윈 20의 부재하에서 항온처리하였다. 최종적으로, 세포를 IFA/트윈 20속에서 세척하고, IFA/트윈 20/RNase속에서 15분 동안 37℃에서 항온처리하고, 프로피듐 요오다이드($50 \mu\text{g/ml}$)로 염색하고 FL-1 채널상에서 FACS 캔 유동 세포분석기(벡톤 딕킨슨 제조원)에 의해 셀퀘스트(CellQuest, 제조원 - 벡톤 딕킨슨) 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.
- [0088] **사람 프로콜라겐 제1형 C-펩타이드(PIP)의 검출을 위한 효소 결합된 면역검정.** 세포를 10% FBS를 함유하는 완전 배지속에 플레이팅하고 합치상태로 성장시키며 FBS가 결여된 배지속에서 24시간 동안 아데노바이러스 작제물로 감염시켰다. 이후에 세포를 세척하고 FBS가 없는 배지속에서 PIP 분석이전에 24시간 동안 배양하였다. PIP의 검출을 제조업자 지시에 따라 1×10^6 세포를 지닌 세포 분해물상에서 ELISA[제조원 - 일본 소재의 다카라 바이오 인코포레이티드(TaKaRa Bio Inc.)]로 평가하였다.
- [0089] **FACS에 의한 p21^{WAF-1/Cip-1}의 검출.** 세포를 75% 에탄올/PBS속에서 30분 동안 4℃에서 고정시키고 0.1% BSA/PBS와 결합하는 비-특이적 항체에 대해 37℃에서 30분 동안 차단시켰다. FITC[Ab-1, 제조원 - 캘리포니아주 샌디에고 소재의 온코진(Oncogene)]와 접합시킨 $2 \mu\text{g/ml}$ 의 항-p21^{WAF-1/Cip-1} 항체를 실온에서 60분 동안 세포와 함께 항온처리하였다. 세포를 0.1% BSA속에서 세척하고, PBS에 재현탁시키고 FL-1 채널상에서 FACS로 분석하였다.
- [0090] **PVA 스폰지 모델.** 동물 보호 및 실험을 실험 동물의 보호 및 이용에 대한 건강 안내서의 국제기구(National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)에 따라 수행하고 적합한 참고 위원회로부터 승인을 받았다. 체중이 350 내지 400g인 수컷 스프라그-다울리(Sprague-Dawley) 랫트[인디애나주

인디아나폴리스 소재의 하를란(Harlan) 공급원]를 케타민/크실라진으로 마취시키고 각각의 랫트의 복부 표면에 5mm의 직선 절개를 수행하였다. 단일을 멸균된 폴리비닐 알콜(PVA) 스폰지(등급 3: 12.7mm x 3mm; M-PACT, Eudora, KS)를 각각의 절개내로 피하내 삽입하고 상처 클립으로 봉합하였다. 스폰지 이식 후 4일째에, 200 μ l의 콜라겐 용액[제조원 - 캘리포니아주 팔로 알토 소재의 코헤션 테크놀로지스(Cohesion Technologies)] 속에서 제형화시킨 1×10^9 PN의 rAd-PDGF-B 또는 rAd-부채를 각각의 스폰지 내부에 주사하였다. 첫번째 주사후 3일째에 100 μ l의 vPBS(PBS, 3% 슈크로스 v/v)속에 제형화시킨 1×10^9 , 1×10^{10} 또는 5×10^{10} PN의 rAd-p21^{WAF1/Cip1}을 각각의 스폰지내로 주사하였다. 두번째 주사 후 5일째에 동물을 마취시키고 각각의 스폰지의 중심부를 수거하고, 4% 파라포름알데하이드 속에 고정시키고, 파라핀 봉매시키고 6- μ m 두께로 단면화하였다. 증식 지표 연구를 위해 50mg/kg의 BrdU[제조원 - 캘리포니아주 샌 디에고 소재의 칼바이오크-노바바이오크 코포레이션(Calbiochem-Novabiochem Corp.)]를 마취전 24시간째에 랫트에게 복강내 주사하였다.

[0091] **면역조직화학.** p21^{WAF1/Cip1} 단백질 검출을 위해, 6- μ m의 PVA 스폰지 파라핀 단면을 -20 $^{\circ}$ C 에탄올/아세트산 (2:1)속에 10분 동안 침지시킨 후 고 pH 완충액[캘리포니아주 카르핀테리아 소재의 다코(Dako) 제조원]속에서 스팀으로 20분 동안 항원 복구시켰다. 내인성 퍼옥시다제를 3%(v/v) H₂O₂와 항온처리함으로써 켜켜시켰다. 슬라이드를 20%(v/v) 소 혈청속에서 차단한 후 마우스 모노클로날 항-사람 p21^{WAF1/Cip1} [1:100, 제조원 - 캘리포니아주 샌 디에고 소재의 비디-파밍겐(BD-PharMingen)]항체와 1시간 동안 항온처리하였다. PBS(3x5분)속에서 세척한 후, 슬라이드를 바이오티닐화된 염소 항-마우스 IgG 제2 항체[1:200, 제조원 - 캘리포니아주 샌 프란시스코 소재의 지메드(Zymed)]와 함께 30분 동안 항온처리하였다. 슬라이드를 PBS (3 x 5분)속에서 세척하고 스트렙타비딘/HRP 접합체(제조원: 다코)와 10분 동안 항온처리하고 AEC 크로마젠/기질(제조원: 다코)에 이어 헤마톡실린 역염색으로 현상시켰다. BrdU 검출을 위해, 지메드의 BrdU 염색 키트 및 벡타스타인 엘라이트(Vectastain Elite) ABC 키트[제조원:캘리포니아주 부를링가메 소재의 벡터 랩스(Vector Labs)]로부터의 결합 프로토콜 및 시약을 사용하였다. 요약하면, 조직 단면을 시알레이티드 유리 슬라이드에 두고 50% 파워로 5분 동안 초음파처리하였다. 단면을 20분 동안 예비-가열된 시트레이트 완충액(pH 6.0)속에서 스팀처리하고, 세정하며, 내인성 퍼옥시다제를 3% (v/v) H₂O₂로 10분 동안 켜켜하였다. 지메드 키트 프로토콜을 수행하고 바이오티닐화된 마우스 항-BrdU 주요 항체와 항온처리하였다. 후속적으로 슬라이드를 PBS속에서 세정하고, 벡타스타인 엘라이트 ABC 시약과 함께 30분 동안 항온처리하고, 다시 세정하고 벡터 노바 레드 크로마젠(Vector Nova red chromagen)/기질(벡터 랩스 제조원)로 5 내지 15분 동안 현상하였다. Ki67 검출을 위해, 파라핀 조직 단면을 10 mM 시트레이트 완충액(pH 6.0)속에서 최대 파워로 초음파처리하고, PBS(3x5분)속에서 세척하고 20% (v/v) 염소 혈청으로 30분 동안 차단하였다. 단면을 마우스 항-사람 Ki67(1:100; 파밍겐 제조원) 주요 항체와 함께 1시간 동안 항온처리하고, PBS(3 x 5분)속에서 세정하고 1:200 희석의 바이오티닐화된 소 항-마우스 IgG (제조원: 파밍겐)와 30분 동안 반응시켰다. 디아미노벤지딘(DAB; 벡터 랩스 제조원)을 키트 지시당 Ki67 양성 세포의 크로마젠 검출을 위해 사용한 후 헤마톡실린으로 역염색하였다.

[0092] **적량적 영상 분석.** 조직 필의 육아 정도를 평가하기 위해, PVA 스폰지의 조직학적 단면을 메이슨 트리크롬 염색법(Masson Trichrome staining method)을 사용하여 가공하였다. 컴퓨터-보조된 적량적 분석을 니콘 E600 현미경 및 4x 플랜-플로어 대물렌즈[Plan-Fluor objective; 제조원 - 미국 뉴욕주 멜빌 소재의 니콘 유에스에이(Nikon USA)]로 획득된 환산 디지털 사진으로 Image Pro PlusTM 소프트웨어[제조원 - 메릴랜드주 실버 스프링 소재의 미디어 사이버네틱스(Media Cybernetics)]를 사용하여 수행하였다. 분석은 스폰지의 내부에 육아 조직 영역을 전체 스폰지 영역 내부로 나누고 파립 조직 필에 대해 100을 곱함으로써 적량하는 것으로 이루어진다. 샘플 크기는 치료 그룹당 평균 6개 스폰지로 이루어진다. 생체내 증식 지표를 위하여, BrdU 및 Ki67 면역조직화학 단면으로부터의 영상을 40x 또는 4x 현미경 대물렌즈를 디지털로 사용하여 획득하고 아도브 포토샵(Adobe Photoshop) 5.0 소프트웨어[제조원 - 캘리포니아주 샌 조세 소재의 아도브 시스템스 인코퍼레이티드(Adobe Systems Inc.)]내로 도입하였다. 양성 세포 수(적색 또는 갈색) 및 총 세포 수(자색 핵)를 관측된 각각의 영역에서 점수매겼다. BrdU의 경우, 조직 단면당 3개의-400x 영역(최소 1500개 세포)을 각각의 그룹으로부터 계수하였다. Ki67의 경우, 그룹당 3개의 전체 조직 단면(최소 13,000 세포/단면)을 평가하였다. 염색 강도와 무관하게 BrdU 또는 Ki67의 핵 염색은 양성으로 고려하였다. 증식 지표율은 적색 또는 갈색 세포 집단 수를 적색 또는 갈색 및 자색 세포 집단으로 나누고 100을 곱하여 계산하였다.

[0093] **통계적 분석.** 데이터는 나타낸 바와 같이, 산술 평균 \pm SD 또는 \pm SEM으로 나타낸다. 데이터의 통계적 분

석은 쌍을 이루지 않은 학생 t-시험[StatView, 노쓰 캐롤라이나주 캐리 소재의 사스 인스티튜트 인코포레이티드(SAS Institute Inc) 제공]을 사용하여 수행하였다. 차이는 $p \leq 0.05$ 에서 현저한 것으로 고려되었다.

[0094]

결과

[0095]

외인성 $p21^{WAF1/Cip1}$ 단백질을 발현하고 rAd-p21^{WAF1/Cip1}와 반응시 세포 주기 정지(cell cycle arrest)를 나타내는 사람 피부 섬유모세포

[0096]

$p21^{WAF1/Cip1}$ 유전자 발현을 증가하는 투여량의 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 또는 rAd-부제로 48시간 동안 처리한 사람 주요 피부 섬유모세포 속에서 평가하였다. rAd-p21^{WAF1/Cip1}에 대해서는 반응하나 rAd-부제에 대해서는 반응하지 않는 경우, $p21^{WAF1/Cip1}$ 의 발현은 FACS 분석에 의해 측정되는 바와 같이 투여량 의존적 방식으로 증가하였다(참조: 도 1A). 1×10^8 PN/ml에 대한 반응시, $p21^{WAF1/Cip1}$ 발현은 치료하지 않은 세포보다 4.1 ± 1.0 (치료하지 않음) 내지 6.0 ± 0.2 ($p=0.005$)로 증가하였다. 최대 투여량의 1×10^9 PN/ml의 rAd-p21^{WAF1/Cip1}에 대한 반응시, 발현은 치료하지 않은 세포보다 4.1 ± 1.0 내지 35.1 ± 1.5 ($p=0.001$)로 증가하였다. 따라서, $p21^{WAF1/Cip1}$ 은 주요 피부 섬유모세포에서 투여량 의존적 방식으로 효율적으로 발현될 수 있다.

[0097]

다음에, 본 출원인은, 내인성 $p21^{WAF1/Cip1}$ 발현이 사람 피부 섬유모세포 속에서 세포 주기 정지를 유발할 수 있는지를 측정하기 위해 시험관내 투여량 반응 연구를 수행하였다. 1×10^7 내지 1×10^9 PN/ml rAd-p21^{WAF1/Cip1}으로 치료한 세포는 BrdU 혼입 및 FACS 분석에 의해 측정되는 바와 같이 세포 증식에 있어서 투여량 의존적인 감소를 나타내었다(참조: 도 1B). S-기에서의 세포 비율은 치료하지 않은 세포 집단에서 평균 $64.4 \pm 5.7\%$ 로부터 1×10^8 PN/ml의 rAd-p21^{WAF1/Cip1}에 대한 반응시 $20.6 \pm 2.6\%$ 으로 감소되었다. 최대 투여량의 rAd-p21^{WAF1/Cip1}, 즉 1×10^9 PN/ml에서, S-기의 세포 비율의 감소는 검출된 양성 세포중 단지 $0.6 \pm 0.1\%$ 로 관측되었다. 검출가능한 세포 주기 억제는 2개의 최대 투여량에서 rAd-부제로 관측되었다. 상세하게는, 1×10^8 PN/ml의 rAd-부제에서, $56.9 \pm 1.0\%$ 의 세포가 BrdU를 혼입한 반면, 1×10^9 PN/ml에서, $34.4 \pm 10.7\%$ 의 세포가 BrdU를 혼입하였다. 최대 투여량의 대조군 아데노바이러스에 대한 반응시 증식의 약화는 이미 기술되어 있다[참조: Brand, K., et al., Gene Ther, 6(6):1054-63 (1999)]. BrdU 혼입은, rAd-p21^{WAF1/Cip1}을 rAd-부제와 1×10^8 및 1×10^9 PN/ml($p < 0.05$)에서 비교하는 경우에 현저히 감소하였다. 이러한 데이터는, 최대 투여량의 재조합 아데노바이러스 치료가 일반적인 항-증식 효과를 유발함을 제안하며, 본 출원인은, 상처가 있는 표적 세포에서 rAd-p21^{WAF1/Cip1}와의 증식 반응시 rAd-p21^{WAF1/Cip1}-특이적인 투여량 의존적 감소를 입증하였다.

[0098]

rAd-p21^{WAF1/Cip1}에 대한 반응시 PIP의 생산을 감소시키는 사람 피부 섬유모세포

[0099]

PIP 펩타이드가 $p21^{WAF1/Cip1}$ 의 전달 후 감소되는지를 측정하기 위하여, 사람 피부 섬유모세포를 증가하는 투여량의 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 또는 rAd-부제로 48시간 동안 치료하였다(참조: 도 1C). 동일한 수의 세포로부터의 분해물에 있어서의 ELISA를 수행하여 세포내 PIP 수준을 적량하였다. 당해 데이터는, 대조군 그룹과 비교하여 사람 피부 섬유모세포를 rAd-p21^{WAF1/Cip1}로 처리한 후 PIP에 있어서 2배 이상의 감소를 나타내었다. PIP에 있어서의 감소는 치료하지 않은 세포(각각 60.0 ± 6.3 ng/ml 대 165.1 ± 9.0 ng/ml의 단백질 각각)와 비교하는 경우 최대 농도의 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료(3.0×10^9 PN/ml)에서 검출되었다. 최대 투여량의 rAd-부제 치료는 170.2 ± 10.3 ng/ml의 세포내 PIP를 나타내었으며, 감염되지 않은 세포로부터 변하지 않았다. 본 출원인의 앞서의 연구는, 100%의 사람 피부 섬유모세포가 FACS 분석에 의해 평가한 것으로서 당해 검정 시스템에서 전이유전자 발현에 대해 양성임을 나타낸다(데이터는 나타내지 않음). 안색 V 염색 및 FACS에 의한 세포사멸 검정을 수행하여 세포의 생존력을 측정하였으며, 당해 데이터는, 세포가 세포사멸성이 아님을 입증하였다(데이터는 나타내지 않음). 이들 데이터는, 세포외-관련 펩타이드가 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료후 약화된을 나타낸다.

[0100]

생체내에서 rAd-PDGF-B 자극 이후 육아 조직을 약화시키는 rAd-p21^{WAF1/Cip1}

[0101]

생체내에서 육아 조직상에 rAd-p21^{WAF1/Cip1}의 효과를 측정하기 위해, 랫트 PVA 스폰지 모델을 사용하였다[참조:

Buckley, A., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 82(21):7340-4 (1985)]. 랫트에서 PVA 스폰지에 육아 조직의 자극인자로서 rAd-PDGF-B의 1×10^9 PN/스폰지를 주사하고[참조: Liechty, K. W., et al., J Invest Dermatol, 113(3):375-83 (1999)] 3일 후 rAd-p21^{WAF1/Cip1}를 5.0×10^{10} PN/스폰지에서 투여하였다(참조: 도 2). rAd-부재 바이러스를 또한 rAd-PDGF-B 및 rAd-p21^{WAF1/Cip1}와 동일한 투여량으로 스폰지에 전달하여 재조합체 아데노바이러스가 당해 모델 시스템에 기여할 수 있는 일반 효과에 대해 조절하였다. rAd-p21^{WAF1/Cip1} 전달 후 5일째에 PVA 스폰지내에 트립톤 염색으로 평가한 것으로서 rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 처리된 스폰지에서 세포 밀도 및 세포량 둘다에 있어 육아 조직이 감소하였다(참조: 도 3). 비히클/비히클(도 3) 및 rAd-부재/rAd-부재 그룹(나타내지 않음)은 rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료 그룹과 유사한 육아 조직 형태를 지녔다(참조: 도 3). 공지된 보고와 일치하는, 최대 육아 조직 필이 rAd-PDGF-B/비히클 치료 그룹에서 관측되었으며(77%; 도 3), 이는, 자극인자, PDGF-B가 당해 모델에서 성장 반응을 증진시켰음을 입증한다[참조: Liechty, K. W., et al., J Invest Dermatol, 113(3):375-83 (1999)]. 본 출원인은 rAd-PDGF-B/rAd-부재에서 53% 육아 조직 필을, rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1}에서 28%의 육아 조직 필을, 비히클/비히클에서 24%의 육아 조직 필을, 및 rAd-부재/rAd-부재 치료 그룹에서 18%의 육아 조직 필을 관측하였다(도 3). rAd-PDGF-B/비히클 및 rAd-PDGF-B/rAd-부재 치료와 비교하여, rAd-PDGF-B에 이은 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료는 육아 조직 필에 있어서 각각 2.7- 및 1.9배 약화를 유발하였다($p < 0.001$ 및 $p = 0.05$). 대조적으로, 비히클/비히클, rAd-부재/rAd-부재, 및 rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료 그룹 사이에 현저한 차이는 관측되지 않았다($p > 0.3$). 비히클/비히클, rAd-PDGF-B/비히클, 및 rAd-PDGF-B/rAd-부재 치료 그룹은 모두 각각 서로 현저하게 상이하였다(각각 $p < 0.001$ 및 $p = 0.01$). 별개의 연구에서, rAd-p21^{WAF1/Cip1}을 사용한 투여량 반응을 1×10^9 및 5×10^{10} PN/ml사이에서 수행하였다(참조: 표 1). 1×10^9 에서 rAd-PDGF-B/비히클 치료시 최대 필과 비교하여 육아 함량에 있어서 23% 감소, 1.0×10^{10} 에서 37% 감소 및 5×10^{10} PN/ml에서 47% 감소되었다. 이러한 데이터는, rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료후 육아 조직에 있어서 적량적 및 정성적 감소를 입증한다.

표 1

[0102] rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료후 PVA 스폰지내 육아 조직 필의 투여량 반응을 감소

	치료 그룹			
첫번째 주사	rAd-PDGF-B	rAd-PDGF-B	rAd-PDGF-B	rAd-PDGF-B
두번째 주사	vPBS	rAd-p21 ^{WAF1/Cip1} (1×10^9)	rAd-p21 ^{WAF1/Cip1} (1×10^{10})	rAd-p21 ^{WAF1/Cip1} (5×10^{10})
육아 부위 ^a (필 비율)	100%	77%	63%	54%
트립톤 염색된 PVA 스폰지 단면을 스폰지내에서 육아 필 영역에 대한 컴퓨터 보조된 영상 분석으로 분석하였다. 필 비율은 육아 조직의 부위/분석된 총 부위 x 100으로 계산되었다. 주사 스케줄 시간측정에 대해서는 도 2를 참조한다. 모든 rAd-PDGF 치료는 1×10^9 PN/스폰지에서 투여하였다. 각각의 치료 그룹은 평균 6개의 개개 스폰지를 나타내며 그룹 당 최소 22회 측정치를 나타낸다. 데이터는 2개의 별개 실험을 나타낸다. ^a 최대 필 치료의 %로 정규화 함(77%, rAd-PDGF-B/vPBS 치료)				

[0103] 생체내에서 p21^{WAF1/Cip1}의 발현

[0104] 생체내에서 형질도입을 확인하고 p21^{WAF1/Cip1} 발현과 육아 조직의 감소를 연결시키기 위해, 본 출원인은 항 사 램 p21^{WAF1/Cip1} 특이적인 항체를 사용하여 랫트 PVA 스폰지 모델에서 p21^{WAF1/Cip1} 발현 세포를 확인하였다. rAd-p21^{WAF1/Cip1}로 치료한지 5일 후에, p21^{WAF1/Cip1} 단백질이 육아 조직 세포내에서 국재화되었으며, 이는 염증 세포(참조: 도 5C, 작은 화살촉) 및 섬유모세포-유사 세포와 형태학적으로 유사하였다. 본 출원인은 비히클/

비히클 또는 rAd-PDGF-B/비히클 치료 그룹에서 p21^{WAF1/Cip1} 양성 염색된 세포를 관측하지 못했다. rAd-p21^{WAF1/Cip1}을 처리한 지 5일 후 p21^{WAF1/Cip1} 발현 세포의 우세한 집단이 강력한 염색을 나타내었으나, 현재 본 출원인은 피크 반응 및 당해 모델에서 p21^{WAF1/Cip1} 단백질 발현의 기간을 정의하지 않았다. 그러나, RT-PCR에 의한 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 발현은 1주 이내에 최대로 되었으며 녹내장 여과 수술의 토끼 모델에서 30일 이상 지속하였다[참조: Perkins, T. W., et al., Arch Ophthalmol, 120(7):941-9 (2002)]. 이러한 데이터는, 육아 조직에서의 감소 및 생체내 p21^{WAF1/Cip1} 발현사이에 관련성을 지지한다.

[0105] 생체내에서 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료 후 약화된 증식 지표

[0106] rAd-p21^{WAF1/Cip1} 전달후 육아 조직의 증식 상태를 측정하기 위하여, BrdU 및 Ki67 면역화학 염색을 PVA 스폰지 조직상에서 수행하였다. 비히클/비히클, rAd-PDGF-B/비히클, rAd-PDGF-B/rAd-부재, 및 rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료 그룹에서 BrdU 및 Ki67 양성 세포의 비율은 도 4에 나타낸다. 최대 BrdU 염색은 rAd-PDGF-B/비히클 및 rAd-PDGF-B/rAd-부재 치료 그룹에서 관측되었으며(각각 25% 및 24%), 이는 rAd-PDGF-B가 조직 증식을 촉진함을 입증하고 또한 rAd-부재 치료가 생체내 증식 상태에 최소한으로 영향을 미침을 제안한다. BrdU 염색된 세포의 최소 비율은 rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료 그룹에서 확인되었다(9%). rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료 그룹에서 BrdU 혼입은 rAd-PDGF-B/비히클 및 rAd-PDGF-B/rAd-부재와 비교하여 현저히 낮다(비교 둘다에 대해 p<0.01). 또한, 비히클/비히클 치료 그룹은 rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료 그룹과 비교하여 2배 큰 수의 Brd 양성 세포를 지닌다(각각 18% 대 9%).

[0107] BrdU 혼입은 S기 개시를 필요로하는 반면, Ki67 또는 Mib1 항원은 G₀ 기를 제외하고는 모든 세포 주기에서 발현된다[참조: Barnard, N. J., et al., J Pathol, 152(4):287-95 (1987)]. Ki67 염색의 분석은 BrdU 염색과 유사한 양성 세포의 비율을 나타낸다(참조: 도 4B). 비히클/비히클 및 rAd-PDGF-B/비히클 치료 그룹의 증식 지표는 각각 22% 및 34%였다. 대조적으로, rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료 그룹은 rAd-PDGF-B/비히클 및 비히클/비히클 치료 그룹(모든 비교의 경우 p<0.001)과 비교하여 현저히 적은 비율의 증식 세포(11%)를 나타내었다. 당해 데이터는, rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료가 세포 증식을 감소시킴으로써 생체내에서 육아 조직을 약화시킴을 입증한다.

[0108] 요약

[0109] 비대 흉터 및 켈로이드의 병인은 알려져 있지 않으나 정상의 상처 치유 반응에서의 조절장애로 부터 유발하는 것 같다. 정상의 상처 치유는 섬유성 상처로 진행되는 섬유증식성 반응으로 진행된다. 중요하게, 심지어 가장 우수한 환경에서도, 상처 부위는 "회복" 보다는 "패치형(patch)"이고, 유형 및 작용 둘다는 치환 대 조직 재생에 관여하는 메카니즘에 의해 영향받는다. 정상적인 상처 치유 캐스케이드는 염증, 증식 및 재모델화(remodeling) 기를 포함하는, 3개의 일시적이고, 중첩된 반응을 포함한다. 모든 세포 주기에서는, 성장-증진 인자와 증식 반응을 하향-조절하는데 관여하는 인자들을 포함하는 이화 과정 및 동화 과정사이에 평형이 존재한다. 비록 현저한 진행이 이루어져 상처 치유를 자극하는데 관여하는 인자들을 설명할 수 있다 해도, 정상적인 상처 치유 반응에 관여하는 세포 주기 조절 및 프로그램화된 세포 사멸을 포함하는 분자 과정과 관련하여서는 거의 이루어지지 않았다. 본원에 제공된 데이터는, 세포 주기 조절이 상처 복구 및 흉터형성에 포함된 과정에서 지니고 있는 중요한 역할을 강조한다.

[0110] 본 출원인의 연구는, 사람 주요 피부 섬유모세포의 세포 주기가 재조합 아데노바이러스를 통해 전달된 p21^{WAF1/Cip1}를 사용하여 사람 주요 피부 섬유모세포에서 효율적으로 억제될 수 있음을 입증한다. 본 출원인은 시험관내에서 BrdU 염색에 의해 입증된 것으로서 증식 상태에서 투여량 의존적 감소와 관련된 p21^{WAF1/Cip1} 단백질 발현에 있어 투여량 의존적 증가를 나타내었다. 최대 투여량에서 대조군 아데노바이러스 치료로 검출가능한 항-증식 효과가 관측되었으나, 프로피듐 요오다이드 염색은, 이들 세포가 rAd-p21^{WAF1/Cip1}로 치료한 세포의 경우에서와 같이, G1보다는 오히려 G2/M기에서 축적되었음을 나타낸다(데이터는 나타내지 않음). 재조합체 아데노바이러스 벡터의 고 투여량을 사용한 형질도입이 세포 증식의 약화를 유발한다는 관찰은 이미 기술되어 있으며 일부 연구는 리포터 유전자를 함유하는 재조합체 아데노바이러스의 고 투여량을 사용한 항-종양 효과

를 보고한다[참조: Erhardt, J. A. 및 R. N. Pittman, *Oncogene*, 16(4):443-51 (1998); Pierce, G. F., et al., *J Exp Med.* 167(3):974-87 (1988); Teramoto, S., et al., *Hum Gene Ther.* 6(8):1045-53 (1995)]. 증가된 수준의 세포 p21^{WAF-1/Cip-1} 단백질은 사람 피부 주요 섬유모세포에서 증식 반응의 감소와 관련되어 있다.

[0111]

세포외 매트릭스의 과도한 축적 및 파괴는 켈로이드 및 비대 흉터의 특징이다[참조: Rockwell, W. B., et al. *Plast Reconstr Surg*, 84(5):827-37 (1989)]. 2개의 화학치료제인, 미토마이신 C 및 독소루비신은 ECM 및 세포독성의 감소를 포함하는 작용 메카니즘과 함께 상처 치유 반응을 억제하는 것으로 보고되어 있다[참조: Saika, S., et al., *Ophthalmic Res.* 29(2):91-102 (1997)]. 본 출원인의 연구는, 피부 주요 섬유모세포에서 p21^{WAF-1/Cip-1}의 증가된 수준이 시험관내에서 PIP 수준을 감소시켰음을 나타낸다. 흥미롭게도, PIP 수준은 약화되었으나 제거되지는 않았으며, 이는 PIP 생산의 기본 수준이 살아있는 세포 집단에서 유지됨을 제안한다. 대조적으로, 미토마이신 C 및 독소루비신 둘다 PIP 분비를 감소시켰으나, 세포 생존성에 있어서 투여량 의존적인 감소가 관측되었고 상처를 치유하는 동물 모델에서 관측된 상처 열개의 원인인 것 같다[참조: Saika, S., et al., *Ophthalmic Res.* 29(2):91-102 (1997)]. 또한, PIP 수준은 rAd-부재 치료에 의해 영향받지 않으며, 이는 PIP 약화가 rAd-p21^{WAF-1/Cip-1} 특이적임을 제안한다. 형질도입된 세포가 전사적으로 활성이라는 사실(테이타는 나타내지 않음)은, PIP에서의 감소가 세포내에서 일반적인 전사 감소의 결과가 아님을 입증한다. 본 출원인은, 외인적으로 발현된 rAd-p21^{WAF-1/Cip-1}의 결과로서의 세포외 매트릭스 생산의 감소가 생체내에서 육아 조직 생산의 약화 효과를 지닌다고 추측하였다.

[0112]

사람 켈로이드 및 비대 흉터의 생화학적 및 병리학적 매개변수를 정확히 자극하는 동물 모델은 존재하지 않는다. 당해 보고에서, 본 출원인은 동물 모델 시스템을 사용하여 생체내 육아 조직에서 상승된 p21^{WAF-1/Cip-1}의 효과를 지적하였다. 육아 조직은 섬유모세포, 새로운 모세관, 염증 세포 및 세포외 매트릭스로 구성되며 상처 복구의 필수적이고 요구되는 성분이다. 육아 조직의 정상적인 일시적 및 공간적 형성의 파괴는 비대 흉터 및 켈로이드에서 유발 효과로서 관련된다. PDGF-BB는 육아 조직 형성의 강력한 자극인자이며 최근의 보고는, 상처가 약화된 모델에서 강력한 전-상처 치유 효과를 입증한다[참조: Liechty, K. W., et al., *J Invest Dermatol.* 113(3):375-83 (1999); Pierce, G. F., et al., *J Exp Med.* 167(3):974-87 (1988); Pierce, G. F., et al., *J Cell Biochem.* 45(4):319-26 (1991); Doukas, J., et al., *Hum Gene Ther.* 12(7):783-98 (2001)]. 흥미롭게도, 흉터가 없는 태아 모델에 대한 PDGF-BB의 첨가는 상처 섬유화를 초래하고 PDGF-BB의 상승된 수준은 간경화증과 관련되어 있다[참조: Haynes, J. H., et al., *J Pediatr Surg.* 29(11):1405-8 (1994); Peterson, T. C. and R. A. Isbrucker, *Hepatology* 15(2):191-7 (1992)]. 본 출원인은 rAd-PDGF-B를 사용하여 세포 유입, 증식 및 육아 조직 침착을 증진시킨 후 랫트 PVA 스폰지 모델에서 rAd-p21^{WAF-1/Cip-1} 치료로 p21^{WAF-1/Cip-1}이 생체내에서 이러한 자극 효과를 약화시킬 수 있는지를 측정하였다.

[0113]

본 출원인의 결과는, rAd-p21^{WAF-1/Cip-1}이 rAd-PDGF-B 치료 단독과 비교하여 정량적 및 정성적 둘다 육아 필요 약화시켰음을 나타낸다. rAd-부재 치료 후 육아 필요의 축소는 본 출원인의 시험관내 결과와 일치하며 rAd-p21^{WAF-1/Cip-1} 치료와 비교하여 효과에 있어 약하다. 초기에, 본 출원인은, rAd-부재 치료만이 숙주에서 rAd 전달 비히클의 잘-정리된 면역조절 효과를 통해 육아 조직 결과를 방해할 수 있다고 추측하였다[참조: Nielsen, L. L., *Oncol Rep* 7(1):151-5 (2000); Kajiwar, K., et al., *Hum Gene Ther.*, 8(3):253-65 (1997); St George, J. A., et al., *Gene Ther*, 3(2):103-16 (1996); Brody, S. L., et al., *Hum Gene Ther*, 5(7): p. 821-36 (1994)]. 본 출원인은, PDGF-BB 및 p21^{WAF-1/Cip-1} 각각의 자극 및 억제 효과가 재조합체 아데노바이러스 기원한 반응 이상으로 육아 조직 활성을 조절한다는 것을 반복적으로 관측하였다. 이러한 관측에 대한 중대성은 생체내에서 육아 조직의 rAd-p21^{WAF-1/Cip-1} 투여량 의존적 약화에 대한 본 출원인의 입증이며, 또한 당해 모델 시스템에서 유전자 특이적인 활성을 지지한다.

[0114]

본 출원인은 rAd-p21^{WAF-1/Cip-1}로 치료한 스폰지에서 사람 p21^{WAF-1/Cip-1} 단백질 발현을 입증함으로써, 사람 p21^{WAF-1/Cip-1}과 육아 조직의 감소를 연결시켰다. 본 출원인은 또한 p21^{WAF-1/Cip-1} 치료된 스폰지에서 2개의 별개 검정으로 감소된 증식을 입증하였으며, 생체내에서 p21^{WAF-1/Cip-1}의 직접적인 항-증식 효과를 지지하였다. 세포-특이적인 단백질 발현은 당해 연구에서 측정되지 않았으나, 형태학적으로, 본 출원인의 결과는, 대식구 및 섬유모

세포 둘다가 외인성 $p21^{WAF-1/Cip-1}$ 단백질을 발현할 수 있음을 제안한다.

[0115] 신체의 거대 기관인 피부는 제한된 전신계적 노출로 국소-영역 전달을 제공하며 접근가능하고 비-침입적으로 시험할 수 있다. 바이러스 및 비-바이러스 시도 둘다는 유전자 전이를 입증하였다[참조: Khavari, P. A., et al, J Intern Med, 252(1):1-10 (2002)]. 본 출원인은 본원에서, 재조합체 아데노바이러스를 통해 전달된, 외인적으로 발현된 세포 주기 조절인자, $p21^{WAF-1/Cip-1}$ 이 과도한 흉터형성과 관련된 증식 반응을 약화시키는 것에 대해 입증하였다. 적절한 설계 및 적용 스케줄을 사용시, $p21^{WAF-1/Cip-1}$ 는 켈로이드 및 비대 흉터와 같은 피부 장애에 있어 치료학적으로 적용되며, 여기서, 병태생리학은 증식성 반응의 조절곤란으로부터 유래된다.

[0116] 실시예 2

[0117] 당해 실시예는 상처에서 rAd-p21 전달 및 $p21^{WAF-1/Cip-1}$ 발현을 나타낸다.

[0118] 시간에 따른 rAd-p21 유전자 전달 및 발현은 다음과 같이 단일의 경피 주사후 토끼 귀의 과도한 흉터 모델에서 특성화되었다.

[0119]

그룹	치료(경피투여량)	중점 분석	분석 시점
1	vPBS	PCR, RT-PCR, 형태	8시간; 1, 3, 5, 7, 10 및 14일
2	rAd-부재 (2×10^{10} PN/상처)	형태	1, 3 및 10일
3	rAd-p21 (2×10^6 PN/상처)	PCR, RT-PCR, 형태	8시간; 1, 3, 5, 7, 10 및 14일
4	rAd-p21 (2×10^{10} PN/상처)	PCR, RT-PCR, 형태	8시간; 1, 3, 5, 7, 10 및 14일

[0120] 방법:

[0121] 2 내지 4개의 6mm 직경의 상처를 토끼 귀당 도입시켰다. 분석용 샘플 크기는 치료 그룹당 3 내지 8개의 상처로 이루어진다. 양쪽 귀에서 동일한 상처 위치로부터 2개의 상처를 혼주하고 단일 튜브에 위치시켜 RT-PCR 및 PCR 검정을 위한 조직 요구조건을 충족시켰다. 당해 튜브는 2개 상처 및 하나의 검정 샘플의 평균을 나타내었다. 8시간, 1, 3, 5, 7 및 10일의 수거 시점에서의 PCR 및 RT-PCR 검정을 위해 N=1 또는 4는 2 또는 8개의 총 상처를 나타낸다. 14일 동안, 하나의 상처를 하나의 샘플로서 단일 튜브에 위치시키므로, N=1 또는 4는 그룹당 총 1개 또는 4개의 상처를 나타낸다. 형태 평가를 위해, 하나의 상처는 하나의 샘플을 나타내었고, 2개 내지 4개의 샘플을 그룹당 평가하였다.

[0122] vPBS 치료 그룹을 PCR/RT-PCR 검정 둘다에 대한 비히클 대조군으로서 제공하고 형태학적으로 평가하였다. rAd-부재 치료는 당해 연구에서 아데노바이러스 효과에 대한 대조군으로서 제공하였다.

[0123] 시험 시약 제조: rAd-p21 및 rAd-부재: 스톡 바이러스를 연구 0일째에 vPBS 희석액으로 희석시키고 병상에 유지시켰다. 희석시킨 바이러스를 동물내 경피 주사하기 전에 실온에서 30분동안 두었다.

[0124] 토끼 제조: 암컷의 뉴질랜드 화이트 토끼를 70mg/kg의 케타민, 5mg/kg의 크실라진 및 0.1mg/kg의 부토르판올을 근육내 주사하여 마취시켰다. 탈모제(NairTM)을 귀에 적용시켜 털을 제거하고 귀를 따뜻한 수돗물로 세정하며 수술 부위를 베타딘과 이소프로판올로 문질렀다. 동물을 예비-수술실로 부터 수술실로 이동시켰다.

[0125] 외과 수술(과정) 및 치료: 멸균 조건하에서, 2 내지 4개의 6mm의 상처를 각각의 귀 중앙에 트레핀으로 카트리지 깊이로 만들었다. 카트리지 및 덮은 피부를 각각의 상처로부터 지혈제로 제거하였다. 상처 가장자리 부위는 Mastisol^R로 제조하고 상처를 OpSite^R 드레싱으로 덮어서 건조를 방지하였다. 드레싱은 연구동안 상처에 두었다. 상처당 1×10^6 또는 2×10^{10} PN의 rAd-p21을 28G½ 인슐린 주사기를 사용하여 상처당 100μL의 총 용적으로 상처 가장자리 부위 주변에 경피 주사하였다. 상처당 주사 부위는 3, 6, 9, 12시 위치에 있으며 상처 가장자리 부위의 2 내지 3mm내에 있다. 수술을 그룹 1, 3 및 4에서 모든 토끼에 대해 양쪽 귀에서 반복하였다. 하나의 귀에 1, 3 및 10일 시점에서 rAd-부재 치료 그룹내 토끼마다 상처를 내었다. 동물을 우리로 보

내고 먹이와 물을 자유롭게 제공하였다.

[0126] 종점 분석: 규정된 참수 시점에서, 동물을 과도한 에타졸 CIII 200mg/kg을 정맥내 과투여하여 마취시키고 토끼 귀를 바닥에서 절단하였다. 완전한 두께의 상처를 10mm 조직 생검 펀치로 절단하여 250 μ L의 QIAGEN RNA_{later}TM (RNA 안정화 시약)을 함유하는 미세원심분리 튜브에 두었다. 모든 조직을 RNA 안정화 시약에 침지시키고 PCR 및 RT-PCR 분석을 위해 4℃에서 저장하였다. 14일째 시점에, 동일한 귀 상처 위치로부터 하나의 상처를 하나의 샘플을 나타내는 원심분리 튜브에 두는 것을 제외하고는, 모든 과정은 상기와 동일하였다. 형태학적 평가를 위해, 상처를 양분하고, 상처의 반을 최적 크리오섹션 온도 화합물(Optimun Cryosection Temperature Compound: OCT)속에서 동결시키고 나머지 반은 4℃에서 4시간 동안 4% 파라포름알데하이드속에서 고정시키고, 70% EtOH로 이전시키고, 트리크롬 염색을 진행시켰다. 형태학적 실험을 염증 및 상처 치유 반응에 대해 상처 조직 단면에서 수행하였다.

[0127] 정량적 PCR/정량적 RT-PCR 및 표준 곡선의 제조: 정량적 PCR 및 RT-PCR(QPCR 및 QRT-PCR) 과정을 사용하여 문헌[참조: Wen et al., Exp Eye Res. 77(3):355-65 (2003)]에 기술된 바와 같이 rAd-p21 DNA 및 전이유전자 발현을 정량하였다. DNA 및 RNA를 약 50 내지 100 mg의 조직으로부터 Tri-ReagentTM을 사용하여 동시-추출하였다.

[0128] **결과:**

[0129] rAd-p21 전달 및 사람 p21^{WAF-1/Cip-1} 유전자 발현은, 단일의 경피 투여량을 상처난 직후 전달한 후에 토끼 귀 과도한 흉터 모델에서 시간에 걸쳐 특성화하였다. QPCR 및 QRT-PCR 기술을 도입하여 상처난 부위에서 rAd-p21 DNA 및 사람 p21^{WAF-1/Cip-1} 유전자 발현을 적량하였다.

[0130] QPCR 및 QRT-PCR 평가: 2×10^6 또는 2×10^{10} PN/상처의 rAd-p21을 토끼 귀 상처에 단일 경피 주사로 전달하였다. 각각의 rAd-p21 분석된 샘플은 합해진 2개의 상처 각각당 2×10^6 또는 2×10^{10} PN이므로 각각 4×10^6 또는 4×10^{10} 총 PN으로 합산되었다. 14일째에는, 샘플당 단지 하나의 상처만이 남았다.

[0131] 최대 rAd-p21 DNA 수준이 8시간 및 1일째에 저 및 고 rAd-p21 투여량 그룹에서 관측되었다. DNA 수준은 저 및 고 투여량의 rAd-p21 그룹 각각에서 1.0 및 3.0 log 이상으로 14일 기간에 걸쳐 감소하였다. 최대 rAd-p21 RNA 수준은 고 투여량 그룹에서 경피 주사후 3일째에 관측되었다. RNA 수준은 3일째에 피크 수준과 비교하여 7, 10 및 14일 째에 약 0.5 내지 1.0 log rAd-p21로 중지되었다. 저 투여량의 rAd-p21 그룹에서 RNA 수준은 치료 후 8시간 및 1일째에 검출불가능하였다(적량가능한 수준 이하; BQL). 저 투여량 rAd-p21 그룹에서 검출가능한 RNA 발현의 개시는 3일째에 관측되었다. 피크 RNA 수준은 저 투여량 그룹에서 3일 내지 14일 사이에서 현저한 차이없이 3일 및 14일째에 관측되었다($p < 0.5$; Fisher's Post Hoc ANOVA). 저 투여량 rAd-p21 그룹에서 3일 및 14일째에 RNA 수준과 비교하는 경우 5, 7 및 10일째에 RNA 수준은 약 0.5-1.0 log로 낮았다. 예측한 바와 같이, 모든 vPBS 샘플은 음성이며, 이는 샘플의 교차 오염 또는 사람 p21 프라이머 서열과 내인성 토끼 서열의 교차 반응성이 없음을 입증한다. 시간에 걸친 저 투여량에서 이러한 RNA 발현 프로파일은 고 투여량의 rAd-p21 그룹과 유사한 발현 트렌드를 입증한다.

[0132] 형태학적 평가: 토끼 상처에 있어서의 형태학적 변화는 급성 상처 치유 과정의 대표적인 상을 수반하였다. 요약하면, 상처 후 8시간 째에, 상처에서 염증 세포 침윤이 관측되었다. 염증 세포 유입은 1일 및 3일째에 모든 상처에서 증가하였다. 5일째에, 육아 조직은 상처 층을 충전하기 시작하여 상피 이주 혀(epithelial migrating tongue)가 상처 가장자리 주변에서 관측되었다. 7, 10 및 14일째에, 상처 층이 육아 조직으로 충전되었고 상피로 덮였다. 보다 젊은 육아 조직 및 상피 층이 10일 및 14일째에 나머지 그룹과 비교하여 낮은 rAd-p21 투여량 치료 그룹에서 인지되었다. 그러나, 낮은 투여량의 rAd-p21 그룹은 14일째에 높은 투여량 그룹보다 보다 조밀한 세포충실성을 나타내었다. 이러한 데이터는, rAd-p21이 상처 흉터에서 상피의 두께 및 육아 조직의 용적을 약화시킬 수 있음을 나타내었다.

[0133] **토의:**

[0134] 사람 rAd-p21 DNA 전달 및 p21^{WAF-1/Cip-1} RNA 발현을 토끼 귀 상처의 고 투여량 및 저 투여량의 rAd-p21 치료 그룹 둘다에서 검출하였다. p21^{WAF-1/Cip-1} RNA 수준은 고 및 저 투여량 그룹 둘다에서 14일 기간에 걸쳐 유지되었다.

[0135] 실시예 3

[0136] 본 실시예는 rAd-p21 치료가 흉터 두께를 억제함을 나타낸다.

[0137] 과도한 흉터 토끼 모델을 사용하여 흉터 두께에 있어서 rAd-p21 치료의 효과를 측정하였다. 증가된 흉터형성은 PDGF-BB(2 μ g)의 단백질을 앞서 기술한 바와 같이 토끼 귀 상처에 주사함으로써 유발시켰다. 2×10^{10} PN의 rAd-p21 또는 rAd-부재의 두번째 주사를 7일 후에 수행하였다. 흉터 높이는 치료에 대한 반응으로서 측정하였고 효과는 rAd-p21 치료후 약 11일 째에 최대로 관측되었다. 흉터 조직을 18 및 35일(초기 상처 후) 사이에 측정하였고 조직을 초기 PDGF-BB 주사후 35일째에 수거하였다.

[0138] 도 5는, rAd-p21 치료가 토끼 귀의 과도한 흉터 모델에서 경피 전달 후 흉터 두께를 약화시킴을 입증한다. 당해 데이터는, 정상적인 흉터 환경에서, 저 투여량의 rAd-p21, 예를 들면, 2×10^6 PN/상처(7×10^6 PN/cm²)이 당해 모델에서 흉터 높이를 감소시키는데 효과적임을 지지한다. PDGF-BB를 사용하여 증진된 흉터 형성을 유발시키는 경우, 더욱 많은 rAd-p21이 이러한 흉터 효과를 극복하기 위해 요구된다.

[0139] 본 명세서에서 모든 공보 및 특허원은, 각각의 개개 공보 또는 특허원이 특정하게 및 개별적으로 참조로서 인용되는 것을 나타내는 것과 같이 참조로 본원에서 인용된다.

[0140] 비록 앞서의 발명이 이해를 명확히 하기위한 목적으로 나열 및 예로서 일부 상세하게 기술되었다 하더라도, 본 발명의 교시의 측면에서 당해 분야의 숙련자에게는, 특정 변화 및 변형이 첨부된 청구의 범위 또는 취지를 벗어남이 없이 이루어질 수 있음이 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1A는 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료후 1차 사람 피부 섬유모세포에서 증식 효과 및 프로-콜라겐 I 단백질 검출을 도시한 것이다. 당해 도면은 1차 사람 피부 섬유모세포에서 p21^{WAF1/Cip1}의 발현을 나타낸다. 세포를 증가된 농도의 rAd로 48시간 동안 처리하고, 항 p21^{WAF1/Cip1}-FITC 항체로 표지하고 FACS로 분석하였다. 막대표에서, 선(A, 파선)은 치료되지 않은 세포에서의 염색을 나타낸다. 선(B)은 1×10^7 PN/ml rAd-p21^{WAF1/Cip1}로 치료한 세포에서의 염색을 나타낸다. 선(C)은 1×10^8 PN/ml의 rAd-p21^{WAF1/Cip1}으로 치료한 세포에서의 염색을 나타낸다. 선(D)은 1×10^9 PN/ml의 rAd-p21^{WAF1/Cip1}으로 치료한 세포에서의 염색을 나타낸다. 막대표는 3회 실험을 대표한다.

[0027] 도 1B는 각종 아데노바이러스 벡터의 투여에 이은 세포 주기 정지를 나타낸다. 세포를 증가된 농도의 rAd(X-축)으로 48시간 동안 처리하고, BrdU로 펄스-표지하며 FACS로 분석하였다. 데이터를 BrdU를 혼입하는 세포의 퍼센트로서 Y-축에 플롯팅하였다(밀폐된 막대그래프). 각각의 바아(bar)는 3개의 웰의 평균 \pm 1개의 표준 편차를 나타낸다. 비교는 1×10^8 및 1×10^9 PN/ml의 투여량에서 rAd-부재(rAd-Empty) 및 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료 그룹사이에서 현저하다($p < 0.05$).

[0028] 도 1C는 각종의 아데노바이러스 벡터의 투여에 이은 RIP 단백질 수준을 나타낸다. 세포를 증가하는 농도의 재조합 아데노바이러스(X-축)와 함께 48시간 동안 항온처리하였다. 세포 분해물을 수거하고 사람 프로콜라겐 제1형 C-펩타이드(PIP)에 대해 ELISA로 분석하였다. 데이터를 총 분해 단백질(Y-축) ml당 PIP ng으로 플롯팅한다. 각각의 바아는 3개의 웰의 평균 \pm 1개의 표준 편차를 나타낸다. 비교는 3×10^9 PN/ml rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료 그룹 및 모든 다른 그룹 사이에서 현저하다($p < 0.05$).

[0029] 도 2는 랫트 PVA 스폰지 모델에서 주사 스케줄을 도시한다. PVA 스폰지를 0일째에 이식하고 rAd-PDGF-B 예비-치료를 스폰지 이식후 4일째에 전달하였다. rAd-p21^{WAF1/Cip1}를 rAd-PDGF-B 예비-치료후 3일째에 전달하고 모든 스폰지를 5일 후에 수거하였다.

[0030] 도 3은 육아조직 필(granulation tissue fill)에서 rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료 효과를 나타낸다. PVA 스폰지를 이식한 후 12일째에 수거(rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료후 5일째)하고 트릭롬 염색을 수행하였다. 평균 퍼센트 육아조직 필을 물질 및 방법에서 기술한 바와 같이 적량적 영상 분석으로 평가하였다. 비교는 rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 대 rAd-PDGF-B/비히클과 rAd-PDGF-B/rAd-부재를 제공받은 그룹 사이에서 현저하다(각각 $p < 0.001$ 및

p=0.05). 그러나, rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 대 비히클/비히클과 rAd-부재/rAd-부재를 제공받은 그룹 사이에 현저한 차이는 관측되지 않았다(p>0.3). 각각의 처리 그룹당 N=7.

[0031]

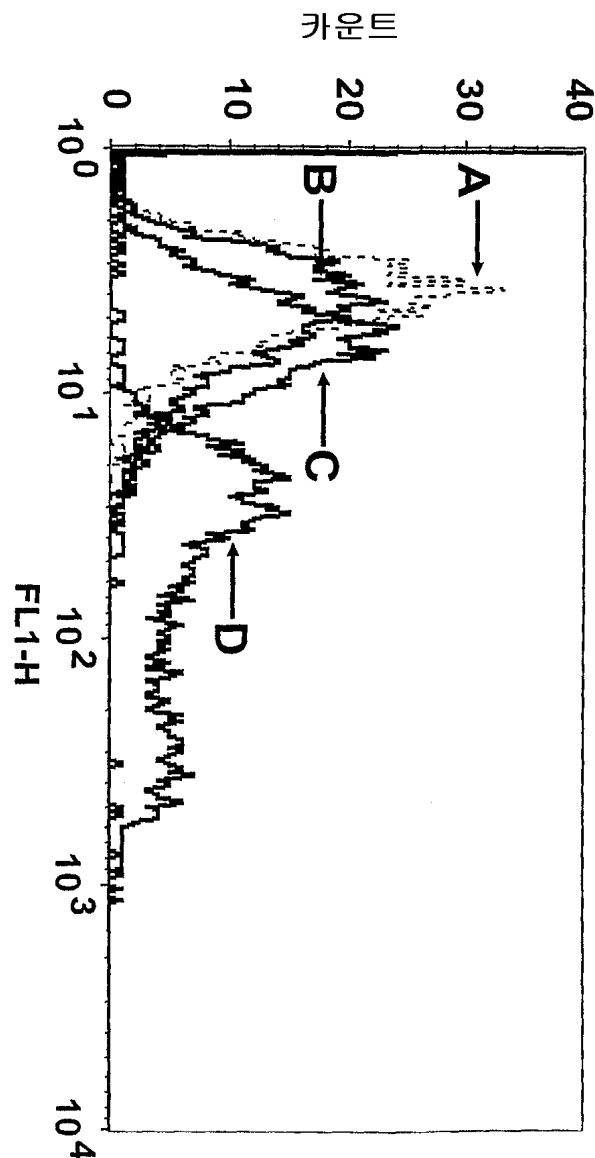
도 4A 및 4B는 생체내에서 rAd-p21^{WAF1/Cip1}의 처리 후 증식 지표를 도시한 것이다. BrdU 및 Ki67 양성 세포의 평균 퍼센트. 면역조직화학을 비히클/비히클, rAd-PDGF-B/비히클, rAd-PDGF-B/rAd-부재, 및 rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 처리된 스폰지중 항-BrdU 및 Ki67 항체를 사용하여 수행하였다. 비교는 rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료 그룹 대 rAd-PDGF-B/비히클과 rAd-PDGF-B/rAd-부재 그룹(*p<0.01), 및 rAd-PDGF-B/rAd-p21^{WAF1/Cip1} 치료 그룹 대 rAd-PDGF-B/비히클과 비히클/비히클 치료 그룹(**p<0.001)사이에서 현저하다. BrdU의 경우, 치료당 3개 스폰지로부터의 9개 영역을 계수하였다. Ki67의 경우, 치료 그룹당 4개의 스폰지를 계수하였다.

[0032]

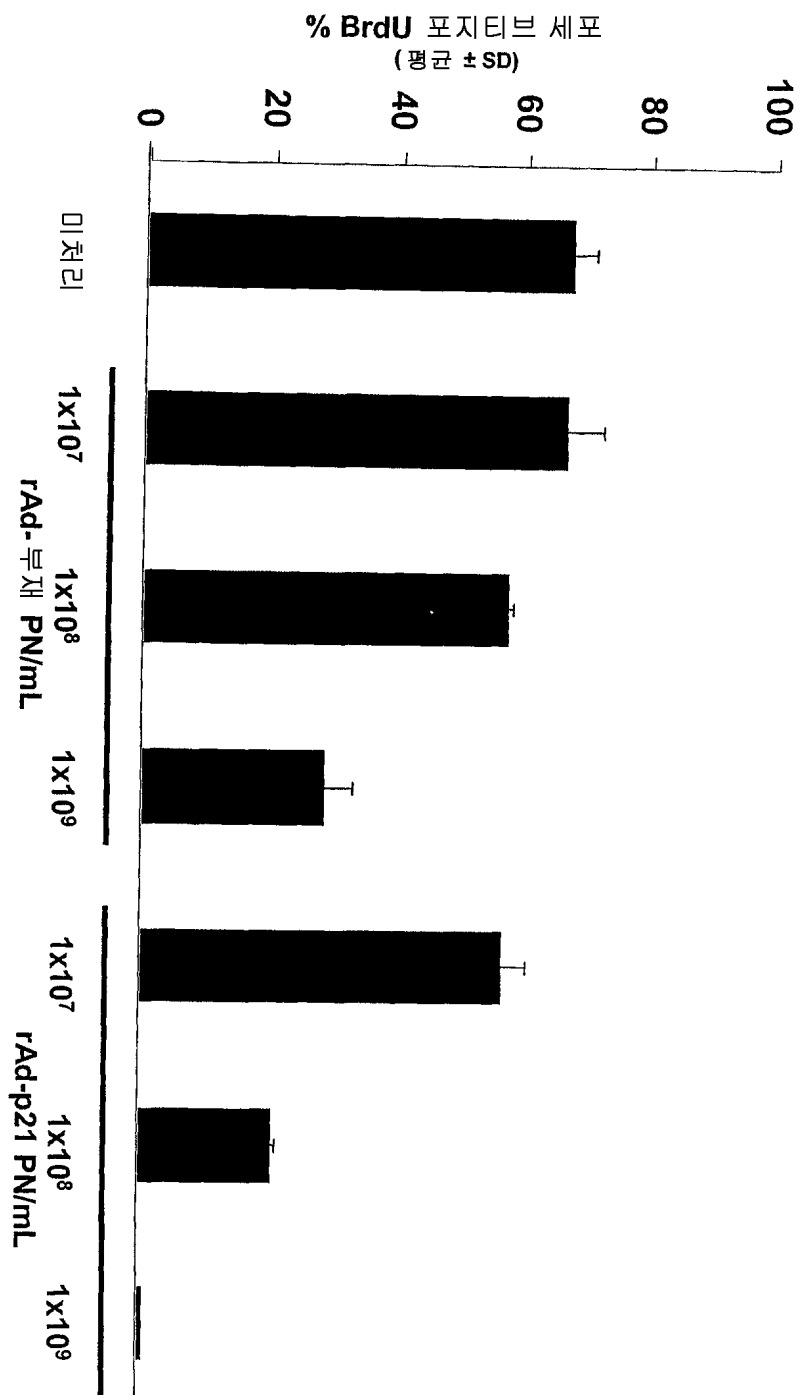
도 5는, p21 발현이 토끼 귀 과도한 흉터형성 모델에서 rAd-p21의 경피 전달 후 상승된 흉터 두께를 억제함을 나타낸다.

도면

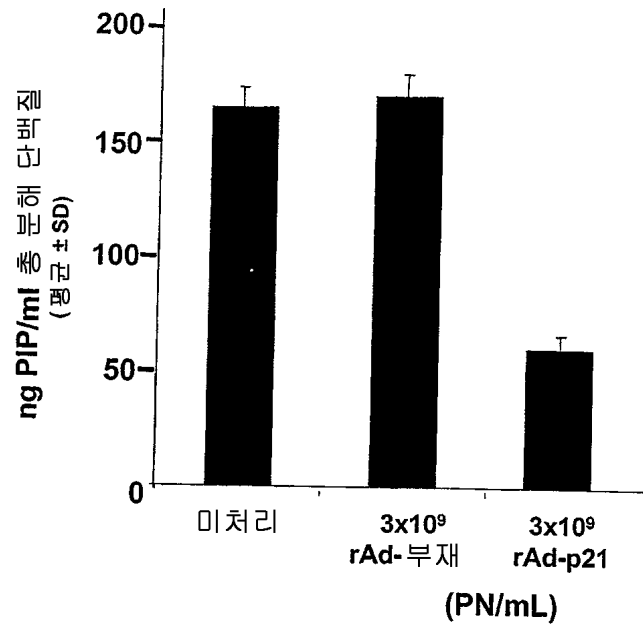
도면1A



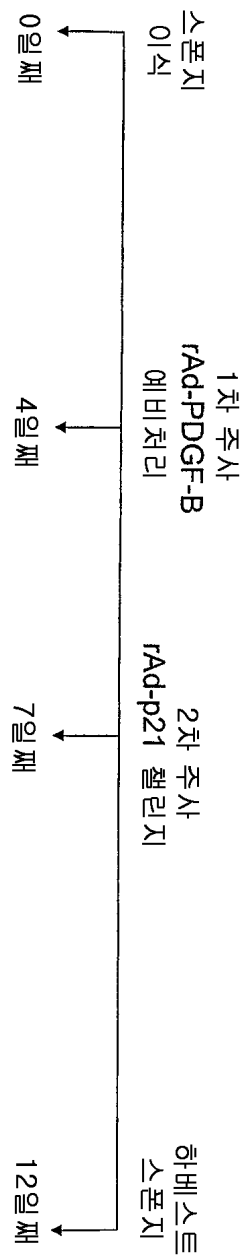
도면1B



도면1C

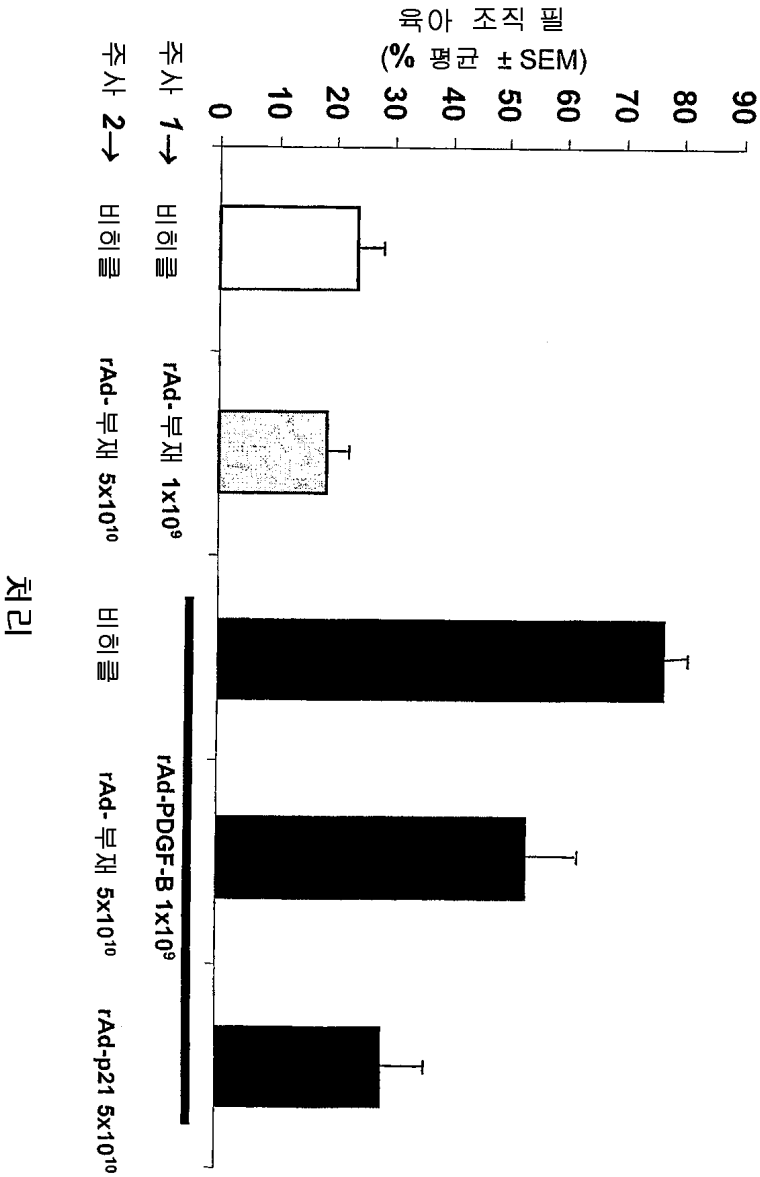


랫트 PVA 스폰지 모델 주사 스케줄

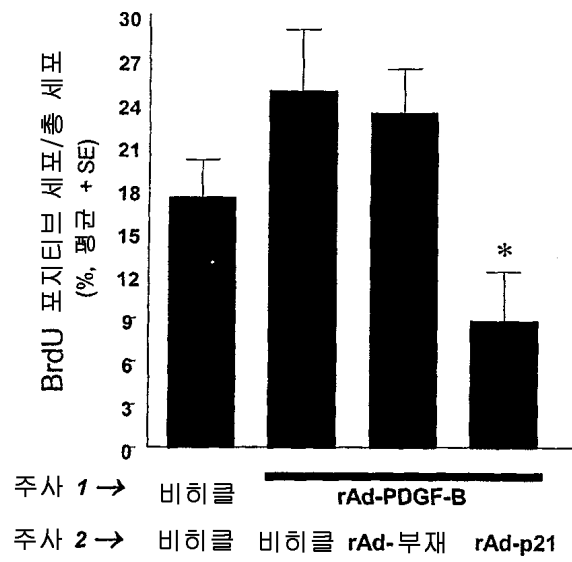


도면2

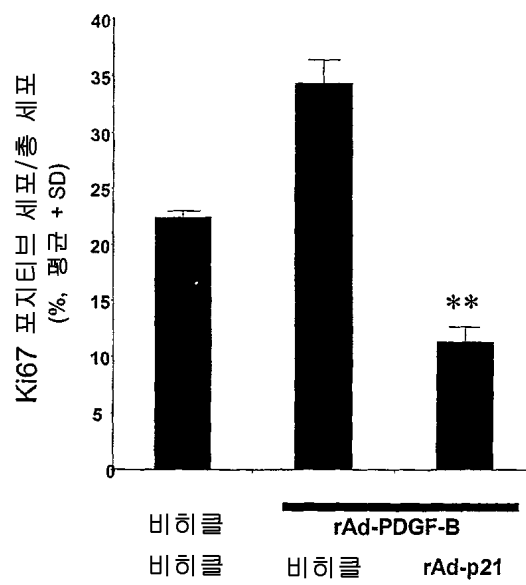
도면3



도면4A



도면4B



도면5

