



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0088542
(43) 공개일자 2012년08월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2006.01) *A61K 35/12* (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01) *C12N 5/10* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7026918
- (22) 출원일자(국제) 2010년04월13일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2011년11월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2010/054844
- (87) 국제공개번호 WO 2010/119039
국제공개일자 2010년10월21일
- (30) 우선권주장
61/168,787 2009년04월13일 미국(US)

- (71) 출원인
아프세스 게엠베하 & 씨오. 카게
독일, 뮌헨 81377 막스-레브쉐-프라츠 30
- (72) 발명자
넬슨, 피터
독일, 뮌헨 81545, 할사우세르 스트라세 119
- (74) 대리인
이원희

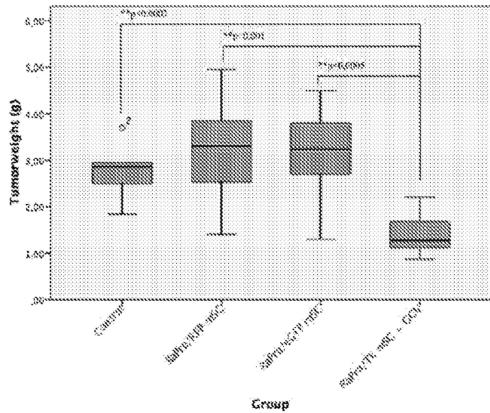
전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 종양 치료를 위한 조작된 중간엽 줄기세포 및 이를 사용하는 방법

(57) 요 약

본 발명은 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)를 사용하여 종양으로 고통받는 개체를 치료하기 위한 방법을 제공하고, 여기에서 각 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포는 (i) 하기 (ii)에 작동 가능하게 연결된 세포독성 단백질을 암호화하는 부위(region) (ii) 프로모터(promoter) 또는 프로모터/인핸서(enhancer) 조합을 포함하는 외인성 핵산을 포함하고, 여기에서 세포독성 단백질은 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)의 치료적으로 유효한 수가 개체의 혈류 내에 도입되었을 때 상기 줄기세포가 종양의 기질 조직에 근접하여 작용하였을 때 선택적으로 발현되는 것이다. 추가적으로 본 발명은 본 발명의 방법에 사용하기 위한 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포를 제공한다.

대 표 도 - 도5d



특허청구의 범위

청구항 1

종양으로 고통받는 개체(subject)의 치료를 위한 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)로서, 여기에서 각 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포는 (i) 하기 (ii)에 작동 가능하게 연결된 세포독성 단백질을 암호화하는 부위(region) (ii) 프로모터(promoter) 또는 프로모터/인핸서(enhancer) 조합을 포함하는 외인성 핵산을 포함하고, 여기에서 세포독성 단백질은 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)의 치료적으로 유효한 수가 개체의 혈류 내에 도입되었을 때 상기 줄기세포가 종양의 기질 조직에 근접하여 작용하였을 때 선택적으로 발현되는, 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 개체는 인간인 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 종양은 전이성인 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양은 혈관성인 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 5

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양은 혈관성이 아닌 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포는 CD34⁻줄기세포인 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포는 상기 개체와 연관하여 이종성(allogenic)인 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 8

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포는 상기 개체와 연관하여 자가성(autologous)인 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양의 기질의 조직은 섬유아세포-유사 세포(fibroblast-like cell)를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포의 도입은 골수체거(myeloablation)를 선행하거나, 동반하거나 또는 뒤따르지 않는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양은 전립선암(prostate tumor), 유방 종양(breast tumor), 췌장 종양(pancreatic tumor), 편평상피암(squamous cell carcinoma), 유방 종양(breast tumor), 흑색종(melanoma), 기저 세포암(basal cell carcinoma), 간세포암(hepatocellular carcinoma), 고환암(testicular cancer), 신경아 세포종(neuroblastoma), 다형성아교모세포종(glioblastoma multiforme)과 같은 신경교종(glioma) 또는 악성 성상세포종(malignant astrocytic tumor), 대장암(colorectal tumor), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 폐암(lung carcinoma), 난소종양(ovarian tumor), 자궁경부암(cervical tumor), 골육종(osteosarcoma), 횡문/평활근육종(rhabdo/leiomyosarcoma), 윤활막육종(synovial sarcoma), 혈관육종(angiosarcoma), 유잉육종/원시신경외배엽종양(Ewing sarcoma/PNET) 및 악성림프종(malignant lymphom)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양은 췌장암인것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 13

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터(promoter)는 RANTES 프로모터인 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 14

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포독성 단백질은 허프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제(Herpes simplex viral thymidine kinase)이고, 상기 개체는 어느 정도의 허프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제에 간시클로비르(ganciclovir) 세포독성을 주기 위하여 간시클로비르로 처리된 것을 특징으로 하는, 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 15

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포의 치료적으로 유효한 수는 약 1×10^5 내지 약 1×10^9 세포/kg 체중인 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 16

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포의 치료적으로 유효한 수는 약 1×10^6 내지 약 1×10^8 세포/kg 체중인 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포의 치료적으로 유효한 수는 약 5×10^6 내지 약 2×10^7 세포/kg 체중인 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 18

유전적으로 변형된 CD-34⁻ 줄기세포의 약 5×10^6 내지 약 2×10^7 세포/kg 체중의 수로 개체의 혈류 내로 도입한 것에 의해 혀장암으로 고통받는 인간 개체를 치료하기 위한 유전적으로 변형된 CD-34⁻ 줄기세포로서, 여기에 서 (a) 각 유전적으로 변형된 CD-34⁻ 줄기세포는 (i) 하기 (ii)에 작동 가능하게 연결된 허프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제(Herpes simplex viral thymidine kinase)를 암호화하는 부위 (ii) RANTES 프로모터를 포함하는 외인성 핵산을 포함하고, (b) 상기 개체는 어느 정도의 허프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제에 간시 클로비르(ganciclovir) 세포독성을 주기 위하여 간시클로비르로 처리되고, (c) 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포의 도입은 골수제거(myeloablation)를 선행하거나, 동반하거나 또는 뒤따르지 않는 것을 특징으로 하는, 유전적으로 변형된 CD-34⁻ 줄기세포.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 종양은 전이성인 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 CD-34⁻ 줄기세포.

청구항 20

제 18항 또는 제 19항에 있어서, 상기 종양은 혈관성인 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 CD-34⁻ 줄기세포.

청구항 21

제 19항에 있어서, 상기 종양은 혈관성이 아닌 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 CD-34⁻ 줄기세포.

청구항 22

제 18항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 중간엽 세포는 상기 개체와 연관하여 이종성(allogenic)인 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 CD-34⁻ 줄기세포.

청구항 23

제 18항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 중간엽 세포는 상기 개체와 연관하여 자가성(autologous)인 것을 특징으로 하는 유전적으로 변형된 CD-34⁻ 줄기세포.

청구항 24

(i) 하기 (ii)에 작동 가능하게 연결된 세포독성 단백질을 암호화하는 부위(region) (ii) 프로모터(promoter) 또는 프로모터/인핸서(enhancer) 조합을 포함하는 외인성 핵산을 포함하고, 여기에서 세포독성 단백질은 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포가 종양의 기질 조직에 근접하여 작용할 때 선택적으로 발현되는 것을 특징으로 하는, 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포.

청구항 25

제 24항에 있어서, 상기 줄기세포는 인간 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포.

청구항 26

제 24항 또는 제 25항에 있어서, 상기 줄기세포는 CD-34⁻ 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포.

청구항 27

제 24항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합은 염증성 매개체(inflammatory mediator)에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는 줄기세포.

청구항 28

제 24항 내지 제 27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합은 사이토카인에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는 줄기세포.

청구항 29

제 24항 내지 제 28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터는 RANTES 프로모터인 것을 특징으로 하는 줄기세포.

청구항 30

제 24항 내지 제 29항 중 어느 한 항에 있어서, 추가적으로 (iii) 하기 (iv)에 작동 가능하게 연결된 선택 표지 유전자 (iv) 항시발현 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 줄기세포.

청구항 31

제 30항에 있어서, 상기 선택 표지 유전자는 항생제 내성 유전자(antibiotic resistance gene) 또는 표면 표지 단백질(surface marker protein)을 암호화하는 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 줄기세포.

청구항 32

제 30항 또는 제 31항에 있어서, 추가적으로 (v) 상기 세포독성 단백질을 암호화하는 부위 및 상기 표면 표지 유전자 사이에 위치한 절연인자(insulator) 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 줄기세포.

청구항 33

제 24항 또는 제 32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합에 작동 가능하게 연결된 세포독성 단백질을 암호화하는 부위는 상기 줄기세포 유전체 내로 통합되는 것을 특징으로 하는 줄기세포.

청구항 34

제 30항 또는 제 32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항시발현 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합에 작동 가능하게 연결된 상기 선택 표지 유전자는 상기 줄기세포 유전체 내로 통합되는 것을 특징으로 하는 줄기세포.

청구항 35

제 33항 또는 제 34항에 있어서, 추가적으로 상기 줄기세포 유전체 내로 통합되는 프로바이러스 서열(proviral sequence)을 포함하고, 상기 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합에 작동 가능하게 연결된 상기 세포독성 단백질을 암호화하는 부위 및 상기 항시발현 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합에 작동 가능하게 연결된 상기 선택 표지 유전자 또는 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합은 프로바이러스 서열의 일부인 것을 특징으로 하는 줄기세포.

청구항 36

제 35항에 있어서, 상기 프로바이러스 서열은 렌티 바이러스(lentiviral), 알파-레트로 바이러스(alpha-retroviral) 또는 감마-레트로 바이러스(gamma-retroviral) 서열인 것을 특징으로 하는 줄기세포.

청구항 37

제 24항 또는 제 36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포독성 단백질은 허프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제(Herpes simplex viral thymidine kinase) 또는 시토신 탈아미노화 효소(cytosine deaminase)인 것을 특징으로 하는 줄기세포.

청구항 38

하기를 포함하는 레트로 바이러스 패키징(packaging) 세포:

- 염증성 매개체에 의해 유도되는, 하기 (ii)에 작동 가능하게 연결된 세포독성 단백질을 암호화하는 부위 (ii) 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합을 포함하는 레트로 바이러스 벡터, 및
- 간엽세포 또는 CD34⁻ 줄기세포의 굴성(tropism)을 제공하는 바이러스 표면 단백질을 암호화하는 유전자.

청구항 39

제 38항에 있어서, 상기 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합은 사이토카인에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는 레트로 바이러스 패키징 세포.

청구항 40

제 38항 또는 제 39항에 있어서, 상기 프로모터는 RANTES 프로모터인 것을 특징으로 하는 레트로 바이러스 패키징 세포.

청구항 41

(i) 하기 (ii)에 작동 가능하게 연결된 헤프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제를 암호화하는 부위 (ii) RANTES 프로모터를 포함하는 외인성 핵산을 포함하는, 유전적으로 변형된 인간 CD34⁻ 줄기세포.

명세서

배경기술

[0001]

최근에 만들어진 패러다임(paradigm)은 악성(malignant) 세포가 복합 세포 및 세포 외 미세환경(microenvironment)에 존재한다는 것을 제안하고 있고 이는 악성 표현형(phenotype)의 시작 및 유지에 유의적으로 영향을 미친다.^{1,2} 고형 종양은 섬유아세포(fibroblast), 내피(endothelium), 혈관주위세포(pericyte), 림프관(lymphatics) 및 일반적으로, 단핵 침윤물(mononuclear infiltrate)을 포함하는 지지세포(supporting cell) 뿐만 아니라 상기 악성 세포로 구성될 수 있을 것으로 볼 수 있다.²⁻⁶ 간질세포(stromal cell)는 종양의 생존에 매우 필수적이고 화학요법의 중재에 중요한 표지가 되고 있다.

[0002]

중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)는 다분화능 기원세포(progenitor cell)이고 다양한 조직의 유지 및 재생에 기여한다.^{7,8} MSCs는 많은 조직에서 찾을 수 있고 거기에서 상기 MSCs는 골수, 혈액 또는 중간엽 조직의 다른 근원과 같은, 줄기 세포의 국부적인 근원으로서 역할을 한다. MSCs는 손상 후 또는 만성 염증 동안에 조직 개조에 기여한다. 손상된 조직은 특이적 내분비(endocrin)를 방출하는 것으로 여겨지고 이는 손상된 부위에 다분화능 MSCs의 동원 및 그들의 추가적인 동원을 이끈다. 또한, MSCs는 종양 기질(stroma)에 강하게 이끌린다. 실험 동물에의 혈액 내로 주입된 MSCs는 악성 종양에 국한된다. Once there, MSCs는 종양 혈관 및 기질 섬유아세포(stromal fibroblast)를 포함하는 종양 기질을 포함하는 다양한 세포 유형에 기여할 수도 있다.

[0003]

유방암에서, 최근에 Karnoub et al.은 종양 부위에 있는 MSCs는 작은 단백질, 케모카인(chemokine) CCL5를 방출시킨다는 것을 밝혔다. 상기 CCL5는 다양한 간엽세포(stromal cell)를 위한 화학주성인자(chemoattractant)로서 작용할 수 있고^{9,10}, 이것의 발현은 증가된 종양 신혈관 생성(neovascularization)과 연관된다. 게다가, CCL5는 원 종양(primary tumor) 성장 부위에 간질세포 유형의 다수의 동원을 통하여 암성장 및 전이에 기여할 수도 있다.^{9,11,12}

[0004]

이는 최근에 MSC 선조(progenitor)의 CD34⁻ 특정생물형군(subpopulation)이 성장하고 있는 종양에 동원되고 새로운 혈관내피세포(vascular endothelial cells, ECs) 또는 혈관주위세포(pericytes) 내로 그들의 분화를 통하여 종양 신생혈관생성(neoangiogenesis)에 기여한다.¹³⁻¹⁵ 중요하게, 이러한 및 연관된 직접적인 영향은 말초 순환(peripheral circulation)에 MSCs의 직접적인 주입 후에 관찰될 수 있다.¹⁶

[0005]

혈관생성을 겪고 있는 종양 조직에 근접한 것에 바탕을 둔 세포독성 단백질 발현 보다, 세포독성 단백질 발현을 위한 종양 기질 조직 그 자체에 근접한 것에 바탕을 둔 세포독성 단백질 발현을 적용하는 줄기 세포에 기초한 치료를 위한 충족되지 않는 필요성이 존재한다. 상기와 같은 필요성은 특히 아직 혈관생성을 겪지 않은 전이성 종양의 치료에 대하여 특히 심각하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006]

- (비특허문헌 0001) 본 명세서 전반에 걸쳐, 다양한 출판물을 인용하였다. 상기 출판물에 드러난 사실은 본 발명에 적용한 것에서 당 업계의 좀 더 충분한 상태를 기재하기 위하여 본 명세서에 참고로 여기에 포함하였다.
- (비특허문헌 0002) Korc M. Pancreatic cancer-associated stroma production. *Am J Surg* 2007; 194(4 Suppl):S84-6.
- (비특허문헌 0003) Ahmed F, Steele JC, Herbert JM, et al. Tumor stroma as a target in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8(6):447-53.
- (비특허문헌 0004) Farrow B, Sugiyama Y, Chen A, et al. Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. *Ann Surg* 2004; 239(6):763-9; discussion 769-71.
- (비특허문헌 0005) Karnoub AE, Weinberg RA. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis* 2006; 26:75-85.
- (비특허문헌 0006) Kiaris H, Trimis G, Papavassiliou AG. Regulation of tumor-stromal fibroblast interactions: implications in anticancer therapy. *Curr Med Chem* 2008; 15(29):3062-7.
- (비특허문헌 0007) Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 2006; 5(15):1597-601.
- (비특허문헌 0008) Fritz V, Jorgensen C. Mesenchymal stem cells: an emerging tool for cancer targeting and therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008; 3(1):32-42.
- (비특허문헌 0009) Zipori D. The mesenchyme in cancer therapy as a target tumor component, effector cell modality and cytokine expression vehicle. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(3):459-67.
- (비특허문헌 0010) Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; 449(7162):557-63.
- (비특허문헌 0011) Moller C, Stromberg T, Juremalm M, et al. Expression and function of chemokine receptors in human multiple myeloma. *Leukemia* 2003; 17(1):203-10.
- (비특허문헌 0012) Soria G, Ben-Baruch A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Lett* 2008; 267(2):271-85.
- (비특허문헌 0013) Fischer M, Juremalm M, Olsson N, et al. Expression of CCL5/RANTES by Hodgkin and Reed-Sternberg cells and its possible role in the recruitment of mast cells into lymphomatous tissue. *Int J Cancer* 2003; 107(2):197-201.
- (비특허문헌 0014) Bexell D, Gunnarsson S, Tormin A, et al. Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas. *Mol Ther* 2009; 17(1):183-90.
- (비특허문헌 0015) Kanehira M, Katagiri T, Shimo A, et al. Oncogenic role of MPHOSPH1, a cancer-testis antigen specific to human bladder cancer. *Cancer Res* 2007; 67(7):3276-85.
- (비특허문헌 0016) Von Luttichau I, Notohamiprodjo M, Wechselberger A, et al. Human adult CD34+ progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells Dev* 2005; 14(3):329-36.
- (비특허문헌 0017) Conrad C, Niess H, Huss R, et al. Multipotent Mesenchymal Stem Cells Acquire a Lymphendothelial Phenotype and Enhance Lymphatic Regeneration In Vivo. *Circulation* 2008.
- (비특허문헌 0018) Conrad C, Gupta R, Mohan H, et al. Genetically engineered stem cells for therapeutic gene delivery. *Curr Gene Ther* 2007; 7(4):249-60.
- (비특허문헌 0019) Kumar D, Hosse J, von Toerne C, et al. JNK MAPK pathway regulates constitutive transcription of CCL5 by human NK cells through SP1. *J Immunol* 2009; 182(2):1011-20.

- (비)특허문현 0020) Liyanage UK, Goedegebuure PS, Moore TT, et al. Increased prevalence of regulatory T cells (Treg) is induced by pancreas adenocarcinoma. *J Immunother* 2006; 29(4):416-24.
- (비)특허문현 0021) Segerer S, Banas B, Wornle M, et al. CXCR3 is involved in tubulointerstitial injury in human glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2004; 164(2):635-49.
- (비)특허문현 0022) Conrad C, Gottgens B, Kinston S, et al. GATA transcription in a small rhodamine 123(low)CD34(+) subpopulation of a peripheral blood-derived CD34(-)CD105(+) mesenchymal cell line. *Exp Hematol* 2002; 30(8):887-95.
- (비)특허문현 0023) Nelson PJ, Kim HT, Manning WC, et al. Genomic organization and transcriptional regulation of the RANTES chemokine gene. *J Immunol* 1993; 151(5):2601-12.
- (비)특허문현 0024) Werner T, Fessele S, Maier H, Nelson PJ. Computer modeling of promoter organization as a tool to study transcriptional coregulation. *FASEB J* 2003; 17(10):1228-37.
- (비)특허문현 0025) von Luetrichau I, Nelson PJ, Pattison JM, et al. RANTES chemokine expression in diseased and normal human tissues. *Cytokine* 1996; 8(1):89-98.
- (비)특허문현 0026) Nelson PJ, Pattison JM, Krensky AM. Gene expression of RANTES. *Methods Enzymol* 1997; 287:148-62.
- (비)특허문현 0027) Fessele S, Boehlk S, Mojaat A, et al. Molecular and in silico characterization of a promoter module and C/EBP element that mediate LPS-induced RANTES/CCL5 expression in monocytic cells. *FASEB J* 2001; 15(3):577-9.
- (비)특허문현 0028) Fessele S, Maier H, Zischek C, et al. Regulatory context is a crucial part of gene function. *Trends Genet* 2002; 18(2):60-3.
- (비)특허문현 0029) Golumbek PT, Hamzeh FM, Jaffee EM, et al. Herpes simplex-1 virus thymidine kinase gene is unable to completely eliminate live, nonimmunogenic tumor cell vaccines. *J Immunother* 1992; 12(4):224-30.
- (비)특허문현 0030) Andoh A, Takaya H, Saotome T, et al. Cytokine regulation of chemokine (IL-8, MCP-1, and RANTES) gene expression in human pancreatic periacinar myofibroblasts. *Gastroenterology* 2000; 119(1):211-9.
- (비)특허문현 0031) Duell EJ, Casella DP, Burk RD, et al. Inflammation, genetic polymorphisms in proinflammatory genes TNF-A, RANTES, and CCR5, and risk of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(4):726-31.
- (비)특허문현 0032) Corbett T. H., Roberts BJ, Leopold WR, et al. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Res* 1984; 44: 717 ? 726
- (비)특허문현 0033) Morikane K, Tempero RM, Sivinski CL, et al. Organ-specific pancreatic tumor growth properties and tumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 1999;47(5):287-96.
- (비)특허문현 0034) Deeg HJ, Klingemann HG, Philips GL, A Guide to Bone Marrow Transplantation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1992.
- (비)특허문현 0035) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., p. 808, Lippincott Williams & Wilkins (2000).
- (비)특허문현 0036) Marfaing-Koka, A., et al., Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. *Journal of Immunology*, 1995. 154(4): p. 1870-8.
- (비)특허문현 0037) Khouri, M, et al. (2007). Inflammation-inducible anti-TNF gene expression mediated by intra-articular injection of serotype 5 adeno-associated virus reduces arthritis. *J Gene*

Med 9: 596-604.

- (비특허문헌 0038) Balkwill, F., Charles, KA, and Mantovani, A (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7: 211-217.
- (비특허문헌 0039) Treschow, A, Unger, C, Aints, A, Felldin, U, Aschan, J, and Dilber, MS (2007). OuaSelect, a novel ouabain-resistant human marker gene that allows efficient cell selection within 48 h. *Gene Ther* 14: 1564-1572.
- (비특허문헌 0040) Fehse, B, et al. (2000). CD34 splice variant: an attractive marker for selection of gene-modified cells. *Mol Ther* 1: 448-456.
- (비특허문헌 0041) Bergoglio, V, et al. (2007). Safe selection of genetically manipulated human primary keratinocytes with very high growth potential using CD24. *Mol Ther* 15: 2186-2193.
- (비특허문헌 0042) Wei, Q, Croy, BA, and Etches, RJ (2001). Selection of genetically modified chicken blastodermal cells by magnetic-activated cell sorting. *Poult Sci* 80: 1671-1678.
- (비특허문헌 0043) Niwa, H, Yamamura, K, and Miyazaki, J (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108: 193-199.
- (비특허문헌 0044) Zychlinski, D, et al. (2008). Physiological Promoters Reduce the Genotoxic Risk of Integrating Gene Vectors. *Mol Ther*.
- (비특허문헌 0045) West, AG, Gaszner, M, and Felsenfeld, G (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev* 16: 271-288.
- (비특허문헌 0046) Miletic, H, et al. (2004). Selective transduction of malignant glioma by lentiviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoproteins. *Hum Gene Ther* 15: 1091-1100.
- (비특허문헌 0047) Di Nunzio, F, Piovani, B, Cosset, FL, Mavilio, F, and Stornaiuolo, A (2007). Transduction of human hematopoietic stem cells by lentiviral vectors pseudotyped with the RD114-TR chimeric envelope glycoprotein. *Hum Gene Ther* 18: 811-820.
- (비특허문헌 0048) Stitz, J, et al. (2000). Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology* 273: 16-20.
- (비특허문헌 0049) Huber, BE, Austin, EA, Richards, CA, Davis, ST, and Good, SS (1994). Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8302-8306.
- (비특허문헌 0050) Horwitz EM, Le BK, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cyotherapy* (2005) 7:393?395.
- (비특허문헌 0051) Hu, WS, and Pathak, VK (2000). Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacol Rev* 52: 493-511.
- (비특허문헌 0052) zsvak, Z, Ivics, Z, and Plasterk, RH (2000). Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J Mol Biol* 302: 93-102.
- (비특허문헌 0053) Wu, SC, et al. (2006). piggyBac is a flexible and highly active transposon as compared to sleeping beauty, Tol2, and Mos1 in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15008-15013.
- (비특허문헌 0054) Hanchen Li, Xueli Fan, and JeanMarie Houghton, Journal of Cellular Biochemistry 101:805?815 (2007).
- (비특허문헌 0055) Balkwill, F., K. A. Charles, et al. (2005). "Smoldering and polarized

inflammation in the initiation and promotion of malignant disease." Cancer Cell 7(3): 211-7.

(비특허문헌 0056) Inman, G. J. and C. S. Hill (2002). "Stoichiometry of active smad-transcription factor complexes on DNA." Journal of Biological Chemistry 277(52): 51008-16.

도면의 간단한 설명

[0006]

도 1a

왼쪽 측면에 1 cm 절개한 곳에서, 췌장을 노출시켰다. 1 ml 주사기를 췌장 내로 150,000 개의 췌장암 세포를 주입하는데 사용하였다.

도 1b

상기 절차 2주 후, 모든 마우스는 감지할 수 있는 종양을 성장시켰고 각각의 실험 군에 대하여 무작위 선정되었다.

도 2

변형된 보이든 챔버(Boyden Chamber) 분석을 Panc02 세포로부터 유래된 조건부의 배지에서 C57B16 MSC의 이동성 반응을 평가하기 위하여 사용하였다. 결과는 Panc02로 유래된 성장 배지에 상기 MSC의 농도의존적으로 유도된 이동성을 보여주었다.

도 3

심어진 Panc02 종양을 침투시키기 위한 MSCs(CMV 프로모터의 조절 아래서 항시발현하게 eGFP를 발현시키기 위해 조작하였다)의 능력을 평가하였다. 1주에 세 번, 500,000개의 세포를 성장하고 있는 췌장 종양이 있는 마우스 내의 정맥 내로 주입하였다. 5주 후에, 상기 마우스를 희생시켰고 상기 종양을 제거하였으며 GFP의 발현을 위해 분석하였다. (A) 결과는 종양과 연관된 강한 GFP의 발현을 보여준다. (B) MSC의 양자 전이(adoptive transfer)는 상기 실험 동안에 심어진 종양의 성장을 증가시켰다는 것을 밝혔다.

도 4

CCL5 프로모터는 Panc02 종양을 표적하는 MSC에서 리포터 유전자 발현의 증가된 선택성을 제공한다. MSCs를 CCL5 프로모터의 조절 아래서 RFP 또는 eGFP 둘 중 하나를 발현시키기 위하여 조작하였다. 주(week) 당 500,000개 세포의 주입을 3주 동안 한 후, 동물을 희생시켰고 상기 종양을 형광 현미경으로 리포터 유전자 발현을 위해 측정하였다. 상기 CCL5 프로모터에 의해 작동된 eGFP (A) 및 RFP-(B) 리포터 유전자는 종양 환경 내에 발현을 보였다. 좀 더 정확한 종양 형태를 RFP 특이적 다클론성 항체를 이용하여 고정된 조직 절편에서 면역조직화학(immunohistochemistry)으로 관찰하였다(C 및 D). (C) 결과는 종양의 기질 부위에서 RFP의 초점 발현을 보여준다(100×). (D+E) 좀 더 높은 배율(각각, 200×, 500×)에서 유사한 종양 시료는 종양 환경에서 상기 RFP 리포터 유전자의 발현을 보이는 MSC의 광범위한 침윤(infiltration)을 보여준다.

도 5a

췌암(pancreatic carcinoma)의 치료 양상으로서 GCV와 함께, CCL5 프로모터의 조절 아래서 HSV-TK을 발현하기 위하여 MSC의 적용을 조작하였다. 컨스트럭트(construct)의 개요를 상기 HSV-TK 자살 유전자를 발현하기 위하여 상기 MSC를 조작하는 데 사용하였다.

도 5b

최적 치료 계획(therapeutic regimen)을 위하여, 500,000 개의 CCL5-TK 조작된 MSCs를 정맥안으로 주입하였다. 성장하고 있는 종양에 동원하기 위하여 그리고 TK 유전자의 발현을 활성화하기 위하여 3일 동안 상기 세포를 주었다. 마우스에 4일 동안 7.5 mg GCV의 정맥내 주사를 하루에 한 번 놓았고, 그 후에 하루를 쉬었다. 상기 마우스에 상기 조작된 줄기 세포를 다시 주입하였고, 주기는 실험기간 동안 반복하였다. 3 주기(종양 도입 후 36 일 또는 첫 번째 MSC 주입 후 21일) 후 상기 동물을 희생시켰고 종양 성장을 평가하였다.

도 5c

종양의 표본을 대조군, 조작된 MSC 대조군(RFP, eGFP) 및 HSV-TK/GCV-처리 동물에서 잘라내었다.

도 5d

HSV-TK/GCV 처리는 실험 동안 종양 성장의 유의적 감소를 야기하였다.

도 6

유전자 요소의 몇 가지 표본(example)과 함께 이식유전자(transgene) 카세트(cassette)의 도식적인 개요. 유도 프로모터(pInd)는 세포독성 단백질을 암호화하는 부위에 연결된다. 두 번째 항시발현 세포 또는 바이러스 프로모터(pConst)는 선택 표지 유전자에 연결된다. 상기 두 가지 구성 단위는 절연인자(insulator) 서열(+/- 절연인자)에 의해 분리될 수도 있다.

도 7

MSC의 유전자 변형을 위해 이식 유전자 카세트를 운반하는 레트로 바이러스(retroviral) 벡터의 개요를 도 6에 묘사하였다. 벡터 생산은 5' 긴 말단반복순서(long terminal repeat, LTR)에서 U3-부위의 프로모터 활성으로부터 작동될 수 있을 것이다. 상기 5' U3-부위는 다른 바이러스 프로모터에 의해 대체될 수 있다. 패키징(packaging) 신호 Φ는 벡터 입자 내로 벡터 유전자의 캡시드화(incapsidation)를 가능하게 한다. 렌티 바이러스(lentiviral) 입자의 생산을 위하여 RRE(rev responsive element) 및 cPPT(central poly purine tract)와 같은 추가적인 성분이 필요하다. wPRE(woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element)의 선택적인 추가는 벡터 적정량(titer) 및 이식유전자 발현을 증가시키는 것에 도움이 될 수 있다. 유도 프로모터(pInd)는 세포독성 단백질을 암호화하는 부위에 연결된다. 두 번째 항시발현 세포 또는 바이러스 프로모터(pConst)는 선택 표지 유전자에 연결된다. 상기 두 가지 구성 단위는 절연인자(insulator) 서열(+/- 절연인자)에 의해 분리될 수도 있다.

도 8

RANTES 프로모터의 조절 아래 HSV tk의 발현을 위한 렌티 바이러스 벡터의 플라스미드(plasmid) 지도.

도 9

TNF α (10 ng/ml) 및 IFN γ (10 ng/ml)로 MSCs의 유도 후 RANTES mRNA 발현. 상대적인 RANTES mRNA 양을 0h, 표준화 수준으로서 유도되지 않은 시료로 △△CT 방법을 이용하여 산출하였다. 두 가지 생물학적 시료로부터 평균 값을 나타냈다.

도 10

간시클로비르와 함께 hMSCs의 처리는 TNF α 및 IFN γ로 RANTES 프로모터의 유도 후 특이적 세포 죽음을 이끈다. 처리되지 않은 (A), TNF α 및 IFN γ로 유도된 (B), 간시클로비르만 처리된 (C) 또는 TNF α 및 IFN γ로 첫 번째로 유도된 다음 간시클로비르가 처리된 (D), hMSCs의 대표적 현미경 사진. 100× 배율.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0007]

본 발명의 요약

[0008]

본 발명의 실시예는 개체의 혈류 내로 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포의 치료적으로 유효한 수를 도입하는 것을 포함하는, 종양으로 고통받는 개체를 치료하는 방법을 제공하고, 여기에서 각 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포는 (i) 하기 (ii)에 작동 가능하게 연결된 세포독성 단백질을 암호화하는 부위(region) (ii) 프로모터(promoter) 또는 프로모터/인핸서(enhancer) 조합을 포함하는 외인성 핵산을 포함하고, 상기 세포독성 단백질이 상기 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포가 종양의 기질 조직에 근접하여 작용할 때 선택적으로 발현되는 것을 특징으로 한다.

[0009]

또한, 본 발명의 또 다른 실시예는 본 명세서에 나타낸 종양으로 고통받는 개체를 치료하기 위한 방법의 어느 하나에 사용하기 위한 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포를 제공한다.

[0010]

또한, 본 발명은 유전적으로 변형된 CD-34⁻ 줄기세포의 약 5×10^6 내지 약 2×10^7 세포/kg 체중의 수로 개체

의 혈류 내로 도입하는 것을 포함하는, 췌장 종양으로 고통받는 인간 개체를 치료하기 위한 방법을 제공하고, 여기에서 (a) 각 유전적으로 변형된 CD-34⁻ 줄기세포는 (i) 하기 (ii)에 작동 가능하게 연결된 헤프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제(Herpes simplex viral thymidine kinase)를 암호화하는 부위 (ii) RANTES 프로모터를 포함하는 외인성 핵산을 포함하고, (b) 상기 개체는 어느 정도의 헤프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제에 간시클로비르(ganciclovir) 세포독성을 주기 위하여 간시클로비르로 처리되고, (c) 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포의 도입은 골수제거(myeloablation)를 선행하거나, 동반하거나 또는 뒤따르지 않는 것을 특징으로 한다.

[0011] 추가적으로, 본 발명은 (i) 하기 (ii)에 작동 가능하게 연결된 세포독성 단백질을 암호화하는 부위(region) (ii) 프로모터(promoter) 또는 프로모터/인핸서(enhancer) 조합을 포함하는 외인성 핵산을 포함하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포를 제공하고, 여기에서 세포독성 단백질은 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포가 종양의 기질 조직에 근접하여 작용할 때 선택적으로 발현되는 것을 특징으로 한다.

[0012] 추가적으로, 본 발명의 실시예는 하기를 포함하는 레트로 바이러스 패키징(packaging) 세포에 직접적이다:

- 염증성 매개체(inflammatory mediator)에 의해 유도되는, 하기 (ii)에 작동 가능하게 연결된 세포독성 단백질을 암호화하는 부위 (ii) 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합을 포함하는 레트로 바이러스 벡터, 및

- 간엽세포 또는 CD34⁻ 줄기세포의 굴성(tropism)을 제공하는 바이러스 표면 단백질을 암호화하는 유전자.

[0015] 추가적으로, 또한, 레트로 바이러스 패키징 세포는 상시 패키징 세포로부터 위형 바이러스(pseudotyped virus)의 생산을 위한 구조 단백질 및 효소를 암호화하는 유전자를 포함한다.

[0016] 마지막으로, 본 발명은 (i) 하기 (ii)에 작동 가능하게 연결된 헤프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제를 암호화하는 부위 (ii) RANTES 프로모터를 포함하는 외인성 핵산을 포함하는, 유전적으로 변형된 인간 CD34⁻ 줄기세포를 제공한다.

본 발명의 상세한 설명

용어(Terms)

[0019] 본 명세서에서, 사용되는 이러한 용어들은 하기와 같이 제시되는 의미를 갖을 수 있다.

[0020] 본 발명에서 사용되는 세포는, 만일 상기 세포 또는 세포의 전구 세포(precursor cell)가 같은 종의 또 다른 개체에서 온 것이라면, 세포는 개체와 연관하여 "이종성(allogenic)"이다.

[0021] 본 발명에서 사용되는 세포는, 만일 상기 세포 또는 세포의 전구 세포가 같은 개체에서 온 것이라면, 세포는 개체와 연관하여 "자가성(autologous)"이다.

[0022] 본 발명에서 사용되는, "CD34⁻ 줄기세포"는 줄기세포의 표면에 CD34를 결핍시킨 줄기세포를 의미일 수 있다. CD34⁻ 줄기세포, 및 이를 분리하는 방법은, 예를 들어, Lange C. et al에서, 이식 및 재생 의학을 위한 동물 무혈청 배지에서 인간 중간엽 간질세포의 가속화되고 안정한 확장이라고 기재하고 있다. *J. Cell Physiol.* 2007,

Apr. 25 [Epub ahead of print].

[0023] 본 발명에서 사용되는, "세포독성 단백질(cytotoxic protein)"은 세포에, 세포 위에 제시하거나 또는 근접하였을 때, 직접적으로 및/또는 간접적으로 세포의 죽음에 원인이 되는 단백질을 의미한다. 세포독성 단백질은 예를 들어, 자살 단백질(예를 들어, HSV-tk) 및 세포자멸사(apoptosis) 유도물질을 포함한다. 세포독성 유전자는 유전자 낙다운(knockdown)(예를 들어, CCR5-/-)을 위한 공 유전자(null gene), siRNA 또는 miRNA를 포함한다. 자살 유전자 시스템(system)의 수는 동정되어 왔고, 허프스 심프렉스 바이러스 티미딘 키나아제(herpes simplex virus thymidine kinase) 유전자, 시토신 탈아미노화 효소(cytosine deaminase) 유전자, 수두-대상 포진 바이러스 티미딘 키나아제(the varicella-zoster virus thymidine kinase) 유전자, 니트로리덕테이즈(nitroreductase) 유전자, 대장균 gpt 유전자, 및 대장균 Deo 유전자를 포함한다. 시토신 탈아미노화 효소; 시토크롬(Cytochrome) P450; 푸린 뉴클레오시드 포스포릴라아제(Purine nucleoside phosphorylase); 카르복시펩티드분해효소(Carboxypeptidase) G2; 니트로리덕테이즈(Nitroreductase). Yazawa K, Fisher WE, Brunicardi FC에 상세히 있는 것과 같이: 암의 자살 유전자 치료에서 현재 진전이 있다. World J Surg. 2002 Jul; 26(7):783-9. 세포독성 인자는 하기를 포함한다: (i) 케모카인(chemokine) 및 무친 케모카인 GPI 결합(mucin chemokine GPI fusion)과 같은 호밍(homing) 인자(시약(agent)에서 유래된 케모카인은 조작된 줄기세포(engineered stem cell)의 직접적인 동원(recruitment)을 가능하게 하기 위해 사용될 수 있고, 예를 들어, 무친 결합이 GPI와 결합하는 것에 대하여, PCT International Application 번호. PCT/EP2006/011508를 참조하라.); (ii) 세포독성 단백질과 같은 바이러스 항원(viral antigen)(홍역, 수두); 및 (iii) her-2/neu 항체, 및 CD52 에피토프(epitope)에 반하여 유도된 CamPath® (Alemtuzumab)의 투여에 따라, 조작된 줄기세포의 표면에 제시될 수 있는 Her2/neu 항원.

[0024] 본 발명에서 사용되는, 핵산은 만일 상기 핵산이 세포 또는 임의의 세포의 전구 세포 내로 인위적으로 도입되고 있다면 세포에 관하여 "외인성(exogenous)"이다.

[0025] 본 발명에서 사용되는, 줄기세포는 만일 상기 줄기세포 또는 임의의 줄기세포의 전구 세포 둘 중 하나가 그들 내로 핵산을 인위적으로 도입한다면 "유전적으로 변형된(genetically modified)" 것이다. 유전적으로 변형된 줄기세포를 발생시키는 방법은 바이러스 또는 비바이러스 유전자 전이(transfer)의 사용을 포함한다(예를 들어, 플라스미드(plasmid) 전이, 과지 인테그라아제(phage integrase), 트랜스포슨(transposon), AdV, AAV 및 렌티바이러스(Lentivirus)).

[0026] 본 발명에서 사용되는, 개체의 혈류 내로 줄기세포를 "도입(introducing)"하는 것은, 주입을 통하여 개체의 정맥 또는 동맥 중 하나의 내부로 상기 세포를 도입하는 것을 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 예를 들어, 한번, 여러 번, 및/또는 하나 이상 또는 좀 더 확장된 기간으로 상기 투여(administering)는 수행될 수 있다. 1회의 주입이 바람직하지만, 초과하여 반복된 주입(예를 들어, 매일, 삼일 마다, 매주, 격주, 매달, 분기별로, 반년 마다 또는 1년 마다)은 몇몇의 경우에서 필요할 수 있다. 또한, 상기 투여는 바람직하게 줄기세포 및 약학적으로 허용가능한 운반체(carrier)의 혼합을 사용하여 수행될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 운반체는 당 업계에서 숙련된 것으로 잘 알려져 있고, 0.01 내지 0.1 M의 인산 완충액(phosphate buffer)을 포함하나 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 0.05 M의 안산 완충액 또는 0.8%의 염분(saline)이다. 추가적으로, 상기 약학적으로 허용가능한 운반체는 수용액 또는 비수용액, 혼탁액, 및 유화액이 될 수 있다. 비수용액의 예는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 및 올레인산 메틸(ethyl oleate)과 같은 주사 가능한 유기농 에스테르(organic ester)가 있다. 수용성 운반체(aqueous carrier)는 물, 알코올성/수용성 용액, 염분 및 완충 배지(buffered media)를 포함하는, 유화액 및 혼탁액을 포함한다. 비경구(parenteral) 대조군(vehicle)은 염화나트륨 용액, 링거의 텍스트로오스(Ringer's dextrose), 텍스트로오스(dextrose) 및 염화나트륨, 유산을 가한 링거 오일 및 고정된 오일을 포함한다. 정맥 대조군은 유체(fluid) 및 영양 보충물, 링거의 텍스트로오스와 같은 전해질 보충물, 링거의 텍스트로오스에 기초한 것들, 및 이와 유사한 것들을 포함한다. 정맥 내 투여에 보통 사용되는 유체는 예를 들어, 레밍턴(Remington)(34)에서, 발견된다. 또한, 보존제 및 다른 첨가제는 예를 들어, 항균제, 항산화제, 퀼레이트

시약, 불활성 기체, 및 이와 유사한 것들과 같은 것이 제시될 수 있다.

- [0027] "중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells)"(또한, "MSCs" 와 같이 언급함)은 결합 조직, 뼈, 연골, 및 순환계 및 림프계에서의 세포의 증가를 부여할 수 있다. 중간엽 줄기세포는 중간엽, 느슨하게 결합된, 방추 또는 성상 모양의 미분화된 세포로 구성되어 있는 배자내 배엽(embryonic mesoderm)의 부분에서 발견된다. 본 발명에서 사용되는, 중간엽 줄기세포는 CD34⁻ 줄기세포를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 하나의 실시예에서, 상기 MSCs는 Horwitz et al.49에서 다분화능 중간엽 간질세포로 정의된 플라스틱 부착 세포(plastic adherent cell)와 같은 섬유아세포(fibroblast)이다. 일مل의 의심을 피하기 위하여, 또한, 용어 "다분화능 중간엽 간질세포"는 중간엽 줄기세포 및 그들의 전구체(precursor)의 부차집단(subpopulation)을 포함하고, 상기 부차집단은 생체 내에서 특이적, 다수의 세포 유형 내로 분화할 수 있는 다분화능 자가-갱신 세포(pluripotent self-renewing cell)로 만든다.
- [0029] 본 발명에서 사용되는, "골수제거(myeloablation)"는 골수 세포의 극심한 또는 완전한 결핍이 예를 들어, 화학요법 또는 방사선 치료의 많은 양의 투여에 기인한다는 것을 의미할 수 있다. 골수제거는 표준 절차이고 예를 들어, Deeg(33)에 기재되어있다.
- [0030] 본 발명에서 사용되는, "핵산(nucleic acid)"은 DNA, RNA 및 그것의 혼성체를 포함하는 임의의 핵산 분자를 의미할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 핵산 분자를 형성하는 핵산염기(nucleic acid bases)는 그것의 파생물 뿐만 아니라 염기(bases) A, C, G, T 및 U가 될 수 있다. 상기 염기의 파생물은 당 업계에 잘 알려져 있고, PCR 시스템, 시약(Reagent) 및 소모품에 전형적으로 보여진다(Perkin Elmer Catalogue 1996-1997, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, N.J., USA).
- [0031] 본 발명에서 사용되는, 세포독성 단백질을 암호화하는 핵산 부위는 만일 프로모터(promoter) 또는 프로모터/인핸서(enhancer) 조합이 적절한 상황 아래 세포독성 단백질의 발현을 야기한다면 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합에 작동 "가능하게 연결"된다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는, "폴리펩티드(polypeptide)"는 아미노산 잔기의 중합체(polymer)를 의미한다. "펩티드(peptide)"는 전형적으로 좀 더 짧은 폴리펩티드를 언급하고(예를 들면, 10개의 아미노산 잔기), "단백질(protein)"은 전형적으로 좀 더 긴 폴리펩티드(예를 들면, 200개의 아미노산 잔기)를 언급한다. 상기 아미노산 잔기는 자연발생적으로 일어나거나 또는 그것의 화학적 유사체(chemical analogues)가 될 수 있다. 또한, 폴리펩티드는 당화(glycosylation), 지방 부착(lipid attachment), 황산화(sulfation), 히드록실화(hydroxylation), 및 ADP-리보실화(ADP-ribosylation)와 같은 변형을 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는, "근접하여(proximity with)"에서 조직은 예를 들면, 상기 조직의 1 mm 내, 상기 조직의 0.5 mm 내 및 상기 조직의 0.25 mm 내를 포함한다.
- [0034] 용어 "RANTES" 프로모터(promoter)는 여기에서 용어 "CCL5" 프로모터와 같은 뜻으로 사용된다.
- [0035]
- [0036] 본 발명에서 사용되는, 만일 세포독성 단백질이 개체에서 임의의 다른 환경에서 발현되는 것 이상으로 같은 환경에서 발현된다면, 상기 세포독성 단백질은 같은 것을 암호화하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포가 종양 기질 조직에 근접한 곳에서 작용할 때 "선택적으로 발현된"이다. 바람직하게, 상기 세포독성 단백질은 개체에서 임의의 다른 환경에서 발현되는 것 이상으로 적어도 10번 같은 환경에서 발현된다.

[0037] 본 발명에서 사용되는, "개체(subject)"는 인간, 비인간 영장류, 마우스, 랫트(rat), 기니아 퍼크(guinea pig) 또는 토끼와 같은, 임의의 동물을 의미할 수 있다.

[0038] 발명에서 사용되는, 장애로 고통받는 개체에 "치료(treating)"는 상기 질병의 진행을 천천히, 멈추는 것 또는 역전하는 것(reversing)을 의미할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서, 질병으로 고통받는 개체를 치료하는 것은 상기 질병의 진행을 역전하는 것을, 이상적으로 질병 자체를 제거하는 것에 초점을 두는 것을 의미한다. 본 발명에서 사용되는, 질병을 개선하는 것(ameliorating) 및 질병을 치료하는 것은 동등하다.

[0039] 본 발명에서 사용되는, "종양(tumor)"은 전립선암(prostate tumor), 췌장 종양(pancreatic tumor), 편평상피암(squamous cell carcinoma), 유방 종양(breast tumor), 흑색종(melanoma), 기저 세포암(basal cell carcinoma), 간세포암(hepatocellular carcinoma), 고환암(testicular cancer), 신경아 세포종(neuroblastoma), 다형성아교모세포종(glioblastoma multiforme)과 같은 신경교종(glioma) 또는 악성 성상세포종(malignant astrocytic tumor), 대장암(colorectal tumor), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 폐암(lung carcinoma), 난소종양(ovarian tumor), 자궁경부암(cervical tumor), 골육종(osteosarcoma), 횡문/평활근육종(rhabdo/leiomyosarcoma), 윤활막육종(synovial sarcoma), 혈관육종(angiosarcoma), 유잉육종/원시신경외배엽종양(Ewing sarcoma/PNET) 및 악성림프종(malignant lymphom)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 종양은 전이성 종양 뿐만 아니라 원 종양(primary tumor)을 포함한다(혈관성 및 혈관성이 아닌 것 모두).

[0040] 본 발명에서 사용되는, 세포는 만일 세포 또는 임의의 세포의 전구 세포가 다른 종의 또 다른 개체에서 온 것이라면 개체에 관하여 "이종(xenogenic)"이다.

[0041] 본 발명에 사용되는 용어 "종양의 기질 조직(tumor's stromal tissue)"은 섬유아세포(fibroblast)/근섬유아세포(myofibroblast), 아교세포, 상피 세포, 지방 세포, 혈관 세포, 평활 근육 세포, 및 면역 세포와 같은 다양한 세포를 포함하는, 종양 주변 및 근접한 결합, 구조 조직을 포함한다. 또한, 종양 기질은 세포 외 매트릭스(matrix) 및 세포 외 분자를 제공한다53.

[0042] 본 발명에서 사용되는 용어 "염증성 매개체(inflammatory mediators)"는 조직 손상 및 종양 성장 부위에서 작용하고, 조직 손상 및 종양 성장에 대하여 친(pro-) 및 항(anti-) 염증성 반응을 조절하는 면역 조절 분자(immune modulatory molecule)를 포함한다. 염증성 매개체의 제한이 없는 예는 사이토카인(cytokine), 및 에이코사노이드(eicosanoide)이다. 종양 세포 및 주변 간질 세포는 염증성 반응을 조정하는 친 염증성 사이토카인 및 프로테아제(protease)와 같은 다수의 친 염증성 매개체를 생산하는 것으로 알려져 있다. 상기 매개체의 예는 TNF- α 및 IL-6이다. 추가적으로, 종양 세포 및 간질세포는 예를 들어, 수지상 세포 성숙을 저해하는, TGF- β , IL-10 및 M-CSF와 같은, 항 염증성 분자의 분비를 통하여 면역 반응을 저해할 수 있다54.

본 발명의 실시예

[0044] 본 발명은 개체의 혈류 내로 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포의 치료적으로 유효한 수를 도입하는 것을 포함하는, 종양으로 고통받는 개체를 치료하는 방법을 제공하고, 여기에서 각 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포는 (i) 하기 (ii)에 작동 가능하게 연결된 세포독성 단백질을 암호화하는 부위(region) (ii) 프로모터(promoter) 또는 프로모터/인핸서(enhancer) 조합을 포함하는 외인성 핵산을 포함하고, 상기 세포독성 단백질이 상기 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포가 종양의 기질 조직에 근접하여 작용할 때 선택적으로 발현되는 것을 특징으로 한다.

- [0045] 치료된 개체는 임의의 동물일 수 있고, 바람직하게는 인간이다. 처리된 종양은 원(primary)이거나 또는 전이성일 수 있고, 혈관성이거나 또는 혈관성이 아닐 수 있다. 바람직하게, 상기 종양은 전이성이고 혈관성이 아니다. 상기 종양은 예를 들어, 전립선암(prostate tumor), 유방 종양(breast tumor), 췌장 종양(pancreatic tumor), 편평상피암(squamous cell carcinoma), 유방 종양(breast tumor), 흑색종(melanoma), 기저 세포암(basal cell carcinoma), 간세포암(hepatocellular carcinoma), 고환암(testicular cancer), 신경아 세포종(neuroblastoma), 다형성아교모세포종(glioblastoma multiforme)과 같은 신경교종(glioma) 또는 악성 성상세포종(malignant astrocytic tumor), 대장암(colorectal tumor), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 폐암(lung carcinoma), 난소종양(ovarian tumor), 자궁경부암(cervical tumor), 골육종(osteosarcoma), 횡문/평활근육종(rhabdo/leiomyosarcoma), 윤활막육종(synovial sarcoma), 혈관육종(angiosarcoma), 유잉육종/원시신경외배엽종양(Ewing sarcoma/PNET) 및 악성림프종(malignant lymphom)이 될 수 있다. 바람직하게, 상기 종양은 췌장암이다. 또 다른 바람직한 실시예에서, 처리된 종양의 기질 조직은 섬유아세포-유사 세포(fibroblast-like cell)를 포함한다.
- [0046] 중간엽 줄기 세포(Mesenchymal stem cell)는 다양한 근원으로부터 분리될 수 있다: 예를 들면, 골수(bone marrow), 제대혈(umbilical cord blood), (동원된) 말초혈 및 지방 조직⁴⁹. 추가적인 바람직한 실시예에서, 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포는 CD34⁻ 줄기세포이다. 추가적으로, 상기 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포는 개체와 연관하여 이종성, 자가성 또는 이종(xenogenic)일 수 있다. 유전적으로 변형된 줄기세포를 이용하는 즉각의(instant) 방법에서, 외인성 유전자는 즉, 상기 줄기세포가 (i) 표적 조직에서 적절한 세포에 근접하여 작용하였을 때, 표적 조직에서 (ii) 분화하거나, 또는 (iii) 적절한 세포가 용해하였을 때 "작동(trun on)"되어 발현된다.
- [0047] 본 발명에서, 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포의 도입은 바람직하게 골수제거(myeloablation)를 선행하거나, 동반하거나 또는 뒤따르지 않는다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 실시예는 종양으로 고통받는 개체를 치료하기 위한 임의의 방법에 사용하기 위한 중간엽 또는 CD34⁻ 줄기세포를 제공한다. 특히 상기 중간엽 또는 CD34⁻ 줄기세포는 염증성 매개체(inflammatory mediator)에 의해 유도되거나 세포독성 단백질을 암호화하는 부위의 전사(transcription)를 조절하는 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합을 포함할 수 있다. 상기와 같은 염증성 매개체는 종양 기질 조직에 의해 방출될 수 있으므로 중간엽 줄기세포에서 세포독성 단백질의 발현이 줄기세포가 상기 종양 기질 조직에 근접하여 작용할 때 유도될 수 있다. 상기 염증성 매개체는 예를 들어 TNF α 또는 IFN γ 와 같은, 사이토카인(cytokine)이 될 수 있다. 특히 프로모터는 RANTES 프로모터가 될 수 있고, RANTES 프로모터는 그 중에서도 TNF α 또는 IFN γ 에 의해 유도될 수 있다³⁵. 또한, 상기 RANTES 프로모터는 MSCs 분화의 맥락(context)에서 분화 신호에 의해 유도될 수 있다. 추가적으로 친 염증(pro-inflammation) 매개체에 의해 유도되는, 프로모터의 표본은 NF- κ B-반응 성분이고³⁶ IL1 β 또는 TNF α 에 의해 유도될 수 있는, 일반적인 프로모터에 있다³⁷.
- [0049] 추가적으로, 항-염증성 매개체(예를 들어, TGF-베타)에 의해 활성화되는 프로모터는 중간엽 줄기세포에서 세포독성 단백질을 표적 발현을 성취하기 위해 사용될 수 있다. 표본(example)은 Smad에 결합하는 성분을 포함하는 프로모터이다⁵⁵.
- [0050] 염증성 매개체에 의해 유도되는 프로모터를 사용하는 것은 혈관생성(angiogenesis)을 아직 겪고 있지 않은, 종양의 선택적인 치료를 가능하게 한다.
- [0051] 본 발명의 임의의 치료적 방법에 사용하기 위한 줄기세포는 추가적으로 (iii) 하기 (iv)에 작동 가능하게 연결

된 선택 표지 유전자(iv) 항시발현 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합을 포함할 수 있다. 상기 선택 표지 유전자는 퓨로마이신(Puromycin), 네오마이신(Neomycin) 또는 와베인(Ouabain)에 저항성을 부여하는 유전자와 같은, 항생제 내성 유전자(antibiotic resistance gene)를 포함할 수 있다³⁸. 상기 항생제 내성 유전자는 항생제의 제시 아래 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포를 선택하고 전위(potential)를 촉진시키는 그들의 종양 때문에 종양 치료에 사용될 수 없는, 변형되지 않은 중간엽 줄기세포를 억제하기 위하여 사용될 수 있다. 항생제 내성 유전자에 추가적으로 또는 대안적으로 표면 표지 단백질을 암호화하는 유전자가 사용될 수 있고, 상기 표면 표지 단백질을 암호화하는 유전자는 단지 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포의 표면에서만 발현된다. 표면 표지 단백질을 위한 제한이 없는 예는 CD34 및 CD24의 스플라이스 변형(splice variant)이다³⁹⁻⁴⁰. 상기 표면 표지 단백질을 인식하는 특이적 항체를 갖고 있는 자성 비드(magnetic bead)는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포를 선택하기 위하여 사용될 수 있다⁴¹.

[0052]

[0053] 선택 표지 유전자(selection marker gene)의 전사를 조절하는 항시발현 프로모터는 pCAG⁴², EF1 α⁴³, PGK⁴², CMV 및 SFFV⁴²와 같은 갖가지 다른 프로모터가 될 수 있다.

[0054]

게다가, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 줄기세포는(v) 세포독성 단백질을 암호화하는 부위와 선택 표지 유전자 사이에 위치한 절연인자 서열을 포함할 수 있다. 상기 절연인자 서열은 선택 표지 유전자의 항시발현 프로모터가 임의의 염증성 매개체의 결핍에 영향을 미치지 않고 세포독성 단백질을 암호화하는 부위의 전사를 "작동시키는(turn on)" 것을 보증할 수 있다⁴⁴.

[0055]

바람직하게, 프로모터 또는 프로모터/인핸서에 작동 가능하게 연결된 세포독성 단백질을 암호화하는 부위 또한 항시발현 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합에 작동 가능하게 연결된 선택 표지 유전자는 줄기세포 유전자 내로 통합된다. 이는 염색체 외 벡터를 갖는 유전적으로 변형된 줄기세포보다 좀 더 안정적인, 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포의 생산을 가능하게 한다.

[0056]

본 발명의 추가적인 실시예에서, 유전적으로 변형된 줄기세포는 추가적으로 줄기세포 유전자 내로 통합되는 프로바이러스(proviral) 서열을 포함하고, 여기에서 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합에 작동 가능하게 연결된 세포독성 단백질을 암호화하는 부위 및 항시발현 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합에 작동 가능하게 연결된 선택 표지 유전자는 프로바이러스 서열의 일부이다. 특히 레트로 바이러스과(Retroviridae)의 군(family)으로부터 온 바이러스는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포를 안정적이게 하기 위하여 사용될 수 있다. 레트로 바이러스의 표본은 렌티 바이러스(lentiviral), 알파-레트로 바이러스(alpha-retroviral) 또는 감마-레트로 바이러스(gamma-retroviral)이다.

[0057]

하기에서, 두 개의 기능 단위(functional unit)를 갖는 이식유전자 카세트(cassette)를 포함하는 레트로 바이러스 벡터는 (도 6)에 기재될 것이다. 상기 두 개의 기능 단위는 다음과 같다:

[0058]

1. 생체 내(in vitro) 선택: 세포의 항시발현 프로모터(예를 들어, CAG-프로모터) 또는 항생제 내성 유전자(예를 들어, 퓨로마이신-내성 유전자)와 같은 선택 표지 유전자에 연결된 바이러스 기원 또는 자성 비드-분리에 적합한 표면 표지 유전자(예를 들어, CD34).

[0059]

2. 방관자 사멸(By-stander killing): 세포의 유도 종양-특이적 프로모터 또는 세포독성 단백질을 암호화하는 부위(예를 들어, 허프스 심플렉스 바이러스 티미딘 카나아제(Herpes simplex Thymidine kinase)의 부호화(coding))에 연결된 바이러스 기원(예를 들어, RANTES 프로모터)

- [0060] 선택적으로, 기능 단위는 두 개의 프로모터 사이에서 프로모터 간섭을 예방하기 위한 절연인자 서열에 의해 분리될 수도 있다.
- [0061] 상기에 기재된 이식유전자 카세트는 레트로 바이러스로부터 유래된 바이러스성 벡터와 같은, MSC에서 전달 및 안정인 발현을 위한 다양한 바이러스 및 비바이러스 벡터 시스템 내로 통합될 수 있다.
- [0062] MSC의 유전자 변형을 위한 레트로 바이러스 벡터는 알파-, 감마-레트로 바이러스 또는 (인간 및 비-인간) 렌티 바이러스로부터 유래될 수 있다. 레트로 바이러스 벡터 시스템은 관심 있는 이식유전자, 즉 세포독성 단백질을 암호화하는 부위를 운반하는, 전이 벡터 백본(backbone) 및 gag-유전자 pol-유전자 및 env-유전자와 같은, 대부분 또는 모든 바이러스 유전자는 전혀 없는, 역 전사 및 벡터 DNA의 통합에 필요한 모든 서열 성분을 포함한다. 레트로 바이러스 벡터의 최신의 발생은 특이적이고 안정한 변형을 수반할 수 있다: SIN(self-inactivating) 벡터라 불리는 것들에서 3' U3-부위는 바이러스 프로모터 활성을 정지하고 숙주 세포 유전자에서 근처 유전자의 전사촉진(transactivation)을 예방하기 위하여 부분적으로 또는 완전히 제거된다⁵⁰.
- [0063] 벡터 입자의 생산을 위하여 보조 플라스미드의 변동 수는 인 트랜스(*in trans*)에 있는 구조 단백질, 효소 및 외피 단백질을 제공하는 것에 요구된다⁵⁰. 바이러스 입자는 이종 외피 당단백질(foreign envelope glycoprotein)을 운반하는 것을 만들어낼 수 있다. 상기 과정을 가성형태화(pseudotyping)라 부른다. 이것은 벡터 입자의 굴성을 바꾸는 것 및 몇 가지 경우에서 벡터 적정량을 향상시키는 것을 가능하게 한다.
- [0064] 상기에 기재된 이식유전자 카세트는 표준 분자 생물학 방법을 사용하여 SIN-레트로 바이러스 벡터 백본 내로 삽입될 수 있고 표준 방법에 따른 바이러스 입자를 생산할 수 있다⁵⁰.
- [0065] 도 7은 도 6에 묘사된 언급된 이식유전자를 운반할 수 있는, 알파- 및 감마-레트로 바이러스 및 렌티 바이러스 벡터 컨스트럭트의 전형적인 개요를 보여준다.
- [0066] 이것은 LCMV GP(Lymphocytic choriomeningitis virus), VSV-g(vesicular stomatitis virus), RD114-TR 또는 GALV env(gibbon ape leukemia virus)의 당단백질과 발현 벡터 입자를 위형화 하는데 계획되어 있다.
- [0067] 중간엽 줄기세포의 유전자 변형을 위한 또 다른 대안적인 방법은 화학적(예를 들어, 리포펙타민(Lipofectamin)) 또는 물리적(예를 들어, 전기 천공법(electroporation)) 형질전환(transfection)이다. 후에 형질전환된 세포는 상기에 기재된 것으로서 안정적으로 형질도입된 MSC를 선택하기 위하여 선택될 수 있고, 여기에서 이식유전자 카세트는 중간엽 줄기세포 유전자 내로 우연히 통합되고 있다.
- [0068] MSC의 유전적인 변형을 위한 또 다른 대안은 트랜스포손(transposon)으로부터 유래된 비바이러스 벡터 시스템을 이용하는 것이다. 최종 역위 반복(inverted repeat)으로 상기에 기재된 발현 카세트의 인접 flanking 후에, 컨스트럭트(construct)는 형질전환을 통하여 MSC 내로 전이될 수 있다. 만일 Sleeping Beauty⁵¹ 또는 Piggybac⁵²과 같은 유전자전위효소(transposase)가 형질전환 동안 인 트랜스(*in trans*)에서 발현된다면, 상기 발현 카세트는 상기 MSC의 유전자 내로 안정적으로 통합될 것이다.
- [0069] 본 발명의 몇몇의 실시예에 따른 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포는 그들의 표면에서 이질적인 당단백질을 발현하는, 위형 바이러스와 함께 고유(native) 중간엽 줄기세포의 형질도입(transduction)으로 준비될 수 있고, 바이러스의 굴성 및 종종 적정량을 바꾼다.

- [0070] 위형 바이러스는 하기를 포함하는 레트로 바이러스 패키징 세포의 도움으로 발생될 수 있다:
- [0071] - 염증성 매개체에 의해 유도되는, 하기 (ii)에 작동 가능하게 연결된 세포독성 단백질을 암호화하는 부위 (ii) 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합을 포함하는 레트로 바이러스 벡터, 및
- [0072] - 간엽세포 또는 CD34⁻ 줄기세포의 굴성(tropism)을 제공하는 바이러스 표면 단백질을 암호화하는 유전자.
- [0073] 추가적으로 레트로 바이러스 패키징 세포는 또한 구조 단백질을 암호화하는 유전자 및 gag-유전자, pol-유전자 및 env-유전자와 같은, 패키징 세포로부터 위형 바이러스의 생산을 위한 효소를 포함하고, 이는 위형 바이러스의 집합을 가능하게 한다.
- [0074] 바람직하게 구조 단백질 및 효소를 암호화하는 상기와 같은 유전자는 바이러스를 생산하기 위하여 중간엽 줄기 세포 또는 CD34-줄기세포의 굴성을 제공하는 바이러스 표면 단백질을 암호화하는 유전자 보다 다른 벡터에 위치하고, 이것은 점염되지만 복제는 가능하지 않다. 상기 위형 바이러스는 (ii) 프로모터 또는 프로모터/인핸서 조합에 작동 가능하게 연결된 세포독성 단백질을 암호화하는 부위를 갖고 바이러스 표면 단백질을 발현한다. 보통 상기 위형 바이러스를 포함하는 레트로 바이러스 패키징 세포(packaging cell)의 상청액은 중간엽 줄기세포의 형질도입에 사용될 수 있다.
- [0075] 중간엽 줄기세포 또는 CD34⁻ 줄기세포(가성형태화)를 위한 굴성을 제공하는 바이러스 표면 단백질을 암호화하는 유전자는 LCMV GP(Lymphocytic choriomeningitis virus)⁴⁵, VSV-g(vesicular stomatitis virus)⁴⁵, RD114-TR⁴⁶ 또는 GALV env(gibbon ape leukemia virus)⁴⁷와 같은 광범위한 숙주(host) 굴성을 부여하는 온갖 종류의 당단백질이 될 수 있다.
- [0076] 상기에 이미 언급된 것으로서, 프로모터 또는 프로모터/ 인핸서 조합은 사이토카인 또는 다른 염증성 매개체에 의해 유도될 수 있다. 바람직한 실시예에서 상기 프로모터는 RANTES 프로모터이다. 또한, 레트로 바이러스 패키징 세포는 추가적으로 유전자 및 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0077] 특히 본 발명의 또 다른 실시예에서, 이상적으로 세포독성 단백질은 허프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제(Herpes simplex viral thymidine kinase)이고, 이상적으로 개체는 어느 정도의 허프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제에 간시클로비르(ganciclovir) 세포독성을 주기 위하여 간시클로비르로 처리된 것이다. 간시클로비르 및 이것의 사용 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다. 또 다른 가능성은 5-플루오로시토신(fluorocytosine)을 독성 화합물 5-플루오루어릴(fluorouracil)로 전환하는, 세포독성 단백질로서 시토신 탈아미노화 효소(cytosine deaminase)의 사용이다⁴⁸.
- [0078] 본 발명에서, 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포의 치료적으로 유효한 수는 제한 없이, 하기 양 및 양의 범위를 포함한다: (i) 약 1×10^5 내지 약 1×10^9 세포/kg 체중; (ii) 약 1×10^6 내지 약 1×10^8 세포/kg 체중; (iii) 약 5×10^6 내지 약 2×10^7 세포/kg 체중; (iv) 약 5×10^6 내지 약 1×10^7 세포/kg 체중; (v) 약 1×10^7 내지 약 2×10^7 세포/kg 체중; (vi) 약 7×10^6 내지 약 9×10^6 세포/kg 체중; (vii) 약 1×10^5 세포/kg 체중; (viii) 약 1×10^6 세포/kg 체중; (ix) 약 5×10^6 세포/kg 체중; (x) 약 1×10^7 세포/kg 체중; (xi) 약 6×10^6 세포/kg 체중; (xii) 약 7×10^6 세포/kg 체중; (xiii) 약 8×10^6 세포/kg 체중; 및 (xiv) 약 9×10^6 세포/kg 체중. 구상된 인간 체중은 제한 없이, 약 50 kg, 약 60 kg; 약 70 kg; 약 80 kg; 약 90 kg; 및

약 100 kg을 포함한다. 상기와 같은 수는 MSCs의 이식에서 준-임상학 동물 실험 및 표준 프로토콜에 기초하였다.

[0079] 또한, 본 발명은 유전적으로 변형된 CD-34⁻ 줄기세포의 약 5×10^6 내지 약 2×10^7 세포/kg 체중의 수로 개체의 혈류 내로 도입하는 것을 포함하는 체장 종양으로 고통받는 인간 개체를 치료하기 위한 방법을 제공한다, 여기에서 (a) 각 유전적으로 변형된 CD-34⁻ 줄기세포는 (i) 하기 (ii)에 작동 가능하게 연결된 허프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제(Herpes simplex viral thymidine kinase)를 암호화하는 부위 (ii) RANTES 프로모터를 포함하는 외인성 핵산을 포함하고, (b) 상기 개체는 어느 정도의 허프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제에 간시클로비르(ganciclovir) 세포독성을 주기 위하여 간시클로비르로 처리되고, (c) 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포의 도입은 골수제거(myeloablation)를 선행하거나, 동반하거나 또는 뒤따르지 않는 것이다. 상기의 방법에서, 상기 종양은 바람직하게 전이성이고, 혈관성이거나 또는 혈관성이 아닐 수 있다. 추가적으로, 상기 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포는 개체와 연관하여 이종성, 자가성 또는 이종일 수 있다.

[0080] 추가적으로 본 발명은 (i) 하기 (ii)에 작동 가능하게 연결된 세포독성 단백질을 암호화하는 부위(region) (ii) 프로모터(promoter) 또는 프로모터/인핸서(enhancer) 조합을 포함하는 외인성 핵산을 포함하는 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포를 제공하고, 여기에서 세포독성 단백질은 유전적으로 변형된 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)는 종양의 기질 조직에 근접하여 작용하였을 때 선택적으로 발현된다. 바람직하게, 상기 중간엽 줄기세포는 인간 CD34⁻ 줄기세포이다. 또한, 바람직하게는 RANTES 프로모터를 포함하는 외인성 핵산이고, 여기에서 세포독성 단백질은 허프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제인 것을 특징으로 한다.

[0081] 마지막으로, 본 발명은 (i) 하기 (ii)에 작동 가능하게 연결된 허프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제를 암호화하는 부위 (ii) RANTES 프로모터를 포함하는 외인성 핵산을 포함하는, 유전적으로 변형된 인간 CD34⁻ 줄기세포를 제공한다.

[0082] 본 발명에서 사용된 다양한 단백질 및 조절 서열은 당 업계에 종사하는 기술자에 의해 쉽게 획득될 수 있다. 예를 들어, 상기 RANTES 프로모터는 (22)에서 밝혔고 보통의 기술의 사용에 의해 획득될 수 있다. HSV TK - V00467 허프스 유전자는 티미딘 키나아제(ATP:티미딘 5' 포스포트란스페라아제(phosphotransferase), e.c. 2.7.1.21) (유형 1 균주(strain) CL101)에 사용될 수 있다.

[0083] 본 발명은 하기에 있는 실험의 세부사항(Experimental Detail)과 관련한 것에 의해 좀 더 이해될 수 있지만, 당 업계에 숙련된 것들은 세부적인 특이적 실험이 하기에 따른 청구항에 좀 더 충분히 기재되는 것과 같이 단지 본 발명의 실례가 된다는 것을 손쉽게 인식할 수 있다.

0084] 실험의 세부사항(Experimental Details)

0085] 개요(Synopsis)

[0086] 목적: 체장암 기질에 직접적인 조작된 중간엽 줄기세포에 기초한 치료의 효율성을 분석하기 위한 것이다.

[0087] 배경 데이터 요약(Summary Background Data): 중간엽 줄기세포(MSC)를 중간엽 줄기세포가 종양 성장 및 전이를 향상시키는 곳인 종양 기질에서 적극적으로 모집하였다. 상기 종양 기질 내에서 MSCs에 의한 화학주성 사이토카인 CCL5의 고조절은 이 과정에서 가장 중요한 역할을 한다는 것을 보여주고 있다. 쥫파(murine)의 MSCs는 리

포터 유전자 또는 CCL5 프로모터의 조절 아래 치료적 유전자를 발현하기 위하여 조작되었고 성장하는 췌장 종양을 마우스 내로 양자 전이시켰다. 그런 다음 종양 성장 및 전이의 영향을 평가하였다.

[0088] 방법: C57/B16 p53(-/-) 생쥐(mice)의 골수에서 분리한 MSCs를 적색 형광 단백질(Red Fluorescent Protein; RFP), 증진된 녹색 형광 단백질(enhanced Green Fluorescent 단백질; eGFP) 또는 RANTES 프로모터에 의해 작동되는 허프스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus; HSV) 티미딘 키나아제(thymidine kinase; tk) 유전자를 안정적 형질전환(stable transfection)시켰다. 정위(orthotopic), 공통 유전자 췌장의(syngeneic pancreatic) Panc02 종양을 갖고 있는 마우스에게 3주 동안 1주일에 한번씩 MSCs를 정맥내로 주입하였다.

[0089] 결과: CCL5 프로모터에 의해 작동되는 eGFP 및 RFP 신호는 처리된 췌장 종양 시료(sample)에서 형광에 의해 검출되었다. 줄기세포 적용 5-7일 후 전구약물 간시클로비르(GCV)를 사용하여 i.p(복강내로) 처리된 상기 HSV-tk 치료법 군은 원 췌장 종양(primary pancreatic tumor) 성장의 50%를 감소시켰고($p<0.0003$, student's t-test), 간 전이(liver metastases)를 감소시켰다(30% vs. 100%).

[0090] 결론: 원 췌장 종양 기질부위로 MSCs의 활성화된 호밍(homing) 및 RANTES 프로모터의 활성화는 eGFP- 및 RFP-리포터 유전자를 사용하여 확인되었다. 간시클로비르의 제시하에, HSV-tk가 형질전환된 MSCs는 원 췌장 종양 성장의 감소 및 전이 발생(incidence)의 유의적 감소를 야기하였다.

[0091] 재료 및 방법(Materials and Methods)

[0092] 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cells)

[0093] 기재된 것으로서 p53 표적 결실(targeted deletion)과 동종(homozygous)인 C57BL/6 마우스의 골수로부터 중간엽 줄기세포를 분리하였다¹⁵. 상기 세포를 세포 배양하에 부착하고 지속적으로 성장시켰다. 서브클로닝(subcloning) 후, 단일 세포 클론을 선택하고 특징화하였다¹⁵. 상기 세포를 CCL5 프로모터와 연결된 적색 형광 단백질(red fluorescent protein; RFP), 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein; eGFP) 또는 HSV 티미딘 키나아제(HSV thymidine kinase)로 형질전환시켰다. 상기 프로모터 서열은 상위 부위(upstream region)의 -972 및 완전 5' 비번역 부위(complete 5' untranslated region)를 사용하였다¹⁸. 또한, 모든 벡터는 CMV가 조절된 Bsr2 블라스티시딘 내성 유전자(CMV-controlled Bsr2 Blasticidin resistance gene)를 포함한다. 블라스티시딘을 5 μ g/ml의 농도로 형질전환된 세포를 선택하기 위해 사용하였다. 생쥐에 주입하기 전에, 상기 세포를 배양 플라스크로부터 분리시키고, PBS로 두 번 세척해주고, PBS로 다시 혼탁시켰다.

[0094]

[0095] 변형된 보이든 챔버(Boyden Chamber) 분석

[0096] 시험관내(in vitro) 직접적인 MSC 이동을 변형된 보이든 챔버 분석을 사용하여 수행하였다¹⁵. 줄기세포를 Panc02 공통 유전자(syngenic) 췌장암 세포 상층액의 내려가는 농도(descending concentration)에 반하여 이동 시켰다.

[0097] 정위(orthotopic) 췌장암(Pancreatic Carcinoma) 모델

[0098] C57BL6 생쥐를 잭슨 연구실(Jackson Labs)로부터 수득하였다. 모든 동물 실험을 바바리아주의 동물 권리 위원회

회(animal rights commission of the state of Bavaria)의 적절한 허가하에 수행하였다. 평균 체중이 20g정도의 두 달 내지 세 달된 C57BL/6 생쥐를 Panc02(C57BL/6 마우스와 공통 유전자) 췌장 종양(pancreatic tumor) 이식을 위해 사용하였다. 상기 생쥐를 케타민(Ketamine, 체중 kg 당 100 mg), 자일라진(Xylazine, 체중 kg 당 5 mg) 및 아트로핀(Atropine)을 사용하여 마취시켰다. 마우스의 좌측 측면에 수술 위치를 소독된 방법으로 베고 준비하였다. 왼쪽 측면에 1 cm 절단부위를 사용하여, 췌장을 노출시켰다. 보정된 누르기 버튼 장치(calibrated push-button device, Hamilton Syringe Company, USA) 및 30 G 바늘을 사용한 1 ml 주사기(모두 BD Biosciences, Spain)를 40 μ l PBS 용액에 있는 150,000 개의 Panc02 췌장 암세포를 췌장으로 주입하기 위하여 사용하였다. 복강으로 췌장 암세포가 흘러나오는 것을 확실히 하기 위해 주의를 기울였다. 마지막에, 상기 바늘을 췌장으로부터 빼낸 후, Q-팁(Q-tip)으로 1분 동안 주입 위치를 살짝 눌러주었다. 종양 세포의 주입 후 복막 및 피부를 4-0 프로렌(prolene, Braun AG, Germany)의 단속봉합으로 닫았다. 상기 과정 2 주 후에, 모든 마우스는 감지할 수 있는 종양을 성장시켰고, 각각의 실험 군에 대하여 무작위 선정되었다. A 군은 줄기 세포 또는 간시클로비르를 주입받지 않았고, B 군은 변형되지 않은 줄기세포를 받았으며, C 군은 C57BL/6 p53/-/CCL5/HSV-tk+ 중간엽 줄기세포 및 GCV 주입을 받았고, D 군은 C57BL/6 p53/-/CCL5/RFP+ 중간엽 줄기세포를 받았고, E 군은 C57BL/6 p53/-/CCL5/eGFP 중간엽 줄기세포를 받았다. 모든 줄기 세포 주입은 주마다 0.5×10^6 세포의 용량을 꼬리 정맥을 통해 주입하였다. C 군의 GCV(Cymeven®, Roche, Germany) 주입은 줄기 세포 주입 5 내지 7일 후 1.5 mg의 용량으로 복강 내(i.p) 주입을 적용하였다. 모든 마우스를 처리 3 주기(cycle) 후에 희생시켰고 상기 종양을 분리하여 무게를 측정하였다. 통계학적 유의성을 위해 각 시료에서 홀 양방적 t-테스트(unpaired two-tailed t-test)를 사용하여 수행하였다.

[0099] 형광 현미경(Fluorescence Microscopy)

[0100] 조직-Tek O.C.T.(Miles Inc. USA)에서 췌장 종양의 조직 시료를 끼워넣고 액체 질소에서 순간 냉동(snap-frozen)을 시켰다. 5 μ m 두께의 크라이오절단부위(Cryosections)를 수득하였다. DAPI 핵 염색 용액(Vectashield “Hard set mounting medium with Dapi”, USA)을 절단 절편(section)에 첨가하고 그들을 즉시 GFP 또는 RFP 형광 신호를 측정하였다. AxioCam MR 현미경 카메라를 사용하여 사진을 수득하였고 상이한 형광 채널의 사진은 소프트웨어 포토샵(Photoshop®, Adobe, USA)을 이용하여 덮어씌웠다.

[0101]

[0102] MSC 주입 및 간시클로비르(Ganciclovir) 처리

[0103] 주입 이전에, 상기 세포를 세어 1×10^6 세포/ml PBS의 최종농도가 되도록 희석하였다. 간시클로비르(GCV)(Cymeven; Roche)를 10 mg/ml의 농도가 되도록 H2O(aqua ad iniecatibilia)에 용해시켰다. 세포 혼탁액을 26 G 바늘을 사용하여 꼬리 정맥으로 주입하였고 약물을 복강내로(intraperitoneal) 주입하였다. 처리는 첫날(day 1)에 0.5 ml 세포(500,000개의 세포)의 주입으로 시작하였다. 5 내지 7일째, 간시클로비르를 매일 60 μ g /g BW의 용량, 예를 들면, 하나의 생쥐에 25 g BW를 갖는 150 μ l로 주입하였다. 7일 후, 처리 주기를 절개될 때까지 반복하였다. 상기 처리 동안 종양 진행과 행동을 기록하였다.

[0104] 조직 및 종양 준비

[0105] 절개 후에, 모든 종양을 따로 준비하였다. 각 종양의 1/3을 포름알데히드(formaldehyd)로 고정하였고 파라핀 왁스(paraffin wax)에 끼웠고, 추가적인 세 번째를 냉동시켰다. 후에 RNA 분리 및 qRT-PCR 분석을 위해 마지막 세 번째를 제조사의 지시사항에 따라 RNAlater 용액(Ambion)에 보존하였다.

[0106] 면역조직화학(Immunohistochemistry)

[0107] 면역조직화학(immunohistochemistry)은 이전에 기재된 것으로서, 5 μm 절편에서 수행하였다²⁰. 1차 항체로서, 다클론 토끼 항-RFP 항체(Mbl Medical and Biological Laboratories, Japan)를 차단 용액(blocking solution, milk+superblock)에서 1:50으로 희석하였다. 2차 항체로서, 다중 바이오틴화된 염소 항-토끼(Linaris, Wertheim-Bettingen, Germany) 항체를 상기 차단 용액에 1:300으로 희석하였다.

[0108] 결과(Results)

[0109] 췌장 종양(Pancreatic Tumor)에 MSCs의 동원(Recruitment)

[0110] 공통 유전자(syngeneic), 정위(orthotopic) 쥐과(murine)의 췌장 종양은 C57B1/6 마우스 배경에서 이전에 밝혔다.^{31,32} 종양 세포는 췌장 성장의 캡슐(capsule) 아래 심었고 극심한(profound) 종양 혈관구조(vasculature)를 보였다(도 1a 및 1b). P53(-/-)의 골수로부터 분리된 CD34-MSCs를 표적 종양 기질의 조작된 MSCs의 효율성을 평가하기 위해 사용하였다.^{15,16,21}

[0111] 첫 번째로 Panc02 종양의 MSC의 일반적인 굴성을 평가하기 위하여, 변형된 보이든 챔버(Boyden chamber) 분석을 종양에서 유래된 인자를 향한 C57B16 MSC의 유도된 이동을 연구하기 위하여 사용하였다. 결과는 조건된 종양 성장 배지의 증가하는 수준에 대하여 MSC의 농도 의존적인 이동을 밝혔다(도 2).

[0112] 세포를 CMV 프로모터의 조절 아래 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP)을 포함하는 플라스미드로 조작하였다. 일주일에 한 번, 500,000개의 세포를 췌장 종양을 성장시키기 위해 마우스 내의 정맥 내로 주입하였다. 5주 후에, 상기 마우스를 희생시켰고 종양을 GFP의 발현을 위해 제거하였고 분석하였다. 결과는 강한 GFP의 발현이 종양과 연관되었다는 것을 밝혔다(도 3의 A). 또한, 상기 세포를 이차 비장(spleen), 림파절(lymph node), 흉선(thymus), 피부 및 내장(데이터는 보이지 않았고 (15))에의 이동에서 발견하였다. 이것은 상기 성장하는 종양에서 체계적으로 주입된 줄기세포의 호밍(homing)을 증명하였다. 또한, 성장하는 췌장 종양을 가진 C57B16 마우스 내로 MSC의 정맥 내의 주입은 종양 성장의 유의적 증가를 야기하였다(도 3의 B).

[0113] 또한, 간, 비장, 및 복막(peritoneum)에서 정맥 내에 적용된 MSC 전이의 영향을 평가하였다. MSCs의 적용은 복막에서 전이를 유의적으로 증가시킨 것을 밝혔다(표 1).

[0114] CCL5 프로모터는 종양 기질에서 리포터 유전자 발현을 작동한다.

[0115] 발명자들은 CCL5 프로모터를 사용하여 종양 기질에 MSC 동원의 맥락에서 리포터 유전자의 좀 더 조절된 발현을 만드는 것의 가능성을 분석하였다. 이를 위해서, P53(-/-) MSC C57/B16 세포 라인(line)을 CCL5 프로모터 조절 아래 RFP 및 eGFP 리포터 유전자로 조작하였다.^{18,22} 상기 CCL5 프로모터는 조직 스트레스 또는 손상의 맥락에서 일반적으로 다양한 조직 유형에서 활성화한다.²³⁻²⁷ 번역의 시작에서 직접적인(immediate) -972 업스트림(upstream) 뉴클레오타이드(nucleotide) 및 5' 완전 비번역 부위는 벡터에서 eGFP 또는 RFP의 업스트림을 클로닝하였다.

- [0116] 결과로 생긴 CCL5-eGFP 또는 RFP가 안정적으로 조작된 MSCs는 FACS를 통하여 리포터 발현의 약하지만 검출 가능한 수준을 보였다(데이터는 보이지 않았음). 상기 세포(500,000 개의)를 체장 종양이 성장하고 있는 마우스의 말초 순환 내로 21일 동안 매 8일 마다 주입하였다.
- [0117] 3주 후 상기 마우스를 희생시켰고 상기 종양 및 주변 조직을 형광 현미경 및 면역조직화학으로 RFP 및 eGFP 리포터 유전자의 발현을 분석하였다. 결과는 성장하고 있는 종양에서 RFP 및 GFP 형광의 수준을 밝혔다(도 4의 A 및 B). 좀 더 나은 형태로 조직 시료에서 RFP 발현을 측정하기 위하여, 포름알데히드로 고정된 시료를 조직면 역화학으로 RFP 단백질 발현을 테스트하였다. MSC를 발현하는 RFP를 종양 기질 전반에 걸쳐 검출하였다(도 4의 C, D 및 E).
- [0118] 조작된 MSCs(Engineered MSCs)에서 치료적 양식으로서 HSV-tk의 사용
- [0119] 실험의 다음 단계에서, CCL5 프로모터를 사용하는 치료적 유전자의 전달을 평가하였다. 이를 위해서, 헤프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제 (HSV-Tk)²⁸의 유전자를 CCL5 프로모터 뒤에 클로닝하였다(도 5a).
- [0120] 0.5×10^6 CCL5-tk가 조작된 MSCs를 주입한 후, 상기 세포를 성장하고 있는 종양 기질에 동원하기 위하여, tk 유전자의 분화 및 그 후 발현을 하게 하기 위하여 3일을 주었다. 마우스는 3일 동안 매일 마다 1.5 mg GCV의 복강 내의 주입을 구성하는 치료의 진행(course)을 받았다. 상기 마우스에 조작된 줄기세포를 다시 주입하였고, 주기(cycle)를 실험기간 동안 반복하였다(도 5b). 36일 후, 상기 동물을 희생시켰고 종양 성장을 평가하였다(도 5c 및 d). 결과는 MSC(CCL5-RFP MSC and CCL5-eGFP MSC)의 처리 또는 조절을 받지 않은 종양이 있는 동물을 조절하는 것과 비교하여 GCV가 잇는 치료적 CCL5/HSV-Tk 줄기세포 컨스트럭트를 받은 마우스의 군에서 종양 부피의 유의적 감소를 밝혔다. 도 5c는 실험의 완성에서 잘라낸 대표적 종양을 보여준다. 종양의 무게는 처리되지 않은 또는 처리된 대조군 동물과 비교하여 종양 무게에서 통계적으로 유의적인 감소를 보였다.
- [0121] 추가적인 지표(parameter)로서, 간, 비장 및 복막(peritoneum)에서 처리의 맥락에서 전이를 분석하였다. MSC의 투여가 복막에서 전이의 수를 증가시킨 반면, GCV의 처리는 비장 및 간에서 전이의 유의적 감소를 야기하였다 (양방적 피셔 직접 테스트(two-tailed Fisher's exact test))(표 2). 전이는 비장, 간, 및 복막 상기 장소에서의 조사 및 각각의 기관의 촉진에 의해 평가되었다.
- [0122] 논의(Discussion)
- [0123] 중간엽 줄기세포는 종양 기질에서 적극적으로 모집되었고 거기에서 중간엽 줄기세포는 종양 성장의 다양한 양상에 기여한다. MSC는 종양 혈관의 기원세포(progenitor cell)로서 기능할 수 있고 또한, 간질-섬유아세포-유사세포의 발생에 기여하는 것으로 보인다. 종양 성장 및 전이에서의 가능성에서 종양에 연관된 간질세포의 특이적 영향은 현재 연구의 주제(issue)이다. 유방-암(mamma-carcinoma) 모델의 준임상적인 연구에서, 이것은 종양 기질 내에서 중간엽 줄기세포(MSC)가 사이토카인 CCL5의 증가된 수준을 생산한다는 것을 보여주었다. CCL5의 분비는 폐 전이의 좀 더 높은 발생 정도를 이끈다.
- [0124] 또한, CCL5 분비는 체장 샘방주위 근섬유아세포(pancreatic periacinar myofibroblast)에서 분화적으로 조절되고, 체장에서 염증 세포의 침입 및 축적을 조정하는 것에서 상기 세포의 역할을 제안한다.²⁹ 체장 암, 체장염 (pancreatitis)이 있는 환자 중 하나는 CCL5 프로모터에서 다형성(polymorphism)과 유의적으로 연관되어왔다.³⁰ 여기에서 상기 일은 전이 뿐만 아니라 원 종양 성장에 종양 기질의 맥락에서 자살 유전자의 선택적인 전달을 위한 치료적 대조군(vehicle)으로서, 조작된 MSCs의 사용을 평가하였다.

[0125] MSCs을 조직 특이적 발현을 위한 CCL5 프로모터의 조절 아래 헤프스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus, HSV) 티미딘 키나아제(thymidine kinase, TK)를 발현시키기 위해 조작하였다. MSCs를 헤프스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제(tk)를 이용하여 형질전환하였고 MSCs는 좀 더 조직 특이적 유전자 발현을 위한 CCL5 프로모터의 조절 아래 있다. Tk는 방관자 효과를 통하여 형질도입된 세포 및 근처의 종양 세포를 죽이는 독성을 발생시키는, 간시클로비르(GCV)를 인산화한다. 간시클로비르가 있는 HSV-TK 유전자 치료는 자살 유전자 치료를 위해 널리 사용되는 계획의 기본을 형성한다.¹⁷

[0126]

[0127] 고형 종양이 순환하는 기원(circulating progenitor)에서 강한 호밍(homing) 작동(drive)을 가하고, 상기 종양 환경은 이러한 접근을 이용하여 효율적으로 표적되었다. 자살 유전자의 CCL5 프로모터에 의해 작동되는 조직 특이적 유전자 발현에 더하여 대조군(vehicle) 줄기세포의 이러한 표적화는 높은 효율성 및 낮은 부작용 프로파일 모두를 이끈다. 게다가, 골수로부터 유래된 MSC는 암 환자 자신으로부터 수득될 수 있다. 이것은 골수체거 및 골수 이식의 요구성 없는 쉬운 정맥 투여를 통하여 자살 유전자의 특이적 전달을 가능하게 할 수 있었다.

[0128]

준임상적인 연구에 기초한 췌장암 치료 계획은 환자 생존을 유의적으로 확대하는 것에서 성공하지 못했다. 진단할 때에, 국소 질병이 있는 췌장암으로 고통받는 환자의 단지 20%가 수술이 가능하다. 환자의 40%는 국소적으로 진행된(그 때문에, 잘라낼 수 없는) 질병을 제시하고, 또 다른 40%는 이미 원거리의 전이로부터 고통받는다. 췌장 종양 모델은 MSCs가 췌장암에서 중요한 역할을 한다고 기재하였다. CCL5/RFP MSC의 체계적인 주입뿐만 아니라 이동 분석을 통하여 실증된 것으로서, 세포는 종양을 활성적으로 찾는다. 상기 체계적으로 주입된 줄기세포는 종양 내에서 배타적으로 발견되었다. 종양 크기 및 감소된 복막 암종증(carcinosis)에서 뒤이은 감소는 줄기세포/자살 유전자 치료와 결합된 환자 맞춤의 임상적인 적용에 촉망이 된다.

[0129]

다른 조직 오목(niche)에 모집된 조작된 줄기세포는 분화의 같은 프로그램을 겪지 않고, 따라서, 치료 유전자를 발현하지 않는다. 상기 접근은 정의된 미세환경 내에 상기 치료 유전자의 선택적인 발현 조절의 유의적 정도를 허락한다.

[0130]

선택적인 유전자 치료와 줄기세포 치료를 연결하는 것은 종양 파괴를 위한 것 뿐만 아니라, 병적인 또는 결손 세포의 재생 또는 대체를 위한 치료적 선택을 향상시킨다. 여기에서, 이것은 유전적으로 변형된 줄기세포가 종양에 조직-특이적인 유전자 치료를 위한 대조군으로서의 역할을 할 수 있고 CCL5 프로모터로 조작된 MSC가 tk 발현을 작동할 수 있다는 것을 보여준다.

표 1

		군	
		대조군(n=5) 전이	고유 mSC(n=3) 전이 p-수준
장기	비장	5(100%)	3(100%) 1.00
	간	3(60%)	3(100%) 0.46
	복막	0(0%)	3(100%) 0.018*

[0131]

[0132] 전이의 발달에서 MSC 처리의 효과. 대조군 및 고유 MSC가 처리된 동물의 비교(MSC는 500,000개의 세포를 3주의 기간 동안 주 1회 주었다). 검사(examination)는 종양 성장의 36일 후 조사 및 촉진에 의해 수행되었다. 수는

전이가 있는 동물을 나타낸다. 유의성(significance)은 양방적 피셔 직접 테스트(two-tailed Fisher's exact test)로 테스트하였다.

표 2

		군							
		대조군(n=5)		RaPro/RFP(n=9)		RaPro/eGFP(n=6)		RaPro/Tk + GCV(n=10)	
		전이	전이	p-수준	전이	p-수준	전이	p-수준	
[0133]	비장	5(100%)	8(89%)	1.00	6(100%)	1.00	3(30%)	0.026*	
	간	3(60%)	4(44.4%)	1.00	2(33%)	0.57	0(0%)	0.022*	
	복막	0(0%)	7(78%)	0.021*	4(67%)	0.06	0(0%)	1.00	

[0134] 표 2. 종양 전이의 분포. 대조군 동물 및 대조군 MSCs로 형질전환된 GFP 및 RFP 리포터 유전자를 자살 유전자 치료가 처리된 동물과 비교하였다. 종양 성장의 36일 후 조사 및 촉진에 의한 검사. 수는 전이가 있는 동물을 나타낸다. 유의성은 양방적 피셔 직접 테스트로 테스트하였다. 모든 MSC는 500,000개의 세포를 3주의 기 동안 주 1회 주었다.

[0135] 인간 MSCs의 안정적 형질도입(transduction)을 위한 생체 내(*in vitro*) 실험 및 HSV tk 발현의 유도를 위한 생체 내 분석

유전적으로 변형된 인간 MSCs의 발생

[0137] 인간 MSCs를 RANTES 프로모터의 조절 아래 HSV tk 유전자 및 SV40 프로모터의 조절 아래 블라스티시딘(blasticidin) 내성 유전자를 harboring하는 벡터 pLenti6 TK RANTES를 운반하는 결핍 렌티 바이러스를 복제하기 위하여 밤새도록 배양시켰다(감염다중도(multiplicity of infection, MOI): 10)(도 8 참조)

[0138] 바이러스를 밤새도록 배양한 배지를 제거한 후 신선한 배지로 교체하였다. 다음 날 유전적으로 변형된 MSCs를 선택하기 위하여 세포에 블라스티시딘(6 µg/ml)을 첨가하였다. 블라스티시딘을 포함하는, 배양 배지를 최소한 6일 동안 3 내지 4일 마다 교체하였다.

RANTES 프로모터(promoter)의 생체 내 유도

[0140] 이것은 사이토카인 TNF α (10 ng/ml) 및 IFN γ (10 ng/ml)의 조합이 HUVECS(human umbilical vascular endothelial cell)에서 RANTES 프로모터의 유도를 이끈다는 것을 기재하였다³⁵.

[0141] 본 발명의 실험에서, 발명자들은 또한, 사이토카인의 같은 조합이 MSCs에서 내인성 RANTES 프로모터의 유도를 이끈다는 것을 기재하길 원했다. 본 발명자들은 생체 내에서 외인성 HSV tk의 발현을 유도하는 것이 가능한 이런 분석을 사용하는 것을 원했다. 유전적으로 변형된 MSCs를 TNF α 및 IFN γ 와 함께 또는 사이토카인이 없이 48 시간까지 배양하였고 0, 24 및 48 시간 후 총 RNA를 분리하였다. RNA (600 ng)을 cDNA에 역으로 전사시켰고 이것을 LightCycler 시스템(Roche, 프라이머(Primer): 정방향(for): CCT CAT TGC TAC TGC CCT CT; 역방향(rev): GGT GTG GTG TCC GAG GAA TA; Universal Probe 16)을 사용하여 내인성 RANTES 발현을 수량화하기 위하여 qRT-PCR 반응에 차례차례 사용하였다. RNA의 같은 양을 다른 시료에 사용하는 것을 확실히 하기 위하여 관리 유전

자(housekeeping gene)(액틴(actin))를 기준 유전자(reference gene)로서 사용하였고(Universal ProbeLibrary human ACTB Gene Assay, Roche) 상대량(relative amount)을 △△CT 방법을 사용하여 계산하였다.

[0142] 도 9에서 보였듯이, 본 발명자들은 TNF α (10 ng/ml) 및 IFN γ (10 ng/ml)로 MSCs를 유도한 후 24시간 및 48시간 내인성 RANTES mRNA의 확연한 증가를 검출하는 것이 가능했다. 상기와 같은 발견은 RANTES 발현이 HUVECs 뿐만 아니라 인간 MSCs에서도 TNF α 및 IFN γ 에 의해 유도된다는 것을 증명한다.

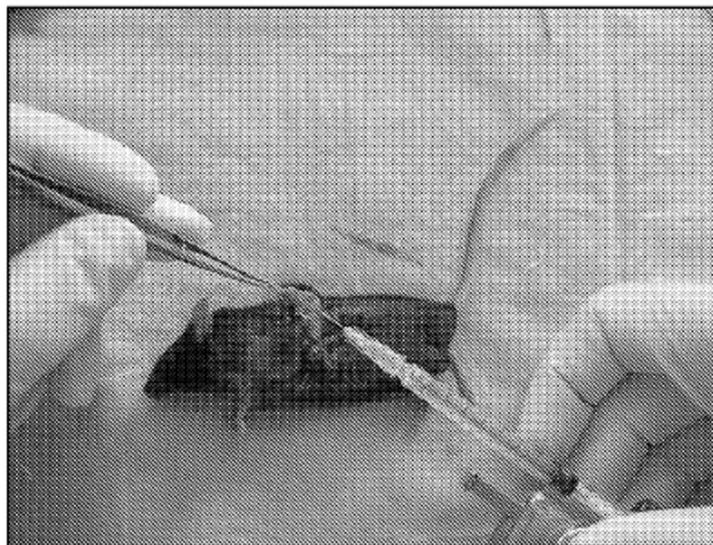
[0143] 간시클로비르(ganciclovir) 처리 후 유도된 유전적으로 변형된 MSCs의 특이적 세포 죽음

[0144] 본 발명자들이 내인성 RANTES 프로모터의 유도를 증명한 후 이것이 외인성 RANTES 프로모터의 조절 아래 있는 HSV tk의 발현을 유도할 수 있는지 아닌지를 조사하였고 그 결과로서 간시클로비르가 처리된 유도된 세포의 처리 후 세포 죽음이 촉진되었다. 상기에 기재된 것과 같이 만들어진 유전적으로 변형된 세포(6 웰(well) 당 50000개의 세포)를 매 3일마다 신선한 사이토카인을 첨가하여 TNFa (10 ng/ml) and IFNg (10 ng/ml)을 9일 동안 처리하였다. 그 후에 상기 세포를 100 μ M 간시클로비르와 함께 3일 동안 배양시켰다.

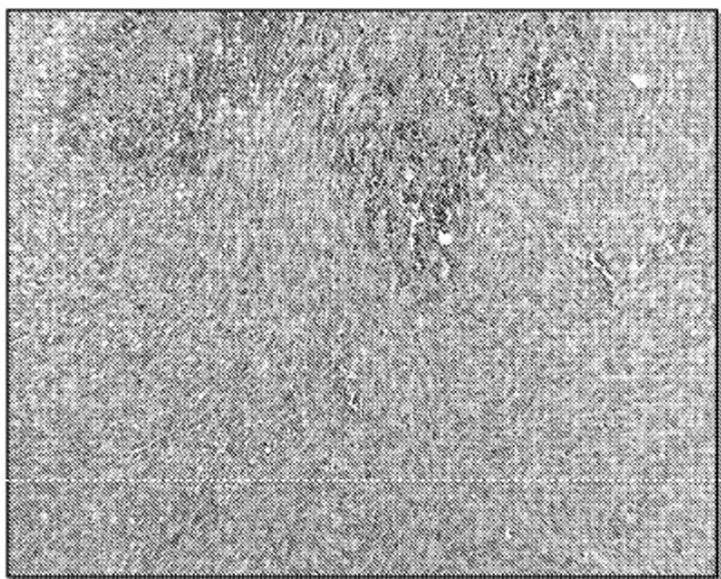
[0145] 결과는 TNF α 및 IFN γ 로 유도되고 그 후 간시클로비르가 처리된 유전적으로 변형된 MSCs는 생존하지 못한다는 것을 분명히 증명하였다(도 10의 D). 단지 TNF α 및 IFN γ 로 유도되거나 또는 간시클로비르가 처리된 세포는 반대였다(도 10의 C).

도면

도면 1a

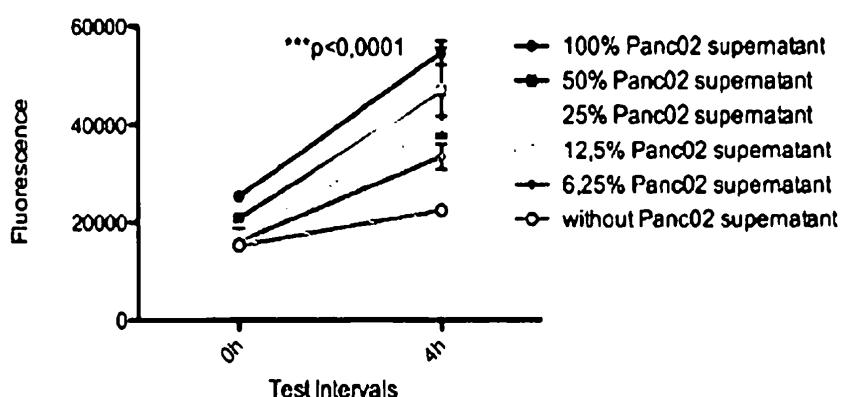


도면1b



도면2

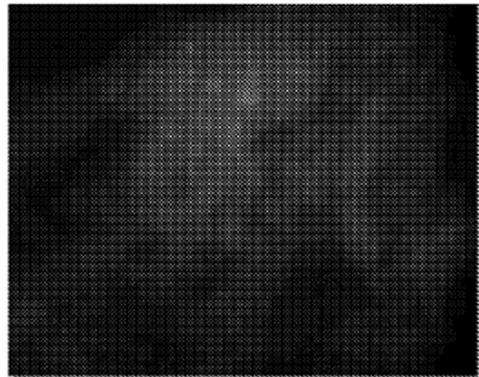
Migration Index of C57Bl6 MSC



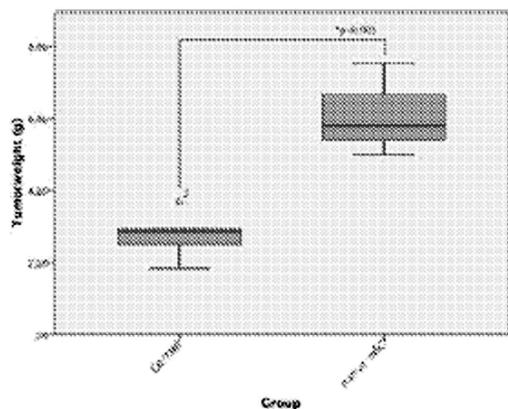
도면3



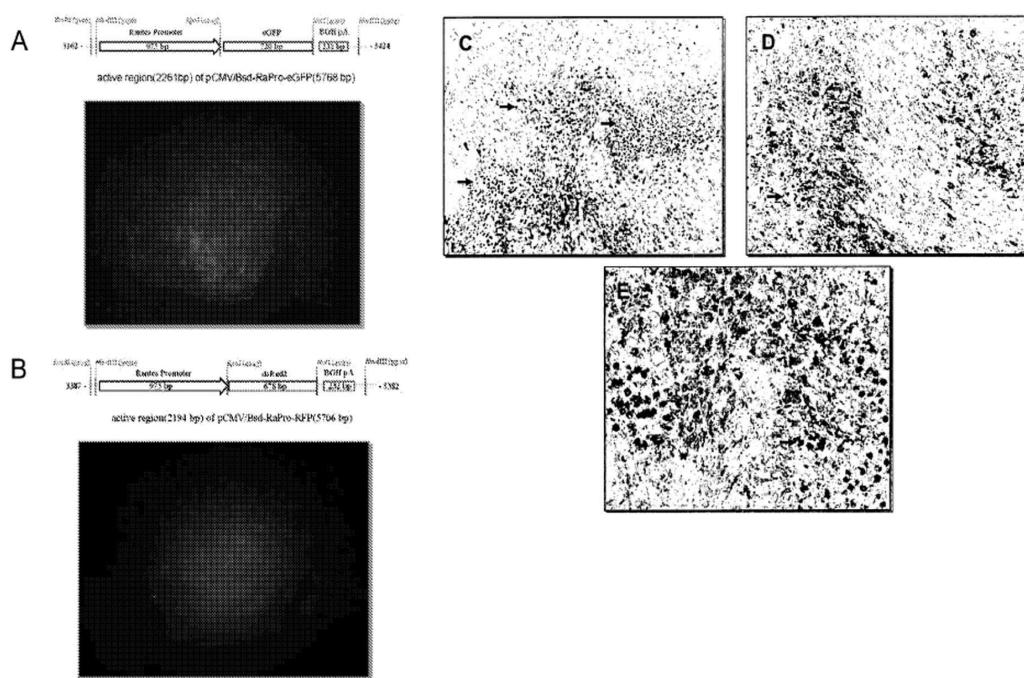
A



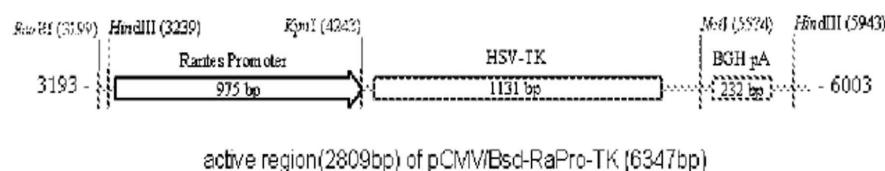
B



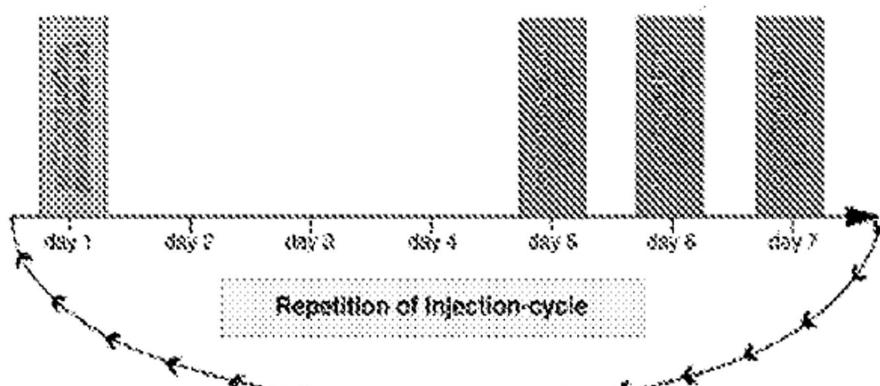
도면4



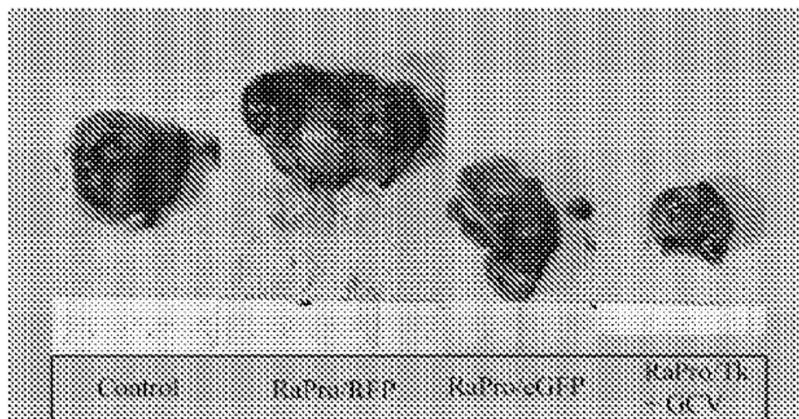
도면5a



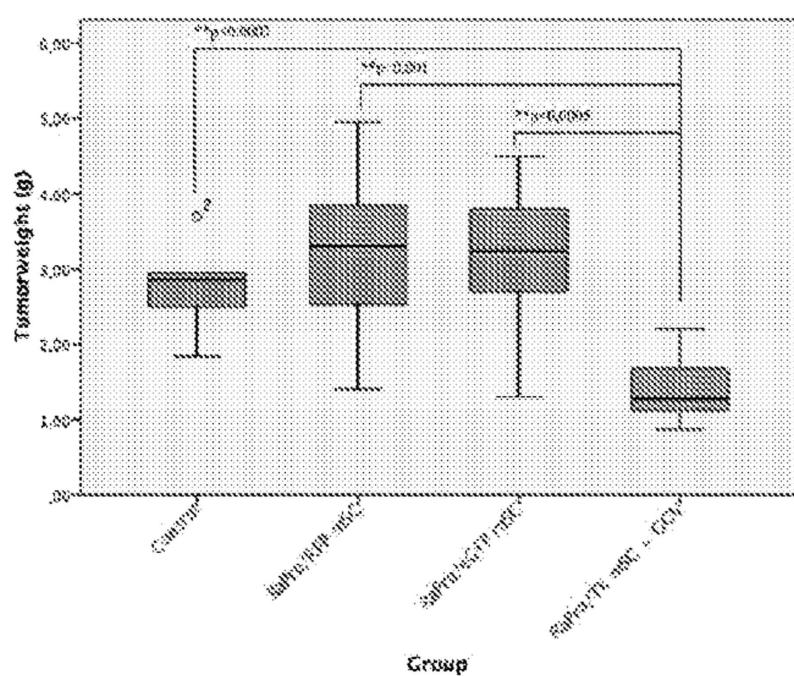
도면5b



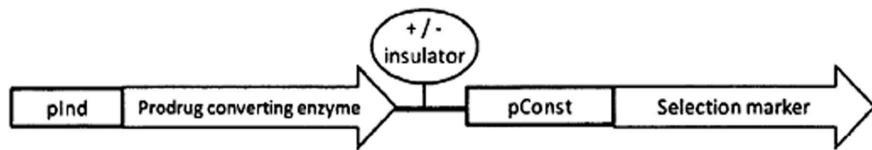
도면5c



도면5d

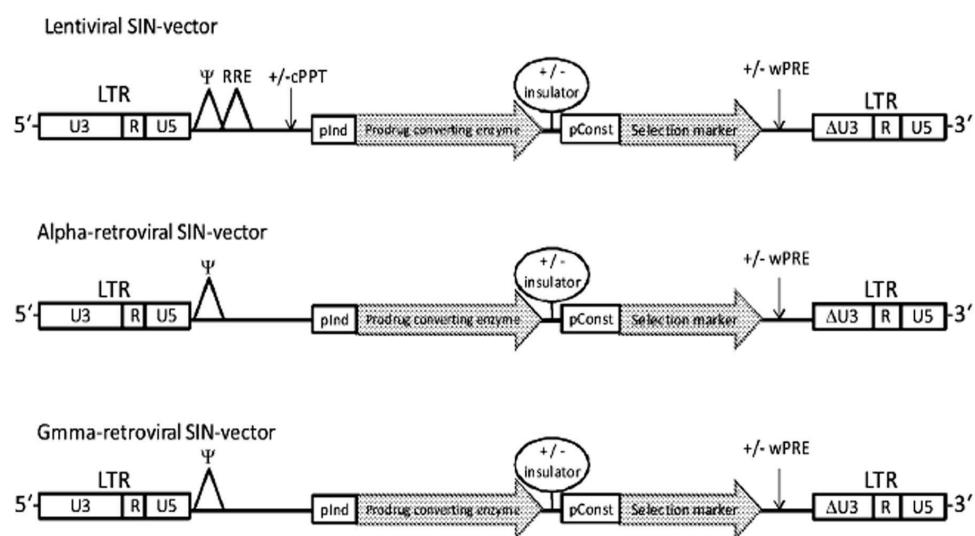


도면6

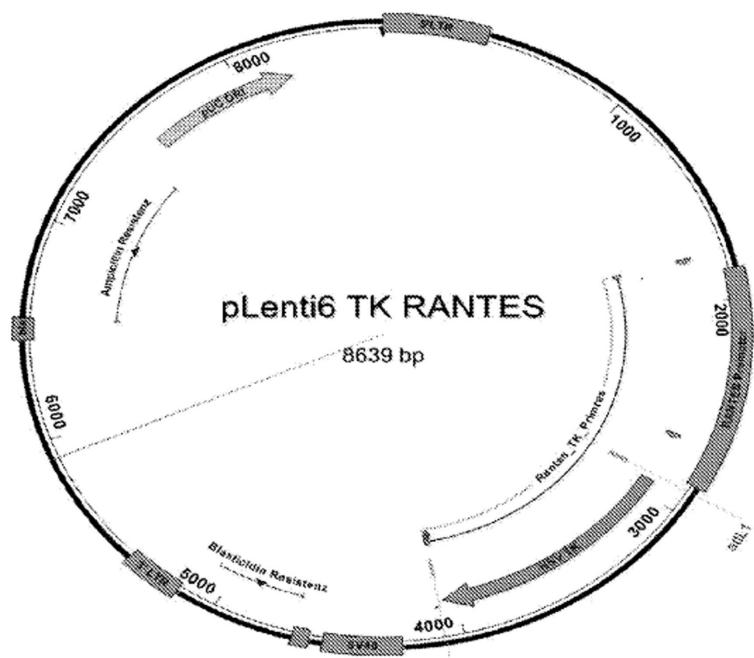


RAN TES	HSV-Thymidine kinase		pCAG	Puromycin resistance
Tie-2	Cytosine deaminase		EF1alpha	Neomycin resistance
			PGK	Ouabain resistance
			CMV	Hygromycin B
			SFFV	CD34

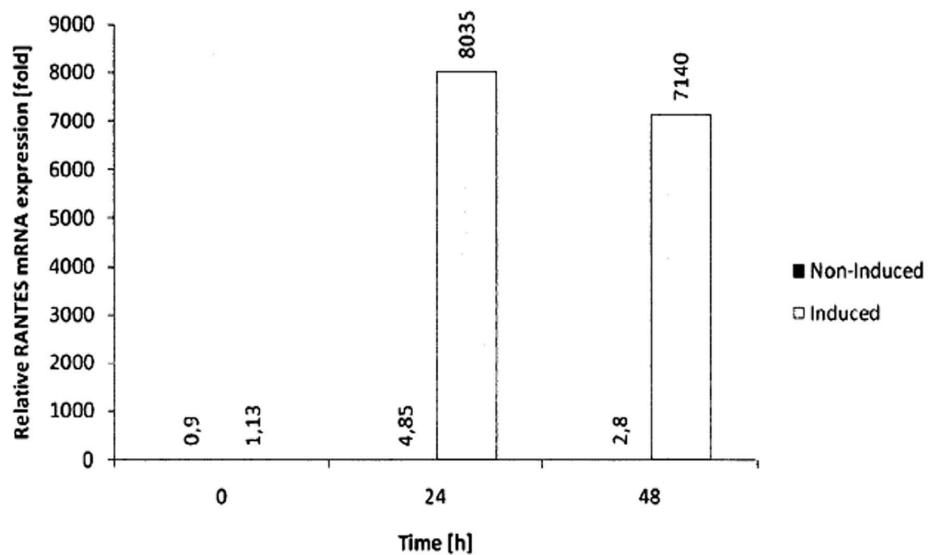
도면7



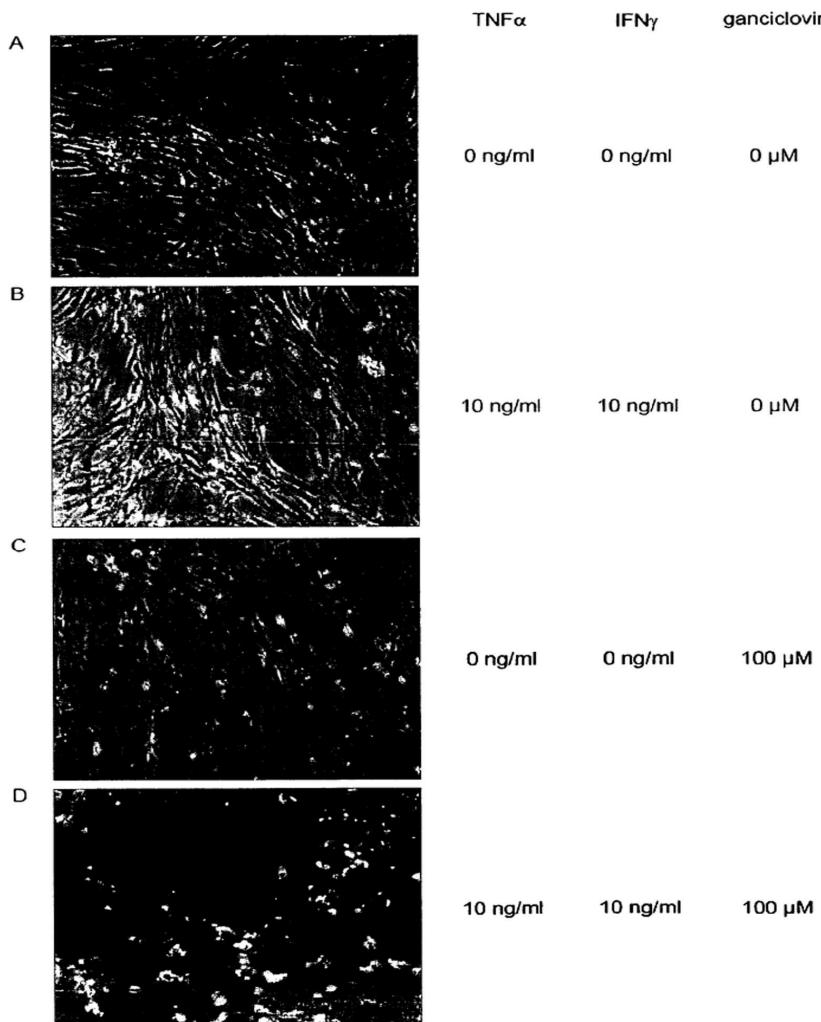
도면8



도면9



도면10



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)