



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년05월20일
(11) 등록번호 10-1396454
(24) 등록일자 2014년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/00 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7013132(분할)
(22) 출원일자(국제) 2005년11월14일
심사청구일자 2013년06월21일
(85) 번역문제출일자 2013년05월22일
(65) 공개번호 10-2013-0072263
(43) 공개일자 2013년07월01일
(62) 원출원 특허 10-2007-7013464
원출원일자(국제) 2005년11월14일
심사청구일자 2010년10월27일
(86) 국제출원번호 PCT/IL2005/001195
(87) 국제공개번호 WO 2006/051545
국제공개일자 2006년05월18일
(30) 우선권주장
10/988,487 2004년11월14일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Shoshana Greenberger 등. The Journal of
Clinical Investigation. 2004.03월. Vol. 113,
No. 7, 페이지 1017-1024.
W02003093409 A2

(73) 특허권자
바스콜라 바이오제닉스 리미티드
이스라엘 60376 오 예후다, 요니 네타냐후 스트리트 6
(72) 발명자
하라츠 드로
이스라엘 53765 라멧 겐, 키르얏-크리니츠, 만데스 스트리트 71
그린버거 쇼샤나
이스라엘 71700 모디인, 빈야민 스트리트 38
(74) 대리인
황의만

전체 청구항 수 : 총 25 항

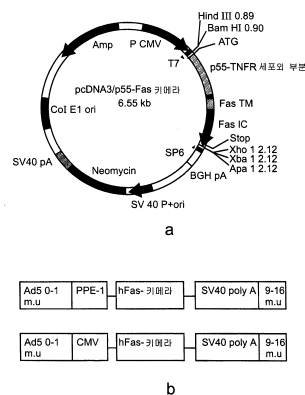
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 내피 세포 특이성을 나타내는 프로모터 및 이를 이용하여 혈관신생을 조절하는 방법

(57) 요약

내피세포 특이적 프로모터 활성을 나타내는 분리된 폴리뉴클레오타이드 서열, 신규한 시스 조절 요소 및, 이상 신생맥관화 또는 세포 성장에 의해 특징되는 질병의 치료를 가능하게 하는데 사용하는 방법이 개시된다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

(a) 서열번호 8의 서열 또는 이것의 상보적 서열을 포함하는 시스-작용 조절 요소를 포함하는 내피 세포 특이성 프로모터; 및

(b) 전구약물을 독성 화합물로 전환할 수 있는 자살 유전자 생성물질(product)을 암호화하고, 상기 내피 세포 특이성 프로모터에 전사적으로 연결된 폴리뉴클레오타이드를 포함하고,

여기서, 피험체는 혈관신생(angiogenesis)의 억제를 더 강화할 수 있는 적어도 하나의 화학요법성 또는 방사선 요법성 양태로 치료되어지는 것인, 백터를 포함하는, 혈관신생 또는 신생 맥관화(excessive neo-vascularization)의 억제가 필요한 피험체에서 혈관형성 또는 신생 맥관화를 억제하기 위한 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 자살 유전자 생성물질은 헤르페스 심플렉스 바이러스의 티미딘 키나제, 수두 대상 포진 바이러스의 티미딘 키나제 및 박테리아성 시토신 디아미나제로 구성되는 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 전구약물은 겐사이클로비르, 어싸이클로비르, 1-(2-데옥시-2-플루오로-베타-D-아라비노푸라노실)-5-요오도 우라실(FIAU), 5-플루오로시토신, 및 6-메톡시퓨린 아라비노시드로 구성되는 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 자살 유전자 생성물질은 헤르페스 심플렉스 바이러스의 티미딘 키나제이고, 상기 전구약물은 겐사이클로비르, 어싸이클로비르 또는 FIAU인 약학적 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 자살 유전자 생성물질은 박테리아성 시토신 디아미나제이고, 상기 전구약물은 5-플루오로시토신인 약학적 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 자살 유전자 생성물질은 수두 대상 포진 바이러스의 티미딘 키나제이고, 상기 전구약물은 6-메톡시퓨린 아라비노시드인 약학적 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 방사선 요법 양태는 부차-치료적 방사선 요법인 약학적 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 자살 유전자 생성물질은 티미딘 키나제이고, 적어도 하나의 방사선 요법 양태는 방사선 요법인 약학적 조

성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 자살 유전자 생성물질은 티미딘 키나제이고, 상기 전구약물은 겐싸이클로비르인 약학적 조성물.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 시스 작용 조절 요소는 서열번호 6 또는 이것의 상보적 서열의 적어도 하나의 복사본(one copy)을 더 포함하는 약학적 조성물.

청구항 11

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 시스 작용 조절 요소는 서열번호 7 또는 이것의 상보적 서열인 약학적 조성물.

청구항 12

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 내피 세포 특이성 프로모터는 PPE-1 프로모터를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 PPE-1 프로모터는 서열번호 1을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 14

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 내피 세포 특이성 프로모터는 PPE-1-3X 프로모터인 약학적 조성물.

청구항 15

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 내피 세포 특이성 프로모터는 서열번호 5의 적어도 하나의 복사본을 포함하는 저산소증 응답 요소를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 16

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 피험체는 화학요법성 양태로 동시에 치료되는 약학적 조성물.

청구항 17

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 벡터는 아데노바이러스 벡터인 약학적 조성물.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

상기 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 혈청형 5인 약학적 조성물.

청구항 19

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 피험체는 종양을 갖는 것인 약학적 조성물.

청구항 20

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,
종양의 크기를 감소시키거나 종양 성장을 억제하는 약학적 조성물.

청구항 21

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,
피험체에서 혈관신생 또는 신생 맥관화와 관련된 질병 또는 증상을 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 22

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 10^3 내지 10^{16} 개의 바이러스 입자들인 아데노바이러스의 치료적 유효량을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 23

제 22 항에 있어서,
상기 아데노바이러스의 치료적 유효량은 10^5 내지 10^{13} 개의 바이러스 입자들인 약학적 조성물.

청구항 24

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,
계통적 투여 또는 직접 국소적 투여를 위하여 제형화되는 것인 약학적 조성물.

청구항 25

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 혈관신생은 전이성 종양 또는 일차 종양의 종양 혈관신생인 약학적 조성물.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 피검체의 특정 조직 부위에서 혈관신생 (angiogenesis)을 조절하는데 사용될 수 있는 핵산 작제물 (nucleic acid constructs), 약학적 조성물, 및 방법에 관한 것이다. 상세하게는, 본 발명은 내피세포 특이적 프로모터 활성을 나타내는 분리된 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 이의 사용 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 내피세포에서 증가된 활성과 특이성을 나타내는 개질-프레프로엔도텔린-1 (modified-엔도텔린-1 (PPE-1) 프로모터 및 핵산 작제물로서, 특정 세포 아군 (subset)에서 세포독성을 활성화하여 비정상적인 혈관생성 또는 세포 성장에 의해 특징되는 질환을 치료할 수 있게 되거나, 또는 새로운 혈관의 성장을 유도하여 그림으로써 허혈성 질환을 치료할 수 있게 하는 것에 관한 것이다. 또한 본 발명은 저산소증 및 혈관신생을 포함하는 생리적 조건에 부응하여 그 발현을 증가시키는 PPE 프로모터의 개질 및 신규한 혈관신생적 내피-특이성 복합 요법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 혈관신생

- [0003] 혈관신생은 새로운 혈관의 성장으로서, 모세 내피세포의 이동, 증식 및 관 형성에 주로 의존하는 과정이다. 혈관신생 중에, 내피세포들은 비활성상태에서 깨어나서 빠르게 증식한다. 비록 세포가 혈관신생적 표현형으로 전이하는 데 담당하는 분자적 기작이 알려져 있지 않지만, 새로운 혈관의 형성을 이끄는 일련의 사건들은 잘 정리되어 있다 [Hanahan, D., Science 277, 48- 50, (1997)]. 혈관 성장은 내피 발생 [Risau, W., Nature 386, 671-674, (1997)] 또는 영양섭취 (intussusception) [Patan, S., et al; Microvasc. Res. 51, 260-272, (1996)]를 수반한다. 첫 번째로, 하기의 일련의 사건이 발생할 수 있다: (a) 혈관, 통상 세정맥 (post capillary venule)의 기부 (basement) 및 세포 간 기질 (interstitial matrix)의 해체; (b) 자극 방향으로의 내피세포 이동; (c) 주된 내피세포를 뒤따라가는 내피세포의 증식; (d) 내피 배열체/발아물 내에서의 내강 형성 (관강화); (e) 발아체의 통합적인 문맥화에 의해서 가지 혈관 및 루프 혈관을 형성하여 피를 흐르게 함; (f) 혈관에 혈관 주변세포가 모여들 (예를 들어, 주변 내피세포 및 평활근 세포); 및 (g) 미성숙 혈관 주위의 기저 막 형성. 신규 혈관들이 또한 두 번째 통로를 통해 형성될 수 있다: 기존 혈관의 내강으로 세포 간 조직 컬럼의 삽입. 이후, 이러한 컬럼들이 성장하고 안정화되면 혈관 내강의 분리 및 국소적인 혈관 망이 재구축되는 결과가 나타난다.
- [0004] 혈관신생은 저 산소 농도의 조건하에서 일어나고 (허혈 및 종양 전이 등) 따라서 혈관신생화에 중요한 환경적 요인이 될 수 있다. 에리스토프로이에틴, 트랜스페린 및 이의 수용체, 대부분의 당 전달 및 해당 경로 유전자, LDH, PDGF-BB, 에도텔린-1 (ET-I), VEGF 및 VEGF 수용체들을 포함하는 몇 가지 유전자들의 발현이 저산소증 유도성 인자 (hypoxia inducible factor (HIF-1))이 이러한 유전자들의 전사를 조절하는 저산소증 반응 요소 (hypoxic response element (HRE))에 특이적으로 결합함으로써 저산소증 조건하에서 유도된다. 저산소증 조건에 응답하여 이러한 유전자들이 발현되게 되면 세포가 저 산소 조건하에서 기능 할 수 있게 된다.
- [0005] 혈관신생 과정은 종양 또는 정상 세포는 물론 세포 외 기질의 조성에 의해 분비되는 혈관 신형성 성장 인자 및 내피 효소의 활성화에 의해 조절된다 (Nicosia 및 Ottinetti, 1990, Lab. Invest., 63, 115). 혈관신생의 초기 단계 중에, 내피세포 발아체가 기존 혈관의 기저막의 간극을 통해 나타난다. (Nicosia 및 Ottinetti, 1990, supra; Schoefl, 1963, Virehous Arch, Pathol. Anat. 337, 97-141; Ausprunk 및 Folkman, 1977, Microvasc. Res. 14, 53-65; Paku 및 Paweletz, 1991, Lab. Invest. 63, 334-346). 새로운 혈관이 형성됨에 따라, 그들의 기저막은 혈관신생 응답에 영향을 주는 것으로 생각되는 복잡한 구조적 및 조성적 변화를 겪게 된다 (Nicosia, 등, 1994, Exp Biology. 164, 197-206).
- [0006] 혈관신생 및 병리:
- [0007] 다양한 혈관신생 인자들이 혈관신생 과정을 통제하고 있다. 병변 중에는, 친-혈관신생 인자 및 항-혈관신생 인자간의 정밀한 균형이 깨어지고, 따라서 비자발성-제한 내피 및 말초 내피세포-증식을 이끌어낸다. 비록 혈관신생이 정상 조건하에서 고도로 제어되는 과정이지만, 많은 질병 ("혈관신생적 질환"으로서 특징되는)들이 끈질긴 조절되지 않은 혈관신생에 의해 유도된다. 그러한 질병 상태에서, 조절되지 않는 혈관신생은 직접적으로 특정 질병을 야기하거나 기존의 병리적 조건을 악화시킨다. 예를 들어, 눈의 신규 혈관화는 실명의 가장 공통적인 원인에 연루되어 있고, 눈의 약 스무 가지 질병의 병리를 담당한다. 관절염과 같은 특징의 기존 조건하에서, 새로운 형성되는 모세혈관들은 관절을 공격하고 연골조직을 파괴시킨다. 당뇨에서도, 망막에서 형성된 신규 모세혈관들은 유리성 체액을 공격하여, 출혈 및 실명을 야기한다. 최근까지, 눈의 신생혈관화, 관절염, 피부병 및 종양의 질병에서 일어나는 혈관신생은 치료적으로 억제하기 어려웠다.
- [0008] 미 균형의 혈관신생은 다양한 병리적 조건들을 대표하며 병리적 상태의 진행을 유지한다. 예를 들어, 고형 종양에서, 혈관 내피세포들은 정상 조직에서의 혈관 내피세포보다 약 35 배 더 빠르게 분할된다 (Denekamp 및 Hobson, 1982 Br. J. Cancer 46:711-20). 그러한 비정상적인 증식은 종양 성장 및 전이에 필수적이다 (Folkman, 1986 Cancer Res. 46:467- 73).
- [0009] 혈관 내피세포 증식은 또한 류마티스성 관절염, 건선 및 활액막염과 같은 만성 염증성 질병에 매우 중요한데, 여기서 상기 세포들은 염증 장소 내에 방출된 성장 인자들에 반응하여 증식한다 (Brown & Weiss, 1988, Ann. Rheum. Dis. 47:881-5). 아테롬성 동맥경화증에서, 아테롬성 동맥경화성 플라크 형성은 혈관에서 내피세포들이 단일 클론성으로 확장되면 발단이 된다 (Alpern-Elran 1989, J. Neurosurg. 70:942-5). 더욱이, 당뇨병 망막증, 시력상실은 망막의 미조절 혈관신생 및 소모를 자극하는, 눈에서 기저막 변화에 의해 야기되는 것으로 판단된다 (West 및 Kumar, 1988, Lancet 1:715-6). 내피세포들은 또한 이식 거부에 연루되어 있다. 동종이식 거부의 경우, 내피세포들은 백혈구들을 이식편의 장소로 향하게 하는 친-접착성 결정인자를 발현한다. 이식편에서 내피세포 상의 백혈구 점착 분자의 유도는 염증성 병변에서 일어나는 것으로 알려진 바와 같이, 국소적으로

방출된 사이토카인에 의해 이뤄질 수 있다. 한편, 완료된 혈관신생은 또한 아테롬성 동맥경화증 유도 관상 동맥 폐색 (예를 들어, 협심증), 사고 외상 또는 외과수술 후의 괴사성 손상, 나이관련 황반 변성 또는 궤양과 같은 위장관 병변에서와 같이, 질병 전개에 주요한 인자이다.

[0010] 그러므로, 혈관 신생 과정을 제거하거나 변형시키는 것은 이러한 과정이 기본적인 질병 상태의 병리적 과정에 기여하는 것을 제한하는 데 중요한 치료적 역할을 하는 것은 물론 이들의 병인을 연구하는 가치 있는 수단을 제공하게 된다.

[0011] 최근, 내피 조절제의 개발에 있어서, 저해성으로 또는 촉진성으로 고안되었던 간에, 상당한 진보가 이루어져 왔다. 예를 들어, 콜라겐-피브 기질 내의 β FGF 단백질을 성인 쥐의 복강으로 투여하면, 잘 혈관화된 및 정상적으로 관류된 구조물이 형성되는 결과를 낳는다 (Thompson, 등, PNAS 86:7928-7932, 1989). 관상 폐색동안 성체 개 관상 동맥으로 β FGF 단백질을 반복적으로 주입하면 심근 기능장애 저하, 심근 경색 축소 및 혈관질 축소를 이끈다 (Yanagisawa-Miwa, 등, Science 257:1401-1403, 1992). β FGF 단백질을 사용하여 심근 허혈증 동물 모델에서도 유사 결과가 보고되었다 (Harada, 등, J Clin Invest 94:623-630, 1994, Unger, 등, Am J Physiol 266:H1588-H1595, 1994).

[0012] 그러나, 오래 지속하는 기능적 혈관의 집단적 형성을 위해, 전술한 단백질 인자의 반복된 또는 장기적 이송이 필요하며, 따라서 그것들의 용도를 임상적 환경에 제한한다. 더욱이, 혈관신생-조절 인자의 생성과 연계된 높은 비용에 더하여, 이러한 인자들의 효율적인 전달하기 위해서는 관상 동맥 내에 위치될 카테터를 사용하는 것이 요구되며, 이는 처리 비용을 증가와 난관을 증대시킨다.

[0013] 그러므로, 모든 항-혈관신생적 요법의 기본적 목적은 증식하는 미세혈관의 초점을 정상적인 휴지 상태로 되돌리는 것이고 및 그들의 재성장을 방지하는 것이다 [Cancer: Principles & Practice of Oncology, 제 5 판, 편집 Vincent T. DeVita, Jr., Samuel Hellman, Steven A. Rosenberg. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. (1997)]. 이와 같이, 친혈관신생 요법은 필요한 혈관신생적 인자를 회복하는 것뿐 아니라, 이들 사이에 적절한 균형을 재성립하는 것에 관한 것이다 (Dor, 등, Ann NY Acad Sci 2003:995:208-16) (친- 및 항 혈관신생 요법의 광범위한 검토에 대해서는 참조, Zhang 등, Acta Bioch 및 Biophys Cinica, 2003:35:873-880, 및 Mariani 등, MedGenMed 2003, 5:22; 및 Folkman, Semin. One 2002, 29:15-18).

[0014] 항혈관신생 요법:

[0015] 항-혈관신생 용법은, 이것이 종양 성장(예, 망막증, 양성 및 악성 혈관신생적 종양)의 진행을 저지할 수 있기 때문에, 강력한 임상 수단이다.

[0016] 일반적으로, 당뇨병 망막증, 건선, 관절염, 혈관증, 종양 성장 및 전이와 같은, 모세 혈관의 미조절된 성장에 의해 야기된 모든 질환은 항-혈관신생적 용법에 대한 목표물이다. 예를 들어, 임상적으로 보이지 않는 크기 (예, 수 mm^3) 너머의 고형 종양의 진행성 성장에는, 새로운 혈관의 연속적인 형성, 즉 종양 혈관신생으로 알려진 과정이 요구된다. 종양 성장 및 전이는 혈관신생-종속적이다. 종양은 반드시 새로운 모세혈관의 성장을 자극 하여 양분과 산소를 공급하여 종양 자체가 성장하게 해야 한다. 그러므로, 종양 혈관신생의 예방 또는 종양의 기존 혈관의 선택적 파괴 (혈관 목표 요법 (vascular targeting therapy))는 항-혈관신생 종양 요법의 근거를 이룬다.

[0017] 최근, 많은 항-혈관신생 제제가 악성 질병의 치료를 위해 개발되었고, 이중 일부는 이미 임상 시험중에 있다 (검토로는 하기 참조, Herbst 등 (2002) Semin. Oncol. 29:66-77, 및 Mariani 등, MedGenMed 2003;5:22).

[0018] 종양 항-혈관신생 치료용으로 가장 많이 연구된 목표는 인간에서 혈관신생을 조절하는 주요 과정, 예를 들어, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)와 이의 수용체 (VEGFR)와의 상호작용이다. VEGFR 친-혈관신생적 작용을 조절하는 제제는 (i) VEGF 단백질 자체에 지향되어 있거나 또는 수용체 (예, rhuMAb VEGF, Avastin)에 대한 항체; (ii) VEGFR 타이로신 키나제 (예, ZD6474 및 SU5416)에 지향된 소분자 화합물; (iii) VEGFR 목표된 리보자임을 포함 한다.

[0019] 다른 신규 혈관신생 저해제는 유일한 항-종양 및 항-혈관신생 특성을 가지는 에스트라디올의 자연적 대사체인, 2-메톡시에스트라디올 (2-ME2), 및 각각 플라즈미노겐 및 콜라겐 XVIII의 단백질 분해성 절단 분해물인 안지오 스타틴과 엔도스타틴을 포함한다.

[0020] 비록 예비-임상 모델에서는 확실할 지라도, 현재까지, 임상 시험에서 시험된 모든 항-혈관신생 제제의 전신 투여는 제한된 성공률 및 혈소판 감소증, 백혈구 감소증 및 객혈을 포함하는 심각한 독성을 보여왔다. 이러한 결

과는 진행된 악성물에 대한 요법으로서 현재의 종양 항-혈관신생제를 사용하는 것에 한계가 있다는 것을 제시하고 있다. O'Reilly 등은 항-혈관신생적 요법이 개시되는 것과 항종양 효과가 나타나는 시점 간의 잠복 기간으로 인해 요법에 대한 반응 전에 초기 종양 진행이 결과될 수 있다는 것을 나타냈다 [O'Reilly S 등. (1998) Proc Am Soc Clin Oncol 17:217a]. 더욱이, 최근의 연구는 혈관신생의 조절이 모세 혈관망 간에 다를 수 있고, 이는 항-혈관 신생 요법이 기관/조직-특이성에 근거하여 최적화될 필요가 있다는 것을 의미하는 것이라고 제시하고 있다 [Arap 등 (1998) Science 279:377-380].

- [0021] 흥미롭게도, 평활근 세포 증식에 지향된 항-혈관신생적 용법 (예, 헤파린, 헤파린-펩타이드 처리) 을 관상동맥 질환을 앓고 있는 환자의 심근 허혈증에 실행시켰을 때, 형편없는 결과가 얻어졌다 [Liu 등, Circulation, 79: 1374-1387 (1989); Goldman 등, Atherosclerosis: 215-225 (1987); Wolinsky 등, JACC, 15 (2): 475-481 (1990)]. 심혈관질환의 치료에 그러한 제제를 사용하는 것과 관련한 다양한 한계는: (i) 심혈관 질환을 가진 환자에 대하여 견딜 수 없는 위험 수위를 보이는 전신 독성; (ii) 수술 후 혈관 상처 치유에 대한 방해; (iii) 주위 내피조직 및/또는 다른 중간 평활근 세포에 대한 손상 가능성을 포함하였다.
- [0022] 따라서, 항-혈관신생 인자의 전신 투여와 연관된 이러한 그리고 다른 고유한 장애물 (즉, 시험관 내 불안정성에 근거한 제조 한계 및 요구되는 고 투여량; 및 차선택 효과에 근거한 일시 투여시의 정점에 이르는 역학 문제) 때문에 새로운 혈관화와 연관된 질병을 치료하는데 혈관신생인자를 효과적으로 사용하는 것에 제한이 된다.
- [0023] 앞에 대한 항-혈관신생 유전자 유법:
- [0024] 일차 종양은 물론 전이 상태에서의 종양 세포 증식은 양분 공급이 제한되면 세포사멸 (apoptosis) 속도가 증가되어 상쇄된다. 잠복성 일차 또는 전이 종양은 "혈관신생적 스위치"가 켜지고 양분 공급이 종양 크기에 적절하게 될 때마다 전이 상태로 발전을 개시한다.
- [0025] 혈관신생 스위치는 몇 가지 기작을 통해 일어날 수 있다:
- [0026] 1. 종양 유전자에 의한 VEGF 및 bFGF와 같은 친-혈관신생 유전자의 상향 조절 또는 트롬보스포딘과 같은 혈관-억제자의 하향 조절.
- [0027] 2. 종양-관련 저산소증 조건에 의한 저산소증 유도성 인자-1 (HIF-1)의 활성화.
- [0028] 3. 종양세포에 의해 유도되는, 종양 망상 (tumor bed) 섬유아세포에 의한 친-혈관신생 단백질 분비.
- [0029] 4. 골수 내피 선구체의 종양과의 상호 전달.

표 1

- [0030] 종양 혈관신생의 내인성 조절자

종양 혈관신생의 내인성 조절자

- | | | |
|--------|----------------------|-------------------------|
| [0031] | 활성체 | 저해체 |
| [0032] | 혈관 내피 성장 인자(VEGF) | P53 |
| [0033] | 섬유아세포 성장 인자 1 (FGF1) | 트롬보스포딘-1* |
| [0034] | 섬유아세포 성장 인자 2 (FGF2) | 트롬보스포딘-2 |
| [0035] | 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF) | 금속단백질효소의 조직 저해체 (TIMPs) |
| [0036] | 안지오프이에틴 2* | 안지오프타틴 |
| [0037] | 안지오프이에틴 1** | 엔도스타틴 |
| [0038] | 변형성 성장 인자-β (TGF-β) | 항혈관신생 항트롬빈 III |
| [0039] | 종양 괴사 인자-α (TNF-α) | 안지오프타틱 C-X-C 케모카인 |
| [0040] | 인터루킨-8 (IL-8) | (PF4, IP-10, MIG) |

- [0041] 혈소판 유래 내피세포 색소 내피 유래 인자 (PEDF)
- [0042] 성장 인자(PD-ECGF) 인터루킨-12 (IL12)
- [0043] 간세포 성장 인자(HGF) 인터페론 (INF)- α β γ
- [0044] * 용량-의존성
- [0045] ** 약한 혈관신생 활성제
- [0046] 혈관신생의 활성제 및 저해제 (참조 상기 표 1)간의 상대적인 균형은 종양을 비활성적인 상태로 유지하는 것에 중요하다. 저해제를 감소시키거나 활성제 수준을 증가시키는 것은 상기 균형을 바꾸는 것이 되고 종양 혈관 신생 및 종양 성장으로 인도하게 한다.
- [0047] 종양 조직 두께가 최근접 혈관보다 150-200 μ m 넘어서면 신생물 조직에 산소를 확산시키는 것은 부적절하다. 따라서, 정의에 의하면, 이러한 범위를 뛰어 넘는 모든 종양은 이미 혈관신생적으로 작동개시되어 있다. 종양 세포 증식속도는 혈관 공급과 무관하다. 그러나, 혈관신생 스위치가 발생하자마자, 세포사멸률은 3-4배 감소된다(24). 더욱이, 신생 혈관이 종양의 세포사멸을 감소시키는 것에 기여하는 것은 양분 공급 및 이화생성물 방출만이 아니다. 미세 도관 내피세포들 또한 종양 세포 세포사멸을 억제하는 b-FGF, HB-EGF, IL-6, G-CSF, IGF-I 및 PDGF와 같은 항-세포사멸 인자, 마이트젠 및 생존 인자를 분비하고 있다.
- [0048] 종양 세포들은 유전적으로 고도의 변이율로 인하여 불안정한데, 이는 일반 세포보다 장점을 부여한다. 예를 들어, p53 유전자에서의 변이는 세포사멸 속도를 억제한다. 더욱이, 친-혈관신생적 또는 혈관신생적 억제자 조절의 종양 유전자를 변형하면 (ras 종양유전자와 같은) 혈관신생적 스위치를 유도하게 될 수 있다. 그러나, 높은 변이율 외에 암의 유전적 불안정성에 대한 다른 기작이 있다. 종양에 의해 식균되는 "세포사멸성 (apoptotic) 몸체"의 증거가 있고, 이는 이수성 및 더 나아가 유전적 불안정성에서의 증가를 결과한다. 무엇보다, 암은 혈관신생에 의존한다. 유전적 불안정성으로 인하여, 암은 친-혈관신생적 사이토카인 균형을 통제할 수 있고, 이는 세포사멸 속도를 억제하고 전이성 근원을 받아시키게 한다.
- [0049] 인간 맥관구조 시스템은 일 조 개 이상의 내피세포를 포함한다. 정상적인 정지상태의 내피세포의 일생은 1000일 이상이다. 비록 종양 진행에 연루된 혈관신생적 내피세포들이 빠르게 증식하지만, 이것들은 계층성 안정성에서 종양세포마다 다르므로 따라서 최소 약물저항성에서 및 변이 클론의 발달의 낮은 가능성에 있어서 상이하다. 더욱이, 종양 진행에 대한 속도 제한 인자가 혈관신생이기 때문에, 혈관신생적 내피세포들에 반하도록 지향되는 치료는 고도로 효과적인 치료 양상을 나타낼 수 있다. 실제로, 수 가지 항-혈관신생 물질은 전신 요법에 대한 강력한 후보자로 사용될 수 있다. 그러나, 이러한 제제들이 단백질이고 이의 투여는 그러므로 빈번한 정맥 투여에 의존하기 때문에, 이들의 사용은 심각한 제조 및 유지 문제점을 던져준다. 항-혈관신생 유전자의 도입은 연속적인 단백질 분비에 강력한 해답을 제시하고 있다.
- [0050] 혈관신생적 과정을 조절하는 새로운 유전자가 확인되면서, 체세포 유전자 요법이 이러한 한계를 극복하고자 시도되었다. 비록 암, 심근 및 말초혈관 질환의 유전자 요법에 대한 방법을 개발하고자 많은 노력이 기울여 졌지만, 효과적이고 특이적인 유전자 전달에 대하여 주요한 장애물들이 여전히 남아 있다 [검토용으로 하기 참조, Feldman AL. (2000) Cancer 89(6): 1181-94]. 일반적으로, 재조합 바이러스성 벡터를 서플로 사용하고, 대상 유전자로 행하는 유전자 요법의 주요 제한 요인은 목표 조직에 대상 유전자를 특이적으로 투입하는 능력이다.
- [0051] 이러한 한계를 극복하고자 하는 시도로서 세포 특이성 유전자와 연계된 조직-특이성 프로모터들을 사용하는 것이 있다. 예를 들어, 내피세포 내피-특이성 프로모터들의 조절하에서 발현된 세포독성 유전자의 내피세포 목표화 (targeting)이 Jaggar 등에 의해 제시되어 있고, 이들은 KDR 또는 E-셀렉틴 프로모터를 사용하여 내피세포들에서 특이적으로 TNF α 를 발현하였다 [Jaggar RT. 등 Hum Gene Ther (1997) 8(18):2239- 47]. Ozaki 등은 폰-빌레브란트 (von-Willebrand) 인자 (vWF) 프로모터를 사용하여 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제(HSV-tk)를 HUVEC에 전달하였다 [Hum Gene Ther (1996) 7(13): 1483-90]. 그러나, 이러한 프로모터들은 약한 활성만을 보였을 뿐이고 고도의 발현을 나타내지 못했다.
- [0052] 수가지 내피세포 특이성 프로모터들이 종래 기술에서 보여진다. 예를 들어, Aird 등은 [Proc. Natl. Acad. Sci. (1995) 92:7567-571] 생체 내에서 조직 특이성 발현을 부여할 수 있는, 인간 폰-빌레브란트 인자의 5' 및 3' 조절 서열을 분리하였다. 그러나, 이러한 서열들은 혼합 패턴의 리포터 형질전환 유전자 (transgene) 발현을 매개할 수 있을 뿐이다. 형질전환 마우스 내의 폰 빌레브란트 조절 요소의 조절하에 있는 박테리아성 LacZ 리포터 유전자를 사용하여 난황낭 및 성체 뇌에 있는 상당한 수의 내피세포에서 형질전환 발현이 나타나는 것을

밝혔다. 그러나, 비장, 폐, 간, 신장, 심장, 고환 및 동맥의 맥관상 (vascular bed)은 물론 트롬보모듈린 지점에서는 어떠한 발현도 검출되지 않았다.

- [0053] Korhonen J 등 [Blood (1995) 96:1828-35]은 마우스 배아의 맥관계를 통틀어 형질전환 유전자의 동종 발현에 기여하는 인간 및 마우스 TIE 유전자 프로모터를 분리하였다. 그러나 성체에서는 그 발현이 폐와 신장의 혈관으로 제한되었고, 심장, 뇌, 간에서는 발현이 되지 않았다. 유사한 결과가 Schlaeger M 등에 의해 얻어졌는데, 이들은 TIE-2 프로모터의 1.2 kb 5' 측면인접 부위(flanking region)를 분리하였고 배아 마우스의 내피세포들로 형질전환 유전자 발현이 제한되어 있는 것을 밝혔다 [Schlaeger TM 등. (1995) Development 121:1089-1098].
- [0054] 따라서, 이러한 서열들 어느 것도 모든 발달 단계의 모든 내피 세포에서 또는 성체 동물에서 균일하게 작동하지 않는다. 더욱이, 이러한 서열들 일부는 내피세포로 제한되지 않았다.
- [0055] Kong과 Crystal에 의해 제시된 다른 방법은 항-혈관신생 인자의 종양 특이적 발현을 포함하는 것이다. 비록 특정 합성 항-혈관신생 제제가 예비 임상 모델에서 독성과 연관이 있지만, 오늘날, 그러나, 내인성 항-혈관신생 제제의 제조할 형태의 독성은 아직 증명되지 않은 상태다 [Kong 및 Crystal (1998) J. Natl. Cancer Inst. 90:273-76].
- [0056] 안지오테라틴 또한 가능한 항-혈관신생 제제로 사용되어 왔다 (Folkman 등, Cell 1997 Jan 24;88(2):277-85), 그러나, 종양에서 혈관신생의 조절에 연루되는 인자가 많기 때문에, 안지오테라틴 요법 단독은 효과적이지 않을 것 같다.
- [0057] 오늘날, 임상시험으로 확실한 것은, Avastin®또는 Bay-43906®과 같은 항 혈관신생적 치료제가 종양을 둘러싸는 혈관의 새로운 성장을 제한함으로써 전이 진행을 저하시킬 수 있다는 것을 보여준 것이다. 그러나, 새로운 혈관의 형성을 저해하고 및/또는 이들을 부분적으로 파괴시키는 것은, 대부분 또는 모든 기존의 신생 혈관을 파괴하고 및 종양 피사를 이끌어 내는 극적인 항 혈관신생적 효과가 요청되는 암 병인론의 관점에서는 미흡할 수 있다.
- [0058] 예비-프로엔도텔린-1 (PPE-1) 프로모터
- [0059] Masaki 등에 의해 1988에 발견된, 엔도텔린 (ET)들은 세 개 유전자로 구성된다: ET-1, ET-2 및 ET-3. 21 개 아미노산 펩타이드인, 엔도텔린-1 (ET-1)은 시초에 내피세포에 의해 합성되는 강력한 혈관수축제 및 평활근 세포 마이토크로소로서 설명되었다. ET-1은, 평활근세포, 기도와 위장관 상피세포, 신경세포 및 사구체 혈관관 세포와 같은 다른 세포에서 일정 발현이 있지만, 맥관 내피세포에서 발현한다. 이의 발현은 저산소증, 심근질환, 염증, 천식, 당뇨 및 암과 같은 병리생리적 조건하에서 유도된다. 엔도텔린-1은 생성을 개시하고 VEGF 및 PDGF와 같은 혈관신생적 인자와 상호작용하여 혈관신생적 과정에서 역할을 한다.
- [0060] Hu 등은 엔도텔린-1 프로모터의 안티센스 본쇄 상에 위치한 저산소증 응답 요소 (HRE)를 동정하였다. 이러한 요소는 저산소증에 의해서 (인간, 래트 및 쥐 유전자의) 엔도텔린-1 프로모터를 양성적으로 조절하는 데 요구되는 저산소증-유도성 인자-1 결합 위치이다. 저산소증은 에리트로포이에틴 (Epo), VEGF, 및 다양한 당분해성 효소를 포함하는 수 가지 유전자들의 발현을 유도하는 강력한 신호이다. 핵심 서열 (8 염기쌍)은 저산소성 조건에 응답하는 모든 유전자에서 보존되어 있고 측면인접 부위는 유전자마다 상이하다. 상기 ET-1 저산소증 응답 요소는 GAT A-2 및 AP-1 결합 위치 사이에 존재한다.
- [0061] Bu 등은 쥐의 PPE-1 프로모터 (mET-1)에서 복합 조절 부위를 발견하였는바, 이는 내피세포 특이성 전사 활성을 부여하는 것으로 및 내피세포로 제한되는 단백질 또는 단백질 복합체를 결합하는 것으로 나타난다. 이러한 부위는, 내피 특이성 전사 요소로 명명되는바, 적어도 세 가지 기능적 요소로 구성되며, 쥐의 PPE-1 프로모터의 -364 bp 및 -320 bp 사이에 위치한다. 전체 활성화에 세 가지 모든 요소가 요구된다. 하나 또는 세 개 복사물이 최소 mET-1 프로모터로 구축되면, 시험관 내 내피 세포에서의 리포터 유전자 발현은 아무런 요소가 없는 최소 프로모터에 비해 2-10 배 증가 되었다. 미국 특허 번호 5,747,340 는 쥐의 PPE-1 프로모터 및 이의 부분물의 용도를 교시하고 있다. 그러나, 이 특허는 내피-특이성 인센서가 내피 특이성을 보존하면서 PPE 프로모터로 이득된 발현 정도를 증가하는데 사용될 수 있다는 사실을 암시하지도 증명하지도 않고 있다. 또한, 상기 특허는 PPE-1 프로모터가 저산소증 조건하에서는 고도의 전사 수준으로 유도된다는 것을 개시하지 않고 있다.
- [0062] 유전자-지향 효소 전구약물요법 (gene-directed enzyme prodrug therapy, GDEPT):
- [0063] 이러한 전략은 또한 "자살 유전자 요법"으로 불리 운다. 이것은 암세포 내에서 비활성 전구약물을 활성적인 세포독성 제제로 전환하는 것을 포함한다.

- [0064] GDEPT에서 가장 널리 사용되는 두 가지 유전자는 겐사이클로비르 (ganciclovir GCV) 투여와 연계된 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제 (HSV-TK) 및 5-플루오로시토신 (5FC) 투여와 연계된 E.coli 시토신 디아미나제 (CD)이다. 상기 HSV-TK/GCV 시스템은 광범위한 예비임상 평가는 물론 임상시험을 거쳤다. 오늘날, HSV-TK/GCV 시스템은 발열, GCV의 전신 독성, 골수억제 (myelosuppression) 및 연성-중간 간독성과 같은 심각한 부작용이 없는 것으로 나타난다.
- [0065] HSV-TK/GCV 시스템은 Kraiselburd 등에 의해 1976에 처음 설명되었다. HSV-TK 함유 플라스미드로 형질감염되었거나 HSV-TK 함유 벡터로 형질유도된 세포는 어싸이클로비르(acyclovir), 겐사이클로비르(GCV), 발사이클로비르 (valciclovir) 및 팜사이클로비르 (famciclovir)를 위시한 약물군에 민감하게 된다. 구아노신 유사체 GCV는 유전자 요법의 기구에서 가장 활성적인 약물이다. HSV-TK 양성 세포는 바이러스성 TK를 생산하는 데, 이는 인간 TK보다 GCV를 GCV 모노포스페이트 (GCV-MP)로 인산화시키는 데 1000배 더 효율적이다. GCV-MP는 후속적으로 천연 티미딘 키나제에 의해 GCV 디포스페이트로 그리고 마지막으로 GCV 트리포스페이트 (GCV-TP)로 인산화된다.
- [0066] GCV-TP는 신생 본쇄에 합체되어 DNA 합성 종결을 유도하고, DNA 연장을 종결하며 결국에는 세포를 죽이는 강력한 DNA 폴리머라제 저해제이다. Since GCV는 주로 HSV-TK 양성 세포에 영향을 끼치기 때문에, 이의 역효과는 희박하며 또한 최소한으로 나타나고, 주로 혈소판 감소증, 호중구감소증 및 신독성이다. 더욱이, GCV 독성은 DNA 합성에 기초하기 때문에, 이는 주로 증식 세포에 영향을 끼친다. 최근, HSV-TK/GCV 시스템은 암 유전자 요법의 임상 시험에서 광범위하게 사용되었다. 그럼에도, 그 결과는 실망 적이며, 생체 내에서 대부분 낮은 형질전환 유도 비율로 인해 제한된다.
- [0067] 최근의 연구로 HSV-TK/GCV 세포 세포독성 기작이 구체화되었다. 이러한 연구로, G2-M DNA 손상 확인점의 활성화로 인하여 말기 S 또는 G2 상에서 세포 주기가 정지된다는 것을 밝혔다. 이러한 사건들은 불가역적인 세포 죽음은 물론 세포 사와 관련된 방관자 효과로 이끈다는 것이 발견되었다. 심각한 세포 증대는 HSV-TK/GCV 시스템으로 투여된 세포에서 잘 알려진 형태 변화이다. 이러한 형태적 변화는 특이한 세포골격 재배치에 의한 것이다. 스트레스 액틴 섬유 및 두꺼운 중간 필라멘트 망들이 세포 주기 휴지 후에 나타난다.
- [0068] 상기 HSV-TK/GCV 시스템은 "방관자 효과"로 명칭 되는 증폭 잠재력을 이용한다. 방관자 효과는 HSV-TK 양성 세포가 HSV-TK 음성 세포의 살해를 유도하는 현상을 말한다.
- [0069] 방관자 효과: 방관자 효과는 Moolten 등에 의해 처음 설명되었는 바, 이들은 각각 1:9 의 HSV-TK 양성 및 HSV-TK 음성 세포 혼합물이 GCV이 첨가되면 경쟁적 세포 살해를 나타낸다는 것을 발견하였다. 몇 가지 방관자 효과는 다음과 같다:
- [0070] 1. 방관자 효과는 세포-세포 접촉에 고도로 의존적임이 발견되었다.
- [0071] 2. 이의 범위는 다른 세포 타입마다 상이하였다.
- [0072] 3. 이는 동종 세포 타입에 제한될 뿐 아니라 상이한 세포 타입의 혼합물에도 제한된다.
- [0073] 4. HSV-TK 발현이 높을수록 더 높은 방관자 효과와 연관이 있다.
- [0074] Culver 등은 생체 내 모델에서 방관자 효과를 처음으로 증명하였다. 이들은, HSV-TK 양성 세포로 상이한 비율로 이식되었을 때, 종양 퇴행이 일어남을 증명하였다. 시험관 내 모델과는 달리, 생체 내에서는, 세포-세포 접촉이 방관자 효과에 필수적이라는 것이 나타나지 않았다. Kianmanesh 등은 일부만이 HSV-TK 양성인, 다른 간 열편 (lobe)에 종양세포를 이식함으로써 원거리 방관자 효과를 증명하였다. HSV-TK 양성 및 음성 지점 둘 다는 퇴행하였다. 방관자 효과는 또한 상이한 기원의 세포 간에서 생체 내에서 증명되었다. 전반적으로, HSV-TK 및 이의 방관자 효과는 유전자 전달 시스템에서 실행될 때 종양 억제에 효과적인 수단을 용이하게 한다. 그러나, 오늘날, 임상 연구는 오로지 제한적 결과만을 증명하고 있다.
- [0075] 따라서, 피험자의 특이적 조직 부위에서 효과적으로 혈관 신생을 조절하는 데 신규한 방법을 제공하면서 그러나 종래기술의 항-혈관신생 방식을 특징짓는 독성 부작용 및 제한적인 성공률이 없는, 고도로 특이적이고, 신뢰성 있는 혈관신생-특이성 프로모터 및 핵산 작제물에 대한 필요성이 널리 인식되고 있고, 이를 가지는 것이 매우 유리하다.

발명의 내용

- [0076] 본 발명의 일 관점에 따라서, 서열번호 16에 설정된 서열의 적어도 일부분에 공유결합적으로 연결된 서열번호 15에 설정된 서열의 적어도 일부분을 포함하는 시스 (cis) 조절 요소를 포함하고, 진핵세포에서, 전사적으로 그

에 연결된 폴리뉴클레오타이드 서열의 전사를 지시할 수 있는, 분리된 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 또한 상기 분리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 작제물, 본 발명의 핵산 작제물을 포함하는 세포, 및 이러한 세포가 심겨진 스카폴드를 제공한다. 상기 분리된 폴리뉴클레오타이드는 약물로서 사용될 수 있고, 다양한 질병 및 조건을 치료하고 예방하는 약물의 제조에 사용될 수 있다.

- [0077] 전술한 바람직한 양태에서 다른 특징에 따라서, 상기 핵산 작제물은 상기 시스 조절 요소의 제어하에 놓여있는 핵산 서열을 더 포함한다. 상기 핵산 서열은 혈관신생 조절자를 더 암호화할 수 있다. 상기 핵산 작제물은 약품으로서 사용될 수 있고 다양한 질병 및 조건, 예를 들어, 조직에서 혈관신생의 조절을 위한 약물의 제조에 사용될 수 있다.
- [0078] 전술한 바람직한 양태에서 다른 특징에 따라서, 상기 핵산 서열은 VEGF, p55, 안지오프이에틴-1, bFGF 및 PDGF-BB으로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0079] 전술한 바람직한 양태에서 다른 특징에 따라서, 상기 스카폴드는 합성 폴리머, 세포 접착 분자 또는 세포 외 기질 단백질로 구성된다.
- [0080] 전술한 바람직한 양태에서 다른 특징에 따라서, 상기 합성 폴리머는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 수산화인회석 (Hydroxyapatite, HA), 폴리글리콜 산 (PGA), 편직된 폴리-1-락타이드로 강화된 엡실론-카프로락톤과 1-락트 산 [KN-PCLA], 직물 (WV-PCLA), 상호연결된-다공성 칼슘 수산화인회석 세라믹 (IP-CHA), poly D,L,-락트 산-폴리에틸렌글리콜 (PLA-PEG), 불포화 폴리에스터 폴리(프로필렌 글리콜-코-퓨마르 산) (PPF), 폴리락타이드-코-글리콜라이드 (PLAGA), 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA), 폴리-4-하이드록시부티레이트 (P4HB), 및 폴리포스파젠으로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0081] 전술한 바람직한 양태에서 다른 특징에 따라서, 상기 세포 접착 분자는 인테그린, 세포 간 접착 분자 (ICAM) 1, N-CAM, 카드헤린(cadherin), 테나신(tenascin), 지세린(gicerin), 및 신경 손상 유도 단백질 2 (닌주린2)로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0082] 전술한 바람직한 양태에서 다른 특징에 따라서, 상기 세포 외 기질 단백질은 피브리노겐, 콜라겐, 피브로넥틴, 비멘틴 (vimentin), 미세소관(microtubule)-연합 단백질 1D, 신경돌기 과생성장 인자(neurite outgrowth factor (NOF)), 박테리아 셀룰로스 (BC), 라미닌 및 젤라틴으로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0083] 본 발명의 다른 관점에 따라서, 진핵 세포에서 목적 핵산 서열을 발현시키는 방법으로서, 서열번호 16에 설정된 서열의 적어도 일부분에 공유결합적으로 연결된 서열번호 15에 설정된 서열의 적어도 일부분을 포함하는 시스 조절 요소의 전사적 조절하에 위치한 상기 목적 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물을 투여함으로써 실행되는 방법을 제공한다. 또한, 상기 핵산 작제물을 조직에 제공하여 상기 조직에서 상기 목적 핵산 서열을 발현시킬 수 있다.
- [0084] 본 발명의 다른 관점에 따라서, 조직에서 혈관신생을 조절하는 방법으로서, (a) 내피세포 특이성 프로모터; (b) 서열번호 5에 설정된 저산소증 응답 요소의 적어도 하나의 복사본; 및 (c) 혈관신생 조절자를 암호화하며, 상기 프로모터와 저산소증 응답 요소의 조절하에 있는 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물을 발현시킴으로써 실행되는, 방법을 제공한다.
- [0085] 본 발명의 다른 관점에 따라서, 조직에서 혈관신생을 조절하는 방법에 있어서, 혈관신생 조절자를 암호화하는 핵산 서열로서, 서열번호 16에 설정된 서열의 적어도 일부분에 공유결합적으로 연결된 서열번호 15에 설정된 서열의 적어도 일부분을 포함하는 시스 조절 요소의 조절하에 있는 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물을 상기 조직에서 발현시켜 상기조직에서 혈관신생을 조절함으로써 실행되는 방법.
- [0086] 전술한 바람직한 구체예의 다른 특징에 따라서, 투여는 전신적 생체 내 투여, 피험체의 몸체로부터 제거된 세포에 세포 외 투여 후 상기 세포를 피험체의 몸체로 재도입; 및 국소적 생체 내 투여로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법으로 실행된다. 또한, 제공은 생체 외 제공일수 있다.
- [0087] 전술한 바람직한 구체예의 다른 특징에 따라서, 상기 조직은 천연 또는 조작된 조직이다.
- [0088] 전술한 바람직한 구체예의 다른 특징에 따라서, 상기 핵산 서열은 친혈관신생 인자를 암호화하고 및 혈관신생을 조절하는 것은 혈관신생을 상방 조절하는 것이다.
- [0089] 전술한 바람직한 구체예의 다른 특징에 따라서, 핵산서열은 혈관신생의 저해체 또는 항-혈관신생 인자를 암호화하고 및 혈관신생을 조절하는 것은 혈관신생을 하방조절하는 것이다.

- [0090] 본 발명의 다른 관점에 따라서, (a) 세포독성 분자의 효능자(effector) 도메인에 융합된 리간드 결합 도메인을 포함하는 키메릭 폴리펩티드를 암호화하는 제 1 폴리뉴클레오타이드 부위; 및 (b) 특정 조직 또는 세포에서 상기 키메릭 폴리펩티드의 발현을 지시할 수 있는 시스 조절 요소를 암호화하는 제 2 폴리뉴클레오타이드 부위를 포함하는 핵산 작제물을 제공한다. 상기 리간드 결합 도메인은, 이것이 특정 조직이나 세포에 존재하는 리간드를 결합할 수 있고, 이러한 리간드가 상기 리간드 결합 도메인에 결합하는 것은 상기 세포독성 분자의 효능자 도메인을 활성화시키는 것으로, 선택될 수 있다. 또한 본 발명의 핵산 작제물로 형질전환된 진핵 세포를 제공한다. 상기 핵산 작제물은 약학물로서 사용될 수 있고 필요한 피험체의 조직에서 혈관신생의 조절을 위한 약물의 제조에 및 종양과, 혈관신생과 신생 맥관화와 관련된 조건과 질병의 치료와 예방에 사용될 수 있다.
- [0091] 전술한 바람직한 구체예의 다른 특징에 따라서, 상기 시스 조절 요소는 PPE-1 프로모터, PPE- 1-3x 프로모터, TIE-1 프로모터, TIE-2 프로모터, 엔도글린 프로모터, 폰빌레브란트 프로모터, KDR/flk-1 프로모터, FLT-1 프로모터, Egr-1 프로모터, ICAM-1 프로모터, VCAM-1 프로모터, PECAM-1 프로모터 및 동맥 카르복실펩티다제-유사 단백질 (ACLP) 프로모터로 구성되는 군으로부터 선택된 내피세포-특이성 또는 말초 내피세포-특이성 프로모터이다.
- [0092] 전술한 바람직한 구체예의 다른 특징에 따라서, 상기 리간드 결합 도메인은 세포-표면 수용체의 리간드-결합 도메인이다. 상기 세포-표면 수용체는 수용체 타이로신 키나제, 수용체 세린 키나제, 수용체 트레오닌 키나제, 세포 접착 분자 및 포스포타제 수용체로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0093] 전술한 바람직한 구체예의 다른 특징에 따라서, 상기 세포독성 분자는 Fas, TNFR, 및 TRAIL로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0094] 본 발명의 다른 관점에 따라서, 조직에서 혈관신생을 하방 조절하는 방법으로서, 상기 핵산 작제물을 조직에서 발현시키고 및 상기 조직에 상기 리간드 결합 도메인의 리간드를 더 제공함으로써 실행되는 방법을 제공한다.
- [0095] 본 발명의 다른 관점에 따라서, 조직에서 혈관신생을 하방 조절하는 방법으로서, 상당수의 혈관신생 세포에서 세포독성을 발생시키도록 고안되고 배열된 핵산 작제물을 상기 조직에 제공함으로써 실행되는 방법을 제공한다. 상기 핵산 작제물은 (a) 세포독성 분자의 효능자 도메인에 융합된 리간드 결합 도메인을 포함하는 키메릭 폴리펩티드를 암호화하는 제 1 폴리뉴클레오타이드 부위; 및 (b) 상당수의 혈관신생 세포에서 상기 키메릭 폴리펩티드의 발현을 지시하는 시스 조절 요소를 암호화하는 제 2 폴리뉴클레오타이드 부위를 포함한다. 상기 리간드 결합 도메인은, 이것이 상당수의 혈관신생 세포 내에 존재하는 또는 이에 제공된 리간드와 결합할 수 있고 및 상기 리간드를 상기 리간드 결합 도메인에 결합시키는 것은 상기 세포독성 분자의 효능자 도메인을 활성화시키는 것으로, 이로써 상기 조직에서 혈관신생을 하방 조절하도록, 선택된다.
- [0096] 본 발명의 다른 관점에 따라서, 조직에서 혈관신생을 하방 조절하는 방법을 제공하는바, 상기 방법은 (a) 핵산 작제물로서 (i) 세포독성 분자의, 결합 도메인에 리간드가 결합한 후 활성화되도록 선택되어진 효능자 도메인에 융합된 리간드 결합 도메인을 포함하는 키메릭 폴리펩티드를 암호화하는 제 1 폴리뉴클레오타이드 부위; 및 (ii) 상당수 혈관신생 세포에서 키메릭 폴리펩티드의 발현을 지시하는 시스 작용 조절 요소를 암호화하는 제 2 폴리뉴클레오타이드를 포함하며, 상당수 혈관신생 세포에서 세포독성을 발생하도록 고안되고 배열된 상기 핵산 작제물을 상기 조직에서 발현시키고; 및 (b) 상기 리간드를 상기 조직에 공급하여 그럼으로써 상기 조직에서 혈관신생을 하방 조절함으로써 실행된다.
- [0097] 본 발명의 다른 관점에 따라서, 활성 성분으로서, 상당수의 혈관신생 세포에서 세포독성을 나타내도록 고안되고 배열된 핵산 작제물을 및 약학적 허용 담체를 포함하는 조직에서 혈관신생을 하방 조절하는 약학적 조성물이 제공된다. 상기 핵산 작제물은 (a) 세포 독성 분자의 효능자 도메인에 융합된 리간드 결합 도메인을 포함하는 키메릭 폴리펩티드를 암호화하는 제 1 폴리뉴클레오타이드 부위; 및 (b) 상당수 혈관신생 세포에서 상기 키메릭 폴리펩티드의 발현을 지시하는 시스 조절 요소를 암호화하는 제 2 폴리뉴클레오타이드 부위를 포함하는바, 상기 리간드 결합 도메인은 특정 조직 또는 세포에 존재하는 리간드와 결합할 수 있도록 선택되어서 상기 리간드가 상기 리간드 결합 도메인에 결합하면 상기 세포독성 분자의 효능자 도메인을 활성화시킨다.
- [0098] 본 발명의 다른 관점에 따라서, 과도한 신생 맥관화와 연관된 질병이나 조건을 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 상당수의 혈관신생 세포에서 세포독성을 발생시키도록 고안되고 배열된 핵산 작제물의 치료적 유효량을 투여함으로써 실행되는바, 상기 핵산 작제물은 (i) 세포독성 분자의 효능자 도메인에 융합된 리간드 결합 도메인을 포함하는 키메릭 폴리펩티드를 암호화하는 제 1 폴리뉴클레오타이드 부위; 및 (ii) 상기 상당수 혈관신생 세포에서 상기 키메릭 폴리펩티드의 발현을 지시하는 시스 작용 조절 요소를 암호화하는 제 2 폴리뉴클레오

타이드 부위를 포함하고; 및 상기 리간드 결합 도메인은 상기 상당수 혈관신생 세포에 존재하거나 이에 제공된 리간드를 결합할 수 있게 및 상기 리간드가 상기 리간드 결합 도메인에 결합하면 상기 세포독성 분자의 효능자 도메인이 활성화되고 이로써 상기 조직에서 혈관신생을 하방 조절하고 과도한 신생 맥관화와 관련된 질병이나 조건을 치료할 수 있게 하도록 선택된다. 또한 피험체에서 종양을 치료한 방법이 제공되는바, 이 방법은 종양의 세포에서 세포독성을 발생시키도록 고안되고 배열된 핵산 작제물을 치료적 유효량으로 투여함으로써 실행된다.

[0099] 본 발명의 다른 관점에 따라서, 허혈과 관련된 질병이나 조건을 치료하는 방법이 제공되는바, 이 방법은 상당수의 혈관신생 세포에서 혈관신생을 발생하도록 고안되고 배열된 핵산 작제물을 치료적 유효량으로 투여하고, 이럼으로써 상기 조직에서 혈관신생을 상방 조절하고 허혈과 관련된 질병이나 조건을 치료하는 것으로 실행된다. 상기 핵산 작제물은 (i) 친혈관신생 인자를 암호화하는 제 1 폴리뉴클레오타이드 부위; 및 (ii) 상당수의 혈관신생 세포에서 상기 친혈관신생 인자의 발현을 지시하는 시스 조절 요소를 암호화하는 제 2 폴리뉴클레오타이드 부위를 포함한다.

[0100] 전술한 바람직한 양태의 다른 특징에 따라서, 허혈과 관련된 질병이나 조건은 상처 치유, 허혈성 뇌졸중, 허혈성 심장 질환 및 위장관 병변으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0101] 본 발명의 다른 관점에 따라서, 조직에서 혈관신생을 하방 조절하는 방법이 제공되는바, 상기 방법은: (a) 혈관신생 세포에서 세포독성을 발생하도록 고안되고 배열된 핵산작제물로서: (i) 자살 유전자를 암호화하는 제 1 폴리뉴클레오타이드 부위 및 (ii) 혈관신생 세포에서 상기 자살 유전자의 발현을 지시할 수 있는 시스 작용 조절 요소를 암호화하는 제 2 폴리뉴클레오타이드 부위를 포함하는 핵산작제물을 상기 조직에서 발현시키고; 및 (b) 상기 조직의 세포사멸을 야기하기에 충분한 양의 전구약물을 상기 조직에 제공하여 상기 전구약물이 상기 자살 유전자에 의해 독성 화합물로 전환될 때 그럼으로써 상기 조직에서 혈관신생을 하방 조절함으로써 실행된다.

[0102] 본 발명의 다른 관점에 있어서, 활성성분으로서, 혈관신생 세포에서 세포독성을 발생하도록 고안되고 배열된 핵산 작제물 및 약학적 허용 담체를 포함하는, 조직에서 혈관신생을 하방 조절하는 약학 조성물을 제공한다. 상기 핵산 작제물은 (a) 전구약물을 독성 화합물로 전환할 수 있는 자살 유전자를 암호화하는 제 1 폴리뉴클레오타이드 부위 및 (b) 혈관신생 세포에서 상기 자살 유전자의 발현을 지시할 수 있는 시스 작용 조절 요소를 암호화하는 제 2 폴리뉴클레오타이드 부위를 포함한다.

[0103] 본 발명의 다른 관점에 따라서, (a) 전구약물을 독성 화합물로 전환할 수 있는 자살 유전자를 암호화하는 제 1 폴리뉴클레오타이드 부위, 및 (b) 혈관신생 세포에서 상기 자살 유전자의 발현을 지시할 수 있는 시스 작용 조절 요소를 암호화하는 제 2 폴리뉴클레오타이드 부위를 포함하는 핵산 작제물을 제공한다. 또한 본 발명의 핵산 작제물로 형질전환된 진핵세포가 제공된다.

[0104] 본 발명의 다른 관점에 따라서, 혈관신생 세포에서 세포독성을 발생시키도록 고안되고 배열된 핵산 작제물을 피험체에 투여함으로써 수행되는, 피험체의 조직에서 혈관신생을 하방 조절하는 방법이 제공된다. 상기 핵산 작제물 (a) 자살 유전자를 암호화하는 제 1 폴리뉴클레오타이드 부위; 및 (b) 혈관신생 세포에서 상기 자살 유전자의 발현을 지시할 수 있는 시스 조절 요소를 암호화하는 제 2 폴리뉴클레오타이드 부위를 포함하며, 상기 자살 유전자는 전구약물을 세포독성을 야기할 수 있는 독성화합물로 전환시킬 수 있도록 선택되어서, 상기 조직에서 혈관신생을 하방 조절한다. 본 발명의 다른 관점에 따라서, 과도한 신생 맥관화와 관련된 질병이나 조건을 치료하는 방법을 제공하는바, 상기 방법은 혈관신생 세포에서 세포독성을 나타내도록 고안되도록 배열된 본 발명의 핵산 작제물의 치료적 유효량을 투여하여, 조직에서 혈관신생을 하방 조절하고 과도한 신생 맥관화와 연관된 질병이나 조건을 치료함으로써 수행된다.

[0105] 본 발명의 다른 관점에 따라서, 피험체에서 종양을 치료하는 방법이 제공되는바, 상기 종양의 세포에서 세포 독성을 발생시키도록 고안 및 배열되어 있고, (i) 자살 유전자를 암호화하는 제 1 폴리뉴클레오타이드 부위; 및 (ii) 상기 종양의 세포에서 상기 자살 유전자의 발현을 지시할 수 있는 시스 작용 조절 요소를 암호화하는 제 2 폴리뉴클레오타이드 부위를 포함하는 핵산 작제물의 치료적 유효량을 투여함으로써 수행되는 방법에서, 상기 자살 유전자는 상기 종양의 세포에서 세포독성을 야기시킬 수 있는 독성 화합물로 전구약물을 전환시킬 수 있도록 선택되는, 방법을 제공한다.

[0106] 전술한 바람직한 구체예의 다른 양태에 따라서, 상기 자살 유전자는 헤르페스 심플렉스 바이러스의 티미딘 키나제, 수두 대상 포진 바이러스의 티미딘 키나제 및 박테리아성 시토신 디아미나제로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0107] 전술한 바람직한 구체예의 다른 양태에 따라서, 상기 전구 약물은 겐사이클로비르, 어사이클로비르, 1-5-요오도

우라실 FIAU, 5-플루오로시토신, 6-메톡시퓨린 아라비노시드 및 이들의 유도체로 구성되는 군으로부터 선택된다.

- [0108] 전술한 바람직한 구체예의 다른 양태에 따라서, 상기 자살 유전자는 헤르페스 심플렉스 바이러스의 티미딘 키나제이고 상기 전구 약물은 겐사이클로비르, 어싸이클로비르, FIAU 또는 이들의 유도체이다.
- [0109] 전술한 바람직한 구체예의 다른 양태에 따라서, 상기 자살 유전자는 박테리아성 시토신 디아미나제이고 상기 전구약물은 5-플루오로시토신 또는 이의 유도체이다.
- [0110] 전술한 바람직한 구체예의 다른 양태에 따라서, 상기 자살 유전자는 수두 대상 포진 바이러스 티미딘 키나제이고 상기 전구약물은 6-메톡시퓨린 아라비노시드 또는 이의 유도체이다.
- [0111] 전술한 바람직한 구체예의 다른 양태에 따라서, 상기 방법은 상기 세포 독성을 상승 작용적으로 더욱 강화할 수 있는 적어도 하나의 추가적인 치료 양상을 조합적으로 포함한다. 상기 적어도 하나의 치료적 양상은 화학요법, 방사선요법, 광선요법과 광역동 요법, 수술, 영양요법, 절제 요법 (ablative therapy), 방사선 요법과 화학요법의 조합, 근접방사선 요법 (brachiotherapy), 양성자 빔 용법, 면역요법, 세포 요법, 및 양성자 빔 방사수술 요법으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0112] 후술하는 본 발명의 바람직한 양태의 다른 특징에 따라서, 상기 핵산 서열은 서열번호 16에 설정된 서열의 적어도 일부분에 공유결합적으로 연결된 서열번호 15에 설정된 서열의 적어도 일부분을 포함하는 시스 조절 요소를 포함하는, 폴리뉴클레오타이드는 이에 전사적으로 연결된 폴리뉴클레오타이드 서열의 전사를 진행 세포에서 지시할 수 있는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 서열번호 15에 설정된 서열의 상기 적어도 일부분은 상기 시스 조절 요소에서 서열번호 16에 설정된 서열의 적어도 일부분의 상류에 위치할 수 있고 또는 서열번호 16에 설정된 서열의 상기 적어도 일부분은 서열번호 15에 설정된 서열의 상기 적어도 일부분의 상류에 위치할 수 있다.
- [0113] 전술한 바람직한 양태의 다른 특징에 따라서, 상기 시스 조절 요소는 서열번호 6에 설정된 서열의 적어도 하나의 복사본 또는 서열번호 6의 적어도 두 개 복사본을 포함한다. 이러한 서열번호 6의 적어도 두 개 복사본은 인접한 것일 수 있다.
- [0114] 전술한 바람직한 양태의 다른 특징에 따라서, 서열번호 15에 설정된 서열의 적어도 일부분은 서열번호 16에 설정된 서열의 적어도 일부분에 링커 폴리뉴클레오타이드 서열을 통해 공유결합적으로 연결된다. 상기 링커 폴리뉴클레오타이드 서열은 프로모터 및/또는 인핸서 요소일 수 있다.
- [0115] 전술한 바람직한 양태의 다른 특징에 따라서, 상기 분리된 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1에 설정된 서열의 적어도 하나의 복사본을 포함한다.
- [0116] 전술한 바람직한 양태의 다른 특징에 따라서, 바람직하게는 서열번호 5에 설정된 서열의 적어도 하나의 복사본을 포함하는 저산소증 응답 요소를 더 포함한다.
- [0117] 전술한 바람직한 양태의 다른 특징에 따라서, 상기 시스 조절 요소는 서열번호 7에 설정된 바와 같은 것이다.
- [0118] 전술한 바람직한 양태의 다른 특징에 따라서, 상기 핵산 작제물은 조건적 복제 아데노바이러스 (conditionally replicating adenovirus)를 더 포함한다.
- [0119] 전술한 바람직한 양태의 다른 특징에 따라서, 상기 바이러스의 치료적 유효량은 약 10^3 내지 약 10^{16} , 바람직하게는 10^5 내지 약 10^{13} , 및 더욱 바람직하게는 10^7 내지 약 10^{12} 바이러스 입자이다.
- [0120] 다른 특징에 따라서, 상기 약학적 조성물은 적어도 10^8 바이러스 입자를 포함한다.
- [0121] 전술한 바람직한 양태의 다른 특징에 따라서, 상기 시스 조절 요소는 PPE-1 프로모터, PPE- 1-3x 프로모터, TIE-1 프로모터, TIE-2 프로모터, 엔도글린 프로모터, 폰 빌레브란트 프로모터, KDR/flk-1 프로모터, FLT-1 프로모터, Egr-1 프로모터, ICAM-1 프로모터, VCAM-1 프로모터, PECAM-1 프로모터 및 대동맥 카르복시펩티다제-유사 단백질 (ACLP) 프로모터로 구성되는 군으로부터 선택되는 내피세포-특이성 또는 말초 내피세포-특이성 프로모터이다.
- [0122] 본 발명은 신규한 인핸서 요소를 가진 시스 조절 요소를 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드 서열 및 이의 사용 방법을 제공함으로써 현재 알려진 기술의 단점을 성공적으로 극복한다. 상기 신규한 인핸서 요소는 형질전환

유전자 발현의 조직-특이성 조절용 및 유전자 요법으로 다양한 질환, 질병과 조건을 치료하는 핵산 작제물 및 약학 조성물을 만드는데 사용될 수 있다. 특히 본 발명의 상기 시스 조절 요소, 분리된 폴리뉴클레오타이드 및 약학 조성물은, 선택된 형질전환 유전자와 더불어, 내피세포에서 혈관신생을 특이적으로 상방 및/또는 하방 조절하여, 종양, 전이성 질환 및 허혈성 질환을 치료하는데 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0123]

본 발명은 본 명세서에서 오로지 예증적인 방식으로 첨부 도면을 참조하여 설명된다. 지금 도면을 상세히 참조하는바, 보여진 특정물은 예증적 방법으로써 그리고 본 발명의 바람직한 구체예를 설명적 논의의 목적으로만 나타낸 것이고, 본 발명의 원리 및 개념적 관점을 가장 유용하고 쉽게 이해하기 쉬운 서술이라고 판단되는 것을 제공한다는 이유로 제시된 것이다. 이러한 관점에서, 본 발명의 기본적인 이해에 필요한 것보다 더 상세히 본 발명의 구조적 상세 점을 제시하려고 시도하지 않으며, 그 서술은 본 발명의 몇 가지 형태가 어떻게 실제 구체화될 수 있는 것인가를 당해 분야의 숙련자에게 명백해지도록 도면을 가지고 행한다.

도면에서:

도 1a-b는 TNFR1의 세포 외 부위 및 Fas의 경막 및 세포 내 부위로부터 제작되고 및 pcDNA3 플라스미드 (a) 또는 아테노마이랄 벡터 (b)로 클론된 Fas 키메라 유전자의 모식도이다.

도 2a-b는 친-세포사멸성 유전자, Fas 키메라 및 TNFR1의 세포사멸 활성을 나타낸다. 도 2a - pcDNA-3-TNFR1 (하부) 또는 대조군 빈 벡터 (상부)로 형질감염된 소 대동맥 내피세포 (BAEC) 및 GFP를 암호화하는 발현 플라스미드를 나타낸다. 도 2b -pcDNA-3-Fas-c (하부) 또는 대조군 빈 벡터 (상부)로 형질감염된 293 세포 및 GFP를 암호화하는 발현 플라스미드를 나타낸다. 형질감염된세포들은 형광 현미경을 사용하여 볼 수 있고 세포사멸 활성은 형태적으로 결정되었다.

도 3a-f는 친-세포사멸 유전자로 형질감염된 BAEC 세포의 전자 현미경 이미지이다. 형질감염 후 24 시간에, BAEC 세포를 2.5% 글루타르알데히드에 고정시키고 가공하였다. 연속적인 세포사멸 과정 단계에 있는 세포가 제시되어 있다.

도 4는 형질감염된 BAEC 및 293 세포에서 지시된 친-세포사멸 유전자의 세포사멸 활성을 정량적으로 보여주는 막대그래프이다. 도 5a는 AdPPE-Fas-c의 PCR 분석 결과를 나타낸다. 레인 1-2 -PPE-1 프로모터 및 Fas-c 유전자를 감싸는 프라이머를 사용하여 얻은 PCR 생성물. 레인 3-4 -Fas-c 프라이머를 사용하여 얻은 PCR 생성물. 레인 5-6 -주형 DNA 부재하에서 얻은 PCR 생성물.

도 5b는 AdPPE-Fas-c 형질전환된 BAEC 세포의 웨스턴 블랏 분석 결과이다. SDS-PAGE로 단백질 샘플을 분해하고 이를 니트로셀룰로즈 막에 전이시키고, TNFR1의 세포 외 부분에 대항하는 다클론성 항체로 탐침하였다. 레인 1-2 -pcDNA3-Fas-c BAEC 형질감염된 세포 (양성 대조군). 레인 3-4 -AdPPE-Fas-c 바이러스의 지시된 MOI로 형질전환된 BAEC 세포. 레인 5 -비감염된 세포. 레인 6-7 -AdPPE-Luc의 지시된 MOI로 형질전환된 BAEC 세포.

도 6a-d는 내피세포들의 세포사멸 (apoptosis)에 대한 Fas-키메라의 과발현의 효과를 설명하는 현미경사진이다. BAEC 세포들: Ad-PPE-1-3x-Fas-키메라 (도 6a); Ad-PPE-1-3x-루시페라제 (도 6b); Ad-PPE-1-3x-Fas-키메라와 Ad-PPE-1-3x-GFP (도 6c); Ad-PPE-1-3x-루시페라제와 Ad-PPE-1-3x-GFP (도 6d)로 각각 MOI 1000으로 감염시켰다. 현미경 사진들은 감염 후 72 시간에 10배 확대하여 찍었다.

도 7 내피세포에 대한 Ad-PPE-1-3x-Fas-키메라의 특이성 세포사멸 효과를 설명하는 막대 그래프이다. 내피세포 (BAEC, HUVEC) 및 비-내피세포 (정상 피부섬유아세포-NSF)의 생존성은 Ad-PPE-1-3x-Fas-키메라 또는 대조군 (루시페라제) 바이러스로 감염 후 72 시간에 결정 바이올렛 염색으로 정량하였다.

도 8은 Fas-키메라 매개 세포사멸에 대한 TNF α 투여의 용량 응답 효과를 나타낸다. BAEC을 Ad-PPE-1-3x-Fas-c로 감염시켰다. 감염 후 48시간에 TNF를 성장 배지에 (지시된 용량으로) 첨가하였다. 이 후 24 시간에 크리스탈 바이올렛 분석으로 생존성을 결정하였다.

도 9a-e는 TNF α 리간드 및 Fas-c 수용체의 협력 작용에 의해 매개되는 내피세포-특이성 세포사멸을 설명하는 현미경사진이다. 제시된 세포들은 Ad-PPE-1-3x-Fas-c로 감염 후 48 시간에 TNF α (10 ng/ml)의 존재 또는 부재하에서 배양하였다; 크리스탈 바이올렛 염색은 감염 후 72 시간에서 수행하였다.

도 10a는 내피세포에 대한 Ad-CMV-Fas-c의 TNF α -의존성 세포사멸 효과를 설명하는 용량 응답성 곡선이다. Ad-CMV-Fas-키메라의 지시된 MOI로 감염된 BAEC 세포의 활성은 TNF α 와 배양한 후 결정하였다.

도 10b-d는 비-내피세포 NSF에 대한 TNF α 리간드와 Ad-CMV-Fas-키메라의 세포사멸 효과를 나타낸다. 도 10b - 대조군 바이러스로 감염된 NSF. 도 10c - Ad-CMV-Fas-키메라로 감염된 NSF. 도 10d - Ad-CMV-Fas-키메라로 감염되고 TNF α (10 ng/ml)와 배양된 NSF.

도 11 a-c는 Ad-PPE-1-3x-Fas-c의 생체 내 항종양 효과를 나타낸다. B16 흑색종 세포로 접종한 마우스에, 종양이 뚜렷해졌을 때, Ad-PPE-1-3x-Fas-c, Ad-CMV-Fas-키메라, 대조군 바이러스 또는 식염수를 정맥주사하였다.

도 11a - 치료기간 중 측정된 종양 면적. 도 11b - 치료기간 말기의 종양 무게. Fig 11c - Ad-PPE-1-3x-Fas-c 처리 마우스 및 대조군 마우스에서의 종양 상태를 나타내는 그림.

도 12는 B2B 세포주 (엔도텔린을 발현하는 기관지 세포주)를 대조군으로 사용하여, 소 및 인간 내피세포에서 루시페라제 발현에 대한 본 발명의 인헨서 요소의 효과를 나타내는 막대그래프이다.

도 13은 다양한 세포주에서 루시페라제 발현에 대한 아데노바이러스 벡터 내의 본 발명의 프로모터의 내피세포 특이성을 나타내는 막대그래프이다.

도 14A-B는 BAEC 세포주에서 본 발명 (14A) 및 Ad5CMV (14B) 대조군 작제물의 조절하에서 GFP 발현을 설명하는 현미경사진이다.

도 15는 내피세포 및 비-내피세포에서 pACPPE-1-3Xp55, pACPPE-1-3X루시페라제 및 pCCMVp55 에 의해 유도된 % 세포사멸의 막대그래프이다.

도 16은 본 발명의 인헨서 요소를 프로모터 작제물에 도입시 저산소증 응답에 대한 효과를 나타내는 막대그래프이다.

도 17은 본 발명의 인헨서 요소를 아데노벡터 작제물의 프로모터로 도입시 저산소증 응답에 대한 효과를 나타내는 막대그래프이다.

도 18은 본 발명의 인헨서 요소를 프로모터에 도입시 소 및 인간 내피, 엔도텔린 발현 세포주에서의 발현 수준에 대한 효과를 나타내는 막대그래프이다.

도 19 는 내피 프로모터 (PPE-1) 또는 대조군 (CMV) 프로모터를 함유하는 아데노바이러스 작제물을 주입 후, 다양한 기관에서 관찰되는 리포터 유전자의 발현 수준을 나타내는 막대그래프이다.

도 20A-B는 Ad5CMVGFP 작제물 (도 20A)과 Ad5PPE-1-GFP 작제물 (도 20B)로 주입된 마우스의 간 조직에서의 그 작제물들의 세포 발현을 나타내는 현미경 사진이다.

도 21은 본 발명의 인헨서 요소를 프로모터로 도입시 내피 및 비-내피 세포주에서의 발현 수준에 대한 효과를 나타내는 막대그래프이다.

도 22는 본 발명의 인헨서 요소를 프로모터에 도입시 내피 및 비-내피세포주에서 발현 수준에 대한 효과를 나타내는 막대그래프이다.

도 23 A-C은 각각 Ad5PPE-1-3XGFP 형질전환유도 세포, Ad5PPE-1GFP 형질전환유도세포 및 Ad5CMVGFP 형질전환유도 세포에서 GFP 발현을 나타내는 현미경사진이다.

도 24 A-B는 각각 Ad5PPE-1-3XGFP 및 Ad5CMVGFP의 moi-1에 의해 유도된 SMC에서의 GFP 발현을 나타낸다.

도 25 A-B는 HeLa 세포에서 행해진 도 24 A-B와 유사한 실험 결과를 나타낸다.

도 26A-B는 HepG2 세포에서 행해진 도 24A-B와 유사한 실험결과를 나타낸다.

도 27A-B는 NSF 세포에서 행해진 도 24A-B와 유사한 실험결과를 나타낸다.

도 28A-B는 Ad5PPE-1GFP 및 Ad5PPE-1-3XGFP 작제물로 각각 주입된 마우스의 혈관에 붙은 내피세포에서의 GFP 발현을 나타내는 현미경사진이다.

도 29A-C는 주사된 마우스의 신장세포의 결과를 나타내는 현미경사진이다. Ad5CMVGFP 주사된 마우스 (도 29A), Ad5PPE-1GFP (도 29B; 혈관벽에 약간 높은 GFP 발현이 보여 짐; 화살표 표시) 및 Ad5PPE-1-3XGFP (도 29C).

도 30A-C는 비장 조직 편에서 수행된, 도 29A-C에서 도시된 것과 유사한 실험을 나타낸다.

도 31A-D는 식염수 주입 대조군 마우스(도 31A), Ad5CMVGFP 주입 마우스(도 31 B), Ad5PPE-1GFP 주입 마우스

(도 31 C) 및 Ad5PPE-1-3XGFP 주입 마우스 (도 31D)의 전이성 폐에서의 GFP 발현을 나타낸다. 항 Cd31 면역염색(도 31C' 내지 31D')하여 GFP 발현 및 CD31 발현이 각 전이성 조직에서 같이 국소화 되어 있음이 밝혀진다.

도 32는 쥐 PPE-1 프로모터를 함유하는 플라즈미드에 의해 형질감염된 BAEC에서의 루시페라제 활성 (광 units/ μ g 단백질)이 형질전환 세포가 저산소증 조건하에서 배양될 때 훨씬 높다는 것을 나타내는 막대그래프이다.

도 33은 Ad5PPE-1Luc 및 Ad5CMVLuc가 사용된 것을 제외하고는 도 32와 동일한 막대그래프이다.

도 34 는 상이한 세포주에서 저산소증효과를 나타내는 도 33과 동일한 막대그래프이다.

도 35는 BAEC 세포에서 PPE-1 저산소증 응답에 대한 본 발명의 3X 서열의 효과를 나타내는 막대그래프이다. 세포들은 Ad5PPE-1Luc 및 Ad5PPE-1-3XLuc에 의해 형질유도되었다.

도 36은 대퇴동맥 절찰 후 PPE-1-Luc 형질전환 마우스의 다양한 조직에서 루시페라제 발현 수준을 나타내는 막대그래프이다.

도 37A-B는 본 발명과 연계하여 사용된 작제물의 플라즈미드 지도이다.

도 38A-F는 마우스 허혈성 사지에서 혈액관류 및 혈관신생에 대한 Ad5PPE-1-3XVEGF 및 Ad5CMVVEGF의 효과를 나타낸다. 도 38A-D는 절찰 후 21일에서, 여러 가지 처치 군의 마우스의 허혈성 사지에서 관류시 대표적인 초음파 (US) 혈관촬영 영상이다. 노란 신호는 강렬한 관류를 나타낸다. 영상의 우편은 사지의 원거리 말단부를 나타낸다. 도 38 A - Ad5 PPE-1-3XVEGF 처리 마우스; 도 38B - Ad5CMVVEGF 처리 마우스; 도 38C - 대조군, 식염수 처리 마우스; 도 38D - 대조군, 정상적 사지. 도 38E-F는 다양한 처리군의 US 영상에서의 평균 강도 (도 38E); 다양한 처리군에서 CD31+ 세포/ mm^2 의 수로 측정된 평균 모세관 농도 (도 38F)를 나타내는 막대그래프이다.

도 39는 Ad5PPE-1Luc (흰 막대) 및 Ad5CMVLuc (검은 막대)로 형질유도된 증식하는 및 정지상태 소 동맥 내피세포 (BAEC)에서의 루시페라제 활성을 나타내는 막대그래프이다.

도 40은 Ad5PPE-1Luc로 형질유도된 BAEC에서의 루시페라제 활성을 정상적 증식, 정지 상태 및 VEGF 첨가 후 빠른 증식 동안에 나타난 막대그래프이다.

도 41A-B는 Ad5PPE-1Luc 및 Ad5CMVLuc 정상 주입 C57BL/6 마우스의 동맥 (도 41A) 및 간(도 41B)에서의 루시페라제 활성 (광 units/ μ g 단백질)을 설명하는 막대그래프이다. 활성은 주사 후 1 (n=13), 5 (n=34), 14 (n=32), 30 (n=20) 및 90 (n=11) 일 후에 측정하였다.

도 42A-B는 정상적인 주입 BALB/C 마우스에서 Ad5PPE-1Luc (흰막대) 또는 Ad5CMVLuc (검은 막대) 주입 후 5일 (도 42A) 및 14일 (도 42B) (각 시점에서 n=10) 후 검출된 상대적인 루시페라제 활성 (광 units/ μ g 단백질)을 나타내는 막대그래프이다. 활성은 각 동물의 전체 몸체의 루시페라제 발현 백분율로서 표시되어 있다.

도 43은 수단-IV에 의해 착색된, ApoE 결핍 마우스로부터 분리된 동맥을 나타내는 종래 기술 영상이다. 이러한 기관지 동맥은 붉게 염색된 아테롬성 동맥경화 병변을 적게 포함하는 반면 복부 부위는 붉게 염색된 아테롬성 동맥경화 병변이 많다 (출처 Aortic atherosclerotic lesions by 125 I-HDL 및 125 I-BSA. A. Shaish 등, Pathobiology 2001;69:225-29).

도 44는 ApoE 결핍 마우스에 Ad5PPE-1Luc (흰막대; n=12) 또는 Ad5CMVLuc (검은막대; n=12)를 전신 주사한 후 5일에 검출된 절대 루시페라제 활성 (광 units/ μ g 단백질)을 설명하는 막대그래프이다. 복부 동맥으로부터 관찰된 루시페라제 활성은 높은 병변 수준을 포함하며 기관지 지역으로부터 관찰된 것은 적은 병변 수준을 포함한다.

도 45는 Ad5PPE-1Luc (검은 막대) 또는 Ad5CMVLuc (흰막대)를 상치 치유 C57BL/6 유도 마우스에 전신 주사 후 5일에 검출된 절대 루시페라제 활성(광 units/ μ g 단백질)을 나타내는 막대 그래프이다.

도 46는 루이스 폐 암종-유도 마우스의 정상 폐, 전이성 폐 및 일차 종양에서 루시페라제 활성을 나타내는 막대 그래프이다. 루이스 폐암종은 D 122-96 세포를 일차 종양 모델에 대하여는 등에 및 전이성 모델에 대해서는 발 부분에 주사하여 유도되었다. 루시페라제 활성은 Ad5PPE-1Luc (n=9; 흰 막대) 또는 Ad5CMVLuc (n=12; 검은 막대)를 전신 주사 후 5일에 측정되었다. 활성은 광 units/ μ g 단백질로 표시된다.

도 47A-D는 Ad5PPE-1GFP를 내종양 주사 후 LLC 를 가진 마우스의 폐와 종양에서의 GFP 발현 및 조직 형태를 나타내는 현미경 사진이다. 조직을 OCT에서 동결시키고 저온장치 (cryostat)으로 10 μ m로 절단하였다. 모든 사진

은 25 배율로 찍었다. 도 47A - 폐 전이의 신생 혈관에서의 GFP; 도 47B - 도 47A에서 찍은 단편의 CD31 항체 면역염색; 도 47C - 일차 종양의 혈관에서의 GFP 발현; 도 47D - 혈관을 나타내는 C의 단편물 위상차 사진.

도 48은 Ad5CMVLuc, Ad5PPE-1Luc 및 Ad5PPE-1-3X-Luc 로 주입된, 루이스 폐 암종-유도 마우스의 정상 폐 및 전이 폐에서의 루시페라제 발현을 나타내는 막대그래프이다. 루이스 폐 암종은 전이성 모델에 대해서는 발바닥에 D122-96 세포를 주입하여 유도되었다. 루시페라제 활성은 Ad5CMVLuc (n=7; 검은 막대), Ad5PPE-1Luc (n=6; 회색 막대), 또는 Ad5PPE-1-3XLuc (n=13; 갈색 막대)의 전신 주사 후 5일 후에 측정되었다. 활성은 광 units/ μ g 단백질로 표시되어 있다.

도 49는 Ad5CMV, Ad5PPE-1Luc 및 Ad5PPE-1 (3X)로 주사된 루이스 폐 암종-유도 마우스의 정상 폐 및 전이 폐에서 간 활성의 백분율(간이 100%)로 루시페라제 활성을 나타내는 막대그래프이다.

도 50A-B은 Ad5PPE-1-3X-GFP로 주사된 LLC 폐 전이를 가지는 마우스에서 GFP 발현(도 50A) 및 CD31 면역염색(도 50B)의 공동 현상을 나타내는 현미경사진이다.

도 51은 대퇴결찰 후 2, 5, 10 및 18일 후 PPE-1 루시페라제 형질전환 마우스의 근육(허혈성 및 정상)에서 및 대조군(무 - 결찰 동물 - day 0; 군당 n=8)에서 루시페라제 활성(광 units/ μ g 단백질)을 나타내는 막대그래프이다.

도 52는 대퇴결찰 후 5(n=6), 10(n=6) 및 18(n=8) 일 후 PPE-1 루시페라제 형질전환 마우스의 간, 폐 및 동맥에서(허혈성 및 정상)에서 및 대조군(무 - 결찰 동물 - day 0)에서 루시페라제 활성(광 units/ μ g 단백질)을 나타내는 막대그래프이다.

도 53은 Ad5CMVLuc (검은 막대) 또는 Ad5PPE-1Luc (흰 막대)로 주사한 LLC 마우스의 간, 폐 및 일차 종양에서 검출된 루시페라제 활성(광 units/ μ g 단백질)을 나타내는 막대그래프이다.

도 54A-H는 다양한 형질전환 유전자의 조직-특이성 또는 구성성 발현의 조직 분포를 나타내는 인-시츄 하이브리드화 영상이다. 도 54A-C는 A, Ad5PPE-1-3XVEGF 처리 마우스; B, Ad5CMVVEGF 처리 마우스; C, 식염수 처리 마우스 얻은 대표적인 허혈성 근육상에서; D, Ad5CMVVEGF 처리 마우스로부터 얻은 간 절편 상에서 VEGF 특이성 안티센스 탐침자와의 인-시츄 하이브리드화를 나타낸다. 화살표는 양성 염색 세포를 가르킨다. 도 54E-G는 E, Ad5PPE-1-3XPDGF-B 처리 마우스; F, Ad5 CMVPDGF-B 처리 마우스; G, 식염수 처리 마우스의 대표적인 허혈성 근육 상에서; H, Ad5CMVPDGF-B 처리 마우스로부터 얻는 간 절편 상에서의 PDGF-B 특이성 안티센스 탐침자와의 인-시츄 하이브리드화를 나타낸다.

도 55 A-B는 마우스 허혈성 사지에서 혈액 관류 및 혈관신생에 대한 Ad5PPE-1-3XVEGF 또는 Ad5CMVVEGF의 장기 효과를 나타내는 막대그래프이다. A, 대퇴동맥 결찰 후 50일 후에 다양한 처리 군의 US 영상에서의 신호 평균 강도. B, 대퇴동맥 결찰 후 70일 후 다양한 처리 군에서 $CD31^{+}$ cells/mm²의 수로 측정된 평균 모세혈관 농도. 도 56A-D는 마우스 허혈 사지에서 신생 맥관화에 대한 Ad5PPE-1-3XPDGF-B의 초기 및 장기 효과를 나타내는 막대 그래프이다. 도 56A-B - US 영상에 의해 측정된 평균 관류 강도 (56A, 대퇴동맥 결찰 30일 후; 56B, 대퇴동맥 결찰 80일 후). 도 56C-D - 다양한 처리군에서 $CD31^{+}$ cells/mm²의 수로 측정된 평균 모세혈관 밀도 (56C, 대퇴동맥 결찰 35일 후; 56D, 대퇴동맥 결찰 90일 후).

도 57A-G은 마우스 허혈성 사지에서 내피 특이성 또는 구성성 프로모터의 조절하에서 PDGF-B 및 VEGF를 단독으로 또는 조합하여 사용하는 혈관신생 요법의 신생맥관화 및 혈류에 대한 장기 효과를 나타낸다. A, 대퇴동맥 결찰 80일 후, 다양한 처리군의 US 영상에서의 신호의 평균 강도. B, 대퇴동맥 결찰 90일 후, 다양한 처리군에서 $CD31^{+}$ 세포/mm²의 수로 측정된, 평균 모세혈관 밀도. 도 57C-G - 대퇴동맥 결찰 90일 후 허혈성 사지 근육에서 평활근 세포의 성숙 혈관으로의 보강. 평활근 세포는 항- α -SM액틴 항체로 면역염색되었다 (붉은색, X20). C, Ad5PPE-1-3XPDGF-B 처리 마우스; D, 조합 요법 처리 마우스; E, Ad5PPE-1-3XVEGF 처리 마우스; F, 대조군, Ad5PPE-1-3XGFP 처리 마우스; G, 정상 대측 사지 (큰 혈관만이 염색되었음을 주지).

도 58은 동맥 결찰 50일 후 마우스 허혈성 사지에서 혈액 관류에 대한 PDGF-B 단독 또는 친혈관신생 인자 VEGF와 조합된 효과를 나타낸다.

도 59는 유전자-지향 전구약물 요법 (GDEPT)의 기본 원리를 나타내는 모식도이다.

도 60 A-B은 플라스미드 pEL8(3x)-TK의 제작을 나타내는 모식지도이다. 도 60A는 플라스미드 pEL8(3x)-TK의 제

조를 나타내는 모식지도이다. 도 60B는 플라스미드 pACPPE-1(3x)-TK의 지도이다.

도 61은 AdPPE-1 (3x)-TK 벡터의 PCR 생성물을 아가로스 젤에서 분리하여 UV 형광으로 가시화한 것이다. 두 프라이머를 사용하였다: 순방향 프라이머 5'-ctcttgattcttgaactctg-3' (프리-프로오펜도텔린 프로모터 서열 내의 455-474 bp) (서열번호 9) 및 역방향 프라이머 5'-taaggcatgccattgttat-3' (HSV-TK 유전자 서열 내의 1065-1084 bp)(서열번호 10). 다른 벡터에 특이적인 프라이머는 PCR 생성물을 나타내지 않는다. AdPPE-1 (3x)-TK 바이러스 내에 PPE-1(3x) 프로모터와 HSV-TK 유전자의 존재를 증명하는 1 kb 밴드를 주목. 레인 1: 100 bp 크기 마커. 레인 2: pACPPE-1 (3x)-TK 플라스미드. 레인 3: AdPPE-1(3x)-TK 바이러스. 레인 4. DNA 없음.

도 62A-C는 AdPPE-1(3x)-TK (도 62a), AdPPE-1(3x)-Luc (도 62b) 및 AdCMV-TK(도 62c) 벡터들의 선형 모식도를 나타낸다.

도 63은 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절하에서 TK의 뛰어난 세포독성을 나타내는 일련의 현미경 사진이다. 소 동맥 내피세포들 (BAECs)은 0.1, 1, 10, 100, 및 1000의 MOI AdPPE-1(3x)-TK, AdCMV-TK 및 AdPPE-1(3x)-Luc로 형질 유도되었다. GCV (1 μ g/ml)를 형질유도 4 시간 후 첨가하였다. 대조군은 GCV없는 벡터로 또는 벡터없는 GCV로 형질유도하였다. 실험은 96-웰 플레이트에서 매 그룹당 12개 웰에 두 번씩 실행하였다. 양쪽 대조군 둘 다 세포 죽음을 유도하지 않았다 (데이터 미도시). AdPPE-1 (3x) + GCV-처리 세포에서는 AdCMV-TK보다 상당히 낮은 m.o.i.로 세포독성 (세포 증대, 연장 및 팽창) 및 세포독성 (집합성 상실) 사건에 특징적인 형태 변화를 주목. AdPPE-1 (3x)-Luc로 형질유도된 건강하게 남아있다 (작은 크기, 둥글게되고 모여있음).

도 64는 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절하에서 TK의 내피세포 세포독성을 도식한 도면이다. BAEC를 96-웰 플레이트에서 준비하고 도 13에서와 같이 형질유도하고, 이후 4 시간 후에 1 μ g/ml GCV를 첨가하였다. 벡터 첨가 10일 후, 세포활성을 크리스탈 바이올렛 염색으로 측정하였다. 높은 m.o.i.에서 AdPPE-1 (3x)+GCV 의 뛰어난 세포독성을 주목.

도 65은 PPE-1 (3x) 프로모터 조절하의 TK의 내피세포 세포독성과 겐사이클로비르 투여의 뛰어난 상승작용을 나타내는 일련의 현미경사진이다. 소 동맥 내피세포들 (BAECs)을 10 m.o.i.에서 전술한 바와 같이, AdPPE-1(3x)-TK, AdCMV-TK 및 AdPPE-1(3x)-Luc로 형질유도하였고, GCV의 증가 농도 (0.001-10 μ g/ml, 지시된 바와 같이)에 노출하고, 형질유도 4 시간 후에 첨가하였다. 대조군은 GCV 없는 벡터 또는 벡터없는 GCV로 형질유도하였다. 실험은 96-웰 플레이트에서 매 그룹당 12개 웰에 두 번씩 실행하였다. 양쪽 대조군 둘 다 세포 죽음을 유도하지 않았다 (데이터 미도시). AdPPE-1 (3x)+ GCV-처리 세포에서는 AdCMV-TK에 노출된 세포보다 상당히 낮은 농도의 GCV에서 세포독성 (세포 증대, 연장 및 팽창) 및 세포독성 (집합성 상실) 사건에 특징적인 형태 변화를 주목.

도 66은 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절하에서 TK의 내피세포 세포독성 및 겐사이클로비르 투여의 상승작용을 나타내는 그래프이다. BAEC를 96-웰 플레이트에서 준비하고 도 65에서와 같이 형질유도하고, 이후 4 시간 후에 1 μ g/ml 증가 농도 (0.0001-10 μ g/ml)의 GCV를 첨가하였다. 벡터 첨가 10일 후, 세포활성을 크리스탈 바이올렛 염색으로 측정하였다. 0.01 μ g/ml 이상의 GCV 농도에서 AdCMV-TK의 강력한 구성성 TK 발현에 비하여 AdPPE-1 (3x) + GCV 의 뛰어난 세포독성을 주목.

도 67은 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절하의 TK의 내피세포 세포독성과 겐사이클로비르 투여의 특이성, 상승적 효과를 나타내는 일련의 현미경사진이다. 내피 [소 동맥 내피세포 (BAEC), 인간 제대정맥 내피세포 (HUVEC)] 및 비 내피세포 [인간 간종양 세포 (HepG-2), 인간 정상 피부 섬유아세포 (NSF)]를 AdPPE-1 (3x)-TK, AdPPE-1 (3x)-Luc 또는 AdCMV-TK로 10의 m.o.i.에서 형질유도하고 4 시간 후에 1 μ g/ml GCV를 투여하였다. 실험은 96-웰 플레이트에서 매 그룹당 12개 웰에 두 번씩 실행하였다. 형질 유도 4일 후 세포독성 및 세포 형태 변화를 현미경으로 관측하였다. BAEC 및 HUVEC 배양물에서 AdPPE-1 (3x)-TK, + GCV의 탁월한 세포독성 효과 [세포독성 (세포 증대, 연장 및 팽창) 및 세포독성 (집합성 상실)에 특징적인 형태 변화], 및 HepG-2 및 NSF 배양물에서 이의 부재(세포는 작고, 둥글고 집합적으로 남아있음)를 주목. AdPPE-1 (3x)-Luc + GCV 는 모든 세포 유형에 비 독성적이었다.

도 68은 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절하의 TK의 내피세포 세포독성과 겐사이클로비르 투여의 특이성, 상승적 효과를 나타내는 일련의 현미경사진이다. 내피 (BAEC 및 HUVEC) 및 비-내피 (HepG-2 및 NSF) 세포를 96-웰 플레이트에서 준비하고 도 67에서와 같이 형질유도하고, 이후 4 시간 후에 점차 증가되는 농도 (1 μ g/ml)의 GCV를 첨가하였다. 벡터 첨가 10일 후, 세포 활성을 크리스탈 바이올렛 염색법으로 측정하였다. AdCMV-TK + GCV 의 비 특이성 세포 독성과 비교하여, AdPPE-1 (3x) + GCV의 뛰어난 내피세포 특이성 세포독성을 주목.

도 69는 극단적 m.o.i.에서 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절하의 TK의 내피 선택성 세포 독성과 겐사이클로비르 투

여를 나타내는 일련의 현미경 사진이다. 비-내피 (NSF) 세포들은 100 이상의 m.o.i.에서 도 66에서와 같이 AdPPE-1 (3 x)-TK, AdPPE-1 (3x)-Luc 또는 AdCMV-TK로 형질 유도하고, 이 후 4 시간 후에 1 μ g/ml GCV를 투여 하였다. 실험은 96-웰 플레이트에서 매 그룹당 12개 웰에 두 번씩 실행하였다. 형질 유도 4일 후에 세포 독성 및 세포 형태 변화를 현미경으로 관찰하였다. AdCMV-TK +GCV의 비-특이성 세포 독성에 대비하여, AdPPE-1 (3 x)-TK + GCV의 NSF 세포 형태에 대한 효과가 없음을 주목하라.

도 70은 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하의 TK의 생체 내 발현 및 겐사이클로비르 (GCV) 투여에 의한 전이성 성장을 상승적으로 억제하는 것을 나타내는 일련의 사진이다. 루이스 폐 암의 폐 전이는 14 주령 수컷 C57BL/6 마우스 (n=77)의 원발 바닥에 LLC 종양을 접종하여 도입하였고, 일차 종양이 7 mm 크기가 되었을 때 절제하였다. 5일 후, 10^{11} PFU의 상기 아데노바이러스 벡터 [AdPPE-1 (3 x)-TK + GCV; AdCMV-TK + GCV; GCV 없는 AdPPE-1 (3 x)-TK]를 꼬리 정맥에 주사하고, 14 일 동안 100 mg/kg GCV를 주사하였다. 벡터 주사 후 24일째에 마우스를 희생시키고 폐를 절제하여 조사 분석하였다. 대조군 마우스는 식염수와 GCV로 처리된 것이다. AdCMV-TK + GCV, GCV 없는 AdPPE-1 및 아데노바이러스 없는 GCV로 처리된 마우스의 것과 대비하여, AdPPE-1 (3x) + GCV로 처리된 마우스의 폐에서 나타나는 전이상태 전파의 정도가 상당히 감소된 것에 주목.

도 71은 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절하에서 TK의 생체 내 발현 및 겐사이클로비르 (GCV) 투여에 의한 전이성 성장의 억제의 상승적 효과를 나타내는 막대그래프이다. 폐 전이를 C57BL/6 마우스에 도입하고 이 마우스를 전술한 바와 같이 10^{11} PFU의 아데노바이러스 벡터 [AdPPE-1 (3 x)-TK + GCV; AdCMV-TK + GCV; GCV없는 AdPPE-1 (3x)-TK] 및 GCV (100 mg/kg)로 처리하였다. 마우스를 벡터 주입 후 24일째에 희생시키고 폐를 제거하여 폐 전이에 대하여 조사하였다. 대조군은 식염수 및 GCV로 처리되었다. 전이성 덩어리에서 무 GCV (85% 이상)와 AdCMV-TK + GCV 및 식염수 + GCV 대조군 (75% 이상)와 대비하여, AdPPE-1 (3x) + GCV-처리마우스에서의 전이성 덩어리가 상당히 억제되었음을 주목.

도 72a-72c는 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 생체 내 발현 및 겐사이클로비르 (GCV) 투여에 의한, 전이성 병인의 억제에 대한 상승적 효과를 나타내는 폐 전이의 단편물에 대한 조직병원 양태를 보여준다. 폐 전이는 C57BL/6 마우스에 도입되었고 이 마우스는 10^{11} PFU의 아데노바이러스 벡터들 [AdPPE-1 (3 x)-TK + GCV; AdCMV-TK + GCV; GCV없는 AdPPE-1 (3x)-TK] 및 GCV (100 mg/kg)로 전술한 바와 같이 처리하였다. 벡터 주사 후 24일째에 마우스를 희생시켰고 폐 전이 조직 (도 72a 및 72b) 또는 폐 조직 (도 72c)를 절단하고 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. AdPPE-1 (3x) + GCV 투여된 폐로부터 얻어진 전이물에서 대규모 중앙 괴사 및 상당수의 무리의 단핵세포 침입물에 주목 (도 72a 및 72b).

도 73a-73b는 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 생체 내 발현 및 겐사이클로비르 (GCV) 투여에 의한 중앙 세포사멸의 상승적 증강효과를 보여주는, TUNEL과 항-카스파제-3으로 염색된 LLC 폐 전이물 절편의 조직병리를 나타낸다. 도 71a-71b에서 설명된 바와 같이 유도되고 준비된 LLC 폐 전이물의 절편을 고정하고 파라핀에 매립한 후, AdPPE-1 (3x)-TK+GCV를 정맥 내 주사한 폐 전이물에서 향상된 세포사멸에 주목.

도 74a 및 74b는 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 생체 내 발현과 겐사이클로비르 (GCV) 투여에 의한 내피세포-특이성 중앙 세포사멸에 대한 상승 효과를 보여주는, TUNEL 및 항-카스파제-3로 염색된, 유도된 LLC 폐 전이물 절편의 조직병리를 나타낸다. 도 73a-73b에서 설명된 바와 같이 유도되고 제조된 LLC 폐 전이물의 절편을 고정하고 파라핀에 매립한 후, 클레노우-FragE1 (Oncogene, Cambridge, MA) (도 74a) 및 항-카스파제-3-특이성 면역조직병리 (74b)를 사용하는 데옥시뉴클레오타이드 트랜스퍼라제-매개 dUTP-닉 말단-표지법 (TUNEL)으로 세포사멸의 표식에 대하여 분석하였다. 검은 화살은 적혈구를, 붉은 화살은 세포사멸성 내피세포를, 흰 화살은 세포사멸성 중앙 세포를 나타낸다. AdPPE-1 (3x)-TK+GCV를 정맥 내 투여한 마우스로부터 얻은 폐 전이물의 혈관 (내피) 부위에서의 세포사멸이 증가됨에 주목.

도 75a-75d는 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 생체 내 발현 및 겐사이클로비르 (GCV) 투여에 의해 내피세포-특이성 혈관신생의 상승적 저해 효과를 보여주는, 쥐의 폐암종으로부터 얻은 절편의 면역병리를 나타낸다. 도 73a-73b에서 설명된 바와 같이 유도되고 제조된, LLC 폐 전이물 (도 75a), 간 (도 75c) 및 정상적인 폐 조직 (도 75b)의 절편을 고정하고 파라핀에 매립하고, 항-CD-31 면역형광법으로 혈관신생의 표식을 분석하였다. AdPPE-1 (3x)-TK + GCV로 처리한 마우스로부터 얻은 폐 전이물에서 짧고 희미한 혈관에 그리고 혈관의 연속성과 가지화가 없는 것에 주목. 도 75d는 폐 전이물 맥관화 (혈관신생)의 혈관 밀도를 컴퓨터-기반으로 (Image Pro-Plus, Media Cybernetics Incorporated) 측정한 막대 그래프이다. 좌측 막대: AdPPE-1 (3x)TK+GCV; 우측 막대: AdPPE-1 (3 x)TK, GCV 무처리.

도 76은 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 생체 내 발현 및 겐사이클로비르 (GCV) 투여시 간독성이 없는 것을 보여주는, 쥐의 간으로부터 얻은 조직의 절편의 조직병리를 나타낸다. 도 73a-73b에서 설명된 바와 같이 유도되고 제조된, LLC 폐 전이물을 포함하는 마우스의 간으로부터 얻은 절편을 고정하고 파라핀에 매립한 후 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. 구성적으로 발현된 AdCMV-TK +GCV (우측)으로 처리된 마우스의 간에서의 심각한 세포독성과 대비하여, AdPPE-1-TK+GC V (3x) (좌측)으로 처리된 마우스로부터 얻은 간에서의 세포 독성 징후가 없는 것에 주목.

도 77은 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 기관-특이성 발현과 겐사이클로비르 (GCV) 투여를 보여주는 RT-PCR 분석을 나타낸다. 도 73a- 73b에서 설명된 바와 같이 15 주령 수컷C57BL/6 마우스 9 마리에 LLC 폐 전이를 유도하고 만들었다. 아테노바이러스 벡터 [AdPPE-1 (3x)-TK 및 AdCMV-TK], 및 식염수 대조군은 일차 종양 제거 14일 후 정맥으로 주사하였다. 벡터 주사 6일 후에 마우스를 희생시키고 기관들을 수집하였다. 다른 기관들의 RNA를 후술하는 바와 같이 추출하고, PPE-1 (3x) 프로모터와 HSV-TK 유전자 프라이머를 사용하여 PPE-1 (3x) 및HSV-TK 전사체를 RT-PCR로 증폭하였다. PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 내피세포-특이성 발현을 주목 (종양, 하부).

도 78a 및 78b는 Balb/c 쥐의 결장암 종양 모델에서 부차-치료적 및 비독성 광선의 범위를 나타내는 그래프이다. 8 주령의 20마리 수컷 Balb/c 마우스의 왼쪽 대퇴부에 CT-26 결장암 세포를 접종하고, 암 직경이 4-6 mm 도달했을 때 통상적인 마취하에서 0, 5, 10, 또는 15 Gy로 국소 방사선을 쬔었다. 종양 크기의 경우 (76a), 종양 축을 식 $V = \pi / 6 \times \alpha^2 \times \beta$ (α 는 단축이고 β 는 장축이다)에 따라서 계산하였다. 5 Gy 준위는 종양 진행에서 부분적이고, 비-통계적으로 상당한 지체를 유도하였지만 (도 78a), 종양이 상당히 줄지는 않았다 (도 78b).

도 79a-79g는 부차-치료적 방사요법 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 발현과 겐사이클로비르 (GCV) 투여의 조합으로 쥐 결장암에서 종양 성장의 상승적 억제 효과를 나타낸다. 8 주령의 100마리 수컷 Balb/C에 CT-26 결장암 종양 세포를 접종하였다. 종양 축이 4-6 mm에 도달할 때, 10^{11} PFU의 바이러스 벡터를 [AdPPE-1 (3 x)-TK or AdCMV-TK]를 꼬리 정맥에 주사한 후, 제시된 것과 같이, 매일 GCV (100 mg/kg 체중)을 14일간 복강 내 주사하였다. 벡터 투여 3일 후, 마우스를 국소적으로 5 Gy 준위로 쬔었다. 종양 부피는 식 $V = \pi / 6 \times \alpha^2 \times \beta$ (α 는 단축이고 β 는 장축이다)에 따라서 산정하였다. 도 79a는 벡터 주사 후 14일째에 평균 종양 부피±표준편차를 나타낸다. 도 79b는 방사선 요법으로 치료된 군에서 시간에 걸쳐 나타난 평균 종양 부피 진행을 나타낸다. 도 79c는 AdPPE-1 (3 x)-TK + GCV 처치 마우스에서 시간에 걸쳐 나타난 평균 종양 부피 진행을 보여준다. 도 79d는 AdCMV-TK + GCV 처치 마우스에서 시간에 걸쳐 나타난 평균 종양 부피 진행을 보여준다. 도 79e는 대조군 식염수 + GCV 처치 마우스에서 시간에 걸쳐 나타난 평균 종양 부피 진행을 보여준다. 도 79f는 GCV없이 AdPPE-1 (3 x)-TK 처치한 마우스에서 시간에 걸쳐 나타난 평균 종양 부피 진행을 보여준다. 도 79g는 처형 당시 Balb/C 마우스에서 CT-26 일차 종양의 총체적 병리를 나타낸 예이다. 방사요법은 목표 되지 않는 벡터, AdCMV-TK ($p=0.04$) (도 79c-79f)에 비하여, 혈관신생적 내피세포 전사-목표된 벡터 AdPPE-1 (3 x)-TK만을 상당히 유효하게 한다. 모든 바이러스 벡터를 사용하는 치료법은 방사요법 없이 비효율적이었다.

도 80a-80b는 부차-치료적 방사선 요법 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 발현과 겐사이클로비르 (GCV) 투여의 조합으로, 쥐의 결장암에서 종양 괴사의 유도에 대한 상승적 효과를 나타내는, 일차 CT-26 종양의 조직병리적 절편을 나타낸다. 도 79a-79g에서 설명된 바와 같이 유도되고 준비된 CT-26 결장 암 종양으로부터 얻은 절편을 고정하고 파라핀에 매립하였고, 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. AdPPE-1 (3x)+GCV+ 저 준위 방사선 요법의 조합으로 괴사 (도 80a) 및 괴사화 조직 (도 80b)의 면적에 주목.

도 81a-81b는 방사선 요법 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 생체 내 발현과 겐사이클로비르 (GCV) 투여의 조합으로 내피세포와 종양 세포사멸에 대한 상승적 효과를 나타내는, TUNEL과 항-카스파제-3으로 염색된, 유도된 일차 결장암 종양의 조직병리적 절편을 보여준다. Sections from 도 77a-77g에서 설명된 바와 같이 유도되고 준비된, CT-26 일차 결장암 종양을 고정하고 파라핀에 매립한 후, 클레노우-FragE1 (Oncogene, Cambridge, MA) (도 81a) 및 항-카스파제-3-특이성 면역조직병리 (81b)를 사용하는 테옥시뉴클레오타이드 트랜스퍼라제-매개 dUTP-닉 말단-표지법 (TUNEL)으로 세포사멸의 표식에 대하여 분석하였다. 방사선 요법 및 AdPPE-1 (3 x)-TK+GCV의 정맥 내 주사로 처리된 마우스의 종양에서 광범위한 세포사멸(도 81a) 및 카스파제-3-양성 내피세포 (81b)를 주목.

도 82는 방사선 요법 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 생체 내 발현과 겐사이클로비르 (GCV) 투여의

조합으로 내피세포 및 종양 세포사멸에 대한 상승적 효과를 보여주는, 항-카스파제-3으로 염색된, 유도된 일차 결장암 종양의 조직병리적 절편을 나타낸다. 도 79a-79g에서 설명된 바와 같이 유도되고 준비된 CT-26 일차 결장암 종양으로부터 얻은 절편을 고정하고 파라핀에 매립한 후, 항-카스파제-3-특이성 면역조직병리법에 의해 세포사멸의 표식에 대하여 분석하였다. 검은 화살은 적혈구를; 붉은 화살은 세포사멸성 내피세포 및 흰 화살은 세포사멸성 종양 세포를 나타낸다. GCV-의존성 세포사멸성 효과에 주목.

도 83a 및 83b는 방사선 요법 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 생체 내 발현과 겐사이클로비르 (GCV) 투여의 조합으로 종양 맥관화를 저해하는 상승 효과를 보여주는, 항-CD-31로 염색된, 간 조직 및 유도된 일차 결장암 종양의 조직병리 절편을 나타낸다. 도 79a-79g에서 설명된 바와 같이 유도되고 준비된 간 조직 (83b) 및 CT-26 일차 결장암 종양 (83a)으로부터 얻은 절편을 고정하고 파라핀에 매립한 후, 내피세포-특이성 항-CD-31과 반응하여 면역조직병리 분석하였다. 검은 화살표는 적혈구를; 붉은 화살표는 세포사멸성 내피세포를 및 흰 화살표는 세포사멸성 종양 세포를 가르킨다. 간세포에서의 정상적인 맥관화 (83b)와 비교하여, 방사선 요법 및 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 정맥 투여로 처리된 마우스(83a)의 종양에서의 많은 혈관 분포에 주목.

도 84는 방사선 요법 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절하에서의 TK 발현과 겐사이클로비르 (GCV) 투여에 의한 조직-특이성 세포독성을 보여주는 마우스 간 조직의 조직병리 절편을 나타낸다. 벡터 (AdPPE-1 (3x)-TK 및 AdCMV-TK) 및 GCV, 단독 또는 조합물에 노출된 마우스 간으로부터 얻은 절편을 고정하고 파라핀에 매립한 후, 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. AdCMV-TK 및 겐사이클로비르 (좌측)에 의한 전형적인 온건한 간독성에, 및 AdPPE-1 (3x)-TK 처리 간 (우측)에서의 맥관 비정상성이 없는 것에 주목.

도 85a 및 85b는 C57B1/6 폐암 전이성 모델에서 부차-치료적 및 비독성 방사선 조사의 범위를 나타내는 그래프이다. 8주령 수컷 35 C57B1/6 마우스 8 마리에 좌측 발바닥을 통해 루이스 폐암 (LLC) 세포를 접종하고, 일차 종양 제거 8일 후에 일반적인 마취하에서 0, 5, 10, 또는 15 Gy로 가슴벽에 조사하였다. 종양 제거 28일 후에 마우스를 희생시켰다. 무게 감소는 전이성 질환을 나타내었다. 5 Gy 준위는 치료적이지도 (도 85a) 독성적이지도 (도 85b) 않았다.

도 86a-86d는 부차-치료적 방사선 요법 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 발현과 겐사이클로비르 (GCV) 투여의 조합으로 쥐의 폐암에서의 전이성 질병을 억제하는데 상승효과를 나타낸다. 8 주령된 180 마리의 수컷 Balb/C 마우스를 좌측 발바닥을 통해 LLC 세포로 접종하였다. 일차 종양이 생기자마자 일반적인 마취하에서 상기 발을 절단하였다. 절단 5일 후, 10^{10} PFU의 벡터 [AdPPE-1 (3x)-TK 또는 AdCMV-TK]를 꼬리 정맥으로 주사한 후, GCV (100 mg/kg)를 14일간 복강 내 주사하였다. 주사 3일 후에, 마우스의 가슴벽에 겨냥하여 5 Gy 용량을 일반적인 마취하에서 일 회 쪼았다. 도 86a는 조사되었지만 벡터 처리되지 않는 마우스의 55일 기간동안의 생존을 나타낸다. 도 86b는 AdPPE-1 (3x)-TK 처리 마우스의 생존을 나타낸다. 도 86c는 AdCMV-TK 처리 마우스의 생존을 나타낸다. 도 86d는 식염수 처리된 대조군 마우스의 생존을 나타낸다. 방사선 요법은, 목표화되지 않은 벡터 AdCMV-TK (도 86b-86d)에 비하여, 혈관신생적 내피세포 전사-목표화된 벡터, AdPPE-1(3x)-TK만을 상당히 강화시킨 것에 주목. 모든 바이러스 벡터를 사용한 치료법은 방사선 요법없이는 비효율적이었다.

도 87a-87c는 CMV 프로모터의 조절하에서 Fas-c의 내피세포 세포독성을 나타내는 일련의 막대그래프이다. 소 동맥 내피세포(BAEC)들을 CMV-FAS (검은색) 또는 CMV-LUC (회색, 음성 대조군)의 100 (좌측), 1000 (우측) 및 10000 (좌하측) moi로 전환유도 72 시간 후 및 인간 TNF- α 리간드를 상이한 농도로 첨가 24 시간 후에 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. 높은 moi 및 TNF- α 농도에서 BAE 세포의 활성이 감소된 것에 주목.

도 88은 CMV-LUC (붉은 사각형)에 비하여, CMV-FAS (푸른 다이아몬드)를 가진 293 세포에서 바이러스 복제가 더 넓게 퍼져 있는 것을 보여주는 플라크 전개의 그래프이다. CMV-FAS 및 CMV-LUC의 CsCl-밴디드 스톱의 역가는 후술하는 바와 같이 PFU 분석법으로 측정하였다. 데이터는 플라크 분석의 매 2-3일 마다 나타난 플라크의 수를 로그-스케일로 작성하였다.

도 89a 및 89b는 CMV-루시페라제와 비교하여, CMV-Fas-c로 바이러스 감염 (플라킹)의 더 높은 세포-대-세포 확산을 나타내는 293 세포 배양물의 일련의 사진이다. 감염 4일 후, 동일한 희석 농도의 CMV-FAS (좌측) 및 CMV-LUC (우측)으로부터 얻은 플라크를 사진 찍었다. CMV-FAS로 얻은 플라크는 CMV-LUC의 것보다 확실히 더 크고, 이것은 더 높은 속도의 세포 대 세포 확산, 심중팔구 세포 사멸에 의해 유도된 세포 확산을 나타낸다.

도 90은 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절하의 Fas-c의 발현 및 독소루비신 투여에 따른 내피세포 특이성 세포독성에 대한 상승효과를 나타내는 막대그래프이다. BAE 세포를 벡터 (PPE-1 (3x)-FAS)로 형질전환 유도 (10^3 moi) 48 시간 후 독소루비신 100 nM에 노출시켰다. Dox+PPE-fas= 독소루비신+PPE-1 (3x)-Fas-c (오렌지); Dox=독소루비

신 단독 (녹색); PPE-FAS=PPE-1 (3x)-FAS (적색); 무처리=흑색. 벡터 형질유도 96시간 후 크리스탈 바이올렛으로 세포로 염색하였고, 세포 활성을 현미경으로 측정하였다. AdPPE-1 (3x)-Fas-c 및 독소루비신 사이에 내피세포 세포독성에 대한 상당한 상승작용을 주목.

도 91a-91b는 조작된 조직 제조물에서 엔도텔린(PPE-1 3X)의 조절하의 VEGF에 의한 혈관신생의 뛰어난 유도를 나타내는 도식이다. 조직 조작된 제조물 (방법 미개시)을 VEGF를 보충하거나 하지 않은 배지 (50ng/ml)에서 배양하였다. 동일 종류 제조물을 Ad5PPEC-1-3x VEGF 바이러스 또는 대조군 Ad5PPEC-1-3x GFP 아데노바이러스 (대조군 바이러스)로 감염시켰다 (4 시간 동안). 2 주간 배양 후, 제작물을 고정시키고, 매립하고, 박편 절단하고 및 염색하였다. 맥관화는 mm² 당 혈관의 수로서 및 맥관화된 박편 면적의 백분율로서 표시하였다. 도 91a는 Ad5PPEC-1-3x VEGF로 세포를 감염시키는 것은 조작된 제작물에서 형성된 혈관-유사 구조물의 수와 크기에 대하여 유도 효과를 가지는 것을 보여준다. VEGF를 함유한 배지 (VEGF 배지)에 노출된 제작물에 비하여, Ad5PPEC-1-3x VEGF-형질유도된 조직 제작물에서의 맥관화의 양쪽 변수에서의 극적인 증가 (4-5X)에 주목. 도 91b는 Ad5PPEC-1-3x GFP 대조군에 비하여, Ad5PPEC-1-3x VEGF로 감염된 세포로 배양된 이식 조직 제작물의 탁월한 생존성과 맥관화를 나타내는 LUC 발광 강도의 막대그래프이다.

도 92는 야생형 쥐의 PPE-1 프로모터 DNA 서열이다. 상기 프로모터는 내재적 내피세포 특이성 전사 요소 (검은 이탤릭체), NF-1 응답 요소 (분홍색 이탤릭체), GAT A-2 요소 (붉은 이탤릭체), HIF-1 응답 요소 (파란 이탤릭체), AP-1 위치 (녹색 이탤릭체), CAAT 신호 (오렌지 이탤릭체) 및 TATA 박스 (보라색 이탤릭체)를 포함한다.

도 93은 개질된 쥐의 프리-프로엔도텔린-1 프로모터의 3x 단편물의 서열이다. 이 단편물은 2 개의 온전한 내피세포 특이성 양성 전사 요소 (적색) 및 원 서열 반전된 절반으로서 위치하는 두 개 부분(청색)을 포함한다: 서열번호 15 (전사 요소 서열번호 6의 3' 부분으로부터의 뉴클레오타이드), 및 서열번호 16 (전사 요소 서열번호 6의 5' 부분으로부터의 뉴클레오타이드).

도 94는 형질전환 마우스에서 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하 LUC 유전자의 발현에 대하여 조직 특이성, 보센탄-유도 증강효과를 나타내는 막대그래프이다.

도 95a 및 95b는 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절하에서 발현된 형질전환 유전자에 대한 숙주 면역 반응이 없는 것을 ELISA로 측정한 것을 나타내는 막대그래프이다. PPE-1 (3x) Fas-c 처리 마우스에서 야기된 최소 항 TNF-R1 반응(도 95b)과 비교하여, 비특이성 항 아데노백터 반응 (도 95a)에 주목.

도 96은 Ad5 전달 시스템에서 PPE-1 (3X) 프로모터 조절 하 Fas-c 키메라의 발현에 의한 전이성 폐암의 치료에 대하여 용량의 효과를 나타내는 막대그래프이다. 루이스 폐암 세포의 주입 및 일차 종양 절제 후에 폐 전이가 유도되었다. 시험동물들은 일차 종양 절제 5일 후 지시된 용량의 바이러스 또는 위약 (식염수)를 한 차례 정맥 주사되었다. 치료 효율은 부과된 종양에서의 변화 (폐 무게로 측정)로 평가하였다. 대조군과 비교하여, 1x10⁸ 내지 1x¹²의 용량에 의해 전이성 성장이 상당히 감소된 것에 주목.

도 97은 Ad5 전달 시스템에서 PPE-1 (3X) 프로모터의 조절하에 Fas-c 키메라의 발현에 의해서 전이성 폐암을 치료하는 것에 대한 용량과 치료 횟수의 효과를 나타내는 막대그래프이다. 루이스 폐암 세포 및 일차 종양 절제 후에 폐 전이가 유도되었다. 시험 동물들에 지시된 양의 바이러스 또는 위약을 한 번 (회색 컬럼) 또는 두 번 (검은색 컬럼) 정맥 내 주입하였다. 절제 5일 후에 첫 번 주사하였고 절제 9일 후에 두 번째 (지정된 곳에) 주사하였다. 치료 효율은 부과된 종양에 따라 폐 무게를 측정하여 평가하였다. 모든 조사된 용량에서, 두 번 용량에 비하여, 단일 용량에 의한 전이성 성장 저해가 필적하게 효율적임에 주목.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0124] 본 발명은 내피세포 특이적 프로모터 활성을 나타내는 폴리뉴클레오타이드 서열들, 및 이의 이용 방법에 관한 것이다. 더 상세하게, 본 발명은 내피세포들에서 증가된 활성 및 특이성을 나타내는 개질된-프리프로엔도텔린-1 (PPE-1) 프로모터, 및 특정 세포 집단에서 세포사멸을 활성화시키고, 이에 따라 비정상적 신생맥관화 또는 세포 성장으로 특징되는 질병의 치료를 가능케 하는 핵산 작제물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 저산소증 및 및 혈관신생을 포함하는 생리적 조건에 응답하여 그 발현을 향상시키는 PPE 프로모터의 개질 및 신규한 혈관신생성 내피세포-특이성 조합 요법에 관한 것이다.

[0125] 본 발명의 적어도 한 구체예를 상세히 설명하기 전에, 본 발명은 하기 설명에 설정된 또는 실시예에 의해 예시된 세부 항목에 그 적용에 있어서 제한되지 않는다는 것을 이해해야 할 것이다. 본 발명은 다른 구체예를 할 수

있고 또는 다양한 방법으로 실시 또는 수행될 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용된 표현법 및 용어들은 설명의 목적으로 인한 것에도 제한하는 것으로 간주되지 말아야 하는 것임을 이해하여야 한다.

[0126] 균형잡히지 않은 혈관신생은 다양한 병리 조건을 대표적으로 나타내며 때로는 병리적 상태의 진행을 유지하는 것이다. 예를 들어, 고형 종양에서, 혈관 내피세포들은 정상 조직에서보다 35배 빠르게 분열한다 (Denekamp 및 Hobson, 1982 Br. J. Cancer 46:711-20). 그러한 비정상적인 증식은 종양 성장 및 전이에 필요한 것이다 (Folkman, 1986 Cancer Res. 46:467- 73). 혈관 내피세포 증식은 또한 류마티스 관절염, 건선 및 활액막염과 같은 만성 염증성 질환에 중요하며, 여기서 이러한 세포들은 염증 부위 내에 방출된 성장 인자들에 응답하여 증식한다 (Brown & Weiss, 1988, Ann. Rheum. Dis. 47:881-5). 한편, 심장 허혈증, 말초혈관 질환, 외상 치유, 화상 자국, 등의 허혈성 상태에서, 혈관신생을 유도하는 것은 치유 효과를 가지며 (Thompson, 등, PNAS 86:7928-7932, 1998) 및 따라서 유익하다.

[0127] 따라서, 혈관신생 과정을 제어하거나 변경하는 것은 잠재된 질병 상태의 병리적 진행에 이러한 과정이 기여하는 것을 제한하는데는 중요한 치료적 역할을 하는 것은 물론 그러한 질병의 병인을 연구하는 가치있는 수단으로 제공한다. 최근, 저해성으로 또는 자극성으로 고안되었는지 간에, 내피세포 조절제의 개발에서 놀라운 진보가 이루어 졌다 (검토용으로 참조, Mariani 등, GenMedGen 2003, 5:22). 그러나, 혈관신생 적용 및 오래 지속되는 기능성 혈관의 대량 형성에 대해서, 전술한 단백질 인자를 반복적으로 또는 장기간 전달할 필요가 있고, 따라서 임상적 환경에서 이들의 사용을 제한한다. 더욱이, 혈관신생-조절 인자의 생산에 따른 고비용에 더하여, 이러한 인자를 효과적으로 전달하는 것은 관상 동맥 내로 카테터를 사용하여 놓는 것을 요구하며, 이는 치료 비용 및 어려움을 증가시킨다.

[0128] 오늘날, 확실한 임상 시험으로 Avastin® 이나 Bay-43906®과 같은 항-혈관신생 치료가 종양을 둘러싸고 있는 혈관의 신규 성장을 제한함으로써 전이 과정을 무디게 할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 그러나, 새로운 혈관들의 형성을 저해하는 것 및/또는 이들을 부분적으로 파괴하는 것은 대부분 또는 모든 존재하는 신생적 혈관을 파괴하고 및 종양 괴사를 유도하는 극적인 항-혈관신생 효과가 요구되는 암 병리학에서는 미흡할 수 있다. 더욱이, 예비-임상 모델에서는 확실하지만, 현재 임상 시험에서 시험된 모든 항-혈관신생 제제의 전신 투여시 제한된 성공률과 혈소판 감소증, 백혈구 감소증 및 객혈을 포함한 심각한 독성을 보였다. 따라서, 치료제가 내피세포-특이성 목표화 특성을 가지는 것이 친- 및 항-혈관신생 치료제에 필수적이다. 내피세포 특이성 프로모터는 당해 분야에 설명되어 있고, 이의 예는 flk-1, Flt-1 Tie-2 VW 인자 및 엔도텔린-1을 포함한다 (참조, Gu 등의 미국 특허 번호 6,200,751; Williams 등의 미국 특허 번호 5,916,763, 및 Harats 등의 미국 특허 번호 5,747,340, 이러한 모든 특허들은 참조문헌에 포함됨). 내피세포-특이성 프로모터의 제어하에서 발현된 치료 유전자의 내피 세포 목표화는 당해 분야에 알려져 있다. 예를 들어, Jagger 등은 KDR 또는 E-selectin 프로모터를 사용하여 내피세포에 특이적으로 TNF α 를 발현시켰다 [Jagger RT. 등 Hum Gene Ther (1997) 8(18):2239-47] 반면 Ozaki 등은 폰-빌레브란트 인자 (vWF) 프로모터를 사용하여 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제 (HSV-tk)를 HUVEC로 전달하였다 [Hum Gene Ther (1996) 7(13): 1483-90]. 비록 이러한 프로모터들이 내피세포 특이성으로 간주되지만, 이러한 프로모터들의 많은 것들은 내피세포들에 발현을 지시하는 것에 비효율적이며, 요구되는 엄격한 특이성이 결여되어 있고, 약한 활성을 보일 뿐이며 고도의 발현을 허용치 않는다는 것이 연구로 나타났다.

[0129] 치료용으로 더 효율적이고 특이적인 내피세포 프로모터를 제작하는 한 가지 방법은 조직 특이성 인핸서 요소를 동정하고 포함하는 것이다. 내피세포에 특이적인 인핸서 요소는 이미 알려져 있는 데, 예를 들어, Bu 등은 (J. Biol Chem. (1997) 272(19): 32613-32622) PPE-1 (ETE-C, ETE-D 및 ETE-E 요소를 함유)의 인핸서 용소의 세 개 복사본이 프로모터 서열에 내피세포 특이성을 부여한다는 것을 시험관 내에서 증명하였다. 그러나, 이러한 인핸서 요소의 생체 내 유용성은 증명되지 못했다.

[0130] 하기 실시예 단락에서 명쾌히 설명되는 바와 같이, 본 발명자들은 상기 인핸서 요소가 생체 내 치료 적용의 용도에 적합하다는 것을 증명하였다. 유일하고, 개질된 3회 반복 (3x) 인핸서 요소 (서열번호 7)를 창출하고 및 시험관 내 및 생체 내에서 내피세포 특이성 유전자 발현을 지시하는 데에 있어 이의 활성을 산정함으로써, 본 발명자들은 상기 3x 인핸서 요소 서열의 일부를 신규한 재배열 방향으로 포함하는 고도로 활성적인 인핸서 요소를 제작하였다. 이러한 개질된 인핸서 요소들은 생체 내에서 혈관신생에 참여하는 증식 중인 내피세포에는 향상된 특이성을 보이지만 정상적인 내피세포에는 무시할 만한 활성을 보인다. 따라서, 본 발명자들은, 인접한 프로모터 서열들에 재형상되고, 탁월한 활성을 부여하는 인핸서 요소의 부분을, 최초로, 동정하였다.

[0131] 따라서, 본 발명의 일 관점에 따라서, 진핵 세포에서 그것에 전사적으로 연결된 폴리뉴클레오타이드 서열의 전

사를 지시할 수 있는 시스 조절 요소를 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공한다. 상기 분리된 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 16에 설정된 서열의 적어도 일부분에 공유 결합적으로 연결된, 서열번호 15에 설정된 서열의 적어도 일부분을 포함한다. 바람직한 일 구체예에서, 서열번호 15에 설정된 서열의 적어도 일부분은 상기 시스 조절 요소에서 서열번호 16에 설정된 서열의 적어도 일부분의 상류에 존재한다. 다른 바람직한 구체예에서, 서열번호 16에 설정된 서열의 상기 적어도 일부분은 상기 시스 조절 요소에서 서열번호 15에 설정된 서열의 적어도 일부분의 상류에 존재한다.

[0132] 서열번호 15는 쥐의 내피세포 특이성 인핸서 요소 (서열번호 6)의 뉴클레오타이드 좌표 27 내지 44를 나타내는 폴리뉴클레오타이드 서열로서, 추가의 구아닐 뉴클레오타이드가 3' 말단에 연결되어 있는 것이고, 및 서열번호 16은 쥐의 내피세포 특이성 인핸서 요소 (서열번호 6)의 뉴클레오타이드 좌표 1 내지 19를 나타내는 폴리뉴클레오타이드 서열이다.

[0133] 본 명세서 및 수반되는 청구범위의 목적상, 용어 "인핸서"는 바람직하게는, 그러나 절대적이지는 않게, 조직 특이성 방식으로 프로모터의 전사 활성을 높이는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 본 명세서에서 본 명세서에서 사용되는바, 구절 "조직 특이성 인핸서"는 조직- 또는 상황-의존성 방식으로 프로모터의 전사 활성을 증가시키는 인핸서를 지칭한다. 그러한 "조직 특이성 인핸서"는 양립할 수 없는 조직 또는 환경에서 프로모터의 전사 활성을 감소, 저해 또는 침묵시키기까지 한다는 것이 이해될 것이다.

[0134] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 분리된 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 15 및 16의 적어도 일부의 인접 복사체를 포함한다. 반전 방향 (꼬리 대 꼬리, 또는 머리 대 머리), 상보 방향 ("a"를 "t"로, "t"를 "a"로, "g"를 "c"로, 및 "c"를 "g"로 대체), 반전 상보 방향 등과 같은 당해 분야에 공지된 다른 방향물들을 제작할 수 있음에도, 그러한 서열들은 바람직하게는 머리-대-꼬리 방향으로 위치되어 있는 것이 바람직하다. 서열번호 15에 설정된 서열의 적어도 일부분은 서열번호 16에 설정된 서열의 적어도 일부분과 직접적으로 공유 결합적으로 연결될 수 있거나, 바람직한 구체예에서는, 상기 두 서열들이 링커 폴리뉴클레오타이드 서열을 통해 연결될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "링커 폴리뉴클레오타이드"는 둘 또는 그 이상의 측면인접 (flanking) 폴리뉴클레오타이드들 간 (예. 서열번호 15 및 16)에 연결된 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 한 가지 그러한 바람직한 링커 서열은, 예를 들어, 서열번호 7의 위치 55-57에 설정된 바와 같은 링커 서열인 트리뉴클레오타이드 서열 "cca" 이다. 다른 적절한 링커 서열은 천연 또는 인공적인, 전체의 추가 인핸서 요소, 예를 들어, 다중 복사본들의 서열번호 15, 서열번호 16, PPE-1의 Ix 인핸서 요소, 추가적인 전체 프로모터들, 저산소증 응답 요소 (서열번호 5와 같은) 등을 포함할 수 있다.

[0135] 본 명세서에서 사용되는바, 어구 "서열번호 15에 설정된 바와 같은 서열의 일부분..." 또는 "서열번호 16에 설정된 바와 같은 서열의 일부분"은 가르키는 서열의 5' 말단, 3' 말단 또는 이들 사이의 임의의 서열의 적어도 8 개 연속 뉴클레오타이드들을 나타내는 서열로 정의된다. 따라서, 예를 들어, 서열번호 15의 뉴클레오타이드 좌표 1-17까지 한 개 뉴클레오타이드 증가분의 양태로, 뉴클레오타이드 좌표 1-8, 1-9, 1-10, 1-11 ..., 를 나타내는 서열 모두는 본 발명에 따른 서열번호 15의 일부를 구성하는 것이고, 이는 서열번호 15의 뉴클레오타이드 좌표 2-9, 2-10, 2-11, ... 내지 2-17를 나타내는 모든 서열에서도 그러하고, 서열번호 15의 뉴클레오타이드 좌표 3-10, 3-11, 3-12, ... 내지 3-17를 나타내는 모든 서열에서도 그러하며, 이는 서열번호 15의 뉴클레오타이드 좌표 10-17를 나타내는 서열에까지 미친다. 유사하게, 전술한 바와 같이, 서열번호 16의 뉴클레오타이드 좌표 1-19까지 한 개 뉴클레오타이드 증가분의 양태로 뉴클레오타이드 좌표 1-8, 1-9, 1-10, 1-11 ..., 을 나타내는 서열 모두는 본 발명에 따른 서열번호 16의 일부분을 구성하며, 이는 뉴클레오타이드 좌표 2-9, 2-10, ..., 들 나타내는 서열에서도 그러하다.

[0136] 본 발명을 실제 수행시, 개질된 인핸서 PPE-1 (3 x)는, 쥐의 내피세포 특이성 인핸서 요소 (1x) (참조 서열번호 7)의 하나 복사본에 의해 바로 상부 및 바로 하부에 측면인접한, 서열번호 16에서 설정된 바와 같은 서열에 연결된 서열번호 15에 설정된 바와 같은 서열을 포함한다. 따라서, 하나의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 시스 조절 요소는 서열번호 6에서 설정된 바와 같은 서열의 적어도 하나의 복사본을 더 포함한다. 더 바람직한 구체예에서, 상기 시스 조절 요소는 서열번호 6에 설정된 바와 같은 서열의 적어도 두 개 복사본을 포함한다. 가장 바람직한 구체예에서, 본 발명의 시스 조절 요소는 서열번호 7에 설정된 바와 같다.

[0137] 바람직하게는 상기 분리된 폴리뉴클레오타이드는 내피세포-특이성 프로모터 서열 요소를 더 포함한다. 본 명세서 및 첨부되는 청구범위의 목적상, 용어 "프로모터"는 관심의 하류 서열의 RNA 전사를 매개할 수 있는 임의의 폴리뉴클레오타이드 서열을 가르킨다. 상기 내피세포 특이성 프로모터 요소는, 예를 들어, PPE-1 프로모터의 적어도 하나의 복사본을 포함할 수 있다. 본 발명의 핵산 작제물에 의해 이용될 수 있는 적절한 프로모터/인핸서

의 예는 내피세포-특이성 프로모터들: 프레프로엔도텔린-1, PPE-1 프로모터 (Harats D, J Clin Invest. 1995 Mar;95(3): 1335-44)., PPE-1-3x 프로모터 [PCT/IL01/01059; Varda-Bloom N, Gene Ther 2001 Jun;8(11):819-27], TIE-1 (S79347, S79346) 및 TIE-2 (U53603) 프로모터들 [Sato TN, Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Oct 15;90(20):9355-8], 엔도글린 (Endoglin) 프로모터 [Y11653; Rius C, Blood 1998 Dec 15;92(12):4677-90], 폰 빌레브란트 인자 [AF152417; Collins CJ Proc Natl Acad Sci U S A 1987 Jul;84(13):4393-7], KDR/flk-1 프로모터 [X89777, X89776; Ronicke V, Circ Res 1996 Aug;79(2):277-85], FLT-1 프로모터 [D64016 AJ224863; Morishita K, J Biol Chem 1995 Nov 17;270(46):27948-53], Egr-1 프로모터 [AJ245926; Sukhatme VP, Oncogene Res 1987 Sep-Oct;1(4):343-55], E-셀렉틴 프로모터 [Y12462; Collins T J Biol Chem 1991 Feb 5;266(4):2466-73], 내피세포 점착 분자 프로모터들: ICAM-1 [X84737; Horley KJ EMBO J 1989 Oct;8(10):2889-96], VCAM-1 [M92431; Iademaro MF, J Biol Chem 1992 Aug 15;267(23):16323-9], PECAM-1 [AJ313330 X96849; CD31, Newman PJ, Science 1990 Mar 9;247(4947): 1219-22], 혈관 평활근 특이성 요소들: CARg box X53154 및 동맥 카르복시펩티다제-유사 단백질 (ACLP) 프로모터 [AF332596; Layne MD, Circ Res. 2002; 90: 728-736] 및 대동맥 선호 발현 유전자-1 (Aortic Preferentially Expressed Gene-1) [Yen-Hsu Chen J. Biol. Chem., Vol. 276, Issue 50, 47658-47663, December 14, 2001]을 포함한다. 다른 적절한 내피세포 특이성 프로모터들은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, EPCR 프로모터 (Gu 등의 미국 특허 번호 6,200,751) 및 VEGF 프로모터 (Williams 등의 미국 특허 출원 번호 5,916,763) 등이 있다.

[0138] 다양한 조직에서 원하는 핵산 서열의 발현을 지시하기 위해, 전술한 분리된 폴리뉴클레오타이드로, 비-내피세포성 프로모터를 결합할 수 있음이 이해될 것이다. 본 발명의 제작물과 사용하기 적합한 프로모터들은 당해 분야에 공지되어 있다. 이러한 것은 바이러스성 프로모터들 (예, 리트로바이러스성 ITR, LTR, 초기 바이러스성 (immediate early vira)l 프로모터 (IEp) (헤르페스 바이러스IEp (예, ICP4-IEp 및 ICPO-IEp) 및 사이토메갈로 바이러스 (CMV) IEp와 같은), 및 다른 바이러스성 프로모터들 (예, 후기 바이러스성 프로모터들, 잠재-활성 (latency-active) 프로모터들 (LAPs), 라우스 사코마 바이러스 (Rous Sarcoma Virus) (RSV) 프로모터들, 및 무린 류케미아 바이러스 (MLV) 프로모터s))을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 다른 적절한 프로모터들은 인핸서 서열들 (예, 토끼 베타-글로빈 조절 요소), 구성상 활성 프로모터들 (예, 베타-액틴 프로모터, 등), 신호 및/또는 조직 특이성 프로모터들 (예를 들어, TNF 또는 RU486에 응답하는 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, PSA 프로모터 등과 같은 유도성 및/또는 억제성 프로모터들), 및 텔로머라제, 플라스틴 및 핵소키나제 프로모터들과 같은 종양-특이성 프로모터들을 포함하는 진핵성 프로모터들이다.

[0139] 바람직하게는, 상기 분리된 폴리뉴클레오타이드는 저산소증 응답 요소, 예를 들어, 서열번호 5에 설정된 서열의 적어도 하나의 복사본을 포함한다.

[0140] 본 발명의 분리된 핵산 서열은 진핵 조직에서, 특히 예를 들어, 혈관신생에 연루된 내피세포를 증식시키는데 있어서 유전자 발현을 조절하는 데 또는 휴지 중인 내피세포에서 유전자 발현을 정지 (저해) 시키는데 사용될 수 있다.

[0141] 따라서, 상기 본 발명의 분리된 폴리뉴클레오타이드 서열은, 특정 경우에, 본 발명의 분리된 폴리뉴클레오타이드의 조절하에 놓인 핵산 서열을 더 포함하는 핵산 작제물의 부분으로서 제공될 수 있다. 본 발명의 핵산 작제물은, 예를 들어, 선택 표지 또는 리포터 폴리펩티드를 암호화하는 서열, 박테리아에서 복제 개시점을 암호화하는 서열, 단일 mRNA (IRES)로부터 수 개 단백질의 번역을 허용하는 서열, 프로모터-키메릭 폴리펩티드 암호화 부위의 게놈 통합용 서열 및/또는 Invitrogen에서 판매하는 pcDNA3, pcDNA3.1 (+/-), pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, Promega에서 판매하는 pCI, Stratagene에서 판매하는 pBK-RSV와 pBK-CMV, Clontech에서 판매하는 pTRES 및 이들의 유도체와 같은 포유동물 발현 벡터에 일반적으로 포함되어 있는 서열과 같은 추가의 폴리뉴클레오타이드 서열을 더 포함할 수 있다. 그러한 핵산 작제물은 바람직하게는 포유동물 세포 발현을 위해 배열될 수 있고 및 바이러스 기원일 수 있다. 포유동물 발현에 적합한 많은 수의 핵산 작제물은 당해 분야에 공지되어 있다; 하기 실시예 단락에서 그러한 제작물의 몇 가지 상세점을 제공한다.

[0142] 본 명세서 및 첨부되는 청구범위의 목적상, 어구 " 조절하에 놓여진 핵산 서열..."은 RNA 폴리머라제에 의해 전사될 수 있는 능력을 지니고 있으며 이의 전사는 본 발명의 시스 조절 요소와 같은 시스 조절 요소에 의해 지시될 수 있는 임의의 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 이러한 정의는 폴리펩티드들로 번역될 수 있는 코딩 서열은 물론, 안테센스 RNA, DNA와 결합하는 RNA, 리보자임 및 번역 과정을 겪는 것으로 정해지지 다른 분자체에 대한 서열을 포함한다. 본 발명에 따른 작제물에 의해 사용될 수 있는 핵산 서열의 예는 VEGF, FGF-I, FGF-2, PDGF, 안지오프이에틴-1 및 안지오프이에틴-2, TGF- β , IL-8과 같은 혈관신생의 양성 및 음성 조절인자 (혈

관신생 조절인자의 더 광범위한 목록은 상기 표 1을 참조), 세포독성 약물, 리포터 유전자 등이 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 핵산 서열은 혈관신생 조절인자 VEGF, p55, 안지오프로테아제-1, bFGF 및 PDGF-BB로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 시스템 조절 요소에 의한 조절에 적합한 추가의 전사성 핵산 서열은 하기에 및 실시예 단락에 제시되어 있다.

- [0143] 하기에 제시된 실시예들은 본 발명의 신규한 시스템 조절 요소들이 생체 내 전신 투여 후 내피 조직으로 리포터 유전자 (GFP 및 LUC)의 발현을, 허혈성 및/또는 혈관신생적 (증식중인) 내피 조직에서 더 선호되는 방식으로, 신뢰적으로 지시할 수 있다는 것을 나타낸다. 더욱이, 실시예들은 본 발명의 분리된 폴리뉴클레오타이드를 사용하여 종양, 전이체, 허혈성 및/또는 혈관신생적 조직에서 치료 유전자를 선호적으로 발현시킬 수 있다는 것을 나타내며, 이에 따라 치료 적용에서 본 발명의 시스템 조절 요소 및 이의 유도체의 중요성에 대한 직접적인 증거를 제공한다.
- [0144] 일 구체예에서, 본 발명의 핵산 작제물은 하나의 조직에서 혈관신생을 상방 조절하는 데 및 허혈과 관련된 질병 또는 상황을 치료 또는 예방하는데 사용된다. 그러한 질병 및 상황은 증가된 혈관신생에 의해 이득을 취하며, 당해 분야에 공지되어 있는데, 예를 들어 상처 치유, 허혈성 뇌졸중, 허혈성 심장질환 및 위장관 병변이 그러하다.
- [0145] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 어구 "혈관신생을 하방 조절하는 것"은 새로운 혈관의 형성에 이르는 혈관신생 과정을 줄이거나 정지시키는 것을 지칭한다. 어구 "혈관신생을 상방 조절하는 것"은 잠재성 또는 최소한으로 작용하는 내피세포 혈관신생 활성인자의 발현을 향상시키는 것을 지칭한다.
- [0146] 따라서, 본 발명은 유전자 치료로 사용될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는바, 유전자 치료는 숙주에 관심의 유전물질 (예, DNA 또는 RNA)을 전달하여 유전성 또는 획득한 질병이나 상황 또는 표현형을 치료 또는 예방하는 것을 지칭한다. 상기 관심의 유전 물질은 이의 생체 내 생성이 바람직한 생성물 (예, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 기능성 RNA, 안티센스)를 암호화하고 있다. 예를 들어, 관심의 유전물질은 호르몬, 수용체, 효소, 폴리펩티드 또는 치료 가치의 펩타이드를 암호화할 수 있다. 일반적인 검토용으로, 교재 참조 "Gene Therapy" (Advanced in Pharmacology 40, Academic Press, 1997).
- [0147] 유전자 치료에 대한 두 가지 기본 방식은: (1) 생체 외 및 (2) 생체 내 유전자 치료로 발전되었다. 생체 외 유전자 요법에서는, 환자로 부터 세포를 떼어내고 배양하면서 시험관에서 치료한다. 일반적으로, 적절한 유전자 전달 담체/방법 (형질감염, 형질유도, 동종 재조합, 등)을 통해 및 필요시 발현 시스템을 통해 기능성 치환 유전자가 세포 내로 도입되며 그 다음, 개질된 세포를 배양액에서 증폭시키고 숙주/환자로 도입된다. 이러한 유전적 재이식된 세포는 상기 형질감염된 유전 물질을 인 시류 발현하는 것으로 나타난다.
- [0148] 생체 내 유전자 요법에서는, 목표 세포를 피험체로부터 제거하는 것이 아니라, 전이될 유전 물질을 수납 유기체의 세포에 인 시류, 즉 수납자 내로 도입된다. 다른 구체예에서는, 숙주 유전자가 결함이 있는 경우, 유전자는 인 시류 수리된다 (Culver, 1998. (Abstract) Antisense DNA & RNA based therapeutics, February 1998, Coronado, CA).
- [0149] 이러한 유전적으로 변경된 세포들은 형질감염된 유전 물질을 인 시류로 발현하는 것으로 나타난다.
- [0150] 상기 유전 발현 담체는 이중 핵산을 숙주 세포에 전달/전이시킬 수 있다. 발현 담체는 당해 기술 분야에 알려진 바와 같이 세포 선택적인 방식으로 핵산의 목표화, 발현 및 전사를 조절하는 요소를 포함할 수 있다. 유전자의 5' UTR 및/또는 3' UTR는 발현 담체의 5' UTR 및/또는 3' UTR로 대체될 수 있다는 것을 밝힌다. 그러므로, 본 명세서에 사용된 것과 같이, 상기 발현 담체는 필요시, 전달될 실제 유전자의 5' UTR 및/또는 3' UTR을 포함하지 않을 수 있고 오로지 특이성 아미노산 코딩 부위만을 포함할 수 있다.
- [0151] 발현 담체는 이중 물질의 전사를 조절하기 위한 프로모터를 포함할 수 있고, 및 선택적 전사를 허용하는 구성 또는 유도성 프로모터일 수 있다. 필요한 전사 수준을 얻는 데 필요할 수 있는 인핸서들을 선택적으로 포함할 수 있다. 인핸서들은 코딩 서열과 인접하여서 작동하여 프로모터에 의해 지시되는 기본적인 전사 수준을 변경시키는 비번역 DNA 서열이다. 발현 담체는 또한 후술하는 바와 같이 선택 유전자를 포함할 수 있다.
- [0152] 당해 분야에 공지된 다양한 방법 중 하나로 세포 또는 조직에 벡터를 도입할 수 있다. 그러한 방법들은 일반적으로 Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York 1989, 1992), in Ausubel 등, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley 및 Sons, Baltimore, Maryland 1989), Chang 등, Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, MI 1995), Vega 등, Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor MI (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors 및 Their

Uses, Butterworths, Boston MA 1988) 및 Gilboa 등 (Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986)에 설명되어 있고 및, 예를 들어, 안정 또는 일시적인 형질감염, 리포펙션, 전기천공 (electroporation) 및 재조합 바이러스성 벡터에 의한 감염을 포함한다. 중추신경계를 포함하는 벡터에 대해서는 미국 특허 번호 4,866,042호를 및 양성-음성 선택 방법에 대해서는 미국 특허 번호 5,464,764 및 5,487,992호를 참조하라.

[0153] 감염에 의한 핵산의 도입은 다른 기록된 방법들 보다 몇 가지 나은 장점을 부여한다. 감염 본질로 인해, 더 높은 효율을 얻을 수 있다. 또한 바이러스들은 특정 세포 유형에 매우 특성화되어 있고 감염 및 전파된다. 따라서 이들 자연적인 특이성을 사용하여 상기 벡터를 특정 세포에 생체 내로 또는 조직이나 세포의 혼합 배양물 내로 벡터를 목표화시킬 수 있다. 바이러스성 벡터를 또한 특정 수용체 또는 리간드로 개질시켜 수용체-매개 사건을 통해 타겟 특이성을 변경할 수도 있다.

[0154] DNA 바이러스성 벡터 유입 및 발현 재조합 서열의 특정 예는 아데노바이러스-유도 벡터 Adenov53TK이다. 이러한 벡터는 양성 또는 음성 선택용 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제 (TK) 및 소망의 재조합 서열용 발현 카세트를 발현한다. 이러한 벡터를 사용하여, 대부분의 상피 출처 암은 물론 다른 것을 포함하는 아데노바이러스 수용체를 가지는 세포를 감염시킬 수 있다. 이러한 벡터는 물론 유사한 소정의 기능을 나타내는 다른 것은 다양한 세포 군을 처리하는 데 사용될 수 있고, 예를 들어, 세포의 시험관 내 또는 세포 외 배양물, 조직 또는 인간 피검체를 포함할 수 있다. 바람직한 일 구체예에서, 상기 핵산 작제물을 포함하는 벡터는 아데노바이러스이고 적어도 1×10^8 바이러스 입자의 용량으로 제공된다.

[0155] 발현을 특정 세포 유형으로 한정하는 특징을 또한 포함할 수 있다. 그러한 특징들은, 예를 들어, 프로모터 및 소망의 세포 유형에 특이적인 조절 요소를 포함한다.

[0156] 추가로, 재조합 바이러스성 벡터는 측면 감염 및 목표화 특이성과 같은 장점을 제공하기 때문에, 생체 내 발현에 유용하다. 측면 감염은, 예를 들어, 리트로바이러스와 생명 주기에 공유한 것이고 단일 감염된 세포가 싹터서 분리되고 주변 세포를 감염시키는 많은 자손 비리온을 생산하는 과정이다. 그 결과는 많은 부위가 빠르게 감염되고, 이의 대부분이 원 바이러스 입자에 의해 처음에는 감염되지 않은 것이다. 이것은 딸 자손에 의해서만 감염 물이 퍼져나가는 수직형 감염과는 대조된다. 이러한 특성은 소망의 목적이 목표화된 세포의 국소화된 수에만 특정 유전자를 도입하는 것이면 유용할 수 있다.

[0157] 전술한 바와 같이, 바이러스는, 많은 경우에 있어서, 숙주 방어 기작을 교묘히 피하는 것으로 진화된 매우 특정화된 감염성 물체이다. 전형적으로, 바이러스는 특정 세포 유형에서 감염하고 전파된다. 바이러스 벡터의 목표화 특이성은 그의 친부적 특이성을 사용하여 특이적으로 소정의 세포 유형을 목표화하고 그럼으로써 재조합 유전자를 감염된 세포에 도입할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 벡터는 목표화된 소망의 세포 유형에 의존하고 및 당해 분야의 숙련자에게 공지될 것이다. 예를 들어, 유방암이 처리될 것이면, 그러한 상피 세포에 특이적인 벡터를 사용할 수 있다. 마찬가지로, 조혈 (hematopoietic) 시스템의 질병 또는 병리적 조건을 치료하는 경우는, 혈액 세포 및 이들의 전구체에, 바람직하게는 조혈 세포의 특정 유형에 특이적인 바이러스성 벡터를 사용할 수 있다.

[0158] *리트로바이러스성 벡터는 감염성 입자로서 기능하도록 또는 일회의 감염 개시되도록 제작될 수 있다. 전자의 경우, 새로운 바이러스 단백질 및 RNA를 합성하는 데 필요한 모든 유전자, 조절 서열 및 패키징 신호를 유지할 수 있도록, 바이러스 게놈을 개질할 수 있다. 일단 이러한 분자들이 합성되면, 숙주 세포는 또 다른 감염 회차를 경험할 수 있는 새로운 바이러스 입자로 RNA를 꾸린다. 벡터의 게놈 또한 소망의 재조합 유전자를 암호화하고 발현시키도록 조작될 수 있다. 비-감염성 바이러스성 벡터의 경우, 통상 벡터 게놈을 변이시켜 RNA를 바이러스성 입자로 캡슐화시키는 데 요구되는 바이러스성 패키징 신호를 파괴한다. 그러한 신호가 없으면, 형성되는 임의의 입자는 게놈을 포함하지 않을 것이고 따라서, 후속적인 감염 회차를 통해 진행될 수 없다. 벡터의 특이적 유형은 의도된 적용에 달려있다. 실제 벡터는 당해 분야에 공지되어 있고 용이하게 이용될 수 있거나 공지된 방법을 사용하여 당해 분야의 숙련자에 의해 제조될 수 있다.

[0159] 상기 재조합 벡터는 몇 가지 방식으로 투여될 수 있다. 바이러스 벡터를 사용한다면, 예를 들어, 그 과정은 그것들의 특이성을 이용할 수 있고 결론적으로 병소에 국소적으로 투여될 필요가 없다. 그러나, 국소 투여는 더 빠르고 더 효과적인 치료를 제공하고, 예를 들어, 피검체로 정맥재 또는 피하 내 주사로 수행될 수 있다. 척수로 바이러스성 벡터로 주사하는 것 또한 투여의 한 양식으로, 특히 신경퇴행성 질환의 경우 사용될 수 있다. 주사 후, 상기 바이러스성 벡터는 감염에 필요한 적절한 목표 특이성을 가지고 숙주 세포를 인지할 때까지 순환된

다.

- [0160] 선행 기술 유전자 요법에서 만나는 가장 공통적인 문제는 벡터에 대한 숙주의 부실한 효능 및 면역 반응이다. 부실한 효능은 전달된 물질이 세포로 들어가는데 있어서, 계놈으로 통합되는 데 있어서 또는 적절한 수준으로 발현되는 데 있어서 실패로부터 결과될 수 있다. 또한 시간 경과에 걸친 반응이 부실할 수 있다. 이러한 것은 장점일 수 있는 재 투여가 전술한 면역 반응으로 인하여 가끔 문제가 된다는 것을 의미한다.
- [0161] 그러한 치료적 적용은 목표 조직에서 혈관 신생의 향상 및 저해하는 것 둘 다를 포함한다. 본 발명의 시스 조절 요소에 의해 지시되는 핵산 서열의 선회되는 발현에 대한 세포 응답에 의존하면서, 향상된 혈관신생으로 이끄는 내피세포들의 증식, 또는 감소된 혈관신생으로 이끄는 내피세포 증식의 저해가 결과될 수 있다.
- [0162] 따라서, 발현되면 세포독성이 되는 핵산서열을 본 발명의 핵산 작제물에 포함하면, 예를 들어, 종양의 신생적 혈관에서 빠르게 내피세포를 증식시키는 내피세포들로 세포사를 겨냥하는 방법을 제공한다. 그러한 벡터는 전신적으로 투여되기 때문에, 전이성 확산의 장소를 확인하고 파악하는 현재 이용 가능한 능력에 앞서서, 발전중인 전이성 장소에 세포사를 효과적으로 도입하는데 사용될 수 있다.
- [0163] 암 유전자 요법에 본 발명의 작제물과 사용될 수 있는 그러한 치료적 핵산 서열은 변이 유전자 활성화와 조절을 회복시키는 데 주안점을 둔, 교정 (corrective) 유전자 요법, 암 세포에 대항하여 면역계를 감작시키는 데 주안점을 둔 면역조절 (immuno-modulatory) 유전자 요법, 및 전구약물 또는 독성제제 (자살 유전자 요법), 친-세포 사멸성 유전자, 항-혈관신생 유전자에 의해서 또는 화학요법 또는 방사선 요법을 향상시켜 암 세포를 살해하는 데 주안점을 둔 세포감축 (cytoreductive) 유전자 요법으로 구분된다. 본 발명의 시스 조절 요소를 사용하는 교정 유전자 요법에 적합한 핵산 서열은, 그 발현이 암세포에서 억제되는, 항-신생물, DNA-안정화 유전자인, p53 유전자 (GenBank Accesss. No. BCO 18819); Cip/Kip (p21, GenBank Acces. No. NM000389; 및 p27, GenBank Accesss. No. NM004064) 및 Ink4 (pi 4, GenBank Access. No. NM058197), 사이클린-의존성 키나제 저해제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 시스 조절 요소와 같이 종양 유전자 기능의 억제에 적합한 핵산 서열은 ras, myc, erbB2 및 bcl-2와 같은 종양유전자의 전사 및 번역을 방해하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 및 번역을 방해하는 촉매성 리보자임을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 항-종양 유전자 안티센스 및 리보자임 폴리뉴클레오타이드의 합성 및 사용 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, Roth 등의 미국 특허 번호 6,627,189, Bennet 등의 미국 특허 번호 6,265,216 및 Calabretta 등의 미국 특허 번호 5,734,039에 상세히 설명되어 있고, 이들 모두는 본 명세서에 참조 문헌으로 등재되어 있다. 촉매성 항-종양유전자 리보자임의 제조 및 사용 방법은, 예를 들어, Leopold 등의 미국 특허 번호 5,635,385에 설명되어 있고, 이는 전체적으로 본 명세서에 참조된다.
- [0164] 본 발명의 다른 구체예에서, 본 발명의 시스 조절 요소의 조절 하에서 발현되는 핵산 서열은 종양 및 전이성 세포에 의한 면역 감시의 결여를 방지하도록 고안된, 면역조절 유전자 요법에 지향된 것이다. 본 발명의 시스 조절 요소와 사용하기에 적합한 면역조절 인자를 암호화하는 핵산 서열은 사이토카인 유전자, 종양 항원 및 외래 면역원의 세포독성 T 세포 인식을 증강하는 세포 내 분자 유전자 (비-특이성 국소 면역 반응을 유도하기 위해). 적절한 면역자극 인자는, 인간, 알파-, 베타-, 또는 감마-인터페론, 인간 T-세포 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 인간 종양 괴사 인자 (TNF), 및 림포톡신 (TNF-b)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 인간 IL-2 유전자를 클론하고 서열 분석하였고, 예를 들어, pBC12/HIV/IL-2 (American Type Culture Collection ("ATCC") 수탁번호 67618)로부터 얻은 0.68 kB BamHI-HinDIII 단편물로서 얻어질 수 있다. 더욱이, 인간 베타-인터페론, 인간 GM-CSF, 인간 TNF 및 인간 림포톡신의 서열들은 공지되어 있고 이용가능하다. 특히 인간 감마-인터페론은 공지되어 있고 (Fiers 등 (1982) Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 299:29-38) 및 GenBank에 수탁번호 M25460으로 기탁되어 있다. The sequence of human 인간 GM-CSF의 서열은 공지되어 있고 (Wong 등 (1985) Science 228:810-815) GenBank에 수탁번호 M10663로 기탁되어 있다. 인간 TNF의 서열은 개시되어 있고 (Wang 등 (1985) Science 228:149-154) 및 is deposited with GenBank에 수탁번호 M10988로 기탁되어 있다. 인간 림포톡신 (TNF-b)의 서열 역시 개시되어 있고 (Iris 등 (1993) Nature Genet. 3: 137-145) 및 GenBank에 수탁번호 Z15026로 기탁되어 있다.
- [0165] 다른 구체예에 있어서, 본 발명의 시스 조절 요소의 조절 하에서 발현되는 핵산 서열은 세포감축 유전자 요법에, 또는 직접적이거나 간접적인 유전자 전달에 의한 목표 세포의 살해에 지향된다. 다른 바람직한 구체예에서, 핵산 서열은 세포 독성 유전자로서, 예를 들어, p53 및 egr-1-TNF-알파와 같은 자살 유전자, 겐사이클로비르/티미딘 키나제 및 5-플루오로시토신/시토신 디아미나제와 같은 약물 민감 요법용 세포독성 전구약물/효소, 및 5 EIA와 같은 항전이성 유전자이고, 그러나 이것에 한정되지 않는다. 특이적 세포 독성 제작용의 예는 하기

실시에 단락에서 상세히 설명된다.

- [0166] 다른 구체예에서, 본 발명의 시스 조절 요소 하에서 발현된 핵산 서열은 유전 방사동위 요법으로 지향될 수 있다: 방사능-표지된 카테콜아민 1131-메타요오도벤질-구아니딘을 노르아드레날린 수용체 (NAT)를 발현하는 세포에 도입하는 것은 크롬친화성세포종, 신경아세포종, 유암종 및 수질 갑상선 암종 (medullary thyroid carcinoma)을 치료하는 확립된 요법 양상이다. 선택적으로, 소듐 요오드 심포터 (NIS)는 요오드를 정상 및 악성 갑상선 세포로 취득하는 것을 매개한다. 형질전환 유전자로서, NIS 유전자는 시험관 내 및 생체 내 모델에서 전립선 암을 억제하는 것으로 보고되어 있다.
- [0167] 대조적 방법을 사용하여, 예를 들어, 아테롬성 동맥경화 환자, 또는 당뇨병과 같은 질환 또는 상해의 결과로서 말초 순환에 심각한 악화 현상을 겪는 환자에 있어서 조직을 재 맥관화시킬 수 있다. 이 경우, AdPPE-1-3X-GF의 작제물, 여기서 GF는 성장 인자 (예, 사이토카인) 또는 이의 변형물인 타입 (예, AdPPE-1-서열번호7-GF)을 사용할 수 있다. 이러한 목적에 사용되기 적절한 성장 인자들은 VEGF (GenBank accession M95200), 래트 PDGF-BB (GenBank 수탁번호; mus-AF 162784에 99% 동일), EGR-1 (GenBank 수탁번호 M22326), FGF류 (GenBank 수탁번호 XM 003306을 포함하나 이에 한정되지 않는) 및 이의 조합물을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.
- [0168] 본 발명의 이러한 관점에 따라서 하나 이상의 혈관신생 인자를 사용하는 것이 VEGF 단독 투여와 연관되어 나타나는, 혈관 미성숙 및 혈관 퇴행의 문제를 피하는 데 바람직하다는 것을 이해하게 될 것이다 (더 상세한 것은 실시예 단락의 실시예 27 및 31을 참조). 조합 요법은 내피세포 채널 발아의 제 1 단계를 흉내내고 및 후속적으로 안정된 초기 혈관에 평활근을 붙이는 것이다 [Richardson DM 등 (2001) Nat. Biotechnol. 19: 1029- 1034]. 본 발명의 이러한 관점에 따른 조합 요법은 본 발명의 분리된 핵산의 조절 하에 있는, 동일한 핵산 작제물 상에 관심의 폴리뉴클레오타이드들을 클로닝함으로써 수행될 수 있다. 다른 방법 또는 바람직한 양태에서, 상기 관심의 폴리뉴클레오타이드 각각은 본 발명의 핵산 작제물에 독립적으로 클론될 수 있고, 이럼으로써 유도된 혈관신생 과정을 더 밀접하게 조절할 수 있게 한다.
- [0169] 본 발명의 프로모터 서열 내에 저산소증 응답 요소 (예, 서열번호 5)를 합체하여, 허혈성 조직에 발현 선택성을 더 향상시킬 수 있고, 따라서 선택된 조직의 신규 맥관화를 결과할 수 있다. 혈액 공급이 증가함에 따라, 허혈 증은 완화되고, 저산소증 응답 요소가 유도되는 것이 그쳐지고, GF 수준이 감소되며 및 상기 신규-맥관화 과정이 정지된다.
- [0170] 본 발명의 핵산 작제물들을 사용하는 내피 조직에 대한 유전자 요법은 혈관신생적 내피세포를 목표화 할 수 없는 다른 방법으로는 얻을 수 없는 일시적인 협력과정을 제공한다는 것이 이해될 것이다. 후술하는 실시예 단락에서 설명되는 바와 같이, 본 발명의 신규한 인헨서를 포함하는 시스 조절 요소 [예를 들어, PPE-1 (3 x)]는 혈관 증식 중인 조직에서는 특이적으로 재조합 유전자의 발현을 증가시키도록 지시하는 데 반해 다른 비-혈관신생 조직에서는 재조합 유전자 발현을 방지한다 (참조 실시예 12, 14, 16, 19, 20, 23, 27, 29, 34 및 35). 본 발명의 시스 조절 요소 및 작제물의 전사 조절 하에서 치료적 유전자를 발현시키는 것은 그 유전자 생성물이 지향된 세포 과정들 (혈관신생적 성장 과정)의 활성화와 부합하고, 이로써, 더 큰 효과 및 치료에 필요한 효과적인 용량의 감소를 가져온다.
- [0171] 따라서, 본 발명의 시스 조절 요소를 포함하는 작제물을 유전자 요법 맥락에서 사용하면, 종양으로의 전달을 최대화시키면서 주변 정상 조직 상에는 독성 효과를 최소화시킬 것으로 예상된다. 의미 있게는, 후술하는 실시예 단락에서 설명되는 바와 같이 이것은 주위 조직이 내피 요소를 포함한다고 하더라도 마찬가지라는 것이다. 이것은 실시예 16에서 증명되는 바와 같이, 본 발명의 시스 조절 요소는 상기 PPE-1 프로모터의 맥락에서조차, 내피 조직을 빠르게 증식시키는 데 발현 수준을 크게 증가시키기 때문이다.
- [0172] 비록 하기에서 제공된 실시예들이 본 발명의 시스 조절 서열을 상기 PPE-1 프로모터와 연계하여 특이적으로 사용하는 것을 다루고 있지만, 본 발명의 인헨서 요소는 또한 다른 진행 프로모터 서열과 사용될 때도 그의 세포 특이성 효과를 발휘할 것이라는 것이 예상된다.
- [0173] 그러한 예상은 인헨서 요소들이 종종 이동할 수 있다는, 즉 그들이 하나의 프로모터 서열로부터 다른 연관되지 않는 프로모터 서열로 전이될 수 있고 여전히 활성을 유지할 것이라는 것을 보여주는 선행기술 발견에 근거한다. 예를 들어, 참조, D. Jones 등 (Dev. Biol. (1995) 171(1):60-72); N. S. Yew 등, (Mol. Ther. (2001) 4:75-820) 및 L. Wu. 등 (Gene Ther. (2001) 8:1416-26). 실제, Bu 등 (J. Biol Chem. (1997) 272(19): 32613-32622)의 초기 작업은 본 발명의 것과 연관된 인헨서 요소, 예를 들어, 서열번호 15 및 16, 또는 서열번호 6을 포함하는 인헨서들을 구성적 프로모터들, 예를 들어 SV-40 프로모터와 사용할 수 있다는 것을

강력하게 제시하고 있다. 그러한 것으로서, 본 발명의 인헨서 서열을 포함하도록 개질된 진핵 프로모터를 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드, 이를 포함하는 작제물 및 이를 이용한 방법들은 청구되는 발명의 범위에 속한다.

[0174] 따라서, 본 발명에 따른 인헨서 요소의 최소 형태는 서열번호 16에 설정된 서열의 적어도 일부분에 공유결합적으로 연결된 서열번호 15에 설정된 서열의 적어도 일부분을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드이라는 것이 제시된다. 이러한 인헨서는 내피세포 특이성 프로모터들 (예를 들어, PPE-1; 서열번호 1) 및 구성적 프로모터들, 예를 들어, CMV 및 SV-40로부터 유도된 것들과 같은 바이러스성 프로모터들을 포함하는, 그러나 이에 한정되지 않는, 광범위한 프로모터들과 기능할 수 있다고 예측된다. 이러한 인헨서는 다양한 프로모터들에 내피세포 특이성을 부여할 수 있어야 한다. 상기 인헨서 요소는 예를 들어, 서열번호 6에 설정된 서열의 하나 이상의 복사본을 첨가함으로써 확대될 수 있다. 이러한 추가적 서열들은 서열 번호 8의 서열에 연속적으로 또는 비연속적으로 첨가될 수 있다.

[0175] 본 발명은 내피세포에서 관심의 핵산 서열을 발현하는 방법을 또한 포함하는바, 이는 서열번호 16에 설정된 서열의 적어도 일부분에 공유결합적으로 연결된 서열번호 15에 설정된 서열의 적어도 일부분을 포함하는 인헨서 요소 및 상기 관심의 서열을 내피세포에 특이적으로 고도로 발현하는 것을 지시하는 프로모터에 의존하는 작제물을 사용한다.

[0176] 본 명세서에 사용되는바, "피험체의 몸체로부터 분리된 세포로의 생체 외 투여 및 후속적으로 그 세포를 상기 피험체의 몸체로 재도입하는 것" (Lyden 등 (2001) Nature Medicine 7:1 194-1201)에서 설명되는 바와 같이 줄기 세포의 사용을 포함한다.

[0177] 하기 제시된 실시예에서 설명된 실험에서 아데노바이러스를 사용하지만, 본 발명의 작제물은 당해 분야의 숙련자에 의해 다른 바이러스 전달 시스템에 용이하게 적용될 수 있다.

[0178] 상기 내피세포 특이성 프로모터를 포함하는 바이러스 벡터들은 그 바이러스 벡터들의 목표화를 향상시키는 다른 방식과 조합하여 사용될 수 있다. 그러한 방식들은 짧은 펩타이드 리간드 및/또는 이중특이성 또는 이중 기능성 분자 또는 이체들 (diabodies)을 포함한다 (Nettelbeck 등 Molecular Therapy 3:882;2001).

[0179] 유전자 요법의 맥락에서 조직에서 발현된 치료적 형질전환 유전자에 대한 숙주 면역 반응은 효과적인 유전자 요법 방법의 개발 및 고안에 중요한 관심사라는 것이 인식될 것이다. 상기 재조합 형질전환 유전자에 대한 해로운 면역 반응은 약물 전달의 효율을 방해하고, 염증, 세포독성 및 질병에 이르게 하는 것이다. 따라서, 발현된 재조합 치료 분자의 항원성 잠재성은 유전자 요법에서 매우 중요하다.

[0180] 본 발명을 실행 시, Ad5PPE-1 (3x) 핵산 작제물 (실시예 41, 도 95b)의 일부분으로서 발현되는 인간 폴리펩티드 (TNF-R1)은, CMV 프로모터 (도 95)의 조절하에서 Fas-c 키메라 유전자의 투여에 대한 명확한 항-TNF-R1 반응에도 불구하고 마우스에서 항원성이 결여되어 있고, 숙주에서 주요한 면역 반응을 유도하지 않는다는 것이 예기치 않게 발견되었다. 따라서, 본 발명의 분리된 폴리펩티드는, 세포 내에서 상기 재조합 형질전환 유전자 (유전자들)를 발현함으로써 나타나는, 내생적으로 발현된 재조합 형질전환 생성물이나 생성물들에 대한 숙주 면역 반응을 본 발명의 시스 조절 요소의 전사적 조절 하에서 감소 또는 제거하는 데 사용될 수 있다. 바람직하게는, 상기 시스 조절 요소는 PPE-1 (3x) 프로모터이다.

[0181] 본 발명의 실행시, 놀랍게도, 상기 혈관신생적 내피세포 특이성 프로모터 PPE-1 (3x)는 항-혈관신생적 요법에 의한 추가의 강화작용에 역할한다는 것이 밝혀졌다. 도 94는 이중 엔도텔린 수용체 (ETA 및 ETB) 길항제 보센탄의 투여에 응답하여, PPE-1 (3x) 조절하에 있는 LUC 리포터 형질전환 유전자를 함유하는 핵산 작제물을 가지고 있는 형질전환 마우스의 고도로 맥관화된 기관 (동맥, 심장, 폐, 기관지 및 뇌)에서 루시페라제의 발현이 선호적으로 향상된다는 것을 나타낸다. 본 발명의 시스 조절 요소의 조절 하에서 치료적 재조합 유전자의 형질전환적 발현하는 것과 조합된 항-혈관신생적 요법의 상승 효과는 약물 목표화에 대하여 이전에 개시되지 않았던 가능성을 제공하며 및 항-혈관신생 요법에서 요구되는 용량을 감소시킨다. 단일 가정에 의해 한정되지 않는다는 소망없이, 오토크린 루프를 통해 엔도텔린 프로모터의 유도자를 활성화시키는 데 있어서, 항혈관신생 요법에 대한 내재 조직 반응은 실제로 본 발명의 핵산 작제물의 엔도텔린 프로모터의 요소를 향상시킨다. 따라서, 일 구체예에 있어서, 본 발명의 시스 조절 요소를 포함하는 작제물은 내피세포-특이성 프로모터 활성의 내재적 인헨서를 유도할 수 있도록 선택된, 보조적 항-혈관신생 요법과 조합하여 투여될 수 있다. 당해 분야에 공지된 항-혈관신생적 요법은, 보센탄, VEGF-수용체 길항제, 안지오테스틴 및 엔도스테스틴과 같은 엔도텔린 수용체 길항제, 및 베바시주맙 (Bevacizumab) 및 노바스트 (Novast)와 같은 항혈관신생 항체를 포함하지만, 이에 한정

되지 않는다.

- [0182] 본 발명의 작제물 및 방법은 조직 조작에 사용하기에 특히 적합하다. VEGF 및 PDGF는 맥관화를 유도하는데 공통적으로 사용되지만, 이러한 인자들을 효과적인 방식으로 투여하는 방법은 아직 최적은 아니다. 시험관 내에서, 성장인자들을 성장 배지에 첨가한다. 이러한 방법에서, 상대적으로 높은 농도가 필요하다. 생체 내에서, 조작된 조직 작제물은 빠르게 맥관화될 필요가 있고 이식 장소에 혈관신생을 유도할 필요가 있다. 본 발명의 시스템 조절 요소 및 핵산 작제물은 생체 내 및 생체 외에서 조직의 새로운 맥관화에, 예를 들어, 조직 조작, 상처 치유, 노화성 황반 변성을 조직 조작, 치료에 사용될 수 있다. 본 발명을 실시시, PPE-1 (3 x)의 조절 하에서, 혈관신생적 인자는 맥관화된, 시험관 내 조작된 조직에서 선택적으로 발현되고, 및 시험관 내 및 생체 내에서 조작된 조직에서 뛰어난 신생 맥관화를 제공한다는 것이 최초로 발견되었다.
- [0183] AdSPPEC-1-3x VEGF로 세포를 감염시키는 것은 조작된 작제물에 형성된 혈관-유사 구조의 수 및 크기에 대하여 유도 효과를 가지며, 이는 배지에 VEGF를 첨가하는 것에 비하여, Ad5PPEC-1-3x VEGF 바이러스로 처리된 샘플에서 혈관의 수와 면적에서 4-5 배 증가가 나타난다 (Fig 91a). 생체 내 연구에서, 이식된 스카폴드-기반 조직 작제물의 생존, 분화, 통합 및 혈관화를 분석하였다. Ad5PPEC-1-3x VEGF 바이러스로 감염된 작제물은 대조군 작제물과 비교하여, 혈관 구조의 증가를 보인다.
- [0184] 따라서 일 구체예에 있어서, 본 발명의 핵산 작제물은 천연 또는 조작된 조직에서 혈관신생을 제어하는 데 사용될 수 있다.
- [0185] 루시페라제-기반 영상 시스템을 사용하여, 본 발명자들은, Ad5PPEC-1-3x VEGF로 감염된 이식된 작제물은 AAV-루시페라제 단독으로 처리된 대조군 작제물보다 더 높은 신호를 가지며, 이는 Ad5PPEC-1-3x VEGF로 시험관 내 감염하는 것은 상기 이식된, 조작된 조직 작제물의 생존 및 맥관화를 향상시킬 수 있다는 것을 나타낸다고 밝혔다 (도 91b). 또한, 본 발명의 아데노바이러스 작제물로 형질유도된 세포를 포함하는 그러한 조작된 조직 작제물은 세포 용해를 통해 주변 조직을 감싸는 치료적, 재조합 바이러스 입자의 공급원이 될 수 있다.
- [0186] 따라서, 본 발명의 일 관점에 따라서, 본 발명의 핵산 작제물을 포함하는 세포를 제공한다. 본 발명의 다른 관점에 따라서, 이러한 세포들은, 예를 들어, 조직 조작에 사용될 스카폴드를 만드는데 사용된다. 스카폴드를 사용하여 조직 조작하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다 (참조, 예를 들어, 미국 특허 번호 6,753,181; 6,652,583; 6,497,725; 6,479,064; 6,438,802; 6,376,244; 6,206,917, 6,783,776; 6,576,265; 6,521,750; 6,444,803; 6,300,127; 6,183,737; 6,110,480; 6,027,743; 및 5,906,827, 및 미국 특허 출원 번호 0040044403; 0030215945; 0030194802; 0030180268; 0030124099; 0020160510; 0020102727, 모두 참조 문헌으로 포함되어 있고, 조직 스카폴드 상에서 조작된 조직의 발생을 교시하고 있다). 적합한 스카폴드는 합성 폴리머, 세포 점착 분자 또는 세포 외 매트릭스 단백질로 구성될 수 있다.
- [0187] 본 발명에 의해 사용되는 세포 점착/ECM 단백질은 피브리노겐, 콜라겐, 인테그린 (Stefanidakis M, 등, 2003; J Biol Chem. 278: 34674-84), 세포 간 점착 분자 (ICAM) 1 (van de Stolpe A 및 van der Saag PT. 1996; J. Mol. Med. 74: 13-33), 테나신 (tenascin), 피브리넥틴 (fibrinectin) (Joshi P, 등, 1993; J. Cell Sci. 106: 389-400); 비멘틴, 미세소관-연합 단백질 ID (Theodosios DT. 2002; Front Neuroendocrinol. 23: 101-35), 지세린 (gicerin), 신경돌기 과생성장 인자 (NOF) (Tsukamoto Y, 등, 2001; Histol. Histopathol. 16: 563-71), 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA), 박테리아성 셀룰로즈 (BC), 젤라틴, 및/또는 신경 손상 유도 단백질 (nerve injury induced protein 2) (ninjurin 2) (Araki T 및 Milbrandt J. 2000; J. Neurosci. 20: 187-95)를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 세포 점착 및/또는 세포 외 매트릭스 단백질일 수 있다.
- [0188] 본 발명에 의해 사용된 합성 폴리머는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 수산화 인회석 (HA), 폴리글리콜 산 (PGA) (Freed LE, Biotechnology (N Y). 1994 Jul;12(7):689-93.), 엘실론-카프로락톤과 편직된 폴리-1-락타이드로 강화된 1-락트산 [KN-PCLA] (Ozawa T 등, 2002; J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 124: 1157-64), 직포 (WV-PCLA) [Ozawa, 2002 (상기한 바와 같은)], 상호연결된-다공성 칼슘 수산화 인회석 세라믹 (IP-CHA), 폴리 D,L-락트산-폴리에틸렌글리콜 (PLA-PEG) (Kaito T 등, 2005; Biomaterials. 26: 73-9), 불포화 폴리에스테르 폴리 (프로필렌 글리콜-코-푸마르 산) (PPF) (Trantolo DJ 등, 2003; Int. J. Oral Maxillofac. Implants. 18: 182-8), 폴리락타이드-코-클로콜라이드 (PLAGA) (Lu HH, 등, 2003; J. Biomed. Mater. Res. 64A(3): 465-74), 폴리-4-하이드록시부티레이트 (P4HB), 및/또는 폴리포스파젠 (Cohen S 등, 1993; Clin. Mater. 13(1-4): 3-10) 일 수 있다.
- [0189] 본 발명을 실시시, 본 발명자들은 친-세포사멸성 요소의 조직-특이성 발현 및 특이성 활성화의 조합으로 비-목표

화된 조직 또는 세포를 이러한 요소에 노출시키지 않고 혈관 신생에 연루된 세포를 선택적으로 세포 사멸시킬 수 있게 하며, 따라서 선행 기술 치료 방식을 특징지웠던 독성 부작용 및 리던던시 (redundancy)를 피할 수 있다는 것을 발견하였다.

[0190] 따라서, 본 발명의 일 관점에 따라서, 피험체의 조직에서 혈관 신생을 하방 조절하는 방법을 제공한다. 사용되는 바와 같이, 용어 "혈관신생을 하방 조절하는 것"은 새로운 혈관의 형성에 이르게 하는 혈관 신생 과정을 늦추거나 정지하게 하는 것이다. 본 발명의 이러한 관점에 따른 방법은 상당수의 혈관신생 세포에서 세포독성을 내도록 고안되고 배열된 핵산 작제물을 상기 피험체에 투입함으로써 수행된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "혈관신생 세포"는 혈관신생의 과정에 참여하거나 기여한 임의의 세포를 가르킨다. 따라서, 혈관신생 세포들은 내피세포, 평활근 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0191] 본 명세서에 사용되는바, 용어 "세포독성"은 세포의 정상적인 동화작용, 기능 및/또는 구조를, 강력한 비가역적 방식으로, 대부분 세포사에 이르게하는, 화합물 또는 과정의 능력을 지칭한다. "세포독성 분자"는 본 명세서에서는, 일정 조건하에서, 세포 내에 세포 독성을 발생시키거나 세포독성 과정 또는 경로를 유도하는 능력을 가지는 분자로 정의된다. 그러한 세포독성 분자는 메토틱세이트, 뉴클레오시드 유사체, 질소 머스터드 화합물, 안트라사이클린류와 같은 항대사산물과 같은 세포독성 약물, 카스파제와 같은 세포사멸 유도자는 물론 Fas-c 키메라 유전자와 같은, 세포독성 약물과 다른 세포독성 과정의 유도자를 암호화하는 유전자를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 세포독성 약물 및 분자들은, 항 대사산물 약물과 같은 다른 인자에 관계없이 절대적으로 세포독성이거나, 또는 다른, 세포독성 또는 비-세포독성 인자의 상호작용에 의존하여 조건적으로 세포독성일 수 있다. 세포독성 발생 도메인은 세포독성 유전자의 코딩 서열과 같은 세포독성을 유도하거나 개시할 수 있는 세포 독성 분자의 일부분으로서 정의된다. 세포독성 경로는, 그 중에서도 세포사멸 (apoptosis) 및 괴사를 포함한다.

[0192] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 세포독성 제제의 발현은 일단의 혈관신생 세포들에게로 지향된다. 일단의 혈관신생 세포들에서 세포독성 제제의 특이적 발현을 지시하기 위해, 본 발명의 핵산 작제물은 예를 들어, Fas, TNFR, 및 TRAIL과 같은 효능자 도메인에 융합된. 예를 들어, 타이로신 키나제, 수용체 세린 키나제, 수용체 트레오닌 키나제, 세포 접착 분자 또는 포스포타제 수용체의 세포-표면 수용체 도메인일 수 있는 리간드 결합 도메인을 포함하는 키메라 폴리펩티드를 암호화하는 제 1 폴리뉴클레오타이드 부위를 포함한다.

[0193] 그러한 키메라 폴리펩티드는 리간드 결합 도메인의 활성화, 즉 리간드 결합을 통한 활성화가 상기 세포독성 분자의 효능자 도메인을 통한 세포독성을 촉발하는 한 임의의 세포독성 도메인에 융합된 임의의 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0194] 리간드 결합 도메인 및 이에 융합된 세포독성 발생 도메인을 선택하는 것은 세포사멸에 목표화된 혈관신생 세포의 유형에 영향을 받는다. 예를 들어, 특정 군의 내피세포들을 목표화할 때 (예, 증식중인 내피세포, 또는 종양성 표현형을 나타내는 내피세포), 상기 키메라 폴리펩티드는 그러한 내피세포의 환경에서 자연적으로 존재하는 리간드 및 바람직하게는 다른 비목표화된 조직의 내피세포에는 존재하지 않는 리간드 (예, TNF, VEGF)를 결합할 수 있는 리간드 결합 도메인을 포함한다. 그러한 리간드는 내피세포들에 의해 분비될 수 있고 (오토크린), 인접 종양세포에 의해 분비될 수 있고 (파라크린) 또는 이러한 내피세포들에 특이적으로 목표화될 수 있다.

[0195] 적절한 키메라 폴리펩티드류의 예는 상기에서 및 후술하는 실시예 단락의 실시예 7 및 33-36에서 제공되어 있다. 바람직하게는, 상기 키메라 폴리펩티드는 후술하는 실시예 단락의 실시예 7-9에서 상세히 설명되는 Fas-c 키메라 또는 실시예 33-36에서 설명된 HSV-TK 유전자이다. Fas-c 키메라의 발현은 Fas 사멸 경로의 FADD-매개 활성을 통해 세포사멸을 유도하는 것으로 나타났다. HSV-TK 형질전환 유전자를 발현시키면 겐사이클로비르 및 아사이클로비르와 같은 약물에 형질전환된 세포가 굉장히 민감하게 되는 결과를 모이며, 결국 세포사멸 및 괴사 세포사로 이어지게 된다.

[0196] 그러한 키메라 폴리펩티드의 사용은 특히 유용한데, 후술하는 실시예 단락에서 나타난 바와 같이, 특정 군의 혈관신생 세포들에서는 세포독성을 효과적 및 강력하게 활성화시키면서 세포사로 목표화되지 않은 다른 군의 세포에서는 활성화가 되지 않기 때문이다.

[0197] 후술하는 실시예 단락의 실시예 33-38에서 설명되는 바와 같이, PPE-1 (3x) 프로모터 요소의 전사적 조절하에 있는 HSV-TK 유전자를 포함하는 본 발명의 핵산 작제물의 시험관 내 및 생체 내 투여로, 탁월한 겐사이클로비르-의존성 내피세포 세포독성을 나타내었다. 세포독성은 혈관신생적 내피세포들에 한정되면서 종양 및 전이물에서 선택적인 세포사멸성 및 괴사성 세포사를 나타낸다.

- [0198] 따라서, 본 발명의 핵산 작제물은 전구약물을 독성 화합물로 전환시킬 수 있는, 자살 유전자를 전달하는데 사용될 수 있다. 하나의 바람직한 구체예에서, 상기 핵산 작제물은 그러한 자살 유전자를 암호화하는 제 1 폴리뉴클레오타이드 부위 및 혈관신생 세포에서 상기 자살 유전자의 발현을 지시할 수 있는 시스 작용 조절 요소를 암호화하는 제 2 폴리뉴클레오타이드 부위를 포함한다.
- [0199] 본 발명의 작제물 및 방법에서, 치료적 핵산 서열 또는 "자살 유전자" 는 자체로 또는 다른 화합물의 존재 하에서 세포사를 야기하는 생성물을 암호화하는 핵산이다. 전술한 작제물은 자살 작제물의 오로지 일례만을 나타낸다는 것이 이해될 것이다. 다른 예는 수두 대상 포진 바이러스의 티미딘 키나제 및 5-플루오로시토신을 고도의 독성 화합물 5-플루오로우라실로 전환시킬 수 있는 박테리아성 유전자 시토신 디아미나제이다.
- [0200] 본 명세서에서 사용되는바, "전구약물"은 독성 생성물, 즉 종양세포에 독성적인 생성물로 전환될 수 있는 본 발명의 방법에 유용한 임의의 화합물을 의미한다. 상기 전구약물은 본 발명의 방법에 유용한 벡터에서 치료적 핵산 서열 (자살 유전자)의 유전자 생성물에 의해 독성 생성물로 전환된다. 그러한 전구약물의 대표적 예는 HSV-티미딘 키나제에 의해 생체 내에서 독성 화합물로 전환되는 겐사이클로비르이다. 상기 겐사이클로비르 유도체는 종양 세포에 독성이다. 전구약물들의 다른 대표적 예는 어싸이클로비르, FIAU [1-(2-테옥시-2-플루오로-베타-D-아라비노푸라노실)-5-요오도우라실], VZV-TK대한 6-메톡시퓨린 아라비노시드, 및 시토신 디아미나제에 대한 5-플루오로시토신을 포함한다. 바람직한 자살 유전자/전구약물 조합물은 시토신 디아미나제 및 5-플루오로시토신과 이의 유도체, 수두 대상 포진 바이러스 TK 및 6-메틸퓨린 아라비노시드와 이의 유도체, 및 HSV-TK 및 겐사이클로비르, 어싸이클로비르, FIAU 또는 이의 유도체이다. 자살 유전자/전구약물 작제물의 제조 및 사용 방법은 Woo 등의 미국 특허 번호 6,066,624, 및 후술하는 실시예 단락에 상세히 설명되어 있다.
- [0201] 하나의 바람직한 구체예에서, 상기 시스 작용 조절 요소는 내피 또는 말초내피세포 특이성 프로모터이다. 조건적으로 복제하는 아데노바이러스 벡터로 세포를 형질전환 유도하는 것이 목표 세포 용해 및 바이러스 감염의 확산에 더욱 효과적이기 때문에, 상기 핵산 작제물은 조건적으로 복제하는 아데노바이러스를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 그러한 본 발명의 CRAD 작제물은 후술하는 실시예 단락에서 상세히 설명된다.
- [0202] 바람직하게는, 본 발명의 핵산 작제물은, 예를 들어, 전신 투여 경로를 통해 또는 경구, 직장, 경점막 (특히 경비(transnasal)), 장관 또는 비경구 투여 경로를 통해 피험체에 투여된다. 전신 투여는 근육내, 피하내 및 골수강내 주사는 물론 경막내, 직접 뇌실질 내, 정맥 내, 복막 내, 비강 내, 안구 내 주사 또는 종양 내 투여를 포함한다.
- [0203] 바람직하게는, 상기 피험체는 포유동물이고, 더 바람직하게는 인간이며, 가장 바람직하게는 종양 성장, 증식성 당뇨병, 망막증, 관절염 등과 같은 과도 또는 정상 신생맥관화에 의해 특징되는 질환을 겪고 있는 인간이다.
- [0204] 본 발명의 핵산 작제물은 그 자체로 피험체에 또는 약학 조성물의 일부 (활성 성분)으로서 투여될 수 있다.
- [0205] 담체가 제공되거나 그 자체인 폴리뉴클레오타이드를 다양한 세포 타입내로 효과적으로 전달하는 데 사용될 수 있는 많은 전달 전략에 대한 선행 기술의 교시가 있다 (참조, 예를 들어, Luft (1998) J Mol Med 76(2): 75-6; Kronenwett 등 (1998) Blood 91(3): 852-62; Rajur 등 (1997) Bioconj Chem 8(6): 935-40; Lavigne 등 (1997) Biochem Biophys Res Commun 237(3): 566-71 및 Aoki 등 (1997) Biochem Biophys Res Commun 231 (3): 540-5).
- [0206] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "약학 조성물"은 생리적으로 적합한 담체 및 부형제와 같은 다른 화학적 성분을 가지는, 본 명세서에서 설명된 하나 이상의 활성 성분이나 제제의 제조물을 칭한다. 약학 조성물의 목적은 화합물을 유기체에 투여하는 것을 용이하게 하는 것이다.
- [0207] 이후, 어구, "생리적 허용 담체" 및 "약학적 허용 담체"는 유기체에 심각한 자극을 야기하지 않고 투여된 핵산 작제물의 생물학적 활성 및 특성을 폐지하지 않는 담체 또는 희석제를 지칭하는 것으로 상호교환적으로 사용될 수 있다. 보조제는 이러한 어구 하에 포함된다.
- [0208] 본 명세서에서, 용어 "부형제"는 활성 성분의 투여를 더 용이하게 하기 위해 약학 조성물에 첨가된 비활성 물질을 지칭하는 것이다.
- [0209] 부형제의 제한 없는 예는 칼슘 카보네이트, 칼슘 포스페이트, 전분의 다양한 당류 및 타입, 셀룰로즈 유도체, 젤라틴, 식물성 오일 및 폴리에틸렌 글리콜류를 포함한다.
- [0210] 약물의 형성 및 투여에 대한 기술은 "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton,

PA, 최종판에 나타나 있고, 이는 본 발명의 참조문헌에 포함된다.

- [0211] 적절한 투여 경로는, 예를 들어, 경구, 직장, 경점막, 특히 경비강, 장관, 또는 근육 내, 피하 내 및 골수강 내 주사는 물론 경막 내, 직접 뇌심실 내, 정맥 내, 복막 내, 비강 내, 또는 안구 내 주사를 포함하는 비경구적 전달을 포함한다.
- [0212] 선택적으로, 전신적인 방식보다는, 예를 들어, 환자의 조직 부위로 직접적인 약학 조성물 주사를 통한, 국소적 방식으로 약학 조성물을 투여할 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 종양 조직으로 직접 투여하는 것은 국소 투여의 예이다.
- [0213] 본 발명의 약학 조성물은 당해 분야의 공지된 공정, 예를 들어, 혼합, 용해, 과립화, 당의 제조, 균질화, 에멀전화, 캡슐화, 내포화 또는 동결화 과정의 방식으로 제조될 수 있다.
- [0214] 본 발명에 따라 사용되는 약학 조성물은 약학적으로 사용될 수 있는 제조물로 활성 성분을 가공하는 것을 용이하게 만드는 부형제 및 보조제를 포함하는 하나 이상의 생리적 허용 담체에서 배합된다. 적절한 배합은 선택된 투여 경로에 의존한다.
- [0215] 주사의 경우, 상기 약학 조성물의 활성성분은 적절한 용액, 바람직하게는, 한크 용액 (Hank's solution), 링거액 또는 생리적 염 완충액과 같은 생리적으로 양립되는 완충액에서 배합될 수 있다. 경점막 투여를 위해서는, 침투될 장애물에 적절한 침투제를 배합물에 사용한다. 그러한 침투제는 일반적으로 당해 기술분야에 공지되어 있다.
- [0216] 경구 투여의 경우, 상기 약학 조성물은 당해 분야에 공지된 약학적 허용 담체와 활성 화합물을 조합함으로써 용이하게 배합될 수 있다. 그러한 담체는 환자에 의해 경구 섭취용으로 상기 약학 조성물을 정제, 알약, 당의정, 캡슐, 액제, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로 만드는 것이다. 경구용의 약학 제조물은, 정제 또는 당의정 핵심물을 만들기 위해 필요 시 적절한 보조제를 첨가한 후, 고형 부형제를 사용하여, 선택적으로는 그 결과 혼합물을 뿜고 과립 혼합물을 가공하여 만들 수 있다. 적절한 부형제는 특히, 락토즈, 수크로즈, 만니톨 또는 소르비톨을 포함하는 당과 같은 충전제; 예를 들어, 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 옥수수 전분, 검 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈, 소듐 카르보메틸셀룰로즈와 같은 셀룰로즈 제조물; 및/또는 폴리비닐피롤리돈 (PVP)과 같은 생리적 허용 폴리머이다. 필요시, 가교된 폴리비닐 피롤리돈, 아가 또는 알긴산이나 소듐 알지네이트와 같은 이의 염류와 같은 붕해제를 첨가할 수 있다.
- [0217] 당의정 내용물은 적절한 코팅물로 제공된다. 이러한 목적에는, 아라빅 검, 탈크, 폴리비닐 피롤리돈, 카르보폴 젤, 폴리에틸렌 글리콜, 산화 티타늄, 락커 용액 및 적절한 유기 용제나 용제 혼합물을 선택적으로 포함할 수 있는 농축된 당 용액을 사용할 수 있다. 확인용으로 또는 활성 화합물의 용량물의 상이한 조합을 특징짓기 위해 염료 또는 색소를 정제나 당의정에 첨가할 수 있다.
- [0218] 경구적으로 사용될 수 있는 약학 조성물은 젤라틴으로 만든 압입 끼워맞춤 (push-fit) 캡슐은 물론 젤라틴으로 만든 연질, 봉입 캡슐 및 글리세롤 또는 소르비톨과 같은 가소제를 포함한다. 상기 압입 끼워맞춤 캡슐은 락토즈와 같은 충전제, 전분과 같은 결합제, 탈크 또는 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제, 및 선택적으로 안정제와 혼합하여 활성 성분을 포함할 수 있다. 연질 캡슐에서, 상기 활성 성분들은 지방 오일, 액체 과라핀 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적절한 액체에 용해되거나 현탁될 수 있다. 추가로, 안정제를 첨가할 수 있다. 경구용의 모든 배합물들은 선택된 투여 경로에 적절한 투약량 형태로 존재해야 한다.
- [0219] 부갈 (buccal) 투여의 경우, 조성물은 통상적인 방식으로 배합된 정제 또는 로젠지의 형태를 가질 수 있다.
- [0220] 비강 흡입을 통한 투여를 위해, 본 발명에 따라 사용되는 활성 성분은 적절한 추진제, 예를 들어, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로-테트라플루오로메탄 또는 이산화탄소를 사용하는 압축된 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이 표출 형태로 편리하게 전달될 수 있다. 압축된 에어로졸의 경우, 미터식으로 결정된 양을 전달하는 밸브를 제공함으로써 투여 단위를 결정할 수 있다. 디스펜서에 사용되는 캡슐 및 예를 들어, 젤라틴의 카드리지는 상기 화합물 및 락토즈나 전분과 같은 적절한 분말 기재물의 분말 혼합물을 함유하도록 배합될 수 있다.
- [0221] 본 명세서에 설명된 약학 조성물은 비경구적 투여, 예를 들어, 볼루스 주사 또는 연속 주입에 의한 투여용으로 배합될 수 있다. 주사용 배합물은 단위 투여 형태, 예를 들어, 선택적으로 첨가된 보존제가 첨가된 앰플 또는 다중 투여량 용기로 제공될 수 있다. 상기 조성물은 유성 또는 수성 담체에 포함된 현탁액, 용액 또는 에멀전일 수 있고 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 배합제를 포함할 수 있다.

- [0222] 비경구 투여용 약학 조성물은 수용성 형태로 있는 활성 제조물의 수용액을 포함한다. 추가로, 상기 활성 성분의 현탁액은 적절한 유성 또는 수성 기반 주사 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적절한 친유성 용제 또는 담체는 참기름 또는 에틸 올레이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스테르류를 포함한다. 수성 주사 현탁액은 소듐 카르복시메틸 셀룰로즈, 소르비톨 또는 텍스트란과 같은, 현탁액의 점도를 높이는 물질을 포함할 수 있다. 선택적으로, 상기 현탁액은 또한 활성 성분의 용해도를 높여 고도로 농축된 용액을 제조하게 하는 적절한 안정제 또는 제제를 포함할 수 있다.
- [0223] *선택적으로, 사용전에, 상기 활성 성분은, 적절한 담체, 예를 들어, 멸균된, 발열원 부재 수와 구성되는 분말 형태로 있을 수 있다.
- [0224] 본 발명의 약학 조성물은 또한, 코코아버터 또는 다른 글리세라이드류와 같은 좌약 기제를 사용하여, 좌약 또는 정제 관장물 (retention enemas)과 같은 직장 조성물로 배합될 수 있다.
- [0225] 본 발명의 맥락에 사용되기 적합한 약학 조성물류는 의도된 목적을 성취하기에 효과적인 양으로 활성 성분이 포함되는 조성물을 포함한다. 더 상세하게는, 치료적으로 유효한 양은 질환의 증상 (예를 들어, 골물질의 점진적인 감소)를 예방하고, 완화시키고 또는 개선하는 데 또는 처리되는 피험체의 생존을 연장시키는데 효과적인 활성 성분 (예, 안티센스 올리고 뉴클레오타이드)의 양을 의미한다.
- [0226] 치료적으로 유효한 양은, 특히 본 명세서에서 제공되는 상세한 내용에 비추어, 당해 분야의 숙련자가 결정할 수 있다.
- [0227] 본 발명의 방법에 사용되는 임의의 제조물에 대해서, 치료적으로 유효한 양 또는 투약량은 시험관 내 및 세포 배양 분석에서 처음 결정될 수 있다. 예를 들어, 쥐의 골석화증의 Src 결핍 모델 (Boyce 등 (1992) J. Clin. Invest. 90, 1622-1627; Lowe 등 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 4485-4489; Soriano 등 (1991) Cell 64, 693-702)과 같은 동물 모델에서 안출되어서 소량의 농도나 역가를 얻을 수 있다. 그러한 정보는 인간에서 유용한 투약량을 정확히 결정하는 데 사용될 수 있다.
- [0228] 본 명세서에서 설명된 활성 성분의 독성, 세포독성 및 치료 효능은 시험관 내, 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 약학적 방법으로 결정될 수 있다. 이러한 시험관 내 및 세포 배양 분석법 및 는 동물 연구에서 얻은 데이터는 인간에 사용되는 투약량 범위를 산출하는 데 사용될 수 있다. 투약량은 사용된 투약 형태 및 이용된 투여 경로에 의존하여 변할 수 있다. 정확한 배합, 투여 경로 및 투약량은 환자의 조건을 고려하여 의사들 개별적으로 선택될 수 있다 (참고, Fingl, 등, 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1).
- [0229] 투약 용량 및 간격은 종양 진행을 지연시키기에 충분한 활성 성분의 수준 (최소 유효 농도, MEC)으로 조절될 수 있다. MEC는 제조물에 따라 변할 것이지만, 시험관 내 데이터로부터 추정될 수 있다. MEC를 얻는데 필요한 투약량은 개별적 특성 및 투여 경로에 의존할 것이다. 검출법을 사용하여 혈액 농도를 결정할 수 있다.
- [0230] 치료될 조건의 중증도 및 반응성에 의존하여, 투약은 단일 또는 치료 과정이 수일 내지 수주간 지속되면서 다중 투여일 수 있고, 질병 상태의 감소가 얻어진다.
- [0231] 투여될 조성물의 양은, 물론, 처리될 피험체, 병의 중증도, 투여 방식 및 처방 의사의 판단 등에 의존할 것이다.
- [0232] 본 발명을 실행하면서, 아데노바이러스 담체 내에서 PPE- 1(3X) 프로모터의 전사 조절 하에 있는 Fas-c 키메라의 항-전이성 효과는 투약 및 치료 섭생 조건의 범위를 훨씬 뛰어 넘는다는 것이 관찰되었다. 후술하는 실시예 단락의 실시예 42에서 상세히 설명되는 바와 같이, 한 번 대 두 번 정맥내 주사된 마우스에서 전이성 폐암의 루이스 폐 암 모델에서의 결과를 비교하면, 종양 부피를 줄이는데 단일 주사 (전이성 확산 개시 후 5일)는 두 번 주사한 것만큼 유효하다 (희생 시 폐 중량으로 측정시)는 것을 밝혔다. 다른 실험으로, 일 회 투약 당 더욱이, 10^8 바이러스의 소량을 단일 정맥내 주사하면, 전이성 성장을 감소시키는 데 효과적이며 (희생시 폐 무게로 측정), 10^9 바이러스 및 그 이상의 용량으로 45% 감소된 것 보다 더 크다는 것을 밝혔다.
- [0233] 따라서, 본 발명의 일 구체예에서, 상기 핵산 작제물은 생체 내에서 단일 투약으로 투여된다. 다른 구체예에서, 상기 핵산 작제물은 한 번 이상, 즉 두 번, 세 번 등으로 투여된다. 다른 구체예에서, 상기 핵산 작제물은 투여당 적어도 1×10^8 바이러스의 투약량으로 투여되는 Ad5-PPE-1(3X)과 같은 아데노바이러스 작제물이다.

- [0234] 본 발명의 조성물은, 필요시, 상기 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투약 형태를 포함할 수 있는, FDA 승인 키트와 같은 팩 또는 디스펜서 장치로 주어질 수 있다. 상기 팩은, 예를 들어, 블리스터 팩과 같은 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 상기 팩 또는 디스펜서 장치는 투여 지침서를 포함할 수 있다. 상기 팩 또는 디스펜서는 또한 약학물의 제조, 사용 또는 판매를 규정하는 정부 기관에 의해 명시된 형태로 용기에 넣은 표식이 첨부될 수 있고, 상기 표식은 조성물, 또는 인간이나 수의사 투여의 형태에 대해 기관에 의해 승인된 것을 반영한다. 그러한 표식은 예를 들어, 약물 처방에 관한 미국 식품의약국에 의해 승인받은 표지이거나 승인된 제품 간지(insert) 일 수 있다. 양립 가능한 약학적 담체에 배합된 본 발명의 제조물을 포함하는 조성물은 또한, 상기 상세히 설명된 바와 같이, 제조되어, 적절한 용기에 두고 지정된 조건의 치료에 대한 표지를 붙일 수 있다.
- [0235] 본 발명의 약학 조성물은 세포에 의한 상기 핵산 작제물의 취득, 핵산 작제물에 의해 암호화된 키메라 폴리펩티드 또는 자살 유전자의 세포 발현, 또는 발현된 키메라 폴리펩티드 또는 자살 유전자 생성물의 활성을 향상시킬 수 있는 임의의 추가 성분을 더 포함할 수 있다.
- [0236] 예를 들어, EC 세포로 아데노바이러스 벡터를 취득하는 것은 조작된 항체 또는 작은 펩타이드로 상기 벡터를 처리함으로써 향상될 수 있다. 그러한 "아데노바디(adenobody)" 처리는 세포 상의 EGF 수용체로 아데노바이러스 작제물을 지향되게 하는 데 효과적이라는 것이 나타난다 (Watkins 등 1997, Gene Therapy 4:1004-1012). 추가적으로, 니클린 등은 파지 디스플레이를 통해 분리된 소 펩타이드가 내피세포에서 벡터의 특이성 및 효율을 증가시키고 및 배양 중인 간세포에서 발현을 감소시킨다는 것을 발견하였다 (Nicklin 등 2000, Circulation 102:231-237). 최근의 연구에서, FGF 재목표화된 아데노바이러스 벡터는 마우스에서 tk의 독성을 감소시켰다 (Printz et al 2000, Human Gene Therapy 11:191-204).
- [0237] 저 준위 방사선 조사는 주로 G2/M 상에서 DNA 본체를 끊고, 방관자 효과를 향상시키는 세포막 손상을 야기하는 것으로 나타나며 따라서 조합하여 투여될 때, 다른 세포 독성 및 항-신생물 요법을 강화시킬 수 있다. 혈관 내피세포들은 그러한 조합 또는 보조제 용법에 특히 적합한데, 저준위 방사선 조사는 소혈관 내피세포의 세포사멸성 시스템을 특히 겨냥하는 것으로 나타났기 때문이다 (Kolesnick 등, Oncogene 2003;22:5897-906). 안지오테타틴은 저 용량 방사선의 치료효과를 강화시키는 것으로 나타났다 (Gorski 등 Can Res 1998;58:5686-89). 그러나, 방사선 조사가 친-혈관신생적 "조직 수리 인자"를 증가시키는 것으로 나타났기 때문에 방사선 조사의 효과는 여전히 불투명하다 (Itasaka 등, Am Assoc Cane Res, 2003;abstract 115). 유사하게, 특정 화학요법 제제는 특이적 세포독성 및 세포사멸성 경로를 활성화 시키는 것으로 나타났다 [독소루비신, 시스플라틴 및 마이토마이신 C는 FADD/MORT-1 경계에서 Fas 수용체, FADD, 및 다른 친세포사멸성 신호의 축적을 유도한다 (Micheau 등, BBRC 1999 256:603-07)]. 본 발명의 실행시, 저 준위 방사선 조사 치료는 놀랍게도, PPE-1 (3 x)의 조절 하에 있는 TK를 포함하는 핵산 작제물 및 겐사이클로비르 투여의 항-종양 및 항-전이성 효율에 대하여 명백히 상승 효과를 가지는 것이 밝혀졌다 (실시에 35 및 36, 도 79-86). 그러한 저준위 방사선 조사가 TK 발현 및 치료 효과를 활성화할 수 있고, 독소루비신 화학요법 효과를 특히 강화할 수 있고, 및 FADD/MORT-1 세포사멸적 경로를 활성화시키는 것으로 나타나고 있기 때문에 (Kim 등, JBC 2002;277:38855-62), 본 발명의 맥락에서 특이적 관련성이 있다.
- [0238] 그러한 조합 요법의 효능에 대한 다른 증거는 실시에 37에 설명되어 있는바, 내피세포 (BAEC)에서 독소루비신 및 AdPPE-1 (3x)-Fas-c 키메라 작제물을 조합 투여하는 상승 효과를 나타내고 있다 (도 91). 따라서, 비정상적 혈관신생과 연관된 질병 또는 조건을 치료하는 데, 본 발명의 핵산 작제물 및 이를 함유하는 약학 조성물을 단독으로 또는 이의 질환에 확립된 또는 실험적인 치료법과 조합하여 사용할 수 있다. 본 발명의 핵산 작제물 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 조합하여 사용하는 데 적합한 암 치료의 요법은, 화학요법, 방사선 요법, 광요법 및 광동력 요법, 수술, 영양요법, 절제 요법 (ablative therapy), 방사선 요법과 화학요법의 조합, 근접방사선 요법 (brachiotherapy), 양성자 빔 용법, 면역요법, 세포 요법, 및 양성자 빔 방사수술 요법을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0239] 본 발명의 화합물과 공동 투여될 수 있는 항암 약물은, 아시비신; 아클라루비신; 아코다졸 하이드로클로라이드; 아크로닌; 아드리마이신; 아도젤레신; 알데스루킨; 알트레타민; 암보마이신; 아메탄트론 아세테이트; 아미노글루테티민; 암사크린; 아나스트로졸; 안트라마이신; 아스파라기나제; 아스펠린; 아자시티딘; 아제테파; 아조토마이신; 바티마스타트; 벤조데파; 비칼루타마이드; 비스안트렌 하이드로클로라이드; 비스나파이드 디메실레이트; 비젤레신; 블레오마이신 설페이트; 브레퀴나르 소듐; 브로피리마인; 부셀판; 카르티노마이신; 칼루스테론; 카라세라마이드; 카르베티머; 카르보플라틴; 카르무스타인; 카루비신 하이드로클로라이드; 카르젤레신; 세테펩골; 클로람부실; 시클레마이신; 시스플라틴; 클라드리빈; 크리스나톨 메실레이트; 사이클로포스파마

이드; 사이트라빈; 다카르바진; 닥티노마이신; 다우노루비신 하이드로클로라이드; 데시타빈; 텍소르마플라틴; 데자구아닌; 데자구아닌 메실레이트; 디아지퀴논; 도세탁셀; 독소루비신; 독소루비신 하이드로클로라이드; 드롤록시펜; 드롤록시펜 사이트레이트; 드로모스타놀론 프로피오네이트; 두아조마이신; 에다트렉세이트; 에플로니타인 하이드로클로라이드; 엘사미트루신; 엔로플라틴; 엔프로메이트; 에피프로피딘; 에피루비신 하이드로클로라이드; 에르블로졸; 에소루비신 하이드로클로라이드; 에스트라무스틴; 에스트라무스틴 포스페이트 소듐; 에타니다졸; 에토포사이드; 에토포사이드 포스페이트; 에토프린; 파드로졸 하이드로클로라이드; 파자라빈; 펜레티나이드; 플록스우리딘; 플루다라빈 포스페이트; 플루오로우라실; 플루로시타빈; 포스퀴돈; 포스트리에신 소듐; 켄시타빈; 켄시타빈 하이드로클로라이드; 하이드록시우레아; 이다루비신 하이드로클로라이드; 이포스파마이드; 일모포신; 인터페론 알파-2a; 인터페론 알파-2b; 인터페론 알파-n1; 인터페론 알파-n3; 인터페론 베타-1a; 인터페론 감마-1b; 이프로플라틴; 이리노테칸 하이드로클로라이드; 란레오타이드 아세테이트; 레트로졸; 루프로라이드 아세테이트; 리아로졸 하이드로클로라이드; 로메트렉솔 소듐; 로무스틴; 록속탄트론 하이드로클로라이드; 마소프로콜; 메이탄신; 메크로에타민 하이드로클로라이드; 메제스트롤 아세테이트; 메렌게스트롤 아세테이트; 멜팔란; 메노가릴; 메르캅토프린; 메토티렉세이트; 메토티렉세이트 소듐; 메토프린; 메투레데파; 미틴도마이드; 미토카르신; 미토크로민; 미토길린; 미토말신; 미토마이신; 미토스파; 미토타인; 미토산톤 하이드로클로라이드; 미코페놀 산; 노코다졸; 노갈라마이신; 오르마플라틴; 옥시수란; 팔클리탁셀; 페가스파르가제; 펠리오마이신; 펜타무스틴; 페프로마이신 설페이트; 페르포스파마이드; 피포브로만; 피포셀판; 피록산트론 하이드로클로라이드; 플리카마이신; 플로메스탄; 포르피머 소듐; 포르피로마이신; 프레드니무스틴; 프로카르바진 하이드로클로라이드; 퓨로마이신; 퓨로마이신 하이드로클로라이드; 피라조푸린; 리보프린; 로글레테티마이드; 사핑골; 사핑골 하이드로클로라이드; 세무스틴; 심트라젠; 스파르포세이트 소듐; 스파르소마이신; 스피로게르마늄 하이드로클로라이드; 스피로무스틴; 스피로플라틴; 스트렙토니그린; 스트렙토조신; 솔로페누르; 탈리소마이신; 탁솔; 테코갈란 소듐; 테가푸르; 텔록산트론 하이드로클로라이드; 테모포핀; 테니포사이드; 테록시론; 테스토라톤; 티아미프린; 티토구아닌; 티오테파; 티아조푸이린; 티라파자민; 토포테칸 하이드로클로라이드; 토레미펜 사이트레이트; 트레스톨론 아세테이트; 트리시리빈 포스페이트; 트리메트렉세이트; 트리메트렉세이트 글루루코네이트; 트립토텔린; 튜블로졸 하이드로클로라이드; 우라실 머스타드; 우레데파; 바프레오타이드; 베르테포핀; 빈블라스틴 설페이트; 빈크리스틴 설페이트; 빈데신; 빈데신 설페이트; 비네피딘 설페이트; 빈글리시네이트 설페이트; 빈로이로신 설페이트; 비노렐빈 타르트레이트; 빈로시딘 설페이트; 빈줄리딘 설페이트; 보로졸; 제니플라틴; 지노스타틴; 조루비신 하이드로클로라이드을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 추가의 항신생물 제제는 Goodman 및 Gilman의 "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Eighth Edition, 1990, McGraw-Hill, Inc. (Health Professions Division)의 Chapter 52, Antineoplastic Agents (Paul Calabresi 및 Bruce A. Chabner), 및 이의 개론, 1202- 1263에 설명된 것을 포함한다.

[0240] 상기 리간드 또는 상기 세포독성 전구 약물에 노출된 세포로 목표화하는 것이 바람직할 찌라도, 본 발명은 또한 상기 리간드 또는 세포독성 전구약물에 노출되지 않거나 자연적으로 영향을 받지 않는 세포에서 본 발명의 핵산 작제물을 발현시키는 것에 관한 것이라는 것이 이해될 것이다. 그러한 경우, 본 발명의 방법은 그러한 리간드, 또는 전구약물을 형질전환된 세포에 투여하는 단계를 포함한다. 그러한 투여는 전술한 투여 방법 중 임의의 것을 사용하여 실행될 수 있다. 바람직하게는, 세포독성의 활성은 매우 특이적이 되게, 예를 들어, 항체 연합 타겟팅을 사용하는 세포 목표화 방식으로 상기 리간드 또는 전구약물을 투여한다. 세포독성 또는 세포사멸성 활성화의 이러한 방식은 후술하는 실시예 단락에서 더 상세히 설명되어 있다. 따라서, 본 발명은 핵산 작제물, 그러한 작제물을 포함하는 약학 조성물 및 과도한 또는 비정상적 혈관신생으로 특징 지워지는 조직 부위에서 혈관신생을 하방 조절하도록 그러한 작제물을 이용하는 방법을 제공한다.

[0241] 본 발명은 특이성 세포 집단에서 목표화된 발현을 가능케 하기 때문에, 다양한 종양을 처리하는데 개질되고 사용될 수 있다.

[0242] 따라서, 본 발명의 다른 관점에 따라서, 종양을 치료하는 방법을 제공한다.

[0243] 본 발명의 이러한 관점에 따른 방법은 종양 세포에 전술한 키메라 폴리펩티드 또는 자살 유전자를 발현시킴으로써 실행된다. 따라서, 본 발명의 이러한 관점에 따라서, 상기 폴리펩티드 키메라 또는 자살 유전자의 발현은 가스스트린-방출 펩타이드 (GRP) 프로모터 [AF293321S3; Morimoto E Anticancer Res 2001 Jan-Feb;21(1A):329-31], hTERT 프로모터 [AH007699; Gu J , Gene Ther 2002 Jan;9(1):30-7], 핵소키나제 타입 II 프로모터 [AF148512; Katabi MM, Hum Gene Ther. 1999 Jan 20;10(2):155-64.], 또는 L-플라스틴 프로모터 [L05490, AH002870, MMU82611 ; Peng XY, Cancer Res. 2001 Jun 1;61(11):4405-13]와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 종양 특이성 요소에 의해 지시된다.

- [0244] 종양 세포에서 폴리펩티드 키메라 (예, Fas-c) 또는 자살 유전자의 발현으로, 이러한 세포에서 세포독성 및/또는 세포사멸을 활성화하고, 따라서 세포사에 이르게 하며, 후속적으로 종양 성장을 늦추거나 휴지시키고, 가능하게는 종양 수축을 야기한다.
- [0245] 본 발명의 추가의 목적, 장점, 및 신규 특징은 제한적으로 의도되지 않은 하기 실시예의 설명에서 당해 분야의 통상적 숙련자에게 명백해질 것이다. 추가로, 본 발명의 다양한 구체 양태 및 관점들 각각은 전술한바 및 후술되는 청구범위에서 청구되는 바와 같이 하기 실시예에서 실험적으로 지지된다.
- [0246] 실시예
- [0247] 전술한 설명과 함께 본 발명을 비-제한적 방식으로 설명하는 하기 실시예를 참조하고자 한다.
- [0248] 일반적으로 여기서 사용된 용어 및 본 발명에서 이용되는 실험 과정은 분자, 생화학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술을 포함한다. 그러한 기술들은 문헌에 온전히 설명되어 있다. 예를 들어, 참조, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook 등, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel 등, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley 및 Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson 등, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren 등 (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 미국 특허 번호 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 및 5,272,057에 설정된 방법론; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes MII Celis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites 등 (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell 및 Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman 및 Co., New York (1980); 이용가능한 번역분석법은 특허 및 과학 저서에 광대하게 설명되어 있다, 참조, 예를 들어, 미국 특허 번호 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 및 5,281,521 ; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., 및 Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription 및 Translation" Hames, B. D., 및 Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. L, ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) 및 "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak 등, "Strategies for Protein Purification 및 Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); 이 모두는 온전히 설정된 대로, 참조 문헌에 기재된다. 다른 일반적인 참조문헌들은 이러한 문서를 통틀어 제공된다. 여기서의 과정들은 당해 분야에 공지된 것으로 사료되고 독자의 편의를 위해 제공된다. 여기에 포함된 모든 정보는 본 명세서에서 참조된다..
- [0249] 특허, 하기 언급된 실시예와 연계한 실험은 하기 방법 및 재료를 사용하였다:
- [0250] 재료 및 방법
- [0251] 세포 배양
- [0252] 루이스 폐암 - (D 122-96), 인간 배아 신장 (293) 및 HeLa 세포를 10% 태아 소 혈청 (FCS), 50 U/ml 페니실린, 50 µg/ml 스트렙토마이신 및 2 mM 글루타민 (Biological industries, Beit-Haemek, Israel)이 보충된 4.5 gr/1 DMEM에서 배양하였다. 소 동맥 내피세포 - BAEC, 정상 피부 섬유아세포 - NSF, HepG2 및 인간 제대 정맥 내피세포 - HUVEC-304 (ATCC, USA)을 5% FCS, 50 U/ml 페니실린, 50 µg/ml 스트렙토마이신 및 2 mM 글루타민 이 보충된 1.0 gr/1 DMEM (Biological industries, Beit- Haemek, Israel)에서 배양하였다. BAEC 세포는 완전 섬유아세포 성장 인자 (Sigma, St. Louis. MO.)로 보충되었다. RINr1046-38 (RIN-38)을 5% FCS (Biological Industries, Beit-Haemek, Israel), 50U 페니실린/ml, 50 µg 스트렙토마이신/ml 및 2 mM 글루타민으로 보충된 199 이얼레스 (Earle's) 염 (5.5 mM glucose) 배지에서 배양하였다.
- [0253] 본 명세서에서 사용되는바, "HepG2"는 ATCC-HB-8065를 지칭한다.
- [0254] 본 명세서에서 사용되는바, "HeLa"는 ATCC-CCL-2를 지칭한다.
- [0255] 본 명세서에서 사용되는바, "인간 기관지 내피세포" 및 "B2B"는 ATCC- CRL-9609을 지칭한다.

- [0256] 본 명세서에서 사용되는바, "HUVEC" 및 "인간 제대 정맥 내피세포"는 ATCC-CRL-1730를 지칭한다.
- [0257] 본 명세서에서 사용되는바, "CHO" 및 "중국 햄스터 난소"는 ATCC-61를 지칭한다.
- [0258] 저산소증 유도
- [0259] 형질 감염 또는 형질 유도 26 시간 후, 세포를, 0.5% O₂, 5% CO₂, 잔여량 N₂를 함유하는 가스로 30분간 세정한 단독 챔버에서 배양하였다. 상기 단독 챔버는 습기찬 5% CO₂, 37℃ 인큐베이터에 두었다.
- [0260] 세포 및 조직에서의 루시페라제 활성
- [0261] 프로모터 활성을 시험관 내 및 생체 내에서 정량 분석하기 위해, 루시페라제 유전자 발현 시스템 키트를 사용하였다 (Promega Corp., Madison, WI). 형질감염 또는 형질유도 48시간 후, 상기 세포를 세척하고 200 μl 용해 버퍼 (lysis buffer)에 15분간 처리하였다. 세포 용해물을 수집하고 15 분간 (14,000 rpm) 4℃에서 원심분리하였다. 후속적으로, 상청액 10 μl를 50 μl 루시페라제 분석 버퍼에 첨가하였다. 활성은 20 초간에 걸쳐 루미노 미터 (Luminometer)로 측정하였다.
- [0262] 고형 조직에서 루시페라제 활성을 분석하기 위해, 20 mg 샘플을 적출하고 균질화 용액 1 ml에서 균질화시키고 15 분간 (14,000 rpm) 4℃에서 원심분리하고, 상청액 10 ml를 전술한 바와 같이 루시페라제 활성에 대하여 분석 하였다. 결과는 1 mg 단백질 당 루시페라제 광 유닛으로 표시하였다. 표준물질로서 우혈청 알부민 (BSA)를 사용하는 브래드포드 분석법으로 단백질을 측정하였다.
- [0263] 시험관 및 생체 내 GFP 활성
- [0264] 시험관 내 GFP 발현을 시험하기 위해, 세포를 PBS로 두 번 세척하고 및 새로이 만든, 4% 파라포름알데히드를 함유하는 PBS로 30 분간 고정하였다. 고정 후, 형광 현미경 조사를 실시하였다.
- [0265] *생체 내에서 전달된 유전자의 세포 분포를 시험하기 위해, 조직을 새로이 만든, 4% 파라포름알데히드를 함유하는 0.1 M 포스테이트 버퍼에서 6 시간 동안 4℃에서 고정하고, 밤새 4℃에서 30% 수크로스로 젖어들게 하고, OCT 화합물 (Sakura, USA)에서 동결하였다. 저온유지장치 (cryostat)를 사용하여 조직 덩어리를 10 μm 두께로 절단하고 형광 현미경하에서 직접 관찰하였다 (FITC 필터).
- [0266] 증식하는 및 휴지 상태 세포
- [0267] 증식중인 및 휴지 상태 BAEC에서 PPE-1 프로모터 활성을 비교하기 위해, 세포를 두 그룹으로 나눴다: 1. 증식 세포 - 10% FCS 배지에서 성장 및 감염. 2. 휴지 상태 세포 - 형질 유도 후 72 시간 내에 무혈청 배지에서 성장 및 감염.
- [0268] 모든 세포를 습윤 항온처리 장치, 5% CO₂, 37℃에서 성장시켰다.
- [0269] 부착성 PER. C6® 세포
- [0270] PER.C6® (Crucell, Leiden, Netherlands) 인간 배양 세포에서 대량 배양으로 아데노바이러스 입자를 제조하였다. PER.C6® (Crucell, Leiden, Netherlands) 세포를 DMEM+10%FBS+10mMgCl₂에서 배양하였다. 이중 유전자를 아데노바이러스 혈청형-5 백본에 쉽게 삽입시키게 하는 플라스미드 시스템과 같이 PER.C6®을 사용할 수 있다. 치료 유전자 삽입 및 PER.C6®와 연계하여 사용되는 서플 벡터 pAdAptTM (Crucell, Leiden, Netherlands)는 동 종 재조합으로 인해 RCA가 없는 재조합 아데노바이러스 벡터를 생성하게 한다.
- [0271] 재조합 복제 결핍 아데노바이러스의 제조
- [0272] 몇 가지 재조합 복제 결핍 아데노바이러스 (타입 5)를 제작하였다. 루시페라제 유전자 (pGL2-basic GenBank 기탁번호 X65323에서 유래된) 및 SV40 polyA 부위 (pGL2-basic GenBank 기탁번호 X65323에서 유래된)의 상류에 위치한 쥐의 프레프로엔도텔린-1 (PPE-1) 프로모터 (서열번호 1)를 포함하는 발현 카세트를 pPAC.pIpA (프로모터-부재 작제물)의 BamHI 제한효소 위치에 결찰하였다. 상기 GFP 유전자 (pEGFP, GenBank 기탁 번호 AAB02572로부터 유래)를 PPE-1 프로모터로 NotI 제한효소 위치에 결찰하였다. Ad5PPE-1Luc 또는 Ad5PPE-1GFP로 명칭되는 복제 결핍 재조합 아데노바이러스들을 Becker, T.C. 등 (Methods Cell biol. 43, Roth M. (ed). New York. Academic Press, 1994, pp. 161-189)에 기술된 바와 같이 아데노바이러스 플라스미드 pJM17와 pPACPPE-1Luc 또

는 Ad5PPE-1GFP로 공동 형질감염하여 제조하였고, 제조합 비리온을 수확하였다. 바이러스를 대규모 생산용으로 제조하였다. 이러한 바이러스 스탁을 10^9 - 10^{12} 플라크-형성 유닛/ml (pfu/ml)의 농도로 4℃에서 보관하였다. 사이토메갈로바이러스 (CMV) 조기 (immediate early) 프로모터 (GenBank 기탁번호 U47119)를 포함하는 바이러스들 Ad5CMV-Luc 및 Ad5CMV-GFP (Quantum biotechnologies, Carlsbad, Canada) PPE-1 바이러스 벡터에 대하여 설명한 바와 같이 대규모 제조용으로 제조하였고 비-세포 특이성 대조군으로 사용하였다.

[0273] PPE 프로모터의 개질

[0274] Bu 등 (J. Biol Chem. (1997) 272(19): 32613-32622)에 의해 발견된 양성 전사 요소의 세 개 복사본을 43 염기쌍 내인성 양성 요소 (-364 내지 -320 bp)의 하류(-286bp)에 위치한 NheI 제한효소 위치로 삽입함으로써 개발된 쥐의 PPE-1 프로모터를 개발하였다.

[0275] 여기서 "3X"로 명명되는 인헨서 단편물은 쥐의 PPE-1 프로모터 내에 존재하는 내생 서열 요소 (서열번호 1의 뉴클레오타이드 좌표 407-452)의 3중 복사체이다. 혈관 내피세포들에서 PPE-1 프로모터 활성을 유도하는 것은 이러한 요소의 존재 여부에 달려있다는 것이 이전에 밝혀졌다 Bu 등 (J. Biol Chem. (1997) 272(19): 32613-32622). 상기 3X 단편물은 96 염기쌍 길이인 두 개의 상보적인 DNA 단일본체를 사용함으로써 합성될 수 있다 (BioTechnology industries; Nes Tziona, Israel), (서열번호 2 및 3). 상기 두 개의 단일 본체 DNA 단편물을 어닐하고 클레나우 단편물 (NEB)을 사용하여 메운다; 결과된 이중 본체 DNA는 145 염기쌍 길이이고 Nhe-1 제한효소 위치를 포함한다 (서열번호 4).

[0276] T4 라이게아제를 사용하여 내인성 Nhe-1 위치 하류에 있는 쥐의 PPE-1 프로모터에 이러한 3X 단편물을 결합하였다. 결과된 작제물을 DH5 α 콤피텐트 세포에서 증식하였고 maxi-prep Qiagen 키트를 사용하여 대규모 플라스미드를 만들었다.

[0277] 추가 플라스미드들

[0278] *야생형 PPE-1 프로모터

[0279] 쥐의 프레프로엔도텔린-1 (PPE-1) 프로모터의 1.4 kb, SV40 polyA 시그널 위치를 가진 루시페라제 유전자 (GenBank 기탁번호 X65323) 및 쥐의 ET-1 유전자의 첫 번 인트론을 포함하는 PPE-1-루시페라제 카세트 유전자 (5249bp)를 Harats 등에 의해 사용된 pEL8 플라스미드 (8848bp) (J. Clin. Inv. (1995) 95: 1335-1344)로부터 얻었다. BamHI 제한 효소를 사용하여 PPE-1 -루시페라제 카세트를 pEL8 플라스미드로부터 추출한 후, 추출 키트 (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 1% 아가로즈 겔로부터 DNA 단편물을 추출하였다.

[0280] 프로모터-부재 pPAC.pIpA 플라스미드

[0281] 아데노바이러스 타입 5의 서열을 포함하는 상기 프로모터-부재pPAC.pIpA 플라스미드 (7594bp)는 pPACCMV.pIpA (8800bp)으로부터 얻었다. CMV 프로모터, 다중 클로닝 부위 및 SV40 폴리아데닐화 부위 (1206 bp)를 NotI 제한 효소로 제거하였다. 단편화된 DNA를 1% 아가로즈 겔로부터 추출하였다. 선형 플라스미드 (7594 bp)를 클레나우 단편물로 메꾸고 및 BamHI 링커를 신속 DNA 라이게이션 키트를 사용하여 양쪽 결합성 (cohesive) 말단에 결합하였다. 상기 선형 플라스미드를 T4 DNA 리가제로 재결합하고 DH5 α 콤피텐트 세포로 형질전환 시켜 BamHI 제한효소 위치를 가진 pPAC.pIpA를 증폭하였다. 상기 플라스미드 대규모 생성하였고 maxi prep DNA 정제 키트로 정제하였다.

[0282] pPACPPE-1루시페라제 플라스미드

[0283] 상기 PPE-1-루시페라제 카세트를 상기 pPAC.pIpA 플라스미드의 BamHI 제한효소 위치로 T4 DNA 라이게아제를 사용하여 삽입함으로써 pPACPPE-1루시페라제 플라스미드를 제작하였다. 후속적으로 이 플라스미드를 사용하여 DH5 α 콤피텐트 세포를 형질전환시켰다. 상기 플라스미드 (12843bp)를 대량 생산하였고 maxi prep DNA 정제 키트를 사용하여 정제하였다.

[0284] pPACPPE-1 GFP 플라스미드

[0285] PPE-1 프로모터 하류에 있는 GFP 유전자 (pEGFP, GenBank 기탁번호 AAB02572에서 유래)를 NotI 제한효소 위치에 T4 DNA 라이게아제에 의해 부차-클로닝함으로써 pPACPPE-1GFP 플라스미드를 제작하였다.

[0286] 다음, 상기 플라스미드를 사용하여 DH5 α 콤피텐트 세포들을 형질전환시켰다. 상기 플라스미드 (11,801 bp)를

대량 생산하였고 maxi prep DNA 정제 키트로 정제하였다.

- [0287] pACPPE-nX 루시페라제 및 pACPPE-UX GFP플라즈미드
- [0288] Luc 또는 GFP를 포함하는 pEL8-3X (도 26B)로부터 BamHI 제한 효소에 의해 절단된 PPE-1-3XLuc 또는 PPE-1-3XGFP 카세트를 상기 pPAC.p1pA 플라즈미드의 BamHI 제한효소 위치에 삽입함으로써 상기 pPACPPE-1-3X 루시페라제 및 pPACPPE-1-3 XGFP를 제작하였다. pEL8-3X는, 두 개의 NheI 장소 사이에 위치한 상기 삼중 내피세포 특이성 인헨서 3X (서열번호 7에 설정된 바와 같은)을 포함하는 BamHI 및 NotI사이에 위치한 상기 개질된 쥐의 PPE-1 프로모터 (1.55 kb) (붉은색)를 포함한다. 상기 프로모터, 루시페라제 또는 GFP 유전자, SV40 poly A 장소 및 상기 엔도텔린-1 유전자의 첫 번째 인트론, 모두 상기 PPE-1 개질 프로모터 카세트로 지칭되는바, 재료 및 방법에서 설명된 바와 같이, BamHI 제한 효소로 절단하고 추출하였다. 상기 플라즈미드 (12843bp)를 대량으로 생산하고 maxi prep DNA 정제키트로 정제하였다.
- [0289] 시험관 내 실험, DNA 형질유도 - 형질유도 24 시간 전에, 세포를 24 또는 96 웰 플레이트에 분주하였다. 부차 융착된 세포를 샘플 웰에서 계수하였다. 그 후, 성장 배지를 각 웰로부터 흡입하고 지시된 바이러스성 벡터를, 지시된 M.O.I.에서 감염배지 (DMEM 또는 RPMI 1640, 2% FBS)에서 희석하였고 단일층에 첨가하였다. 세포를 실온에서 4 시간 배양하였다. 후속적으로, 완전 배지를 첨가하고 세포를 37℃, 5% CO₂에서 72 시간 동안 배양하였다.
- [0290] 동물
- [0291] 모든 동물 절차는 텔-하쇼머 (Tel-Hashomer)에 있는 셰바 메디컬 센터 (Sheba Medical Center)의 "Animal Care and Use Committee"에 의해 승인 받았다.
- [0292] 상이한 마우스 종을 사용하였다:
- [0293] (i) 수컷, 생후 3개월, 야생형 C57BL/6 마우스 (하란 팜 (Harlan farm), 예루살렘, 이스라엘).
- [0294] (ii) 수컷, 생후 3 개월 BALB/C 마우스 (하란 팜, 예루살렘, 이스라엘),
- [0295] (iii) 수컷 및 암컷, 생후 6 개월, C57BL/6xSJ129 마우스의 ApoE 유전자 결핍 마우스 하이브리드 (Plump AS, 등 Cell (1991) 71 :343-353).
- [0296] (iv) 수컷 및 암컷, 생후 3 개월, 쥐의 PPE-1 프로모터 (5.9Kb)의 조절 하에서 루시페라제 유전자를 과발현, Harats 등 (J. Clin. Inv. (1995) 95: 1335-1344)에 의해 발생.
- [0297] 모든 마우스는 Lipids and Atherosclerosis Research Institute에서 배양된 것이다.
- [0298] 정상 마우스에서의 조직 유전자 발현
- [0299] 효율 및 조직 특이성을 분석하기 위해, 전술한 바와 같이, Ad5PPE1Luc 또는 Ad5CMVLuc (비-조직-특이성 대조군으로서)의 10¹⁰ pfu/ml을 생리 식염수 100 μ l에 현탁하고 및 마우스의 꼬리 정맥에 주사하였다. 루시페라제 활성을 주사 1, 5, 14, 30 및 90일 후에 분석하였다. 발현된 리포터 유전자의 세포 분포를 국소화시키기 위해, Ad5PPE-1GFP 또는 Ad5CMVGFP (100 μ l 생리 식염수에 10¹⁰ pfu/ml)을 정상적인 생후 3개월의 수컷 C57BL/6 마우스의 꼬리 정맥에 주사하였다. GFP 발현은 주사 5일 후에 검출되었다. 모든 마우스는 건강하게 보였고 아무런 독이나 염증이 간이나 다른 조직에서 나타나지 않았다.
- [0300] 조직에서의 GFP 활성
- [0301] 생체 내 전달된 유전자의 세포 분포를 시험하기 위해, 주사된 마우스로부터 얻은 조직 샘플을 새로이 만든, 4% 파라포름알데히드를 함유한 0.1 M 포스페이트 버퍼에서 6 시간 동안 4℃에서 고정시키고, 4℃에서 30% 수크로스에 밤새 적시고 OCT 화합물 (Sakura, California, USA)에 동결하였다. 조직 덩어리를 10 μ m 두께로 저미고, 형광 현미경하에서 직접 관측하였다 (FITC filter).
- [0302] 종양 이식:
- [0303] 루이스 폐 암종 세포 (LLC)를 트립신/EDTA로 수거하고, PBS로 세 번 세척하고 및 0.1% 트립판 블루 (Biological industries, Beit-Haemek, Israel)로 계수하여 활성을 산정하였다. 마우스에서 종양 혈관신생에서 PPE-1 프로모터 활성의 활성 정도를 시험하기 위해, 두 개의 상이한 종양 모델을 사용하였다.

- [0304] 일차 종양 모델에서, 상기 세포 (1 ml 생리 식염수내의 1×10^6 세포/ml)를 마우스 등에 피하 내 주사하였다 (n=17). 주사 21일 후, Ad5PPE-1, Ad5PPE-1GFP, Ad5CMV, 또는 Ad5CMVGFP (10^{10} pfu/ml)를 종양 조직 (IT) 내로 또는 정맥내로 주사하고 전술한 바와 같이 그 활성을 검출하였다.
- [0305] 전이 종양 모델에서, 상기 세포 (5×10^5 세포/ml, 0.5 ml 생리 식염수에 포함)를 마우스 발바닥에 주사하였다 (n=12). 종양 조직이 직경 0.7 mm 크기에 달했을 때, 발바닥 (일차 종양을 가진)을 마취 및 멸균 조건 하에서 절제하였다. 수술 14일 후, 바이러스 (Ad5PPE-1, Ad5PPE-1GFP, Ad5CMVLuc 또는 Ad5CMVGFP)를 마우스 정맥으로 주사하였다.
- [0306] 양쪽 종양 실험 모델에서, 마우스를 바이러스 주사 5일 후에 처형하였고, 조직을 적출하고 루시페라제 또는 GFP 활성에 대하여 분석하였다.
- [0307] 상처 치유 모델
- [0308] 수컷의 생후 3 개월 C57BL/6 마우스에 소듐 펜토바비탈 (6 mg/kg)을 피하내 주사하여 마취시켰다. 이들 등을 면도하고 5 cm로 직선 절개하였다. 절개된 것을 4/0 멸균 실크 실로 즉시 봉합하였다. 치유되는 상체에서 혈관신생 과정을 H&E 및 항 폰-빌레브란트 항체 면역조직화학 염색으로 2일 마다 조사하였다.
- [0309] 절개 10일 후, 10^{10} pfu/ml의 Ad5PPE-1Luc 또는 Ad5CMVLuc를 꼬리 정맥내로 전신적으로 주사하였다. 주사 5일 후, 마우스를 처형하고 루시페라제 활성을 절개 장소의 피부에서 및 대조군으로서 정상 대측 장소에서 전술한 바와 같이 분석하였다.
- [0310] 조직학적 검사 - 종양 및 전이된 조직에서 혈관신생의 정도를 평가하기 위해, 조직을 5 μ m 절편으로 자르고 헤마톡실린 및 에오신 (H&E)으로 염색하였다. 항 CD31 (래트 항 마우스 CD31 모노클론성 Ab. Pharminogen, NJ, USA) 항체를 종양 모델에서 신-맥관화의 분석에 사용하였다.
- [0311] VEGF 및 PDGF-B 형질전환 발현용 플라스미드 및 아데노바이러스 벡터 - 재조합 복제 결핍- 아데노바이러스 혈액형 5를 Varda-Bloom, N. 등 [Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. (2001) Gene Ther 8, 819-27]에서 설명된 바와 같이 제조하였다. 간단하게는, 쥐의 VEGF₁₆₅ (GenBank 기탁번호 M95200) 또는 래트 PDGF-B (GenBank 기탁 번호 AF 162784)에 대한 cDNA를 사이토메갈로바이러스 (CMV) 조기 프로모터의 조절 하에서 포함하도록 pACCMV.pLpA 플라스미드를 개질하였다. CMV 프로모터가 상기 개질된 쥐의 프레프로엔도텔린-1 (PPE-1-3X) 프로모터에 의해 대체된 pACPPE-1-3X 플라스미드를 동일한 cDNA 서열로 제작하였다. 각 플라스미드를 pJM17 플라스미드와 같이 HEK293 세포로 공동 형질감염시켜서 다양한 재조합 아데노바이러스들을 생성하였다. 바이러스를 HEK293 세포에서 증식하였고 10^{10} PFU/ml 농도로 감축하였다. 대조군 벡터를 유사하게 생성하였다.
- [0312] 뒷다리 허혈증 및 유전자 요법의 마우스 모델 - 적어도 12 주령의 수컷 및 암컷 C57B16 마우스 (Harlan Laboratories Ltd., Israel)를 웨바 메티컬 센터의 Animal Care and Use Committee의 가이드라인에 따라 유지하였다. 상기 설명된 절차에 근거하여 뒷다리 허혈증을 유도하였다 [Couffinhal, T. 등 Mouse model of Angiogenesis. Am J Pathol 152, 1667-79. (1998)]. 간단히, 동물을 펜토바비탈 소듐 (40 mg/kg, IP)으로 마취시켰다. 다리 털을 면도한 후, 우측 대퇴 동맥을 복제 및 슬와 동맥의 분기 근처에서 절찰하였다. 절찰 5일 후, 10^9 PFU의 다양한 아데노바이러스 벡터를 LV 투여하였다.
- [0313] 초음파 영상 - 절찰 후 7일 간격으로, 시너지 초음파 시스템 (General Electric, USA)을 7.5 MHz에서 혈관조영 모드에서 사용하여 초음파 영상을 실시하였다. 조영중에 동물을 깨우고 가웠다. 동물을 90일 동안까지 통상적인 조건하에서 순응시켰다.
- [0314] 면역조직화학 - 처형된 허혈성 마우스의 뒷다리 및 간 조직으로부터 골격근을 OCT 화합물에서 동결하였고 동결 절단하였다. 래트 단일클론성 항- CD31 항원 (PharMingen, San Diego, CA)을 사용하여 내피세포를 면역염색하였다. 마우스 다중클론성 항- α SM액틴 항체 (SIGMA, St. Louis, MO)를 사용하여, 평활근 세포를 면역 염색하였다. 배경은 헤마톡실린으로 염색하였다.
- [0315] 인-시츄 하이브리드화 - 허혈성 동물의 양 뒷다리로부터 5 μ m 골격근 절편물을 만들었다. VEGFi₆₅ 또는 PDGF-B에 대하여 센스 또는 안티센스 DIG-표지 탐침자로 인-시츄 하이브리드화를 실시하였고, 디콕지제닌

(digoxigenin) (DIG)을 항-DIG-AP 접합체 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)로 검출하였다. 배경은 메틸 그린으로 염색하였다.

- [0316] 영상 처리 - 이미지-프로 플러스 소프트웨어 도구 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD)를 사용하여 초음파 영상을 처리하였다. 가장 강력한 관류를 나타내는 컬러 픽셀의 수를 각 영상에서 계산하였다.
- [0317] 통계 분석
- [0318] 통계적으로 유의한 차이에 대하여 그룹 간 분석을 t-테스트 ANOVA, 또는 Mann-Whitney 랭크 테스트를 사용하여 실시하였다. 데이터는 평균±표준오차로서 나타나 있다.
- [0319] 실험 결과
- [0320] 실시예 1
- [0321] 내피세포 (BAEC) 및 293 세포에서 친-세포사멸성 유전자 활성화에 대한 시험관 내 분석
- [0322] 암 치료에서, 항-혈관신생적 요법은 성장하는 종양을 옥성하는 전개되고 있는 맥관 구조를 겨냥하고 있다 [Folkman J. N Engl J Med (1995) 333(26): 1757-63]. 세포사멸 또는 프로그램된 세포사의 연구가 진행됨에 따라, 선택적 및 효과적인 세포사 조절자를 암호화하는 많은 유전자들이 확인되었다 [Strasser 등 Annu Rev Biochem (2000) 69:217-45.].
- [0323] 항-혈관신생적 요법에 대한 가장 적합한 제제를 확인하기 위해 본 연구는 몇 가지 친-세포사멸성 유전자를 검색하는 것이다. MORT1 (FADD - Fas associated death domain protein, GenBank 기탁번호 NM 003824), RIP (Receptor-interacting-protein, GenBank 기탁번호 U25995), CASH (c-FLIP, GenBank 기탁번호 AF0 10127), MACH (caspase 8 GenBank 기탁번호 X98172), CPP32 (카스파제 3, GenBank 기탁번호 U13737), 카스파제 9 (U60521), 및 TNFR1의 세포 외 부위와 Fas의 경막 및 세포 내 부위로부터 제작된, 두 개의 "데스 (death) 수용체"의 이전에 설명된 융합체인 Fas-키메라 (Fas-c) [Boldin MP 등 J Biol Chem (1995) 270(14):7795-8, 참조도 1a)을 포함하는 몇 가지 친-세포사멸성 유전자를 PCR 증폭시켰고 및 공지된 클로닝 기술을 사용하여 pcDNA3 (Invitrogen, Inc.) 포유동물 발현 벡터로 클론하였다.
- [0324] 이러한 친-세포사멸 유전자 작제물을 BAEC (소 동맥 내피세포) 및 비-내피세포 대조군 세포로서 사용되는 293 세포에서, pGFP와 함께 공동 발현시켰다. 형질감염 24 시간 후, 세포를 형광 현미경을 사용하여 분석하였다. 형광 현미경을 사용하여 세포사멸성 세포를 전형적인 형태 (예, 작은 및 둥근 형태)에 근거하여 확인하였다 (도 2a-b). 전자 현미경을 사용하여, 세포사멸성 표현형을 분석하였다 (도 3a-f). 세포 사멸 효과를 정량화한 결과, MORT1, TNFR1 및 Fas-키메라가 BAEC 및 293 세포 에서 가장 높은 세포 사멸 활성을 유도하였다는 것을 나타냈다 (도 4a-b). 카스파제 3 및 9는 이러한 관점에서 덜 강력했는데 아마도 그것들은 비활성 지모겐 형태로 있기 때문이다. 이러한 결과에 근거하여, Fas-키메라 (Fas-c) 유전자를 항-혈관신생적 요법에서 사용될 아데노바이러스-벡터를 생성하는 데 선택하였다.
- [0325] 실시예 2
- [0326] 개질된 PPE-1 프로모터 (PPE-1 (3x)의 조절 하에서 Fas-키메라를 암호화하는 재조합 아데노바이러스의 생성
- [0327] 전장 길이 Fas-키메라를 암호화하는 cDNA를 프레-엔도텔린1 프로모터를 함유하는 플라스미드 pPACPE1-3x로 서브클로닝 시켰다 (참조도 1b). 재조합 아데노바이러스 이러한 플라스미드와 pJM17 플라스미드를 인간 배아 신장 293 세포로 공동 감염시킴으로써 재조합 아데노바이러스를 생성하였다. 바이러스 클로닝의 성공여부는 PCR 증폭으로 확인하였다 (도 5a).
- [0328] 목표 세포에서 Fas-c의 발현을 결정하기 위해, 내피 BAEC 세포를 지정된 역가의 Ad-PPE-1(3x)-Fas-c로 형질 유도하였다. 형질 유도 72 시간 후, 세포를 용해하고 세포 단백질을 비환원성 SDS-PAGE 젤을 사용하여 분해하였다. 항-TNFR1 항원(Sc-7895, Santa-Cruz Biotech)을 사용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 도 5b에서 나타난 바와 같이, 45kD에서 이동하는 밴드가 뚜렷이 나타나 있고 이것의 발현은 용량-의존성이어서, 키메라 단백질의 정확한 폴딩 및 발현을 제시하고 있다. 대조적으로, 비-형질전환 내피세포 또는 대조군 빈(empty) 바이러스 벡터로 형질유도된 세포에서는 상응하는 밴드가 없다. 따라서, 이러한 결과는 Fas-c의 아데노바이러스-매개 유전자 전달이 목표 세포에서 형질전환유전자 발현을 결과한다는 것을 확인시켰다.
- [0329] 실시예 3

- [0330] Ad-PPE-1 (3x)-Fas-c 발현은 내피세포에서 세포 사멸을 유도한다
- [0331] 내피세포의 세포사멸을 유도하는 Ad-PPE-1(3x)-Fas 키메라의 능력을 결정하였다. 도 6a-b에서 나타난 바와 같이, 내피세포의 프레-프로엔도텔린 지향된, 아데노바이러스-매개 형질유도는 명확하고 대규모적 세포사를 결과한다; Ad-PPE-1 (3x)-Fas-c (10^3 MOI)로 감염된 HUVEC 및 BAEC은 세포막이 기포화, 호상화 (rounding)와 수축 및 용기로부터 떨어지는 것을 포함하는, 세포사멸을 경험하는 응집 세포의 형태적 특징을 가졌다. 반면, 동일한 MOI에서 대조군 바이러스로 감염된 세포는 정상적인 외양과 성장 속도를 유지하였다. 100 MOI로 형질유도된 세포는 최소한의 세포사만을 나타냈다 (데이터 미도시).
- [0332] Ad-PPE-1 (3 x)-Fas-c의 세포독성 특징의 다른 평가는 PPE-1 프로모터의 조절하에서 리포터 유전자 GFP를 발현하는 세포에 이러한 바이러스를 발현시킴으로써 수행되었다. 도 6c-d에서 명백히 나타나는바, 대부분 상기 형질유도된 세포들은 형질유도 72 시간 후에 전형적인 세포사멸 모습을 나타낸 반면, 대조군 바이러스 및 Ad-PPE-GFP로 공동 형질유도된 세포들은 정상으로 나타났다.
- [0333] Fas-c의 세포사멸 효과는 크리스탈 바이올렛 염색법을 사용하여 정량화되었다. 도 7에 나타난 바와 같이, Ad-PPE-Fas-c로 BAEC 및 HUVEC을 감염시키면 각각 57 % 및 65 %의 사망률을 결과하는 반면, 대조군 바이러스는 세포 활성화에 아무런 영향을 끼치지 못하였다.
- [0334] 친-세포사멸성 Ad-PPE-Fas-c의 내피세포 특이성은 이러한 벡터로 NSF (정상 피부 섬유아세포)를 감염시켜서 증명하였다. 이러한 세포들은 낮은 수준의 PPE-1를 발현하는데 [Varda-Bloom, N. 등 유전자 Ther 8, 819-27. (2001)] Ad-PPE-Fas-c의 감염으로는 영향을 받지 않았다. 반면, 상기 재조합 벡터 Ad-CMV-Fas-c는 이러한 세포에서 세포사멸을 유도하였다.
- [0335] 실시예 4
- [0336] Ad-PPE-1 (3x)-Fas-c 수용체 및 TNF α 리간드의 공동 투여는 선택적인 방식으로 친-세포사멸 효과를 증대시킨다
- [0337] Fas-c를 발현하는 세포에서 세포사멸 효과를 증대시키는 TNF α 능력을 조사하였다. Ad-PPE-Fas-c (100 MOI)로 바이러스 감염 48 시간 후 내피세포 배양물에 인간 TNF α 를 첨가하였다. 24 시간 후에 세포 활성을 측정하였다. 도 8에 나타난 바와 같이, TNF α (10ng/ml)는 Ad-PPE-1(3x)-Fas-c 감염세포의 활성을 73% 감소시킨 반면, TNF α 단독에 의해서는 또는 대조군 바이러스 (Ad-Luc)로 감염된 세포에서는 심각한 사멸이 수행되지 않았다. TNF α 효과를 구체화하기 위해, 세포 특이성에 역점을 두었다. NSF (정상 피부 섬유아세포), DA3 (마우스 유선 선암), D 122 (루이스 폐암) 및 B16 흑색종 세포를 Ad-PPE-Fas-c 또는 대조군 바이러스로 감염시켰다. 48 시간 후, 배양물을 TNF α 를 보충하고 및 크리스탈 바이올렛으로 염색 후 세포 형태를 평가하였다. 도 9a-e에 나타난 바와 같이, Ad-PPE-Fas-c로 감염된 비-내피세포들은 정상적인 외양을 나타냈고 TNF에 의해 영향을 받지 않았다. 반면, Fas-c로 BAEC를 아데노바이러스성으로 감염시키면 된 TNF를 첨가시 세포 활성이 뚜렷이 감소하는 결과를 낳았다. CMV 프로모터에 의해 구동되는 Fas-c의 비-선택적 세포사멸 활성이 도 10a에 나타나 있고, 이는 내피세포에 대하여 Ad-CMV-Fas-c의 TNF-의존적 세포사멸 효과를 보인다. 지정된 MOI의 Ad-CMV-Fas-키메라로 감염된 BAEC의 활성은 TNF로 처리 후 결정되었다.
- [0338] 특히, 상기 비-내피세포-특이성 벡터 Ad-CMV-Fas-c는 내피세포 및 비-내피세포 둘 다에서 TNF α 의존적 세포사멸을 야기하였다 (도 10b-d).
- [0339] 실시예 5
- [0340] Ad-PPE1 (3x)-Fas-c는 마우스에서 B16 흑색종의 생체 내 성장 지연을 야기한다
- [0341] B16 흑색종 마우스 모델을 사용하여 PPE1-3x 프로모터로부터 발현된 Fas-c의 항-종양 효과를 시험하였다. B16 흑색종 세포 (8×10^5)를 40 C57b1/6 마우스의 옆구리 부분에 피하 주사하였다. 종양이 축적될 때 (~5x5 mm), 마우스를 무작위로 하기와 같이 4 그룹으로 나눴다: (i) 대조군- 식염수 주사; (ii) 대조군 바이러스 (PPE 프로모터에 의해 조절되는 루시페라제 함유 아데노바이러스); (iii) 프레프로엔도텔린 (PPE) 프로모터에 의해 조절되는 Fas-TNF 수용체 키메라 유전자를 함유하는 Ad-PPE 1-3x-Fas-c-바이러스; 및 (iv) 비-내피세포 특이성 CMV 프로모터에 의해 조절되는 Fas-TNF 수용체 키메라 유전자를 포함하는 Ad-CMV- Fas-c-바이러스.
- [0342] 핸드 측정기(caliper)를 사용하여 종양 크기 (길이 및 너비)를 측정하였다. 도 11a에 나타난 바와 같이, 종양 크기는 대조군 마우스에 비하여, Ad-PPE1-3x-Fas-c 또는 Ad-CMV-Fas-c로 처리된 마우스에서 더 작았다. 치료 기간 말에 종양 무게는 Ad-PPE 1-3x-Fas-c 처리된 마우스에서 더 적었다 (도 11b). Ad-PPE 1-3x-Fas-c로 감염된

마우스는 종양에서 뚜렷한 괴사를 보였다 (도 11e).

- [0343] 전이 질환의 저해: 루이스 폐 암 모델: PPE-1(3x)-Fas-c 키메라에 의한 종양 성장의 발현 특이성 및 저해 효율을 전이성 루이스 폐 암종 모델에서 더 시험하였다. 하기 상세히 설명하는 바와 같이 수컷 C57BL/6J에서 폐 LLC 전이를 유도하였고 및 마우스를 바이러스성 벡터AdPPE-1 (3x) LUC, AdPPE-1 (3x)-Fas-c, 및 AdCMV-Fas-c로 9 일 간격으로 두 번 주사하였다 (Greenberger 등, J Clin Invest 2004;113:1017-1024).
- [0344] 바이러스 투여 6일 후에 마우스로부터 기관을 수거하고 PCR로 Fas-c 발현을 분석하였다. CMV-Fas-c-처리 마우스에서의 넓은 분포의 Fas-c 발현(데이터 미도시, 참조 Greenberger 등, J Clin Invest 2004; 113:1017-1024)과는 달리 PPE-1 (3x) 프로모터에 의한 Fas-c의 전사 조절로 종양 내포 폐로 한정되게 발현을 이끈다 (결과 미도시).
- [0345] 또한, 상기 처리 및 대조군으로부터 얻은 폐를 전체적으로 병리적 고찰하여, 전이물 내포 마우스에 AdPPE-1 (3x)-Fas-c를 투여하여 종양 성장을 저해하고 및 폐 표면에 자라고 있는 종양의 크기를 감소시킨 반면, 대조군 동물의 폐는 종양 조직으로 거의 뒤덮혔다는 것을 발견하였다 (데이터 미도시, 참조 Greenberger 등, J Clin Invest 2004; 113:1017-1024).
- [0346] *처리 및 대조 마우스로부터 얻은 폐 절편물의 조직병리학 및 TUNEL과 내피세포-특이성 CD31 염색으로, 전이물 내포 마우스에 AdPPE-1(3x)-Fas-c를 투여하면 종양 맥관 내피세포에 상당한 손상과 연관되어, 대량 세포사멸 및 괴사를 유발하는 것으로 밝혔다. 반면, 대조군-처리 마우스의 혈관은 영향을 받지 않았다 (데이터 미도시, 참조 Greenberger 등, J Clin Invest 2004; 113:1017-1024).
- [0347] 실시예 6
- [0348] 시험관 내 3X-PPE-1 플라스미드 활성의 분석
- [0349] PPE-1-3X의 활성을 분석하기 위해, PPE-1-3X 프로모터 플라스미드 및 개질되지 않은 PPE-1 프로모터 플라스미드에서의 리포터 유전자의 비교를 실시하였다. PPE-1-3X 단편물 또는 미개질 PPE-1 단편물 및 리포터 유전자 루시페라제를 포함하는 리포터 유전자 플라스미드를 내피세포 및 비-내피세포 세포주는 물론 PPE-1 프로모터를 발현하는 기관지 상피 세포주 (B2B)에 형질감염시켰다 (참조 상기 재료 및 방법). 상기 B2B 세포주는 PPE-1 프로모터에 비하여 비-내피세포 주에서 발현을 감소시키는 3X 요소의 능력의 표시를 제공하는 것으로 선택된다. 리포텍타민 (lipofectamine) (Promega Corp., Madison, WI)을 사용하여 형질감염을 수행하였다. 확립된 분자생물학 실시예 따라서, 각 경우에서 형질감염의 표시자로서, β gal-neo 플라스미드를 사용하였다.
- [0350] 형질감염 48 시간 후, 상기 세포를 용해 버퍼(Promega Corp., Madison, WI) 를 이용해 모으고 및 루시페라제 활성을 루시노미터 (TD-20e - Turner Designs, Sunnyvale, California)로 분석하였다. 동일하게, 상이한 형질전환 효율에 대해 표준화시키기 위해, β gal 활성을 분석하였다. 그 결과를 도 12 및 표 2에 요약하였다. PPE-3X의 조절하의 루시페라제 활성은 미개질 PPE-1의 조절하의 루시페라제 활성보다 15-20 배 더 높다. 비-내피세포 주에서, PPE-1 및 PPE-1-3X 둘 다를 사용하여 최소 발현을 검출하였다. 이러한 것은 PPE-3X가 생체 내에서 내피세포로 특이적으로 유전자를 전달하는 확실한 후보임을 증거하는 것이다.

표 2

- [0351] PPE-1 및 PPE-1-SX 루시페라제 작제물로 형질감염된 세포에서의 루시페라제 활성

플라스미드	루시페라제 활성: 내피세포주 내에서		비 내피세포 주
	HUVAC	BAEC	RIN
PPE	135.12	1121.3	0.73
PPE-1-3X	768	18331.7	0.32

- [0352] 실시예 7
- [0353] Ad5PPE-1/루시페라제의 시험관 내 활성 및 특이성
- [0354] PPE-1/루시페라제, PPE-1-3X/루시페라제, PPE-1/GFP 및 PPE-1-3X/GFP를 Ad5 플라스미드로 결합하여 Ad5PPE-1/Luc, Ad5PPE-1- 3X/luc, Ad5PPE-1/GFP 및 Ad5PPE-1-3X/GFP를 생성하였다 (Varda-Bloom 등, (2001) Gene

therapy 8:819-827). 이러한 작제물을 후술하는 바와 같이 개별적으로 분석하였다.

- [0355] Ad5PPE-1/luc의 활성을 시험하기 위해, B2B (인간 기관지 상피세포), BAEC (소 동맥 내피세포) 및 HUVEC (인간 제대 정맥 내피세포)의 형질감염을 실시하였다. 이러한 세 가지 세포주들은 엔도텔린 유전자를 발현하고, 내피 세포에서 시험되는 작제물의 발현 수준을 나타내기 위해 선택되었다. RIN (랫트 인슐리노마) 세포주는 엔도텔린을 발현하지 않는 데 음성 대조군으로 사용되었고, 동일한 작제물로 형질감염되었다. Ad5CMVLuc (CMV 프로모터의 조절하의 루시페라제)를 모든 세포주에서 비-내피세포-특이성 대조군으로서 사용하였다.
- [0356] 도 13은 CMV 프로모터를 사용한 것 보다 PPE-1 프로모터를 사용한 내피세포 BAEC 및 HUVEC 세포주에서 더 높은 루시페라제 발현이 나타난다는 것을 명백히 보여준다. 내피세포 기원이 아닌 RIN 세포에서, 상기 CMV 프로모터는 PPE-1 프로모터보다 더 높은 루시페라제 활성을 생성하였다. 이러한 결과는 미개질된 PPE-1 프로모터의 내피 세포 특이성을 증명한다.
- [0357] 실시예 8
- [0358] Ad5PPE-3XLuc 및 Ad5PPE-3XGFP의 활성 및 특이성
- [0359] 특이성 및 발현 수준에 대한 상기 3X 요소의 영향을 확인하기 위해, Ad5PPE-3X/루시페라제 및 Ad5PPE-3X/GFP 작제물을 사용하여 실시예 7에서 설명된 세포주를 형질감염시켰다. 실시예 7에서와 같이, Ad5CMVLuc를 비-내피세포-특이성 대조군으로서 사용하였다. CMV 프로모터와 비교하여 PPE-3X 프로모터의 조절 하에서 BAEC 및 HUVEC 세포의 더 높은 루시페라제 발현이 검출되었다. 도 14A는 BAEC 세포주에서 Ad5PPE-1-3X의 조절하에 GFP 발현을 나타내는 현미경 사진이다. 도 14B는 BAEC 세포주에서 Ad5CMV의 GFP 발현을 나타내는 현미경사진이다. 이러한 도면에서 명백히 나타난 바와 같이, PPE-1-3X 프로모터는 내피세포에서 더 활성적이다. 이러한 결과는 3X 요소로써 PPE-1 프로모터의 내피세포 특이성이 줄지 않는다는 것을 명백히 나타낸다. 세포 배양물에서 PPE-1 및 PPE-1-3X 프로모터의 상대적인 활성이 하기 실시예 11에 나타나 있다.
- [0360] 실시예 9
- [0361] p55 유전자의 친-세포사멸 활성의 시험관 내 분석
- [0362] P55 (TNFR1, GenBank 기탁번호 M75866)를 PACPPE3X (PPE-1-3X 프로모터 포함) 및 PACCMV로 서브클로닝 후, 이러한 플라스미드 및 GFP (pEGFP-C1 벡터; CLONTECH, Palo Alto, CA)를 전술한 바와 같이 공동 형질감염시켰다. 간략히, 상기 유전자를 PPE-1 프로모터 (루시페라제 유전자 대신) 하류의 NotI 제한효소 위치에 T4 DNA 라이게아제를 사용하여 클로닝시킨 후, DH5 α 콤피텐트 세포로 이를 형질전환시켰다. 형질감염 24 시간 후, 작고 둥근 세포사멸성 세포가 정상세포와는 시각적으로 구분되었다. 친-세포사멸 플라스미드로 형질감염된 세포의 전자현미경 사진은 세포사멸의 전형적인 외형을 보이며, 시각적 평가를 확인하였다.
- [0363] PPE-1-3X 프로모터 하에서, 내피세포에서 p55에 의해서만 세포사멸이 유도되는 반면 (도 15), 상기 CMV 프로모터는 임의의 세포 특이성 활성을 나타내지 않는다. PPE-1-3X의 조절하의 루시페라제는 어떠한 시험된 세포주에서도 세포사멸을 유도하지 않았다. 이러한 결과들은 PPE-1-3X 프로모터를 사용함으로써, 내피세포에서 특이적으로 세포사멸을 유도하는 것이 용이하다는 것을 가르킨다.
- [0364] 실시예 10
- [0365] 저산소증 응답성 요소 (HRE)는 저산소증 민감 내피세포에서 목표 유전자 발현을 향상시킬 수 있다
- [0366] 저산소증은 혈관 상태 및 구조의 주요한 조절자이다. 이것은 혈관신생의 강력한 자극이라는 것이 또한 나타났다 (허혈성 심장 질환 및 암 둘 다에서 (Semenza, G.L. 등 (2000) Adv Exp Med Biol.; 475: 123-30; Williams, KJ. (2001) Breast Cancer Res. 2001 : 3;328-31 및 Shimo, T. (2001) Cancer Lett. 174;57-64). 또한, 저산소증은 에리트로포이에틴, VEGF, 해당 효소 및 ET-1을 포함하는 많은 유전자의 발현을 조절하는 것으로 보고되었다. 이러한 유전자들은 저산소증 유도 인자-1 (HIF-1)로 명명된 유도성 전사 복합체가 연루된 공통적인 산소-감지 경로에 의해 조절된다. 상기 HIF-1 복합체는 목표 유전자의 시스 작용 저산소증 반응 요소(HRE)와 결합함으로써 저산소증으로의 전사 반응을 매개한다. 상기 HRE는 VEGF, 산화 질소 (Nitric Oxide) 신타제-2, 에리트로포이에틴 및 엔도텔린-1, ET-1을 위시한 다른 것들을 포함하는 저산소증에 응답하는 몇 가지 유전자의 프로모터에 존재하는 보존 서열이다. 상기 ET-1 프로모터는 전사 개시 위치의 상류 -118 bp 위치에 있는 반전 저산소증 반응 요소를 포함하며, 상기 요소는 7 개 염기쌍을 포함하고 GATA-2 및 AP1 위치들 사이에 존재한다 5' GCACGTT 3' - 50 염기쌍 (서열번호 5).

- [0367] 상기 프레프로엔도텔린-1 (PPE-1) 프로모터는 종양 또는 허혈성 조직의 저산소증 미세환경에서 그 발현을 증가시키는 능력을 가진 저산소증 반응 요소를 포함하며, 따라서, "종양 조직 특이성" 및/또는 "허혈성 조직 특이성"이 되게 한다. 이러한 HRE의 실제 기능을 평가하기 위해, 루시페라제 또는 GFP 리포터 유전자와 연계하고 및 아데노바이러스 벡터에 의해 전달된 PPE-1 프로모터 및 PPE-1-3X 프로모터의 분석을 실시하였다.
- [0368] PPE-1 프로모터 또는 PPE-1-3X 프로모터의 조절 하에 있는 루시페라제 활성은 정상 산소 및 저산소 조건하의 BAEC 세포와 비교하였다 (0.5% O₂, 16 시간). PPE-1 프로모터의 조절 하에 있는 루시페라제 활성은 저산소증에 노출 시 5 배 더 높았다 (도 16 및 17). 더욱이, PPE-1-3X 프로모터의 조절 하에 있는 루시페라제 활성은 저산소증 조건 하에서 2.5 배 더 높았다. 요약해서, 상기 3X 요소를 PPE 1 프로모터로 도입하면, PPE-1-3X 유전자에 의한 정상 산소 조건의 발현 수준이 미개질 PPE-1 프로모터를 사용한 것에 관찰된 것보다 더 높다고 하더라도, 여전히 저산소증에 응답하여 하류 유전자의 발현 수준을 증가시킬 수 있다.
- [0369] 실시예 11
- [0370] 내피 세포주에서의 PPE-1-3X 및 PPE-1 프로모터 활성의 평가
- [0371] 도 18은 pPPE-1/루시페라제 및 pPPE-1-3X/루시페라제를 사용한 B2B, HUVEC 및 BAEC 형질감염 실험으로부터의 결과를 요약한 것이다. B2B, HUVEC 및 BAEC에서 PPE-1 프로모터 조절 하 보다 PPE-1-3X 프로모터 조절 하에서 더 높은 루시페라제 발현 (30, 8.5 및 1.5 배)이 각각 관찰되었다. 이러한 결과들은 상기 제시된 것을 확고히 하고, PPE-1-3X가 내피세포에 특이적으로 높은 발현 수준을 지시하는 데 매우 적합하다는 것을 확립하는 데 기여한다. 향후 생체 내 전달의 맥락에서, PPE-1-3X 작제물로 성취한 더 높은 수준의 발현은 더 적은 양의 DNA를 투여하는 것으로 해석된다. 이는, 따라서, 특이성을 더욱더 증가시키도록 할 것이다.
- [0372] 실시예 12
- [0373] Ad5PPE-1Luc의 생체 내 효능, 특이성 및 안정성
- [0374] 실시예 7 내지 10에서 관찰된 발현의 내피세포 특이성이 세포 배양물의 인공물이 아니라는 것을 확증하기 위해, 상기 Ad5PPE-1/루시페라제 작제물을 상기 "정상 마우스에서 조직 유전자 발현"에서 설명된 바와 같이 C57BL/6 마우스에 주사하였다. 시험관 연구에서와 같이, Ad5CMV/루시페라제를 음성 대조군으로서 사용하였다.
- [0375] 아데노바이러스 벡터들을 주사 후, 맥관화된 및 비-맥관화된 조직에서의 루시페라제의 특이적 활성 및 안정성을 분석하였다. 결과는 도 19 (간에서 발현 대비 루시페라제 발현) 및 표 3 (전신 발현의 백분율로서 루시페라제 발현)에 요약하였다. 예상되는 바와 같이, Ad5CMV/루시페라제 처리 마우스에서, 상기 루시페라제 활성 대부분 (>80% 전신 발현의) 이 간에서 발견되었다. 상기 PPE-1 프로모터에 의해 조절되는 루시페라제 활성은 간에서 더 낮았다 (전신 발현의 37-54%). 상기 PPE-1 유도된 발현은, Ad5CMV/루시페라제-처리 마우스에 비하여(전신 발현의 최대 1.8%; 표 2), 동맥에서 훨씬 더 높았다 (각각 주사 5 및 14일 후, 전신 발현의 23-33%). 이러한 결과들은 세포 배양에서 특이적으로 관찰된 내피세포를 확인시키는 것이다. 간은 매우 맥관화된 기관임을 기억해야 할 것이다. 그러므로, 하기 상세히 설명하는 바와 같이, 기관 내에서 세포 발현을 조사하였다.

표 3

[0376] PPE-1 및 CMV 기반 작제물의 주사 5 및 14일 후 기관에서의 루시페라제 발현

주사 후 일수	5		14	
	광 units/ μ g 단백질		광 units/ μ g 단백질	
기관	PPE-1	CMV	PPE-1	CMV
동맥	13.0 \pm 2.9 (32.7%)	1.4 \pm 0.5 (0.56%)	10.6 \pm 2.4 (12.6%)	1.3 \pm 0.3 (1.1%)
심장	0.2 \pm 0.1 (0.5%)	1 \pm 0.6 (0.4%)	1.5 \pm 0.3 (1.7%)	1.8 \pm 0.6 (1.6%)
간	22.7 \pm 4.5 (57%)	219 \pm 111.5 (88.6%)	34.9 \pm 7.8 (41.6%)	52.8 \pm 10.6 (46.8%)
폐	0.2 \pm 0.1 (0.5%)	2.3 \pm 1.0 (0.9%)	3.6 \pm 0.8 (4.3%)	2.0 \pm 0.9 (1.8%)
근육	0.3 \pm 0.1 (0.7%)	0.8 \pm 0.2 (0.3%)	1.2 \pm 0.3 (1.4%)	1.5 \pm 0.5 (1.3%)

비장	1.3±0.8 (3.2%)	1.6±0.9 (0.6%)	2.0±0.4 (2.4%)	2.3±0.9 (2.0%)
췌장	2±0.6 (5.0%)	20.1±6.8 (8.1%)	26.4±5.9 (31.5%)	42.5±24.5 (40.1%)
신장	0.1±0 (0.25)	0.9±0.6 (0.4%)	0.6±0.1 (0.71%)	0.8±0.3 (0.7%)

[0377] 도 41A 및 41B는 주사된 110 마리 마우스의 동맥 (A) 및 간에서 (B) 절대 루시페라제 활성 (광 units/ μ g 단백질)을 나타내고 있다. 루시페라제 활성은 주사 1 (n=13), 5 (n=34), 14 (n=32), 30 (n=20) 및 90 (n=11) 일 후에 측정되었다. 동맥에서의 결과는 대부분 내피세포에서의 프로모터 (PPE-1 또는 CMV) 활성을 나타내며 간에서의 결과는 대부분 간세포에서의 활성을 나타낸다.

[0378] 실시예 13

[0379] BALB/C 마우스에서 생체 내 Ad5PPE-1의 효율, 특이성 및 안정성의 분석

[0380] 상기 관찰된 결과가 특정 동물 종의 인공물이 아니라는 것을 증명하기 위해, 실시예 12의 실험을 12 주령 BALB/C 마우스 (각 군당 n=10)에 반복하였다.

[0381] 아데노바이러스 벡터를 사용한 절대 결과가 C57BL/6 마우스에서보다 BALB/C에서 낮기 때문에, 모든 조직에서, 루시페라제 발현은 전체 루시페라제 활성의 백분율로 나타낸다.

[0382] 주사 5일 후에, 최고의 상대적 루시페라제 발현이 Ad5PPE-1 주입된 마우스의 비장에서 (90.9%) 및 Ad5CMV 주입된 마우스의 간에서 (86.2%) 관찰되었다. 주사 14일 후에 Ad5PPE-1 주사된 마우스의 동맥에서의 상대적인 루시페라제 활성이 (32.9%), 주사 5일 후의 활성 (1.75%)과 비교하여, 상당히 증가한 것이 또한 관찰되었다 (도 42A 및 42B; Ad5PPE-1Luc - 흰 막대; Ad5CMVLuc-검은 막대). 이러한 결과들은 마우스의 종에 관계없이, PPE-1 프로모터의 조직 특이성이, 간세포가 주사된 DNA를 선호적으로 취득함에도 불구하고, 간세포 발현을 효과적으로 제거하기에 충분히 강하다는 것을 나타내고 있다.

[0383] 실시예 14

[0384] 생체 내 Ad5PPE-1에 의해 전달된 유전자의 세포 국소화

[0385] 생체 내 PPE-1에 의해 발현된 유전자의 세포 발현 장소를 확정하기 위해, 아데노바이러스 벡터 Ad5PPE-1-GFP에 의해 전달된 녹색 형광 단백질 (GFP)을 사용하였다. Ad5CMVGFP (Quantum, Canada)를 비-내피세포-특이성 음성 대조군으로서 사용하였다. 정맥 내 주사 5일 후, 마우스를 처형하고 그 조직을 형광현미경으로 분석하였다.

[0386] Ad5CMVGFP 벡터가 주사된 마우스에서, 대부분의 발현은 간세포에서 검출되었고 간의 내피세포에서는 발현이 검출되지 않았다 (도 20A). 대조적으로, Ad5PPE-1-GFP 주사 마우스 (도 20B)는 간세포에서 어떠한 발현도 나타내지 않았으나 간의 혈관의 내피세포에서는 상당한 발현을 보였다. 실제로 모든 PPE-1 유도 발현이 내피세포에서 검출되는 다른 세포에서도 유사한 결과가 얻어졌으나, CMV 유도 발현의 어느 것도 내피세포에서 얻어지지 않았다. 이러한 결과들은 내피세포 및 비-내피세포를 포함하는 기관에서조차 내피세포 특이성이 보존된다는 것을 알려준다. 이러한 발견은 성장하는 종양에서 혈관신생을 방지하기 위한 주요한 의미를 가지고 있다.

[0387] 실시예 15

[0388] 생체 내 Ad5PPE-1-3X Luc 및 Ad5PPE-1-3X GFP의 효율 및 내피세포 특이성 분석

[0389] 세포에서 리porter 유전자들인 루시페라제 및 녹색 형광 단백질 (GFP)의 발현을 이끌어 나가는데 있어서 Ad5PPE-1 및 Ad5PPE-1-3X의 상대적인 효율을 정하기 위해, 진술한 세포주를 사용하여 내피세포에서의 특이성을 시험관 내에서 시험하였다. Ad5CMVLuc 및 Ad5CMVGFP를 비-조직 특이성 대조군으로서 사용하였다. Ad5PPE-1Luc 및 Ad5PPE-1GFP를 사용하여 상기 3X 서열을 첨가함으로써 야기된 발현 수준에서의 상대적인 변화를 확인하였다.

[0390] 도 21 및 22에서 요약된 결과는, PPE-1-3X 프로모터의 조절 하의 루시페라제 활성은, 비-내피세포 - Rat 인슐리노마 - RIN, HeLa, HePG2 및 정상 피부 섬유아세포 (NSF)에서의 활성과 비교하여, EC 세포주 (소 동맥 내피세포 - BAEC)에서 5-10 배 더 높았다 (도 21 및 22).

[0391] 도 21은 Ad5PPE-1Luc, Ad5PPE-1-3XLuc, 및 Ad5CMVLuc에 의해 형질유도된 B2B, BAEC 및 RIN 세포에서 광 units/

μg 단백질로서 루시페라제 활성을 나타낸다.

- [0392] Ad5CMVLuc로 형질유도된 RIN 세포에서 최고의 루시페라제 발현이 관측되었으나, 이러한 작제물은 BAEC 및 B2B 세포에서 낮은 발현을 보여준다. Ad5PPE-1-3XLuc에 의해 형질유도된 BAEC 세포에서 그 다음 높은 루시페라제 발현이 관측되었다. Ad5PPE-1Luc는 BAEC 세포에서 더 낮은 수준으로 발현되었다. B2B 세포주에서, Ad5PPE-1Luc 및 Ad5PPE-1-3XLuc는 거의 동일한 수준으로 발현되었다.
- [0393] 동일한 감염 조건에서 (moi=10), 내피세포에서 PPE-1-3X 프로모터 조절 하의 전체적인 루시페라제 활성은 상기 PPE-1 프로모터 조절 하보다 23배 더 높고 및 상기 CMV 프로모터 조절 하보다 23-47 배 더 높았다. 이것은, 비-내피 RIN 세포에서의 루시페라제 발현이 CMV 프로모터 조절 하에서 3,000 배 더 높다는 사실에도 불구하고 그러하다 (도 21).
- [0394] PPE-1 및 PPE-1-3X가 다른 비-내피세포 계열에서 비활성적이라는 것을 확립하기 위해, HeLa, HepG2, 및 NSF 세포주를 형질유도하였다. BAEC를 내피세포 대조군으로서 사용하였다. 도 22는 Ad5PPE-1Luc, Ad5PPE-1-3XLuc 및 Ad5CMVLuc에 의해 형질유도된 HeLa, HepG2, NSF 및 BAEC세포에서 루시페라제 활성을 광 units/μg 단백질로서 나타낸 도면이다. Ad5CMVLuc로 형질 유도하면, HeLa, HepG2 및 NSF 세포에서 고도의 루시페라제 발현을 야기하였다. 이러한 세포들은 PPE-1의 조절 하에서 루시페라제를 발현하지 못했고, PPE-1-3X 프로모터로는 적은 수준에서 루시페라제를 발현하였다. 예상되는 바와 같이, Ad5PPE-1Luc 또는 Ad5PPE-1-3XLuc로 형질 유도된 BAEC 세포는 높은 루시페라제 발현을 보였다.
- [0395] 종합하면, 이러한 결과들은 PPE-1 프로모터내로 3X 서열을 도입하면 내피세포 주에서 높은 수준의 발현을 야기하는 반면, 비-내피세포에서는 원하지 않는 발현을 방지한다는 것을 나타낸다.
- [0396] 상기 PPE-1 프로모터에 3X 서열을 첨가하면 moi=1에서 형질유도된 BAEC에서 GFP 발현을 도시하는 도 23A-C에서 나타난 바와 같이, EC 세포주 (소 동맥 내피세포 - BAEC)에서 녹색 형광 단백질의 발현 수준을 또한 증가시켰다. 이러한 실험에서 CMV 프로모터를 사용한 결과 아무런 GFP 발현이 관찰되지 않았다.
- [0397] 도 23에서, A는 Ad5PPE-1-3XGFP 형질유도 세포를 나타내고, B는 Ad5PPE-1GFP 형질유도 세포 및 C는 Ad5CMVGFP를 나타낸다. 다시, 상기 3X 서열을 상기 PPE-1 프로모터로 도입하면 상기 리포터 유전자의 발현을 상당히 증가시켰다. 이러한 결과는 내피세포 특이성 인핸서로서 작용하는 상기 3X 서열의 능력이 전사될 하류 유전자의 기능이 아니라는 것을 가르킨다.
- [0398] 더욱이, Ad5PPE-1-3X-GFP 및 Ad5PPE-1GFP 형질 유도는, 도 24-27에서 요약된 바와 같이, CMV 프로모터 하의 높은 발현과 비교하여, 비-내피세포류, SMC, HeLa, HePG2 및 정상 피부 섬유아세포 (NSF)에서 GFP 발현을 나타내지 않는다. 도 24는 Ad5PPE-1-3XGFP (A) 또는 Ad5CMVGFP (B)로 moi=1에서 형질유도된 SMC에서의 GFP 발현을 보인다. 고수준의 GFP 발현은 Ad5CMVGFP 형질유도로부터 결과되는 반면, Ad5PPE-1-3XGFP 형질유도로는 아무런 GFP 발현을 얻지 못하였다.
- [0399] 도 25는 HeLa 세포에서 행하여진 유사한 실험의 결과를 나타낸다. 전 도면에서와 같이, A 는 Ad5PPE-1-3XGFP로 형질 유도된 세포를 B는 Ad5CMVGFP로 형질 유도된 세포를 나타낸다. 반복해서, 고도의 GFP 발현이 Ad5CMVGFP 형질 유도에 의해 결과되었지만, Ad5PPE-1-3XGFP 형질 유도로는 아무런 GFP 발현을 얻지 못하였다.
- [0400] 도 26은 HepG2 세포에서 행하여진 유사한 실험의 결과를 나타낸다. 전 도면에서와 같이, A 는 Ad5PPE-1 (3X)GFP로 형질 유도된 세포를, B는 Ad5CMVGFP로 형질 유도된 세포를 나타낸다. 반복해서, 고도의 GFP 발현이 Ad5CMVGFP 형질 유도에 의해 결과되었지만, Ad5PPE-1-3XGFP 형질 유도로는 아무런 GFP 발현을 얻지 못하였다.
- [0401] 도 27 은 NSF 세포에서 행하여진 유사한 실험의 결과를 나타낸다. 전 도면에서와 같이, A 는 Ad5PPE-1-3XGFP로 형질 유도된 세포를, B는 Ad5CMVGFP로 형질 유도된 세포를 나타낸다. 반복해서, 고도의 GFP 발현이 Ad5CMVGFP 형질 유도에 의해 결과되었지만, Ad5PPE-1-3XGFP 형질 유도로는 매우 낮은 수준의 GFP 발현이 결과되었다.
- [0402] 이러한 결과들은, 종합하면, 서열번호 7의 3X 서열을 포함하는 개질된 PPE-1 프로모터를 사용함으로써 고도의 내피세포 특이성 및 고도의 내피세포 발현이 얻어진다는 것을 나타내고 있다.
- [0403] 실시예 16
- [0404] 생체 내 Ad5PPE-1-SX에 의해 전달된 리포터 유전자의 세포 국소화
- [0405] PPE-1-3X 프로모터의 조절 하에서 생체 내 발현된 리포터 유전자의 세포 국소화 양상을 알아보기 위해, 전술한 바와 같이, Ad5PPE-1-3XGFP 및 Ad5PPE-1GFP를 마우스에 주사하였다. 정맥 내 주사 5일 후, 마우스를 처형하고

조직을 형광 현미경으로 분석하였다.

- [0406] Ad5PPE-1GFP 주사된 마우스에 비하여, Ad5PPE-1-3XGFP 주사된 마우스의 간, 신장 및 비장 혈관의 내피세포에서 상당히 더 높은 GFP 활성이 관찰되었다. 도 28A-B은 대표적 결과를 나타낸다.
- [0407] 도 28A는 Ad5PPE-1GFP로 주사된 마우스의 혈관에 정렬된 내피세포에서의 낮은 GFP 발현 수준을 보여준다. 도 28B는 상기 작제물에 3X 서열을 첨가한 결과로 나타난, 고도의 GFP 발현 수준을 나타낸다.
- [0408] 혈관의 안쪽 세포에서의 높은 발현에도 불구하고, 간세포, 사구체, 상피세포 및 비장세포에서는 아무런 발현도 검출되지 않았다 (도 18 및 19).
- [0409] 도 29는 주사된 마우스의 신장 조직으로부터의 대표적인 결과를 나타낸다. Ad5CMVGFP 주사된 마우스 (도 29A), Ad5PPE-1GFP (도 29b) 및 Ad5PPE-1-3XGFP (도 29C) 주사된 마우스 모두는 신장 세포에서 낮은 GFP 활성을 나타낸다. 도 29B에서, 혈관벽에서 약간 더 높은 GFP 발현이 보인다 (화살표 지시).
- [0410] 도 30은 주사된 마우스의 비장 조직에서 얻은 대표적 결과를 나타낸다. Ad5CMVGFP 주사된 마우스 (도 30A), Ad5PPE-1GFP 주사된 마우스 (도 30B) 및 Ad5PPE-1-3XGFP 주사된 마우스 (도 30 C) 모두는 비장 세포에서 낮은 수준의 GFP 활성을 보인다. Ad5PPE-1-3XGFP 주사된 마우스의 혈관에서 높은 GFP 활성이 나타난다 (화살표 지시).
- [0411] 이러한 결과들은 상기 PPE-1 및 PPE-1-3X 프로모터 둘 다 생체 내에서 내피세포 특이성이라는 것을 확인시켰다. 이들은 양쪽 프로모터들의 활성이 비-증식성 내피세포 조직(즉, 건강한 기관의 혈관)에 한정되어 있다는 것을 제시하고 있다. 따라서, 종양 혈관신생 모델에서 분석을 실시하였다.
- [0412] 실시예 17
- [0413] 생체 내 종양 신생맥관화에서 Ad5PPE-1 작제물의 분석
- [0414] 종양의 혈관신생 혈관에 리포터 유전자의 발현을 특이적으로 지시하는 Ad5PPE의 능력을 확인하기 위해, 쥐의 LLC 모델 (재료 및 방법에서 설명된)을 사용하였다. 일 구체예에서, Ad5PPE-1Luc 또는 Ad5CMVLuc (10^{10} pfu/ml 각각)을 전신 주사 한 5일 후에 종양 신생맥관화에서 루시페라제 발현을 시험하였다.
- [0415] 이러한 실험에서, 일차 및 전이 종양 모델에 Ad5CMVLuc을 전신 주사하면 일차 종양 및 전이 폐에서 최소한의 발현이 나타났다. 이러한 발현 수준은 천연 정상 세포에서 CMV에 의해 지시된 루시페라제의 최소 발현과 유사하다 (도 35; 검은 막대; n=12). 대조적으로, PPE-1 프로모터의 조절 하에서 (도 35; 흰 막대; n=9), 상기 고도의 혈관신생적 폐 전이물은, 빈약하게 맥관화된 일차 종양 및 천연 폐에서 루시페라제 활성보다 약 200 배 높은 루시페라제 활성과 연관이 된다.
- [0416] 간, 신장, 심장 및 췌장과 같은 비-전이성 조직에서의 루시페라제 발현은 최소였다. 동맥에서의 발현 수준은 전이성 폐에서의 수준의 약 30% 였다.
- [0417] LLC 모델에서의 추가의 실험에서, Ad5PPE-1GFP 및 Ad5CMVGFP 작제물을 사용하여 일차 종양 및 전이 폐에서 리포터 유전자 발현을 국소화하였다.
- [0418] Ad5PPE-1GFP 주사된 마우스는, 비록 종양세포 자체에서는 발현이 검출되지 않았지만, 일차 종양의 혈관에서 높은 수준의 GFP 특이성 발현을 보였다 (도 47C). 이러한 관측은 실시예 20에 제시된 LLC 세포 배양 모델의 결과와 일치한다. 폐 전이체에 있어서, GFP는 전이된 병소의 대동맥 및 작은 신생 혈관 둘 다에서 높은 수준으로 발현되었다 (도 47A). 정상 폐 조직에서는 어떠한 발현도 검출되지 않았다. GFP 발현 (도 47A) 및 CD31 항체 면역염색 (도 47B)의 공동 국소화로 상기 내피세포 국소화를 증명하였다. 대조적으로, Ad5CMVGFP 주사된 마우스에서, 일차 종양 및 폐 전이 둘다에서 어떠한 GFP 활성도 검출되지 않았다.
- [0419] 도 47C은 Ad5PPE-1GFP를 종양 내 주사한 후, 일차 종양의 혈관에서의 GFP 발현을 나타내고 있다. 도 47D은 구획 C와 동일하게 보관된 위상차 영상으로서 종양 및 그 혈관을 나타내고 있다.
- [0420] 이러한 결과들은 PPE-1이 종양 세포 자체에서는 고도의 발현을 이끌지 않지만, 상기 프로모터는 종양 내의 혈관 내피에서, 특히 빠르게 증식하는 신생혈관에서 고도의 발현을 이끈다는 것을 나타내고 있다.
- [0421] Ad5CMV를 일차 피하내 종양 모델로 종양 내 주사하면, 종양 조직에서는 높은 루시페라제 발현을 간에서는 중간 발현 수준 (종양에서 발현된 양의 10%; 도 53)을 결과한다. 전이 폐에서는 어떠한 발현도 검출되지 않았다. 반면에, 종양 내 주사시, PPE-1 프로모터 하의 루시페라제 발현은 일차 종양 및 전이 폐에서 유사한 루시페라제

발현 수준을 결과하였고 간에서는 발현이 검출되지 않았다.

[0422] 실시예 18

[0423] 암종 세포 배양 시스템에서 Ad5PPE-1 작제물의 분석

[0424] 암종 세포에서 루시페라제 발현을 지시하는 Ad5PPE-1 및 Ad5CMV의 효율을 분석하기 위해, 상기 D122-96 루이스 폐 암종 세포주를 사용하였다.

[0425] 다양한 moi에서 시험관 내 형질 유도를 수행하였다. 그 결과는, 양쪽 아데노바이러스 벡터들이 상기 루시페라제 유전자를 이러한 세포들에 형질유도할 수 있다는 것을 나타낸다 (표 4). 그럼에서, Nevertheless, 루시페라제 활성 directed by the 상기 PPE-1 프로모터에 의해 지시되는 루시페라제 활성은, 각각 50 대 1000-2500 광 units/ μ g 단백질로, 내피세포에서 검출되는 활성보다 LLC 세포에서 더욱 낮다.

[0426] [표 5]

[0427] Ad5PPE-1 Luc 및 Ad5CMVLuc에 의한 루이스 폐 암종 세포주 (D122-96)의 시험관 내 형질유도

	MOI=1	MOI=5	MOI=10
AdPPE-1	8.1 \pm 0.06	33.95 \pm 7.0	50.7 \pm 5.0
Ad5CMV	9.3 \pm 1.1	47.3 \pm 4.0	88.13 \pm 10.1

[0428]

[0429] 실시예 19

[0430] 생체 내 종양 신생 혈관에서의 3X 서열의 효과 분석

[0431] 혈관신생적 혈관에서의 PPE-1 프로모터에 대한 상기 3X 서열의 효과를 확정하기 위해, 상기 루이스 폐 암 (LLC) 전이 모델 (재료 및 방법에서 설명)을 사용하였다. Ad5PPE-1GFP, Ad5PPE-1-3XGFP 또는 Ad5CMVGFP의 10^{10} 감염 유닛을 IV 주사 5일 후, 마우스를 처형하고 조직을 재료 및 방법에서 설명한 바와 같이 분석하였다.

[0432] 도 31A-D는 식염수 주사된 대조군 마우스 (도 31A), Ad5CMVGFP 주사된 마우스 (도 31 B), Ad5PPE-1GFP 주사된 마우스 (도 31 C) 및 Ad5PPE-1-3XGFP 주사된 마우스 (도 31D)의 전이성 폐에서 GFP 발현을 요약하고 있다. 항-CD31 면역염색 (도 31C' 내지 31D')하여, 각 전이 조직에서 GFP 발현의 위치를 확인한다. 그 결과는 대조군 - 식염수 주사된 마우스에서는 아무런 GFP 발현도 검출되지 않은 반면 (도 31A), CMV 주사된 마우스의 상피 기관 지 주위에서는 약간의 발현이 있었고, 그러나 이러한 마우스의 전이 폐의 혈관신생적 혈관에서는 없었다 (도 31B)는 것을 보여준다. Ad5PPE-1GFP 주사된 마우스의 전이 폐에서 낮은 GFP 발현이 관찰된 반면 (도 31C 및 31C', Ad5PPE-1-3XGFP 주사된 마우스의 새로운 혈관에서 높은 그리고 특이적 발현이 관찰되었다 (도 31D 및 31D').

[0433] 이러한 결과들은 실시예 15의 생체 내 결과 및 실시예 7, 8 및 11의 시험관 내 결과 사이에 명백한 차이를 설명하고 있다. 상기 PPE-1 및 상기 PPE-1-3X 프로모터 둘 다는 내피세포 특이성이다. 그러나, 상기 3X 서열은 예를 들어 성장중인 종양에서 새로이 형성되는 혈관과 같은 빠르게 증식하는 내피세포에서 발현 수준을 크게 증가시킨다.

[0434] 실시예 20

[0435] 종양 혈관신생적 혈관에서 PPE-1 프로모터에 대한 3X 요소의 효과

[0436] 종양 혈관신생적 혈관에서 PPE-1 프로모터의 효능 및 특이적 활성화에 대한 본 발명의 3X 요소의 효과를 연구하기 위해, 상기 LLC 전이 모델을 사용하였다. 10^{10} pfu/ml의 Ad5PPE-1Luc, Ad5PPE-1-3XLuc, Ad5CMVLuc, Ad5PPE-1GFP, Ad5PPE-1-3X-GFP 또는 Ad5CMVGFP의 i.v. 주사 5일 후, 마우스를 처형하고 그 조직을 전술한 바와 같이 루시페라제 또는 GFP 발현에 대하여 분석하였다.

[0437] 도 48은 Ad5PPE-1-3XLuc, Ad5PPE-1Luc 또는 Ad5CMVLuc의 전신 주사 후 정상 폐에서 대 전이성 폐에서의 루시페라제 발현을 비교한 막대그래프이다. 실험군은 Ad5CMVLuc (n=7; 검은 막대), Ad5PPE-1Luc (n=6; 회색 막대) 및 Ad5PPE-1-3XLuc (n=13; 갈색 막대)이다. 활성은 광 units/ μ g 단백질로서 표시된다.

[0438] PPE-1-3X 프로모터의 조절하에서의 루시페라제 발현은 정상적인 폐에서의 활성화에 비하여 전이성 폐에서 35배 더 크고 3X 요소 부재 PPE-1 프로모터에 의해 구동되는 발현보다 3.5배 더 높다 (p<0.001). Ad5PPE-1-3XLuc로 주

사된 마우스의 다른 조직에서는 매우 적은 루시페라제 활성이 검출되었다. 상기 폐에서 루시페라제 발현을 각 주사된 동물로부터의 백분율로 계산한 결과, 전이 폐에서의 활성이 정상적 폐에서의 활성과 비교하여 10배 증가하였다는 것이 밝혀졌다 (도 49).

[0439] 리포터 유전자 발현을 특정 세포 유형에 국소화하기 위해, GFP 작제물을 사용하였다. 도 50A-B는 Ad5PPE-1-3XGFP 주사된 마우스의 전이 폐에서 GFP 발현(도 50A)을 나타낸다. CD31 항체에 의한 면역염색 (도 50B)으로, 새로운 혈관에서 GFP 발현되는 것이 확인된다. 대조군-식염수 주사된 마우스에서는 어떠한 GFP 발현도 검출되지 않았다. CMV 주사된 마우스의 상피 기관지의 주위에서 낮은 수준의 발현이 있지만, 전이 폐의 혈관신생적 혈관에서는 없었다. 요약하면, 이러한 결과들은, 발현 수준에서의 큰 증가는 3X 요소를 Ad5 PPE-1 작제물로 도입한 결과로서 나온 것이고 및 이러한 증가된 발현은 종양의 혈관신생적 혈관에 특이적이라는 것을 나타내고 있다. 잠재적으로, 관측된 효과는 전술한 저산소증 응답과 연계하여 관심의 서열의 발현 수준을 더 증대할 수 있을 것이다.

[0440] 실시예 21

[0441] PPE-1 저산소증 응답의 특성화

[0442] 쥐의 PPE-1 프로모터 활성에 대한 저산소증의 효과를 더 특징짓기 위해, 소 동맥 내피세포 (BAEC)를 DNA 플라스미드로 형질감염시켰다 (pEL8; 도 37A). 상기 pEL8 플라스미드는 쥐의 PPE-1 프로모터 (1.4kb) (적색), 상기 루시페라제 유전자 (1842 bp), SV40 poly A 장소 및 엔도텔린-1 유전자의 첫번째 인트론을 포함하며, 통틀어 PPE-1 프로모터 카세트로 칭하며 이를, 재료 및 방법에서 설명한 바와 같이, BamHI 제한 효소로 절단하고 추출하였다. 감염 후, 세포를 저산소증 조건에 노출시켰다.

[0443] 저산소증 (0.5% O₂)에 18 시간 노출시킨 감염된 BAEC에서 루시페라제 발현은 정상 환경에서 배양된 세포에서의 루시페라제 발현보다 8 배 더 높았다 (도 32). 도 32는 쥐의 PPE-1 프로모터를 포함하는 플라스미드에 의해 형질감염된 BAEC에서의 루시페라제 활성 (광 units/ μ g 단백질)은 형질감염된 세포가 저산소증 환경에 배양되었을 때 상당히 더 높았다는 것을 나타낸다. 동일한 형질감염 효율이 β -갈락토시다제 리포터 벡터로 공동 형질감염과 LacZ 활성 분석에 의해 확인되었다.

[0444] 아데노바이러스 벡터에 의해 전달된 쥐의 PPE-1 프로모터가 또한 저산소증에 의해 상방 조절되는 지를 조사하기 위해, BAEC를 Ad5PPE-1Luc로 형질유도하였다. 이번 실험에서 AdSCMVLuc를 비-특이성 대조군으로 사용하였다. 결과는 도 33에 요약되어 있다. Ad5PPE-1Luc에 의해 형질유도된 BAEC에서의 저산소증 루시페라제 활성은 증가되었다. 반면, 정상 산소조건 및 저산소증 간의 심각한 차이가 Ad5CMV 형질유도 세포에서는 검출되지 않았다 (도 33).

[0445] 상기 PPE-1 프로모터 활성의 향상이 내피세포에 특이적인 것인가를 알기 위해, 상이한 세포주 (BAEC, B2B, CHO, RIN 및 심장 근세포)를 Ad5 PPE-1 (moi=10)로 형질유도하고 및 저산소증 (0.5% O₂) 또는 정상 산소 환경에 노출시켰다. 결과는 도 34에 요약되어 있다. 루시페라제 활성은 B2B 세포에서는 약간 증가하였고, 저산소증 환경에서 배양된 BAEC 세포에서는 상당히 증가하였다. 다른 세포 주에서의 루시페라제 발현은, 정상 산소 상태와 비교하여, 저산소증 환경에 의해 감소되었다. 이러한 결과는 PPE-1 프로모터의 저산소성 유도는 일차적으로 내피 세포 계열에서 일어난다는 것을 확인시킨다.

[0446] 실시예 22

[0447] PPE-1 저산소증 응답에 대한 3X 서열의 효과

[0448] PPE-1 저산소증 응답에 대한 3X 서열의 효과를 확인하기 위해, BAEC를 Ad5PPE-1Luc 및 Ad5PPE-1(3X)Luc로 형질유도하였다.

[0449] 형질유도 후, BAEC 세포를 전술한 바와 같이, 저산소증 또는 정상 산소 환경에서 배양하였다. 결과는 도 35에 요약하였다.

[0450] 상기 Ad5PPE-1Luc 작제물을 사용한 루시페라제 발현은 저산소증에 대한 응답에 있어서 상당히 증가하였다 (7배) (저산소증에서 2578 및 정상 산소 상태에서 322.1). 반면에, 상기 Ad5PPE-1(3X)Luc 작제물은 저산소증에 대한 응답에 있어서 1.5 배 증가 만을 보였을 뿐이다 (정상 산소 상태의 2874.5 에서 저산소증의 4315로). 이러한 결과는 3X 서열을 상기 PPE-1 프로모터에 첨가했을 때 관찰되는 정상 산소 상태에서의 고수준의 발현이 저산소증 응답에 대하여 어느 정도 가려주는 것으로 기능하고 있다는 것을 알려준다.

- [0451] 실시예 23
- [0452] 형질전환 마우스 모델에서의 저산소증에 대한 PPE-1 응답
- [0453] 국소적 저산소증/허혈증에 있는 조직에서 쥐의 PPE-1 프로모터 활성을 조사하기 위해, 상기 재료 및 방법에서 설명된 mPPE-1-Luc 형질전환 마우스를 사용하였다. 이 마우스를 기술된 바와 같이 국소적 뒷다리 허혈증으로 유도하였다 (Couffinhal T. 등 (1998) Am. J. Pathol. 152;1667- 1679). 간략하게, 동물을 펜토바비탈 소듐 (40 mg/kg, IP)으로 마취시켰다. 복재 및 슬와 동맥의 분기, 약 2 mm 근처에 있는 우측 대퇴 동맥을 결찰하여 뒷다리 일방에 허혈을 유도하였다. 관류에서의 기능적 변화 유도를 확인하기 위해, 7.5 MHz 변환기 및 혈관조영 소프트웨어가 장치된 시너지 초음파 시스템 (GE)를 사용하여 4 및 14일째에 초음파 영상을 실시하였다. 동물은 통상적인 조건하에서 최대 18일 간 가두었다.
- [0454] 결찰 2, 5, 10 및 18일 후, 허혈 근육에서, 정상 비-결찰 근육에서 및 간, 폐 및 동맥에서, 루시페라제 발현을 분석하였다.
- [0455] 결과는 도 36에 요약되어 있는바, 결찰 후 기간 동안 간, 폐 및 동맥에서는 심각한 차이가 검출되지 않는 반면, 정상 비-결찰 및 허혈성 근육 둘 다에서 대퇴부 결찰 후 루시페라제 유전자 발현이 증가되었다는 것을 나타내고 있다. 상기 허혈성 근육에서의 루시페라제 발현이 결찰 5일 후에 정점에 도달한 반면, 비-결찰된 근육에서의 정점 루시페라제 발현은 대퇴동맥 결찰 10일 후에 검출되었다. 이것은 PPE-1 프로모터의 저산소증 응답이 생체 내 시스템에서 기능적이라는 것을 나타내는 것이다. 비-허혈성 근육에서의 루시페라제 발현은, 수술 되지 않은 대조군 조직 (day=0)에서의 발현과 비교하여, 실험된 기간 수일 동안 변하지 않았다. 반면에, 상기 허혈성 근육에서의 루시페라제 발현은 다른 시간 시점에서보다 5일째에 상당히 높았다.
- [0456] 5일째에, PPE-1에 의해 지시된 루시페라제의 발현은 수술 되지 않은 대조군 마우스보다 및 10 및 18일째의 허혈성 근육에 비하여 2.5 배 더 높았다 (도 51).
- [0457] 국소 허혈증에 속한 형질전환 마우스의 간, 폐 및 대동맥을 포함하는 다른 비-허혈성 조직에서 루시페라제 발현 양상은 허혈성 유도 18일 이내에서는 이러한 조직에서의 루시페라제 발현이 심각하게 변하지 않는다는 것을 알려준다 (도 52).
- [0458] 더욱이, 이러한 결과들은 내피 조직의 비율이 낮은 조직 (간 및 비-허혈성 근육)에서 보다 내피 조직의 비율이 높은 조직 (폐 및 동맥)에서 루시페라제 발현이 더 높다는 것을 확인시켜 준다.
- [0459] 실시예 24
- [0460] 내피세포에서 Ad5PPE-1 Luc 활성화에 대한 세포 증식 수준의 효과
- [0461] Ad5PPE-1 Luc의 효능 및 특이적 활성화에 대한 세포 증식 수준의 효과를 확인하기 위해, 내피세포 (BAEC)의 혈관 신생 모델을 시험관 내 시험하였다. 형질유도된 BAEC를 혈청 고갈에 의해 휴지 상태로 유도하거나 또는 10% FCS에서 배양하여 정상적으로 증식하게 하였다. 간략히, 세포를 48 시간 형질유도하여 휴지상태 세포로-혈청 고갈 72 시간 후 또는 증식하는 세포로-정상적인 배지에서 (10% FCS)-로 만들었다. 루시페라제 활성은 광 unit/ μ g 단백질로서 표시하여 세포 양에서의 차이를 표준화하였다. 제시된 결과들은 4 개의 대표적인 독립 실험으로부터 얻은 삼중 시험의 평균값이다. PPE-1 프로모터 (흰 막대; 도 28) 조절 하의 루시페라제 발현은 휴지 상태 세포에서 보다 정상적인 증식 BAEC에서 4 배 더 높고 및 정상 증식 BAEC에서는 상기 CMV 프로모터 (검은 막대; 도 28)의 조절하의 루시페라제 발현보다 25배 더 높았다. 또한, 증식중인 세포에서, PPE-1 프로모터의 조절하에 있는 활성은 상기 CMV 프로모터 대조군 하의 활성보다 10배 더 높았다.
- [0462] 생체 내 혈관신생 조건을 자극하기 위해서, 40 ng/ml 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)를 첨가함으로써 빠른 증식으로 유도된 BAEC에서 Ad5PPE-1Luc 활성을 시험하였다. 이러한 조건하에서의 활성을 정상적인 증식 세포 및 휴지 상태 세포에서의 활성과, 전술한 바와 같이 비교하였다. VEGF로 세포 증식으로 유도된 BAEC에서의 루시페라제 발현은 정상적인 증식 세포에서보다 44 배 더 높았고 및 휴지 상태 세포에서보다 83배 더 높았다 (도 40).
- [0463] 종합하면, 이러한 실험들은, 상기 PPE-1 프로모터의 전사 조절 하에서 목적 서열의 활성 수준은 세포 증식 수준의 기능을 반영하는 것으로 빠른 증식은 더 높은 수준의 발현을 야기한다는 것을 나타내고 있다.
- [0464] 실시예 25
- [0465] 아테롬성 동맥경화증 유도 마우스에서의 PPE-1 프로모터의 분석

- [0466] 아테롬성 동맥경화성 혈관에서 상기 Ad5PPE-1 벡터의 효능 및 특이성을 시험하기 위해, 10^{10} pfu/ml 의 바이러스 벡터를 6 일령 ApoE 결핍 마우스에 전신적으로 투여하였다 (Plump, A.S. 등 Cell; 1991; 71:343- 353).
- [0467] ApoE 결핍 마우스는 노령화됨에 따라, 이들은 지질이 풍부한 음식을 섭취하지 않고도 고 콜레스테롤 수치 및 대규모 아테롬발생성 플라크를 발전시킨다. 도 43은 수단-IV에 의해 착색된, ApoE 결핍 마우스로부터 절제된 동맥 그림이다
- [0468] 흉부동맥은 아테롬성 동맥경화성 병소의 붉은 부분이 적은 반면 복부 부위는 매우 높게 아테롬성 동맥경화성인 것에 주목하라 (도 43, 125I-HDL 및 125I-BSA에 의한 동맥 아테롬성 동맥경화성 병소의 영상으로부터 도입됨. A. Shaish 등, Pathobiology - Pathobiol 2001;69:225-9).
- [0469] 도 44는 Ad5PPE-1Luc (흰 막대; n=12) 및 Ad5CMVLuc (검은 막대; n=12)를 ApoE 결핍마우스에 전신 투여 5일 후에 관찰된 루시페라제 발현을 요약하고 있다. 결과는 적은 아테롬성 동맥경화성 병소를 포함하는 흉부 면적 및 아테롬성 동맥경화성 병소가 풍부한 복부 동맥에서의 절대 루시페라제 발현으로 제시되어 있다.
- [0470] 상기 PPE-1 프로모터에 의해 조절된 루시페라제 발현은 상기 대조군 CMV 프로모터하의 발현에 비하여, 고도의 아테롬성 동맥경화성 복부에서 6 배 높고, 및 약한 아테롬성 동맥경화성 흉부 동맥에서는 1.6배 높았다.
- [0471] 상기 Ad5PPE-1Luc 주입된 마우스의 두 개 동맥 부위 간에는 심각한 차이가 없는 반면, 병소를 포함하는 복부 동맥에서의 낮은 발현에 비하여, Ad5CMVLuc 주사된 군의 흉부 동맥에서는 더 높은 루시페라제 발현이 관측되었다. 이러한 결과는 구성성 프로모터 (CMV)가 아테롬성 동맥경화증이 심한 부위에서는 단히는 경향을 가지는 반면, 상기 PPE-1 프로모터는 질환 진행에 의해 상대적으로 덜 영향을 받는다는 것을 보여준다.
- [0472] 실시예 26
- [0473] 상처 치유 모델에서의 PPE-1 프로모터의 분석
- [0474] 치유중인 상처 난 혈관에 루시페라제 발현을 지시하는 데 있어서 Ad5PPE-1 작제물의 효율 및 특이적 활성을 시험하기 위해, 상기 재료 및 방법에서 설명한 바와 같이, 쥐의 상처 치유 모델을 사용하였다.
- [0475] 다른 실험에서와 같이, Ad5CMVLuc를 비-조직 특이성 대조군으로서 사용하였다. 상기 PPE-1 프로모터 (도 45; 흰색 막대) 조절 하의 루시페라제 활성은 상기 CMV 대조군 (도 45; 검은 막대)하에서 관찰된 활성과 비교하여 정상 부위 (6.8 ± 3.2) 및 치유중인 상처 부위 (5 ± 1.6) 둘 다에서 더 높았다.
- [0476] 상기 CMV 및 PPE-1 프로모터 둘 다는 치유 중인 상처에 감소된 발현 수준을 나타내기 때문에, 이러한 결과를 해석하기 어렵다. 이러한 예상치 못한 관찰에도 불구하고, 상기 PPE-1 프로모터가 상기 CMV 프로모터보다 정상 및 치유중인 조직 둘 다에서 더 높은 발현 수준을 지시한다는 것은 명백하다. 치유중인 상처에서 양쪽 프로모터들로 관찰된 상기 감소된 발현 수준은 피사성 상처 조직의 존재로 설명될 수 있을 것이다.
- [0477] 실시예 27
- [0478] 허혈성 근육 혈관으로 목표화된 VEGF 및 PDGF-B의 발현
- [0479] 혈관신생의 생체 내 유도는 때때로 내피세포들로 구성되는 원시적 혈관망을 형성하는 결과를 가져온다. 이러한 신생 혈관들은 쉽게 인열되고, 퇴화 및 구멍나기 쉽고 또한 잘 관류되지 않는다. 이러한 한계를 극복하기 위해, 내피세포는 물론 주변내피세포들 (즉, 소 혈관에서의 주변세포 또는 큰 혈관에서의 평활근 세포)을 채용할 수 있는, 다양한 혈관신생적 인자들을 국소적으로, 시기적으로 및 용량-조절적으로 전달하는 것이 요구된다.
- [0480] 상기 개질된 프레프로엔도텔린-1 프로모터, PPE-1-3X를 사용하여 허혈성 사지 근육의 내피세포에서, 분비 개시점을 향하여 평활근 세포를 채용하여, 새롭게 형성된 혈관의 고도의 투과성을 방지하게 하는 내피세포 분비 인자인 VEGF 또는 PDGF-B를 발현하였다. 허혈성 조직에서 VEGF 및 PDGF-B의 발현을 정하기 위해, 인-시츄 하이브리드화를 실시하였다. 도 54A-C에서 나타난 바와 같이, VEGF mRNA의 상당한 발현이 Ad5PPE-1-3XVEGF 처리된 마우스로부터 얻은 허혈성 근육 절편에서 검출될 수 있는 반면, Ad5CMVVEGF 또는 식염수-처리 마우스의 근육 절편에서는 기본적으로 아무런 신호가 보이지 않았다. 유사하게, PDGF-B의 mRNA가 존재하는 것이 Ad5PPE-1-3XPDGF-B로 처리된 마우스의 허혈성 사지 근육에서 검출되었지만, 그러나 Ad5CMVPDGF-B 또는 식염수-처리된 마우스에서는 검출되지 않았다 (도 54E-G). 흥미롭게도, 도 12A 및 12E에서의 신호 패턴은 혈관 구조와 닮았다. 특히, 다양한 처리군으로부터 얻은 대표적인 간 절편은 Ad5CMV 처리 동물에서 VEGF 또는 PDGF-B의 대규모 발현을 보이며 (도 54D 및 54H), 그 반면 Ad5PPE-1- 3X 벡터 처리된 마우스의 간에서는 어떠한 발현도 검출되지 않았다 (테이

터 미도시).

[0481] 종합하면, 상기 분석은 상기 Ad5PPE-1-3X 벡터가 목표 기관에서 혈관신생적 인자를 검출가능한 수준으로 발현하는 것을 매개하지만, 상기 구성성 Ad5CMV 벡터는 거의 배타적으로 간 조직에서만 형질전환 유전자를 발현시켰다.

[0482] 실시예 28

[0483] PPE-매개 VEGF 발현에 의한 향상된 혈관신생

[0484] Ad5PPE-1-3XVEGF의 치료 효과를 이전에 보고된 Ad5CMVVEGF의 것과 비교하였다. 10^9 PFU의 양쪽 치료 벡터는 물론 리포터 벡터 Ad5CMV루시페라제, 및 대조군으로서 동일 부피의 식염수를 마우스에, 대퇴동맥 결찰 5일 후, 전신적으로 투여하였다. 양다리의 중간 지점의 초음파 (US) 영상을 혈관 조영 방식으로 찍었다. 도 38A-D에서 나타난 바와 같이, 결찰 21일 후에, 대조군 동물에서 관류의 신호는 감소되고 절두된다; 그러나, Ad5PPE-1-3XVEGF 및 Ad5CMVVEGF 처리된 마우스 둘 다의 US 영상에서는, 연속되고, 향상된 신호가 나타난다. 21일째 상기 두 VEGF 처리 군에서 관류의 평균 강도는 대조군의 것보다 3 배 더 높고 ($p < 0.01$), 및 상기 동물의 정상적인, 대측 사지로부터 측정된 것과 유사하다 (도 38E). 대퇴동맥 결찰 21일 후 내피세포 특이성 마커인 항 CD-31를 사용하여 행한 면역조직화학 분석으로, Ad5 PPE-1-3XVEGF 처리된 마우스의 허혈성 근육 절편은 평균 $546 \text{ CD31+ cells/mm}^2$ 인 것으로 나타났고, 이는 Ad5CMVVEGF 및 대조군에서 각각 585 및 $485 \text{ CD31+ cells/mm}^2$ 인 것과 대비된다 (도 38F). 이러한 데이터는 Ad5PPE-1-3XVEGF로 단기간 처리한 것은 Ad5CMVVEGF의 강력한 CMV 프로모터로 처리한 것과 동일하게 유효하다는 것을 보여준다. 더욱이, H&E로 염색한 마우스의 간 절편은 간염 또는 다른 병리적 만성 변화의 징후를 보이지 않고 (데이터 미도시), 따라서 간세포에 대한 아데노바이러스 지향성 효과를 제외시킨다.

[0485] 실시예 29

[0486] PPE-조절된 발현에 의한 VEGF 유전자 요법의 연장 효과

[0487] 혈관신생의 유도에 관하여, 친혈관신생 인자의 조직 특이성 발현 대 구성 발현을 조사하였다. 관류 및 혈관신생에 대한, PPE-조절된 및 CMV-조절된 VEGF 발현의 효과를 70일 기간 실험으로 시험하였다. 허혈성 사지를 가진 마우스를 상기와 같이 처리하였다 (참조 실시예 28). US 영상으로, 바이러스 투여 후 1-2 주에서부터 치료 군 양쪽 다 상당한 관류 향상이 있음이 나타났으나, 대조군에서는 미미한 변화가 검출되었다 (데이터 미도시). 상기 Ad5PPE-1-3XVEGF 처리의 장기 효과는 대퇴동맥 결찰 50 및 60일 후에 검출되었다. 관류는, Ad5CMVVEGF 또는 식염수-처리 마우스에 비하여, Ad5PPE-1-3XVEGF 처리 마우스에서 상당히 증가하였다. Ad5CMVVEGF 및 대조군 처리 동물 간의 관류에서의 차이는 상기 시간 기간에 걸쳐 감소되었다. 50 일째 날에, Ad5PPE-1-3XVEGF 처리 군에서 관류의 평균 강도는 Ad5CMVVEGF 또는 식염수 처리 마우스에서보다 약 50% 더 높았고, 대측 정상 사지의 것과 유사하였다 ($p < 0.01$, 도 55A). 70일째에 동물을 처형시, Ad5PPE-1-3XVEGF 처리 마우스의 근육 절편에서의 모세혈관 밀도는 $747 \text{ CD31+ cells/mm}^2$ 이었고, 이는 상기 Ad5CMVVEGF 군 ($474 \text{ CD31+ cells/mm}^2$) 및 대조군 ($342 \text{ CD31+ cells/mm}^2$) 보다 각각 57% 및 117% 더 높았다 ($p < 0.01$, 도 55B).

[0488] 실시예 30

[0489] PPE-프로모터 내피세포-특이성 PDGF-B 발현에 의한 혈관신생 향상

[0490] PDGF-B는 파라크린 내피세포 분비 인자로서, 평활근 세포를 모아서 혈관 성숙화 및 대개는 또한 혈관신생에 연루되는 것으로 나타나고 있다 [Edelberg, J.M. 등 Circulation 105, 608-13. (2002); Hsu 등 JCe// Physiol 165, 239-45. (1995); Koyama, N. 등 JCe// Physiol 158, 1-6. (1994)]. It has also been shown that PDGF-B가 협착에 [Sano, H. 등 Circulation 103, 2955-60. (2001); Kaiser, M., 등 Arthritis Rheum 41, 623-33. (1998)] 및 섬유아세포 증식에 [Nesbit, M. 등 Lab Invest 81, 1263-74. (2001); Kim, WJ. 등 Invest Ophthalmol Vis Sci 40, 1364-72. (1999).] 연루되어 있다고 알려져 있다. 내피세포 특이성 조절하에서 혈관신생을 유도하는 PDGF-B의 능력을 시험관 내 및 생체 내 시험하였다.

[0491] Ad5PPE-1-3XPDGF-B 벡터는 Ad5PPE-1-3XVEGF와 같이, 시험관 내 내피세포에서 혈관신생 변화를 유도하였다 (데이터 미도시). 피브린 코팅된 배양용기에서 배양된 내피세포를 10 MOI 의 Ad5PPE-1-3XPDGF-B로 형질유도하면, 이차원적 원형 구조물의 생성 및 피브린 분해가 나타났다. 시험관 내 효과에 대해서는, 마이스를, 대퇴동맥 결찰

5일 후 10 PFU의 Ad5PPE-1-3XPDGF-B로 전신 처치하였다. 결찰 30일 후, 상기 Ad5PPE-1-3XPDGF-B 처리 마우스에서의 관류의 평균 강도는 대조군에서보다 약 90% 더 높았다 (도 56A). 관류 80일 후, Ad5PPE-1-3XPDGF-B 처리군에서의 관류의 평균 강도는 대조군에서 보다 60% 더 높았다 (도 56B).

[0492] 결찰 35 및 90일 후에, 모세혈관 밀도를 측정하였다. 단기간에서, 상기 Ad5PPE-1-3XPDGF-B 처리 마우스의 허혈성 근육 절편에서의 평균 모세혈관 밀도는 516 CD31+ cells/mm²이고, 식염수-처리군에서는, 439로 나타났다 (도 56C). 결찰 90일 후, Ad5PPE-1-3XPDGF-B 처리 마우스에서의 평균 모세관 밀도는 566 CD31+ cells/mm²로 약간 증가한 반면 대조군에서는 중간 정도 감소가 나타났다 (378 CD31+ cells/mm², 도 56D).

[0493] 이러한 결과는, Ad5PPE-1-3XPDGF-B 벡터 자체는 강력한 혈관신생 치료로써, 투여 후 단기간에 혈관신생을 유도할 뿐 아니라, 오랜 기간 동안 치료 효과를 보유했을 수 있다는 것을 나타내고 있다. Ad5PPE-1-3XPDGF-B로 처리된 마우스의 간에서 어떠한 만성적 변화도 검출되지 않았다.

[0494] 실시예 31

[0495] 내피세포에서 PDGF-B 발현에 의한 혈관 성숙

[0496] 혈관신생의 향상 및 혈관 구조물의 성숙은 VEGF 및 PDGF-B 둘 다를 조합 요법에 이용함으로써 성취될 수 있다는 가정을 두 가지 치료 양상을 이용하여 시험하였다: (i) 10⁹ PFU의 Ad5PPE-1-3XVEGF 및 Ad5PPE-1-3XPDGF-B의 단일 투여; (ii) Ad5PPE-1-3XVEGF 투여 5일 후 유사 용량의 Ad5PPE-1-3XPDGF-B 투여. 두 양상은 동일한 결과를 산출하였고 따라서, 하나로써 지칭된다. 결찰 90일 후, 상기 조합 요법 및 상기 Ad5PPE-1-3XVEGF 처리 마우스 둘 다는 대조군, Ad5PPE-1-3XGFP 처리 마우스에 비하여, 상당히 더 높은 말초혈관 밀도를 보였으나, 상기 다양한 치료군 가운데서 유의한 차이는 없었다 (도 57B). 그러나, 조합 요법 군에서 US 영상에서의 관류의 평균 강도는 상기 Ad5PPE-1-3XVEGF 처리된 군보다 최대 42% 더 높았다 (도 57A). 이것은 상기 조합 요법 군 및 Ad5PPE-1-3XPDGF-B 처리 마우스의 허혈성 근육에서 작은 혈관이 성숙됨에 의해 설명될 수 있다. 혈관 평활근 세포에 대한 상당한 염색이 상기 조합요법 또는 Ad5PPE-1-3XPDGF-B로 처리된 마우스로부터 얻은, α-SM액틴에 대하여 면역염색된 마우스 절편에서 나타나 있다 (도 57C-D). 열은 염색이 대조군 및 Ad5PPE-1-3XVEGF 처리된 마우스에서 나타날 수 있다 (도 57E-F). 상기 정상 사지 근육에서, 더 큰 소 동맥 및 소 정맥 주위에 현저한 염색이 있다 (도 57G). 결찰 후 35일만큼 빠르게, Ad5PPE-1-3XPDGF-B로 처리된 마우스에서 유사한 결과가 얻어졌다 (데이터 미도시). 결찰 35일 후, 처치된 마우스의 간 절편에서 어떠한 만성 변화도 나타나지 않았다. 이러한 결과들은 별개 실험에서 더욱 구체화되었고, 이는 결찰 50일 후, 혈액 관류에 대하여 PDGF-B 단독 및 조합 요법의 효과를 강조하는 것이다. 도 58에 나타난 바와 같이, 결찰 50일 후에, 조합 요법 군에서 혈액 관류 세기는 완전히 정상 사지의 것과 닮았다. 이러한 효과는, 양쪽 성장 인자의 구성성 발현 (CMV 프로모터)이 오로지 절반 관류 능력을 결과함에 따라서, PPE-3X에 의존성이다. 흥미롭게는, PDGF-B 단독의 PPE-3X 의존성 발현은, 상기 조합 요법에 의해 유도된 바와 같이, 거의 동일한 관류 (예, 77 %)를 매개할 수 있었다. 그러나, 그러한 결과들은 구성 프로모터를 사용하였을 때 나타나지 않았다.

[0497] 이러한 결과들은, 상기 PPE-1-3X 프로모터가, 전신 투여에도 불구하고 혈관신생적 내피세포에서 선호되는 발현을 저하시키지 않고, 치료 유전자를 충분히 강하게 활성화시킬 수 있다 것을 확인시킨다. 더구나, 이러한 결과들은 VEGF와 같은, 잘 확립된 혈관신생 성장 인자를 더 첨가하지 않고, 그 혈관신생 작용을 매개할 수 있는 친-혈관신생 인자로서 PDGF-B를 구체화한다.

[0498] 실시예 32

[0499] AdPPE-1(Sx)-TK 벡터의 제작 및 특성화

[0500] 상기 HSV-TK/GCV는 가장 광범위하게 연구되고 실행된 종양감축성 유전자-약물 조합이다. HSV-TK-포함 플라스미드로 형질감염된 또는 HSV-TK을 포함하는 벡터로 형질유도된 세포를, 어싸이클로비르, 겐싸이클로비르 (GCV), 발싸이클로비르 및 판싸이클로비르를 포함하는 약물의 거대군에 민감하도록 만든다. 구아노신 유사체 GCV는 TK와 조합할 때 가장 활성적인 약물이다. HSV-TK 양성 세포는 바이러스성 TK를 생성하고 이는 GCV를 GCV 모노포스페이트 (GCV-MP)로 인산화시키는 데 있어서, 인간 TK보다 10³ 배 더 효율적이다. GCV-MP는 후속적으로 천연 티미딘 키나제에 의해 GCV 다이포스페이트로 및 최종적으로 GCV 트리포스페이트 (GCV-TP)로 인산화된다.

[0501] 처음에는, 두 개 플라스미드를 준비하였다. 하나의 플라스미드는 개질된 쥐의 프레-프로엔도텔린-1 (PPE-13x) 프로모터에 의해 조절된 HSV-TK 유전자를 함유하며 및 상기 PPE-1 (3x) 프로모터에 의해 조절된 유전자의 효능

을 시험관 내 시험하기 위해 제조하였다. 상기 PPE-1(3x) 프로모터에 의해 조절되는 HSV-TK 유전자는 물론 아데노바이러스성 서열을 포함하는 더 큰 플라스미드를 동종 재조합에 의해 바이러스 벡터 제조용으로 제조하였다. 상기 HSV-TK 유전자(1190 bp)는 4348 bp 플라스미드 pORF-HSVITK를 두 개 제한 효소로 처리하여 수득하였다. SalI 제한효소 장소는 상기 HSV-TK 유전자의 5' 말단에 대하여 위치하고 EcoRI 장소는 3' 말단에 대하여 위치한다. 상기 HSV-TK 유전자를, 삽입되는 유전자의 상류에 (상기 HSV-TK 유전자의 3' 말단에 대하여) NotI 제한효소 장소를 포함하는 3400 bp 플라스미드 pBluescript-SK의 다중 클로닝 장소에 결합하였다. 상기 SalI 장소는 클레나우 처리하였고 NotI 링커를 상기 HSV-TK 유전자의 5' 말단에 결합하였다.

- [0502] 상기 HSV-TK 유전자 (지금은 두 개의 NotI 제한효소 장소에 의해 포위된)를, 전술한 두 개의 플라스미드, pEL8(3x)-Luc 및 pACPPE-1(3x)-GFP의 NotI 제한효소 장소에 결합하였다:
- [0503] 1. The designated, instead of the 상기 1842 bp 루시페라제 유전자 대신, pEL8(3x)-Luc로 지칭되는 8600 bp 플라스미드는 두 개의 NotI 제한효소 장소가 측면에 위치한다. 상기 pEL8(3x)-TK 플라스미드는 상기 PPE-1 (3x) 프로모터, 상기 HSV-TK 유전자, SV-40 폴리-아데닐화 장소 및 쥐의 엔도텔린-1 유전자의 첫 번째 인트론을 포함한다 (도 60a).
- [0504] 2. 1242 bp 녹색 형광 단백질 (GFP) 유전자 대신, 11946 bp 플라스미드 pACPPE-1(3x)-GFP, 두 개의 NotI 제한효소 장소에 둘러싸임 (도 60b).
- [0505] 개질된 쥐의 프레-프로엔도텔린-1 프로모터에 의해 조절된 HSV-TK 유전자를 구비한 아데노바이러스-5 벡터의 구축. AdPPE-1 (3x)-TK로 명명된 복제-결핍 벡터를 제 1 세대 (E1 유전자 삭제, E3 불완전) 아데노바이러스-5 벡터에 근거하여 제작하였다. 상기 재조합 벡터는 공지된 통상적인 클로닝 기술을 사용하여 인간 배아 신장-293 (HEK-293)에 플라스미드 pACPPE-1(3x)-TK 및 pJM- 17 (40.3 kb)를 공동 감염시켰다. 상기 pJM-17 플라스미드는 E1 유전자를 제외한 전체 아데노바이러스-5 게놈을 포함한다. 상기 HEK-293 세포주는 상기 E1 탈락물을 대신하는데, 그것들은 E1 유전자를 트랜스로 포함하기 때문이다. 40 개 동종 재조합물들 중 하나가 벡터 AdPPE-1 (3x)-TK를 유도하였다.
- [0506] AdPPE-1 (3x)-TK 벡터 특성화.
- [0507] 상기 바이러스 DNA 상에서 PCR 분석을 실시하여 상기 재조합 아데노바이러스에서 상기 TK 형질전환 유전자 및 프로모터의 존재를 증명하였다. 두 개 프라이머를 사용하였다: 순방향 프라이머 5'- ctcttgattcttgaactctg-3' (455-474 bp, 상기 프레-프로엔도텔린 프로모터 서열 내)(서열번호 9) 및 역방향 프라이머 5'- taaggcatgcccattgttat-3' (1065-1084 bp, 상기 HSV-TK 유전자 서열 내)(서열번호 10). 본 발명자들의 연구실에서 생성된, 벡터의 다른 프라이머들을 사용하여 상기 벡터의 순도를 확인하였다. 약 1 kb의 밴드가 상기 AdPPE-1 (3x)-TK 바이러스 내에서 상기 PPE-1(3x) 프로모터 및 상기 HSV-TK 유전자의 존재를 증명하였다 (도 61). 그러나, 제작된 아데노바이러스 벡터의 다른 프라이머의 어느 것도 생성물을 허용하지 않았다. 따라서 상기 벡터는 순수한 콜로니였다.
- [0508] 상기 바이러스를 HEK-293 세포에서 더 정제하여 단일 바이러스 클론을 분리하였다.
- [0509] AdPPE-1(3x)-TK의 바이러스 DNA를 UV광 하에서는 형광을 내도록 화학적으로 개질된 디데옥시 뉴클레오타이드의 존재하에서 사이클 시퀀싱 반응에 의해 서열분석하였다. 4 개 프라이머를 사용하여 전체 형질전환 유전자의 존재를 증명하였다:
- [0510] 1. 순방향 프라이머 5'-ctcttgattcttgaactctg-3' (455-474 bp, 프레-프로엔도텔린 프로모터 내) (서열번호 9), 상기 "3x" 요소에 선행.
- [0511] 2. 역방향 프라이머 5'-gcagggctaagaaaaagaaa-3' (551-570 bp, 프레-프로엔도텔린 프로모터 내) (서열번호 11).
- [0512] 3. 순방향 프라이머 5'-tttctttttcttagccctgc-3' (551-570 bp 프레-프로엔도텔린 프로모터내)(서열번호 12).
- [0513] 4. 역방향 프라이머 5'-taaggcatgcccattgttat-3' (1065-1084, HSV-TK 유전자 내)(서열번호 10) 상기 HSV-TK 유전자 내.
- [0514] 프라이머 1 (서열번호 9) 및 3 (서열번호 10) 단독으로는 생성물을 얻지 못했기 때문에, 프라이머 2 (서열번호 11) 및 3 (서열번호 12)을 사용하였다. 결과물은 생쥐 (Mus musculus) Balb/c 프레-프로엔도텔린-1 유전자, 프로모터 부위 gi|560542|gb|U07982.1|MMU07982[560542] (서열번호 1)와 99% 동일성은 물론, 헤르페스 심플렉스

바이러스의 티미딘 키나제 유전자 gi|59974|emb|V00470.1|HERPES[59974]와 99.4% 동일성을 보였다. AdPPE-1(3X)의 서열은 도 92에 상세 기재되어 있다.

[0515] 상기 3x 서열은 (도 93) 내피세포 특이성 양성 전사 요소의 추가의 삼중 반복체를 포함한다. 이러한 145 bp 서열에는, 전술한 바와 같이, 두 개의 완전한 내피세포 특이성 양성 전사 요소 및 반대 순서로 두 개 단편물로 나누는 한 개 서열이 있다.

[0516] 대조군 벡터류. 두 개 아데노바이러스 벡터, 즉 상기 PPE-1(3x) 프로모터가 결합된 하나, 및 상기 Luc 유전자가 결합된 다른 하나를, 상기 AdPPE-1(3 X) 벡터에 대한 대조물로서 사용하기 위해 제조하였다. 상기 벡터 AdCMV-TK (비 세포 특이성 프로모터 대조물로서 사용)는 초기 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터에 의해 조절되는 HSV-TK 유전자를 포함한다 (도 62c). 상기 벡터 AdPPE-1 (3 x)-Luc는 상기 개질된 쥐의 프레-프로엔도텔린-1 프로모터에 의해 조절되는 루시페라제 (Luc) 유전자를 포함한다 (도 62b). 상기 바이러스를 규모가 증가된 일회성 방식으로 배양하고 -20℃에서 10^9 - 10^{12} 입자/ml의 농도로 보관하였다.

[0517] 실시예 33

[0518] 상기 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하의 겐사이클로비르 및 TK의 세포독성: 시험관 내 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하 TK의 탁월한 내피세포 세포독성

[0519] AdPPE-1(3x)-TK의 특이성 내피세포-목표화 세포독성을 대조군 벡터들 AdCMV-TK 및 AdPPE-1 (3x)-Luc와 비교함으로써 내피세포 주에서 시험관 내 분석하였다.

[0520] AdPPE-1 (3x)-TK+GCV는 낮은 moi에서 세포독성이다: 소 동맥 내피세포 (BAECs)를 AdPPE-1 (3x)-TK, AdCMV-TK 및 AdPPE-1 (3 x)-Luc로 0.1, 1, 10, 100, 및 1000의 moi에서 형질유도시켰다. GCV (1 µg/ml)를 형질유도 4 시간 후에 첨가하였다. 대조군은 GCV없는 벡터 또는 벡터 없는 GCV로 형질유도시켰다. 두 가지 대조군 다 세포사를 유발하지는 않았다 (데이터 미도시). AdCMV-TK보다 상당히 더 적은 m.o.i.에서 AdPPE-1 (3x) + GCV-처리 세포에 일어난 세포독성에 특징적인 형태 변화 (세포 증대, 연장 및 팽창) 및 유착성 상실에 주목. AdPPE-1 (3x)-Luc로 형질전환된 세포는 건강하게 남아있었다 (작은 크기, 호상화(rounded) 및 유착성, 도 63). 크리스탈 바이올렛의 염색으로 결정된 (도 64), 세포 활성을 평가하면, 상기 AdPPE-1 (3 x)-TK 벡터는, GCV 투여와 조합될 때, BAEC 세포에서 강력한 구성성 CMV 프로모터에 의해 조절되는 TK 유전자보다 더 낮은 m.o.i.에서 더 큰 세포독성을 보인다는 것을 확증하였다.

[0521] AdPPE-1 (3x)-TK+GCV는 저농도 GCV에서 세포독성이다: 소 동맥 내피세포 (BAECs)를 전술한 바와 같이, AdPPE-1 (3x)-TK, AdCMV-TK 및 AdPPE-1 (3x)-Luc로 10의 m.o.i. 에서 형질유도하고 하고, 증가농도의 GCV (0.001-10 µg/ml, 지시되는 바)에 노출하고, 형질유도 4 시간 후 첨가하였다. GCV 없는 벡터로 형질유도되거나 또는 벡터 없는 GCV를 수납한 대조군 세포는 어떠한 농도에서도 세포사의 징후를 보이지 않았다 (데이터 미도시). AdCMV-TK (중간 시리즈)에 노출된 세포보다 상당히 더 적은 GCV 농도에서 AdPPE-1 (3x) + GCV-처리 세포(도 65)에 일어난 세포독성에 특징적인 형태 변화 (세포 증대, 연장 및 팽창) 및 유착성 상실에 주목. 크리스탈 바이올렛의 염색으로 결정된 (도 66), 세포 활성을 평가하면, 상기 AdPPE-1(3x)-TK 벡터는, GCV 투여와 조합될 때, BAEC 세포에서 강력한 구성성 CMV 프로모터에 의해 조절되는 TK 유전자보다 더 낮은 GCV 농도에서 더 큰 세포독성을 보인다는 것을 확증하였다.

[0522] AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 세포독성은 내피세포에 특이적이다: 내피세포에 대한 상기 벡터 AdPPE-1(3x)-TK의 특이성 및 효능을 평가하기 위해, 내피 세포 [소 동맥 내피세포 (BAEC), 인간 제대 정맥 내피세포 (HUVEC)] 및 비-내피 세포 [인간 간암종 세포 (HepG-2), 인간 정상 피부 섬유아세포 (NSF)]를 10 m.o.i.에서 AdPPE-1(3x)-TK, AdPPE-1 (3x)-Luc 또는 AdCMV-TK로 형질전환하고, 형질전환 4 시간 후 1 µg/ml GCV를 투여하였다. 형질유도 4일 후 세포독성 및 세포 형태 변화가 검출되었다. AdPPE-1(3x)-TK + GCV는 특히 BAEC 및 HUVEC에서 세포독성을 유도하였고, AdCMV-TK + GCV는 오로지 HepG-2에서 세포독성을 유도하였다. NSF는 m.o.i. = 10에서 모든 벡터에 안정적이었다. AdPPE-1(3x)-Luc + GCV는 모든 세포 유형에 비독성이었다 (도 67). 크리스탈 바이올렛 염색으로(도 68) 결정된 세포 활성을 평가하면, GCV 투여와 조합할 때 AdPPE-1 (3 x)-TK 벡터는 강력한 구성성 CMV 프로모터에 의해 조절되는 TK 유전자 (AdCMV-TK + GCV)의 비-특이성 세포독성과 비교하여, 상승된 내피세포-특이성을 보인다는 것을 확증하였다. 비내피세포 NSF를 100의 높은 m.o.i. 에서 AdPPE-1 (3 x)-TK, AdPPE-1(3x)-Luc 또는 AdCMV-TK로 형질유도하고, 형질유도 4 시간 후 1 µg/ml GCV를 투여했을 때, 세포 형태에 대하여 AdPPE-1(3x)-TK+GCV의 어떠한 효과도 관찰되지 않았다 (도 69). 대조적으로, 강력한 구성성 CMV 프로모터 (AdCMV-TK+GCV)의 조절하 TK로 처리된 세포는 강력한 비특이성 세포독성을 나타냈고, 이는 극단적인 m.o.i.에서도 PPE-1 (3x) 프

로모터의 조절 하에서 및 겐사이클로비르 투여에서 TK가 내피세포에 선택적으로 세포독성을 나타낸다는 것을 확인하는 것이다.

- [0523] 종합하면, 이러한 결과들은, 상기 벡터 AdPPE-1(3x)-TK가 인간 내피세포를 포함한 내피세포의 살해를 특이적으로 유도할 수 있다는 것을 처음으로 보여준다. 더욱이, 상기 벡터 AdPPE-1 (3x)-TK는 전구약물 GCV에 의해 온전히 조절되고 및 상대적으로 낮은 GCV 농도에서 완전히 활성적이다. 최종적으로, 비록 상기 아데노바이러스 벡터의 내피세포 형질유도 효능은 상대적으로 낮더라도, 내피세포 살해는 매우 효과적이다.
- [0524] 실시예 34
- [0525] 겐사이클로비르의 투여 및 PPE-1 (3x) 프로모터 조절하 TK의 치료 효과: PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 생체 내 탁월한 내피세포 세포독성
- [0526] AdPPE-1(3x)-TK의 특이적 내피세포-목표화 세포독성의 치료 효능을, 암종양 발생 및 전이 성장의 동물 모델에서 GCV 및 대조군 벡터 AdCMV-TK 및 AdPPE-1(3x)-Luc의 전신 투여와 비교함으로써 생체 내 평가하였다.
- [0527] PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 생체 내 발현 및 겐사이클로비르 (GCV) 투여에 의한 루이스 폐암 (LLC)에서의 전이성 성장의 상승적 억제: 루이스 폐암은 높은 전이 잠재성을 지닌 매우 공격적이고 악성 암의 잘 특성화된 동물 모델이다. 사이토카인 IL-2 (Kwong et al , Chest 119;112:1332-37)를, 상기 내피세포 프로모터 Tie/Tek 및 GCV (dePalma 등, Nat Med 2003;9:789-795)와 및 상기 VEGF 프로모터 및 GCV(Koshikawa et al Cane Res 2000;60:2936-41)와 시험관에서 사용하여 HSV-TK와의 조합 요법을 실시하였다. 전이성 질환에 대한 AdPPE-1 (3x) 및 GCV의 전신 투여의 효과를 시험하기 위해, 좌측 발에 종양 세포를 접종하고 일차 종양이 형성되자 마자 발을 절제하여 LLC 폐 전이를 유도하였다. 아데노바이러스 벡터들 [AdPPE-1(3x)-TK + GCV; AdCMV-TK + GCV; GCV없는 AdPPE-1(3x)-TK]를 일차 종양 제거 5일 후 정맥 내로 투여하고, 14일간 매일 GCV를 복막 내로 투여하였다.
- [0528] 마우스 배제는 다음과 같았다: 22 마리 마우스는 일차 종양이 생성되지 않았기 때문에 배제되었고, 한 마리는 벡터 주사 실패로 인하여, 8 마리는 폐 전이의 어떠한 흔적도 없이 죽었다. 배제된 마우스 중에, 18 마리는 명부 등재 전에 제외되었고, 6 마리는 그룹 1 (AdPPE-1 (3 x)-TK + GCV)으로부터, 2 마리는 그룹 2(AdCMV-TK + GCV)로부터, 3마리는 그룹 3 (AdPPE-1 (3 x)-TK, GCV 부재) 및 2 마리는 그룹 4 (식염수+GCV)로부터 배제되었다. 벡터 주사후 24일 째에 마우스를 처형하였다. 그 날에 대조군 (식염수 + GCV 및 AdPPE-1(3 x)-TK, GCV 부재)의 마우스들의 25%가 폐 전이 확산으로 인해 죽었다. 도 70는 처리 및 대조군으로부터 얻은 폐 조직을 도면으로서, AdCMV-TK + GCV, GCV 없는 AdPPE-1 (3x)-TK 및 아데노바이러스 없는 GCV로 치료된 마우스로부터 얻은 것에 대비하여, AdPPE-1 (3x) -TK+ GCV 처리 마우스의 폐에서 상당히 감소된 정도의 전이성 확산을 보여준다.
- [0529] 처형시, AdPPE-1 (3x)-TK + GCV로 처리된 마우스의 전이물의 평균 중량 (전이성 질환의 정도를 표식)은 GCV 없는 AdPPE-1 (3x)-TK로 처리된 마우스의 것보다 3.3 배 낮았다 (평균±표준오차 0.3g±0.04 vs. 0.8g±0.2, 각각; p<0.05). AdCMV-TK + GCV 또는 식염수 + GCV로 처리된 마우스의 전이물의 평균 중량은 다른 군의 것과 통계적으로 다르지 않았다 (도 71).
- [0530] 전이성 폐 조직에 대한, PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 생체 내 발현 및 겐사이클로비르 (GCV)의 세포독성 효과: LLC 전이 성장에 대한 AdPPE-1 (3x) 및 GCV 투여의 효과를 조사하기 위해, 전이성 폐로부터 얻은 폐 조직 상에 헤마톡실린 및 에오신 염색을 실시하였다 (도 72a-72c). GCV 없는 AdPPE-1 (3x)-TK 또는 식염수 + GCV로 처리된 마우스로부터 얻은 폐 전이물에서 약한 주변성 괴사가 검출되었다 (도 72a). AdPPE-1(3x)-TK + GCV로 처리된 마우스로부터 얻은 폐 조직은 기포 및 기관지 주위 단핵구 침윤을 나타내나 GCV 없는 AdPPE-1 (3 x)-TK 또는 식염수 + GCV로 처리된 마우스로부터 얻은 폐에서는 아무런 침윤도 검출되지 않았다. AdPPE-1(3x)-TK + GCV로 처리된 마우스로부터 얻은 폐 전이물은, GCV 없는 AdPPE-1 (3x)-TK 또는 식염수 + GCV (도 72b,c)로 처리된 마우스로부터 얻은 전이물에 비하여, 일 무리의 단핵구 침윤을 보였다. AdCMV-TK + GCV로 처리된 마우스로부터 얻은 샘플에서 최소의 괴사 및 단핵구 침윤이 또한 검출되었다. 이러한 결과는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV가 폐 전이물에서 중앙 괴사 및 단핵구 침윤 증가를 유도한다는 것을 의미한다.
- [0531] LLC 폐 전이물에 대하여 AdPPE-1(3x)-TK + GCV의 저해 효과에 관련되는 세포사의 특성을 규명하기 위해, TUNEL 및 항-카스파제-3 염색을 폐 조직 상에서 실시하여 세포사멸을 평가하였다. AdPPE-1(3x)-TK + GCV 처리된 마우스로부터 얻은 폐 전이물은 GCV 없는 AdPPE-1 (3x)-TK 또는 식염수 + GCV로 처리된 마우스와 비교하여, 수 많은 중앙 세포를 가졌다 (도 73a 및 73b). AdPPE-1 (3x)-TK + GCV로 처리된 마우스의 폐로부터 얻은 시편을 조직병

리 검사한 결과, AdCMV-TK + GCV로 처리된 마우스로부터 얻은 시편보다 DNA 손상 (TUNEL, 도 73a) 및 카스파제-3 (도 73b) 둘 다 상당히 더 높은 수준으로 나타났고 이는 중앙 세포 세포사멸을 가르키는 것이다. 더 심각하게는, 전이성 폐로부터 얻은 조직병리 절편을 TUNEL 및 카스파제-3 염색하면, AdPPE-1(3x)-TK+GCV로 정맥내 처리된 마우스로부터 얻은 폐 전이물의 혈관 (내피) 부위에서 증가된 세포사멸이 나타났고 (도 74), 이는 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 생체 내 발현 및 겐사이클로비르 (GCV) 투여에 의한 전이성 세포의 세포사멸을 상승적으로 증가시켰다는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV의 전신적 투여가 대규모 중앙 세포 사멸을 유도한다는 것을 의미한다. 더구나, 혈관신생적 내피세포 세포사멸은 대규모 중앙 괴사 및 세포사멸의 대한 기작일 수 있다.

[0532] PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 발현 및 겐사이클로비르 (GCV) 투여는 전이성 질환에 있어서 생체 내 항-혈관신생 효과를 가진다: CD-31은 혈관신생의 독특한 내피세포 마커이다. 항 CD-31 염색을 전이성 폐 조직 상에서 실시하여 전신적 AdPPE-1(3x)+GCV의 항-전이성 효과에서 내피세포의 참여를 규명하였다. 도 75a-75d는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV 처리된 마우스로부터 얻은 폐 전이물에서의 혈관신생적 혈관이 연속되거나 분지되지 않고 불명확한 경계를 가진 짧은 혈관이라는 것을 나타낸다 (도 75a-75c). GCV 없는 AdPPE-1 (3x)-TK 또는 식염수 + GCV로 처리된 마우스로부터 얻은 폐 전이물의 혈관신생적 혈관은 수없이 분지되고 명확한 경계를 가진 긴 혈관이라는 것을 보여준다 (도 75a). 비록 AdPPE-1(3x)-TK로 처리된 마우스의 것보다 훨씬 더 작더라도 (미도시), AdCMV-TK + GCV 처리된 mice의 폐 전이물에서 검출된 맥관구조물은 최소한도로 비정상적이라는 것이 나타난다. 증식하는 내피 조직에 대한 이러한 항-혈관신생적 효과의 특이성은 간 혈관에 대한 효과가 부재함으로 명확해진다 (도 75c). 컴퓨터 기반 혈관 밀도 측정된 결과 (Image Pro-Plus, Media Cybernetics Incorporated), AdPPE-1 (3 x)-TK + GCV 군이 GCV 없는 AdPPE-1(3x)-TK으로 처리된 군보다 폐 전이물의 혈관 밀도가 1.5 배 더 적다는 것이 나타났다 ($40107.7 \mu\text{m}^2$ 대 $61622.6 \mu\text{m}^2$, 각각) (도 75d).

[0533] 종합하면, 이러한 결과들은 AdPPE-1(3x)-TK + GCV의 전신 투여는 혈관신생적 내피세포 세포사멸의 높은 선택을 통해 중앙 전이성 괴사 및 세포사멸을 유도한다는 것을 나타낸다.

[0534] **AdCMV-TK + GCV의 전신 투여는 LLC 폐 전이를 가지는 마우스에서 간독성을 유발한다.** 아테노바이러스 벡터들의 전신 투여의 주요 부작용 중의 하나는 간 독성이기 때문에, 유도된 LLC 종양을 가진 C57BI/6 마우스에서 간 형태를 분석하였다. 처리된 및 대조군 간 조직의 Analysis of 헤마톡실린 및 에오신 염색 부분을 분석한 결과, 구성적 프로모터 AdCMV-TK의 조절하의 TK + GCV로 처리된 마우스로부터 얻은 간이 문맥 및 문맥 주변 단핵구 침윤과 작은 응집성 괴사 부위를 보이는 반면, AdPPE-1 (3x)-TK+GCV로 처리된 마우스 및 대조군은 최소한의 침윤 및 간세포 핵 증대만을 보일 뿐이라는 것이 나타났다 (도 76). 이러한 결과들은 상기 CMV 프로모터의 조절하 TK의 구성적 발현이 명백히 간독성인 반면, 혈관신생-특이성 AdPPE-1(3x)-TK+GCV 처리로는 간 형태 상에 어떠한 해로운 부작용을 나타내지 않는다는 것을 증거하고 있다.

[0535] **생체 내 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 발현의 엄격한 기관 특이성:** 상기 PPE-1(3x) 프로모터의 조절하 HSV-TK 발현에 대하여 상기 항-전이성 효과의 기관- 및 조직 특이성 정도를 규명하기 위해, 아테노바이러스 벡터로 처리된 LLC 폐 전이를 가진 마우스의 상이한 기관으로부터 얻은 여러가지 조직 상에서 HSV-TK 및 α -액틴 프라이머를 사용하여 PCR을 실시하였다.

[0536] 9 마리의 15 주령 C57BL/6 수컷 마우스를 사용하였다. 좌측 발에 중앙 세포를 접종시키고 일차 종양이 형성되자 다리를 절제하여 LLC 폐 전이를 유도하였다. 일차 종양 제거 14일 후, 아테노바이러스 벡터 (AdPPE-1 (3x)-TK 및 AdCMV-TK) 또는 식염수를 정맥내 주사하였다. 벡터 주사 6일 후, 마우스를 처형하고, 설명한 바와 같이, RNA를 수집된 기관으로부터 추출하였다. RNA 상에 역전사-PCR을 실시한 후, HSV-TK 및 α -액틴 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. AdPPE-1 (3x)-TK로 처리된 마우스의 폐에서 양성 HSV-TK 발현이 검출되었지만, 간에서는 아무런 HSV-TK 발현이 나오지 않았다. 대비적으로, AdCMV-TK로 처리된 마우스의 간에서 매우 높은 HSV-TK 발현이 나타났고 및 폐에서는 아무런 발현도 나타나지 않았다 (도 77). α -액틴에 대하여 교정된, 컴퓨터 기반 밀도계 (Optiquant, Packard-Instruments)를 사용하여 AdPPE-1(3x)-TK 처리된 마우스에서는 11.3의 폐/간 발현 비율이 나타났고, AdCMV-TK 처리된 마우스에서는 5.8의 간/폐 발현비율로 측정하였다.

[0537] 이러한 결과들은 AdPPE-1 (3x)-TK 처리 마우스가 주로 풍부한 혈관신생기관, 즉 전이성 폐에서 HSV-TK 유전자를 발현시키는 반면, 상기 CMV 프로모터 하의 TK 발현은 (AdCMV-TK 처리된 마우스) 간과 같은 풍부한 콕사키 (Coxsackie) 아테노바이러스 수용체 기관에 주로 나타난다는 것을 알려준다 (도 77). 강한 양성적 HSV-TK 발현이 또한 AdPPE-1(3x)-TK 처리된 마우스의 고환에서 검출되었다. 단일 가정에 의해 제한되지 않는다는 소망을 가지고, 상기 AdPPE-1(3x)-TK 처리된 마우스에서의 양성적 발현은 성선 (gonad)에서 엔도텔린 프로모터가 높게

발현된다는 것으로 설명될 수 있다는 것이 이해될 것이다. AdCMV-TK 처리 마우스에서 양성적 발현은, 매우 높은 α -액틴 밴드에 의해 반영되는 바와 같이, 상대적으로 높은 RNA 용출로 설명된다.

[0538] 종합하면, 이러한 결과들은, AdPPE-1(3x)-TK + GCV의 전신 투여가 매우 공격적인 암의 전이 확산을, 중앙 전이성 괴사의 유도 및 혈관신생적 내피세포 세포사멸의 선택적 유도를 통해, 안전하고 조직 특이적 방식으로 효과적으로 저해할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0539] 실시예 35

[0540] 겐사이클로비르 및 PPE-1 (3x) 프로모터 조절하의 TK 투여와 방사선 요법 조합: 생체 내 내피세포의 상승적 세포독성 효과

[0541] 개별 요법들에 비하여, 다중 치료양상의 항암 요법은, 원하지 않는 부작용의 감소를 결과하는, 필요한 투여량의 감소 및 치료기간 둘 다의 관점에서 및 상이한 치료 기작의 상승적 수렴으로부터 나타나는 치료의 더 큰 효율의 관점에서 상당한 장점을 가진다 (최근 검토 문서, 참조, Fang 등, Curr Opin Mol Ther 2003;5:475-82). 다중양상 요법에서의 AdPPE-1(3x)-TK + GCV 투여 효능을 규명하기 위해, Balb/C 마우스에서 느리게 성장하는 일차 CT-26 결장암, 및 C57B1/6 마우스의 전이성 루이스 폐암에 대하여 AdPPE-1 (3 x)-TK + GCV 전신 투여 효과를 단회 방사선 요법과 조합하여, 평가하였다.

[0542] 국소적 단일 투여 5 Gy 방사선요법은 일차적 CT-26 결장암 종양을 지닌 Balb/C 마우스에는 비독성적이고 부차-치료적이다: 8주령의 20 마리 BALB/C 수컷 마우스의 좌측 대퇴부로 CT-26 결장암종을 접종시켜 부차-치료적이고 비-독성적인 방사선 양을 찾았다. 종양 크기가 4-6 mm에 달했을 때, 마우스를 국소 단회 방사선으로 치료하였다. 4 개의 방사선 양을 조사하였다: 0 (검은 원), 5 (개방 원), 10 (검은 삼각형), 또는 15 (개방 삼각형) Gy. 종양 부피 [$V = \pi/6 \times a^2 \times b$ (a 는 단축이고 b 는 장축이다)에 따라 계산]를 장축 및 단축을 측정함으로써 매일 산출하였다. 마우스가 잘 있는 것 (well-being)에 대해서는 관찰과 무게 측정으로 매일 감시하였다. 10 및 15 Gy 투여량은 비처리 마우스에 비하여 종양 진행 발달을 억제하였다 ($p=0.039$, $p=0.029$, 각각). 그러나 5 Gy 투여량은 종양 진행에서 부분적인, 통계적으로 의미가 없는 지연을 유도할 뿐이었고 (도 78a), 및 5 Gy로 처리된 마우스에서는 어떠한 심각한 몸무게 감소 (도 78b)도 비정상적인 행동도 감지되지 않았다. 이러한 결과에 근거하여 단일 5 Gy 용량의 방사선 요법을 상기 조합 치료 실험에 사용하였다.

[0543] 국소 5 Gy 방사선 요법과 조합된, PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 생체 내 발현 및 겐사이클로비르 (GCV) 투여에 의한 일차 결장암 종양 진행의 억제: 8 주령된 100마리 수컷 Balb/C 마우스를 CT-26 결장 암 종양 세포로 접종하였다. 종양 축이 4-6 mm에 도달했을 때, 10^{11} PFU의 바이러스 벡터 [AdPPE-1 (3x)-TK or AdCMV-TK]를 꼬리 정맥내로 주사한 후, 14일간 매일 GCV를 복막내 주사하였다 (100 mg/kg 체중). 벡터 투여 3일 후, 상기 마우스를 국소 5 Gy 용량으로 쏘였다. 종양 부피를 $V = \pi/6 \times a^2 \times b$ (a 는 단축이고 b 는 장축이다)에 따라 산정하였다. 처형시, 마우스를 사진찍고 종양과 간 시편을 확보하여 조직 분석하였다.

[0544] AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법은 다른 치료법에 비해 종양 진행을 억제하였다. 평균 종양 억제의 기간은 약 2 주였고, 이는 아데노바이러스 활성화의 기간과 부합하는 것이다. AdPPE-1 (3 x)-TK + GCV + 방사선요법 처리군의 평균 종양 부피 진행은 AdPPE-1(3x)-TK + GCV 처리군 ($p=0.04$) 및 AdCMV-TK + GCV 처리군 ($p=0.008$)보다 더 적었다.

[0545] 더욱이, 이러한 군에서의 평균 종양 부피 진행(AdPPE-1 (3 x)-TK + GCV+ 방사선요법)은 다른 모든 군 ($p=0.0025$)에서의 누적 평균 종양 부피 진행, 즉 모든 비-조사 군 (AdPPE-1 (3 x)-TK + GCV, Ad5CMV-TK +GCV, GCV없는 AdPPE-1(3x)-TK 및 식염수 + GCV; $p=0.0005$)에서의 누적 평균 종양 부피 진행 및 다른 방사선 조사된 군 (Ad5 CMV-TK + GCV + 방사선요법, GCV 없는 AdPPE-1 (3x)-TK + 방사선요법 및 식염수 + GCV + 방사선요법; $p=0.041$)에서의 누적 평균 종양 부피 보다 더 적었다 (도 79a, b). 방사선요법은 비-목표화된 벡터, AdCMV-TK ($p=0.04$)에 비하여 오로지 혈관신생적 내피세포 전사-목표화된 벡터, AdPPE-1 (3x)-TK만을 상당히 강화시켰을 뿐이다 (도 79c-f). 모든 바이러스 벡터를 사용하는 치료법은 방사선요법이 없으면 효과적이지 않았다.

[0546] 종합하면, 이러한 결과들은 CT-26 결장암 종양 발달에 대하여, 조합된 AdPPE-1(3x)-TK + GCV 및 방사선요법의 생체 내 현저한 상승적 종양 억제 효과를 나타낸다는 것을 가르킨다.

[0547] 방사선 요법과 조합된 AdPPE-1 (3x)-TK + GCV는 대규모 종양괴사를 유도한다: 조합된 AdPPE-1 (3x)-TK + GCV 및 방사선요법의 항-종양발생적 효과의 기작을 규명하기 위해, 헤마톡실린 및 에오신 염색을 종양 조직상에서 실시하였다. 종양 조직은 세포증식성 (hypercellular)이고, 밀집되어 있고 고도의 유사분열 지수를 가졌다. 두

개 요소가 모든 군에서 검출되었다: 괴사 및 괴사 영역 내에서 과립화 조직. 방사선을 포함하는 치료법으로 치료한 마우스로부터 얻은 종양은, 조사되지 않는 마우스로부터 얻은 종양보다 더 큰 괴사 영역 및 과립화 조직을 보였다. 이러한 군에서, 괴사 (도 80a) 및 과립화 조직 (도 80b)은 대부분 종양에 있다. AdPPE-1(3x)-TK + GCV와 방사선요법 조합으로 처리된 마우스는 가장 광범위한 괴사 및 과립화 조직을 보이며, 이는 시편 영역의 약 55%-80%였다 (도 80). 방사선요법없이 AdPPE-1(3x)-TK + GCV로 처리된 마우스의 종양은 다른 비-조사 군보다 상대적으로 더 큰 괴사성 면적을 보였다 (데이터 미도시). 이러한 결과들은 AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법이 부분적으로 과립화 조직에 의해 대체되는 대규모 종양 종양 괴사를 유도한다는 것을 나타낸다.

[0548] **방사선 요법과 조합된 AdPPE-1(3x)-TK + GCV는 내피세포 및 대규모 종양 세포사멸을 유도한다:** 결장암 종양에 대하여 AdPPE-1 (3x)-TK + GCV 및 방사선요법의 저해 효과에 관계하는 세포사의 특징을 규명하기 위해, TUNEL 및 항-카스파제-3 염색을 종양 조직상에서 실시하여 세포사멸성 세포를 나타내었다. TUNEL 염색은 방사선 조사된 군에서 종양 괴사 영역을 감싸는 세포사멸성 종양 세포를 나타낸다. 종양 세포가, 방사선 요법과 조합된 AdPPE-1(3x)-TK + GCV로 처리된 마우스로부터 얻은 종양에서, 임의의 다른 군에서보다 더 많이 검출되었다 (도 30a). 종양 절편을 항-카스파제-3으로 염색하여 동일한 세포사멸성 세포 패턴을 얻었다. 더욱이, 세포사멸성 종양 세포 (흰 화살표)에 의해 감싸여진 괴사성 영역은 사행형 (serpentine shape)을 가지며 유일하게 혈관 밀도가 증가하였다 (도 81b). 세포사멸성 영역 내의 혈관의 내피세포들은 양성적인 항-카스파제-3 염색을 나타냈다 (도 82).

[0549] 종합하여, 이러한 결과들은 방사선 요법과 결합된 AdPPE-1 (3x)-TK + GCV는 결장 암 종양에서 괴사성 영역을 감싸는 대규모 종양 세포 세포사멸을 유도한다는 것을 제시하고 있다. 더욱이, 종양 세포사멸성 영역 내의 혈관신생적 혈관 밀도의 증가, 괴사와 세포사멸성 영역의 형태, 및 내피세포 세포사멸의 존재는 혈관신생 조직 손상에 파생적으로 말초혈관 괴사를 나타내는 것이다.

[0550] **방사선 요법과 조합된 AdPPE-1 (3x)-TK + GCV는 생체 내에서 종양 발달을 억제하는 데 항-혈관신생적 효과를 가진다:** CD-31는 혈관신생에 독특한 내피세포 마커이다. 항 CD-31 면역염색을 종양 조직상에서 실시하여 내피세포에 대하여 상지 조합 요법의 직접적인 효과를 규명하였다. 방사선 단독을 포함하는 치료법으로 처리된 마우스로부터 얻은 종양 절편의 혈관신생적 혈관은 연속되거나 분지되지 않고 불명확한 경계를 가진 짧은 혈관이었다. GCV 없이 벡터만을 투여하면, 어떠한 비정상도 야기하지 않았고 (도 83a), 방사선 요법과 조합된 AdPPE-1 (3x)-TK + GCV는 가장 광범위한 혈관 이상을 나타냈다 (도 32a). 간 혈관은 영향을 받지 않았다 (도 83b). 이러한 결과는 방사선 요법과 결합된 AdPP1(3x)-TK + GCV의 투여는 혈관신생적 혈관에서 광범위한 혈관 분포를 유도한다는 것을 나타낸다.

[0551] ***AdPPE-1(3x)이 아닌, AdCMV-TK + GCV의 전신 투여는 CT-26 결장 암 종양을 지닌 마우스에서 간독성을 유도한다:** 아데노바이러스 벡터의 전신적 투여의 주요 부작용의 하나는 간독성이기 때문에, 벡터-처리, 조합 요법 및 대조군 마우스로부터 얻은 간 조직상에서 헤마톡실린 및 에오신 염색을 실시하였다. 모든 처리군의 간 시편은 증대된 간세포 핵 및 쿠퍼 세포 신생물을 보였다. 가장 뚜렷한 변화는 방사선 요법과 조합한 또는 조합하지 않은 AdCMV-TK + GCV로 처리된 마우스에서 나타났다 (도 84). 양 그룹 간에 간 기능 (간효소 SGOT, SGPT) 또는 신장 기능 (우레아, 크레아틴)의 세포 마커의 변화는 발견되지 않았다. 간 내피세포들은 방사선 요법과 조합된 벡터 AdPPE-1 (3x)-TK + GCV에 의해 영향을 받지 않았다 (도 84, 우측). 이러한 결과들은 상기 CMV 프로모터에 의해 조절된 HSV-TK를 발현하는 아데노바이러스 벡터가 상대적으로 간독성이라는 것을 나타낸다.

[0552] 종합하면, 이러한 결과는 AdPPE-1 (3 x)-TK + GCV가 정맥내 투여하기에 안전하다는 것을 보인다. 더욱이, 상기 벡터는 비독성, 국소 실시된 방사선요법이 추가되는 경우와 조합될 때만, 느리게 성장하는 일차 종양 진행을 효과적으로 억제한다. 단일 전체에 한정되지 않는다는 소망을 가지고, 세포 사멸을 통한 종양 혈관신생의 특이적 억제는 종양 억제에 대한 기작으로 보인다. 더욱이, 상기 AdPPE-1 (3 x)-TK 벡터의 세포독성 활성화는 GCV의 투여 및 방사선요법에 의존적이다.

[0553] 실시예 36

[0554] 방사선 요법과 조합된 켄사이클로비르 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절하의 TK의 투여: 전이하는 암에서 생체 내 생존 향상

[0555] 암에서 장기 생존에 대하여 조합된 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV 및 단회 방사선요법의 항혈관신생적 활성이 미치는 영향을 규명하기 위해, 상기 벡터와 GCV 및 방사선요법을 빠르게 전이하는 루이스 폐암 모델에 전신 투여하였다.

- [0556] 국소 단회 5 Gy 방사선요법은 루이스 폐암 전이를 나타내는 C57BI/6 마우스에 비독성이고 부차-치료성이다: 35 마리의 8 주령 C57BL/6 수컷 마우스를 LLC 세포로 왼쪽 발바닥에 접종하였다. 일차 종양 형성시, 상기 왼쪽 발을 일반적인 마취하에서 절제하였다. 발 절제 8일 후, 마우스 흉부를 겨냥하여 단 회 방사선요법을 일반적인 마취하에서 실시하였다. 다섯 방사선 조사 용량을 조사하였다: 0, 2, 50, 10 및 15 Gy. 일차 종양 제거 3-4 주 후에, 조사되지 않은 마우스는 몸무게가 감소되었고, 이는 전이성 질환의 표시이다. 일차 종양 제거 28일째에 마우스를 처형하였다. 마우스가 잘 있는 것에 대해서는 관찰과 체중 측정으로 감시하였다 15 Gy로 조사된 6 마리 마우스 중 5 마리가 조사 5일 내, 폐 전이 징후 없이 죽었다. 마우스 배제는 하기와 같다: 다른 군에 비해, 일차 종양 발달이 2 주 지연되어서 한 마리 마우스를 제외하였다. 3 마리는 연구 진행 중에 죽었고 부검을 실시하지 않았다. 상기 제외된 마우스들 중에서, 한 마리가 등재되기 전에 배제되었고, 비-처리된 군으로부터 한 마리, 2 Gy 군으로부터 한 마리 및 5 Gy 군으로부터 한 마리가 배제되었다. 10 Gy로 처리된 마우스의 평균 전이 체중은 다른 군의 것보다 더 낮았으나, 5 Gy로 처리된 군 ($p=0.001$)과는 통계적으로만 상이하였다 (도 85a). 전술한 바와 같이, 15 Gy 방사선으로 처리된 마우스는 어떠한 전이 흔적도 없이 5일 이내에 죽었다. 10 Gy로 처리한 마우스는 방사선 조사 10일 후 현저한 일시 체중 감소를 보이지 않았다 (도 85b). 5 Gy 용량의 단회 방사선요법은 치료적이지도 (도 85a) 독성적이지도 (도 85b) 않기 때문에, 이를 조합 치료 실험에 사용하였다.
- [0557] 부차-치료적 방사선요법 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절 하에서 TK의 발현과 겐사이클로비르 (GCV) 투여의 조합에 의한 쥐의 폐암에서 전이성 질환의 상승적 억제: 180 마리의 8 주령 수컷Balb/C 마우스를 좌측 발바닥을 통해 LLC 세포로 접종하였다. 일차 종양 형성 후, 일반적인 마취하에서 발을 절제하였다. 10^{10} PFU의 벡터 [AdPPE-1(3x)-TK or AdCMV-TK]를 꼬리 정맥에 주사한 후, 14일 동안 매일 GCV (100 mg/kg)를 복막 내 주사하였다. 벡터 주사 3일 후, 5 Gy 용량의 단 회 방사선요법을 일반적인 마취하에서 마우스의 흉부에 실시하였다.
- [0558] 마우스를 6 군으로 나눴다: 1. Ad5PPE-1(3x)-TK + GCV, 2. Ad5CMV-TK + GCV, 3. 식염수 + GCV, 4. Ad5PPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법, 5. Ad5CMV-TK + GCV + 방사선요법, 및 6. 식염수 + GCV + 방사선요법. 마우스 배제: 다리 절제 후 곧 바로 4 마리 죽음, 일차 종양이 너무 커서 4 마리 등재 배제, 일차 종양 발달이 늦어져서 7 마리 제외, 폐 전이의 흔적이 보이지 않아서 12 마리 제외, 양안에서 배출물 발생으로 1 마리 제외. 상기 제외된 마우스 중에서 14 마리가 등재되기 전에 배제되었다. 2 마리가, 군 1에서부터, 2 마리가 군 2로부터, 2 마리가 군 3으로부터, 4 마리가 군 4로부터, 3 마리가 군 5로부터 및 1 마리가 군 6으로부터 배제되었다.
- [0559] AdPPE-1 (3 x)-TK + GCV + 방사선요법으로 처리된 마우스는 임의의 다른 처리군보다 상당히 오래 생존하였다 ($p=0.05$) (도 86a). 또한, 방사선요법은 비-목표화된 벡터, AdCMV-TK에 비하여, 혈관신생적 내피세포 전사-목표화된 벡터, AdPPE-1 (3 x)-TK, 만을 현저히 강화하였다 ($p=0.04$) (도 86b-d). 이러한 결과는 전신적으로 투여된AdPPE-1 (3 x)-TK 벡터 + GCV + 단회 방사선요법의 조합 치료가 전이성 질병에서 상승적으로 생존을 연장시킨다는 것을 나타낸다.
- [0560] 실시예 37
- [0561] 상기 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절하에서 Fas 및 TNFR 키메라 유전자의 이중 요법: 독소루비신에 의한 시험관 내 내피세포 특이성의 상승적 향상
- [0562] 화학요법 및 HSV/TK보다 "자살 유전자"의 혈관신생적 내피세포-특이성 발현의 조합의 효능을 규명하기 위해, PPE-1(3x) 프로모터를 Fas-키메라 (Fas-c, 상기 상세한 설명 참조)와 조합하여 가지는 AdPPE-1 (3x)-Fas-c를 BAEC 세포에 단독으로 및 안트라사이클린 글리코사이드 독소루비신 (DOX)과 조합하여 투여하였다. BAE 세포의 세포사멸은, 세포 생존에 의해 측정되는 바와 같이 (% 활성, 크리스탈 바이올렛 염색으로 산정), AdPPE-1 (3x)-Fas-c + DOX로 처리된 마우스에서 AdPPE-1 (3x)-Fas-c 또는 DOX 단독으로 처리된 마우스에서보다 상당히 크게 나타났다 (도 91).
- [0563] 이러한 결과들은 상기 PPE-1 (3x) 프로모터가 추가의 치료 유전자 약제물의 효과적인, 내피세포-특이성 발현을 지시하는 데 사용될 수 있고 및 PPE-1 (3x) 의존성, 세포사멸-유도성Fas-c 발현 및 화학요법의 조합은 매우 효율적인 상승적 내피세포 μ 세포사멸을 결과한다는 것을 알려준다.
- [0564] 실시예 38
- [0565] 조건적으로 복제하는 아데노바이러스 벡터
- [0566] 재료 및 실험 방법
- [0567] 세포 배양: 소 동맥 내피세포 (BAEC) 및 인간 정상 피부 섬유아세포 - NSF 세포주는 10% 열 불활성화 FCS, 100

μg/ml 페니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신을 포함하는 저 글루코즈 DMEM에서 배양한다. HeLa (인간 자궁 경부암), 루이스 폐암 세포 (D 122-96) 및 293 (인간 배아 신장) 세포주는 10% 열 불활성화 FCS, 100 μg/ml 페니실린, 100 μg/ml 스트렙토마이신을 포함하는 고 글루코즈 DMEM에서 배양하였다. 인간 제대 내피세포 - HUVEC (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.)는 EGM-2 Bullet 키트 (Clonetics, Bio-Whittaker, Inc., MD, USA)에서 배양한다. 인간 폐암 세포주 (A549)는 10% 열 불활성화 FCS, 100 μg/ml 페니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신을 포함하는 MEM에서 배양한다. 모든 세포는 37°C, 5% CO₂, 습윤 대기에서 배양한다.

[0568] 플라스미드 및 바이러스 벡터 제작:

[0569] 플라스미드 클로닝: 반디불이 루시페라제의 cDNA를 pcDNAIII 발현 플라스미드의 다중 클로닝 장소 (CMV 프로모터 부위, Invitrogen)에, 및 PPE1-3x 프로모터와 상기 아데노바이러스-5 DNA 서열의 부분을 포함하는 pPACPE-1. pip A에 서브클로닝하였다. pPACPE-1.pIpA 플라스미드로부터 PPE-1 프로모터의 첫번째 인트론을 삭제시킴으로써 세 번째 플라스미드를 클로닝하였다. 이러한 세 개 플라스미드는 이전에 본 발명자들의 실험실에서 클로닝되었으며 세포 배양 형질감염에 사용되었다.

[0570] 복제 결핍 벡터 클로닝: FAS-키메라의 cDNA를 pPACPE-1.pIpA 및 pPACCMV.pIpA 플라스미드로 서브클로닝시켰다. 이러한 플라스미드를 아데노바이러스-5 게놈의 대부분을 포함하는 pJM17와 공동 형질감염시키고 및 칼슘 포스페이트 방법을 사용하여 293 인간 배아 신장 세포주 (ATCC)로 공동 형질감염시켰다. 이러한 세포주는 바이러스성 복제에는 필요하지만, pPAC.pIpA이나 pJM17 플라스미드에는 포함되어 있지 않은 E1 유전자를 포함하도록 고안되었다. 상기 플라스미드들을 세포 내에서 동종 재조합하게 하고 약 2 주 후, 재조합 바이러스들이 형성되고 복제되기 시작하여, 최종적으로 세포 용해를 야기하였다. 바이러스 콜로니들을 분리하고 배양하며, 이들의 정확한 삽입 방향을 PCR로 확인한다. 복제 결핍 벡터들은 종래 클로닝 기술로 이전에 준비하였다.

[0571] 조건적 복제 아데노바이러스 (CRAD) 제작: AdEasy 법 (Stratagene, LaJolla CA)을 사용하여CRAD들을 제작하였다. 아데노바이러스-5 DNA 서열의 일부를 포함하는 플라스미드인, PShuttle-MK는 하기와 같이 개질되었다: pShuttle (Stratagene, La Jolla, CA)에서 다중 클로닝 장소 및 우측 팔을 미드카인 (Midkine) (mk) 프로모터 및 연속적인 아데노바이러스 E1 부위로 대체하였다. 나중에, 상기 MK 프로모터는 인트론이 없는 PPE1-3x로 대체되었다. 두 번째 플라스미드는 IRES 서열 (pIRES-EYFP 플라스미드에서 출처, BD Biosciences) 및 FAS-키메라 cDNA를 상기 프로모터 및 E1 사이에 서브클로닝함으로써 제작되었다. IRES는 동일한 전사물로부터 두 개의 단백질을 번역하는 것을 허용한다. 결과된 두 개 서열을 PmeI 절단으로 선형화시키고 후속적으로 이스케리아 콜리 BJ5183 ADEAS Y-1 (Stratagene)으로 형질전환시켰다. 이러한 타입의 박테리아는 E1 및 E3 유전자 부위를 제외하고, 대부분의 아데노바이러스-5 서열을 포함하는 pADEASY-1 플라스미드로 이미 형질전환되었다. 상기 플라스미드들은 박테리아 내에서 동종 재조합되고 (pShuttle 및 pADEASY-1 간에), 따라서 완전한 벡터 게놈을 창출한다. 상기 재조합물을 나중에 PacI으로 절단하고, 칼슘 포스페이트 법을 이용하여 293 인간 배아 신장 세포주 (ATCC)로 형질감염시켰다. 나머지 과정은 복제 결핍 벡터에 대해 설명한 바와 같다.

[0572] 일반적인 프로모터 CMV (사이토메갈로 바이러스)를 상기 E1 유전자전에 서브클로닝시킴으로써 양성 대조군 바이러스 CMV-E1을 구축하였다. CMV-E1 바이러스는 편재되어 있고 및 내피세포에 특이성을 가지지 않는다.

[0573] 하기 복제 결핍 벡터 및 CRAD를 전술한 방법에 따라서 제작하였다:

[0574] 복제 결핍 벡터:

[0575] PPE-1(3x)-FAS, CMV-FAS, CMV-LUC (LUC - 반디불이 루시페라제 리포터 유전자의 약자), PPE-1(3x)-LUC.

[0576] CRADs:

[0577] PPE-1(3x)-CRAD, PPE-1(3x)-Fas-CRAD, CMV-E1

[0578] 형질감염 실험: BAEC 및 HeLa 세포를 24-웰 플레이트에 60-70% 용착도로 배양하였다. 발현 제작물 0.4 μg/well, 형질감염 효율에 대한 대조군으로서 pEGFP-C1 벡터 (CLONTECH, Palo Alto, CA) 0.04 μg/well을 사용하여 공동 형질감염을 행하였다. 리포펙타민 및 리포펙타민 플러스 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 형질감염에 사용하였다, 37°C에서 3 시간 배양 후, 형질감염 혼합물을 배양 배지로 교체하였다.

[0579] 형질유도 실험: 벡터 (PPE-FAS, CMV-FAS, CMV-LUC, PPE-1UC)를 감염배양 배지 (Contains 정상 배양 배지에서의 10% 대신에 2% FCS 함유)에 희석시켜 10, 100, 1000, 10000의 감염다중도 (multiplicity of infection, moi)를 얻었다. 감염다중도는 목표 세포당 바이러스의 수로서 계산된다. 목표 세포 (BAEC 및 293)를 형질유도 24 시간 전

에 배양하였다. 형질유도 일에, 세포의 성장 배지를, 96 웰 플레이트 또는 60 mm 플레이트에서 0.1 또는 2 ml 감염 배지와 각각 혼합된 바이러스 함유 용액과 교체하였다. 상기 세포를 4 시간 동안 배양한 후, 새로운 배지를 형질유도된 세포에 첨가하였다. 벡터 복제 및 세포사멸성 유도의 평가는 PFU 역가화 (하기 참조) 및 ApoPercentage 키트 (Accurate Chemical, Westbury, NY)로 각각 실시하였다. 크리스탈 바이올렛 염색을 세포활성의 지시자로서 또한 사용하여, 플레이트의 표면에 부착된 세포의 양을 평가하였다.

[0580] 바이러스 역가의 시험 - 플라크 형성 유닛 분석법 (PFU): 바이러스 스타크를 역가 측정하고 -80°C 에서 보관하였다. 293 세포들의 부차-융합성 (80%) 배양물을, 감염 배지에 순차적으로 희석된 (10^{-2} - 10^{-13}) 바이러스 벡터에 의해 2 시간 동안 감염시켰다. 2 시간 후, 배지를 PBS로 세척하고 아가로 덮었다. 약 2 주 후에 플라크가 분명한 가장 높은 희석액의 농도를 PFU/ml (PFU - 플라크 형성 유닛)의 유닛으로 간주한다

[0581] 결과

[0582] 세포독성 유전자 발현은 아데노바이러스 복제를 향상시킨다: 바이러스 복제에 대하여 세포사멸성 유도의 영향을 규명하기 위해, CMV-FAS 복제를 293 (인간 배아 신장) 세포주에서 시험하였다. 이 세포주에서, 상기 바이러스는 FAS-c에 의해 세포사멸을 또는 그 복제의 결과로 세포 용해를 유도할 수 있다. 초기 (바이러스 감염 후 수 시간 내) 세포사멸은 바이러스 복제를 방해할 것이고 반면, 후기 세포사멸 (바이러스 감염 후 수 일)은 바이러스 확산을 향상시킬 것이다.

[0583] 세포사멸을 유도하는 CMV-FAS의 능력을 규명하기 위해, BAEC를 형질유도하고 및 세포사멸을 세포 활성의 ELISA-크리스탈 바이올렛 분석법으로 측정하였다 (도 89). 높은 농도 (10000 moi)의 CMV-FAS는 리간드 (TNF- α 를 활성화시키지 않고 세포사멸을 유도한 반면 저 농도에서는 세포사멸을 유도하기 위해 상기 리간드를 첨가할 필요가 있었다.

[0584] 세포 대 세포로의 CMV-FAS 확산은 293 세포에서 플라크 진화로 분석되었다. 플라크 진화의 속도 및 플라크의 크기에 따라 관찰되는 바와 같이 (도 88 및 89), 비-세포사멸 유도 벡터 CMV-LUC에 비하여, CMV-FAS 벡터를 사용할 때는 플라크 진화가 더 높은 비율로 일어난다.

[0585] 상기 인트론을 가지거나 가지지 않는 PPE 1-3x 프로모터가 RNA 전사를 유도할 수 있는 능력에 대하여 루시페라제 리포터 유전자를 사용하여 평가하였다 (미도시). 아무런 심각한 차이가 발견되지 않았다. 이러한 결과는 FAS와 같은 세포사멸-유도 "살해" 유전자를 지닌, 상술한 혈관신생적, 내피세포-특이성 바이러스 작제물 AdPPE-1 (3x)과 같은 아데노바이러스 벡터가 복제되는 것은 숙주 세포의 추가의 세포사멸성 용해가 되면 증강될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0586] 실시예 39

[0587] VEGF 발현의 PPE-1(3x)은 조작된 조직의 신생맥관화 및 생존을 향상시킨다.

[0588] 조작된 조직 제조물의 맥관화에 대한 엔도텔린 프로모터 조절 하의 VEGF의 발현의 시험관 내 및 생체 내 효과를 연구하기 위해, 세포를 Ad5PPEC-1-3x VEGF으로 감염시키고, 제조물을 분석하여 맥관화에 대한 효과를 측정하였다.

[0589] 도 91a은 Ad5PPEC-1-3x VEGF로 세포를 감염시키면, 저장된 제조물에서 형성된 혈관-유사 구조물의 수와 크기에 유도 효과를 나타낸다는 것을 보여준다. 제조물을 VEGF가 보충되거나 되지 않은 배지 (50ng/ml)에서 성장시켰다. 동일 제조물을 Ad5PPEC-1-3x VEGF 바이러스 또는 대조군 1 GFP 아데노바이러스로 감염시켰다 (4 시간 동안). 배양 2 주 후, 제조물을 고정, 매립, 절편 및 염색하였다.

[0590] VEGF을 상기 배지에 첨가한 것과 세포를 Ad5PPEC-1-3x VEGF로 감염한 것 간에 비교하면, Ad5PPEC-1-3x VEGF 바이러스로 처리된 샘플에서 혈관의 수와 혈관 영역의 백분율에서 4 내지 5 배 증가되는 것이 발견되었다 (도 91a).

[0591] 생체 내 연구에서, 세 가지 상이한 모델을 사용하여 이식체의 생체 내 생존, 분화, 통합 및 맥관화를 분석하였다. 이러한 모델들은 (i) SCID 마우스 등에서의 피하 이식, (ii) 누드 래트의 사두근으로의 이식, 및 (iii) 누드 마우스의 전복근 (anterior abdominal muscle) 단편과 상기 제조물의 치환. 상기 제조물에 숙주 혈관이 스며들었다. Ad5PPEC-1-3x VEGF 바이러스로 감염된 제조물은 대조군 제조물과 비교하여, 혈관 구조물이 증가되었다.

[0592] 조직-조작된 제조물 세포 내 생존 및 통합화를 분석하기 위해, 본 발명자들은 루시페라제-기반 영상 시스템을 사용하였다. 상기 생체 내 영상 시스템 (IVIS)은 전신적으로 투여된 루시페린과 국소적으로 생성된 루시페라제

와 이 상호반응에 의해 발생하는 광을 검출함으로써 작동한다. 이식 48 시간 전에, 제조물을 루시페라제를 암호화하는 아데노 연합 바이러스 (Adeno Associated Virus AAV)로 감염시켰다. 다음, 상기 제조물을 누드 마우스의 전복근 벽에 인 시츄 위치시켰다. AAV-루시페라제를 수술시 각 마우스의 좌하방 다리에 주입하여 양성 대조군으로서 사용하였다. 수술 3 내지 4주 후, 마우스에 루시페린을 투입하여 조직-조작된 제조물로의 관류를 측정하였다.

[0593] Ad5PPEC-1-3x VEGF로 감염된 제조물 (및 나중에 AAV-루시페라제로 감염된)은 AAV-루시페라제로만으로 감염된 대조군 제조물보다 더 높은 신호를 가졌다 (결과 미도시). 종합하면, 이러한 결과들은 Ad5PPEC-1-3x VEGF를 사용한 시험관 내 감염으로, 이식된 조직 조작된 제조물의 생존 및 맥관화가 향상시킬 수 있다는 것을 제시한다.

[0594] 실시예 40

[0595] 항혈관신생적 치료에 의한 PPE-1 (3x) 프로모터의 시험관 내 활성화

[0596] 혈관신생의 억제에 대한 많은 조직들의 공통적인 반응은, 혈관 항상성을 관장하는 자동-조절된 오토크린 피드백 루프에 의해 생성된 복합 신호에 응답하여, 내인성 혈관신생 경로를 상방 조절하는 것이다 (참조 Hahn 등, Am J Med 1993, 94:13S -19S, 및 Schramek 등, Senim Nephrol 1995; 15: 195-204). 그러한 기작이 상기 PPE-1 (3x) 프로모터의 조절하에서 핵산 서열의 발현을 어떻게 실행하는 것인가를 규명하기 위해서, 상기 PPE-1(3x) 조절하에 있는 루시페라제 (LUC) 유전자[PPE-1 (3x)-LUC]를 가지는 본 발명의 핵산 작제물로 형질전환된 형질전환 마우스에 강력한 항혈관신생 약물 보센탄을 투여한 및 투여하지 않은 조직에서, 발광의 생체 내 수준을 측정하였다. 보센탄 (TracleerTM) 은 다양한 징후, 대부분 중요한 것으로 폐동맥 고혈압 및 폐섬유증에 대해 임상적으로 현재 승인된 이중 엔도텔린 수용체 (ETA 및 ETB) 길항체이다.

[0597] 본 발명의 PPE-1(3x)-LUC 작제물을 지니는 형질전환 마우스는 상기 상세히 서술한 바와 같이, 당해 분야에 공지된 클로닝 방법으로 생성되었다. 10 주령 PPE-1(3x)-Luc 형질전환 마우스, (n=5 각 군당) 에 음식을 또는 100 mg/kg/day 보센탄을 함유하는 음식을 30 일간 먹였다. 치료 마지막 날에 마우스를 처형하고, 마우스의 기관을 상기 방법 단락에 설명한 바와 같이 제거하여 발광 강도를 측정하였다.

[0598] 도 94는 상기 형질전환 마우스에서 상기 재조합 유전자의 조직 특이성 과발현을 부여하는 것을 나타낸다. 심장 및 동맥과 같은, 기관은 정상적으로는 더 큰 엔도텔린 활성을 지니며, 뇌, 기관지 및 폐와 같은 기관은 다소 적은 정도로 가지는데, 이들 기관에서 발광 강도가, 간이나 신장에 비하여 증가되었다. 대부분의 기관에서, 그러나, 보센탄 투여에 의해 발광 강도가 현저히 향상되었고 (심장 조직에서 최대 40%까지) (도 94), 따라서 이는 특히 엔도텔린 수용체 길항체들, 일반적으로는 혈관신생의 저해제가 본 발명의 내피세포 특이성 프로모터를 활성화시킬 수 있고 및 PPE-1 (3x) 전사 조절하에서 형질전환 유전자의 발현의 향상을 조직 특이적 방식으로 유도할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0599] 실시예 41

[0600] 상기 PPE-1(3x) 프로모터의 조절하에서 생체 내 발현된 형질전환 유전자는 면역원성이 아니다.

[0601] 전술한 바와 같이, 다른 장기간 치료 양태로서, 유전자 요법은 발현된 형질전환성 단백질에 연속 노출에 대한 내재성 숙주 면역 반응으로 때때로 복잡해진다. 형질전환성 단백질에 의한 면역 자극은 치료의 효능 감소, 염증 및 때때로 심각한 부작용을 낳는다. 본 발명의 시스 작용 조절 요소를 사용하여 발현된 형질전환 유전자의 숙주 면역 반응을 알아보기 위해, LLC 미소전이체를 지니고, 및 상기 Fas-TNF-R1 키메라 (Ad5PPE-1(3x) Fas-c 및 Ad5CMV Fas-c), 또는 상기 LUC 리포터 유전자 (Ad5PPE-1(3x) Luc)를 가지는 벡터로 처리된 마우스에서 아데노 바이러스 핵소 및 TNF-R1에 대한 항체 역가를 분석하였다 (군당 6 마리 마우스). 대조군 마우스는 식염수로 처리하였다.

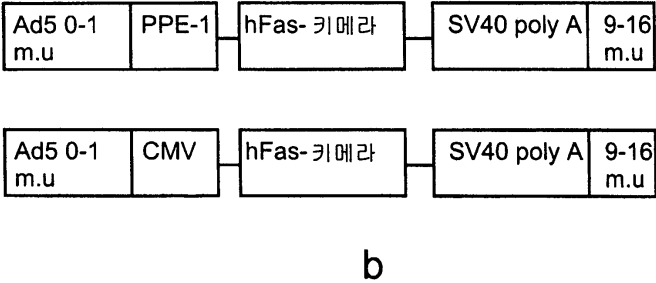
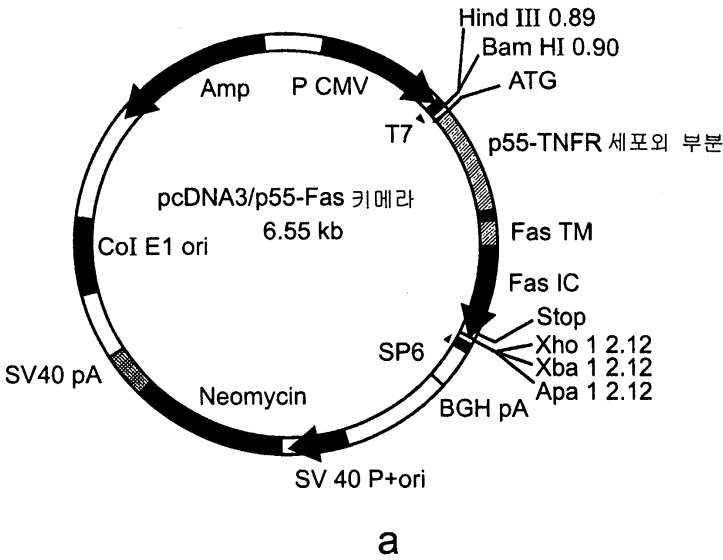
[0602] 벡터를 5일 간격으로 세 번 주사하였다. 마지막 벡터 주사 10일 후에, 마우스를 처형하였고, 아데노바이러스에 대한 항체 및 인간 TNF-R1에 대한 항체의 수준을 결정하고, ELISA 분석으로 삽입된 형질전환 유전자에 의해 발현된 단백질을 측정하였다. 예기치 않게, 인간 TNF-R1에 대한 항체의 수준이 Ad5-PPE(3x)-Fas-c 처리 마우스에서 검출되는 수준보다 적은 것으로 발견되었고, 반면 이러한 수준들은 비특이성 Ad5-CMV-fas 벡터로 처리된 마우스에서 상대적으로 높았다 (도 95b). 아데노바이러스 핵소에 대한 항체 역가는 상이한 바이러스-주사 군들에서 유사하였다 (도 95a). 이러한 결과들은 본 발명의 PPE-1 (3 x) 작제물을 사용하여 발현된 형질전환 유전자들이 계통발생적 근친관계에 상관없이 숙주 면역계에 의해 묵인된다는 것을 나타낸다.

[0603] 실시예 42

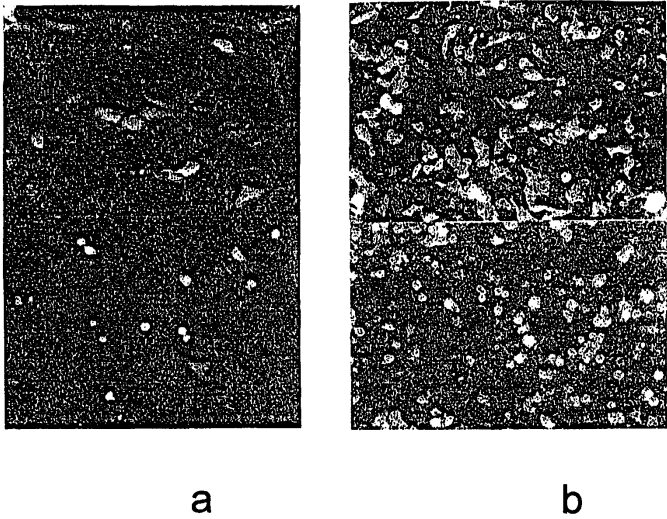
- [0604] PPE-1 (3x) 프로모터의 조절하에서 Fas-c의 생체 내 발현에 의한 루이스 폐암 (LLC)에서의 전이성 성장의 효과적인 억제: 투여량 반응 및 치료법
- [0605] 임상적 방법의 간소화 및 표준화는 약학 분야에서 매우 중요하다. 전이성 질병에 대하여, AdPPE-1(3x)-Fas-c 키메라의 전신적 투여의 투여량 및 치료법의 효능을 시험하기 위해, 좌측 발을 종양 세포로 접종하고 일차 종양이 7 mm 크기에 달했을 때 발을 제거하여 LLC 폐 전이를 유도하였다. 투여량 1×10^7 - 1×10^{12} 의 AdPPE-1(3x)-Fas-c 벡터 [또는 대조용으로 AdPPE-1 (3x) Luc] 또는 대조군으로서 식염수를 정맥 내 투여하였다. 일차 종양 제거 후 5일에 첫 번째 투여량을 투여하였고, 두 번째는 지시된 곳에, 종양 제거 후 9일에 실시하였다. 마우스를 체중, 외양 및 활성에 따라서, 치료과정을 통틀어 치료의 안정성에 대하여 평가하였다. 간 무게, 외양 및 기능 (효소 활성)을 처형시 평가하였다.
- [0606] 벡터 주사 후 20일째에 마우스를 처형하고 적출된 폐의 무게에 따라, 전이 확산의 정도를 부과된 종양으로 평가하였다. 도 96은 1×10^7 - 1×10^{12} AdPPE-1(3x)-Fas-c 벡터 또는 식염수를 한 번 주사 받은 마우스로부터 얻은 폐의 무게를 비교한 막대 그래프로서, 상기 AdPPE-1 (3x)-Fas-c 작제물 벡터를 발현시키는 마우스의 폐에서는 전이 확산 (종양 하중)의 정도가 상당히 감소된 것을 나타낸다. 가장 현저한 효과는 가장 높은 투여량에서 관찰되었다: 1×10^{12} AdPPE-1 (3x)-Fas-c를 받은 마우스에서의 종양 하중은 식염수 대조군보다 3.5 배 적었다 (0.31g 대. 1.16g, 각각).
- [0607] 도 97은 1×10^9 - 1×10^{12} AdPPE-1 (3 x)-Fas-c 벡터로 한 번 또는 두 번 처리된 마우스, 대조군 AdPPE-1(3X)Luc 벡터, 또는 식염수 처리된 마우스에서 폐의 무게로 측정된 종양 하중을 비교한 막대 그래프로서, 1×10^9 - 1×10^{12} AdPPE-1 (3 x)-Fas-c 벡터를 한 번 또는 두 번 주사한 마우스의 폐에서의 종양 하중이 상당히 감소된 것을 나타낸다. 대조군 벡터 (AdPPE-1 (3 X)Luc) 또는 식염수 주사의 항전이효과는 관찰되지 않았다. 모든 조사된 투여량에서, AdPPE-1-(3X)-Fas-c를 한 번 및 두 번 투여한 것 간의 항전이 효과 (평균 폐 중량)에서의 차이는 최소한이었다.
- [0608] 이러한 결과들은 아데노바이러스 벡터를 상대적으로 적은 양으로 단 회 투입한 후 상기 PPE 1(3X) 프로모터의 조절하에서 Fas-c 키메라를 생체 내 발현시키면, D122 루이스 폐암 모델에서 전이 성장을 효과적으로 저해할 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0609] 개별 양태의 맥락에서 뚜렷하게 설명하기 위해 제시된, 본 발명의 특정 특징들은 또한 단일 양태에서 조합적으로 제공될 수 있다. 역으로, 단일 양태의 맥락에서 간결하게 설명하기 위해 제시된 본 발명의 다양한 특징들은 또한 개별적으로 또는 임의의 적절한 부분 조합적으로 제공될 수 있다.
- [0610] 비록 본 발명이 이의 특정 양태와 연계하여 설명되어 있지만, 많은 대안, 개질 및 변형이 당해 분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 따라서, 그러한 대안, 개질 및 변형은 첨부되는 청구범위의 사상 및 넓은 범위 내에 포용되는 것으로 의도된다. 본 명세서에서 언급된 모든 공개문헌, 특허 및 특허출원은 각 개별 공개문헌, 특허 또는 특허 출원이 특수적으로 및 개별적으로 본 발명에 참조문헌으로 기재되는 것인 양 그와 같은 정도로, 전체적으로 본 명세서에 참조물로 기재된다. 또한 본 출원서에서의 임의의 참고 문헌의 인용 및 식별은 그러한 참조 문헌이 본 발명의 선행기술로서 이용가능하다는 승인으로서 해석되어서는 안 된다.

도면

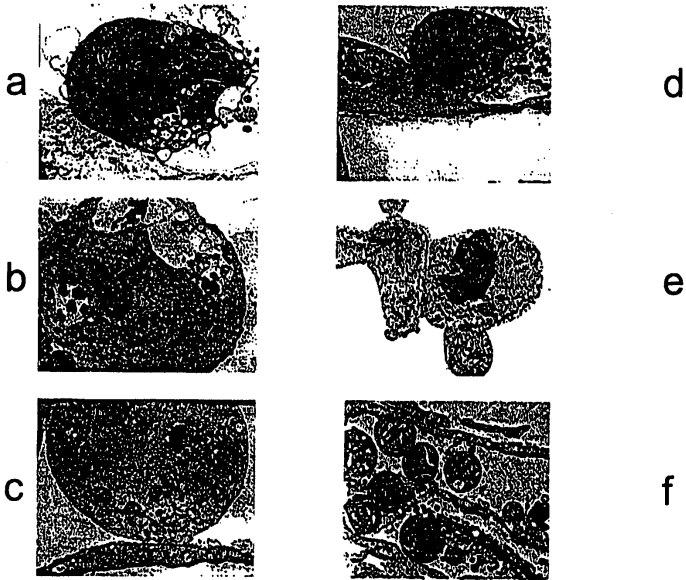
도면1



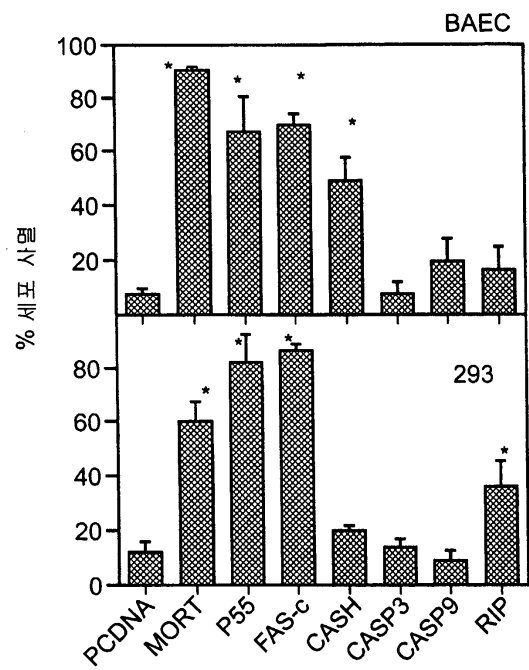
도면2



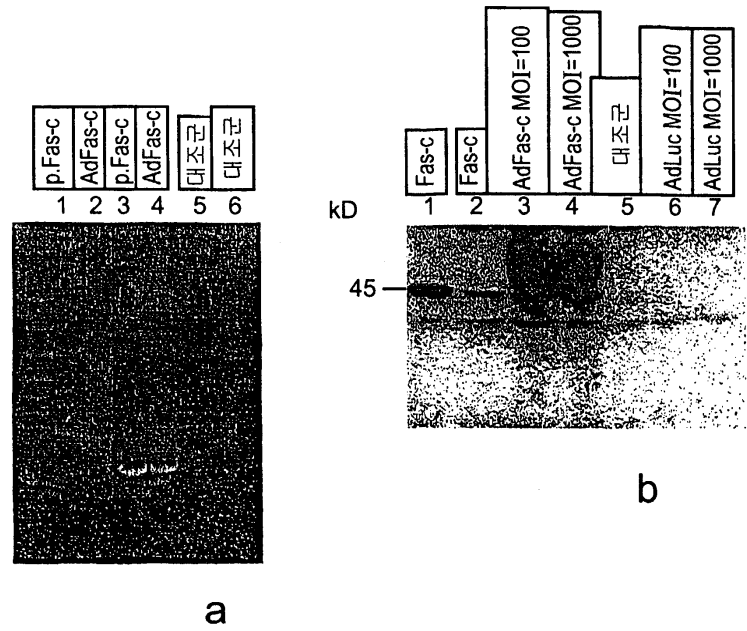
도면3



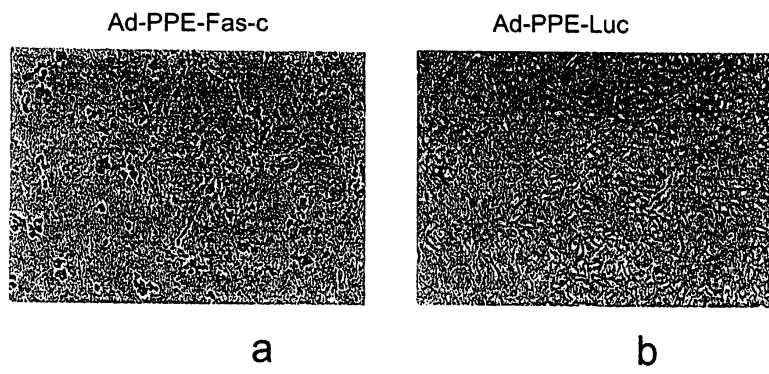
도면4



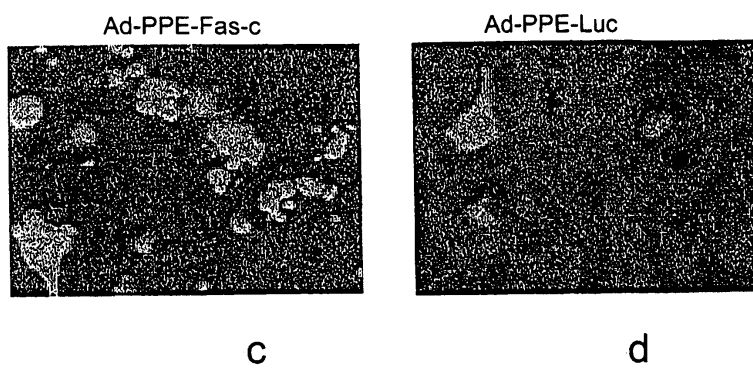
도면5



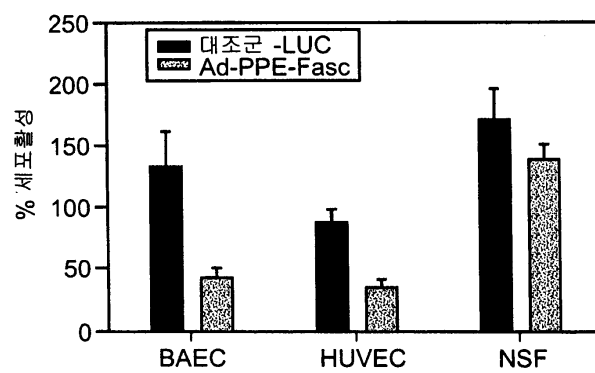
도면6ab



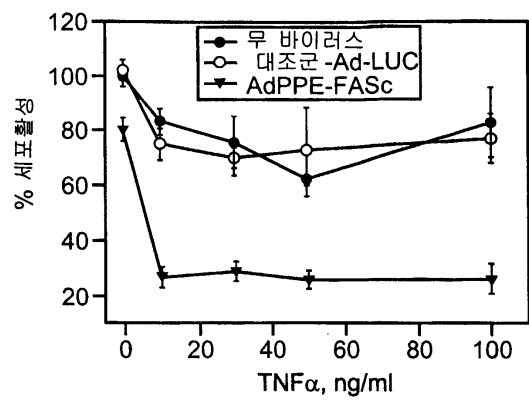
도면6cd



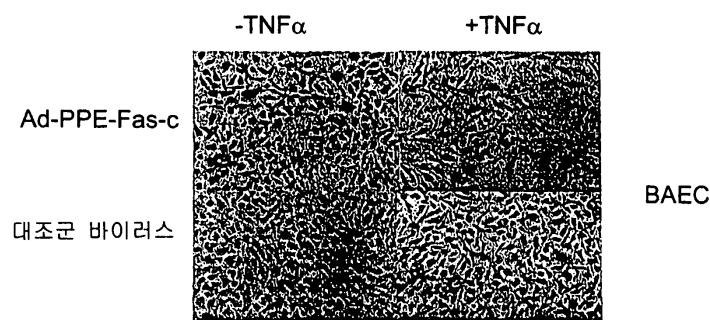
도면7



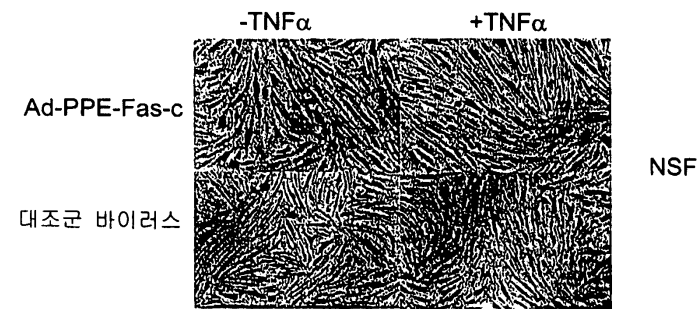
도면8



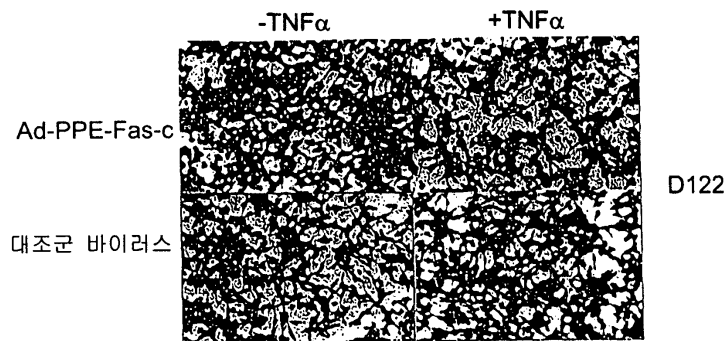
도면9a



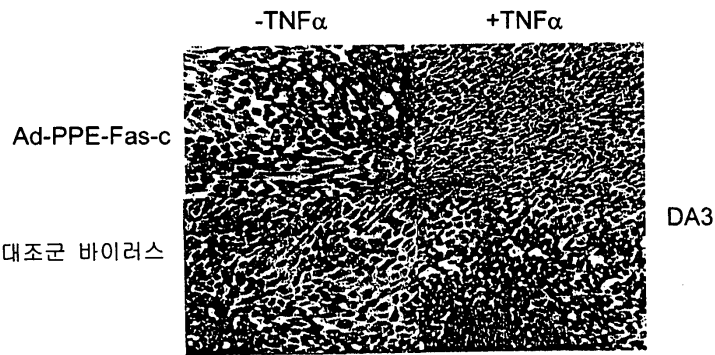
도면9b



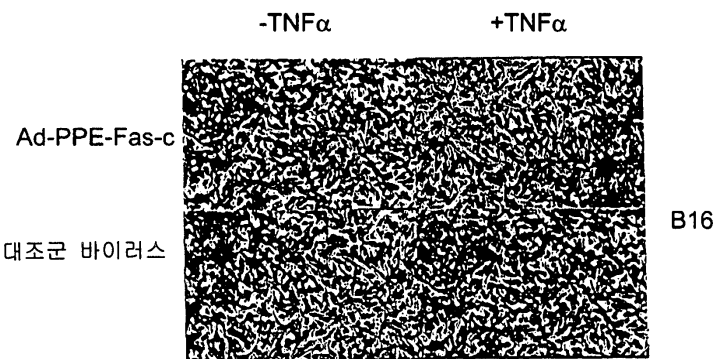
도면9c



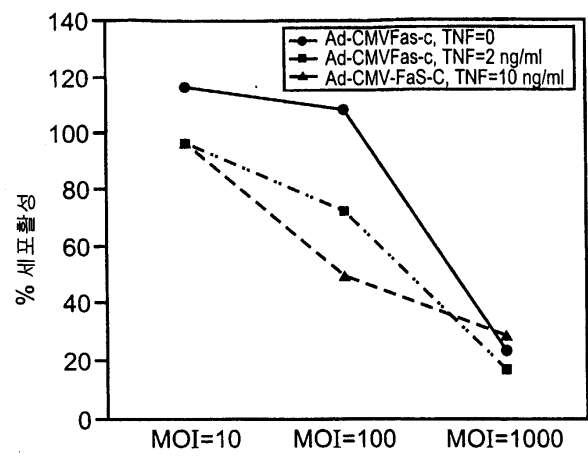
도면9d



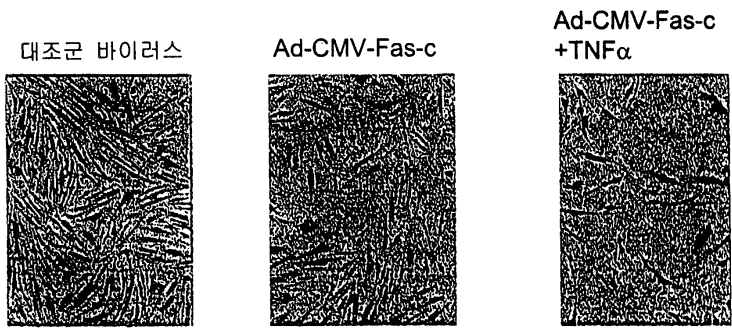
도면9e



도면10



a

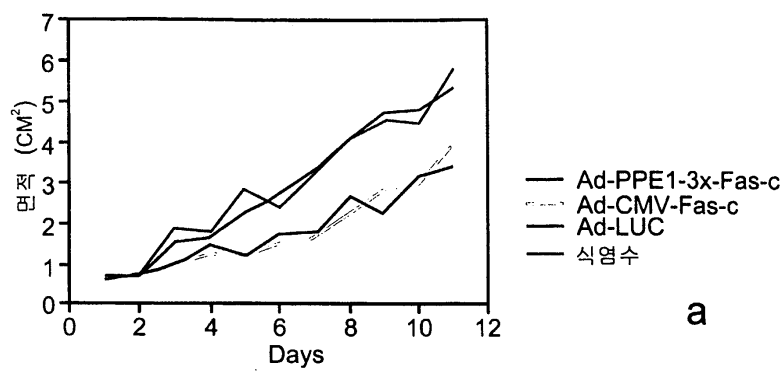


b

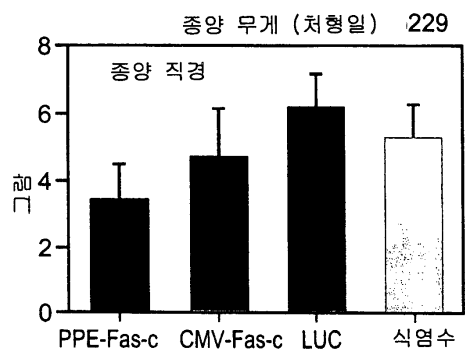
c

d

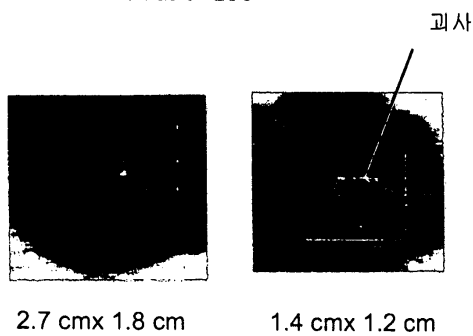
도면11



a

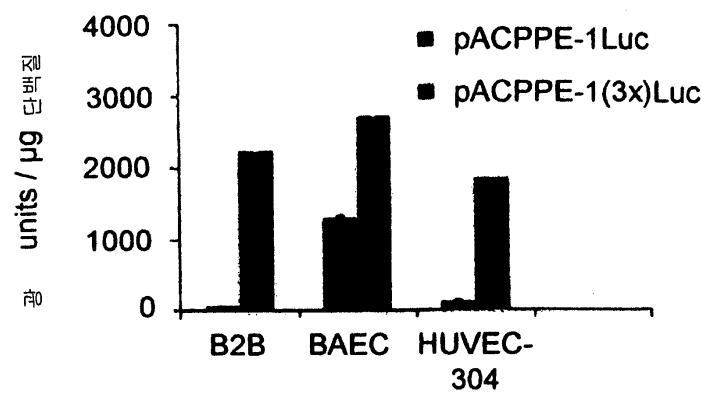


b

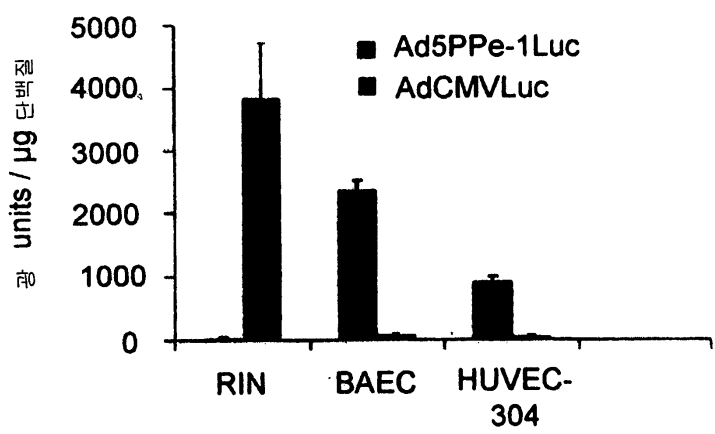


c

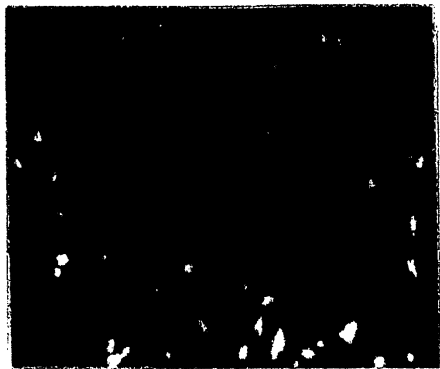
도면12



도면13



도면14

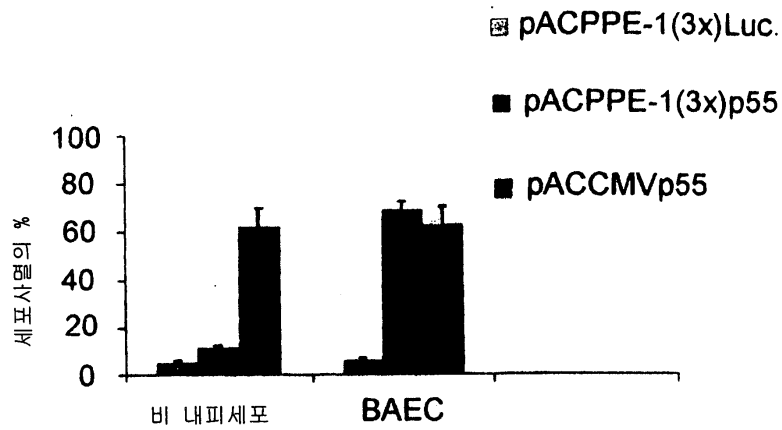


a

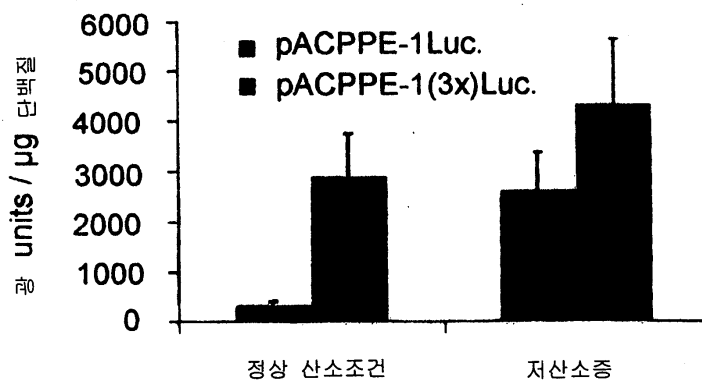


b

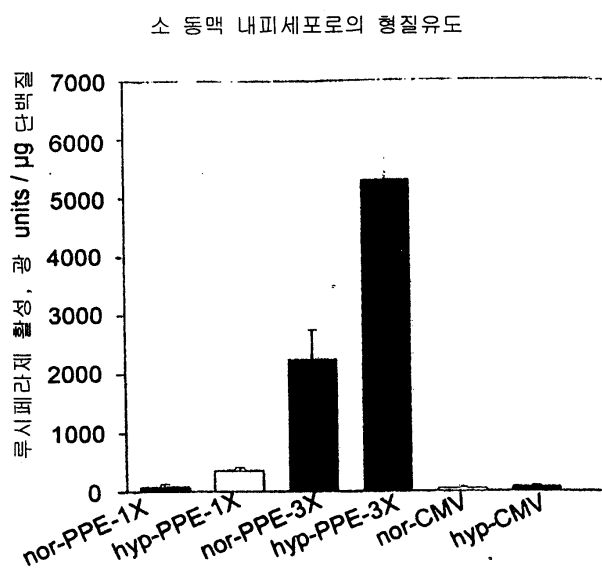
도면15



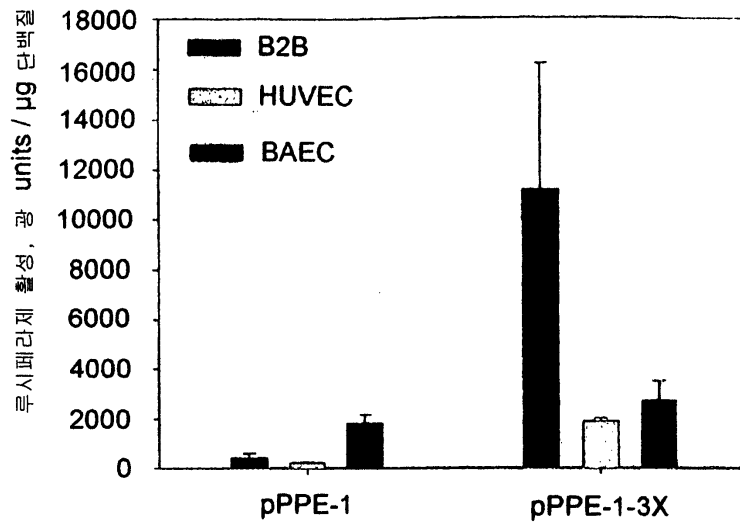
도면16



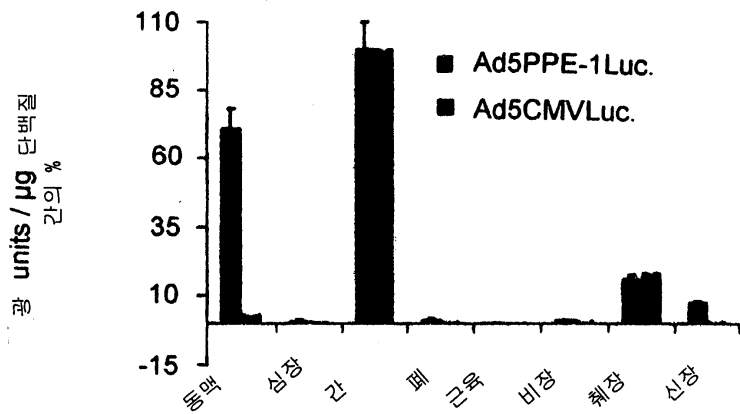
도면17



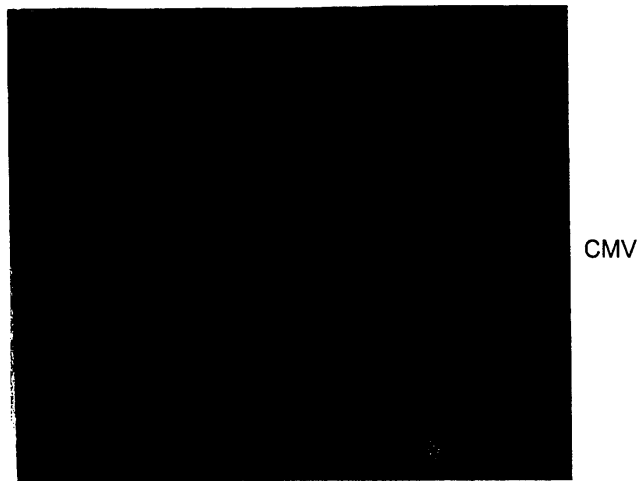
도면18



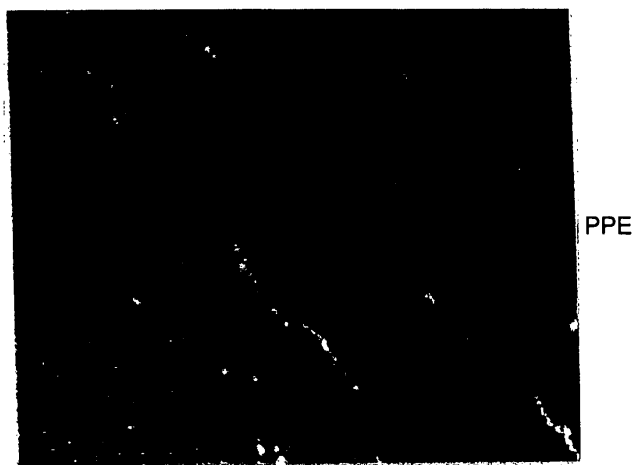
도면19



도면20

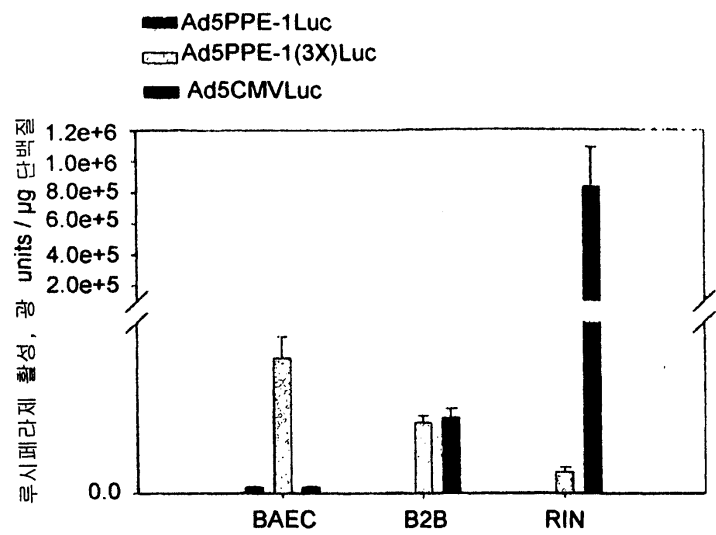


a

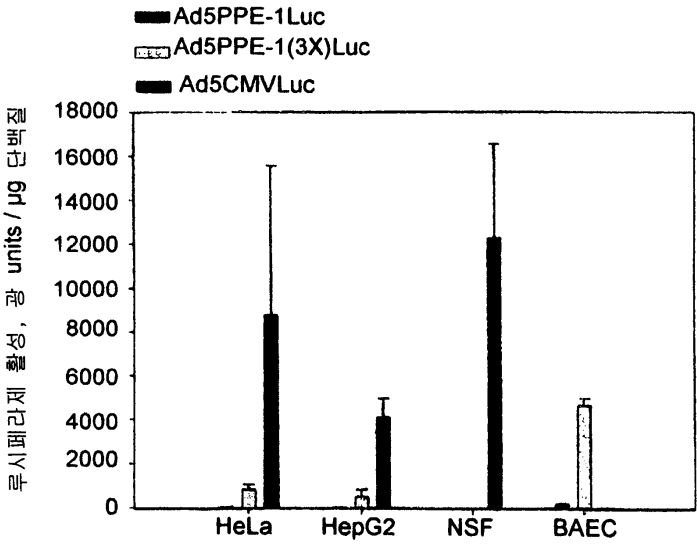


b

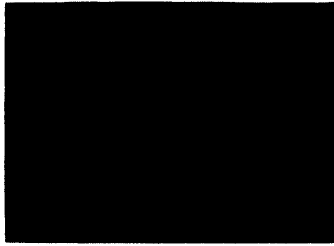
도면21



도면22



도면23



a



b

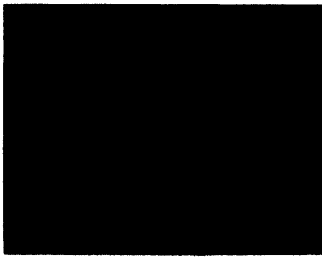


c

도면24



a

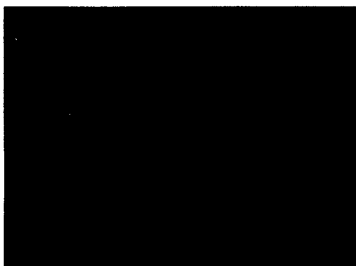


b

도면25

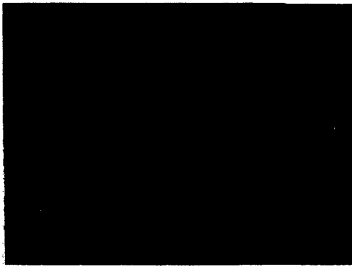


a

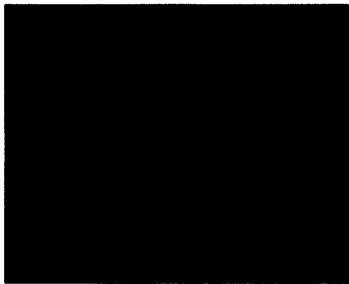


b

도면26

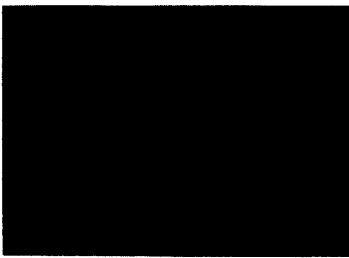


a

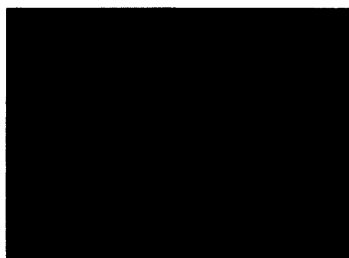


b

도면27

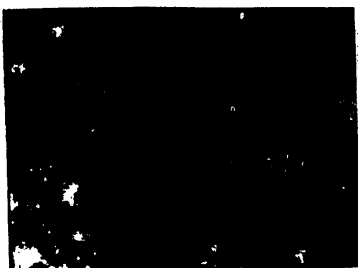


a

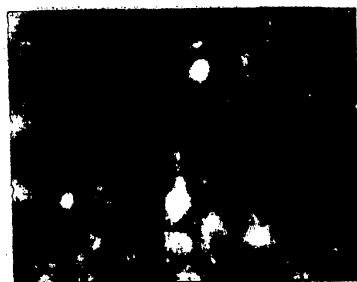


b

도면28

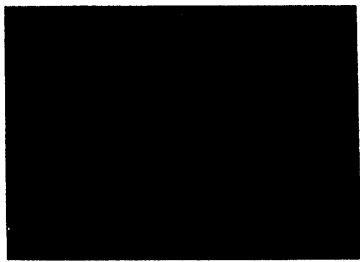


a



b

도면29



a



b

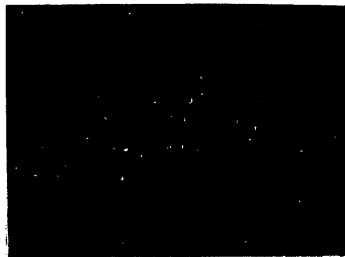


c

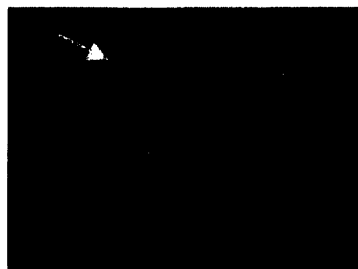
도면30



a

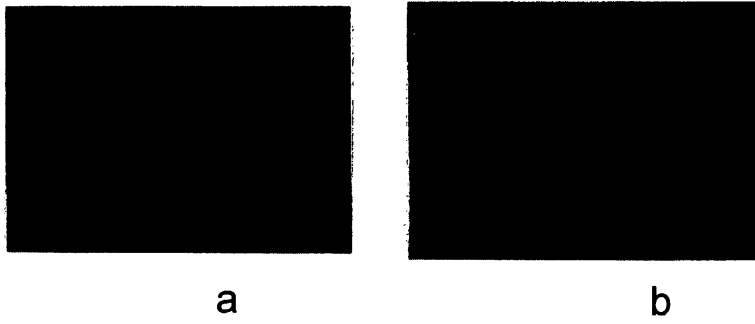


b

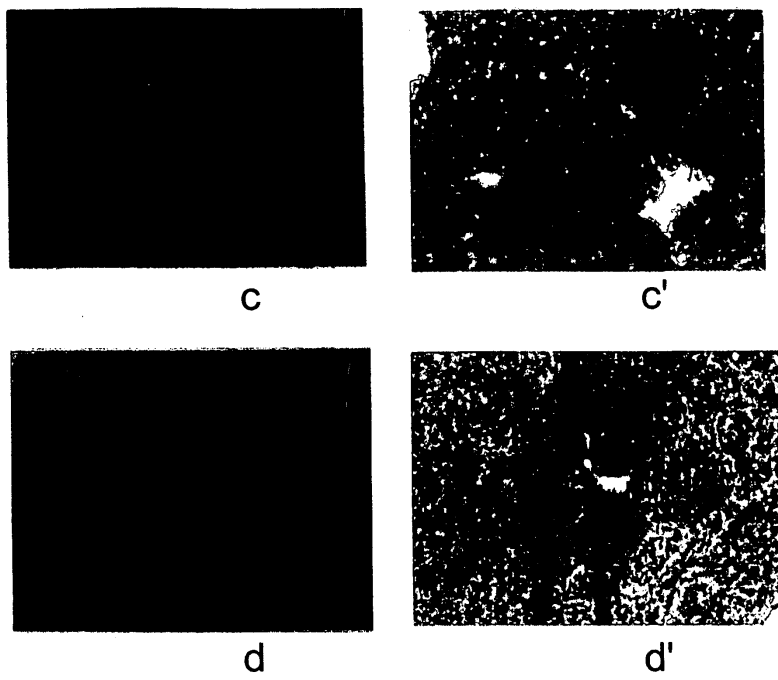


c

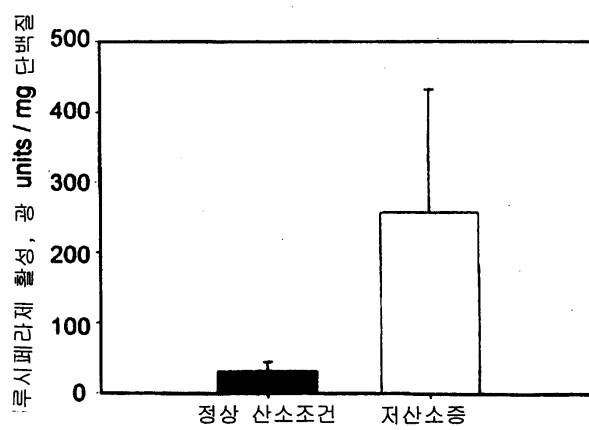
도면31ab



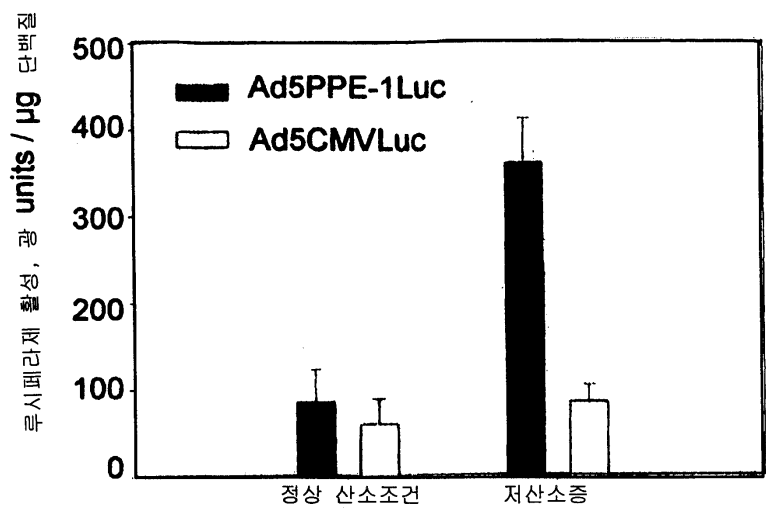
도면31cd



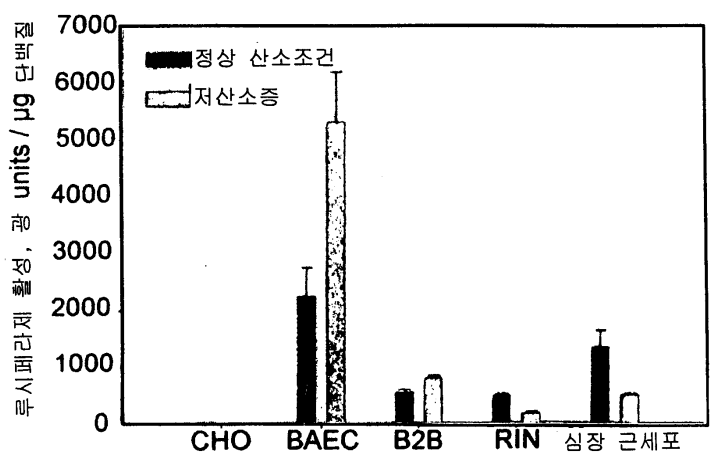
도면32



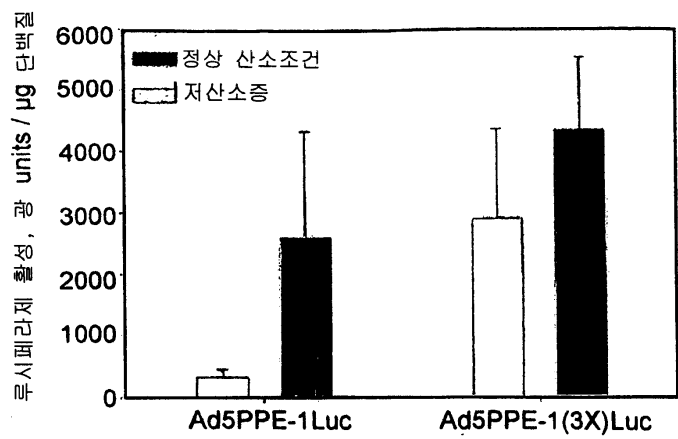
도면33



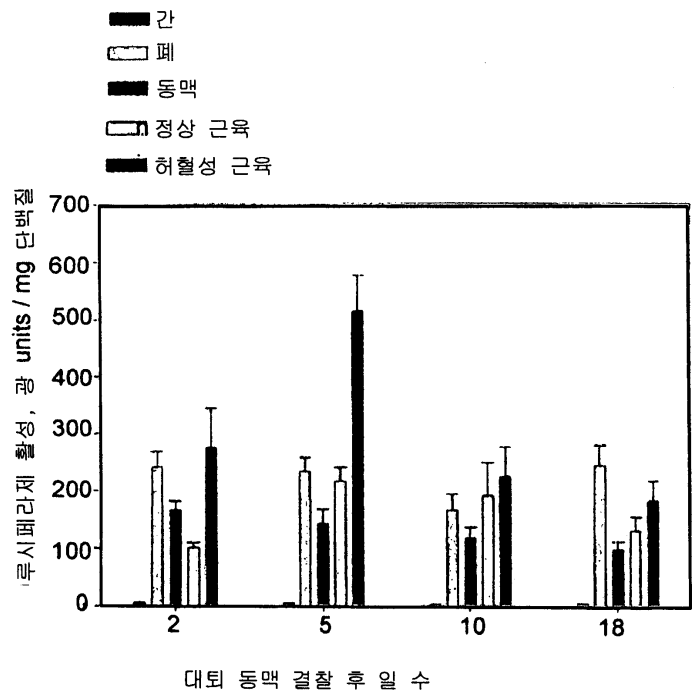
도면34



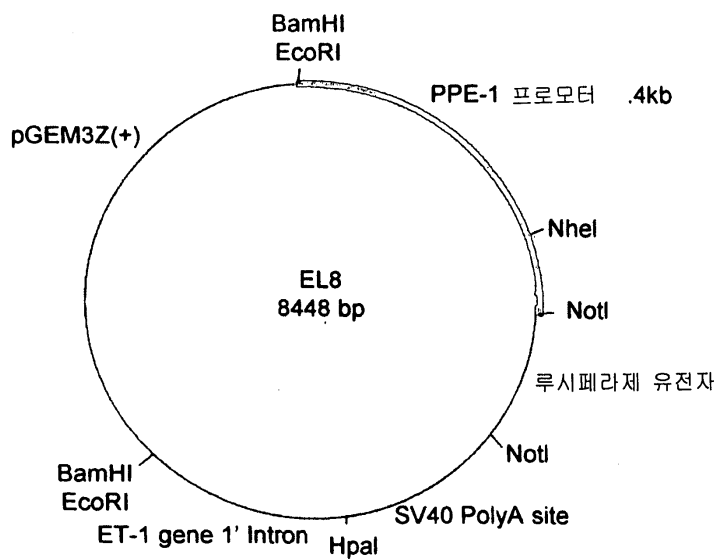
도면35



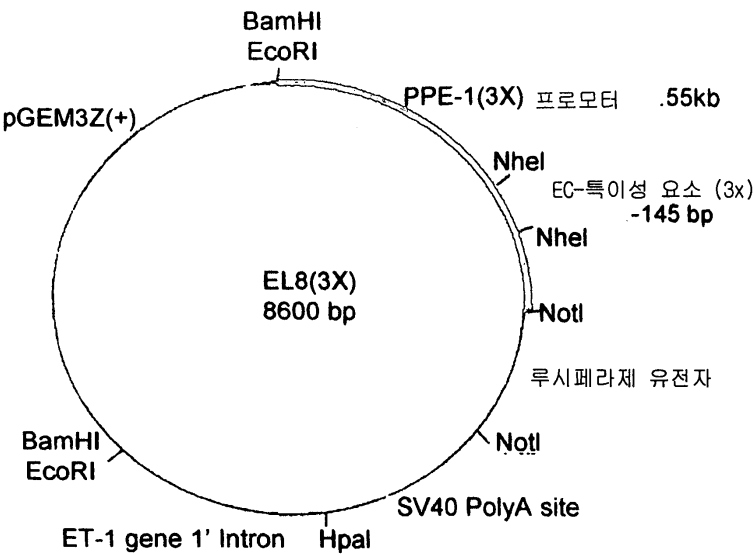
도면36



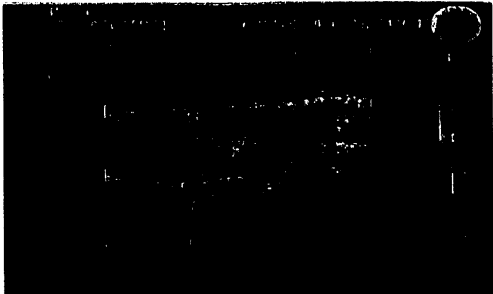
도면37a



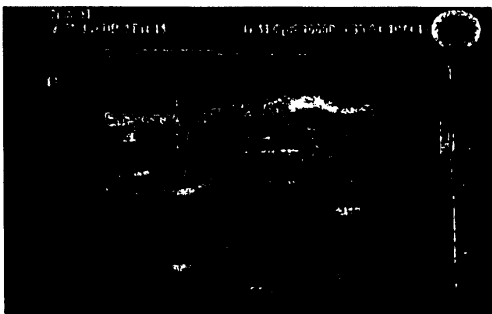
도면37b



도면38a



도면38b



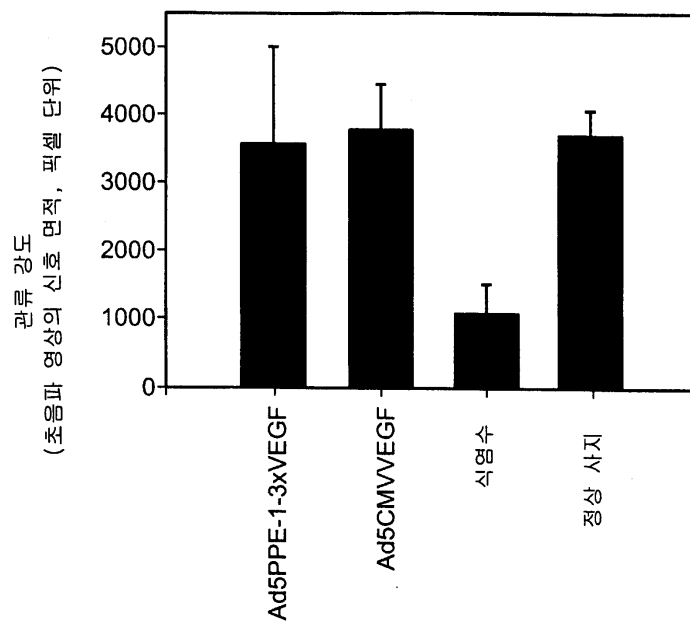
도면38c



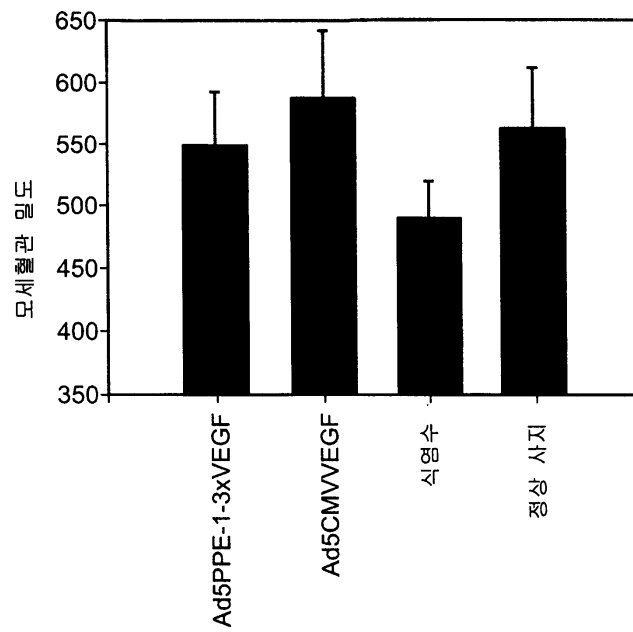
도면38d



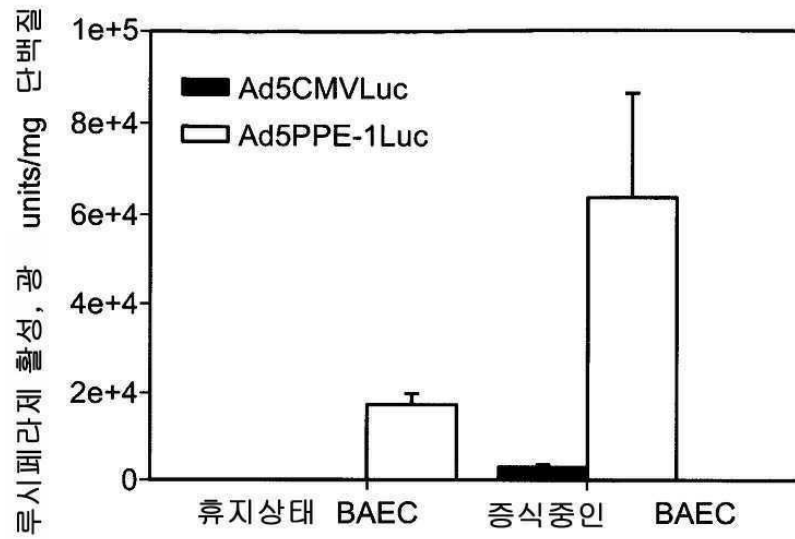
도면38e



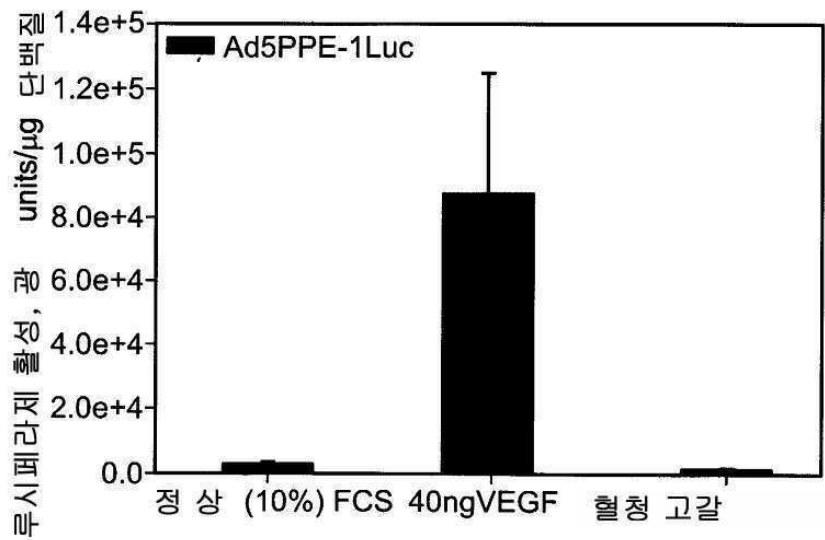
도면38f



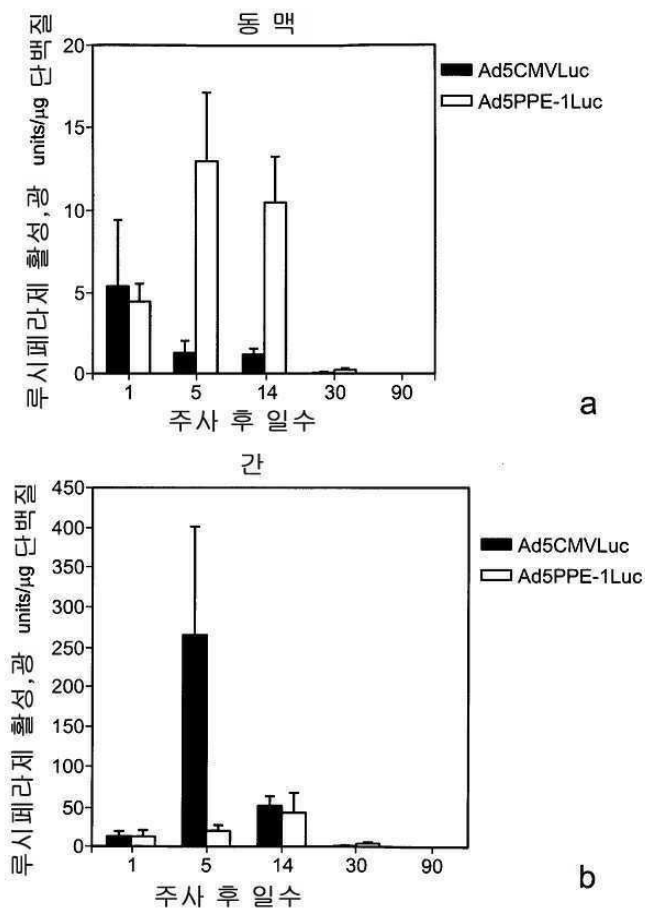
도면39



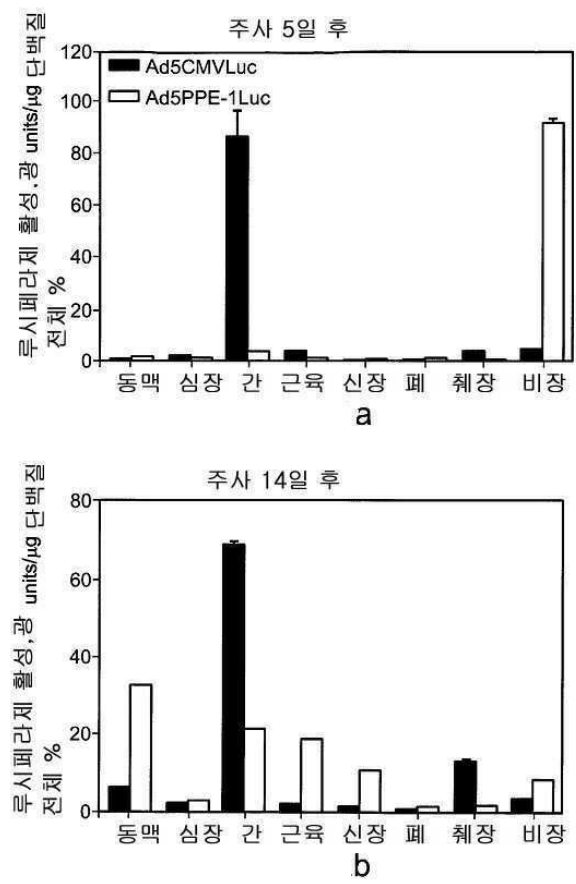
도면40



도면41



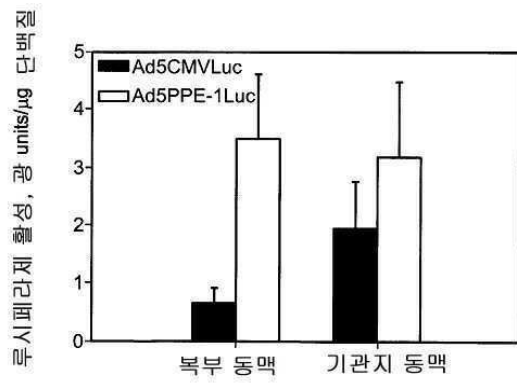
도면42



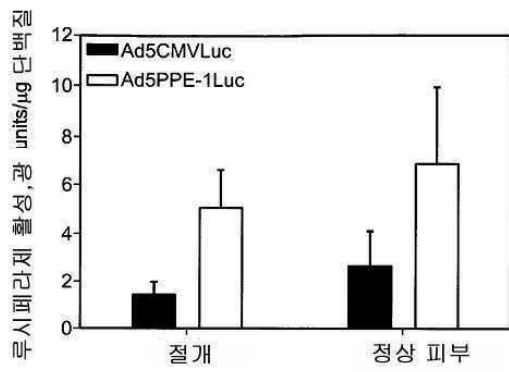
도면43



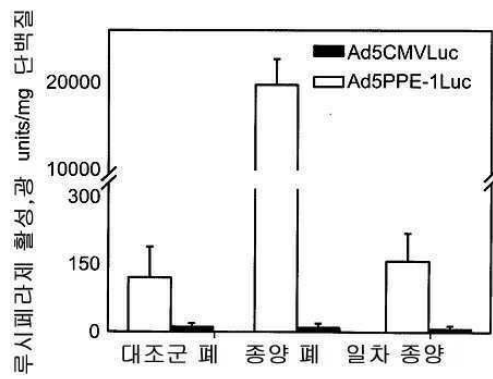
도면44



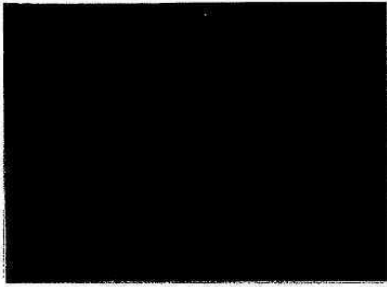
도면45



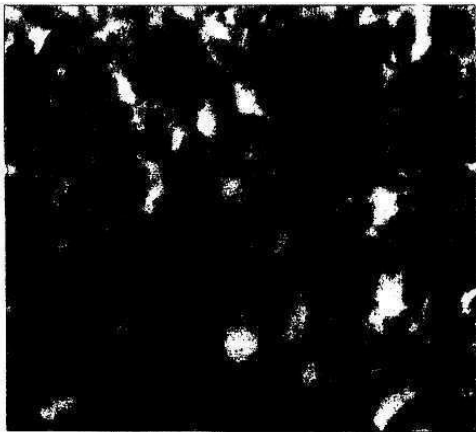
도면46



도면47ab

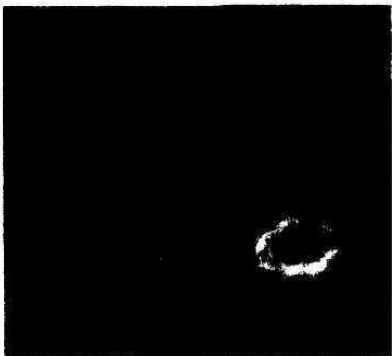


a

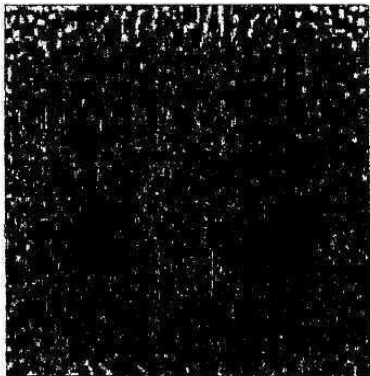


b

도면47cd

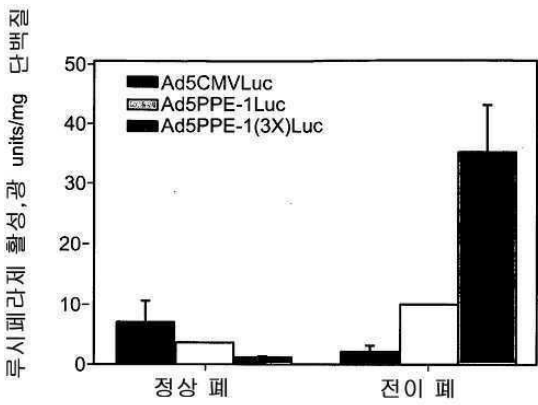


c

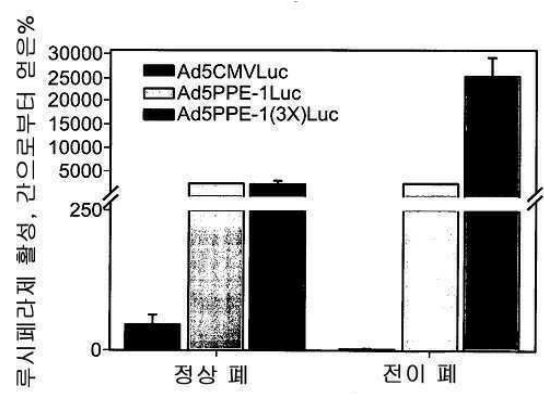


d

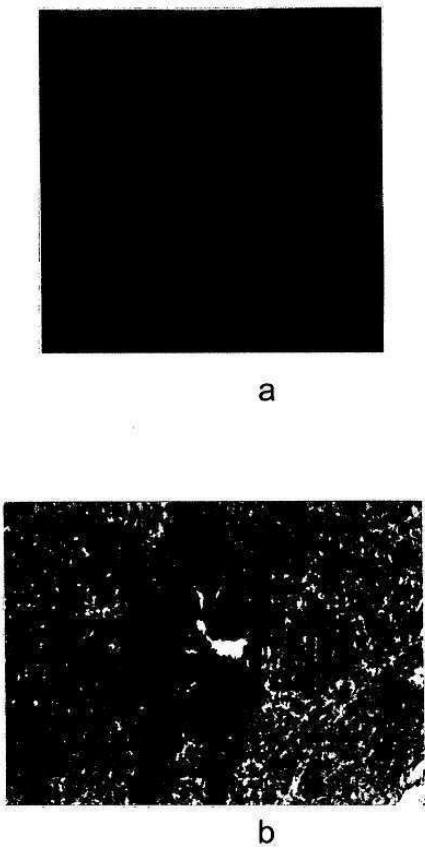
도면48



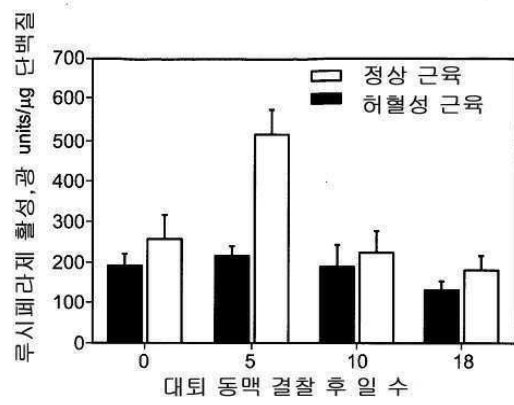
도면49



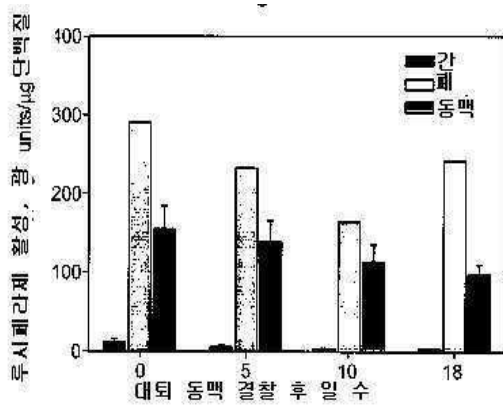
도면50



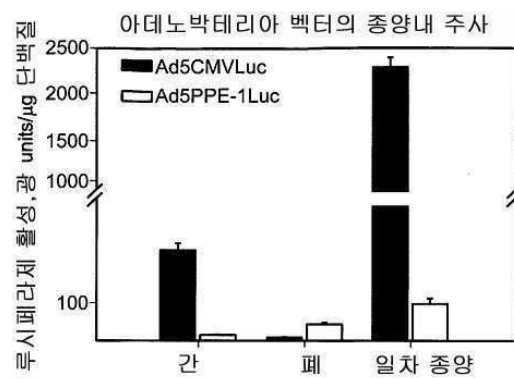
도면51



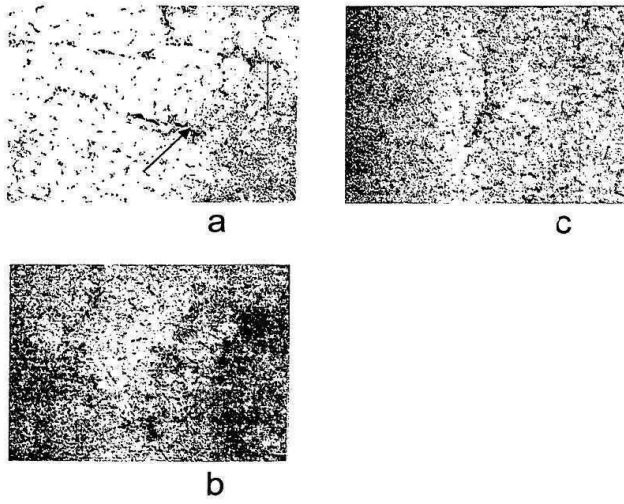
도면52



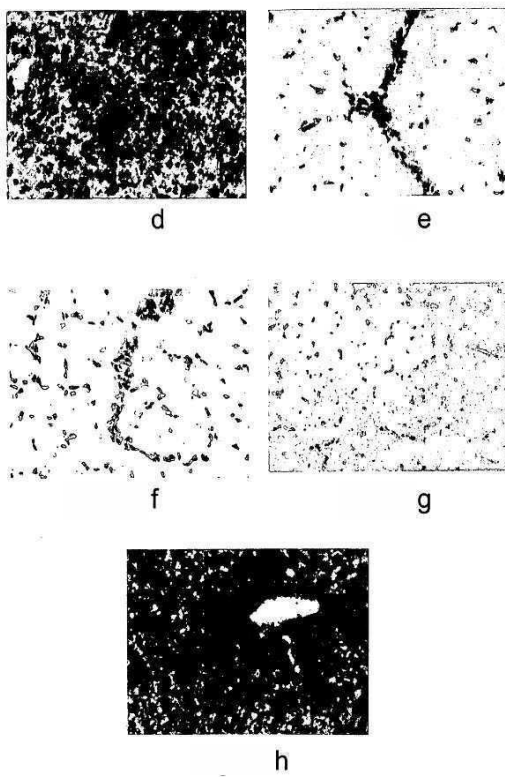
도면53



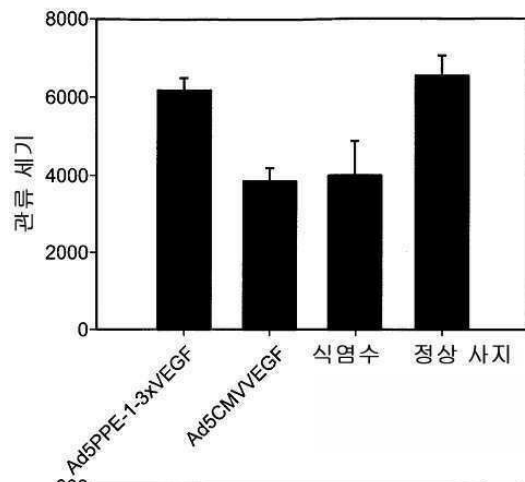
도면54abc



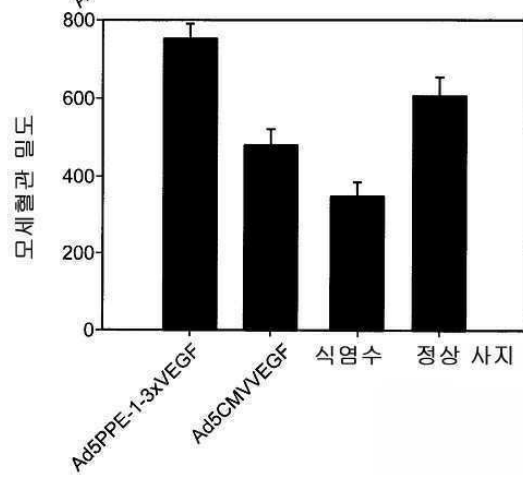
도면54def



도면55

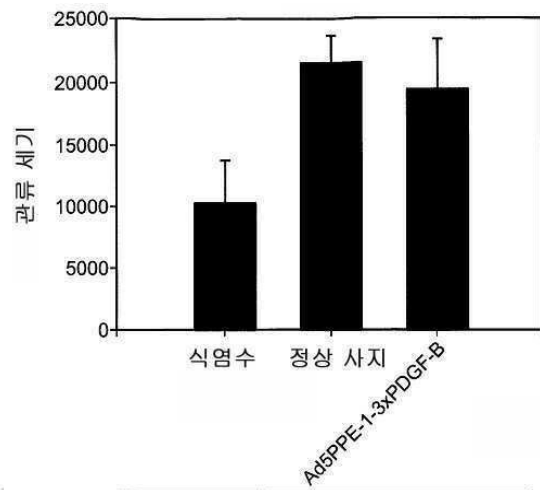


a

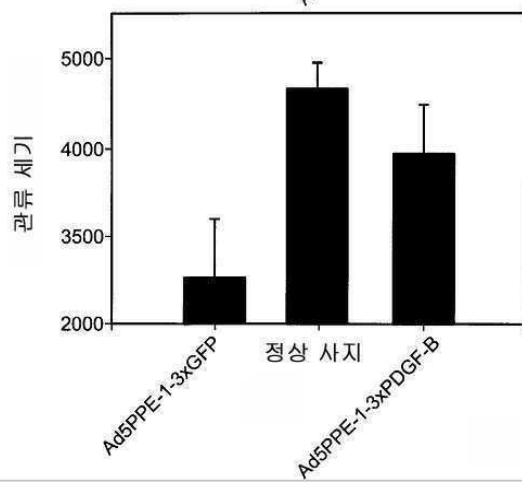


b

도면56ab

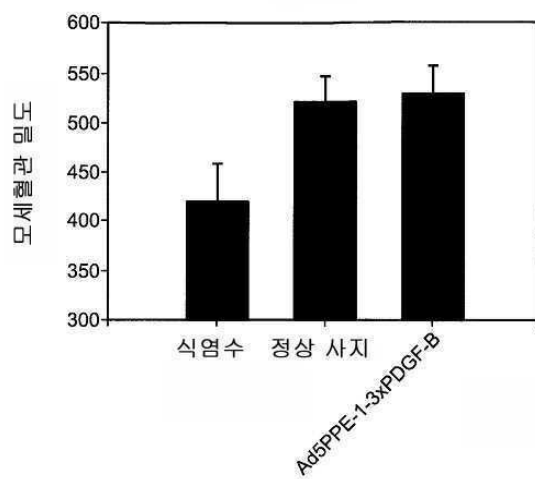


a



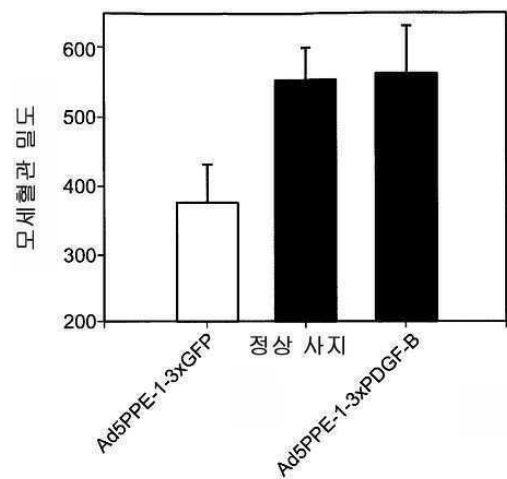
b

도면56c



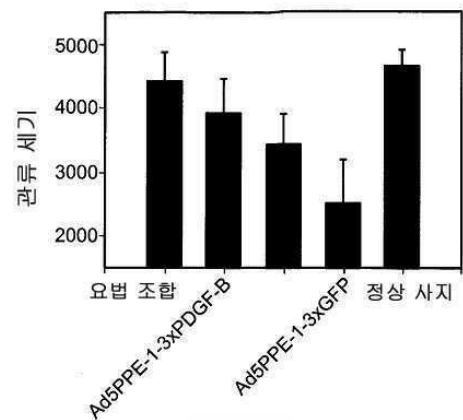
c

도면56d

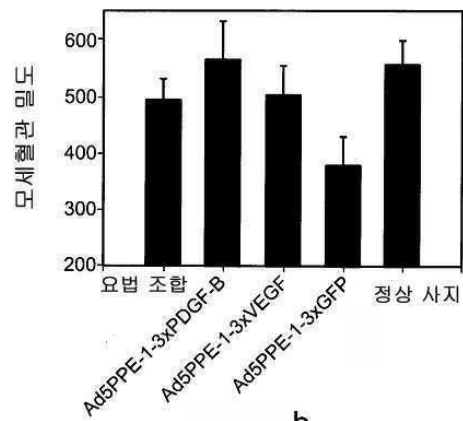


d

도면57ab



a

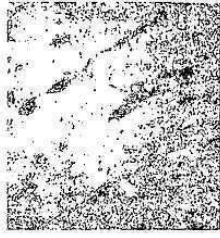


b

도면57cd



c

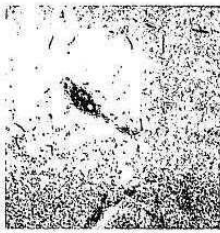


d

도면57ef



e



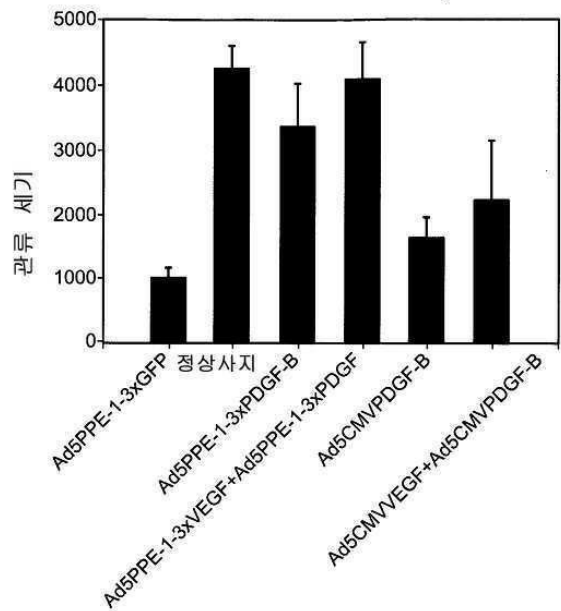
f

도면57g

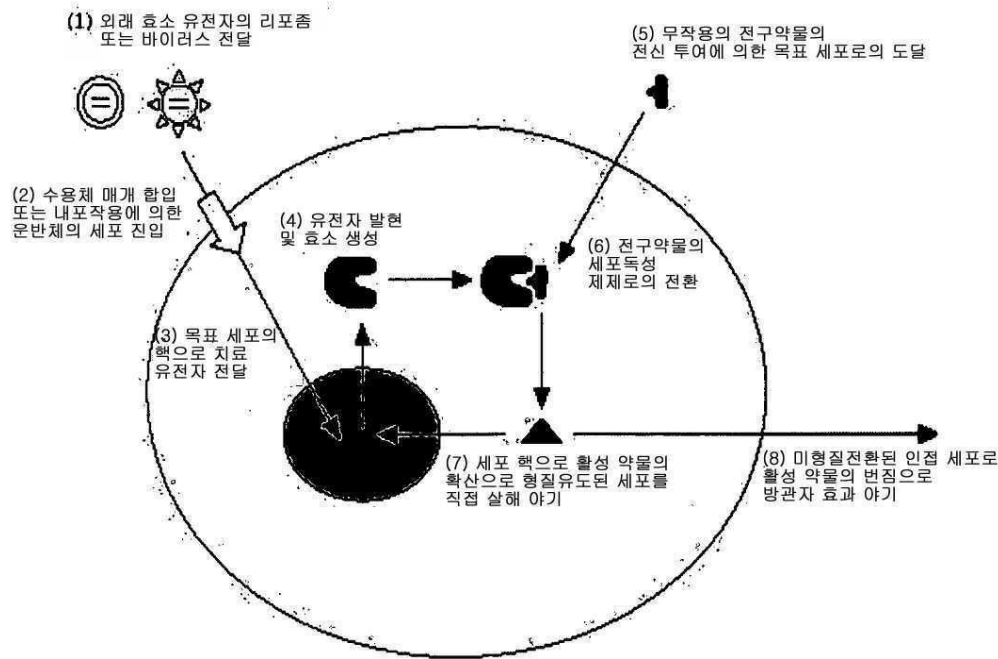


g

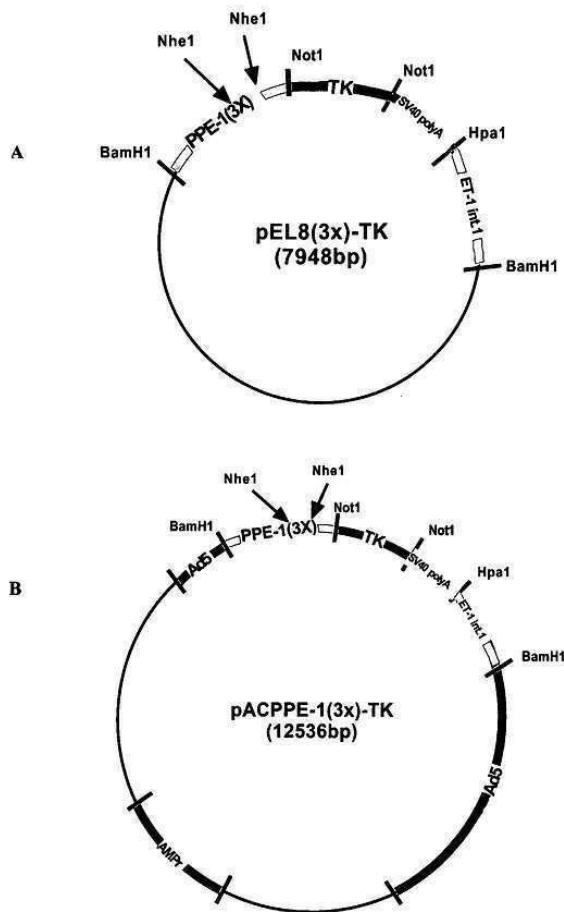
도면58



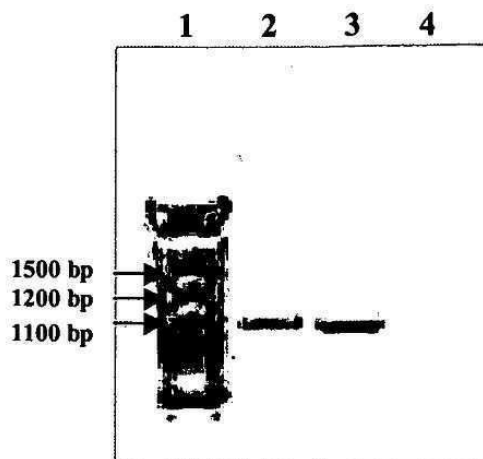
도면59



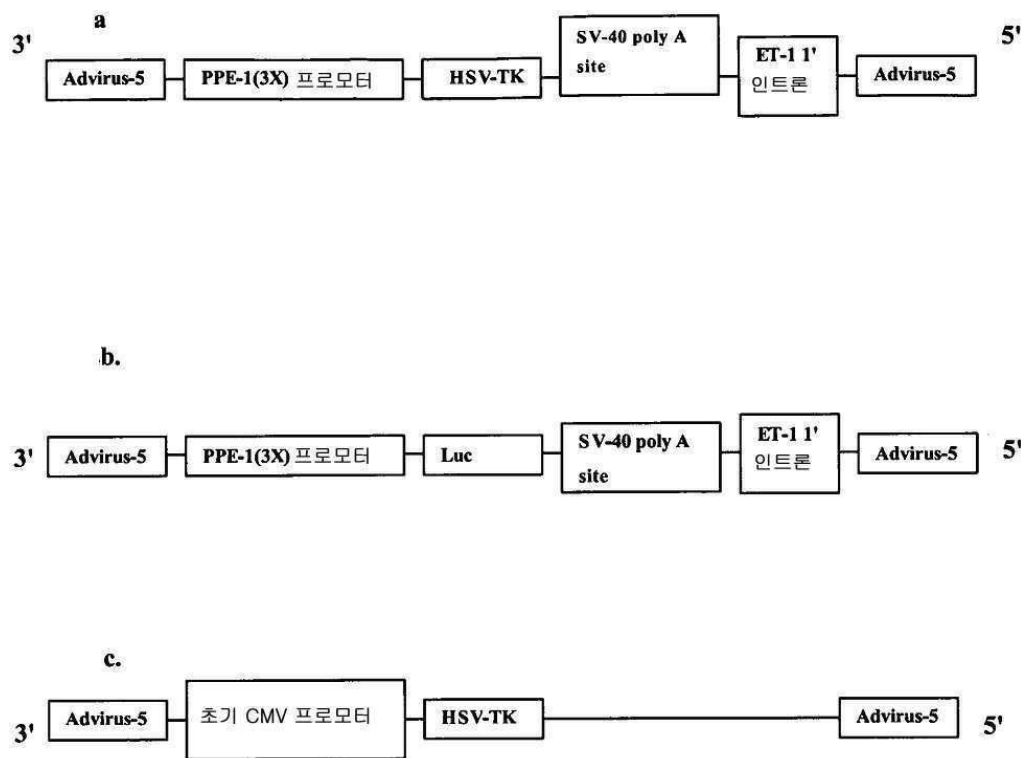
도면60



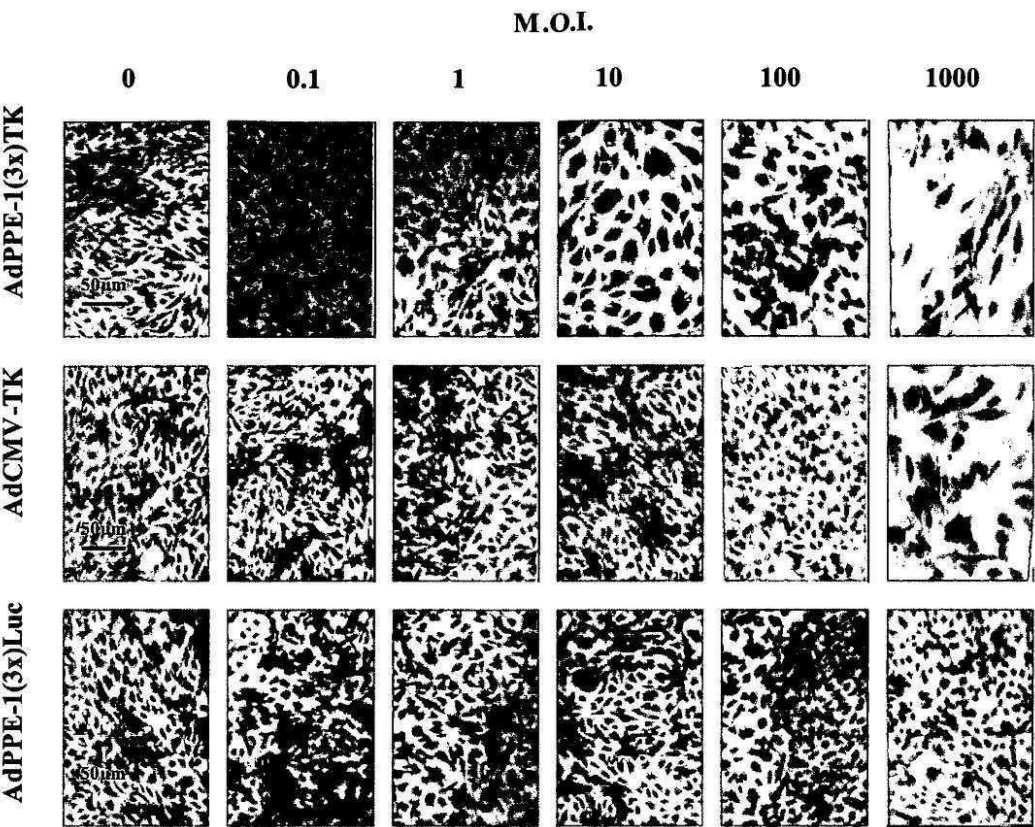
도면61



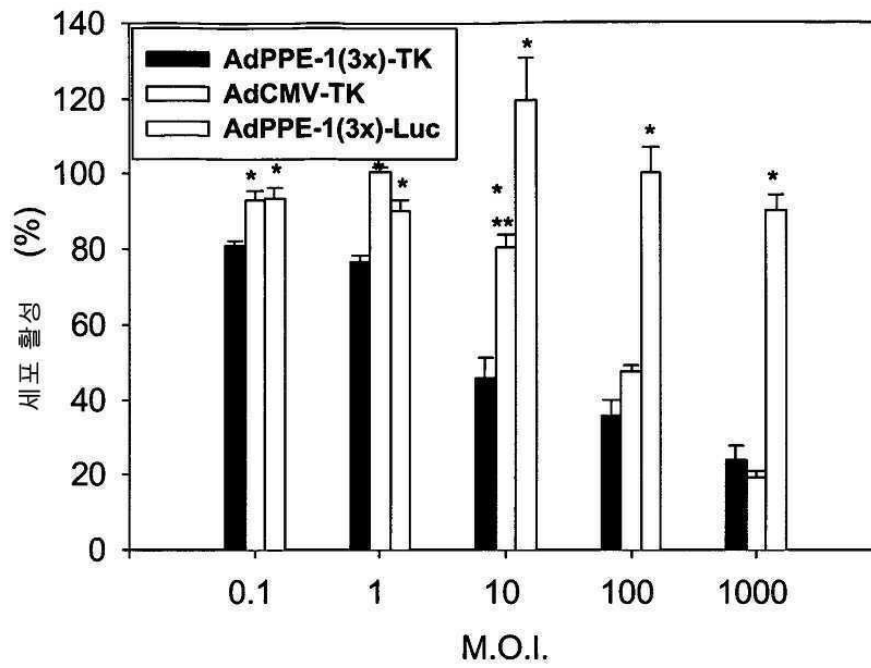
도면62



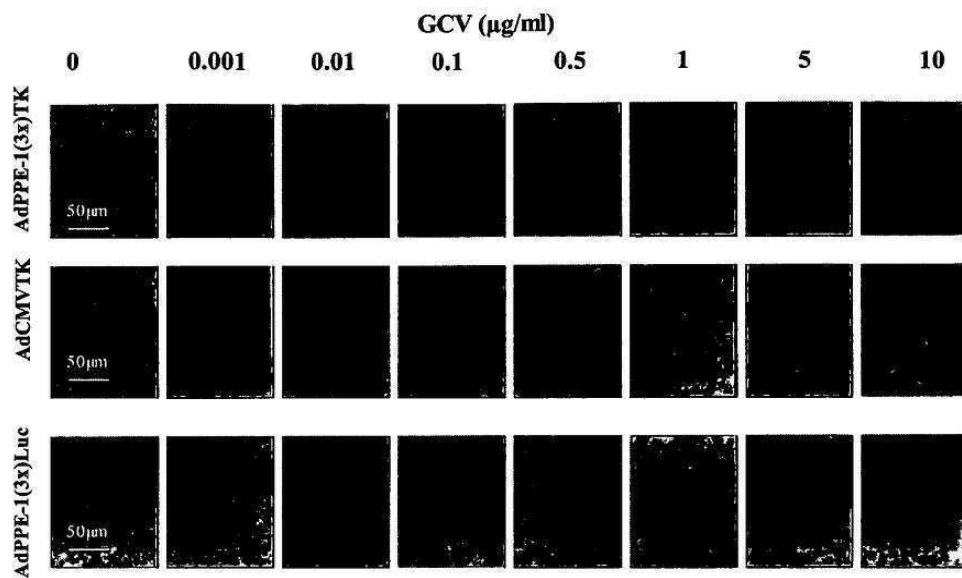
도면63



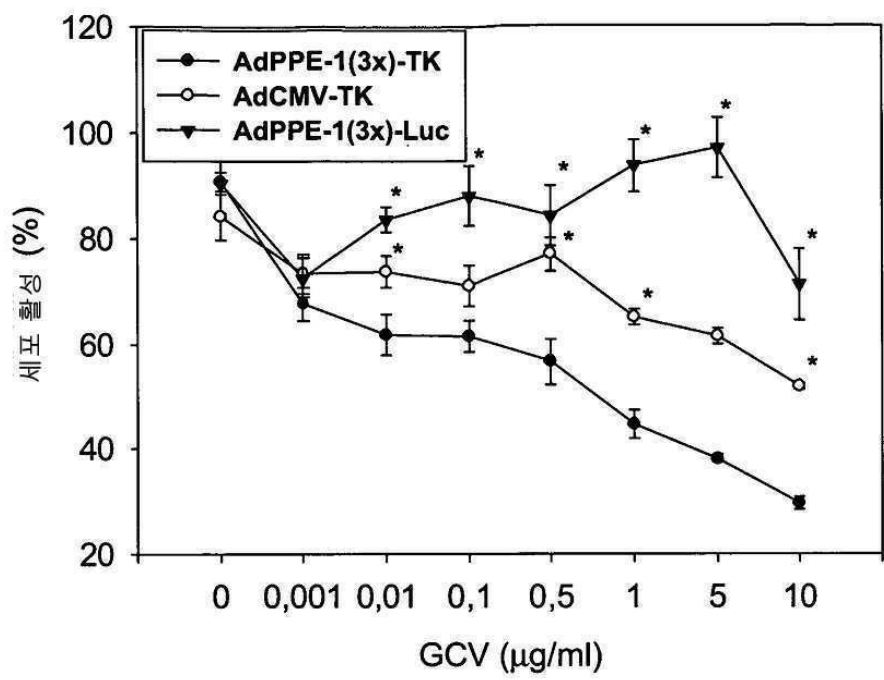
도면64



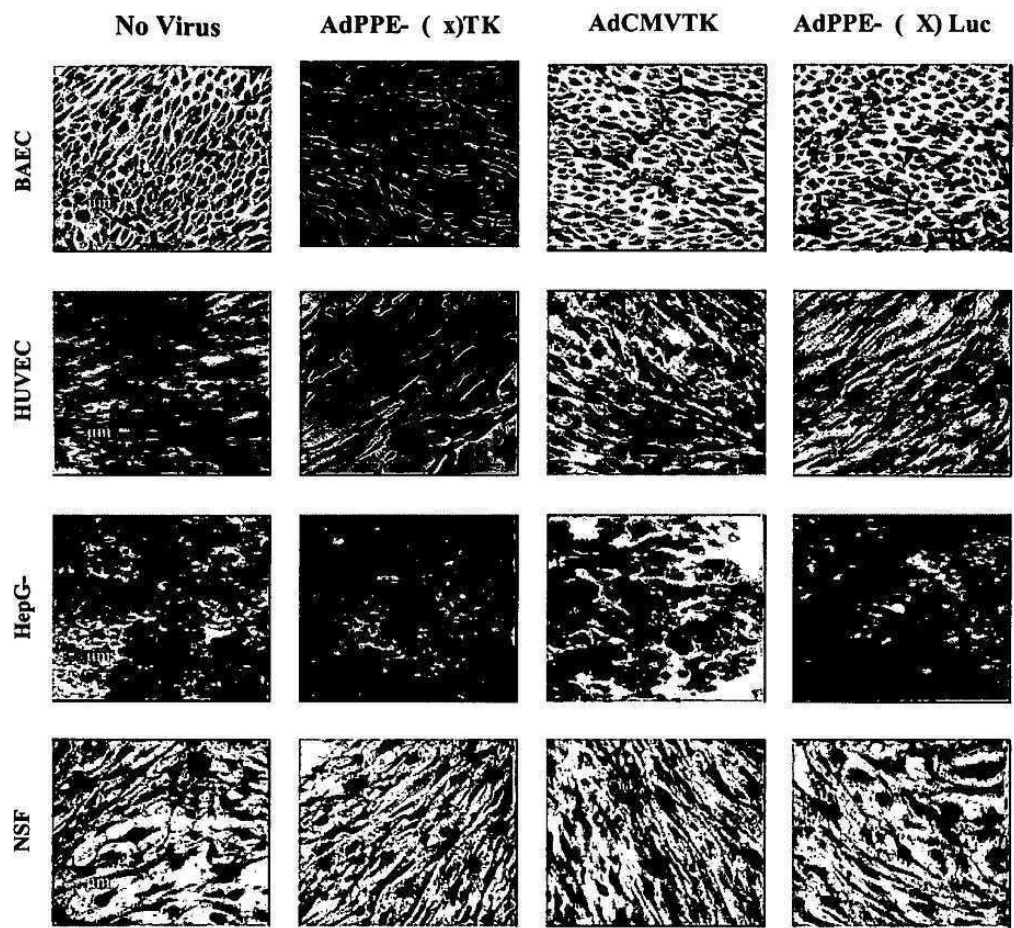
도면65



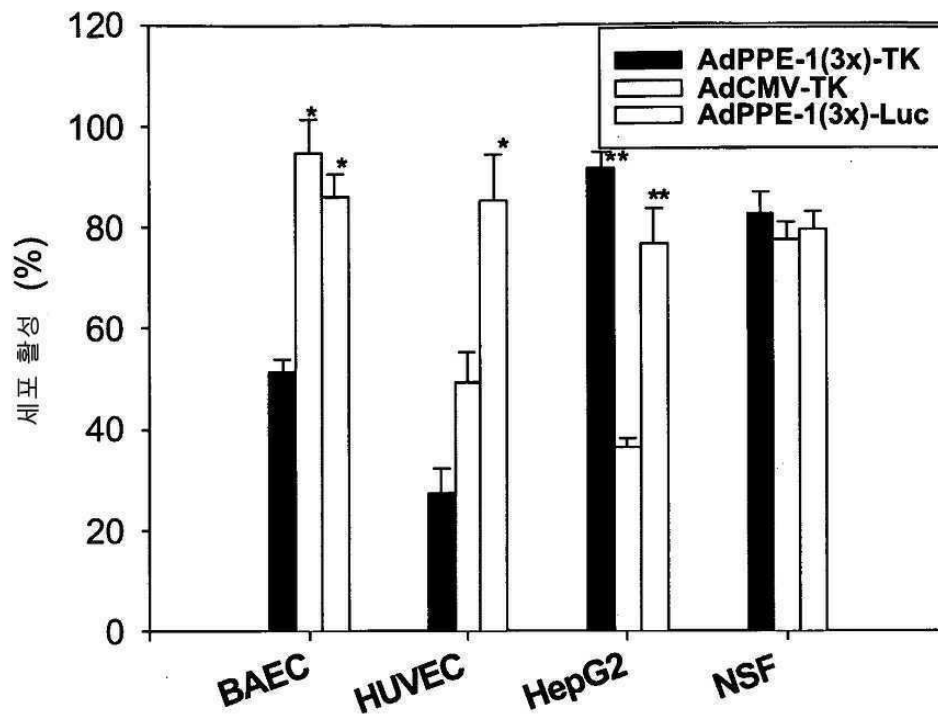
도면66



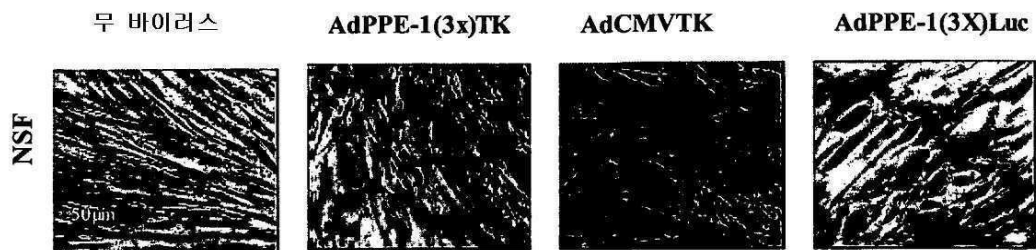
도면67



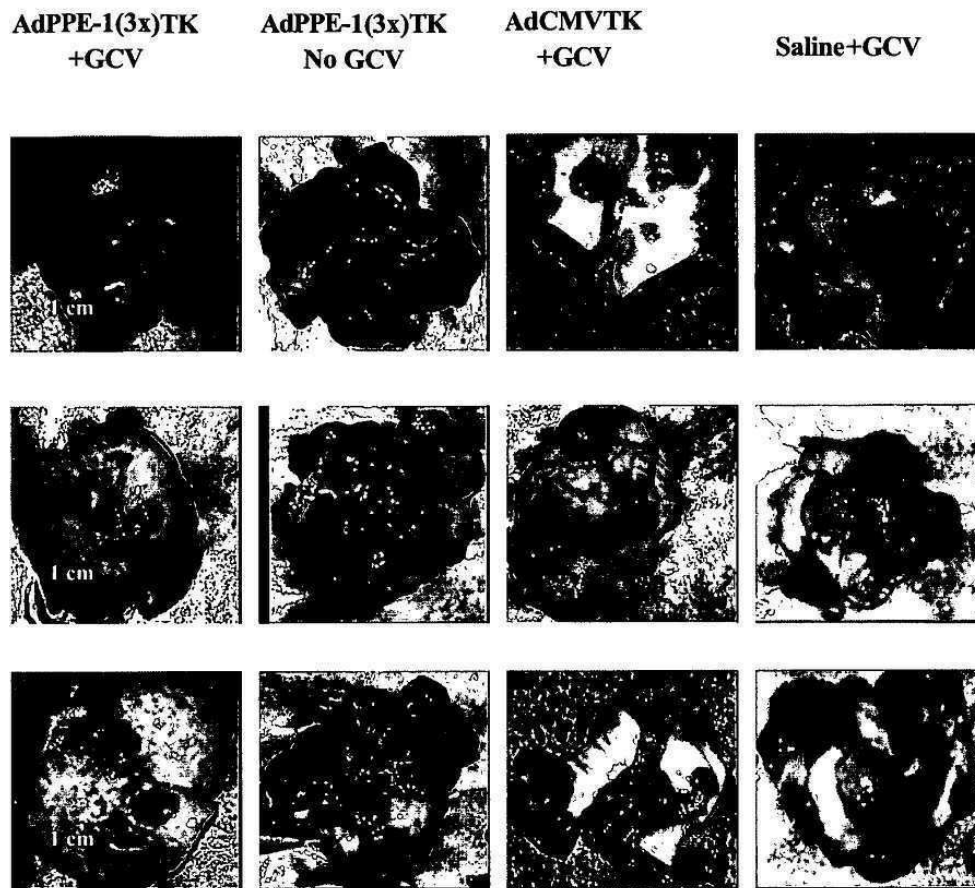
도면68



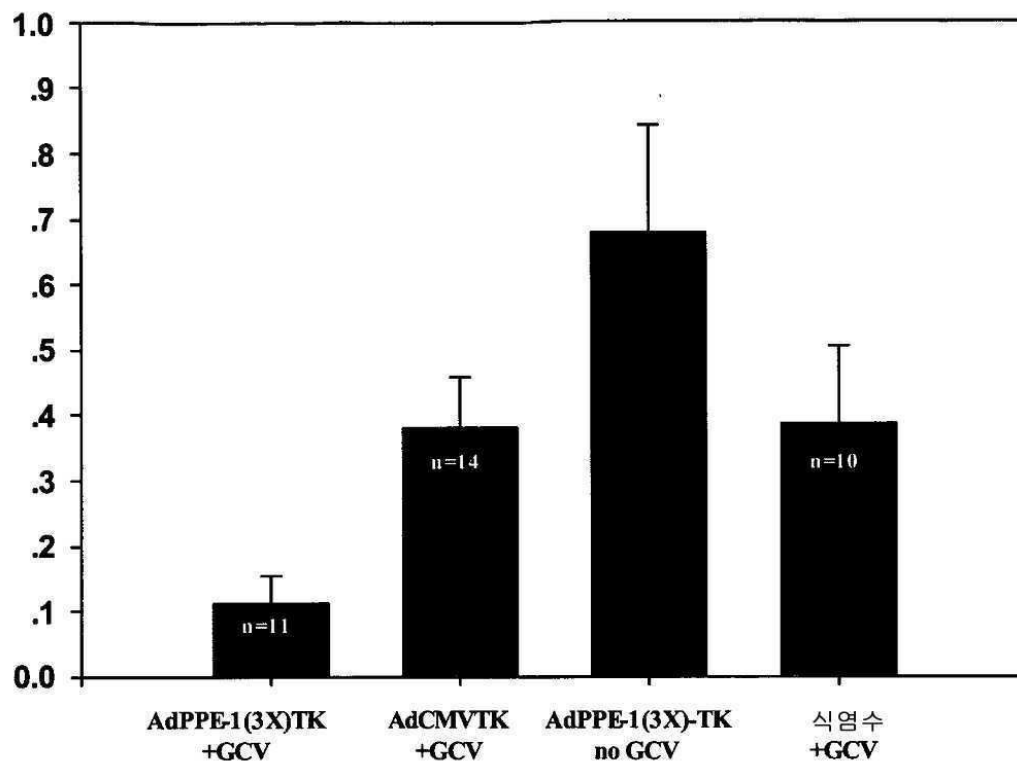
도면69



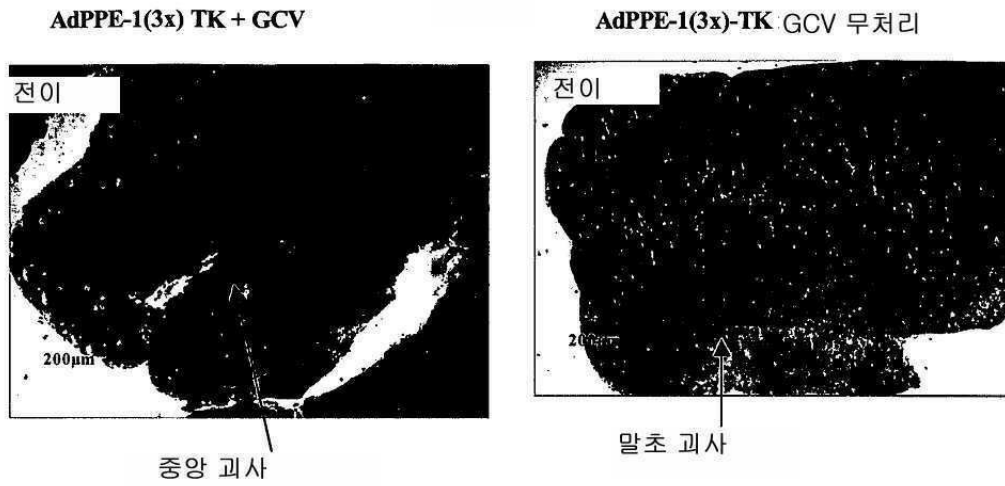
도면70



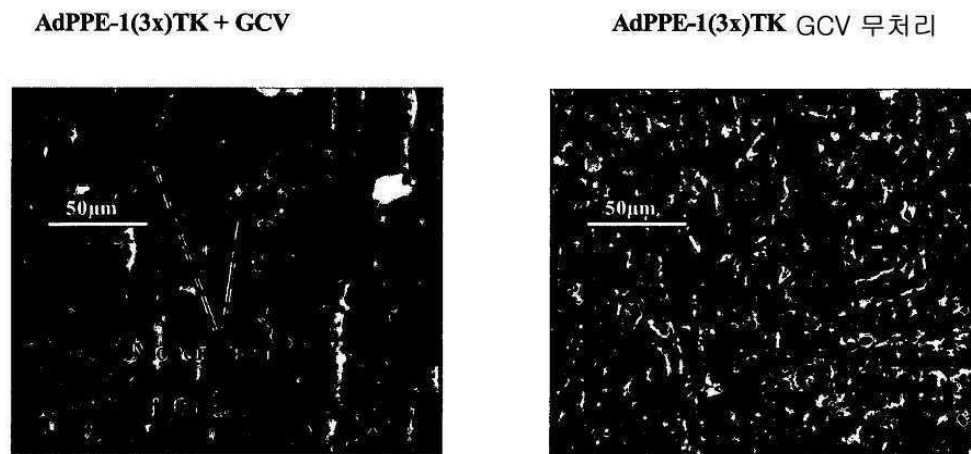
도면71



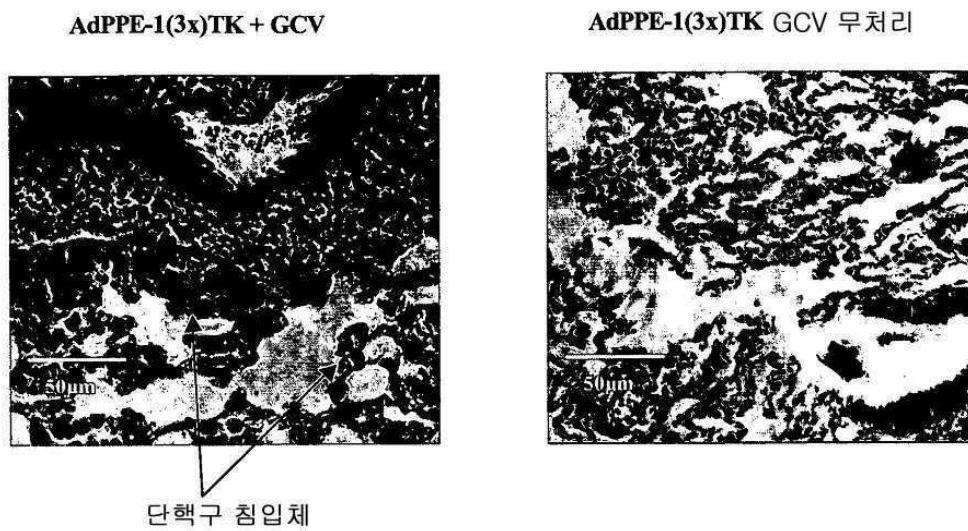
도면72a



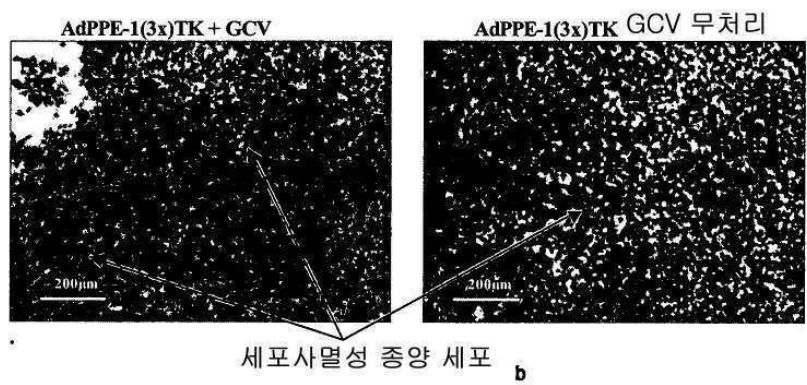
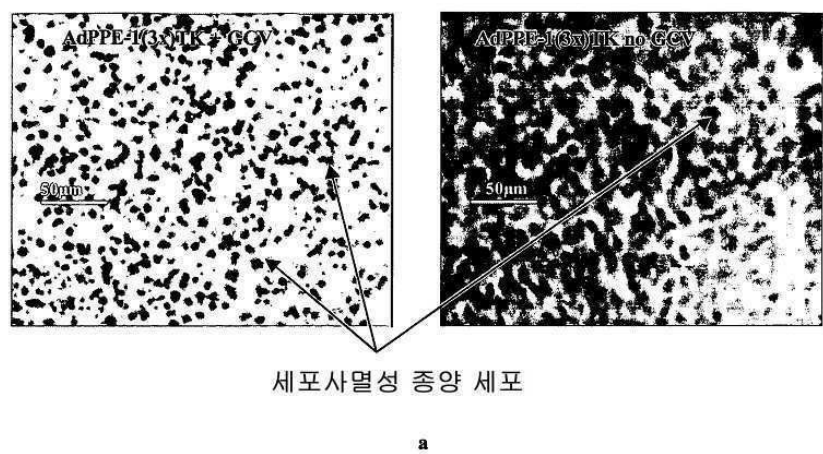
도면72b



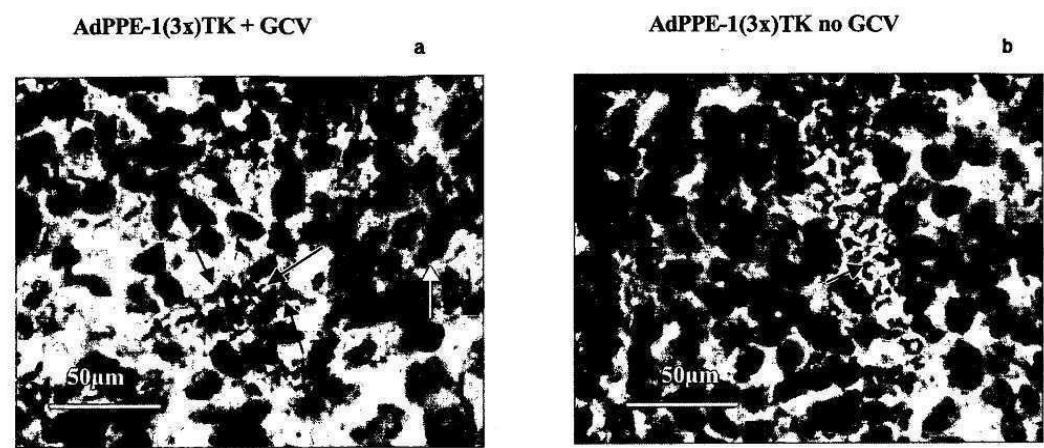
도면72c



도면73

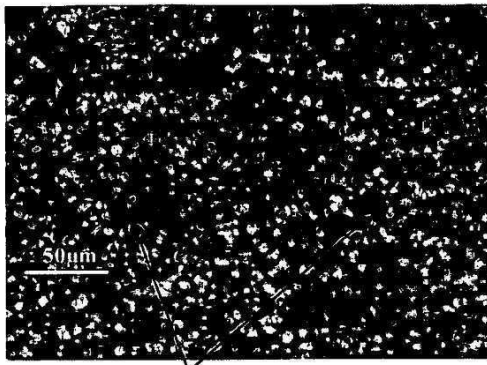


도면74



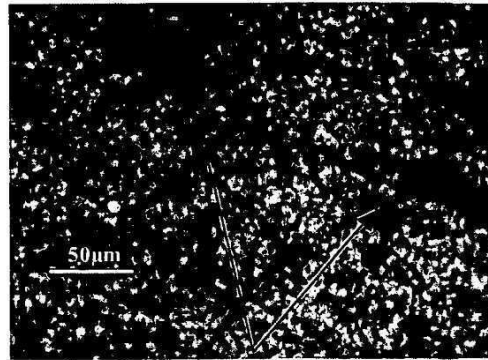
도면75a

AdPPE-1(3x)TK + GCV



연속적이지 않고
분지되지 않은 짧은 혈관

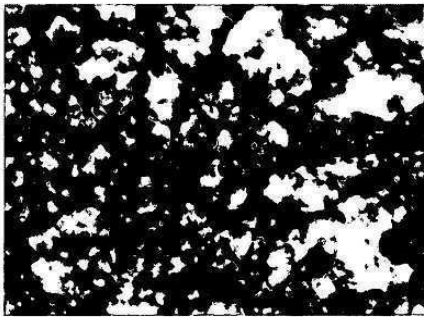
AdPPE-1(3x)TK no GCV



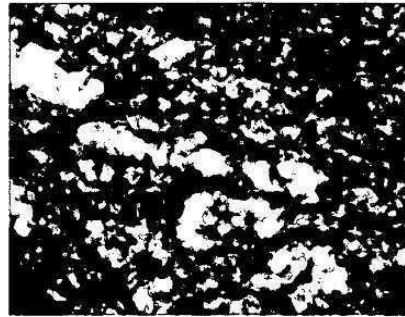
명확히 분리되고
분지된 수 많은 혈관

도면75b

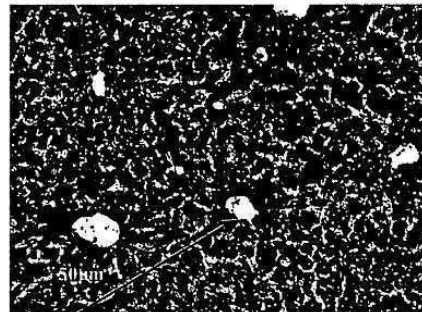
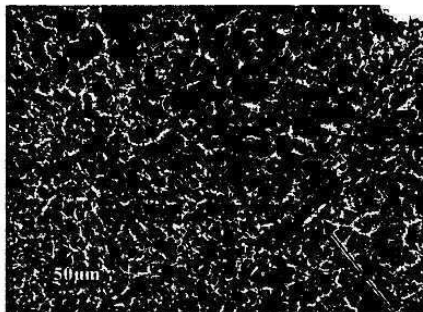
AdPPE-1(3x)TK + GCV



AdPPE-1(3x)TK no GCV

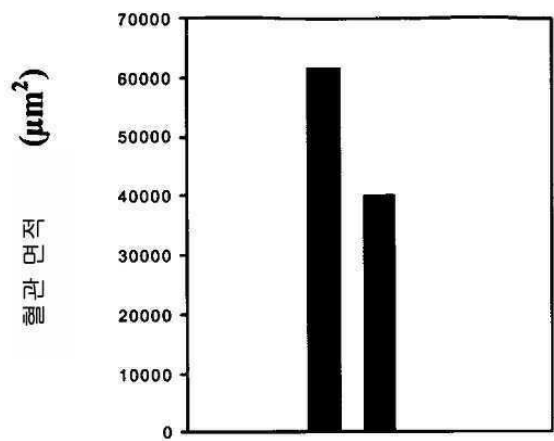


도면75c

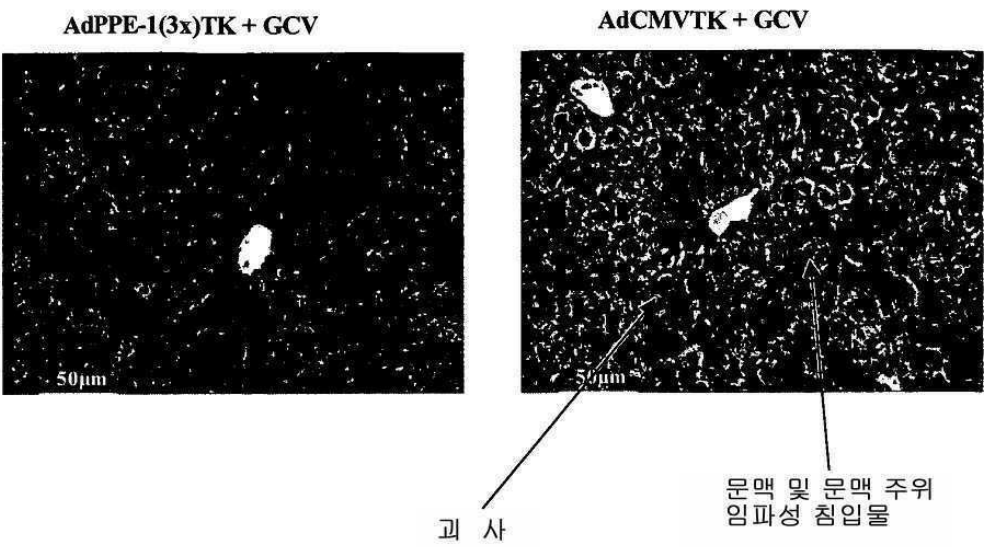


관
제

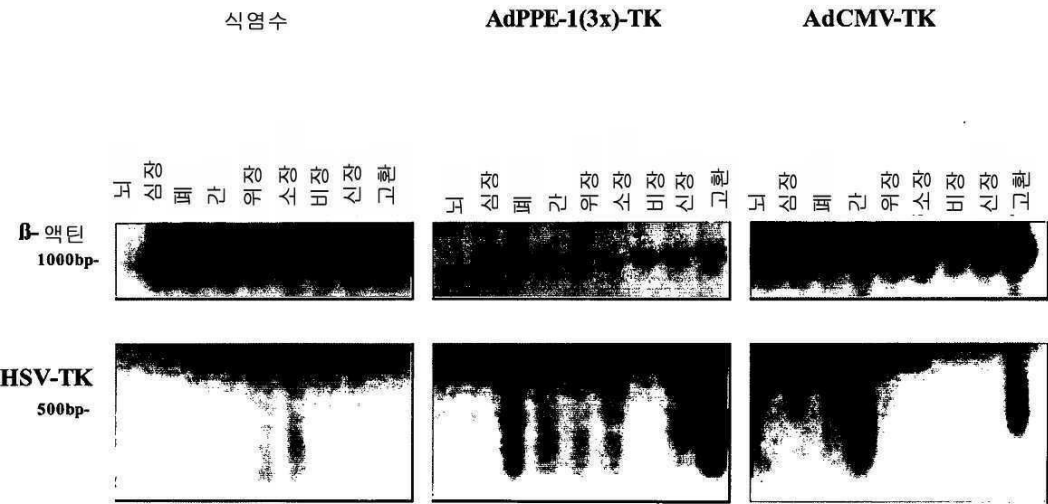
도면75d



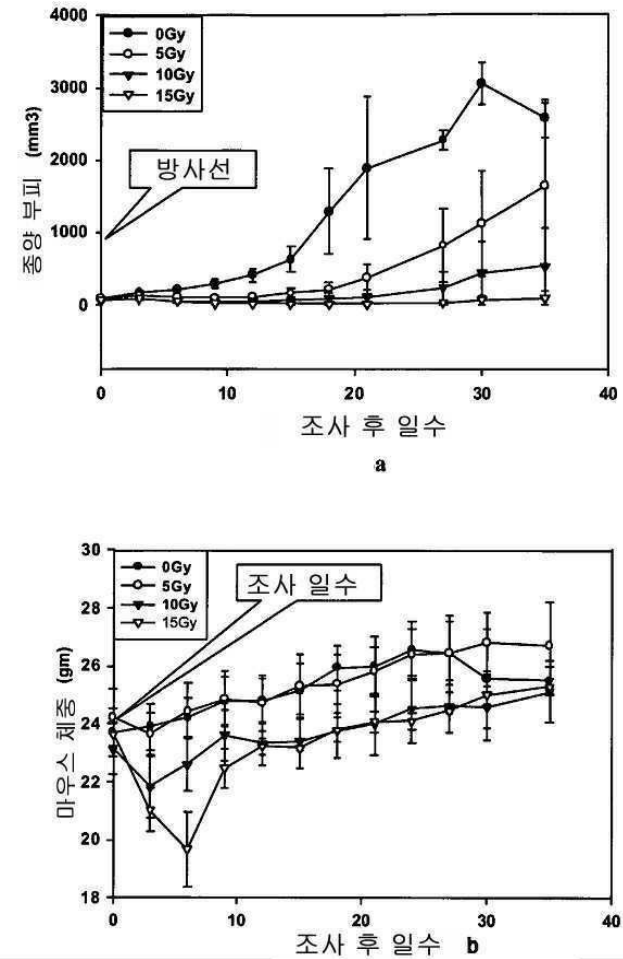
도면76



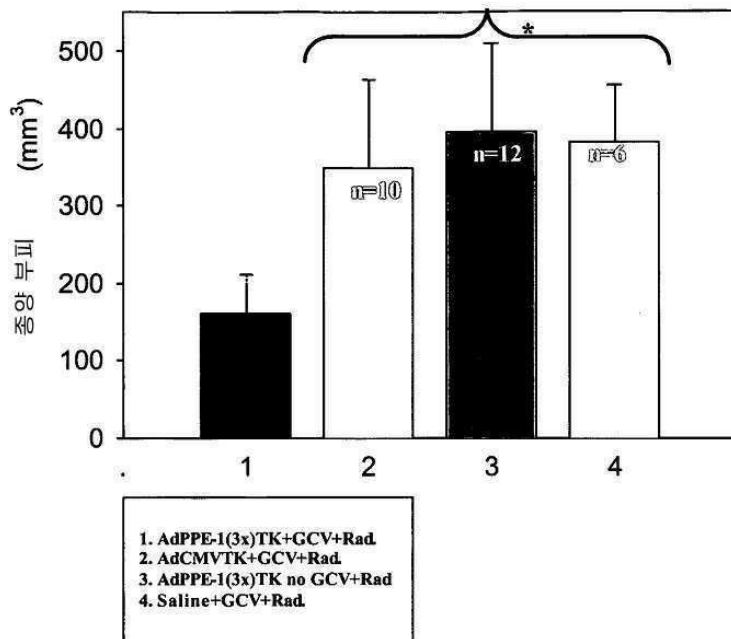
도면77



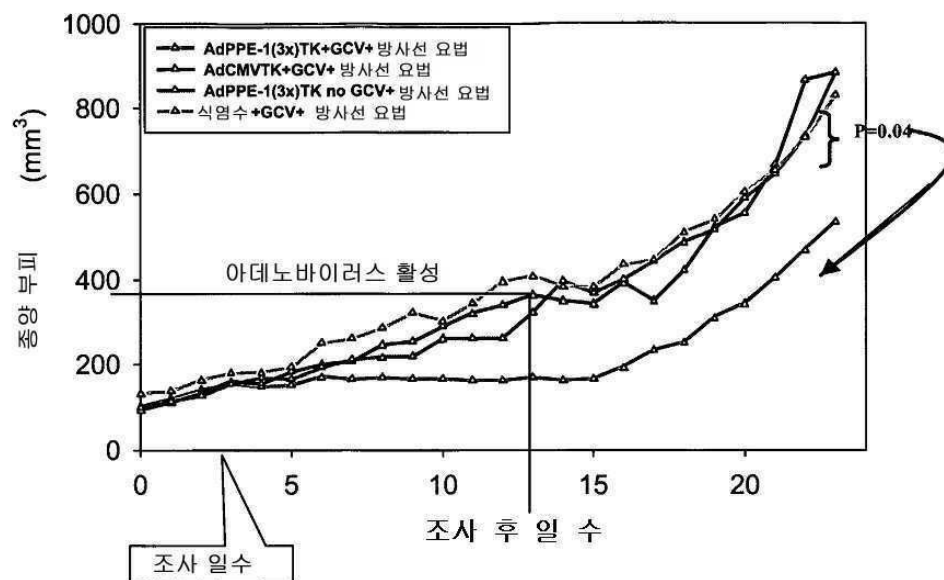
도면78



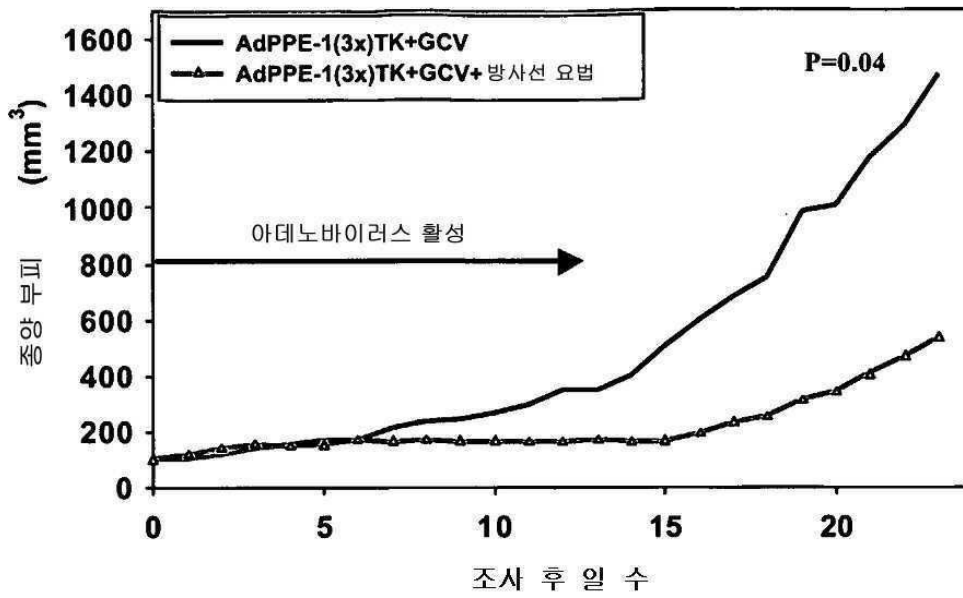
도면79a



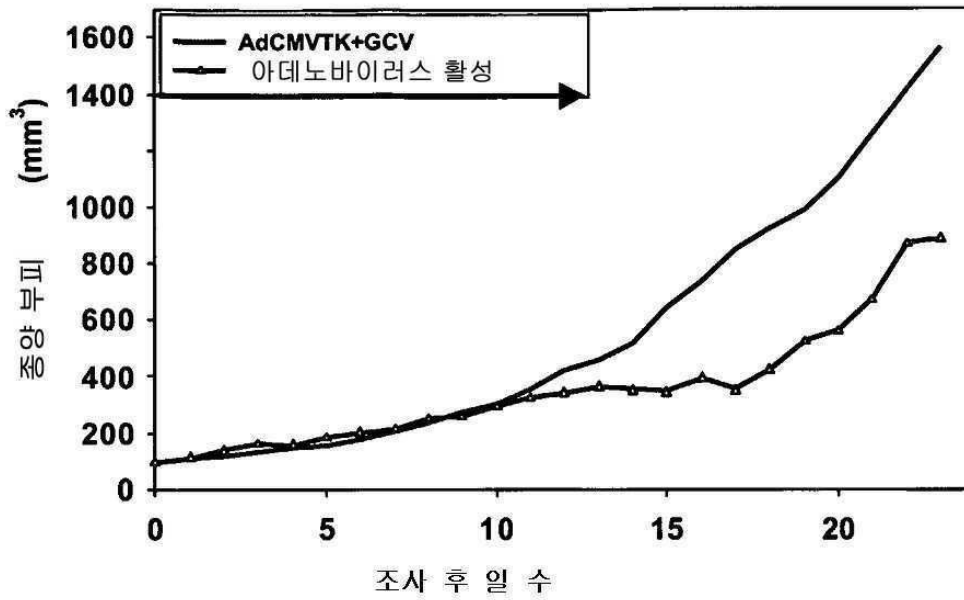
도면79b



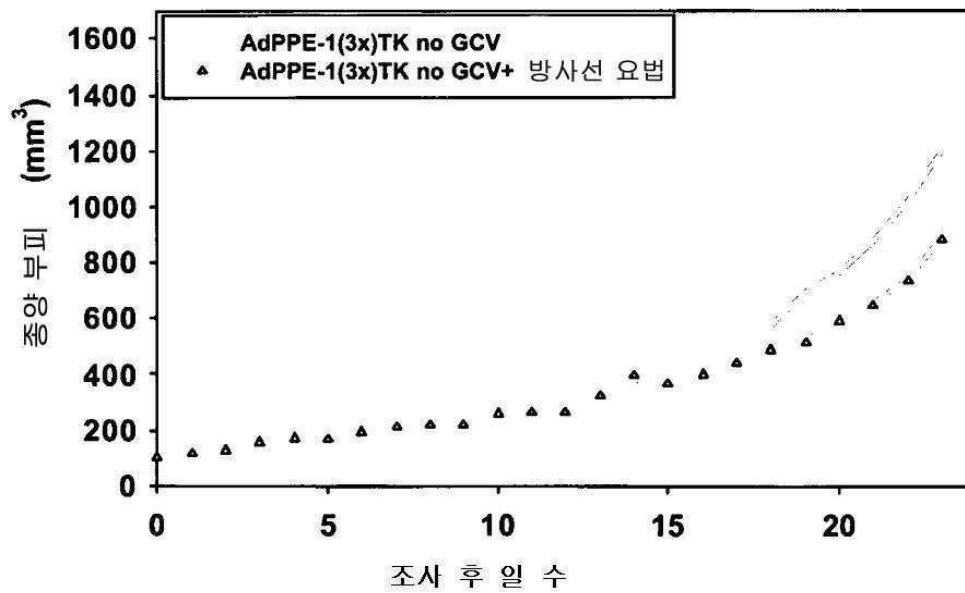
도면79c



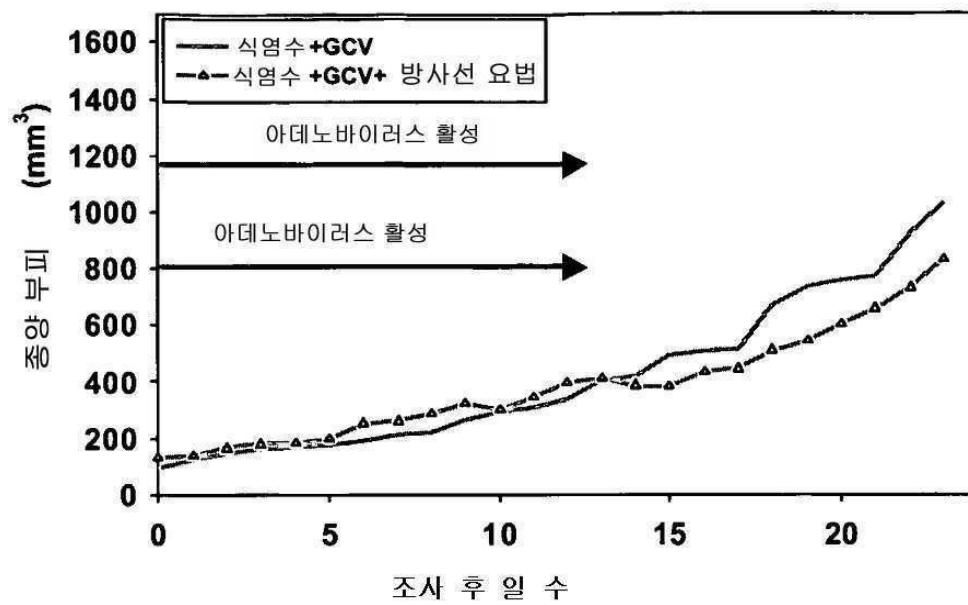
도면79d



도면79e



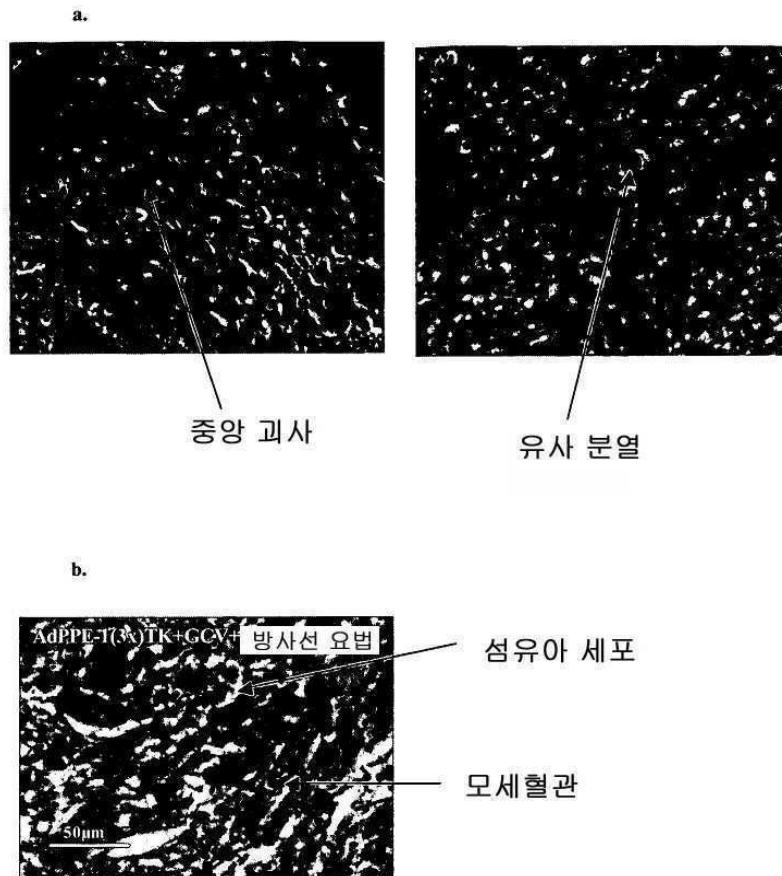
도면79f



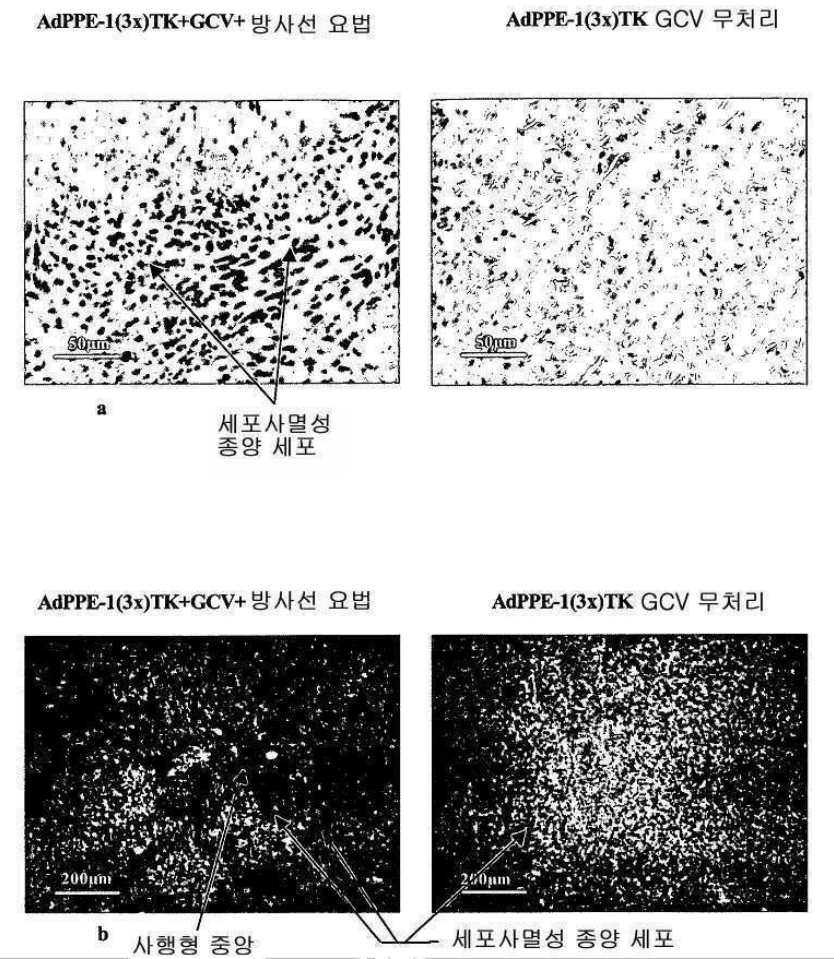
도면79g



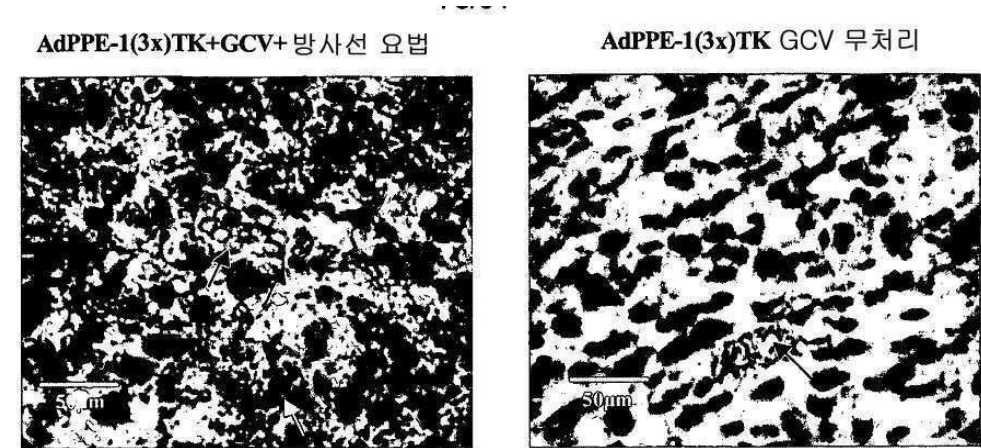
도면80



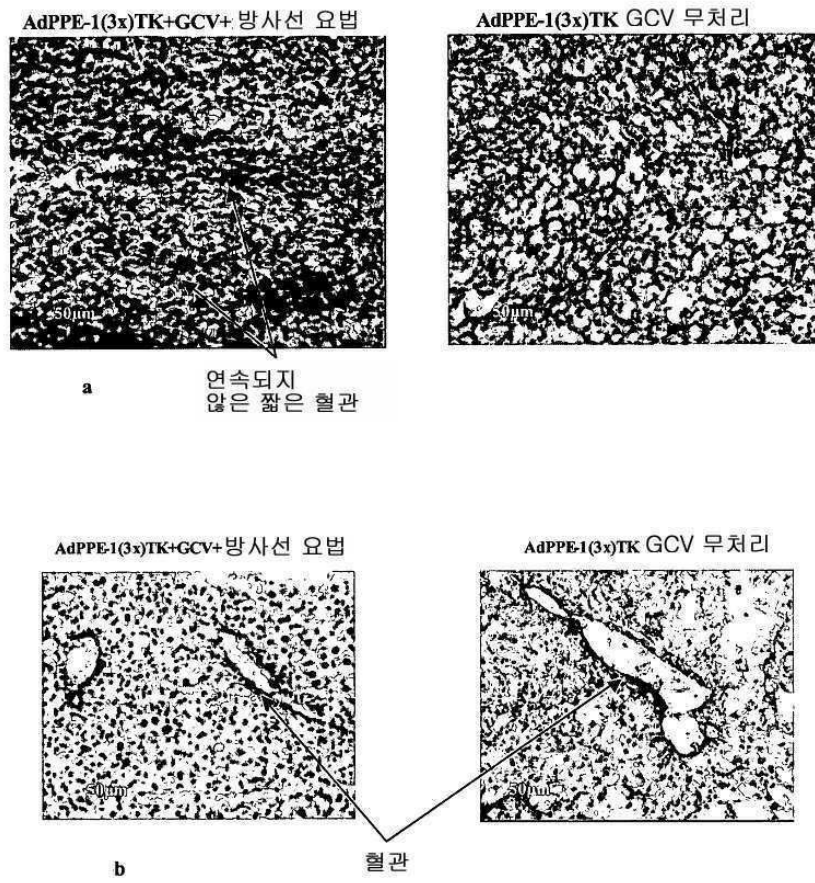
도면81



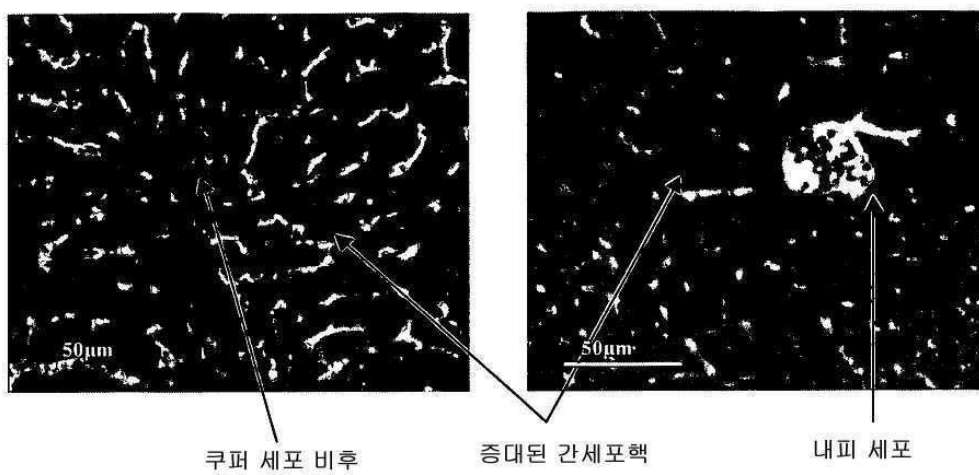
도면82



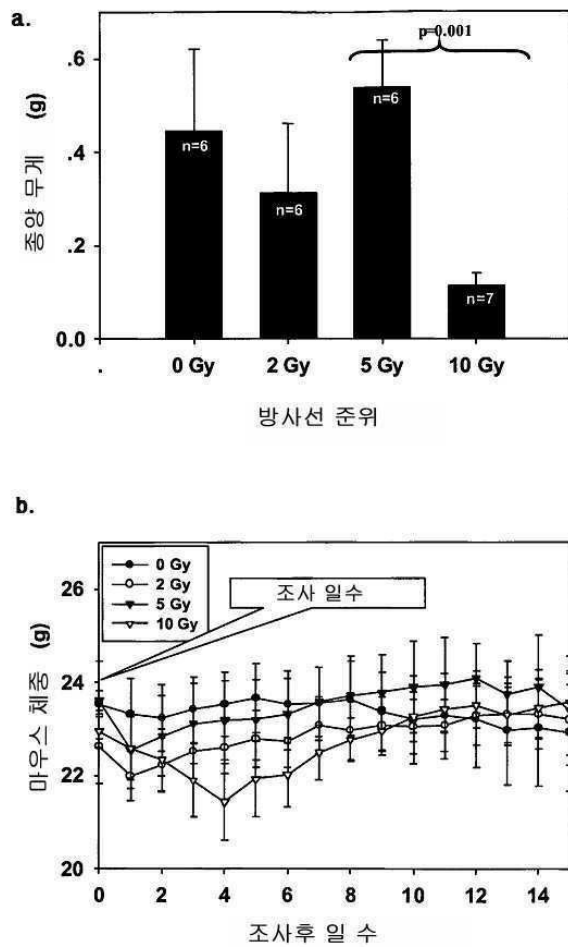
도면83



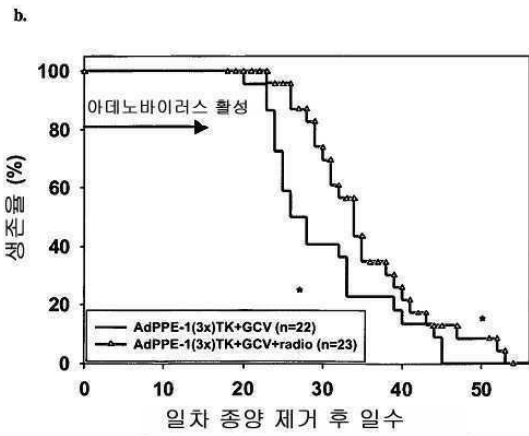
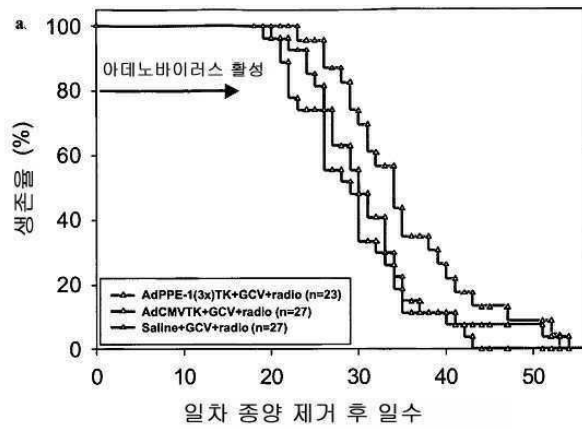
도면84



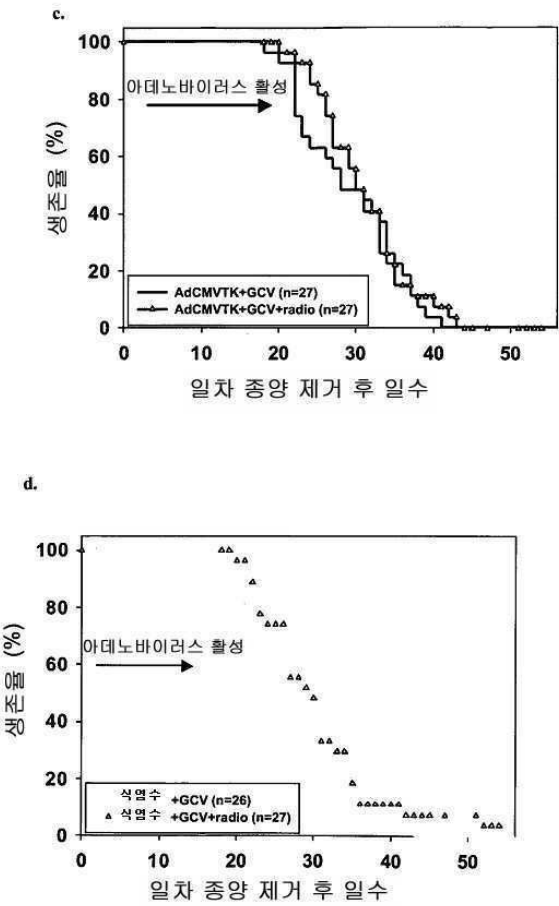
도면85



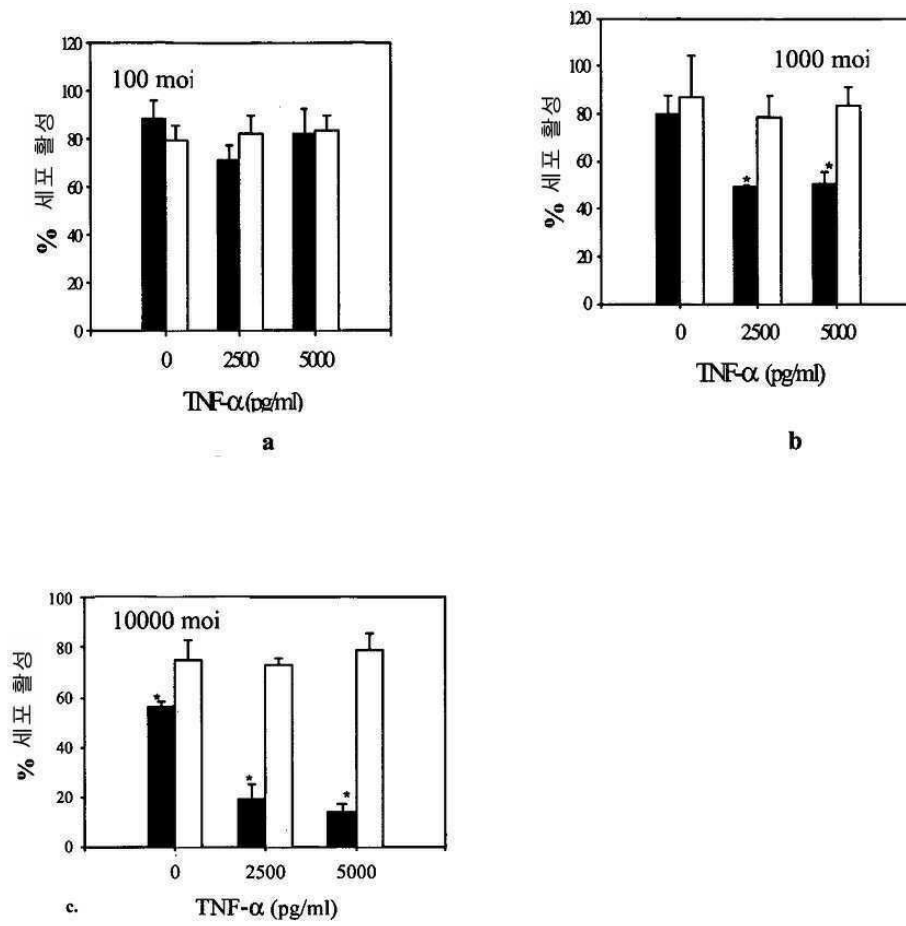
도면86ab



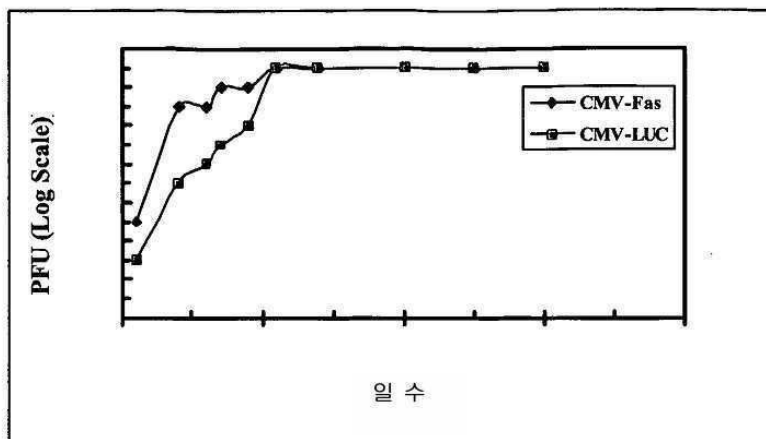
도면86cd



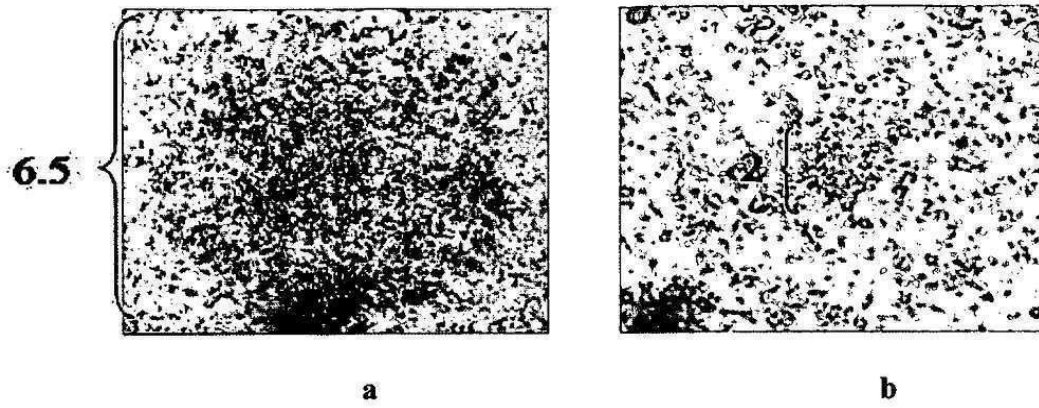
도면87



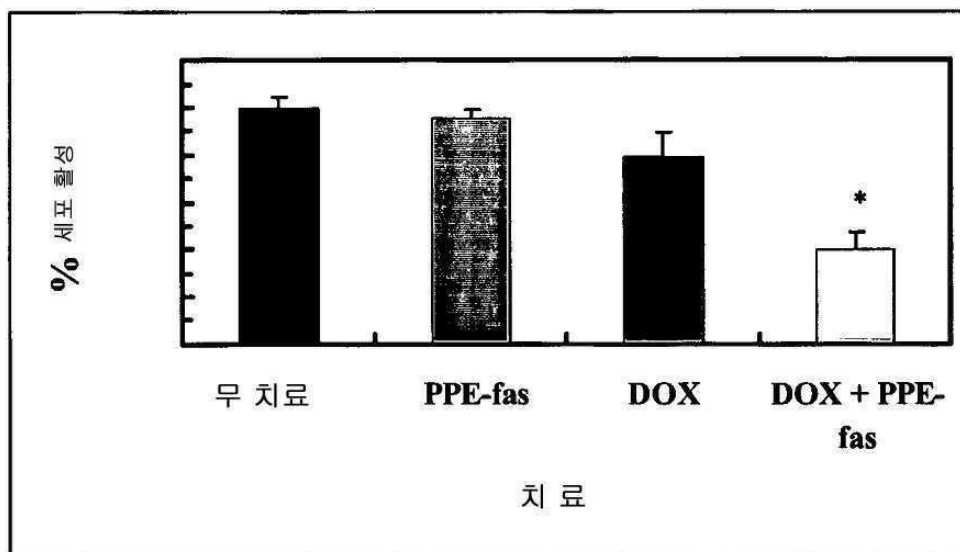
도면88



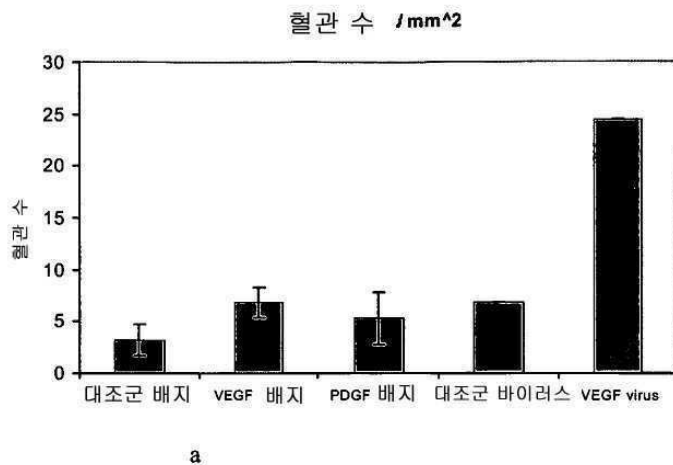
도면89



도면90

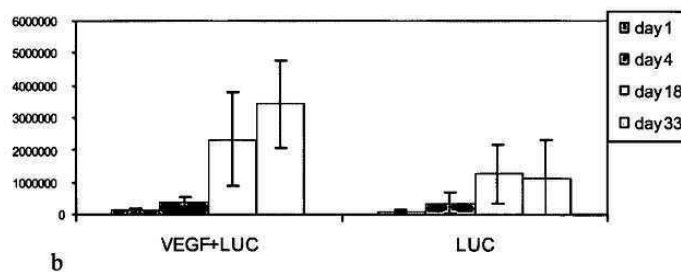


도면91



a

조작된 이식물의 맥관화에 대한 Ad5PPEC-1-3x VEGF 효과



b

도면92

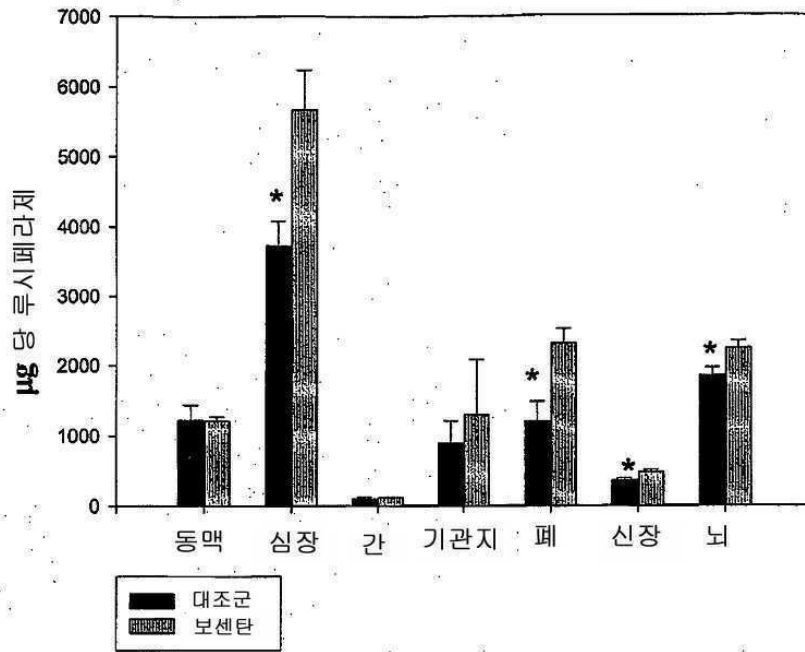
[illegible]

도면93

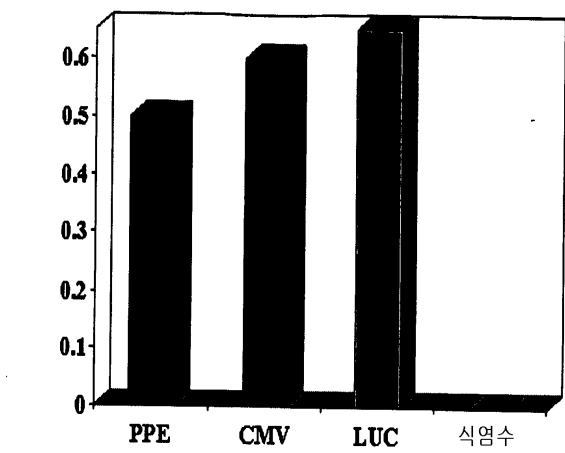
5'- gtacttcatacttttcatccaatggggtgactttgcttctggag ggtgactttgcttctggag cca
gtacttcatacttttcat gtacttcatacttttcatccaatggggtgactttgcttctggag gctagctgccag
-3'

도면94

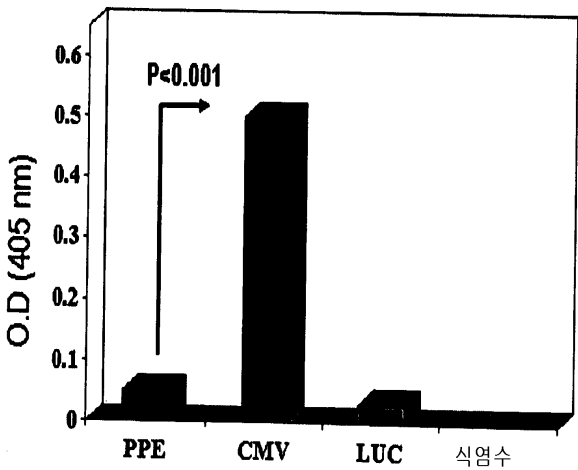
PPE-Luc 형질전환 마우스 상의 보세탄의 효과



도면95

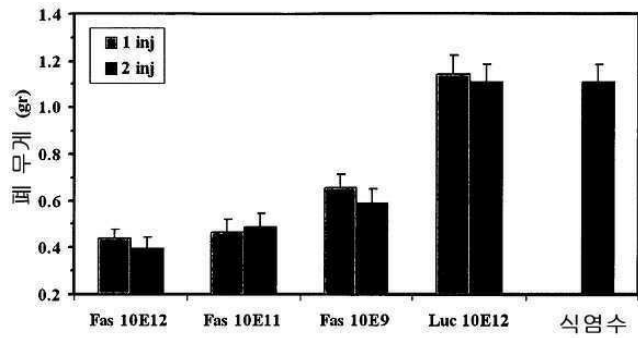


a

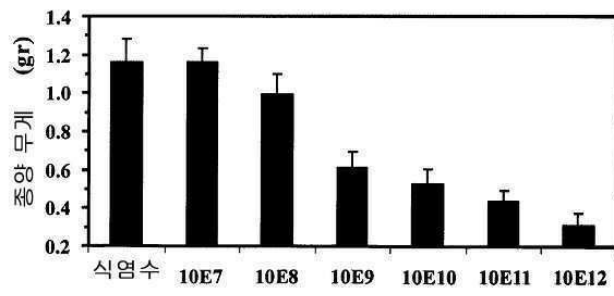


b

도면96



도면97



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)