



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

| | | |
|------------------------------|-----------|-------------|
| (51) 。 Int. Cl. | (45) 공고일자 | 2007년07월13일 |
| <i>C12N 15/861</i> (2006.01) | (11) 등록번호 | 10-0737286 |
| <i>A61K 39/00</i> (2006.01) | (24) 등록일자 | 2007년07월05일 |

| | | | |
|-----------|-----------------|-----------|-----------------|
| (21) 출원번호 | 10-2005-0080822 | (65) 공개번호 | 10-2007-0025068 |
| (22) 출원일자 | 2005년08월31일 | (43) 공개일자 | 2007년03월08일 |
| 심사청구일자 | 2005년08월31일 | | |

(73) 특허권자 박기량
 충북 청주시 흥덕구 가경동 동부아파트 107-203

 주성대학산학협력단
 충북 청원군 내수읍 덕암리 산4 주성대학내

 김원재
 서울시 강동구 상일동 173번지 삼성빌라 4-304

 조영화
 충북 청주시 흥덕구 비하동 669-13

 문성권
 충북 충주시 칠금동 삼일아파트 104동 1502호

 정경환
 서울 송파구 오금동 2번지 대림아파트 5동 501호

(72) 발명자 박기량
 충북 청주시 흥덕구 가경동 동부아파트 107-203

 김원재
 서울시 강동구 상일동 173번지 삼성빌라 4-304

 조영화
 충북 청주시 흥덕구 비하동 669-13

(74) 대리인 이처영

| | |
|--|---|
| (56) 선행기술조사문헌 | |
| Cancer Research, Vol. 62:3077-3083 (2002. 6. 1.) | Proc Nat Acad Sci. USA, Vol. 98:4605-4610 |
| KR100563099 B1 | (2001. 4. 10.) |
| US6096303 A | KR1020060005163 A |
| | US6375929 B1 |

심사관 : 신원혜

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) VEGFR 트렁케이티드 cDNA를 함유하는 재조합아데노-연관 바이러스 및 이를 함유하는 암-특이적 유전자치료제

(57) 요약

본 발명은 VEGF 수용체단백질(VEGFR)의 truncated cDNA와 아데노-연관 바이러스(AAV) 시스템을 이용한 유전자 치료제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, VEGFR-1의 truncated cDNA를 함유하는 rAAV 벡터, VEGFR-2의 truncated cDNA를 함유하는 rAAV 벡터 및 상기 벡터를 함유하는 암-특이적 유전자 치료제에 관한 것이다.

본 발명에 따른 유전자 치료제는 종양의 증식 및 전이에 필수적인 혈관신생에 관여하는 VEGF의 발현 및 기능을 억제하여, 종양의 성장을 감소시킴으로서 암을 유전자 차원에서 치료하는데 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도

도 5

특허청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

다음 단계를 거쳐 제조되고, 서열번호 1의 염기서열 VEGFR-1의 불완전한(truncated) cDNA를 함유하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터:

(a) 서열번호 1의 염기서열 VEGFR-1의 불완전한(truncated) cDNA를 함유하는 아데노-연관 바이러스의 재조합을 위한 플라스미드 DNA(pAAV) 벡터, 아데노-연관 바이러스 게놈 복제에 관여하는 단백질과 캡시드를 발현시키는 아데노-연관 바이러스 rep-cap(AAV rep-cap) 플라스미드 DNA 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드를 동물세포주에 트랜스펙션하는 단계;

(b) 상기 트랜스펙션된 동물세포주를 배양하는 단계; 및

(c) 상기 배양된 세포주를 파쇄한 다음, 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 입자를 분리·정제하는 단계.

청구항 3.

삭제

청구항 4.

다음의 단계를 거쳐 제조되고, 서열번호 4의 염기서열을 가지는 VEGFR-2의 불완전한(truncated) cDNA를 함유하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터:

(a) 서열번호 4의 염기서열을 가지는 VEGFR-2의 불완전한(truncated) cDNA를 함유하는 아데노-연관 바이러스의 재조합을 위한 플라스미드 DNA(pAAV) 벡터, 아데노-연관 바이러스 게놈 복제에 관여하는 단백질과 캡시드를 발현시키는 아데노-연관 바이러스 rep-cap(AAV rep-cap) 플라스미드 DNA 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드를 동물세포주에 트랜스펙션하는 단계;

(b) 상기 트랜스펙션된 동물세포주를 배양하는 단계; 및

(c) 상기 배양된 세포주를 파쇄한 다음, 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 입자를 분리·정제하는 단계.

청구항 5.

제2항의 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터 및 제4항의 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터를 함유하는 암-특이적 유전자 치료제.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

발명의 분야

본 발명은 VEGF 수용체단백질(VEGFR)의 truncated cDNA와 아데노-연관 바이러스(AAV) 시스템을 이용한 유전자 치료제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, VEGFR-1의 truncated cDNA를 함유하는 rAAV 벡터, VEGFR-2의 truncated cDNA를 함유하는 rAAV 벡터 및 상기 벡터를 함유하는 암-특이적 유전자 치료제에 관한 것이다.

발명의 배경

암으로 인한 사망률은 국내·외를 막론하고 해마다 증가하는 추세이다. 암은 세계적으로 감염성 질환 및 심혈관계 질환과 더불어 주요한 사망원인 중 하나로 손꼽히고 있다. 세계보건기구(WHO)의 세계 보건 보고서(World Health Report)에 따르면, 2004년 총 사망자의 12.5%인 7,121,000명이 암으로 사망하였으며, 식습관, 환경의 변화 및 수명연장으로 인하여 향후 25년 내에 암 발생인구가 매년 약 3천만 명으로 늘어나고, 이중 2천만 명의 인구가 암으로 사망할 것으로 예상하고 있다.

현재 암치료를 사용하는 방법은 크게 외과적 수술, 방사선 치료 및 약물치료가 있는데, 이들 방법은 암치료를 위해 독자적으로 사용되거나 두 가지 이상의 방법이 병용된다. 일반적으로, 외과적 수술은 다양한 암의 단계에서 적용될 수 있다. 초기 단계의 암들은 대체적으로 외과적 수술로 치료가 가능하지만, 암이 많이 진전되었거나 전이가 일어난 경우에는 외과적 수술만으로 어렵기 때문에 방사선 치료 또는 약물치료를 같이 사용한다. 방사선 치료는 외부에서 방사선을 조사하거나, 체내로 투여한 방사성 물질에서부터 나온 X-선 또는 γ -선을 암세포에 조사하여 암을 치료한다. 약물치료는 항암제를 경구나 주사로 투여하여 암세포의 증식에 필요한 DNA나 관련 효소를 파괴하거나 억제하는 방법이다. 다른 방법에 비하여, 약물 치료가 가지는 장점은 몸의 어떤 부위에 생긴 암이라도 약물이 도달할 수 있고, 전이된 암을 치료한다는 것이다. 현재 약물 치료는 전이성 암 치료의 표준요법으로 사용되고 있다. 물론 전이된 암을 약물요법으로 완치할 수 있는 것은 아니지만, 증상을 완화시킴으로써 수명을 연장시키는 중요한 역할을 한다. 하지만, 이러한 약물요법의 주류를 이루고 있는 화학요법제는 부작용, 항암제 내성 등의 문제점을 가지고 있다.

그러나, 생명과학분야의 눈부신 발전에 힘입어 생물요법제가 급성장하고 있다. 생물요법제는 신체 본연의 면역 기능을 회복시키거나 증가시킴으로써 암세포의 활동력을 약화시켜 암의 진행을 막는 것을 치료적 근거로 삼고 있다. 신체의 면역 체계가 제 기능을 발휘할 때 암세포들을 효과적으로 사멸시킬 수 있으나, 그렇지 않은 경우 암세포가 쉽게 증식하거나, 또는 다른 병원균들이 쉽게 공격을 가할 수 있게 된다. 생물요법제의 상기 단점을 보완하기 위해 외과적 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등과 같은 다른 치료법들과 같이 사용되기도 한다.

현재 생명과학분야에서 관심을 받고 있는 생물요법제로는 안티센스 항암제 및 혈관생성 억제제를 들 수 있다. 안티센스 항암제는 암세포의 특이적 mRNA에 상보적으로 결합할 수 있는 DNA단편을 사용하여, mRNA의 프로세싱 또는 단백질의 발현을 저해하는 방법으로, 암세포의 사멸을 유도하는 것이다. 인간게놈 프로젝트의 결과로 인하여 30,000여개의 유전자 서

열이 판독되고, 100,000여개의 mRNA서열을 알 수 있게 되었다. 이로써 암세포와 연관된 mRNA 후보군에 대한 정보가 대량 확보되면서, 신호전달 체계와 관련된 유전자, 세포사멸(apoptosis) 및 세포 증식에 관련된 유전자들에 대한 안티센스 항암제를 스크리닝하여 임상 실험중에 있다.

종양의 성장은 이에 필요한 산소 및 영양분을 공급해주는 새로운 혈관의 생성(angiogenesis)이 있어야 가능하다. 일반적으로 암세포가 증식함에 따라 종양 내부는 저산소 상태가 되고, 조직이 괴사하게 된다. 또한, 종양 자체의 압력에 의해 혈관이 파괴됨으로써 저산소 상태는 더욱 악화된다. 이러한 저산소 상태를 극복하기 위하여 종양은 신혈관 생성과 관련된 인자들(VEGF, bFGF, IL-8, PDGF, PD-EGF 등)을 발현하게 되어 신혈관 생성을 촉진하게 된다. 즉, 신혈관 생성은 종양의 성장에 있어서 필수적인 과정인 것이다.

신혈관 생성 억제제는 이러한 종양의 신혈관 생성을 방해하여 종양의 성장을 저해함으로써, 암을 치료하는 것을 목적으로 한다. 직접적인 신혈관 생성 억제제는 혈관 내피세포의 증식 및 이동을 방해하거나, 신혈관 생성인자에 대한 반응을 억제함으로써 신혈관 생성을 방해한다. 직접적인 신혈관 생성 억제제는 후천내성(acquired drug resistance)을 보다 적게 유발한다는 장점을 지니고 있다. 간접적인 신혈관 생성 억제제는 신혈관 생성을 활성화시키는 종양내의 단백질 발현을 억제하거나, 상기 종양 단백질과 혈관 내피 세포표면 수용체 사이의 결합을 차단함으로써 신혈관 생성을 억제한다.

상기 기술한 바와 같이, 치료분야의 변화양상을 살펴보면, 인공적인 화학물질에서 천연 생체내 물질을 이용하는 방향으로 변화하고 있음을 알 수 있다. 특히, 다양한 분야의 유전체 연구 사업들이 진행되면서 각종 질병의 병인으로 작용하는 유전자들이 발견되고 있다. 이러한 연구 결과들을 임상적인 치료나 예방효과와 연결짓기 위하여, 기능이 소실되거나 변형된 유전자를 교정하기 위한 유전자를 체내에 도입하여 기능을 정상화시키거나 치료기능을 활성화 시켜주는 유전자 전달 기술에 대한 연구, 즉 유전자 치료(gene therapy) 분야에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 상기 유전자 치료분야는 최근 수년간 관심과 연구가 집중되면서 그에 따른 결과들도 급증하고 있다.

유전자 치료법은 유전자 전달 및 발현에 의하여 질병을 치료하는 방법으로서, 약물치료와는 달리 장애가 있는 특정 유전자를 목표로 유전적 결함을 교정하는 치료법이다. 유전자 치료의 궁극적인 목표는 살아있는 세포를 유전적으로 변형하여 유익한 치료 효과를 얻는 것이다. 상기 치료법은 질환부위로 유전인자의 정확한 전달, 생체 내에서의 완전한 분해, 독성 및 면역 항원성 부재(不在) 및 유전인자의 장기간 안정적인 발현이라는 장점을 지니고 있어서, 질병치료에 있어 더할 나위없는 최선의 치료법으로 각광받고 있다.

유전자 치료의 주 연구분야는 특정 질병에 치료효과를 나타내는 유전자를 도입하거나, 항암제 등에 저항성을 나타내도록 정상세포의 저항기능을 증강시키거나, 각종 유전성 질환자에 있어서 변형되거나 소실된 유전자를 대체하는 분야로 요약할 수 있다.

유전자 치료법은 크게 생체내(*in vivo*)와 생체외(*in vitro*) 두 가지로 구분된다. *in vivo* 유전자 치료법은 치료 유전자를 직접 체내에 주입하는 것이고, *in vitro* 유전자 치료법은 일차적으로 목적 세포(target cell)를 시험관내에서 배양하고, 이들 세포에 유전자를 도입시킨 다음, 유전자 변형된 세포를 다시 체내로 주입하는 것이다. 현재 유전자 치료 연구 분야에서는 *in vivo* 유전자 치료법보다는 *in vitro* 유전자 치료법을 많이 사용하고 있다.

유전자 전달기술은 크게 바이러스를 수송체로 사용하는 방법(viral vector-based transfer method), 합성 인지질이나 합성 양이온성 고분자 등을 사용하는 비바이러스성 방법(non-viral delivery method) 및 세포막에 일시적인 전기자극을 가하여 유전자를 도입하는 전기 투과법(electroporation) 등의 물리적 방법으로 구분할 수 있다.

상기 유전자 전달기술 중에서, 바이러스 수송체를 사용하는 방법은 치료유전자로 대체된 유전자를 지니는 일부 또는 전체의 복제능력이 결손된 벡터로서 유전인자의 전달이 효율적으로 이루어질 수 있기 때문에 유전자치료를 위해 선호되고 있다. 바이러스 수송체 또는 바이러스 벡터로 사용되는 바이러스로는 RNA 바이러스 벡터(레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등)와 DNA 바이러스 벡터(아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터 등)가 있으며, 이 외에도 단순포진 바이러스 벡터(herpes simplex viral vector), 알파 바이러스 벡터(alpha viral vector) 등이 있다. 이중에서도 특히 연구가 활발히 진행되고 있는 것은 레트로바이러스와 아데노바이러스이다.

숙주세포의 게놈에 통합기능이 있는 레트로바이러스(Retrovirus)의 특징은 인체에 해가 없지만 통합 시 정상세포의 기능을 억제할 수 있고, 다양한 세포에 감염되고, 증식이 쉬우며, 1~7 kb 정도의 외부 유전자를 수용할 수 있고, 복제결합 바이러스를 생성할 수 있는 능력이 있다는 것이다. 그러나, 유사분열 이후의 세포에 감염되기 힘들며, *in vivo* 상태에서 유전자 전달이 어렵고, 체세포 조직을 항시 *in vitro*에서 증식하여야만 한다는 단점도 지니고 있다. 또한, 레트로바이러스는 원형 암유전자(proto-oncogene)에 통합될 수 있어 돌연변이의 위험성이 있고 세포를 괴사시킬 수도 있다.

한편, 아데노바이러스(Adenovirus)는 클로닝 벡터(cloning vector)로 여러 가지 장점을 가지는데, 중간정도의 크기로 세포 핵 속에서 복제될 수 있으며, 임상적으로 무독성이고, 외부 유전자를 삽입하여도 안정적이며, 유전자의 재배열이나 손실이 일어나지 않고, 진핵생물을 형질전환시킬 수 있으며, 숙주세포 염색체에 통합되어도 안정적이면서도 높은 수준으로 발현된다. 아데노바이러스의 좋은 숙주세포는 인간의 조혈, 림프, 골수종의 원인이 되는 세포이다. 그러나, 전상 DNA라서 증식이 어렵고, 감염된 바이러스를 회복시키는 것이 쉽지 않으며, 바이러스의 감염율이 낮다. 또한 전달된 유전자의 발현이 1~2주 후에 가장 많이 되고, 일부 세포에서는 3~4주정도만 발현이 유지된다. 또한, 문제가 되는 것은 높은 면역 항원성을 갖는다는 것이다.

아데노-연관 바이러스(Adeno-associated virus, AAV)는 상기와 같은 문제점들을 보완할 수 있으면서, 유전자 치료제로의 많은 장점을 가지고 있어 최근에 선호되고 있다. AAV는 단일가닥의 원바이러스(Provirus)로서, 복제하기 위하여 보조 바이러스를 필요로 하고, AAV 게놈(genome)은 4,680 bp로서 감염세포의 염색체 19번 특정부위에 삽입이 가능하다. 트랜스 유전자(*trans-gene*)는 각각 145bp의 두 개의 역위말단반복(*inverted terminal repeat*, ITR) 서열부분과 시그널 서열(*signal sequence*)부분에 의해 연결된 플라스미드DNA(plasmid DNA)에 삽입된다. AAV *rep* 부분과 *cap* 부분을 발현시키는 다른 플라스미드DNA와 함께 트랜스펙션(*transfection*)시키고 아데노바이러스는 보조바이러스로서 첨가한다. AAV는 유전자를 전달하는 숙주세포의 범위가 넓고, 반복투여 시 면역 부작용이 적으며, 유전자 발현 기간이 긴 장점을 지니고 있다. 더구나, AAV 게놈이 숙주세포의 염색체에 통합되어도 안전하고, 숙주의 유전자발현을 변형시키거나 재배열시키지 않는다.

1994년 CFTR 유전인자를 포함한 AAV 벡터가 섬유아세포증(*cystic fibrosis*) 치료를 위하여 NIH에 승인된 이래, 다양한 질병의 임상치료에 이용되고 있다. 혈액응고인자인 인자 IX 유전자(*factor IX gene*)를 포함한 AAV 벡터는 B형 혈우병(*hemophilia B*)을 치료에 이용되고 있고, AAV 벡터를 이용한 A형 혈우병(*hemophilia A*) 치료제 개발이 진행되고 있다. 또한, 여러 가지 종류의 항암유전자를 함유한 AAV 벡터는 종양 백신으로 사용하는 경우가 입증되었다.

VEGF를 사용한 유전자 치료로는 폐순환승압을 치료하기 위해 맥관형성 인자를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 결손 아데노바이러스(대한민국 특허출원: 10-2001-7013633)를 예로 들 수 있지만, 상기 치료법은 VEGF 센스 염기서열을 사용하였기 때문에 허혈성 질환 치료에 한해서만 사용이 가능하고, 신혈관생성에 의한 질병, 특히, 암의 치료에는 사용이 불가하다. 더욱이, 아데노바이러스는 면역 항원성이 높고, 숙주세포로의 감염성이 낮을 뿐 아니라, 발현 기간이 짧은 단점을 지니고 있어 치료용으로 사용하기에는 부적절하다.

암을 치료용 폴리펩타이드에 대한 연구는 기존에 많이 진행되어 왔지만, 상기 물질들의 대부분은 화학요법에 속한다. 그리고, 폴리뉴클레오티드에 대한 연구도 지속적으로 진행되어 왔지만, 바이러스 벡터 등을 통하여 효율적으로 생체내에 이동시키는 방법과 연계해서는 그 결과가 미흡하다.

한편, 본 발명자들은 VEGF-A의 안티센스 cDNA를 함유하는 rAAV-AShVEGF-A 벡터(KR 10-2004-54043), VEGF-A, VEGF-B 및 VEGF-C의 안티센스 cDNA를 함유하는 rAAV-AShVEGF-ABC 벡터(PCT/KR2005/002435)가 암의 유전자 치료제로써 효율적이라는 것을 규명하고, 이를 특허출원한 바 있다. 아울러, VEGF-A의 안티센스 cDNA를 함유하는 rAAV-AShVEGF-A 벡터, VEGFR-1 truncated soluble cDNA를 함유하는 rAAV-TShVEGFR-1 벡터 및 VEGFR-2 truncated soluble cDNA를 함유하는 rAAV-TShVEGFR-2 벡터를 함유하는 암의 유전자 치료제에 대해서도 특허출원한 바 있다 (KR 10-2005-67661).

본 발명자들은 더욱 효율적인 암의 유전자 치료제를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, VEGFR truncated cDNA를 함유하는 rAAV-TRhVEGFR-1 벡터 및 rAAV-TRhVEGFR-2 벡터를 제작하고, 상기 벡터들이 VEGF 기능을 억제한다는 것을 확인함과 아울러, *in vivo* 상에서 뛰어난 종양억제효과를 나타낸다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 유전자치료용 VEGFR-1 truncated cDNA를 함유하는 rAAV 벡터 및 VEGFR-2 truncated cDNA를 함유하는 rAAV 벡터를 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 VEGFR-1 truncated cDNA를 함유하는 rAAV 벡터 및/또는 VEGFR-2 truncated cDNA를 함유하는 rAAV 벡터를 포함하는 암-특이적 유전자치료제를 제공하는데 있다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) VEGFR-1의 truncated cDNA를 함유하는 pAAV 벡터, AAV rep-cap 플라스미드 DNA 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드를 동물세포주에 트랜스펙션하는 단계; (b) 상기 트랜스펙션된 동물세포주를 배양하는 단계; 및 (c) 상기 배양된 세포주를 파쇄한 다음, 재조합 rAAV 입자를 분리·정제하는 단계를 거쳐 제조되고, VEGFR-1의 truncated cDNA를 함유하는 rAAV 벡터를 제공한다.

본 발명은 또한, (a) VEGFR-2의 truncated cDNA를 함유하는 pAAV 벡터, AAV rep-cap 플라스미드 DNA 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드를 동물세포주에 트랜스펙션하는 단계; (b) 상기 트랜스펙션된 동물세포주를 배양하는 단계; 및 (c) 상기 배양된 세포주를 파쇄한 다음, 재조합 rAAV 입자를 분리·정제하는 단계를 거쳐 제조되고, VEGFR-2의 truncated cDNA를 함유하는 rAAV 벡터를 제공한다.

본 발명은 또한, 상기 VEGFR-1의 truncated cDNA를 함유하는 rAAV 벡터 및 VEGFR-2의 truncated cDNA를 함유하는 rAAV 벡터를 포함하는 암-특이적 유전자 치료제를 제공한다.

본 발명에 있어서, VEGFR-1의 truncated cDNA 및 VEGFR-2의 truncated cDNA는 각각 서열번호 1 및 서열번호 4의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명에 따른 유전자치료제는 대장암, 방광암 및 폐암에 특이적인 것을 특징으로 할 수 있다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 혈관신생 억제기능 유전자를 함유한 pAAV 플라스미드 클로닝

(1) pAAV-TRhVEGFR-1의 제작

HUVEC(Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., USA) 세포로부터 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하였으며, 하기의 TRhVEGFR-1 F1 및 TRhVEGFR-1 R1 프라이머를 이용하여 RT-PCR 방법으로 2,427bp의 truncated 인간 VEGFR-1 수용체 cDNA(서열번호 1)를 증폭하였다. 증폭 단편을 제한효소 *KpnI* 및 *XhoI*으로 처리하여, 동일한 제한효소로 절단된 pAAV-FIX cis 플라스미드 DNA(US6,093,292)와 라이게이션시켜, pAAV-TRhVEGFR-1을 제작하였다 (도 1).

TRhVEGFR-1 F1 (서열번호 2):

AAGGTACCGCCACCATGGTCAGCTACTGGGACA

Kpn I Kozak

TRhVEGFR-1 R1 (서열번호 3):

CCCTCGAGCTACTGCTCATCCAAAGGAACTTCA (서열번호 3)

Xho I stop codon

(2) pAAV-TRhVEGFR-2의 제작

암세포주 LCSC#1 세포(WO 02/061069)로부터 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하였으며, 하기의 TRhVEGFR-2 F1 및 TRhVEGFR-2 R1 프라이머를 이용하여 RT-PCR 방법으로 2430bp의 truncated 인간 VEGFR-2 수용체 cDNA(서열번호 4)를 증폭하였다. 증폭 단편을 제한효소 *KpnI* 및 *XhoI*으로 처리하여, 동일한 제한효소로 절단된 pAAV-FIX cis 플라스미드 DNA와 라이게이션시켜, pAAV-TRhVEGFR-2를 제작하였다 (도 2).

TRhVEGFR-2 F1 (서열번호 5):

GGGGTACCGCCACCATGGAGAGCAAGGTGCT

Kpn I Kozak

TRhVEGFR-2 R1 (서열번호 6):

CCCTCGAGCTATTTCATCTGGATCCATGAC

Xho I stop codon

실시예 2: 혈관신생억제 유전자치료제로 이용되는 rAAV 벡터 구축

유전자 치료에 이용되는 재조합 AAV (rAAV-TRhVEGFR-1) 벡터를 제작하기 위해서는 실시예 1에서 제작된 pAAV-TRhVEGFR-1 플라스미드 DNA 이외에 AAV *rep* 부분과 *cap* 부분을 발현시키는 AAV *rep-cap* 플라스미드 DNA (pAAV-RC 플라스미드, Stratagene Co., USA)와 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드 (pHelper 플라스미드, Stratagene Co., USA)가 필요하다. 상기 세 가지 종류의 플라스미드 DNA(pAAV-TRhVEGFR-1, pAAV-RC 및 pHelper)를 HEK293 (human embryonic kidney 293; ATCC CRL-1573) 세포에 모두 트랜스팩션시킨 다음, 96시간 배양한 후, HEK293 세포를 모아서 초음파 파쇄하고, 재조합 AAV (rAAV) particle을 CsCl 밀도구배 원심분리를 3번 반복하여, RI (Refractive Index)가 1.37~1.41 g/ml인 부분을 모아 순수하게 분리하여 rAAV-TRhVEGFR-1을 수득하였다.

rAAV-TRhVEGFR-2는 pAAV-TRhVEGFR-1 대신에 pAAV-TRhVEGFR-2를 사용하여 상기와 같은 방법으로 수득하였다.

상기 수득된 rAAV-TRhVEGFR-1 및 rAAV-TRhVEGFR-2의 particles 적정(titration)은 CMV 프로모터 부위의 PCR 프라이머[CMV F1: 5'-GGG CGT GGA TAG CGG TTT GAC TC-3' (서열번호 7), CMV R1: 5'-CGG GGC GGG GTT ATT ACG ACA TT-3' (서열번호 8)]를 제작하여 Quantitative PCR 방법으로 적정하였다. 이때 농도를 알고 있는 각 pAAV 플라스미드 DNA를 표준물질로 이용하였으며, 상기 방법으로 생산 분리된 재조합 rAAV 벡터는 보통 $10^{12} \sim 10^{13}$ viral particles/ml의 rAAV particle titer를 가진다는 것을 확인하였다.

실시예 3: 본 발명의 rAAV 벡터의 혈관신생억제 효과확인 (wound healing assay)

완전배지(EGM-2 BulletKit, Cat# CC-3162, Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., USA)에서 배양된 HUVEC 세포에 rAAV-TRhVEGFR-1 및 rAAV-TRhVEGFR-2의 M.O.I가 2×10^5 되도록 각각 또는 함께 24시간동안 처리하고, 48시간 후 세포가 자란 플레이트를 cell scraper로 긁어 상처(wound)를 내었다. 상처를 낸 플레이트를 수득배지[EBM-2 (Cat# CC-3156, Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., USA) + 1% FBS]를 이용하여 2번 세척하여 떨어진 세포를 제거하였다. 상기 플레이트에 VEGF protein (Calbiochem, Cat. #676472)을 10ng/ml이 되도록 처리하고 24시간 후 migrated cell을 촬영 분석하였다.

그 결과, 표 1, 도 3a 및 도 3b에 나타난 바와 같이, rAAV-TRhVEGFR-1 및/또는 rAAV-TRhVEGFR-2를 처리군의 경우, 무처리군 및 VEGF protein만을 처리한 군에 비하여, 이동된 세포의 수가 현저히 적었다.

이는 rAAV-TRhVEGFR-1 및/또는 rAAV-TRhVEGFR-2 처리시 VEGF의 기능을 억제하여, 상처치유가 지연되는 것을 의미한다. 이 결과로부터, 본 발명의 rAAV-TRhVEGFR-1 벡터 및 rAAV-TRhVEGFR-2 벡터는 VEGF가 혈관 내피세포를 이동시켜 혈관을 생성시키는 것을 억제하여, 종양의 증식을 방해함으로써 항암효과를 나타낼 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[표 1]
본 발명의 rAAV 벡터 처리에 따른 상처치유 지연효과

| | | | | | | |
|------------------------|---|---|---|---|---|---|
| VEGF protein (10ng/ml) | - | + | + | + | + | + |
| | | | | | | |

| rAAV | - | - | rAAV-EGFP | rAAV- TRhVEGFR-1 | rAAV- TRhVEGFR-2 | rAAV- TRhVEGFR-1+ rAAV- TRhVEGFR-2 |
|----------------|------------|-------------|-------------|------------------|------------------|------------------------------------|
| Migrated cells | 150.2±7.95 | 217.2±21.70 | 195.8±19.27 | 113.4±17.64 | 84.33±11.31 | 75.33±6.98 |

실시예 4: 본 발명의 rAAV 벡터를 이용한 항암효과 분석(Xenograft 분석)

본 실시예에서는 실시예 3의 wound healing migration assay에서 항암효과가 입증된 [rAAV-TRhVEGFR-1 + rAAV-TRhVEGFR-2]를 투여한 경우의 항암효과를 *in vivo* 상에서 조사하였다.

우선, BABL/c 누드마우스 (BABL/c nu/nu mouse, (주)중앙실험동물, Japan SLC, Inc.)에 NCI-H460 인간 폐암세포주 (ATCC HTB-177) 5 x 10⁶ 개를 피하주사 방법으로 주입하여 tumor model을 만들었다.

상기 암세포를 주입한 BABL/c 누드마우스의 종양체적이 70~80 mm³에 이르면 10¹¹~10¹² viral particles/개체의 rAAV 벡터(rAAV-AShVEGF-A 및 rAAV-TRhVEGFR-1+rAAV-TRhVEGFR-2)를 미정맥 주사 방법 (tail vein injection)으로 트랜스덕션시켰다. 트랜스덕션 한 후 3주 동안 동물의 일반증상(일반상태, 운동성, 외관, 자율신경 및 사망 여부)을 관찰하고, 체중을 측정하였으며, 전자캘리퍼스(Absolute digimatic, Mitutoyo Corp., Japan)를 이용하여 종양체적을 측정하였다.

본 실시예에서 대조군으로 사용한 rAAV-AShVEGF-A 벡터(도 4)는 다음과 같은 방법으로 제작하였다. HUVEC (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., USA) 세포로부터 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하였으며, 하기의 AShVEGF-A 프라이머를 이용하여 RT-PCR 방법으로 429bp의 인간 VEGF-A isoform 안티센스 cDNA(1025-1453 위치)를 증폭하였다. 증폭 단편을 제한효소 *KpnI* 및 *XhoI*으로 처리하여, 동일한 제한효소로 절단된 pAAV-FIX cis 플라스미드 DNA와 라이게이션시켜, pAAV-AShVEGF-A를 제작하였다.

AShVEGF-A F2(서열번호 9): GGGGTACCGTCTTGCTCTATCTTTC

KpnI

AShVEGF-A R1(서열번호 10): CCCTCGAGGGCCTCCGAAACCATGAACT

XhoI

한편, 현재 널리 사용되는 항암제인 taxol(paclitaxel; Cat# T1912, Sigma, USA)을 대조군으로 하여 xenograft 실험을 함께 진행하였다. 암세포를 주입한 BABL/c 누드마우스의 종양체적이 70~80 mm³에 이르면 200 µg/mouse 용량을 복강 투여하였고, 이때로부터 매주 1회씩 동일용량을 시험기간 동안 투여하였다. 동물의 상태관찰, 체중 및 종양체적 측정은 다른 시험군과 동일하게 수행하였다. taxol (paclitaxel)은 DMSO에 50 mg/ml 농도로 용해한 후, 투여하기 전 HEPES 완충액으로 1 mg/ml 농도로 희석하였고, 각 마우스에는 0.2 ml(200 µg/mouse 용량) 씩 복강투여방법으로 주입하였다.

모든 동물의 체중을 투여 직전과, 시험물질 투여 후 3일 간격으로 측정된 결과, 낮은 체중증가율을 보였고, 암 치료효과와 시험동물의 체중변화율과는 상관관계가 없는 것으로 관찰되었다.

한편, 종양의 체적을 3일간격으로 버니어 캘리퍼스(Vernier calipers)를 이용하여 3주 동안 측정된 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, rAAV-AShVEGF-A 투여군 및 taxol 투여군에 비해, 본 발명에 따른 유전자 치료제인 [rAAV-TRhVEGFR-1 + rAAV-TRhVEGFR-2] 투여군에서 탁월한 종양억제 효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다.

발명의 효과

이상 상세히 기술한 바와 같이, 본 발명은 유전자치료용 VEGFR-1의 truncated cDNA 또는 VEGFR-2의 truncated cDNA를 함유하는 rAAV 벡터를 제공하는 효과가 있다. 본 발명은 또한, VEGFR-1의 truncated cDNA를 함유하는 rAAV 벡터 및/또는 VEGFR-2의 truncated cDNA를 함유하는 rAAV 벡터를 포함하는 암-특이적 유전자치료제를 제공하는 효과가 있다. 본 발명에 따른, 유전자 치료제는 종양의 증식 및 전이에 필수적인 혈관신생에 관여하는 VEGF의 발현 및 기능을 억제하여, 종양의 성장을 감소시킴으로서 암을 유전자 차원에서 치료하는데 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 pAAV-TRhVEGFR-1의 유전자 지도이다.

도 2는 본 발명에 따른 pAAV-TRhVEGFR-2의 유전자 지도이다.

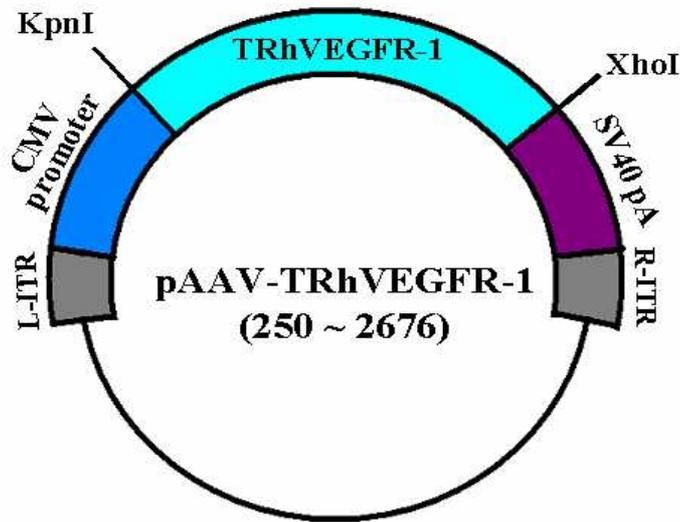
도 3a는 본 발명에 따른 rAAV-TRhVEGF-1 및/또는 rAAV-TRhVEGF-2의 상처치유 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이고, 도 3b는 본 발명에 따른 rAAV-TRhVEGF-1 및/또는 rAAV-TRhVEGF-2의 상처치유 효과를 확인한 현미경사진을 나타낸 것이다.

도 4는 rAAV-AShVEGF-A의 유전자 지도이다.

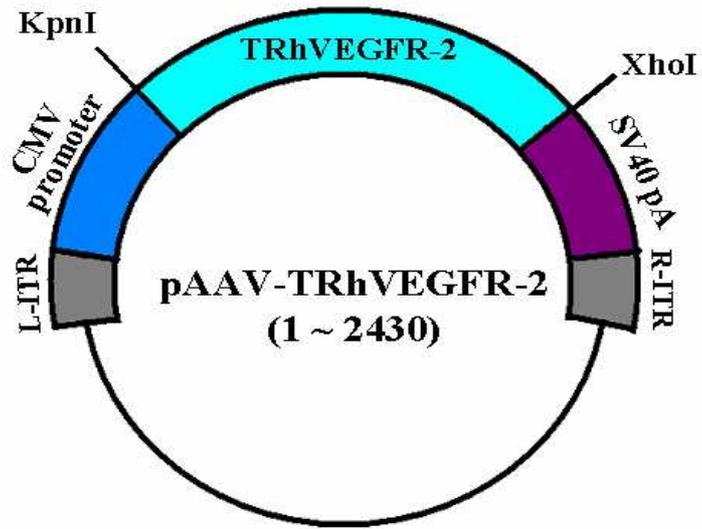
도 5는 본 발명에 따른 rAAV 벡터를 복강주사한 누드마우스에서 종양체적 변화를 나타낸 것이다.

도면

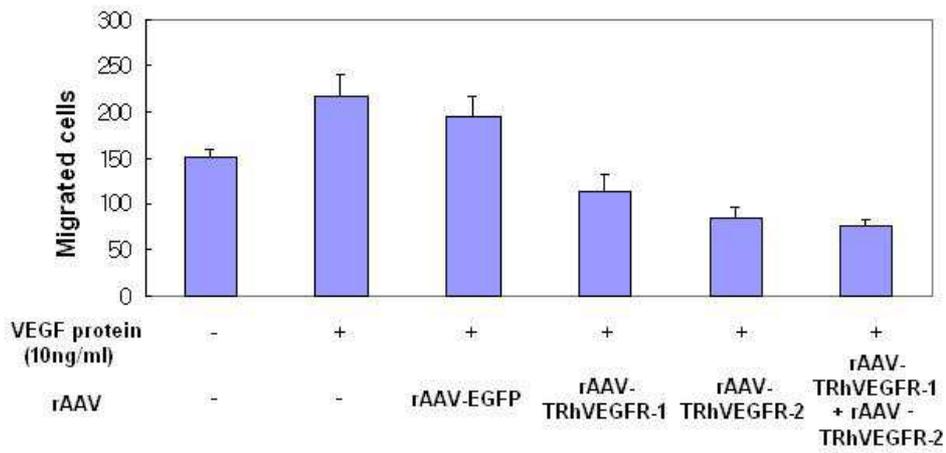
도면1



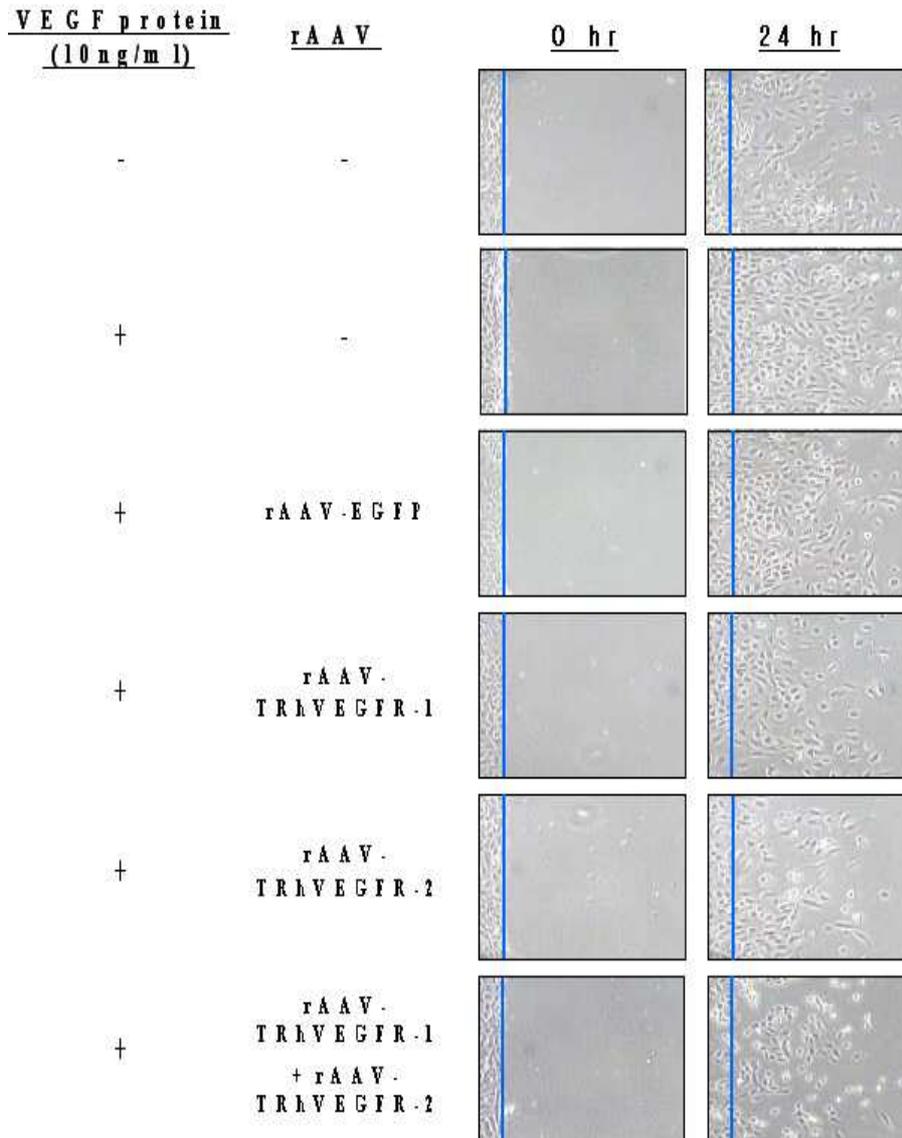
도면2



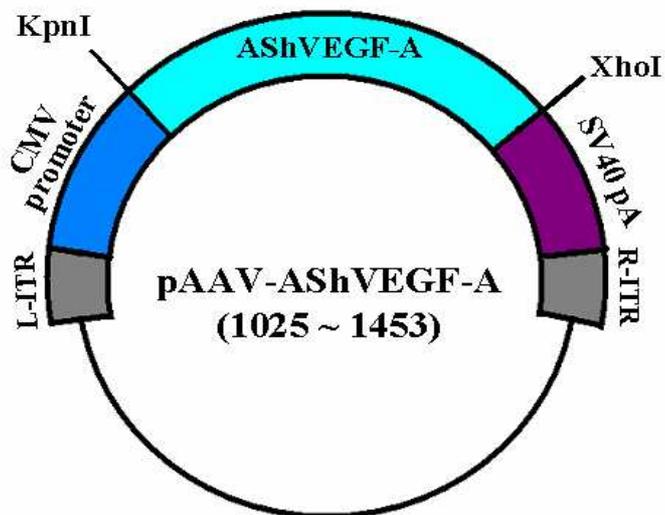
도면3a



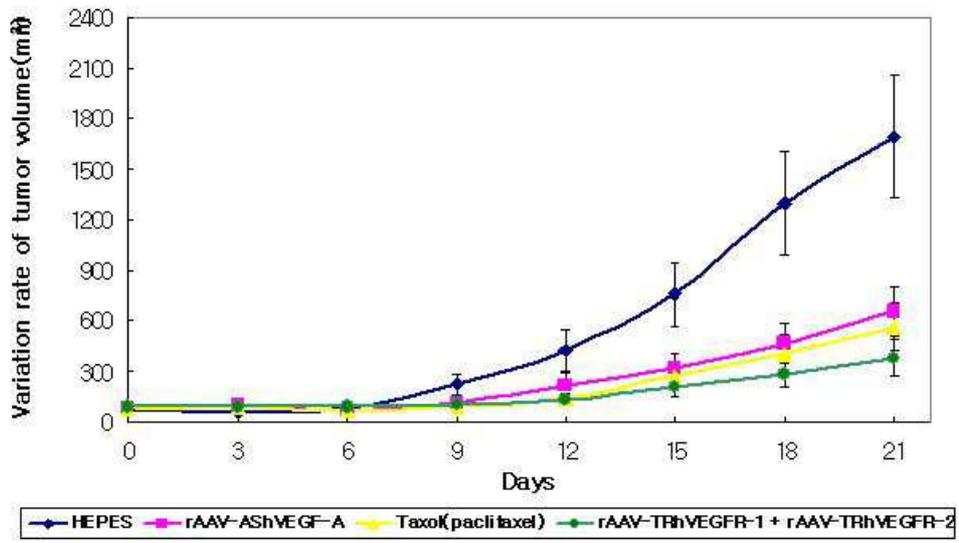
도면3b



도면4



도면5



서열목록

서열목록 전자파일 첨부