



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년06월15일

(11) 등록번호 10-1525548

(24) 등록일자 2015년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/11 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7024041

(22) 출원일자(국제) 2008년04월27일
심사청구일자 2013년04월26일

(85) 번역문제출일자 2009년11월18일

(65) 공개번호 10-2010-0017114

(43) 공개일자 2010년02월16일

(86) 국제출원번호 PCT/IL2008/000543

(87) 국제공개번호 WO 2008/132729

국제공개일자 2008년11월06일

(30) 우선권주장

11/790,992 2007년04월30일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20050106559 A1

US20050176632 A1

The Journal of Biological Chemistry, Vol.
272, No. 51, pp. 32613-32622 (1997.12.19.)

(73) 특허권자

바스클라 바이오제닉스 리미티드
이스라엘 60376 오 예후다, 요니 네타냐후 스트리트 6

(72) 발명자

하바츠 드로
이스라엘 52648 라마트-간, 키르야트 크리니티,
시갈리트 스트리트 10
그린버거 쇼샤나
이스라엘 71700 모디인, 빈야민 스트리트 38
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

황의만

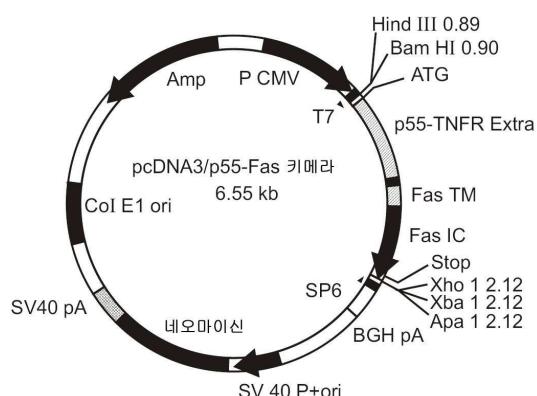
전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 내피세포 특이성을 나타내는 프로모터 및 혈관신생의 조절을 위한 그 프로모터의 사용 방법

(57) 요 약

본 명세서에는 내피세포 특이적 프로모터 활성을 나타내는 단리된 폴리뉴클레오티드 배열, 신규의 cis 조절 엘리먼트 및 이상 혈관신생이나 세포 증식을 특징으로 하는 질환의 치료를 가능하게 하는 사용 방법이 개시된다.

대 표 도 - 도1a

(72) 발명자

브라이트바르트 에알

이스라엘 73127 하쉬모나임, 하이츠하르 스트리트
27

벤지오 리브나트

이스라엘 49317, 페타크-티크바, 시베디아 스트리
트 4

펠레드 미가엘

이스라엘 84847 베에르-셰바, 네베 노이, 채트사브
스트리트 17

명세서

청구범위

청구항 1

필요로 하는 대상체의 조직 내의 혈관신생을 다운조절할 때 사용하거나, 필요로 하는 대상체에서의 과도한 혈관신생과 관련된 질병 또는 질환을 치료할 때 사용하기 위한 PPE(pre-prodenothelin)-1 프로모터에 전사적으로 결합된 아데노바이러스 E1 영역을 포함하고,

상기 PPE(pre-prodenothelin)-1 프로모터는 배열번호:8에 표시되어 있는 배열의 적어도 1개의 복제를 더 포함하는 cis 작용 조절 엘리먼트를 포함하는, 조건부 복제 아데노바이러스.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 프로모터가 PPE-1-3X 프로모터인 것을 특징으로 하는 조건부 복제 아데노바이러스.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 프로모터가 배열번호:6에 표시되어 있는 배열 또는 그것의 상보(complimentary) 배열의 적어도 1개의 복제(copy)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조건부 복제 아데노바이러스.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 프로모터가 배열번호:6에 표시되어 있는 배열 또는 그것의 상보 배열의 적어도 2개의 복제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조건부 복제 아데노바이러스.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 프로모터가 배열번호:1에 표시되어 있는 배열, 그것의 단편, 또는 그것의 유도체의 적어도 1개의 복제를 포함하는 것을 특징으로 하는 조건부 복제 아데노바이러스.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 프로모터는 하이폭시아 응답 엘리먼트를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조건부 복제 아데노바이러스.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 하이폭시아 응답 엘리먼트는 배열번호:5에 표시되어 있는 배열의 적어도 1개의 복제를 포함하는 것을 특징으로 하는 조건부 복제 아데노바이러스.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 프로모터는 배열번호:7에 표시되어 있는 배열 또는 그것의 상보 배열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조건부 복제 아데노바이러스.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 리포터(reporter) 유전자 배열이 결여되는 것을 특징으로 하는 조건부 복제 아데노바이러스.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아데노바이러스는 아데노바이러스 혈청형 5가인 것을 특징으로 하는 조건부 복제 아데노바이러스.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아데노바이러스는 의약 조성물로서 조제되는 것을 특징

으로 하는 조건부 복제 아데노바이러스.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아데노바이러스의 치료적 유효량이 10^3 내지 10^{16} 개의 바이러스 입자인 것을 특징으로 하는 조건부 복제 아데노바이러스.

청구항 13

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아데노바이러스의 치료적 유효량이 10^5 내지 10^{13} 개의 바이러스 입자인 것을 특징으로 하는 조건부 복제 아데노바이러스.

청구항 14

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아데노바이러스의 치료적 유효량이 10^7 내지 10^{12} 개의 바이러스 입자인 것을 특징으로 하는 조건부 복제 아데노바이러스.

청구항 15

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아데노바이러스는 침투성(systemic) 인비보(in-vivo) 투여, 엑스비보(ex-vivo) 투여, 또는 국부 인비보 투여에 의해 투여되는 것을 특징으로 하는 조건부 복제 아데노바이러스.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

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

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 혁산 구조, 약학 조성물 및 대상체의 특수 조직 영역의 혈관신생을 조절하기 위해 사용될 수 있는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 내피세포 특이적 프로모터 활성을 나타내는 단리된 폴리뉴클레오티드 배열 및 그 사용 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 증대된 활성 및 내피세포 내에서의 특이성을 나타내는 개질 프리프로엔도셀린-1(proreendothelin-1; PPE-1) 프로모터 및 특수 세포 서브세트(specific cell subsets)의 세포독성을 활성화하여 특이적 혈관신생을 특징으로 하는 질환의 치료를 가능하게 하는데 사용될 수 있거나, 새로운 혈관의 세포를 성장시키거나 또는 성장을 유도함으로써 허혈성 질환의 치료를 가능하게 하는데 사용될 수 있는 혁산 구조에 관한 것이다. 본 발명은 또 하이폭시아(hypoxia) 및 혈관신생을 포함한 생리학적 조건에 응답하여 그 발현을 개선하는 PPE 프로모터의 개질 및 혈관신생 내피 특이적 조합 치료에 관한 것이다.

배경 기술혈관신생(Angiogenesis):

[0003] 혈관신생은 새로운 혈관이 성장하는 것으로서, 그 성장 과정은 주로 이동(locomotion), 증식, 및 모세혈관 내피 세포에 의한 관 형성(tube formation)에 의존한다. 혈관신생 중, 내피세포는 그 휴지(quiescent) 상태로부터 벗어나서 급속하게 증식한다. 세포의 혈관신생 표현형으로의 전이에 관여하는 문자 기구는 알려져 있지 않으나 새로운 혈관의 형성의 원인이 되는 과정들은 잘 입증되어 있다[Hanahan, D., Science 277, 48-50, (1997)]. 혈관의 성장은 내피 스프라우팅(endothelial sprouting)[Risau, W., Nature 386, 671-674, (1997)] 또는 분할 혈관신생(intussusceptions)[Patan, S., et al; Microvasc. Res. 51, 260-272, (1996)]을 수반한다.

[0004] 제1의 경로에서, 다음의 과정들이 발생한다:

[0005] (a) 혈관 기저부(basement), 통상 후 모세관 세정맥(post capillary venule) 및 간질 매트릭스(interstitial matrix)의 용해;

[0006] (b) 스티뮬러스(stimulus)를 향한 내피세포의 이동;

[0007] (c) 선행하는 내피세포(들)에 후속하는 내피세포의 증식;

[0008] (d) 내피 어레이(array)/스프라우트(sprout)의 혈관강(lumen)의 형성(캐널라이제이션; canalization);

[0009] (e) 혈액의 흐름을 허용하기 위해 스프라우트들의 문합(confluencial anastomoses)에 의한 분기(branches) 또는 루우프(loops)의 형성;

[0010] (f) 주피세포(pericytes; 즉 주피세포 및 평활근 세포)를 구비한 혈관의 인베스트먼트; 및

[0011] (g) 미성숙 혈관 주변의 기저막의 형성.

[0012] 제2의 경로, 즉 기존의 혈관의 혈관강 내로 간질 조직주(interstitial tissue column)의 삽입을 통해서도 신생 혈관이 형성될 수 있다. 이를 조직주의 성장 및 그 안정화에 의해 혈관강이 분할되고 국부 혈관망이 개조된다.

[0013] 혈관신생(Angiogenesis)은 낮은 산소농도 조건(허혈 및 종양전이 등) 하에서 발생하므로 신혈관형성(neovascularization)의 중요한 환경인자가 될 수 있다. 에리스로포이에틴(erythropoietin), 트랜스페린(transferring) 및 그 수용체, 대부분의 글루코스 수송 유전자 및 당분해 경로 유전자, LDH, PDGF-BB, 엔도셀린-1(ET-1), VEGF 및 VEGF 수용체를 포함한 다수의 유전자의 발현은 이를 유전자의 전사를 조절하는 하이폭시아

응답 엘리먼트(Hypoxic Response Element; HRE)에 하이포시아 유도 인자(Hypoxia Inducible Factor; HIF-1)를 특이적 결합하는 것에 의해 하이포시아 상태 하에서 유도된다. 하이포시아 상태에 반응하는 이들 유전자의 발현은 세포가 하이포시아 상태 하에서 기능을 발휘할 수 있도록 한다.

[0014]

혈관신생 과정은 종양 또는 정상 세포뿐 아니라 세포의 기질(extracellular matrix)의 조성물에 의해 분비된 혈관신생 성장 인자 및 내피세포 효소(Nicosia and Ottinetti, 1990, Lab. Invest., 63, 115)의 활성에 의해 조절된다. 혈관신생의 초기단계 중에, 내피세포 스프라우트는 기존의 혈관의 기저막 내의 간극을 통해 나타난다(Nicosia and Ottinetti, 1990, supra; Schoefl, 1963, Virehous Arch. Pathol. Anat. 337, 97-141; Ausprunk and Folkman, 1977, Microvasc. Res. 14, 53-65; Paku and Paweletz, 1991, Lab. Invest. 63, 334-346). 새로운 혈관이 형성됨에 따라, 새로운 혈관의 기저막은 복잡한 구조적 및 조성적 변화를 겪는데, 이것은 혈관신생 응답에 영향을 미치는 것으로 생각된다(Nicosia, et. al., 1994, Exp Biology. 164, 197-206).

[0015]

혈관신생 및 병리학:

[0016]

다수의 혈관신생 인자들이 혈관신생 과정을 지배한다. 혈관신생 유발인자들(pro-angiogenic factors) 및 혈관신생 저항인자들(anti-angiogenic factors) 사이의 미세한 균형이 붕괴되고, 그 결과 비자기제한적(nonself-limiting) 내피세포 및 주위내피세포(periendothelial cell)의 증식이 유발된다는 것이 병리학에 의해 이해된다. 혈관신생은 정상 조건 하에서 고도로 조절되는 과정이지만, 많은 질병(특히, 혈관신병 질병)들이 지속적으로 조절되지 않는 혈관신생에 의해 유발된다. 이와 같은 질병 상태에서, 조절되지 않은 혈관신생은 특정 질병의 직접적인 원인이 되거나 기존 병리학적 증상을 악화시키는 원인이 될 수 있다. 예를 들면, 안구의 신혈관형성(ocular neovascularization)은 실명의 가장 일반적인 원인이 되고, 대략 20가지 눈병의 증상의 기초가 된다. 관절염과 같은 기 존재하는 증상에서, 새롭게 형성된 모세혈관은 관절 내에 침투하여 연골을 파괴한다. 당뇨병에서, 망막 내에 새롭게 형성된 모세혈관은 안구의 유리액(vitreous humor) 내에 침투하여 출혈 및 실명의 원인이 된다. 최근에 이르기까지, 안구 신혈관형성, 관절염, 피부병, 및 종양에서 발생하는 혈관신생은 치료적으로 억제하는 것이 곤란하였다.

[0017]

불안정한 혈관신생은 여러 가지 병리학적 증상의 전형이 되고, 그 병리학적 상태의 진행을 지속시킨다. 예를 들면, 고령 종양 내의 혈관 내피세포는 정상 조직 내의 혈관 내피세포에 비해 약 35배 빠른 속도로 분화된다(Denekamp and Hobson, 1982 Br. J. Cancer 46:711-20). 이와 같은 비정상 증식은 종양 성장 및 전이를 위해 필요하다(Folkman, 1986 Cancer Res. 46:467-73).

[0018]

혈관 내피세포 증식은 이 내피세포가 염증 부위 내에서 방출되는 성장 인자들에 응답하여 증식하는 류머티즘성 관절염, 건선 및 활막염과 같은 만성 염증성 질환에도 중요하다(Brown & Weiss, 1988, Ann. Rheum. Dis. 47:881-5). 죽상동맥경화증에서, 죽상동맥경화성 플레이크(atherosclerotic plaque)는 혈관 내의 내피세포의 모노클로날 팽창(monoclonal expansion)에 의해 촉발된다. 더욱, 당뇨병성 망막증에서의 실명은 제어되지 않은 상태의 혈관신생 및 망막의 소모를 자극하는 눈의 기저막 변화에 의해 유발되는 것으로 생각된다.

[0019]

내피세포는 또 이식거절반응(graft rejection)에도 관계가 있다. 동종이식 거절반응 증상에서, 내피세포는 이식 부분에 백혈구 트래픽(leukocyte traffic)을 유발하는 사전 부착 결정인자(pro-adhesive determinant)를 발현한다. 이식 내의 내피세포 상의 백혈구 부착 분자의 유도는 국부 방출된 사이토카인(cytokines)에 의해 수행될 수 있는 것으로 생각된다.

[0020]

다른 한편, 무효화된 혈관신생도 죽상동맥경화 유래의 관상동맥폐색(예, 협심증), 상해 또는 수술 후의 괴사 손상, 또는 궤양과 같은 위장장애와 같은 질병 발생에 중요한 인자이다.

[0021]

따라서, 혈관신생 과정을 조절 또는 개변하는 것은 기초 질병 상태의 병리학적 진행에 미치는 혈관신생 과정을 제한하는데 중요한 치료적 역할을 할 수 있을 뿐 아니라 그 병인학을 연구하기 위한 가치 있는 수단을 제공할 수 있다.

[0022]

최근 내피세포 조절 약제(억제제 또는 자극제)의 개발에 상당한 진전이 이루어졌다. 예를 들면, 성체 쥐의 복막강 내에 설치된 콜라겐 괴복된 매트릭스 내에서의 β FGF 단백질 투여에 의해 양호한 혈관신생 및 정상 환류 구조(perfused structure)가 얻어진다. 관상동맥 폐색 중인 성체 쥐의 관상 동맥 내에 β FGF 단백질을 주입하면 심근기능장해의 감소, 심근경색의 감소, 및 혈관의 증대의 결과가 얻어진다는 보고가 있다(Yanagisawa-Miwa, et al., Science 257:1401-1403, 1992). β FGF 단백질을 이용한 심근 허혈 동물 모델에서도 유사한 결과가 보고되었다(Harada, et al., J Clin Invest 94:623-630, 1994, Unger, et al., Am J Physiol 266:H1588-H1595, 1994).

[0023] 그러나, 장기간 지속되는 기능을 가지는 혈관의 대량 형성을 위해, 전술한 단백질 인자의 반복된 운반 (delivery) 또는 장기간의 운반이 필요하므로 전술한 단백질 인자는 임상에서의 사용이 제한되었다. 더욱, 혈관신생 조절 인자의 생성에 수반되는 고비용 이외에도 이들 단백질 인자들의 효율적인 운반을 위해서는 관상동맥 내에 카테터를 설치해야 하므로 이것은 비용 및 처치의 곤란성을 더 증대시킨다.

[0024] 모든 혈관신생 저항 치료의 기본 목표는 미세혈관 증식소(foci of proliferating)를 정상 안정 상태로 복귀시키고 그 재성장을 방지하는 것이다[Cancer: Principles & Practice of Oncology, Fifth Edition, edited by Vincent T. DeVita, Jr., Samuel Hellman, Steven A. Rosenberg. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. (1997)]. 마찬가지로, 혈관신생 치료의 목표도 필요 혈관신생 인자들을 원상회복시키는 것이 아니라 이들 사이에 적절한 균형을 재확립하는 것이다(Dor, et al, Ann NY Acad Sci 2003;995:208-16)(for an extensive review of pro- and antiangiogenic therapies see Zhang et al Acta Bioch and Biophys Cinica, 2003:35:873-880, and Mariani et al. MedGenMed 2003, 5:22; and Folkman, Semin. Onc 2002, 29:15-18).

혈관신생 저항 치료법:

[0026] 항혈관신생 치료법은 종양(예, 망막증, 양성 및 악성 혈관신생 종양) 성장의 진행을 지연시킬 수 있으므로 확실한 임상적 치료법이다.

[0027] 일반적으로, 당뇨병성 망막증, 건선, 관절염, 혈관종, 종양 성장 및 전이와 같은 모세혈관의 제어되지 않은 성장에 의해 유래된 모든 질병은 혈관신생 저항 치료법의 표적이다.

[0028] 예를 들면, 임상적으로 발견되지 않는 크기(예, 수 mm^3 의 크기)를 초과하는 고형 종양의 진행성 성장은 종양 혈관신생(tumor angiogenesis)으로 알려져 있는 과정인 새로운 혈관의 지속적인 형성이 필요하다. 종양 성장 및 전이는 혈관신생 의존성(angiogenesis-dependent)이다. 종양은 종양 자체의 성장을 위한 양분 및 산소를 수송하기 위해 새로운 모세혈관의 성장을 지속적으로 자극해야 한다. 그러므로, 종양 혈관신생의 방지 또는 종양에 존재하는 혈관의 선택적 파괴(혈관 표적 치료법)는 혈관신생 저항 종양 치료법의 기초가 된다.

[0029] 최근, 악성 질병의 치료를 위한 다량의 혈관신생 저항 약제가 개발되었고, 이들 중 일부는 이미 임상 시험 중에 있다(참조: Herbst et al. (2002) Semin. Oncol. 29:66-77, and Mariani et al, MedGenMed 2003;5:22).

[0030] 종양의 혈관신생 저항 치료를 목적으로 하는 대부분의 연구 대상은 인체 내의 혈관신생을 조절하는 지배적 과정, 즉 혈관 내피세포 성장 인자(VEGF)와 그 수용체(VEGFR)의 상호작용이다. VEGFR 혈관신생 유발작용을 조절하는 약제는 (i) VEGF 단백질 자체 또는 그 수용체에 대한 항체 (예, rhuMAb VEGF, Avastin); (ii) VEGF 티로신 키나아제에 대한 소분자 화합물 (예, ZD6474 및 SU5416); (iii) VEGFR 표적 리보자임을 포함한다.

[0031] 기타 신규의 혈관신생 저항제는 고유의 항종양 및 혈관신생 저항 특성을 보유하는 에스트라디올의 천연 대사물인 2-메톡시에스트라디올(2-ME2) 및 플라스미노겐 및 콜라겐 XVIII의 각각의 단백질 분해 철단 단편인 엔지오스파틴(angiostatin) 및 엔도스타틴(endostatin)을 포함한다.

[0032] 사전 임상 모델에서는 장래성이 밝지만 현재까지 임상 실험에서 시험된 모든 혈관신생 저항 약제의 체계적 투여는 제한적인 성공률을 보여주었고, 혈소판감소증, 백혈구감소증 및 각혈을 포함한 심각한 독성을 나타내었다. 이들 결과는 현재의 종양 항혈관신생 약제의 진행악성종양(advanced malignancies)의 치료제로서의 사용에 한계가 있을 수 있다는 것을 암시하는 것이다. 오레일리(O'Reilly) 등은 항혈관신생 치료법의 개시와 항종양 효과 사이의 잡복기는 치료에 응답하기 전 초기 종양이 진행하는 결과는 얻는다는 것을 보여주었다[O'Reilly S et al. (1998) Proc Am Soc Clin Oncol 17:217a]. 더욱, 최근의 연구들은 혈관신생의 조절은 모세혈관상 (capillary beds)을 간에 상이하다는 것을 제안하였는데, 이것은 항혈관신생 치료법은 장기/조직 특이성 토대 위에 최적화될 필요가 있다는 것을 암시한다[Arap et al. (1998) Science 279:377-380].

[0033] 흥미롭게도 평활근 세포 증식에 대한 혈관신생 저항 치료법(예, 헤파린, 헤파린-펩티드 치료)이 관상 동맥 질병을 가진 환자의 심근 허혈에 대해 실행되었을 때 나쁜 결과가 얻어졌다[Liu et al., Circulation, 79: 1374-1387 (1989); Goldman et al., Atherosclerosis, 65: 215-225 (1987); Wolinsky et al., JACC, 15 (2): 475-481 (1990)]. 심장혈관 질환의 치료를 위한 약제의 사용에 수반된 여러 가지 제한은 (i) 심장혈관 질환을 가진 환자에 대한 허용이 불가한 정도의 위험을 발생하는 전신 독성(systemic toxicity); (ii) 수술 후 혈관 창상 치유와의 간섭; (iii) 주변 내피세포 및/또는 기타 내측 평활근 세포에 대한 손상의 가능성성이 포함되었다.

[0034] 따라서, 혈관신생 저항 인자(즉, 인비트로 불안정성(in-vitro instability)에 기초한 제조 한계 및 요구되는 높은 사용량; 및 결핍 효과의 원인이 되는 볼러스(bolus) 투여의 최대 동력학(peak kinetics))의 전신 투여

(systemic administration)에 수반된 이들 장해 및 고유의 장해는 질병에 관련된 신혈관형성의 치료에서의 혈관신생 인자의 효과적 사용을 제한한다.

[0035] 암의 혈관신생 저항 유전자 치료법

원발 종양뿐 아니라 전이 종양의 종양 세포 증식은 제한된 영양 공급에 의한 아폽토시스(apoptosis) 비율을 증대시키는 것에 의해 상쇄된다. 휴지상태의 원발성 또는 전이 종양은 "혈관신생 스위치(angiogenic switch)"가 발생하고, 영양 공급이 종양의 크기에 대해 적절할 때마다 전이를 발현시키기 시작한다.

혈관신생 스위치는 다수의 기구를 통해 발생한다:

1. 암유전자에 의한 VEGF 및 bFGF와 같은 혈관신생 유발 유전자의 업조절(up-regulation), 또는 트롬보스폰딘(thrombospondin)과 같은 혈관신생 저항제의 다운 조절(down-regulation).

2. 종양 관련 하이포시아 조건에 의한 하이포시아 유도 인자-1(hypoxic inducible factor-1; HIF-1)의 활성화.

3. 종양 세포에 의해 유도되는 종양상(tumor bed) 섬유아세포에 의한 혈관신생 유발 단백질의 분비.

4. 종양에 트래픽(trafficking)을 유발하는 골수 내피세포 전구체.

표 1: 종양 혈관신생의 내인성 조절인자(regulators)

종양 혈관신생의 내인성 조절인자	
활성화인자(Activators)	억제인자(Inhibitors)
혈관 내피세포 성장 인자 (VEGF)	P53
섬유아세포 성장 인자 1 (FGF1)	트롬보스폰딘-1*
섬유아세포 성장 인자 2 (FGF2)	트롬보스폰딘-2
혈소판 유래 성장 인자 (PDGF)	금속프로테아제(Metalloproteinases)의 조직 억제인자(TIMPs)
엔지오파이에틴2*	엔지오스타틴(Angiostatin)
엔지오파이에틴1**	엔도스타틴(Endostatin)
형질변환 성장 인자-β* (TGF-β)	혈관신생 유발성 앤티트롬бин(Antithrombin) III
종양 괴사 인자-α* (TNF-α)	혈관정지성 C-X-C 케모카인(PF4, IP-10, MIG)
인터로킨-8 (IL-8)	색소 내피세포 유래 인자(PEDF)
혈소판 유래 내피세포 성장 인자 (PD-DCGF)	인터로킨-12(IL-12)
간세포 성장 인자 (HGF)	인터페론 (INF)-α β γ

* 사용량 의존성

** 약한 혈관신생 활성화인자

혈관신생의 활성화인자와 억제인자 사이의 상대적 균형(상기 표 1 참조)은 종양을 휴지 상태 내에 유지하기 위해 중요하다. 억제인자의 수준을 감소시키거나 활성화인자의 수준을 증대시키면 양자 간 균형이 변화됨으로써 종양 혈관신생 및 종양 성장이 유발된다.

종양 조직의 두께가 최인접 혈관으로부터 150–200 μm를 초과하는 경우 신생물 조직(neoplastic tissue)에 대한 산소 확산은 부적절한 것이다. 그러므로, 본질적으로 이 치수를 초과하는 모든 종양은 이미 혈관신생의 스위치온(switched-on) 상태에 있다. 종양 세포 증식률은 혈관 공급에 무관하다. 그러나, 혈관신생 스위치가 발행되자마자 아폽토시스의 비율은 3-4배(24) 감소한다. 더욱, 영양 공급 및 이화생성물 방출은 종양 아폽토시스 감소에 대한 혈관신생 혈관의 유일한 원인이 아니다. 미소혈관구조 내피 세포는 항아폽토시스성 인자(anti-apoptotic factors), 마이토겐(mitogens), 및 b-FGF, HB-EGF, IL-6, G-CSF, IGF-1 및 종양 세포 아폽토시스를 더욱 억제하는 PDGF와 같은 생존 인자도 분비한다.

종양 세포는 체내의 세포에 비해 유리함을 제공하는 높은 돌연 변이율에 기인되어 유전학적으로 불안정하다. 예를 들면, p53 유전자의 돌연변이는 아폽토시스율을 억제한다. 더욱, 혈관신생 유발 제어 또는 혈관신생 저항

제어의 암유전자 변화(예, ras 암유전자)는 혈관신생 스위치를 유발시킬 수 있다. 그러나, 높은 돌연 변이율은 암의 유전적 불안정성에 대한 유일한 기구가 아니다. 종양 세포에 의해 식균된 "아폽토시스 사체(apoptotic bodies)"의 증거가 있는데, 이것은 이수성(aneuploidy)의 원인이 되고, 또 유전학적 불안정성을 증대시킨다. 일반적으로, 암은 혈관신생에 의존한다. 유전학적 불안정성에 기인되어 암은 아폽토시스율을 억제하고, 전이시이딩(metastatic seeding)을 가능하게 하는 혈관신생 유발 사이토카인 균형을 통합조정할 수 있다.

[0049] 인간의 혈관계는 3조개 이상의 내피세포를 포함하고 있다. 정상적인 휴지 상태의 내피세포의 수명은 1000일을 초과한다. 종양 진행에 관여하는 혈관신생 내피세포는 급속하게 증식하지만 그 계놈 안정성(genomic stability)은 종양 세포와 상이하다. 따라서, 약물내성이 최소이고 변이체 클론의 발달의 가능성은 낮다. 또, 종양 진행을 위한 율속(rate-limiting)은 혈관신생이므로 혈관신생 내피세포에 대한 치료는 고효율의 치료 양식을 낼 수 있다. 사실, 다수의 혈관신생 저항 물질은 전신요법의 잠재적 후보의 역할을 한다. 그러나, 이들 약제는 단백질이고, 따라서 그 투여는 빈번한 정맥내 투여에 의존하므로, 이들 약제의 사용은 심각한 제조 및 유지 문제를 제기한다. 혈관신생 저항 유전자의 운반은 지속적 단백질 분비를 위한 잠재적 해결책을 제공한다.

[0050] 혈관신생 과정을 조절하는 신규 유전자의 동정에 의해, 상기 문제점을 극복하기 위해 체세포 유전자 치료법이 시도되었다. 암, 심혈관 질환 및 말초혈관 질환의 유전자 치료법을 개발하기 위한 지대한 노력이 경주되었음에도 불구하고, 유효하고 특이적 유전자 운반에 중요한 장해가 여전히 존재하고 있다[참조: Feldman AL. (2000) Cancer 89(6):1181-94]. 일반적으로 셔틀(shuttle)로서 재조합 바이러스 벡터를 이용하는 해당 유전자를 이용한 유전자 치료법의 중요한 제한 인자는 해당 유전자를 표적 조직에 특이적으로 유도하는 능력에 있다.

[0051] 이들 제한을 극복하기 위한 시도는 세포독성 유전자에 공액을 이루는 조직 특이적 프로모터의 사용을 포함한다. 예를 들면, 제어 하에서 발현되는 세포독성 유전자의 내피세포 표적화에서 내피세포 특이적 프로모터가 재거(Jaggar) 등에 의해 설명되었다. 재거 등은 내피세포 내에서 TNF α 를 특이적으로 발현하기 위해 KDR 또는 E-셀렉틴(selectin) 프로모터를 사용하였다[Jaggar RT. Et al. Hum Gene Ther (1997) 8(18):2239-47]. 오자키(Ozaki) 등은 헤드페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제(herpes simplex virus thymidine kinase; HSV-tk)를 HUVEC에 딜리버하기 위해 폰-빌레브란트 인자(von-Willebrand factor; vWF) 프로모터를 사용하였다. 그러나, 이들 프로모터는 약한 활성만을 나타내었고, 고수준의 발현은 불가하였다.

[0052] 다수의 내피세포 특이적 프로모터가 종래기술에 기술되어 있다. 예를 들면, 에어드(Aird) 등은 인비보(in-vivo) 상태에서 조직 특이적 발현을 제공하는 인간의 폰 빌레브란트 인자 유전자의 5' 및 3' 조절배열을 단리하였다[Proc. Natl. Acad. Sci. (1995) 92:7567-571]. 그러나, 이들 배열은 레포터 도입유전자 발현의 불균일 패턴만을 완화할 수 있다. 폰 빌레브란트 조절 엘리먼트의 제어 하에서 유전자 도입 마우스 내에 도입된 박테리아 LacZ 레포터 유전자는 난황낭 및 성숙뇌 내의 내피세포의 하위개체군 내에서 도입유전자 발현을 나타내었다. 그러나, 비장, 폐, 간장, 신장, 심장, 고환의 혈관상 및 트롬보모듈린 유전자좌(thrombomodulin locus)에서는 전혀 발현이 겹출되지 않았다.

[0053] 코호넨 제이(Korhonen J) 등은 마우스의 태아의 혈관계를 통한 도입유전자의 균일한 발현에 기여하는 인간과 마우스의 TIE 유전자 프로모터를 단리하였다[Blood (1995) 96:1828-35]. 그러나, 성체 내에서의 발현은 폐 및 신장의 혈관에 제한되었고, 심장, 뇌, 간장에서의 발현은 겹출되지 않았다. 첼라거 엠(Schlaeger M) 등에 의해 유사한 결과가 얻어졌다. 첼라거 엠 등은 TIE-2 프로모터의 1.2 kb 5' 인접(flanking) 영역을 단리하였고, 태아 마우스의 내피세포에 제한된 도입유전자 발현을 보여주었다[Schlaeger TM et al. (1995) Development 121:1089-1098].

[0054] 따라서, 이들 배열의 어느 것도 발생단계 또는 성체 동물의 모든 내피세포에서 균일하게 작용하지 않는다. 더욱, 이들 배열의 일부는 내피세포에 제한되지 않았다.

[0055] 콩(Kong) 및 크리스털(Crystal)에 의해 제시된 다른 방법은 혈관신생 저항 인자의 종양 특이적 발현을 포함하였다. 그러나, 일부의 합성 혈관신생 저항제는 사전 임상 모델에서 독성을 수반하였으나 현재까지 내생의 혈관신생 저항제의 재조합형의 독성을 입증되지 않았다.

[0056] 엔지오스타틴도 또한 가능한 혈관신생 저항제로서 사용되었으나(Folkman et al., Cell 1997 Jan 24:88(2):277-85), 종양 내에서의 혈관신생의 조절에 관련된 과다한 인자들로 인해 엔지오스타틴 치료법만으로는 효과가 있을 가능성이 극히 낮다.

[0057] 현재까지 유망한 임상 시험을 통해 Avastin® 또는 Bay-43906®, 같은 혈관신생 치료는 종양 주위의 새로운 혈관의 성장을 제한하는 것에 의해 전이의 진행을 지연시킬 수 있다는 것을 보여주었다. 그러나, 대부분 또는 전

체의 현존하는 혈관신생 혈관을 파괴함과 동시에 종양細胞를 유도하는 혈관신생 저항 효과가 필요한 암 병리학에서는 새로운 혈관의 형성의 억제 및/또는 이들 혈관을 부분적으로 파괴하는 것은 불충분하다.

[0058] 프리-프로엔도셀린-1(pre-proendothelin-1; PPE-1) 프로모터

1988년 마사키(Masaki) 등에 의해 발견된 엔도셀린(ET)은 ET-1, ET-2 및 ET-3의 3개의 유전자로 구성되어 있다. 엔도셀린-1(ET-1)(21 아미노산 웨티드)은 내피세포에 의해 합성된 강력한 혈관수축제 및 평활근 세포 미토겐으로서 최초로 기술되었다. ET-1은 그 일부는 평활근 세포, 기도 및 위장 내피세포, 뉴런 및 사구체 메상기움 세포(glomerular mesangial cells)와 같은 다른 세포 내에서 발현되기도 하지만 혈관 내피세포 내에 발현된다. 그 발현은 하이포시아, 심혈관 질환, 염증, 천식, 당뇨병 및 암과 같은 다양한 병태생리학 증상 하에서 유도된다. 엔도셀린-1은 VEGF 및 PDGF와 같은 혈관신생 인자의 생성을 유발하고, 따라서 혈관신생 과정에서 중요한 역할을 담당한다.

[0060] 휴(Hu) 등은 엔도셀린-1 프로모터의 앤티센스 스트랜드(antisense strand) 상에 위치되는 하이포시아 반응성 엘리먼트(hypoxia responsive element; HRE)를 동정하였다. 이 엘리먼트는 하이포시아 상태에 의해 (인간, 쥐 및 쥐과동물의 유전자의) 엔도셀린-1 프로모터의 양성적 조절을 위해 요구되는 하이포시아 유래 인자-1 결합부위이다. 하이포시아는 에시스로포이에틴(erythropoietin; Epo), VEGF, 및 다양한 당분해 효소를 포함하는 다수의 유전자의 발현을 유발하는 강력한 신호이다. 코어 배열(8 염기쌍)은 하이포시아 상태에 반응함과 동시에 인접 영역이 기타 유전자의 것과 상이한 모든 유전자 내에 보전된다. ET-1 하이포시아 반응성 엘리먼트는 GATA-2 및 AP-1 결합부위의 사이에 위치된다.

[0061] 부(Bu) 등은 내피세포 특이적 전사 활성을 부여함과 동시에 내피세포에 한정되는 단백질 또는 단백질 복합체를 결합하는 것으로 보이는 쥐과동물 PPE-1 프로모터(mET-1) 내의 복잡한 조절 영역을 동정하였다. 내피세포 특이적 양성 전사 엘리먼트(specific positive transcription element)로 지정된 이 영역은 쥐과동물 PPE-1 프로모터의 -364 bp 및 -320 bp의 사이에 위치된 적어도 3개의 기능 엘리먼트로 구성되어 있다. 모든 3개의 기능 엘리먼트는 완전 활성화를 위해 필요하다. 1 카피(copy) 또는 3 카피가 최소의 mET-1 프로모터로 구축되었을 때, 인비트로(*in vitro*) 상태의 내피세포 내의 레포트 유전자 발현은 엘리먼트가 없는 최소 프로모터에 비교하여 2-10배 증대되었다.

[0062] 미국특허 US5,747,340는 쥐과동물 PPE-1 프로모터 및 그 일부분의 사용을 교시한다. 그러나, 이 특허는 내피세포 특이적 인핸서(enhancer)가 이용하여 내피세포 특이성을 유지하면서 PPE 프로모터에 의해 달성된 발현의 수준을 증대시킬 수 있다는 것을 암시도 입증도 하고 있지 않다. 또, 이 특허는 PPE-1 프로모터는 하이포시아 상태 하에서 높은 전사 수준으로 유도된다는 것을 교시하고 있지 않다.

[0063] 유전자 지향성 효소 프로드리그 치료법(Gene-directed enzyme prodrug therapy(GDEPT)):

[0064] 이 치료법은 "자살유전자 치료법"이라고도 불린다. 이것은 암세포 내에서의 불활성 프로드리그의 활성 세포독성 약제로의 전환이 수반된다. GDEPT 내에 가장 널리 사용된 2가지 유전자는 간시클로비르(ganciclovir; GCV) 투여와 결합된 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제(HSV-TK) 및 5-플루오로시토신(5-fluorocytosine; 5FC) 투여와 결합된 대장균 시토신 디아미나제(cytosine deaminase; CD)이다. 상기 HSV-TK/GCV 계는 광범위한 사전 임상 평가뿐 아니라 임상 시험이 실행되었다. 현재까지, 상기 HSV-TK/GCV 계는 발열, GCV의 전신 독성, 골수억제(myelosuppression) 및 경증(mild-moderate) 정도의 간중독성과 같은 부작용이 크지 않다는 것이 입증되었다.

[0065] 상기 HSV-TK/GCV 계는 1976년에 크라이셀버드(Kraiselburd) 등에 의해 최초로 설명되었다. 플라즈미드를 포함한 HSV-TK에 의해 트랜스펙션(transfected)된 세포 또는 벡터를 포함한 HSV-TK에 의해 트랜스펙션된 세포는 아시클로비르(aciclovir), 간시클로비르(ganciclovir; GCV), 발시클로비르(valaciclovir) 및 팜시클로비르(famciclovir)를 포함하는 슈퍼 패밀리의 드리그에 대해 민감해진다. 구아노신 유사체(guanosine analog) GCV는 유전자 치료법의 구성에서 가장 활성이 양호한 드리그이다. HSV-TK 양성 세포는 GCV의 GCV 모노포스페이트(GCV-MP)로의 인산화 효율이 인간의 TK에 비해 1000배(three orders of magnitude) 이상인 바이러스 TK를 생성한다. 이어서 GCV-MP는 천연 티미딘 키나제에 의해 GCV 디포스페이트로 인산화되고, 최후에 GCV 트리포스페이트(GCV-TP)로 인산화된다.

[0066] GCV-TP는 강력한 DNA 폴리머라제 억제제로서 발생기 스트랜드(nascent strand)에 결합하는 것에 의해 DNA 합성을 종료시키고, DNA 신장을 종료시키고, 결국 세포 사망의 원인이 된다. GCV는 주로 HSV-TK 양성 세포에 영향을 주므로, 그 악영향은 최소화 및 희박화되고, 주로 혈소판감소증, 호중구감소증(neutropenia) 및 신장독성을 포함한다. 더욱, GCV 독성은 DNA 합성에 기초하므로 그 영향은 주로 증식하는 세포에 미친다. 최근 상기 HSV-

TK/GCV계는 암 유전자 치료법의 임상실험에서 광범위하게 사용되어왔다. 그럼에도 불구하고, 결과는 실망스러운 것이었고, 대부분 트랜스덕션(transduction)의 백분율이 낮은 인비보 상태에 제한되었다.

[0067] 최근의 연구는 HSV-TK/GCV 세포 세포독성 기구에 특징을 두었다. 최근 연구 결과 G2-M DNA 손상 체크포인트의 활성화에 기인되어 말기 S 단계 또는 G2 단계에서 세포주기가 정지된다는 것이 밝혀졌다. 이들 현상은 비가역적 세포사 뿐 아니라 세포사에 관련된 바이스탠더 효과(bystander effect)로 이어진다는 것이 밝혀졌다. 극심한 세포 확대는 잘 알려진 HSV-TK/GCV계가 투여된 세포 내의 형태 변화이다. 이 형태 변화는 특이적 세포골격 재구축에 기인한 것이다. 세포 주기 정지 후에 스트레스 액틴 파이버(Stress actin fiber) 및 두꺼운 중간 필라멘트로 된 망(net)이 나타난다.

[0068] HSV-TK/GCV계는 "바이스탠더 효과"라는 증폭 포텐셜(amplification potential)을 이용한다. 바이스탠더 효과는 HSV-TK 양성 세포가 HSV-TK 음성 세포의 살해를 유도하는 현상을 의미한다.

[0069] **바이스탠더 효과:** 바이스탠더 효과는 몰텐(Moolten) 등이 최초로 설명하였는데, 그는 HSV-TK 양성 세포와 HSV-TK 음성 세포의 1:9 혼합물은 GCV의 첨가 후 세포가 전멸된다는 것을 발견하였다. 바이스탠더 효과의 다수의 특징이 설명되었다:

1. 바이스탠더 효과는 세포-세포 접촉에 크게 의존하는 것이 발견되었다.

2. 그 범위는 세포의 종류에 따라 달라진다.

3. 그것은 균질 세포 종류에 한정되지 않고 상이한 세포 종류의 혼합물에도 적용된다.

4. 높은 수준의 HSV-TK 발현은 높은 바이스탠더 효과와 관련이 있다는 것이 발견되었다.

[0070] 켈버(Culver) 등은 인비보 모델에서 바이스탠더 효과를 증명하였다. 그들은 상이한 비율로 HSV-TK 양성 종양을 이식하였을 때 종양이 퇴행한다는 것을 입증하였다. 인비트로 모델과 달리 인비보 모델에서는 세포-세포 접촉이 바이스탠더 효과를 위해 불가결한 요소라는 것이 밝혀졌다. 키안만네쉬(Kianmanesh) 등은 일부만이 HSV-TK 양성인 상이한 간엽(liver lobes) 내에 종양 세포를 이식하는 것에 의해 원거리(distant) 바이스탠더 효과를 입증하였다. HSV-TK 양성 및 음성 병소(focus)의 양자가 퇴행하였다. 바이스탠더 효과는 상이한 기원의 세포들에 대한 인비보 상태에서도 입증되었다. 일반적으로, HSV-TK 및 그 바이스탠더 효과는 유전자 도입 시스템(gene delivery system) 내에서 실행되었을 때 효과적인 종양 억제 수단을 촉진해 준다. 그러나, 현재까지 임상 연구는 제한된 결과만을 입증했을 뿐이다.

조건부 복제 아데노바이러스(CRAd):

[0071] 현재의 아데노바이러스 벡터의 생성은 이 벡터가 정상 세포를 감염시킨다는 사실 및 다수의 종양 세포들이 도입 유전자에 의해 영향을 받지 않은 상태에 유지된다는 사실에 주로 기인되어 암유전자 치료법을 위한 용도에 제한된다. 양호한 복제 벡터는 인간에 대해 저병원성 또는 무병원성이어야 하고, 종양 선택적이어야 하고, 고용량으로 투여될 수 있어야 한다.

[0072] 종양괴(tumor masses)가 증대된 진행질환에서, 바이러스 벡터에 의한 종양 침윤은 효능의 핵심이다. 종양 세포의 트랜스덕션의 증대를 위한 새로운 강력한 방법은 조건부 복제 Ads(CRAds)와 같은 복제가능한 종양봉괴제를 사용하는 것이다. 주로 표적 세포에 대한 바이러스의 복제 및 예비 정상 세포에 대한 바이러스 복제를 금지하기 위해 초기 1 유전자(E1 유전자)의 유전자공학에 주로 초점을 맞추어, 종래 CRAd 벡터의 성장을 위한 2가지 중요한 방법이 개발되었다. 종양 세포 내에서 상보되지만 정상 세포 내에서는 상보되지 않는, Ad524와 같은 유전적 상보-타입(complementation-type; 타입 1)의 CRAds는 직초기(immediately early) (E1A) 또는 초기(E1B) 아데노바이러스 영역에서 돌연변이를 가진다. 트랜스 상보-타입(transcomplementation-type; 타입 2)의 CRAds에서, 바이러스 복제는 종양/조직-특이적 프로모터를 통해 제어된다. 그러나, 양자의 경우, 이소성 간장 트랜스덕션 및 벡터-유도된 독성은 중요한 문제이다(Rein, et al, Future Oncol, 2006;2:137-43). 따라서, 종래의 기술은 다른 세포 유형을 감염시킴이 없이 혈관신생 세포에 고도의 특이성을 가지며, 소망의 혈관신생 내피 세포 유형에서만 고효율로 복제하는 아데노바이러스 벡터 면에서 불충분하다.

[0073] 따라서, 대상체의 특이적 조직 영역 내의 혈관신생을 효과적으로 조절함과 동시에 종래 기술의 혈관신생 저항 방법의 독성 부작용 및 제한된 성공을 회피하는 새로운 방법을 제공하는 고도로 특별하고, 신뢰성이 있는 혈관신생-특이적 프로모터 및 혁신 구축물에 대한 필요성의 인식 및 그것을 확보하는 것이 크게 유리하다는 인식이 광범위하게 존재하고 있다.

발명의 상세한 설명

발명의 요약

[0080]

본 발명의 일 관점에 따르면, 배열번호:16으로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분에 공유결합된 배열번호:15로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분을 포함하는 cis 조절 엘리먼트를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드로서, 진핵성 세포(eukaryotic cells) 내에서 이 폴리뉴클레오티드에 전사적으로 결합된 폴리뉴클레오티드 배열의 전사를 지향시켜줄 수 있는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 또한, 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 구축물, 본 발명의 핵산 구축물을 포함하는 세포, 및 이 세포로 접종된 스캐폴드(scaffolds)가 제공된다.

[0081]

본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 핵산 구축물은 cis 조절 엘리먼트(cis regulatory element)의 조절 제어 하에 위치된 핵산 배열을 더 포함한다. 상기 핵산 배열은 혈관신생 조절제를 더 코드 할 수 있다.

[0082]

본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 핵산 배열은 VEGF, p55, 엔지오팝이에틴-1(angiopoietin-1), bFGF 및 PDGF-BB으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0083]

본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 스캐폴드는 합성 폴리머, 세포 접착 분자, 또는 세포 외 기질로 구성된다.

[0084]

본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 합성 폴리머는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 히드록시아파타이트(HA), 폴리글리콜 산(PGA), 엡실론-카프로락톤, 및 1-젖산(lactic acid)으로서, 폴리-1-락ти드(lactide) 편물[KN-PCLA], 직물(WV-PCLA), 연속공공(interconnected-porous) 칼슘 히드록시아파타이트(IP-CHA), 폴리D,L-젖산-폴리에틸렌글리콜(PLA-PEG), 비포화 폴리에스테르 폴리(프로필렌 글리콜-코-퓨말산)(PPF), 폴리락티드-코-글리콜리드(PLAGA), 폴리히드록시알카노에이트(PHA), 폴리-4-히드록시부티레이트(P4HB), 및 폴리포스파젠에 의해 강화된 1-젖산으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0085]

본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 세포 부착 분자는 인테그린, 세포간 부착 분자(ICAM) 1, N-CAM, 카드헤린, 테나신, 기세린(gicerin), 및 신경 손상 유래의 단백질(nerve injury induced protein 2; 닌주린2(ninjurin2))로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0086]

본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 세포외 기질은 피브로겐, 콜라겐, 피브로넥틴, 비멘틴, 미소관 관련 단백질 1D, 신경돌기 신장 인장(NOF), 박테리아 셀룰로스(BC), 라미닌 및 젤라틴으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0087]

본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 진핵세포의 핵산 배열을 발현하는 방법이 제공된다. 이 방법은 배열번호:16으로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분에 공유결합된 배열번호:15로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분을 포함하는 cis 조절 엘리먼트의 전사 제어 하에 위치된 해당 핵산 배열을 포함하는 핵산 구축물을 대상체에 투여하는 것에 의해 수행된다.

[0088]

본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 조직 내의 혈관신생을 조절하는 방법이 제공된다. 이 방법은 (a) 내피세포 특이적 프로모터; (b) 배열번호:5로 표시된 하이폭시아 응답 엘리먼트의 최소 하나 이상의 카페; 및 (c) 혈관신생 조절제를 코드하는 핵산 배열로서, 상기 프로모터 및 상기 하이폭시아 응답 엘리먼트의 조절 제어 하에 존재하는 핵산 배열을 포함하는 핵산 구축물을 상기 조직 내에 발현시키는 것에 의해 수행된다.

[0089]

본 발명의 다른 관점에 따르면, 조직 내의 혈관신생을 조절하는 방법이 제공된다. 이 방법은 혈관신생 조절제를 코드하는 핵산 배열을 포함하는 핵산 구축물을 조직 내에 발현시키는 것에 의해 수행된다. 상기 핵산 배열은 배열번호:16으로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분에 공유결합된 배열번호:15로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분을 포함하는 cis 조절 엘리먼트의 조절 제어 하에 존재한다.

[0090]

본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 투여는 전신 인비보 투여, 대상체로부터 제거된 세포에 엑스비보 투여 후 그 세포를 대상체의 체내에 재도입; 및 국부 인비보 투여로 구성된 그룹으로부터 선택된 투여방법에 의해 수행된다.

[0091]

본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 조직은 천연 조직 또는 가공 조직(engineered tissue)이다.

[0092]

본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 핵산 배열은 혈관신생 유발 인자를 코드하고, 혈관신

생 조절은 혈관신생 업조절(upregulating)이다.

[0093] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 핵산 배열은 혈관신생 저항제이고, 혈관신생 조절은 혈관신생 다운조절(downregulating)이다.

[0094] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, (a) 독성 분자의 이펙터 영역에 융합된 리간드 결합 영역을 포함하는 키메라 폴리펩티드를 코드하는 제1의 폴리뉴클레오티드 영역; 및 (b) 특이적 조직 또는 세포 내에 상기 키메라 폴리펩티드의 발현을 지향시켜 줄 수 있는 cis 조절 엘리먼트를 코드하는 제2의 폴리뉴클레오티드 영역을 포함하는 핵산 구축물이 제공된다. 상기 리간드 결합 영역은 특이적 조직 또는 세포 내에 존재하는 리간드를 결합할 수 있고, 상기 리간드 결합 영역에 대한 리간드의 결합은 독성 분자의 이펙터 영역을 활성하도록 선택된다. 또, 본 발명의 핵산 구축물에 의해 형질전환된 진핵세포가 제공된다.

[0095] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 cis 조절 엘리먼트는 PPE-1 프로모터, PPE-1-3x 프로모터, TIE-1 프로모터, TIE-2 프로모터, 엔도글린(Endoglin) 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 라이크 단백질(ACLP) 프로모터로 구성된 그룹으로부터 선택된 내피세포 특이적 프로모터 또는 주피세포 특이적 프로모터이다.

[0096] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 리간드 결합 영역은 세포 표면 수용체의 리간드 결합 영역이다. 세포 표면 수용체는 수용체 티로신 키나제, 수용체 세린 키나제, 수용체 트레오닌 키나제, 세포 부착 분자 및 포스파타제 수용체로 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0097] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 세포독성 분자는 Fas, TNFR, 및 TRAIL로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0098] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 대상체의 조직 내의 혈관신생 다운조절 방법이 제공된다. 이 방법은 혈관신생 세포의 서브 집단 내에 세포독성을 발생하도록 설계 및 구성된 핵산 구축물을 대상체에게 투여하는 것에 의해 수행된다. 상기 핵산 구축물은 (a) 독성 분자의 이펙터 영역에 융합된 리간드 결합 영역을 포함하는 키메라 폴리펩티드를 코드하는 제1의 폴리뉴클레오티드 영역; 및 (b) 혈관신생 세포의 서브 집단 내에 상기 키메라 폴리펩티드의 발현을 지향시켜 줄 수 있는 cis 조절 엘리먼트를 코드하는 제2의 폴리뉴클레오티드 영역을 포함한다. 상기 리간드 결합 영역은 혈관신생 세포의 서브 집단 내에 존재하거나 그 서브 집단에 제공된 리간드를 결합할 수 있고, 상기 리간드 결합 영역에 대한 리간드의 결합은 독성 분자의 이펙터 영역을 활성함으로써 조직 내의 혈관신생을 다운조절하도록 선택된다.

[0099] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 대상체의 조직 내의 혈관신생을 다운조절하는 방법이 제공된다. 이 방법은 하기 단계를 포함한다.

[0100] (a) 혈관신생 세포의 서브 집단 내에 세포독성을 발생하도록 설계 및 구성된 핵산 구축물로서, 하기를 포함하는 핵산 구축물을 상기 대상체의 조직 내에 발현하는 단계.

[0101] (i) 세포독성 분자의 이펙터 영역에 융합된 리간드 결합 영역을 포함하는 키메라 폴리펩티드를 코드하는 제1의 폴리뉴클레오티드 영역. 상기 이펙터 영역은 리간드 결합 영역에 리간드의 결합 후 활성화되도록 선택된다.

[0102] (ii) 혈관신생 세포의 서브 집단 내의 상기 키메라 폴리펩티드의 발현을 지향시켜 주기 위한 cis 작용 조절 엘리먼트를 코드하는 제2의 폴리뉴클레오티드 영역.

[0103] (b) 상기 리간드를 대상체에 투여하고, 그 결과 조직 내의 혈관신생을 다운조절하는 단계.

[0104] 본 발명의 추가의 관점에 따르면, 활성 성분으로서 혈관신생 세포의 서브 집단 내의 세포독성을 발생하도록 설계 및 구성된 핵산 구축물 및 약학적으로 허용할 수 있는 담체를 포함하는 대상체 조직 내의 혈관신생 다운조절 용 약학 조성물이 제공된다. 상기 핵산 구축물은 (i) 세포독성 분자의 이펙터 영역에 융합된 리간드 결합 영역을 포함하는 키메라 폴리펩티드를 코드하는 제1의 폴리뉴클레오티드 영역; 및 (ii) 상기 혈관신생 세포의 서브 집단 내에 상기 키메라 폴리펩티드의 발현을 지향시켜 주기 위한 cis 조절 엘리먼트를 코드하는 제2의 폴리뉴클레오티드 영역을 포함한다. 여기서, 상기 리간드 결합 영역은 상기 특이적 조직 또는 세포 내에 존재하는 리간드를 결합할 수 있도록 선택되고, 그 결과 상기 리간드 결합 영역에의 상기 리간드의 결합은 상기 독성 분자의 상기 이펙터 영역을 활성화한다.

[0105] 본 발명의 또 다른 추가의 관점에 따르면, 과잉 신혈관형성에 관련된 질병 또는 증상의 치료방법이 제공된다.

이 치료방법은 하기의 단계에 의해 수행된다.

[0106] - 혈관신생 세포의 서브 집단 내에 세포독성을 발생하도록 설계 및 구성된 치료적으로 유효한 양의 혁산 구축물로서, 하기를 포함하는 혁산 구축물을 투여하는 단계.

[0107] (i) 세포독성 분자의 이펙터 영역에 융합된 리간드 결합 영역으로서, 이 리간드 결합 영역은 상기 혈관신생 세포의 서브 집단 내에 존재하거나 그 서브 집단에 제공된 리간드를 결합할 수 있도록 선택되고, 상기 리간드 결합 영역에의 상기 리간드의 결합은 상기 독성 분자의 상기 이펙터 영역을 활성화하는 리간드 결합 영역을 포함하는 키메라 폴리펩티드를 코드하는 제1의 폴리뉴클레오티드 영역; 및

[0108] (ii) 상기 서브 집단 내에 상기 키메라 폴리펩티드의 발현을 지향시켜 주기 위한 cis 작용 조절 엘리먼트를 코드하는 제2의 폴리뉴클레오티드 영역.

[0109] - 상기 조직 내의 혈관신생을 다운조절하고, 과잉 신혈관형성에 관련된 질병 또는 증상을 치료하는 단계.

[0110] 또, 대상체 내의 종양의 치료방법이 제공된다. 이 종양의 치료방법은 종양 세포 내에 세포독성을 발생하도록 설계 및 구성된 치료적으로 유효한 양의 혁산 구축물을 투여하는 것에 의해 수행된다.

[0111] 본 발명의 또 다른 추가의 관점에 따르면, 허혈에 관련된 질병 또는 증상의 치료방법이 제공된다. 이 치료방법은 혈관신생 세포의 서브 집단 내에 혈관신생을 발생하도록 설계 및 구성된 치료적으로 유효한 양의 혁산 구축물을 투여하는 단계 및 그 결과 조직 내의 혈관신생을 업조절하고, 허혈에 관련된 질병 또는 증상을 치료하는 단계에 의해 수행된다. 상기 혁산 구축물은 (i) 혈관신생 유발 인자를 코드하는 제1의 폴리뉴클레오티드 영역; 및 (ii) 혈관신생 세포의 서브 집단 내에 혈관신생 유발 인자의 발현을 지향시켜주기 위해 존재하는 cis 조절 엘리먼트를 코드하는 제2의 폴리뉴클레오티드 영역을 포함한다.

[0112] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 허혈에 관련된 질병 또는 증상은 창상 치유, 허혈성 뇌경색, 허혈성 심질환 및 위장장애로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0113] 본 발명의 또 다른 추가의 관점에 따르면, 대상체의 조직 내의 혈관신생을 다운조절하는 방법이 제공된다. 이 다운조절 방법은 하기의 단계에 의해 수행된다.

[0114] (a) 혈관신생 세포 내의 세포독성을 위해 설계 및 구성된 혁산 구축물로서, 하기를 포함하는 혁산 구축물을 조직 내에 발현하는 단계.

[0115] (i) 자살 유전자를 코드하는 제1의 폴리뉴클레오티드 영역; 및

[0116] (ii) 혈관신생 세포 내의 자살 유전자의 발현을 지향시켜 줄 수 있는 cis 작용 조절 엘리먼트를 코드하는 제2의 폴리뉴클레오티드 영역.

[0117] (b) 프로드러그가 상기 자살 유전자에 의해 독성 화합물로 전환되었을 때, 조직의 아폽토시스를 유발하는데 치료적으로 충분한 양의 프로드러그(prodrug)를 대상체에 투여하고, 그 결과 조직 내의 혈관신생을 다운조절하는 단계.

[0118] 본 발명의 또 다른 추가의 관점에 따르면, 대상체의 조직 내에 혈관신생을 다운조절하기 위한 약학 조성물이 제공된다. 이 약학 조성물은 활성 성분으로서 혈관신생 세포 내의 세포독성을 발생하도록 설계 및 구성된 혁산 구축물 및 약학적으로 허용할 수 있는 담체를 포함한다. 상기 혁산 구축물은 (a) 프로드러그를 독성 화합물로 전환시켜 줄 수 있는 자살 유전자를 코드하는 제1의 폴리뉴클레오티드 영역; 및 (b) 상기 혈관신생 세포 내의 자살 유전자의 발현을 지향시켜 줄 수 있는 cis 작용 조절 엘리먼트를 코드하는 제2의 폴리뉴클레오티드 영역을 포함한다.

[0119] 본 발명의 또 다른 추가의 관점에 따르면, 상기 혁산 구축물은 (a) 프로드러그를 독성 화합물로 전환시켜 줄 수 있는 자살 유전자를 코드하는 제1의 폴리뉴클레오티드 영역; 및 (b) 상기 혈관신생 세포 내의 자살 유전자의 발현을 지향시켜 줄 수 있는 cis 조절 엘리먼트를 코드하는 제2의 폴리뉴클레오티드 영역을 포함한다. 또, 본 발명의 혁산 구축물을 이용하여 형질전환된 진핵 세포가 제공된다.

[0120] 본 발명의 또 다른 추가의 관점에 따르면, 대상체의 조직 내의 혈관신생을 다운조절하는 방법이 제공된다. 이 방법은 혈관신생 세포 내에 세포독성을 발생하도록 설계 및 구성된 혁산 구축물을 대상체에 투여하는 것에 의해 수행된다. 상기 혁산 구축물은 (a) 자살 유전자를 코드하는 제1의 폴리뉴클레오티드 영역; 및 (b) 상기 혈관신생 세포 내에 상기 자살 유전자의 발현을 지향시켜 주기 위한 cis 작용 조절 엘리먼트를 코드하는 제2의 폴리뉴

클레오티드 영역을 포함하고, 여기서, 상기 자살 유전자는 프로드러그를 세포독성을 유발할 수 있는 독성 화합물로 전환하고, 그 결과 조직 내의 혈관신생을 다운조절할 수 있도록 선택된다.

[0121] 본 발명의 또 다른 추가의 관점에 따르면, 과잉의 신혈관형성에 관련된 질병 또는 증상의 치료방법이 제공된다. 이 치료방법은 혈관신생 세포 내의 세포독성을 위해 설계 및 구성된 치료적으로 유효한 양의 본 발명의 핵산 구축물을 투여하는 단계, 그 결과 조직 내의 혈관신생을 다운조절하는 단계, 및 과잉의 신혈관형성과 관련된 질병 또는 증상을 치료하는 단계에 의해 수행된다.

[0122] 본 발명의 또 다른 추가의 관점에 따르면, 대상체 내의 종양의 치료방법이 제공된다. 이 종양의 치료방법은 종양의 세포 내에 세포독성을 발생하도록 설계 및 구성된 치료적으로 유효한 양의 핵산 구축물로서, 하기를 포함하는 핵산 구축물을 투여하는 단계에 의해 수행된다.

[0123] (i) 자살 유전자를 코드하는 제1의 폴리뉴클레오티드 영역; 및

[0124] (ii) 종양 세포 내에 자살 유전자의 발현을 지향시켜 줄 수 있는 cis 작용 조절 엘리먼트를 코드하는 제2의 폴리뉴클레오티드 영역.

[0125] 여기서, 자살 유전자는 프로드러그를 종양의 세포 내에 세포독성을 유발할 수 있는 독성 화합물로 전환시킬 수 있도록 선택된다.

[0126] 본 발명의 추가의 관점에 따르면, cis 조절 엘리먼트에 전사적으로 결합된 조건부 복제 아데노바이러스를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 상기 cis 조절 엘리먼트는 혈관신생 내피세포 내의 상기 아데노바이러스의 전사를 유발할 수 있다.

[0127] 본 발명의 추가의 관점에 따르면, 대상체의 조직 내에서 혈관신생을 다운조절하는 방법이 제공된다. 이 방법은 cis 조절 엘리먼트에 전사적으로 결합된 조건부 복제 아데노바이러스를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 구축물을 조직 내에서 발현하는 단계를 포함한다. 상기 cis 조절 엘리먼트는 혈관신생 내피세포 내에서 상기 아데노바이러스의 전사를 유발하고, 그것에 의해 상기 조직 내에서 혈관신생을 다운조절할 수 있다.

[0128] 본 발명의 추가의 관점에 따르면, 과잉의 혈관신생이 관련된 질병 또는 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 이 방법은 치료를 요하는 대상체에게 cis 조절 엘리먼트에 전사적으로 결합된 조건부 복제 아데노바이러스를 포함하는 핵산 구축물의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 단계를 포함한다. 상기 cis 조절 엘리먼트는 혈관신생 내피세포 내에서 상기 아데노바이러스의 전사를 유발할 수 있고, 그것에 의해 조직 내에서의 혈관신생을 다운조절하고, 과잉의 혈관신생에 관련된 질병 또는 질환을 치료한다.

[0129] 본 발명의 추가의 관점에 따르면, 대상체의 종양을 치료하는 방법이 제공된다. 이 방법은 치료를 요하는 대상체에게 cis 조절 엘리먼트에 전사적으로 결합된 조건부 복제 아데노바이러스를 포함하는 핵산 구축물의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 단계를 포함한다. 상기 cis 조절 엘리먼트는 혈관신생 내피세포 내에서 상기 아데노바이러스의 전사를 유발할 수 있고, 그것에 의해 조직 내에서의 혈관신생을 다운조절하고, 종양을 치료한다.

[0130] 후술된 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 혈관신생 유발제 또는 혈관신생 억제제를 코드하는 비바이러스 성 이종배열이 결여되어 있다.

[0131] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 자살 유전자는 헤르페스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus)의 티미딘 키나제(thymidine kinase), 대상포진 바이러스(varicella zoster virus), 및 박테리아 시토신 테아미나제(bacterial cytosine deaminase)로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0132] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 프로드러그는 간시클로비르(ganciclovir), 아시클로비르(acyclovir), 1-5-이오도우라실(iodouracil) FIAU, 5-플루오로시토신(fluorocytosine), 6-메톡시프린 아라비노시드(methoxypurine arabinoside) 및 그 유도체로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0133] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 자살 유전자는 헤드페스 심플렉스 바이러스의 티미딘 키나제이고, 상기 프로드러그는 간시클로비르, 아시클로비르, FIAU 또는 그 유도체이다.

[0134] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 자살 유전자는 박테리아 시토신 테아미나제이고, 상기 프로드러그는 5-플루오로시토신 또는 그 유도체이다.

[0135] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 자살 유전자는 대상포진 바이러스 티미딘

키나제이고, 상기 프로드러그는 6-메톡시퓨린 아라비노시트 또는 그 유도체이다.

[0136] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 방법은 상기 세포독성의 추가 증강이 공동작용에 의해 가능하도록 선택된 최소 하나 이상의 추가의 치료법과 조합하여 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함한다. 상기 최소 하나 이상의 추가의 치료법은 화학요법, 방사선요법, 광선요법 및 광선역학요법, 수술법, 영양요법, 절제요법, 방사선요법과 화학요법의 병행법, 완두요법(brachiotherapy), 양자 비임 요법(proton beam therapy), 면역요법, 세포요법 및 광자 비임 방사선 수술법(photon beam radiosurgical therapy)으로 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0137] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 핵산 배열은 배열번호:16으로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분에 공유결합된 배열번호:15로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분을 포함하는 cis 조절 엘리먼트를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 진핵성 세포 내에서 이 폴리뉴클레오티드에 전사적으로 결합된 폴리뉴클레오티드 배열의 전사를 지향시켜줄 수 있다. 상기 배열번호:15로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분은 배열번호:16으로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분의 상류 측에 배치되거나, 배열번호:16으로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분은 배열번호:15로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분의 상류측에 배치될 수 있다.

[0138] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 cis 조절 엘리먼트는 배열번호:6으로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 카페, 또는 배열번호:6의 최소 2 이상의 카페를 더 포함한다. 상기 배열번호:6의 최소 2 이상의 카페는 인접할 수 있다.

[0139] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 배열번호:15로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분은 링커(linker) 폴리뉴클레오티드 배열에 의해 배열번호:16으로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분에 공유결합된다. 상기 링커 폴리뉴클레오티드 배열은 프로모터 및/또는 인핸서 엘리먼트(enhancer element)일 수 있다.

[0140] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 배열번호:1로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 카페를 포함한다.

[0141] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 하이폭시아 응답 엘리먼트(hypoxia response element)을 포함하고, 이 하이폭시아 응답 엘리먼트는 배열번호:5로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 카페를 포함하는 것이 바람직하다.

[0142] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 cis 조절 엘리먼트는 배열번호:7로 표시된 것과 같다.

[0143] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 핵산 구축물은 조건부 복제 아데노바이러스(conditionally replicating adenovirus)를 더 포함한다.

[0144] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 cis 조절 엘리먼트는 PPE-1 프로모터, PPE-1-3x 프로모터, TIE-1 프로모터, TIE-2 프로모터, 엔도글린(Endoglin) 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 라이크 단백질(ACLP) 프로모터로 구성된 그룹으로부터 선택되는 내피세포 특이적 또는 주피세포 특이적 프로모터이다.

[0145] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 방법은 아데노바이러스의 카페 수를 증대시킬 수 있도록 선택된 최소 하나 이상의 화합물 및/또는 혈관신생 조절제의 발현을 증대시킬 수 있는 최소 하나 이상의 화합물을 상기 조직 또는 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함한다.

[0146] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 추가의 화합물은 코르티코스테로이드 및/또는 N-아세틸 시스테인이다.

[0147] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 방법은 상기 cis 조절 엘리먼트의 추가 활성 증강이 공동작용에 의해 가능하도록 선택되는 최소 하나 이상의 혈관신생 조절제를 상기 조직 또는 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함한다.

[0148] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 최소 하나 이상의 혈관신생 조절제는 엔도셀린 수용체 길항제(endothelin receptor antagonist)이다. 상기 엔도셀린 수용체 길항제는 A형 또는 B형의 엔도셀린 수용체 길항제일 수 있다.

- [0149] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 B형 특이적 엔도셀린 수용체 길항제는 A192,621; BQ788; Res 701-1 및 Ro 46-8443로 구성된 그룹으로부터 선택된다.
- [0150] 본 발명의 바람직한 실시예의 추가의 특징에 따르면, 상기 엔도셀린 수용체 길항제는 보센탄(Bosentan)을 제외한 엔도셀린 수용체 길항제이다.
- [0151] 본 발명은 신규의 인핸서 엘리먼트를 구비한 cis 조절 엘리먼트를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드 배열 및 그 사용방법을 제공하는 것에 의해 공지의 구성의 결점을 성공적으로 극복한다. 상기 신규의 인핸서 엘리먼트는 핵산 구축물 및 도입유전자의 발현의 조직 특이적 조절 및 유전자 치료법에 의한 다종의 질환, 질병 및 증상의 치료를 위한 약학 조성물의 제조에 사용될 수 있다. 특히, 상기 본 발명의 cis 조절 엘리먼트, 단리된 폴리뉴클레오티드 및 약학 조성물은 선택된 도입유전자와 함께 내피세포 내의 혈관신생을 특이적 업조절 및/또는 다운조절하여, 종양, 전이성 질병 및 허혈성 질병의 치료에 이용될 수 있다.
- [0152] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명의 예시에 대해 설명한다. 도면의 구체적 내용은 본 발명의 바람직한 실시예를 설명하는 것으로서, 본 발명의 가장 유용한 것으로 생각되는 것 및 본 발명의 원리 및 개념을 용이하게 이해시킬 수 있는 것으로 생각되는 것을 제공한 것이다. 따라서, 도면에는 본 발명의 기본적인 이해에 필요한 정도의 구조가 도시되어 있다. 본 기술분야의 전문가는 도면을 참조한 발명의 설명을 통해 본 발명의 다수의 형태를 구현할 수 있을 것이다.

실시예

- [0272] 본 발명은 내피세포 특이적 프로모터 활성을 나타내는 폴리뉴클레오티드 배열 및 이것의 사용방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 내피세포 내에서 증대된 활성 및 특이성을 나타내는 개질 프리프로엔도셀린-1(modified-preprotoendothelin-1; PPE-1), 및 특이적 세포 서브세트 내의 아폽토시스를 활성화하는데 이용되어 비정상 신혈관형성 또는 세포 성장에 관련된 질병을 치료할 수 있는 핵산 구축물을 관한 것이다. 본 발명은 하이폭시아 및 혈관신생을 포함한 생리학적 조건에 응답하여 발현을 증대하는 PPE 프로모터의 개질 및 신규의 혈관신생 내피세포 특이적 치료법과 결합된 치료법에 관한 것이다.
- [0273] 본 발명의 적어도 하나의 실시예를 상세히 설명하기에 앞서, 본 발명은 상세한 설명란에 설명된 세부내용 또는 실시예에 예시된 내용에 한정되지 않는다는 것을 먼저 이해해야 한다. 본 발명은 기타의 실시예가 가능하고, 다양한 방법으로 실행 또는 수행될 수 있다. 또, 본 명세서에 사용된 용어는 설명을 위한 것일 뿐 본 발명을 제한하는 것으로 간주되어서는 안 된다.
- [0274] 불안정한 혈관신생은 여러 가지 병리학적 증상의 전형이 되고, 그 병리학적 상태의 진행을 지속시킨다. 예를 들면, 고령 종양 내의 혈관 내피세포는 정상 조직 내의 혈관 내피세포에 비해 약 35배 빠른 속도로 분화된다 (Denekamp and Hobson, 1982 Br. J. Cancer 46:711-20). 이와 같은 비정상 증식은 종양 성장 및 전이를 위해 필요하다(Folkman, 1986 Cancer Res. 46:467-73). 혈관 내피세포 증식은 이 내피세포가 염증 부위 내에서 방출되는 성장 인자들에 응답하여 증식하는 류머티즘성 관절염, 건선 및 활막염과 같은 만성 염증성 질환에도 중요하다(Brown & Weiss, 1988, Ann. Rheum. Dis. 47:881-5). 반면, 심허혈, 말초혈관 질환, 창상치유, 화상 등과 같은 허혈 증상에서는 혈관신생의 유도가 치료효과가 있고(Thompson, et al., PNAS 86:7928-7932, 1998), 따라서 유익하다.
- [0275] 따라서, 혈관신생 과정을 조절 또는 개변하는 것은 기초 질병 상태의 병리학적 진행에 미치는 혈관신생 과정을 제한하는데 중요한 치료적 역할을 할 수 있을 뿐 아니라 그 병인학을 연구하기 위한 가치있는 수단을 제공할 수 있다. 최근 내피세포 조절 약제(억제제 또는 자극제)의 개발에 상당한 진전이 이루어졌다(참조: see Mariani et al GenMedGen 2003, 5:22). 그러나, 혈관신생 유발용으로의 사용을 위해 그리고 장기간 지속되는 기능을 가지는 혈관의 대량 형성을 위해, 전술한 단백질 인자의 반복된 운반(delivery) 또는 장기간의 운반이 필요하므로 전술한 단백질 인자는 임상에서의 사용이 제한되었다. 더욱, 혈관신생 조절 인자의 생성에 수반되는 고비용 이외에도 이들 단백질 인자들의 효율적인 운반을 위해서는 관상동맥 내에 카테터를 설치해야 하므로 이것은 비용 및 처치의 곤란성을 더 증대시킨다.
- [0276] 현재까지 유망한 임상 시험을 통해 Avastin® 또는 Bay-43906® 같은 혈관신생 치료는 종양 주위의 새로운 혈관의 성장을 제한하는 것에 의해 전이의 진행을 지연시킬 수 있다는 것을 보여주었다. 그러나, 대부분 또는 전체의 현존하는 혈관신생 혈관을 파괴함과 동시에 종양 괴사를 유도하는 혈관신생 저항 효과가 필요한 암 병리학에서는 새로운 혈관의 형성의 억제 및/또는 이들 혈관을 부분적으로 파괴하는 것은 불충분하다. 더욱, 사전 임상 모델에서는 장래성이 밝지만 현재까지 임상 실험에서 시험 된 모든 혈관신생 저항 약제의 체계적 투여는 제한적

인 성공률을 보여주었고, 혈소판감소증, 백혈구감소증 및 각혈을 포함한 심각한 독성을 나타내었다. 따라서, 치료 약제의 내피세포 특이적 표적화는 혈관신생 유발 치료법 및 혈관신생 저항 치료법의 본질이다. 내피세포 특이적 프로모터는 flk-1, Flt-1 Tie-2 VW 인자, 및 엔도셀린-1 (참조: 구(Gu) 등에게 허여된 미국특허 US 6,200,751; 윌리암스(Williams) 등에게 허여된 US 5,916,763; 및 하라츠(Haratz) 등에게 허여된 US 5,747,340, 이들 특허는 본 명세서에 참조로서 도입되었다)을 포함하는 종래기술의 예에 설명되어 있다. 내피세포 특이적 프로모터의 제어 하에서 발현되는 치료 유전자의 내피세포 표적화도 종래기술에 개시되어 있다. 예를 들면, 재거(Jagger) 등은 내피세포 내에서 TNF α 를 특이적으로 발현하기 위해 KDR 또는 E-셀렉틴 프로모터를 이용하였고 [Jaggar RT. Et al. Hum Gene Ther (1997) 8(18):2239-47], 오자키(Ozaki) 등은 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제(HSV-tk)를 HUVEC로 운반하기 위해 폰-빌레브란트 인자(vWF) 프로모터를 이용하였다[Hum Gene Ther (1996) 7(13):1483-90]. 이들 프로모터는 내피세포 특이적인 것으로 생각되지만, 연구 결과 이들 프로모터 중 많은 것이 내피세포의 발현을 지향시켜주는 테 불충분하고, 요구되는 엄밀한 특이성이 부족하고, 활성이 약하고, 고수준의 발현이 불가능하다는 것이 밝혀졌다.

[0277] 치료용으로 보다 효과적이고 특이성을 가지는 내피세포 프로모터의 구축을 위한 한 가지 방법은 조직 특이적 인핸서 엘리먼트(tissue specific enhancer elements)를 동정(identification)하고 포함(inclusion)하는 것이다. 내피세포에 특이적인 인핸서 엘리먼트는 부(Bu) 등이 이미 설명하였다(J. Biol Chem. (1997) 272(19): 32613-32622). 부 등은 PPE-1의 인핸서 엘리먼트의 3 카피(ETE-C, ETE-D, 및 ETE-E))는 인비트로(*in-vitro*) 상태에서 내피세포 특이성을 가지는 프로모터의 배열에 기여한다는 것을 입증하였다. 그러나, 상기 인핸서 엘리먼트의 인비보(*in-vivo*) 상태의 효용은 입증되지 않았다.

[0278] 후술하는 실시예란에서 명확하게 설명되는 바와 같이, 본 발명자들은 인핸서 엘리먼트가 인비보 상태의 치료용으로 적합하다는 것을 입증하였다. 독특하고, 개질된 3회 반복(3x)되는 인핸서 엘리먼트(배열번호:7)를 생성하고, 인비트로 및 인비보 상태에서 내피세포 특이적 유전자 발현을 유도하는 그 활성을 평가함으로써 본 발명자들은 신규의 재배열된 방위의 3x 인핸서 엘리먼트의 부분을 포함하는 고도의 활성을 가지는 인핸서 엘리먼트를 구축하였다. 이 개질 인핸서 엘리먼트는 혈관신생에 참여하는 내피세포의 증식에 대한 향상된 특이성을 나타내고, 인비보 상태에서 정상 내피세포에서는 무시할 수 있는 활성을 나타낸다. 따라서, 본 발명자들은 최초로 재구성시 인접하는 프로모터 배열에 대해 우세한 활성을 부여하는 인핸서 엘리먼트의 부분들을 동정하였다.

[0279] 따라서, 본 발명의 일 관점에 따르면, 진핵세포 내에서 전사적으로 결합된 폴리뉴클레오티드 배열의 전사를 유도할 수 있는 cis 조절 엘리먼트를 포함하는 단리된 폴리펩티드가 제공된다. 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 배열번호:16으로 표시되는 배열의 최소 하나 이상의 부분에 공유결합된 배열번호:15로 표시되는 배열의 최소 하나 이상의 부분을 포함한다. 바람직한 일 실시예에서, 배열번호:15로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분은 cis 조절 엘리먼트에서 배열번호:16으로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분의 상류측에 위치되어 있다. 또 다른 바람직한 실시예에서, 배열번호:16으로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분은 cis 조절 엘리먼트에서 배열번호:15로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분의 상류측에 위치되어 있다.

[0280] 배열번호:15는 쥐과동물의 내피세포 특이적 인핸서 엘리먼트(배열번호:6)의 뉴클레오티드 배위 27 내지 44를 나타내는 폴리뉴클레오티드 배열로서, 3' 말단에 결합된 추가의 구아닐 뉴클레오티드를 가지는 것이고, 배열번호:16은 쥐과동물의 내피세포 특이적 인핸서 엘리먼트(배열번호:6)의 뉴클레오티드 배위 1 내지 19를 나타내는 폴리뉴클레오티드 배열이다.

[0281] 본 명세서 및 첨부한 청구범위의 목적을 위해, "인핸서(enhancer)"라는 용어는 바람직하게는 조직 특이적(그러나 반드시 조직 특이적인 것은 아님)으로 프로모터의 전사 활성을 증대시키는 임의의 폴리뉴클레오티드 배열을 의미한다. 본 명세서에 사용된 "조직 특이적 인핸서(tissue specific enhancer)"라는 용어는 조직 의존적(tissue-dependent) 또는 문맥 의존적(context-dependent)으로 프로모터의 전사 활성을 증대시키는 인핸서를 의미한다. 상기 "조직 특이적 인핸서"는 비적합성 조직(non-compatible) 또는 환경에서 프로모터의 전사 활성을 감소, 억제 또는 심지어 봉쇄하는 것을 알 수 있다.

[0282] 본 발명의 일부의 실시예에 따르면, 단리된 폴리뉴클레오티드는 배열번호:15 및 배열번호:16의 최소 하나 이상의 부분의 인접 카피들(contiguous copies)을 포함한다. 상기 배열들은 헤드 투 테일(head to tail) 방위로 위치되는 것이 바람직하고, 역방위(테일 투 테일 또는 헤드 투 헤드), 상보적 방위("a"를 "t"로 치환, "t"를 "a"로 치환, "g"를 "c"로 치환, 및 "c"를 "g"로 치환), 역상보적 방위 등과 같은 본 기술분야에 공지되어 있는 기타의 방위도 가능하다. 배열번호:15로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분은 배열번호:16으로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분에 직접 공유결합되거나, 바람직한 일 실시예에서, 2개의 배열이 링커 폴리뉴클레오티드

드 배열에 의해 결합될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 "링커 폴리뉴클레오티드(linker polynucleotide)"라는 용어는 2개 이상의 인접 폴리뉴클레오티드들(예, 배열번호:15 및 배열번호:16) 사이에 결합된 폴리뉴클레오티드 배열을 의미한다. 상기 링커 배열 중 바람직한 하나는 예를 들면 트리뉴클레오티드 배열 "cca"로서, 이것은 배열번호:7의 55-57 위치에 있는 뉴클레오티드로서 표시된 링커 배열이다. 기타 적합한 링커 배열은 전체 추가 인핸서 엘리먼트, 예를 들면 천연의 또는 인공의 배열번호:15 및 배열번호:16의 복수의 카페, PPE-1의 1x 인핸서 엘리먼트, 추가의 전체 프로모터, 하이폭시아 응답 엘리먼트(배열번호:5) 등을 포함할 수 있다.

[0283]

본 명세서에 사용된 "배열번호:15로 표시된 배열의 일부분..." 또는 "배열번호:16으로 표시된 배열의 일부분..."이라는 문구는 표시된 배열의 5' 말단, 3' 말단, 또는 이들 사이의 임의의 배열의 최소 8개 이상의 인접하는 뉴클레오티드를 나타내는 배열로서 정의된다. 따라서, 예를 들면, 배열번호:15의 뉴클레오티드의 배위 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, ..., 1-17(이 최대 배위 1-17에 이르기까지 배위가 1씩 증가함)을 나타내는 배열은 모두 본 발명에 따라 배열번호:15의 일부를 구성하고, 15의 뉴클레오티드의 배위 2-9, 2-10, 2-11, ..., 2-17의 뉴클레오티드 배위를 나타내는 모든 배열, 15의 뉴클레오티드의 배위 3-10, 3-11, 3-12, ..., 3-17의 뉴클레오티드 배위를 나타내는 모든 배열, 및 15의 뉴클레오티드의 배위 10-17의 뉴클레오티드 배위에 이르는 모든 배열은 배열번호:15의 일부를 구성한다. 마찬가지로, 배열번호:16의 뉴클레오티드의 배위 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, ..., 1-19(이 최대 배위 1-19에 이르기까지 배위가 1씩 증가함)을 나타내는 배열은 모두 본 발명에 따라 배열번호:16의 일부를 구성하고, 뉴클레오티드 배위 2-9, 2-10, ..., 나타내는 배열도 전술한 바와 같이 모두 배열번호:16의 일부를 구성한다.

[0284]

본 발명의 실시 중에, 개질 인핸서 PPE-1(3x)는 쥐과동물 내피세포 특이적 인핸서 엘리먼트(1x)(참조, 배열번호:7)의 하나의 카페가 직상류측 및 직하류측에 인접하는 배열번호:16으로 표시되는 배열에 결합된 배열번호:15로 표시된 배열을 포함하는 것이 발견되었다. 따라서, 바람직한 일 실시예에서, 본 발명의 cis 조절 엘리먼트는 배열번호:6으로 표시되는 배열의 최소 하나 이상의 카페를 더 포함한다. 더 바람직한 일 실시예에서, cis 조절 엘리먼트는 배열번호:6으로 표시되는 배열의 최소 2개 이상의 카페를 포함한다. 가장 바람직한 일 실시예에서, 본 발명의 cis 조절 엘리먼트는 배열번호:7로 표시된다.

[0285]

상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 내피세포 특이적 프로모터 배열 엘리먼트를 더 포함하는 것이 바람직하다. 본 명세서 및 첨부한 청구범위의 목적을 위해, "프로모터(promoter)"라는 용어는 해당하는 하류측 배열의 RNA 전사를 매개할 수 있는 임의의 폴리뉴클레오티드 배열을 의미한다. 상기 내피세포 특이적 프로모터 엘리먼트는 예를 들면 PPE-1 프로모터의 최소 하나 이상의 카페를 포함할 수 있다. 본 발명의 핵산 구축물에 의해 이용될 수 있는 적합한 프로모터/인핸서의 예는 내피세포 특이적 프로모터로서, 프리프로엔토셀린-1(preproendothelin-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) 프로모터 [Sato TN, Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Oct 15;90(20):9355-8], 엔도글린 프로모터(Endoglin promoter)[Y11653; Rius C, Blood 1998 Dec 15;92(12):4677-90], 혼 빌레브란트 인자(von Willebrand factor)[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(E-selectin promoter)[Y12462; Collins T J Biol Chem 1991 Feb 5;266(4):2466-73]를 포함하고, 내피세포 부착 분자 프로모터로서, ICAM-1 [X84737; Horley KJ EMBO J 1989 Oct;8(10):2889-96], VCAM-1 [M92431; Iademarco 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]를 포함하고, 혈관 평활근 특이적 엘리먼트로서, CArG box X53154 및 대동맥 카르복시펩티다제 라이크 단백질(aortic carboxypeptidase-like protein; ACLP) 프로모터[AF332596; Layne MD, Circ Res. 2002; 90: 728-736] 및 대동맥 우선 유전자-1 [Yen-Hsu Chen J. Biol. Chem., Vol. 276, Issue 50, 47658-47663, December 14, 2001]를 포함한다. 기타 적합한 내피세포 특이적 프로모터는 본 기술분야에 공지된 예를 들면 EPCR 프로모터(미국특허 US 6,200,751; 구(Gu) 등) 및 VEGF 프로모터(미국특허 US 5,916,763; 윌리암스(Williams) 등)가 있다.

[0286]

본 명세서에서 사용된 "혈관신생 조절제(modulator of angiogenesis)"라는 용어는 조직 내의 혈관신생을 억제 또는 향상할 수 있는 분자 또는 화합물로서 정의된다. 이와 같은 혈관신생 조절제는 내피세포 특이적 프로모터 활성을 업조절 또는 다운조절하는 예를 들면 엔도셀린 수용체 또는 혈관신생 인자와 같은 혈관신생의 중요 표적의 길항제와 같은 혈관신생 저항 인자일 수 있다.

[0287]

다양한 조직 내에서 소망의 핵산 배열의 발현을 유도하기 위해 기타 비내피세포 프로모터도 전술한 단리된 폴리뉴클레오티드에 결합될 수 있음을 알 수 있다. 본 발명의 구축물에 사용하는데 적합한 프로모터는 본 기술분야에 공지된 것이다. 이들 프로모터는 바이러스 프로모터(예, 레트로바이러스 ITRs, LTRs, 즉시형 초기 바이러스 프로모터(IEp)(예, 헤르페스바이러스 IEp (예, ICP4-IEp 및 ICP0-IEp) 및 사이토메갈로바이러스(CMV) IEp), 및 기타 바이러스 프로모터(예, 후기 바이러스 프로모터, 잠재 활성(latency-active promoters; LAPs), 로우스 사르코마 바이러스(Rous Sarcoma Virus; RSV) 프로모터, 및 머린 루케미아 바이러스(Murine Leukemia Virus; MLV) 프로모터))를 포함한다. 그러나, 이것에 한정되지 않는다. 기타 적합한 프로모터는 인핸서 배열(예, 토키 β -글로불린 조절 엘리먼트)을 포함하는 진핵 프로모터, 구성적 활성화 프로모터(예, β -액틴 프로모터 등), 신호 및/또는 조직 특이적 프로모터(예, 유도성 및/또는 억제성 프로모터(예, TNF 또는 RU486에 응답하는 프로모터, 메탈로티오닌(metallothioneine) 프로모터, PSA 프로모터 등), 및 텔로메라제(telomerase), 플라스틴(plastin) 및 헥소키나제(hexokinase) 프로모터와 같은 종양 특이적 프로모터이다.

[0288]

상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 예를 들면 배열번호:5로 표시되는 배열의 최소 하나 이상의 카피와 같은 하이폭시아 응답 엘리먼트를 더 포함하는 것이 바람직하다.

[0289]

본 발명의 단리된 핵산 배열은 특히, 내피세포(예를 들면 혈관신생에 관련된 내피세포)의 증식하거나 또는 휴지 내피세포 내에서의 유전자 발현을 봉쇄(억제)하는 진핵 조직 내에서의 유전자 발현을 조절하는데 사용될 수 있다.

[0290]

따라서, 본 발명의 단리된 폴리뉴클레오티드 배열은 경우에 따라 본 발명의 단리된 폴리뉴클레오티드의 조절 제어 하에서 위치되는 핵산 배열을 더 포함하는 핵산 구축물의 일부로서 제공될 수 있다. 본 발명의 핵산 구축물은 선택 마아커(selection markers) 또는 레포터 폴리펩티드를 코드하는 배열, 박테리아 내에서의 복제 기점(origin of replication)을 코드하는 배열, 단일 mRNA (IRES)로부터 다수의 단백질의 번역을 허용하는 배열, 프로모터-키메라 폴리펩티드 코드 영역의 게놈 융합(genomic integration)을 위한 배열 및/또는 인비트로젠사(Invitrogen)로부터 구입할 수 있는 pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, 프로메가사(Promega)로부터 구입할 수 있는 pCI, 스트라타젠사(Stratagene)로부터 구입할 수 있는 pBK-RSV 및 pBK-CMV, 클론텍사(Clontech)로부터 구입할 수 있는 pTRES, 이들의 유도체와 같은 포유동물의 발현 벡터 내에 일반적으로 포함되는 배열을 더 포함할 수 있다. 이와 같은 핵산 구축물은 포유동물 세포 발현을 위해 구성되고, 바이러스성(viral origin)이 될 수 있는 것이 바람직하다. 포유동물 발현에 적합한 핵산 구축물은 다수의 예가 종래기술에 공지되어 있다. 후술되는 실시예란에서 그와 같은 다수의 핵산 구축물의 상세한 내용이 제공된다.

[0291]

본 명세서 및 첨부한 청구범위의 목적을 위해, "...조절 제어 하에 위치된 핵산 배열(nucleic acid sequence positioned under regulatory control...)"이라는 문구는 RNA 폴리머라제에 의해 전사될 수 있는 능력을 가지는 임의의 폴리뉴클레오티드 배열을 의미한다. 상기 전사는 본 발명의 cis 조절 엘리먼트와 같은 cis 조절 엘리먼트에 의해 유도될 수 있다. 이 정의는 폴리펩티드로 번역될 수 있는 배열을 코드하는 것뿐 아니라 안티센스(antisense) RNA의 배열을 코드하는 것 및 DNA, 리보자임(ribozymes) 및 기타 번역되지 않는 분자 성분을 결합하는 RNA의 배열의 코드하는 것을 포함한다. 본 발명에 따른 구축물에 의해 이용될 수 있는 핵산 배열의 예는 VEGF, FGF-1, FGF-2, PDGF, 앤지오포이에틴-1(angiopoietin-1) 및 앤지오포이에틴-2, TGF- β , IL-8 (참조, 전술한 표 1의 혈관신생 조절제의 리스트), 세포독성 드리그, 레포터 유전자 등과 같은 혈관신생 양성 조절제 및 음성 조절제가 있다. 바람직한 일 실시예에서, 핵산 배열은 VEGF, p55, 앤지오포이에틴-1, bFGF 및 PDGF-BB 와 같은 혈관신생 조절제로부터 선택된다. 본 발명의 cis 조절 엘리먼트에 의해 제어되는데 적합한 번역이 가능한 추가의 핵산 배열은 후술되는 실시예란에 제공되어 있다.

[0292]

후술되는 실시예는 본 발명의 신규의 cis 조절 엘리먼트는 허혈 및/또는 혈관신생(혈관증식) 내피세포 조직에서 우선적으로 전신 인비보 투여(systemic *in-vivo* administration) 후 내피세포 조직에 대해 레포터 유전자(GFP and LUC)의 발현을 신뢰성 있게 유도할 수 있다는 것을 설명한다. 특히, 이들 실시예는 본 발명의 단리된 폴리뉴클레오티드는 종양, 전이암, 허혈 및/또는 혈관신생 조직 내의 치료 유전자를 우선 발현하는데 사용될 수 있다는 것을 보여줌으로써, 본 발명의 cis 조절 엘리먼트 및 그 유도체의 치료적 중요성의 직접적 증거를 제공한다.

[0293]

일 실시예에서, 본 발명의 핵산 구축물은 조직 내의 혈관신생의 업조절(upregulating), 및 허혈에 수반되는 질병 또는 증상의 치료 또는 방지에 사용된다. 향상된 혈관신생의 도움을 받을 수 있는 질병 및 증상은 종래기술에 공지되어 있고, 예를 들면, 창상 치유, 허혈성 뇌경색, 허혈성 심질환 및 위장장애 등이 있다.

- [0294] 본 명세서에서 사용된 "혈관신생의 다운조절(down-regulating angiogenesis)"이라는 문구는 새로운 혈관의 형성을 유발하는 혈관신생 과정을 지연시키거나 정지시키는 것을 의미한다. "혈관신생의 업조절(upregulating angiogenesis)"이라는 문구는 휴지 상태 또는 최소 기능 상태의 내피세포 혈관신생 활성제(activator)의 발현을 향상시키는 것을 의미한다.
- [0295] 따라서, 본 발명은 유전자 치료에 이용될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 유전자 치료라는 용어는 유전적 또는 후천적 질병 또는 증상 또는 표현형을 치료 또는 예방하기 위해 해당 유전자 물질(예, DNA 또는 RNA)을 숙주 내에 운반하는 것을 의미한다. 해당 유전 물질은 인비보 상태에서 생성이 필요한 요구되는 생성물(예, 단백질, 폴리펩티드, 웨티드, 기능적 RNA, 앤티센스)을 코드한다. 예를 들면, 상기 해당 유전 물질은 호르몬, 수용체, 효소, 폴리펩티드 또는 치료 가치가 있는 웨티드를 코드할 수 있다. 검토를 위해 일반적으로 "유전자 치료(Gene Therapy)"(Advanced in Pharmacology 40, Academic Press, 1997)라는 책을 참고하면 된다.
- [0296] 유전자 치료 방법은 기본적으로 (1) 엑스비보(ex vivo) 유전자 치료 및 (2) 인비보(in vivo) 유전자 치료의 두 가지 방법이 포함된다. 엑스비보 유전자 치료에서는 환자로부터 세포가 제거되고, 인비트로(in vitro) 상태에서 배양 및 처리된다. 일반적으로, 적절한 유전자 전달 운반체(vehicle) 방법(트랜스펙션(transfection), 트랜스డ션(transduction), 상동적 재조합 등)을 통해 기능적 치환 유전자가 세포 내에 도입되고, 필요한 발현계 및 상기 개질 세포는 배양액 중에서 증식된 후, 숙주/환자에게 복귀된다. 이를 유전학적으로 재이식된 세포는 자체 내에서 트랜스펙션된 유전 물질(transfected genetic material)을 발현하는 것이 입증되었다.
- [0297] 인비보 유전자 치료에서는 표적 세포가 대상체로부터 제거되는 대신 운반될 유전 물질이 수용체 기관 자체의 세포 내에 도입된다. 다른 실시예에서, 숙주 유전자가 손상된 경우, 그 유전자는 자체 치유된다(Culver, 1998. (Abstract) Antisense DNA & RNA based therapeutics, February 1998, Coronado, CA).
- [0298] 이들 유전학적으로 변경된 세포는 자체 내에서 트랜스펙션된 유전 물질을 발현하는 것이 입증되었다.
- [0299] 유전 발현 운반체(gene expression vehicle)는 숙주 세포 내로 비상동 핵산을 전달/운반할 수 있다. 발현 운반체는 본 기술분야에 공지된 세포 선택 방법에서 핵산의 표적화, 발현 및 전사를 제어하는 엘리먼트를 포함할 수 있다. 유전자의 5'UTR 및/또는 3'UTR는 발현 운반체의 'UTR 및/또는 3'UTR에 의해 대치될 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 사용된 발현 운반체는 운반될 실제 유전자의 'UTR 및/또는 3'UTR을 반드시 포함하지 않고, 특이적 아미노산 코드화 영역만을 포함할 수 있다.
- [0300] 상기 발현 운반체는 비상동 물질의 전사 제어를 위한 프로모터를 포함할 수 있고, 선택적 전사를 허용하는 구조 프로모터이거나 유도 프로모터일 수 있다. 필요에 따라 필요한 전사 수준을 얻는데 필요한 인핸서가 포함될 수 있다. 인핸서는 일반적으로 프로모터에 의해 결정된 기본적 전사 수준을 변화시키기 위해 코드 배열(cis 상태)과 지속적으로 공동작용하는 임의의 비번역 DNA 배열이다. 발현 운반체는 또 후술되는 선택 유전자를 포함할 수도 있다.
- [0301] 벡터들은 종래기술에 공지된 다양한 방법들 중의 임의의 하나의 방법에 의해 세포 또는 조직 내에 도입될 수 있다. 상기 방법들은 일반적으로 샘브룩(Sambrook) 등의 저서(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York 1989, 1992), 오스벨(Ausubel) 등의 저서(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland 1989), 창(Chang) 등의 저서(Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, MI 1995), 베가(Vega) 등의 저서(Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor MI 1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston MA 1988) 및 길보아(Gilboa) 등의 저서(Biotchniques 4 (6): 504-512, 1986)에 기술되어 있고, 예를 들면, 안정 트랜스펙션 또는 천이 트랜스펙션, 리포펙션(lipofection), 전기천공법(electroporation) 및 재조합 바이러스 벡터를 이용한 감염 등이 포함된다. 또, 중추신경계에 관련된 벡터에 대해서는 미국특허 US 4,866,042를 참조하고, 양성-음성 선택 방법에 대해서는 미국특허 US 5,464,764 및 US 5,487,992를 참조하면 된다.
- [0302] 감염에 의한 핵산의 도입은 열거된 다른 방법들에 비해 많은 이점을 제공한다. 감염은 그 전염 특성에 기인되어 고효율이 달성될 수 있다. 또, 바이러스는 매우 특이성이 높고, 통상 특이적 종류의 세포 내에서 감염 및 증식한다. 따라서, 그 천연의 특이성을 이용하여 인비보 상태에서 또는 조직이나 혼합된 세포 배양액 내에서 특이적 세포 종류에 벡터를 표적화 할 수 있다. 바이러스 벡터는 또 특이적 수용체나 리간드를 이용하여 개질되어 수용체가 매개된 과정을 통해 표적 특이성을 변경할 수 있다.
- [0303] 재조합 배열을 도입 및 발현하는 DNA 바이러스 벡터의 특정 예는 아데노바이러스 유래 벡터인 Adenop53TK이다. 이 벡터는 양성적 선택이나 음성적 선택에 대해 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제(TK)를 발현하고, 소량의 재조

합 배열에 대한 발현 카세트를 발현한다. 이 벡터는 상피성 기원의 암 및 기타 암의 대부분을 포함하는 아데노 바이러스 수용체를 가지는 세포를 감염시키는데 이용될 수 있다. 이 벡터 및 소망의 유사한 기능을 발휘하는 기타의 벡터는 혼합 세포 집단을 처리하기 위해 사용할 수 있고, 예를 들면, 인비트로 또는 엑스비보 상태의 세포 배양물, 조직 또는 인간 대상체를 포함할 수 있다.

[0304] 특정 세포 종류에 대한 발현을 제한하는 특징도 포함될 수 있다. 이와 같은 특징들은 예를 들면 소망의 세포 종류에 대해 특이성을 가지는 프로모터 및 조절 엘리먼트를 포함한다.

[0305] 또, 재조합 바이러스 벡터는 횡형 감염(lateral infection) 및 특이성 표적화(targeting specificity)와 같은 이점을 제공하므로 소망의 핵산의 인비보 발현에 유용하다. 횡형 감염은 예를 들면 레트로바이러스의 라이프사이클(life cycle)의 특유한 것으로서, 이 과정에서 단일의 감염된 세포는 많은 자손 바이러스입자를 생산하고, 이 바이러스입자들은 받아하여 인접 세포들을 감염시킨다. 그 결과, 광범위한 영역이 급속하게 감염되는데, 그 감염된 영역의 대부분은 원형 바이러스 입자에 의해 초기에 감염되지 않았던 부분이다. 이것은 감염체가 딸 자손(daughter progeny)을 통해서만 전파하는 수직형 감염(vertical-type of infection)에 대비된다. 횡형 감염이 불가한 바이러스 벡터도 생산될 수 있다. 이 특징은 일정 수의 표적 세포 내에만 특이적 유전자를 도입하는 것을 목적으로 하는 경우에 유용하게 사용할 수 있다.

[0306] 전술한 바와 같이, 바이러스는 많은 경우 숙주의 방어 기구를 회피하도록 발전된 극히 특이화된 감염체이다. 통상, 바이러스는 특이적 세포 종류 내에서 감염 및 전파된다. 바이러스 벡터의 특이성 표적화는 사전설정된 세포 종류를 특이적으로 표적화하고, 그 결과 감염된 세포 내에 재조합 유전자를 도입하기 위해 그 천연의 특이성을 이용한다. 본 발명의 방법에서 사용된 벡터는 표적화될 소망의 세포 종류에 의존하는 것으로 본 기술분야의 전문가에게 공지된 것이다. 예를 들면, 유방암을 치료하려면 상피세포에 대한 특이성을 가지는 벡터가 사용될 수 있다. 마찬가지로, 조혈세포계의 질병 또는 병적 상태를 치료하려면 혈관에 대해, 바람직하게는 특이적 종류의 조혈세포에 대해, 특이성을 가지는 바이러스 벡터가 사용될 수 있다.

[0307] 레트로바이러스 벡터는 감염성 입자로서 기능하도록 또는 단일의 초기 감염만 수행되도록 구축될 수 있다. 전자의 경우, 바이러스의 게놈은 신규의 바이러스 단백질 및 RNA를 합성하기 위해 모든 필요 유전자, 조절 배열 및 패키징 시그널(packaging signals)을 유지할 수 있도록 개질된다. 일단 이들 분자가 합성되면, 숙주 세포는 RNA를 추가의 감염을 수행할 수 있는 새로운 바이러스 입자 내에 패키징한다. 상기 벡터의 게놈은 소망의 재조합 유전자를 코드 및 발현하도록 개변될 수도 있다. 비감염성 바이러스 벡터의 경우, 벡터 게놈은 통상 RNA를 바이러스 입자 내에 봉입하는데 필요한 바이러스 패키징 시그널을 파괴하도록 돌연변이된다. 패키징 신호가 없으면 형성된 모든 입자는 게놈을 포함하지 않고, 따라서 후속 감염을 수행할 수 없다. 벡터의 특이성 종류(specific type)는 대상으로 하는 용도에 의존한다. 실제의 벡터는 공지되어 있고, 종래기술에서 용이하게 입수하거나 주지의 방법을 이용하여 본 기술분야의 전문가에 의해 구축될 수 있다.

[0308] 재조합 벡터는 다수의 방법을 통해 투여될 수 있다. 예를 들면, 바이러스 벡터가 사용되는 경우, 진행과정은 바이러스 벡터의 표적 특이성을 이용할 수 있으므로 질환 부위에 국부적으로 투여할 필요가 없다. 그러나, 국부 투여는 신속하고 더욱 효과적인 치료를 제공할 수 있고, 투여도 예를 들면 정맥주사 또는 피하주사에 의해 수행될 수 있다. 특히 신경변성 질병(neuro-degenerative diseases)의 경우 척추액 내로의 바이러스 벡터의 주입도 하나의 투여 방법으로서 사용될 수 있다. 주입 후, 바이러스 벡터는 감염을 위한 적절한 표적 특이성을 이용하여 숙주 세포를 인식할 때까지 순환된다.

[0309] 종래기술에서 만나게 되는 가장 일반적인 문제점은 유전자 치료 프로토콜이 효과가 낫다는 것과 벡터에 대한 숙주의 면역 반응에 있다. 상기 낫은 효과는 운반된 물질의 세포 내로의 진입 실패, 게놈 내로의 도입 실패, 또는 적절한 수준의 발현 실패에 기인될 수 있다. 또, 시간이 경과함에 따라 반응이 약해지는 경우가 많다. 이것은 장점을 제공할 수도 있는 재투여는 종종 전술한 면역 반응에 기인되어 문제가 되는 경우가 많다는 것을 의미한다.

[0310] 이와 같은 치료적 용도는 표적 조직 내의 혈관신생의 향상 및 억제의 양자를 포함한다. 본 발명의 cis 조절 엘리먼트에 의해 유도된 핵산 배열의 우선 발현에 대한 세포의 반응에 따라, 향상된 혈관신생을 유발하는 내피세포의 증식 또는 감소된 혈관신생 및 허혈을 유발하는 내피세포 증식의 억제가 발생할 수 있다.

[0311] 따라서, 본 발명의 핵산 구축물 내에서 세포독성을 가지도록 발현하는 핵산 배열을 도입하는 것은 예를 들면 종양의 신생 혈관 내의 급속히 증식하는 내피세포에 대한 세포사(cell death)를 표적화하는 방법을 제공한다. 이와 같은 벡터는 전신 투여될 수 있으므로 현재 이용할 수 있는 전이성 증식소(metastatic foci)의 동정 및 위치

설정 능력을 사용하기에 앞서 상기 벡터를 이용하여 전이성 종식소의 발달시 세포사를 효과적으로 유도할 수 있다.

[0312]

본 발명의 구축물과 함께 사용될 수 있는 상기 치료적 핵산 배열은 암의 유전자 치료를 위한 변종 유전자 활성의 복원 및 제어를 목표로 하는 수정 유전자 치료법(corrective gene therapy), 암세포에 대항하는 면역체계의 증감(sensitizing)을 목표로 하는 면역 조절 유전자 치료법(immuno-modulatory gene therapy), 및 프로드러그 또는 독성제(자살 유전자 치료법), 프로-아폽토시스 유전자, 혈관신생 유발 유전자에 의한 암세포 사멸을 목표로 하는 종양축소 유전자 치료법(cytoreductive gene therapy), 또는 강화된 화학요법 또는 방사선요법으로 분류되는 암의 유전자 치료법을 위해 이용될 수 있다. 본 발명의 *cis* 조절 엘리먼트를 이용한 수정 유전자 치료법에 적합한 핵산 배열은 p53 유전자(GenBank Access. No. BC018819), 암세포 내에서 발현이 억제되는 항종양의 DNA-안정화 유전자; Cip/Kip (p21, GenBank Acces. No. NM000389; and p27, GenBank Accesss. No. NM004064) 및 Ink4 (p14, GenBank Access. No. NM058197), 사이클린 의존성 억제제를 포함한다. 그러나, 이들 핵산 배열에 한정되지 않는다. 본 발명의 *cis* 조절 엘리먼트를 이용한 암유전자 기능의 억제에 적합한 핵산 배열은 ras, myc, erbB2 및 bcl-2와 같은 암유전자의 전사 및 번역과 간섭하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotides) 및 번역과 간섭하는 촉매 리보자임(catalytic ribozymes)을 포함한다. 그러나, 이들 핵산 배열에 한정되지 않는다. 항암유전자 안티센스 및 리보자임 폴리뉴클레오티드의 합성과 사용방법은 본 기술분야의 공지된 기술로서, 본 명세서에 참조로서 도입되는 예를 들면 미국특허 US 6,627,189(로스(Roth) 등에 허여), 미국특허 US 6,265,216(베넷(Bennet) 등에 허여), 및 미국특허 US 5,734,039(칼라브레타(Calabretta) 등에 허여)에 상세히 기술되어 있다. 촉매 항암세포 리보자임의 제조방법 및 사용방법은 본 명세서에 참조로서 도입되는 예를 들면 미국특허 US 5,635,385(레오폴드(Leopold) 등에 허여)에 기술되어 있다.

[0313]

본 발명의 추가의 실시예에서, 본 발명의 *cis* 조절 엘리먼트의 제어 하에 발현되는 핵산 배열은 종양 및 전이세포에 의한 면역학적 감시의 회피를 방지하도록 설계된 면역수식 유전자 치료법(immunomodulation gene therapy)을 목적으로 한다. 본 발명의 *cis* 조절 엘리먼트와 함께 사용하기에 적합한 면역수식 인자를 코드하는 핵산 배열은 사이토카인 유전자(cytokine genes), 종양 항원의 세포독성 T세포 인식을 증대시키기 위한 세포내 분자 유전자, 및 (비특이적 국부 면역 반응을 유도하기 위한) 외인성 외래 면역원이다. 적합한 면역활성화 인자는 인간 IL-2, 인간 α -인터페론, β -인터페론 또는 γ -인터페론과 같은 인터페론, 인간 T세포 과립구-매크로파지 콜로니 활성 인자(GM-CSF), 인간 종양 괴사 인자(TNF), 및 림포톡신(lymphotoxin; TNF-b)을 포함한다. 그러나, 이들 인자에 한정되지 않는다. 종래 인간 IL-2 유전자는 클로닝 및 배열되어 있고, 예를 들면 pBC12/HIV/IL-2로부터 0.68 kB BamHI-HinDIII 단편으로서 입수가 가능하다(ATCC 수탁번호 67618으로부터 입수가 가능함). 또, 인간 β -인터페론, 인간 GM-CSF, 인간 TNF 및 인간 림포톡신도 공지되어 있고, 입수가 가능하다. 특히, 인간 γ -인터페론의 배열은 공지되어 있고(Fiers et al. (1982) Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 299:29-38), 젠뱅크(GenBank)에 수탁번호 M25460으로 기탁되어 있다. 인간 GM-CSF 배열은 공지되어 있고(Wong et al. (1985) Science 228:810-815), 젠뱅크에 수탁번호 M10663으로 기탁되어 있다. 인간 TNF 배열은 공지되어 있고(Wang et al. (1985) Science 228:149-154), 젠뱅크에 수탁번호 M10988로 기탁되어 있다. 인간 림포톡신(TNF-b)의 배열도 공개되어 있고(Iris et al. (1993) Nature Genet. 3:137-145), 젠뱅크에 수탁번호 Z15026으로 기탁되어 있다.

[0314]

추가의 실시예에서, 본 발명의 *cis* 조절 엘리먼트의 제어 하에서 발현되는 핵산 배열은 종양축소 유전자 치료법, 또는 직접 유전자 운반 또는 간접 유전자 운반에 의해 표적 세포를 괴사시키는 것을 목적으로 한다. 바람직한 일 실시예에서, 상기 핵산 배열은 p53 및 egr-1-TNF- α 와 같은 자살 유전자, 간시클로비르/티미딘 키나제 및 5-플루오로시토신/시토신 데아미나제와 같은 약제 감수성 치료법을 위한 세포독성 프로-드러그/효소, E1A와 같은 항전이 유전자(antimetastatic genes)와 같은 세포독성 유전자이다. 특이적 세포독성 구축물의 예는 후술하는 실시예란에 상세히 기재되어 있다.

[0315]

또 다른 실시예에서, 본 발명의 *cis* 조절 엘리먼트의 제어 하에서 발현되는 핵산 배열은 유전자 방사성동위원소 치료법을 목적으로 할 수 있다. 노르아드레날린 수용체(NAT)를 발현하는 세포 내에 방사능 표지된 카테콜아민 I131-메타이오도벤질-구아니딘을 도입하는 것은 갈색세포종(pheochromocytoma), 신경아세포종(neuroblastoma), 카르치노이드 종양(carcinoid tumor) 및 갑상선수양암(medullary thyroid carcinoma)의 확립된 치료방법이 된다. 또, 소디움 이오딘 심포터(NIS)는 정상 갑상선 세포 및 악선 갑상선 세포 내의 이오딘의 도입을 매개한다. NIS 유전자는 도입유전자로서 인비트로 모델 및 인비보 모델에서 전립선암을 억제하는 것으로 보고되었다.

[0316]

반대의 방법을 이용하여 예를 들면 동맥경화증 환자 또는 당뇨병과 같은 질병 또는 상해로 인해 말초 순환 장해를 가지고 있는 환자의 조직 내에 혈관을 발달시킬 수 있다. 이 경우, AdPPE-1-3X-GF 형식의 구축물(여기서,

GP는 성장 인자(예, 사이토카인) 또는 그 모디피컨트(modificants)(예, AdPPE-1-SEQ ID NO:7-GF)이 사용될 수 있다. 이러한 목적에 사용하기 위한 적합한 성장 인자는 VEGF (젠햄크 수탁번호: M95200) 및 rat PDGF-BB (젠햄크 수탁; mus-AF162784에 대해 99%의 동일성) 및 EGR-1 (젠햄크 수탁번호: M22326) FGFs (젠햄크 수탁번호: XM 003306을 포함. 그러나, 이것에 한정되지 않음) 및 이들의 조합을 포함한다. 그러나, 이를 성장인자에 한정되지 않는다.

[0317] 본 발명의 상기 관점에 따르면, VEGF 단독 투여에 관련이 있는 것으로 보이는 혈관 미성숙 및 혈관 퇴행의 문제를 회피하기 위해 하나 이상의 혈관신생 인자를 사용하는 것이 바람직하다는 것을 알 수 있다(더욱 상세한 내용은 실시예란의 실시예 27 및 실시예 31을 참고할 것). 조합된 치료법은 내피세포 채널 스프라우팅(channel sprouting) 및 이어지는 평활근 세포의 안정한 발생기 혈관으로의 회복의 제1단계를 모방할 수 있다[Richardson DM et al. (2001) Nat. Biotechnol. 19:1029-1034]. 본 발명의 상기 관점에 따른 조합된 치료법은 본 발명의 단리된 핵산의 조절 하에 존재하는 동일 핵산 구축물 상에 해당 폴리뉴클레오티드를 클로닝함으로써 실행될 수 있다. 대안으로서 또는 바람직하게, 해당하는 각 폴리뉴클레오티드는 독립적으로 핵산 구축물 내에 클로닝되고, 그 결과 유도된 혈관신생 과정이 치밀하게 조절될 수 있다.

[0318] 본 발명의 프로모터 배열 내의 하이폭시아 응답 엘리먼트(예, 배열번호:5)를 도입하는 것도 허혈 조직에 대한 발현 선택성을 더욱 향상시키고, 그 결과 선택된 조직의 신혈관형성을 유도하기 위해 본 발명과 함께 사용될 수 있다. 혈액의 공급이 개선됨에 따라, 허혈증상이 완화되고, 하이폭시아 응답 엘리먼트의 유도는 중단되고, GF 수준은 하락되고, 신혈관형성 과정은 중단된다.

[0319] 본 발명에 따른 핵산 구축물을 이용하는 내피세포 조직에 대한 유전자 치료는 혈관신생 내피세포의 표적화가 불가능한 다른 방법에 의해서는 얻을 수 없는 시간적 협조(temporal coordination)가 제공된다. 후술하는 실시예란에 설명되어 있는 바와 같이, 본 발명의 신규의 인핸서 엘리먼트를 포함하는 cis 조절 엘리먼트[예, PPE-1(3x)]는 혈관증식 중에 있는 조직에 특이적으로 재조합 유전자의 발현의 증가를 유발하는 한편 다른 비혈관신생 조직 내에서는 재조합 유전자의 발현을 방지한다(참조, 실시예 12, 14, 16, 19, 20, 23, 27, 29, 34 및 35). 본 발명의 cis 조절 엘리먼트 및 구축물의 전사적 제어 하에서 치료 유전자의 발현은 유전자 생성물이 유도되는 세포 과정(혈관 성장 과정)의 활성과 일치하므로 효율을 증대할 수 있고, 치료에 필요한 유효 투여량을 감소시킬 수 있다.

[0320] 따라서, 유전자 치료의 상황에서 본 발명의 cis 조절 엘리먼트를 포함하는 구축물을 사용하는 경우 종양에 대한 최대의 운반이 예상되는 한편 주변의 정상 조직에 대해서는 최소의 독성 효과가 예상된다. 특히 이것은 후술하는 실시예란에 설명되어 있는 바와 같이 주변의 조직이 내피세포 성분을 포함하고 있는 경우에도 사실이다. 실시예 16에서 입증되는 바와 같이, 이것은 본 발명의 cis 조절 엘리먼트가 PPE-1 프로모터의 하에서도 급속하게 증식하고 있는 내피세포 조직 내에서 발현의 수준을 크게 증대시키기 때문이다.

[0321] 후술되는 실시예들은 PPE-1 프로모터와 병용하여 본 발명의 cis 조절 엘리먼트의 용도를 특별히 다루고 있고, 본 발명의 인핸서 엘리먼트는 다른 진핵세포 프로모터 배열과 병용되었을 때 그 세포 특이적 효과를 발휘하는 것으로 예측된다.

[0322] 이와 같은 예측은 인핸서 엘리먼트가 종종 운반이 가능하다는 것을 보여주는 종래기술의 발견에 기초한 것이다. 즉, 인핸서 엘리먼트는 하나의 프로모터 배열로부터 다른 관련이 없는 프로모터 배열로 운반될 수 있고, 여전히 활성을 유지할 수 있다. 예로서, 디. 존스(D. Jones) 등(Dev. Biol. (1995) 171(1):60-72); 엔. 애스. 예(N. S. Yew) 등(Mol. Ther. (2001) 4:75-820) 및 엘. 우(L. Wu) 등(Gene Ther. (2001) 8:1416-26)을 참고할 것. 실제로, 부(Bu) 등의 초기 논문(J. Biol Chem. (1997) 272(19): 32613-32622)은 본 발명의 인핸서 엘리먼트에 관련되는 인핸서 엘리먼트, 예를 들면, 배열번호:15 및 배열번호:16 또는 배열번호:6을 포함하는 인핸서는 구성적 프로모터, 예를 들면, SV-40 프로모터와 병용될 수 있다는 것을 강력하게 시사한다. 이와 같은바, 구축물, 방법 및 본 발명의 인핸서 배열을 포함하도록 개질된 진핵 프로모터를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드는 청구된 발명의 범위 내에 포함된다.

[0323] 따라서, 본 발명에 따른 인핸서 엘리먼트의 최소 구성은 배열번호:16으로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분에 공유결합된 배열번호:15로 표시된 배열의 최소 하나 이상의 부분을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드라고 가정된다. 이 인핸서는 내피세포 특이적 프로모터(예, PPE-1; 배열번호:1) 및 구성적 프로모터(예, CMV 및 SV-40로부터 유래된 바이러스 프로모터와 같은 바이러스 프로모터)를 포함하는 다양한 프로모터와의 병용에 의해 기능을 발휘하는 것으로 예측된다. 이 인핸서는 다양한 프로모터에 대해 내피세포 특이성을 부여할 수 있어야 한다. 상기 인핸서는 예를 들면 배열번호:6으로 표시되는 배열의 하나 이상의 카페의 첨가에 의해 증식될 수

있다. 이들 추가의 배열은 배열번호:8의 배열에 연속적으로 또는 비연속적으로 첨가될 수 있다.

[0324] 본 발명은 배열번호:16으로 표시되는 배열의 최소 하나 이상의 부분에 공유결합되는 배열번호:15로 표시되는 배열의 최소 하나 이상의 부분을 포함하는 인핸서 엘리먼트에 의존하는 구축물 및 내피세포에 대해 특이적으로 해당 배열의 높은 발현 수준을 유도하는 프로모터를 이용하여 내피세포 내에서 해당 핵산 배열을 발현하는 방법을 더 포함한다.

[0325] 본 명세서에 사용된 "대상체의 신체로부터 제거된 세포에 대한 엑스비보 투여 및 그 대상체의 신체 내로의 상기 세포의 재도입(ex-vivo administration to cells removed from a body of a subject and subsequent reintroduction of the cells into the body of the subject)"이라는 문구는 특히 리덴(Lyden) 등의 논문에 기재된 줄기세포의 사용을 포함한다(Lyden et al. (2001) Nature Medicine 7:1194-1201).

[0326] 후술하는 실시예에 기재된 실험에서는 아데노바이러스가 이용되었으나, 본 기술분야의 전문가는 용이하게 다른 바이러스 운반 시스템을 채용할 수 있다.

[0327] 내피세포 특이적 프로모터를 포함하는 바이러스 벡터도 이 바이러스 벡터의 표적화를 향상시키기 위한 기타의 수단과 병용될 수 있다. 이러한 기타의 수단은 단 펩티드 리간드(short peptide ligand) 및/또는 이중특이성 또는 이중관능성 분자 또는 다이어바디(diabodies)(Nettelbeck et al. Molecular Therapy 3:882;2001)을 포함한다.

[0328] 유전자 치료법의 관점에서 조직 내에서 발현된 치료적 도입유전자에 대한 숙주의 면역반응이 효율적인 유전자 치료 프로토콜의 개발 및 설계에 중대한 현안 문제이다. 재조합 도입유전자 생성물에 대한 역 면역반응(Adverse immune response)은 약물 운반 효능과 간섭할 수 있으므로 염증, 세포독성, 및 질병을 유발한다. 따라서, 발현된 재조합 치료 분자의 항원 가능성(antigenic potential)은 유전자 치료에서 매우 중요하다.

[0329] 본 발명의 실행 중에 Ad5PPE-1(3x) 핵산 구축물(실시예 41, 도 95b)의 일부로서 발현된 인간 폴리펩티드(TNF-R1)는 마우스 내에서 항원성이 결여되어 있다는 것과, CMV 프로모터(도 95)의 제어 하에서 Fas-c 키메라 유전자의 투여에 대한 분명한 항-TNF-R1 반응에도 불구하고 숙주 내에서 면역학적 반응을 유발하지 않는다는 것이 예기치 않게 발견되었다. 따라서, 본 발명의 단리된 폴리펩티드는 본 발명의 cis 조절 엘리먼트의 전사적 제어 하에서 세포 내에서 재조합 도입유전자(또는 도입유전자들)를 발현시킴에 의해 내인성 발현된 재조합 도입유전자 생성물 또는 생성물들에 대한 숙주 면역반응을 감소 또는 제거하는데 이용될 수 있다. 상기 cis 조절 엘리먼트는 PPE-1 (3x) 프로모터인 것이 바람직하다.

[0330] 본 발명의 실시 중에 혈관신생 내피세포 특이적 프로모터인 PPE-1 (3x)은 추가의 혈관신생 저항 치료법에 의해 상승작용한다는 것이 예기치 않게 발견되었다. 도 94는 이중 엔도셀린 수용체(ETA and ETB) 길항제 보센탄(Bosentan)의 투여에 응답하여, PPE-1 (3x) 제어 하에서 LUC 레포터 도입유전자를 포함하는 핵산 구축물을 포함하는 유전자도입된 마우스의 고도로 혈관이 신생된 기관(대동맥, 심장, 폐, 기관 및 뇌) 내에서 루시페라제 발현이 우선적으로 향상되는 것을 보여준다. 이와 같은 본 발명의 cis 조절 엘리먼트의 제어 하의 치료적 재조합 유전자의 도입유전자의 발현과 결합된 혈관신생 저항 치료법의 시너지 효과에 의해 이전에 발견되지 않은 약물 표적화를 위한 가능성이 제공되고 동시에 혈관신생 치료법을 위한 약물 사용 요구량이 감소된다. 어떤 하나의 가설에 제한됨이 없이, 자기분비 루우프를 통해 엔도셀린 프로모터의 유도제를 활성화함에 있어서, 혈관신생 저항 치료법에 대한 내인성 조직 반응은 실제로 본 발명의 핵산 구축물의 엔도셀린 프로모터 엘리먼트를 강화하는 것으로 생각된다. 따라서, 일 실시예에서, 본 발명의 cis 조절 엘리먼트는 내피세포 특이적 프로모터 활성의 내인성 인핸서를 포함할 수 있도록 선택된 보조적인 혈관신생 저항 치료법을 병용하는 상태에서 투여된다. 종래기술에 공지된 혈관신생 저항 치료법은 보센탄, VEGF-수용체 길항제, 앤지오스타틴(angiostatin) 및 엔도스타틴(endostatin)과 같은 엔도셀린 수용체 길항제 및 베바치주맙(Bevacizumab) 및 노바스트(Novast)와 같은 혈관신생 저항 항체를 포함한다(그러나, 이것이 한정되지 않는다.).

[0331] 또, 본 발명의 cis 조절 엘리먼트 또는 내피세포 특이적 프로모터 활성을 가지는 기타 cis 조절 엘리먼트를 포함하는 구축물은 내피세포 특이적 프로모터 활성을 유도할 수 있는 보조 치료법과 병용하여 예를 들면 허혈 증상의 치료시 혈관신생 활성을 강화시키는 혈관신생 유발 배열을 포함하는 구축물의 발현을 증대하기 위해 사용될 수 있다.

[0332] 또 본 발명의 실시 중에 B형 특이적 엔도셀린 수용체 길항제(BQ788)를 이용한 소과동물 대동맥 내피세포(Bovine Aortic Endothelial cells; BAEC)의 배양은 내피세포 특이적 프로모터[PPE-1(3X)]의 활성의 강화를 유도하고, A형 내피세포 수용체 길항제(BQ123)에 대한 노출은 엔도셀린 프로모터 활성 상에 영향을 주지 않는다는 것이 입

증되었다(도 96). PPE-1 프로모터의 제어 하의 루시페라제 유전자를 발현하는 유전자도입된 마우스를 이용한 추가의 실시 중에 BQ-788에 의해 B형 엔도셀린 수용체가 차단되면 엔도셀린 전사가 증대됨과 동시에 플라즈마 엔도셀린의 순환이 증대된다는 것이 입증되었다.

[0333] 따라서, 일 실시예에서, 본 발명의 cis 조절 엘리먼트를 포함하는 구축물은 보조 치료법을 병용하는 상태에서 투여되고, 그 보조 치료법은 B형 엔도셀린 수용체의 차단한다. 이와 같은 차단은 보센탄; A-186086; Ro-61-6612; SB-209,670; SB-217,243; PD142,893; 및 PD 145,065(그러나, 이것에 한정되지 않음)와 같은 비선택성 엔도셀린 수용체 길항제를 통해, 또는 A192,621; BQ788; Res 701-1 및 Ro 46-8443(Sigma-Aldrich, Inc. St Louis, MO)(그러나, 이것에 한정되지 않음)와 같은 선택성 서브타입 B 엔도셀린 수용체 길항제를 통해 이루어진다.

[0334] 아데노바이러스 벡터를 이용한 감염에 대한 숙주 세포의 반응을 약화시키면 그 운반체에 의해 운반되는 재조합 단백질을 코드하는 구축물의 발현을 향상시킬 수 있다. 최근, 코르티코스테로이드(덱사메타손)의 투여는 염증 유발성 유전자 발현을 억제하고, 인비트로 및 인비보 상태에서 재조합 유전자 발현 효율을 최적화함으로써 재조합 아데노바이러스 감염된 내피세포의 면역 관련 및 아폽토시스 관련 장해의 일부를 방지할 수 있다는 것이 입증되었다(Murata, et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:1796-803). 이와 같은 아데노바이러스 내에서의 도입유전자 발현의 코르티코스테로이드 강화의 효과는 일부의 종양 세포주 내에서보다 내피세포 내에서 특이적이고 더욱 현저하게 발생하는 것이 입증되었다.

[0335] 또, N-아세틸 시스테인(Acetyl Cysteine)(Jornot et al, Journal of Genetic Medicine 2002;4:54-65)을 이용하여 세포를 처리하면 아데노바이러스 처리된 내피세포 내에서의 도입유전자 발현 및 바이러스 투과가 강화되는 것이 최근 입증되었다.

[0336] 본 발명의 실시 중에 코르티코스테로이드 처리는 도입유전자의 아데노바이러스 매개된 일시적 발현을 강화한다는 것이 발견되었다. "%루시페라제/ μ g단백질"로서 측정된 루시페라제 발현은 구조적 CMV 프로모터(Ad-CMV-LUC)의 제어 하에서 루시페라제를 발현하는 아데노바이러스 구축물에 의해 감염되기 전에 3 μ M 덱사메타손으로 처리된 BAEC 세포 내에서 3배 이상 증대되었다. 또, 내피세포 특이적 프로모터 PPE-1의 제어 하에서 레포터 유전자 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein; GFP)을 함유하는 아데노바이러스 구축물에 의해 감염되기 전에 3 μ M 덱사메타손으로 처리된 BAEC 세포 내의 재조합 유전자 발현은 미처리 대조군에 비해 크게 향상되었다(후술된 실시예 42를 참조할 것).

[0337] 따라서, 추가의 실시예에서, 본 발명의 cis 조절 엘리먼트를 포함하는 바이러스 구축물은 바이러스 입자의 카피수의 향상 및/또는 유전자도입된 세포 내의 도입유전자 발현의 향상을 위해 추가 화합물 또는 화합물들을 병용하는 상태에서 투여된다. 여기서, 상기 추가 화합물 또는 화합물들은 코르티코스테로이드(예, 덱사메타손) 및/또는 N-아세틸 시스테인(NAC)이다.

[0338] 본 발명의 구축물 및 방법은 특히 조직 배양(tissue engineering)에 사용하는 것에 적합하다. VEGF 및 PDGF는 일반적으로 혈관신생을 유도하는데 사용되지만, 이를 인자의 효과적인 투여 방법은 아직 최적화되어 있지 않다. 인비트로 상태에서, 상기 성장 인자들은 성장 배지 내에 첨가된다. 이 방법은 비교적 고농도가 필요하다. 인비보 상태에서, 배양 조직 구축물은 신속하게 혈관이 발생되어야 하고 이식부위에 대해 혈관신생을 유도해야 한다. 본 발명의 상기 cis 조절 엘리먼트 및 핵산 구축물은 예를 들면 조직 배양, 창상 치료 등과 같은 인비보 (*in vivo*) 및 엑스비보(*ex-vivo*) 상태에서의 신혈관형성을 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 실시 중에 PPE-1(3x)의 조절 제어 하에서 혈관신생 인자는 혈관신생된 인비트로 상태의 배양 조직 내에서 우선적으로 발현되고, 인비트로 및 인비보 상태에서 배양 조직 내에서 탁월한 신혈관형성을 제공한다는 것이 최초로 입증되었다.

[0339] Ad5PPEC-1-3x VEGF에 의한 세포 감염은 배양된 구축물(engineered constructs) 내에 형성된 혈관과 같은 조직의 수 및 치수에 유도적 영향을 주므로, Ad5PPEC-1-3x VEGF 바이러스를 이용하여 처리된 샘플의 혈관의 수 및 혈관 면적의 백분율이 배지에 VEGF를 첨가한 것(도 91a 참조)에 비해 4-5배 증대한다. 인비보 연구에 의해, 이식된 스캐폴드에 기초(scaffold-based)한 조직 구축물의 생존능력, 분화, 융합 및 혈관형성이 분석되었다. Ad5PPEC-1-3x VEGF 바이러스에 의해 감염된 구축물은 대조 구축물에 비해 혈관 구조가 증대하는 것을 보여준다.

[0340] 따라서, 바람직한 일 실시예에서, 본 발명의 핵산 구축물은 천연 조직 또는 배양 조직 내의 혈관신생을 조절하는데 이용된다.

[0341] 본 발명자들은 루시페라제에 기초한 활성 시스템을 이용하여 Ad5PPEC-1-3x VEGF에 의해 감염된 이식된 구축물을

AAV-luciferase만으로 감염된 대조 구축물에 비해 높은 신호를 가진다는 것을 발견하였다. 이것은 Ad5PPEC-1-3x VEGF에 의한 인비트로 상태의 감염은 이식된 배양 조직 구축물의 생존능력 및 혈관발생을 향상시킬 수 있다 는 것을 의미한다(도 91b 참조). 또, 본 발명의 아데노바이러스 구축물에 의해 트랜스덕션된 세포를 포함하는 배양 조직 구축물은 세포 용해를 통해 주변 조직을 위한 치료적 재조합 바이러스 입자의 공급원을 구성할 수 있다.

[0342] 따라서, 본 발명의 일 관점에 따르면, 본 발명의 핵산 구축물을 포함하는 세포가 제공된다. 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 상기 세포는 예를 들면 조직 배양을 위해 사용되도록 된 스캐폴드를 접종하는데 사용된다. 스캐폴드를 이용한 조직 배양 방법은 본 기술분야에 공지된 것이다(참조예, 본 명세서에 참조로 도입된 미국특허 US 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; 5,906,827, 및 미국특허출원 US 0040044403; 0030215945; 0030194802; 0030180268; 0030124099; 0020160510; 0020102727, 이들 공지의 특허는 모두 조직 스캐폴드 상의 배양 조직의 발생을 교시한다.). 적합한 스캐폴드는 합성 폴리머, 세포 접착 분자 또는 세포와 기질 단백질로 구성될 수 있다.

[0343] 본 발명에 의해 사용되는 세포 접착/ECM 단백질은 피브로겐, 콜라겐, 인테그린(integrin)(Stefanidakis M, et al., 2003; J Biol Chem. 278: 34674-84), 세포간 접착 분자(ICAM) 1 (van de Stolpe A and van der Saag PT. 1996; J. Mol. Med. 74: 13-33), 테나신(tenascin), 피브리넥틴(fibrinectin)(Joshi P, et al., 1993; J. Cell Sci. 106: 389-400); 비멘틴(vimentin), 미소관 결합 단백질 1D(Theodosis DT. 2002; Front Neuroendocrinol. 23: 101-35), 기세린(gicerin), 축색신장 인자(Neurite outgrowth factor; NOF)(Tsukamoto Y, et al., 2001; Histol. Histopathol. 16: 563-71), 폴리히드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoate; PHA), 박테리아 셀룰로스(BC), 젤라틴, 및/또는 신경손상 유발 단백질 2 (닌주린(ninjurin)2)(Araki T and Milbrandt J. 2000; J. Neurosci. 20: 187-95)를 포함(그러나, 이것에 한정되지 않음)하는 임의의 세포 접착 단백질 및/또는 세포와 기질 단백질일 수 있다.

[0344] 본 발명에 의해 사용되는 합성 폴리머는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 히드록시아파타이트(HA), 폴리글리콜 산(PGA)(Freed LE, Biotechnology (N Y). 1994 Jul;12(7):689-93.), 앰실론-카프로락톤, 및 폴리-1-락티드 편물 [KN-PCLA] (Ozawa T et al., 2002; J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 124: 1157-64), 직물(WV-PCLA)[Ozawa, 2002 (Supra)], 연속공공(interconnected-porous) 칼슘 히드록시아파타이트 세라믹(IP-CHA), 폴리D,L-젖산-폴리에틸렌글리콜(PLA-PEG)(Kaito T et al., 2005; Biomaterials. 26: 73-9), 비포화 폴리에스테르 폴리(프로필렌 글리콜-코-퓨말 산)(PPF)(Trantolo DJ et al., 2003; Int. J. Oral Maxillofac. Implants. 18: 182-8), 폴리락티드-코-글리콜리드(PLAGA)(Lu HH, et al., 2003; J. Biomed. Mater. Res. 64A(3): 465-74), 폴리-4-히드록시부티레이트(P4HB), 및/또는 폴리포스파젠(polyphosphazene)(Cohen S et al., 1993; Clin. Mater. 13(1-4): 3-10)에 의해 보강된 1-젖산일 수 있다.

[0345] 본 발명의 실시 중에, 본 발명자들은 조직 특이적 발현 및 프로아폽토시스 제제의 특이적 활성화는 이를 제제에 비표적 조직 또는 세포를 노출시킴이 없이 혈관신생에 관련된 세포의 선택적 아폽토시스가 가능하고, 따라서 종래 치료방법의 특성인 독성의 부작용 및 과잉성을 회피할 수 있다는 것을 발견하였다.

[0346] 따라서, 본 발명의 일 관점에 따르면, 대상체의 조직 내의 혈관신생을 다운조절(down-regulating)하는 방법이 제공된다. 본 명세서에 사용된 "혈관신생의 다운조절(down-regulating angiogenesis)"이라는 문구는 새로운 혈관의 형성을 유도하는 혈관신생 과정을 자연시키거나 정지시키는 것을 의미한다.

[0347] 본 발명의 일 관점에 따른 방법은 혈관신생 세포의 서브 집단 내의 세포독성을 위해 설계 및 구성된 핵산 구축물을 대상체에 투여하는 것에 의해 수행된다. 본 명세서에 사용된 "혈관신생 세포(angiogenic cells)"라는 문구는 혈관신생 과정에 참여하거나 기여하는 임의의 세포를 의미한다. 따라서, 혈관신생 세포는 내피세포, 평활근 세포를 포함한다. 그러나, 이것에 한정되지 않는다.

[0348] 본 명세서에 사용된 "세포독성(cytotoxicity)"이라는 용어는 세포의 정상 대사작용, 기능 및/또는 구조를 비가역적으로 봉괴하여 세포사의 원인이 되는 경우가 많은 화합물 또는 과정을 의미한다. 본 명세서의 "세포독성 분자(cytotoxic molecule)"는 정의된 조건 하에서 세포독성을 발생하는 능력 또는 세포독성 과정을 유발하는 능력이나 세포 내의 통로를 가지는 분자로서 정의된다. 이와 같은 세포독성 분자는 메토트렉세이트(methotrexate), 뉴클레오시드 유사체, 질소 머스터드 화합물, 앤스라사이클린(anthracyclines)과 같은 대사길 항물질과 같은 세포독성 약제, 카스파제와 같은 아폽토시스 유도제 뿐 아니라 세포독성 약제를 코드하는 유전자, 및 Fas-c 키메라 유전자와 같은 세포독성 과정의 유도제를 포함한다. 그러나, 이것에 한정되지

않는다. 세포독성 약제 및 분자는 대사길항 약제와 같은 다른 인자와 무관하게 절대적으로 세포독성을 가지거나 다른 세포독성 또는 비세포독성 인자에 의존하거나 그 인자와의 상호작용에 의해 조건부 세포독성을 가질 수 있다. 세포독성 발생 영역은 세포독성 유전자의 배열을 코드하는 것과 같은 세포독성을 유발 또는 개시할 수 있는 세포독성 분자의 일 부분으로서 정의된다. 세포독성 경로는 특히 아폽토시스(apoptosis) 및 패사(necrosis)를 포함한다.

[0349] 본 발명의 바람직한 실시예에서, 세포독성제의 발현은 혈관신생 세포의 서브집단에 대해 유도된다. 혈관신생 세포의 서브 집단 내에서의 세포독성제의 특이적 발현을 유도하기 위해, 본 발명의 핵산 구축물을 리간드 결합 영역을 포함하는 키메라 폴리펩티드를 코드하는 제1의 폴리뉴클레오티드 영역을 포함한다. 상기 리간드 결합 영역은 수용체 티로신 키나제, 수용체 세린 키나제, 수용체 트레오닌 키나제, 세포 접착 분자, 또는 예를 들면, Fas, TNFR, 및 TRAIL과 같은 세포독성 분자의 이펙터 영역에 융합된 포스파타제(phosphatase)의 예를 들면 세포 효면 수용체 영역이 될 수 있다.

[0350] 상기 키메라 폴리펩티드는 리간드 결합 영역의 활성에 의해(즉 리간드 결합에 의해) 세포독성 분자의 이펙터 영역을 통한 세포독성을 유발하는 한 임의의 세포독성 영역에 융합된 임의의 리간드 결합 영역을 포함할 수 있다.

[0351] 리간드 결합 영역 및 그것에 융합된 세포독성 발생 영역의 선택은 아폽토시스를 위해 표적화된 혈관신생 세포의 종류에 따라 영향을 받는다. 예를 들면, 내피세포의 특이적 서브세트를 표적화(예, 내피세포, 또는 종양성 표현형을 나타내는 내피세포의 증식)하는 경우, 상기 키메라 폴리펩티드는 상기 내피세포의 환경 내에 자연적으로 존재하고, 다른 비표적화된 조직(예, TNF, VEGF)의 내피세포 내에는 존재하지 않는 것이 바람직한 리간드를 결합할 수 있는 리간드 결합 영역을 포함한다. 이와 같은 리간드는 내피세포에 의해 분비될 수 있고(오토크라인), 인접 종양 세포에 의해 분비될 수 있고(파라크라인), 또는 이를 내피세포에 특이적으로 표적화될 수 있다.

[0352] 적절한 키메라 폴리펩티드의 예는 상술되어 있고, 후술되는 실시예란의 실시예 7 및 실시예 33-36에 제공되어 있다. 상기 키메라 폴리펩티드는 후술하는 실시예란의 실시예 7-9에 상세히 기술된 Fas-c 키메라 또는 실시예 33-36에 기술된 HSV-TK 유전자인 것이 바람직하다. Fas-c 키메라의 발현은 Fas 사멸 경로의 FADD 매개된 활성화를 통해 아폽토시스를 유발하는 것이 입증되었다. HSV-TK 도입유전자의 발현은 트랜스덕션된 세포의 간시를 로비르 및 아시클로비르와 같은 약물에 대한 감수성과도(hypersusceptibility)를 유발하여 아폽토시스 및 괴사에 의한 세포사의 원인이 된다.

[0353] 이와 같은 키메라 폴리펩티드를 이용하면 후술하는 실시예란에 기재된 바와 같이 이것이 혈관신생 세포의 특이적 서브 집단 내에서 효율적이고 확실한 세포독성 활성화를 가능하게 하는 한편 세포사가 표적화되지 않은 다른 세포의 서브세트 내에서는 활성화가 회피되므로 특히 유리하다.

[0354] 후술하는 실시예란의 실시예 33-38에 설명되어 있는 바와 같이, PPE-1 (3x) 프로모터 엘리먼트의 전사적 제어 하에서 HSV-TK 유전자를 포함하는 본 발명의 핵산 구축물을 인비트로 및 인비보 상태로 투여하면 우수한 간시를 로비르 의존성 내피세포 세포독성이 생성되었다. 세포독성은 혈관신생 내피세포에 한정됨으로써 종양 및 전이암 내에서의 선택적 아폽토시스 및 괴사성 세포사를 유발하였다.

[0355] 따라서, 본 발명의 핵산 구축물은 프로드러그(prodrug)를 독성 화합물로 전환시킬 수 있는 자살 유전자를 운반하는데 이용될 수 있다. 바람직한 일 실시예에서, 핵산 구축물은 상기 자살 유전자를 코드하는 제1의 폴리뉴클레오티드 영역 및 혈관신생 세포 내에서 상기 자살 유전자의 발현을 유도할 수 있는 cis 작용 조절 엘리먼트를 코드하는 제2의 폴리뉴클레오티드 영역을 포함한다.

[0356] 본 발명의 구축물 및 방법에서, 치료적 핵산 배열 또는 "자살 유전자(suicide gene)"는 생성물을 코드하는 핵산이고, 상기 생성물은 그 자체에 의해 세포사의 원인이 되거나 다른 화합물의 존재 하에서 세포사의 원인이 된다. 당연히, 전술한 구축물은 자살 구축물의 일례에 불과하다. 추가의 예는 대상포진 바이러스(varicella zoster virus)의 티미딘 키나제, 및 5-플루오로시토신(fluorocytosine)을 고독성 화합물 5-플루오로우라실로 전환할 수 있는 박테리아 유전자 시토신 데아미나제가 있다.

[0357] 본 명세서에서 사용된 "프로드러그(prodrug)"는 독성 생성물, 즉 종양 세포에 대해 독성을 가지는 생성물로 전환될 수 있는 본 발명의 방법에 유용한 임의의 화합물을 의미한다. 상기 프로드러그는 본 발명의 방법에 유용한 벡터 내의 치료적 핵산 배열(자살 유전자)의 유전자 생성물에 의해 독성 생성물로 전환된다. 상기 프로드러그의 대표적인 예는 인비보 상태에서 HSV-티미딘 키나제에 의해 독성 화합물로 변환되는 간시클로비르가 있다. 간시클로비르 유도체도 종양 세포에 대해 독성을 가진다. 프로드러그의 다른 대표적인 예는 아시클로비르, FIAU[1-(2-테옥시-2-플루오로-β-D-아라비노푸라노실)-5-이오도우라실], VZV-TK를 위한 6-메톡시푸린 아라비노

시드(methoxypurine arabinoside), 및 시토신 데아미나제를 위한 5-플루오로시토신이 있다. 바람직한 자살 유전자/프로드러그의 조합은 박테리아 시토신 데아미나제 및 5-플루오로시토신 및 그 유도체, 대상포진 바이러스 TK 및 6-메틸푸린 아라비노시드 및 그 유도체, HSV-TK 및 간시클로비르, 아시클로비르, FIAU 또는 그들의 유도체이다. 자살 유전자/프로드러그 구축물의 제조방법 및 용도는 미국특허 US 6,066,624 및 후술하는 실시예란에 상세히 기술되어 있다.

[0358] 바람직한 일 실시예에서, 상기 cis 작용 조절 엘리먼트는 내피세포 특이적 또는 주피세포 특이적 프로모터이다. 조건부 복제 아데노바이러스 벡터(CRAD)를 이용한 세포의 트랜스덕션은 표적 세포 용해 및 바이러스 감염의 확대시에 상당히 더 효과적이므로 상기 핵산 구축물을 조건부 복제 아데노바이러스를 포함하는 것이 바람직하다. 이와 같은 본 발명의 조건부 복제 아데노바이러스 벡터 구축물은 후술하는 실시예란에 상세히 기술되어 있다.

[0359] 본 발명의 실시중에 본 발명의 cis-작용 조절 엘리먼트의 전사 제어 하의 CRAD 구축물이 인비트로에서 혈관신생 내피 세포 내의 성장 및 발생을 선택적으로 억제하는 것에 그리고 인비보에서 과도한 혈관신생과 관련된 질병 및 질환을 치료하는 것에 효과적이라는 것이 밝혀졌다. 실시예 43에서 보이는 바와 같이, E1 프로모터를 개질된 프리-프로엔도셀린-1 프로모터(pre-proendothelin-1 promoter; PPE-1 3X)로 대체한 개질 CRAD 구축물은 비내피 세포의 생존능력은 감소시킴이 없이 인비트로에서 내피 세포의 생존능력을 효과적으로 감소(90%만큼)시키고, 인비트로 마트리겔 분석(matrigel assay)에서 혈관신생을 선택적으로 억제하는데 유사하게 효과적이었다. 실시예 44는 랫에게 고용량의 동일한 CRAD 구축물을 전신투여하는 것은 체중감소 또는 간독성에 상당한 영향을 미치지 않고, LCRT 전이암 모델의 전이 조직량(metastatic burden)은 대조 아데노바이러스의 투여시에 효과가 없는 것에 비해 CRAD 처리된 동물에서 50% 이상 감소되었음을 보여준다.

[0360] 따라서, 개질된 프리프로엔도셀 프로모터(예, PPE-1 3X)의 전사 제어 하의 아데노바이러스를 유풀하면 혈관신생 특이성이 고도로 발현되므로, 이것은 전이암, 종양 및 암 관련 질환의 치료를 위한 새롭고 강력한 해결책을 제공할 수 있다. 이와 같은 혈관신생 특이적 CRAD 구축물은 전에 상술한 바와 같이 흥미있는 배열과의 결합상태로 제공되거나, 또는 후술하는 실시예 43 및 44에 기술된 바와 같이 흥미있는 배열이 결핍된 바이러스 구축물의 형태로 제공될 수 있다. 이와 같은 바이러스-함유 폴리뉴클레오티드 및 이들을 포함하는 구축물은 본 명세서에 기술된 바와 같이 제조 및 투여될 수 있다. 또, 본 발명의 개질된 CRAD는 엔도셀린-1 수용체 길항제, 코르티코스테로이드 및 N-아세틸-시스테인과 같은 감염된 내피 세포 내의 바이러스의 발현을 증진하거나 강화하는 것으로 알려져 있는 추가의 화합물과 함께 투여될 수 있다.

[0361] 따라서, 혈관신생 내피 세포 내의 아데노바이러스의 전사를 유발할 수 있는 cis 조절 엘리먼트에 전사적으로 결합된 조건부 복제 아데노바이러스를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 본 발명의 일 관점에 따르면, 상기 폴리뉴클레오티드는 cis 조절 엘리먼트에 전사적으로 결합된 조건부 복제 아데노바이러스를 포함하고, 예를 들면 세포독성제, 프로아폽토시스제(pro-apoptotic agents)와 같은 혈관신생 촉진제 및/또는 혈관신생 억제제를 코드하는 각종 바이러스 배열이 결핍되어 있다. 상기 cis 조절 엘리먼트는 배열번호 15 및 16에 표시되어 있는 배열, 더욱 바람직하게는 배열번호 6의 적어도 하나의 복제를 포함하는 배열, 가장 바람직하게는 배열번호 7에 표시되어 있는 배열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 혈관신생 내피 제어 엘리먼트를 포함하는 것이 바람직한 내피 프로모터(예, 개질된 PPE-1 3X 프로모터)일 수 있다. 이와 같은 혈관신생 특이적 구축물은 암, 전이성 질환, 종양 성장, 건선, 죽상동맥경화증, 등과 같은 과도한 혈관신생을 특징으로 하는 질환의 치료 및 혈관신생의 다운조절을 위한 조성물 및 방법에 이용될 수 있다.

[0362] 본 발명의 핵산 구축물은 예를 들면 전신 투여 경로 또는 경구 투여, 직장 투여, 경침막 투여(특히, 비강침막 투여), 장내 투여 또는 비경구 투여 경로를 통해 대상체에 투여된다. 전신 투여는 근육 주사, 피하 주사 및 척수 주사뿐 아니라 막하강 주사, 뇌실내 직접 주사, 정맥 주사, 복강내 주사, 비강내 주사, 안구내 주사 또는 종양내 주사를 포함하는 것이 바람직하다.

[0363] 대상체는 바람직하게는 포유동물, 더 바람직하게는 인간, 가장 바람직하게는 종양 성장을 특징으로 하고, 당뇨병성 망막증 및 관절염이 증식하는 과정 또는 비정상 신혈관형성을 특징으로 하는 질병을 가지는 인간이다.

[0364] 본 발명의 핵산 구축물은 그 자체로 또는 약학 조성물의 일부분(활성 성분)으로서 대상체에 투여될 수 있다.

[0365] 종래기술은 다양한 세포 종류 내에 담체가 제공되거나 제공되지 않은 상태의 폴리뉴클레오티드를 효율적으로 운반하는데 사용될 수 있는 다수의 운반 방법을 교시한다(참조예, Luft (1998) J Mol Med 76(2): 75-6; Kronenwett et al. (1998) Blood 91(3): 852-62; Rajur et al. (1997) Bioconjug Chem 8(6): 935-40; Lavigne et al. (1997) Biochem Biophys Res Commun 237(3): 566-71 and Aoki et al. (1997) Biochem Biophys Res

Commun 231(3): 540-5).

[0366] 본 명세서에 사용된 "약학적 조성물(pharmaceutical composition)"은 본 명세서에 기술된 일종 이상의 활성 성분 또는 제제와 생리학적으로 적합한 담체 및 부형제와 같은 기타의 화학적 성분의 조합물이다. 약학적 조성물의 목적은 유기체 내에 화합물의 투여를 촉진하는 것이다.

[0367] 이하의 본 명세서에 사용되는 "생리학적으로 허용될 수 있는 담체(physiologically acceptable carrier)" 및 "약학적으로 허용될 수 있는 담체(pharmaceutically acceptable carrier)"는 서로 바꿔 쓸 수 있는 용어로서, 유기체에 상당한 자극을 유발시키지 않고, 투여된 핵산 구축물의 생물학적 활성 및 특성을 무효화하지 않는 담체 또는 희석제를 의미한다. 이들 문구의 아래에 보조제가 포함된다.

[0368] 본 명세서에 사용된 "부형제(excipient)"라는 용어는 활성 성분의 투여를 더욱 촉진하기 위해 약학 조성물에 첨가된 불활성 물질을 의미한다. 부형제의 예는 칼슘 카보네이트, 칼슘 포스페이트, 여러 가지 당류 및 전분, 셀룰로스 유도체, 젤라틴, 식물유 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 그러나, 이들 물질에 한정되지 않는다.

[0369] 약물의 제제방법 및 투여방법은 레밍تون의 약학("Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA) 최신판에 개시되어 있다. 이 문현은 참조로서 본 명세서에 도입된다.

[0370] 적합한 투여 경로는 예를 들면 경구 투여, 직장 투여, 경점막 투여(특히, 비강점막 투여), 장내 투여 또는 비경구 투여(근육 주사, 피하 주사 및 척수 주사뿐 아니라 막하강 주사, 뇌실내 직접 주사, 정맥 주사, 복강내 주사, 비강내 주사, 또는 안구 주사가 포함됨)가 포함될 수 있다.

[0371] 또는 약학 조성물은 전신 투여 방식 대신, 예를 들면, 환자의 조직 영역 내에 약학 조성물을 직접 주사하는 것과 같은 국부 투여 방식으로 투여될 수 있다. 본 발명에 비추어서 종양 조직 내에 직접 투여는 관련성이 있는 국부 투여의 일례이다.

[0372] 본 발명의 약학 조성물은 본 기술분야의 공지된 공정, 예를 들면, 공지의 혼합 공정, 용해 공정, 조립(granulating) 공정, 당의정 제조(dragee-making) 공정, 미립자화(levigating) 공정, 유화(emulsifying) 공정, 캡슐화 공정, 봉입화(entrappling) 공정 또는 동결건조(lyophilizing) 공정에 의해 제조될 수 있다.

[0373] 따라서, 본 발명에 따라 이용하기 위한 약학 조성물은 부형제 및 활성 성분의 약학적으로 이용될 수 있는 조제물(preparations) 내에의 도입을 촉진시켜 주는 보조제를 포함하는 생리학적으로 허용될 수 있는 하나 이상의 담체를 이용하여 공지의 방법으로 제제될 수 있다. 적합한 제제(formulation)는 선택된 투여 경로에 의존한다.

[0374] 주사용 약학 조성물의 활성 성분은 수용액 내에서, 바람직하게는 행크 용액, 링거 용액, 또는 생리학적 염 완충액과 같은 생리학적으로 적합한 완충액 내에서 제제될 수 있다. 경점막 투여를 위해, 침투 대상의 장벽에 적합한 침투제(penetrants)가 제제 내에 사용된다. 이러한 침투제는 본 기술분야에 일반적으로 공지되어 있다.

[0375] 경구 투여용 약학 조성물은 활성 화합물과 본 기술분야에 주지된 약학적으로 허용될 수 있는 담체를 혼합하는 것에 의해 용이하게 제제될 수 있다. 이러한 담체에 이용하면 약학 조성물을 정제(tablets), 환(pills), 당의정, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 혼탁액, 등과 같은 경구 투여용으로 제제할 수 있다. 경구용 약학 제제물은 고체 부형제를 이용하고, 필요에 따라 얻어진 혼합물을 분쇄하고, 필요에 따라 적합한 보조제를 혼합 한 후, 정제 또는 당의정 코어를 얻도록 입자 혼합물을 처리함으로써 제조될 수 있다. 적합한 부형제는 특히 락토스, 스크로스, 마니톨, 또는 소르비톨을 포함하는 당류와 같은 충전제; 예를 들면, 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 고무 트라가칸트(gum tragacanth), 메틸 셀룰로스, 히드록시프로필메틸-셀룰로스, 소디움 카르보메틸셀룰로스와 같은 셀룰로스 조제물; 및/또는 폴리비닐파리돈(PVP)과 같은 생리학적으로 허용될 수 있는 폴리머이다. 필요 시, 가교결합 폴리비닐 파리돈, 한천, 또는 알긴산 또는 그 염(예, 소디움 알기네이트)과 같은 봉괴제(disintegrating agents)가 첨가될 수 있다.

[0376] 당의정 코어에는 적합한 코팅이 제공된다. 이것을 위해, 아라비아 고무, 탈크(talc), 폴리비닐 파리돈, 카르보폴 젤(carbopol gel), 폴리에틸렌 글리콜, 티타늄 다이옥사이드, 락카 용액(lacquer solutions) 및 적합한 유기 용매 또는 용매 혼합물을 선택적으로 포함할 수 있는 농축 당 용액이 사용될 수 있다. 상이한 조합의 활성 화합물의 양을 표시하거나 특징을 부여하기 위해 정제 또는 당의정 코팅에 염료 또는 색소가 첨가될 수 있다.

[0377] 경구용 약학 조성물은 젤라틴으로 제조된 푸시-핏 캡슐(push-fit capsules) 뿐 아니라 젤라틴 및 가소제(예, 글리세롤 또는 소르비톨)로 제조된 연질의 밀봉 캡슐을 포함한다. 푸시-핏 캡슐은 활성 성분과 혼합된 락토스와 같은 충전제, 전분과 같은 결합제, 탈크 또는 마그네슘 스테아레이트와 같은 화제(lubricants), 및 필요에 따라

안정제를 포함할 수 있다. 연질 캡슐 내에서 활성 성분은 지방유, 유동 파라핀, 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 액체 내에 용해되거나 혼탁될 수 있다. 또, 안정제도 첨가될 수 있다. 경구 투여용 모든 제제의 용량은 그 선택된 투여 경로에 적합한 것이어야 한다.

[0378] 경구 투여용 약학 조성물은 공지의 방법으로 제조된 정제 또는 로젠지(lozenges)의 형태를 취할 수 있다.

[0379] 비공 흡입 투여를 위해, 본 발명에 따라 사용되는 활성 성분은 적절한 추진제(예, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로디플루오로메탄, 디클로로-테트라플루오로에탄 또는 이산화탄소)를 이용하는 고압 팩이나 분무기로부터 에어로졸 형태로 편리하게 운반된다. 고압 에어로졸의 경우, 사용량 단위는 측정량을 운반하는 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 디스펜서(dispenser)에서 사용되기 위한 예를 들면 젤라틴으로 제조된 캡슐 및 카트리지는 화합물 및 적절한 분말 베이스(예, 락토스 또는 전분)의 분말 혼합물을 포함하도록 제조될 수 있다.

[0380] 본 명세서에 기재된 약학 조성물은 예를 들면 볼러스 주입법(bolus injection) 또는 지속 주입법(continuous infusion)과 같은 비경구 투여용으로 제제될 수 있다. 주사용 제제는 단위 용량 형태, 예를 들면 앰플 또는 필로에 따라 방부제를 함유한 멀티도스 용기(multidose containers) 내에 제공될 수 있다. 이 조성물은 유성 매체나 수성 매체 내의 혼탁액, 용액 또는 에멀젼일 수 있고, 혼탁제, 안정제 및/또는 분산제와 같은 조제용 약제(formulatory agents)를 포함할 수 있다.

[0381] 비경구 투여용 약학 조성물은 수용성 활성 조제물로 구성된 수용액을 포함할 수 있다. 또, 활성 성분의 혼탁액은 적절한 오일 베이스 또는 물 베이스의 주사 혼탁액으로서 제조될 수 있다. 적합한 지용성 용매 또는 운반체(vehicles)는 참기름, 합성 지방산 에스테르(예, 에틸올레이트, 트리글리세리데스 또는 리포소메스)와 같은 지방유(fatty oils)를 포함한다. 수성 주사 혼탁액은 소다음 카르복시메틸 셀룰로스, 소르비톨 또는 텍스트란과 같은 혼탁액의 점성을 증대시켜주는 물질을 포함할 수 있다. 필요에 따라, 상기 혼탁액은 안정제 또는 고농축된 용액의 제조를 가능하게 하는 활성 성분의 용해도를 증대시켜주는 제제를 포함할 수 있다.

[0382] 또는, 상기 활성 성분은 분말 형태를 취할 수 있고, 사용시 적합한 운반체(예, 멸균된 피로젠프리 물 베이스 용액)와 배합할 수 있다.

[0383] 본 발명의 약학 조성물은 예를 들면 공지의 좌약 베이스(예, 코코아 버터 또는 기타 글리세리드)를 이용한 좌약이나 정류관장제(retention enemas)와 같은 직장 조성물로 제제될 수도 있다.

[0384] 본 발명에 사용하기에 적합한 약학 조성물은 활성 성분이 목적 달성을 위해 유효한 양만큼 수용된 조성물을 포함한다. 특히, 치료적으로 유효한 양이라 함은 질환(예, 진행성 골량 저하)의 증상을 방지, 완화 또는 개선하거나 치료 중인 대상체의 생존기간을 연장하는데 유효한 활성 성분(예, 안티센스 올리고뉴클레오티드)의 양을 의미한다.

[0385] 치료적으로 유효한 양을 결정하는 것은 특히 본 명세서에 제공된 상세한 설명에 비추어 본 기술분야의 전문가에 의해 실시될 수 있다.

[0386] 본 발명의 방법에 이용되는 임의의 제제물의 치료적으로 유효한 양은 최초에 인비트로 및 세포배양 실험으로부터 평가될 수 있다. 예를 들면, 일회 투여량은 소망의 농도 또는 적정농도(titer)를 달성하기 위해 골화석증의 쥐과동물 Src 결핍 모델과 같은 동물 모델에서 제제될 수 있다(Boyce et al. (1992) J. Clin. Invest. 90, 1622-1627; Lowe et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 4485-4489; Soriano et al. (1991) Cell 64, 693-702). 이와 같은 정보는 인간에 유용한 투여량을 더욱 정밀하게 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0387] 본 명세서에 기술된 활성 성분의 독성, 세포독성 및 치료적 유효성은 표준 인비트로 약학적 치료과정, 세포 배양 또는 실험 동물에 의해 결정될 수 있다. 이를 인비트로 및 세포 배양 실험 및 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 인간에게 사용되기 위한 다양한 투여량을 제제하는데 이용될 수 있다. 투여량은 채용된 투여 형태 및 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 정확한 제제, 투여 경로 및 투여량은 환자의 상태를 고려하여 개개 의사에 의해 선택될 수 있다(참조예, Fingl, et al., 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1).

[0388] 투여량 및 투여간격은 활성 성분이 종양의 진행을 지연시키는데 충분한 수준(최소 유효 농도(minimal effective concentration; MEC))이 되도록 개별적으로 조절될 수 있다. 각 제제물에 대한 MEC는 각각 상이하지만 인비트로 데이터로부터 평가될 수 있다. MEC를 달성하는데 필요한 투여량은 개개의 특성 및 투여 경로에 의존한다. 혈장 농도를 결정하기 위해 검출 분석이 사용될 수 있다.

[0389] 치료될 종상의 종종도 및 반응도에 의존하여, 수일 내지 수주에 걸쳐 지속되는 치료 과정 중 또는 병세의 완화

가 달성되는 것에 따라 투여는 단일회 투여 또는 복수회 투여로 할 수 있다.

[0390] 투여될 조성물의 양은 물론 치료 대상체, 질환의 중증도, 투여 방법, 처방의사의 판단 등에 의존하여 변화된다.

[0391] 본 발명의 조성물은 필요 시 팩이나 활성 성분을 수용하는 하나 이상의 단위 투여 형태를 포함할 수 있는 FDA 승인 키트와 같은 디스펜서 장치와 같은 제품 내에 수용하여 제공될 수 있다. 상기 팩은 예를 들면 금속 포일 또는 블리스터 팩(blister pack)과 같은 플라스틱 포일을 포함할 수 있다. 상기 팩 또는 디스펜서 장치에는 투약 설명서가 첨부될 수 있다. 상기 팩 또는 디스펜서 장치는 또 약품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태로 용기에 관련된 고지(notice)가 수용되어 있을 수 있다. 이 고지는 조성물의 형태, 인체 또는 동물에의 투여를 정부기관이 승인한다는 것이 반영되어 있다. 이와 같은 고지는 예를 들면 처방약에 대한 미국 FDA의 승인 라벨 또는 승인된 생성물이라는 삽입통지문(insert)으로 구성될 수 있다. 적합성 약학적 담체 내에 제재된 본 발명의 제재물을 포함하는 조성물은 또 제조 후 적절한 용기 내에 수용되고, 전술한 바와 같이 표시된 증상의 치료용이라는 라벨이 부착될 수 있다.

[0392] 본 발명의 약학 조성물은 세포에 의한 핵산 구축물의 흡수, 키메라 폴리펩티드 또는 세포 내의 핵산 구축물에 의해 코드된 자살 유전자의 발현, 또는 발현된 키메라 폴리펩티드 또는 자살 유전자 생성물의 활성을 개선할 수 있는 임의의 추가 성분을 더 포함할 수 있다.

[0393] 예를 들면, EC 세포 내로의 아데노바이러스 벡터의 흡수는 이 벡터를 배양된 항체 또는 소 웨პ티드(small peptide)로 처리하는 것에 의해 강화될 수 있다. 이와 같은 "아데노바디(adenobody)"처리는 세포 상의 EGF 수용체에 아데노바이러스 구축물을 유도하는데 효과가 있는 것으로 밝혀졌다(Watkins et al 1997, Gene Therapy 4: 1004-1012). 또, 닉클린(Nicklin) 등은 파이지 제시법(phage display)을 통해 단리된 소 웨პ티드는 내피세포 내의 벡터의 특이성 및 효율을 증대시키는 한편 배양물 내의 간장 세포 내에서의 발현을 감소시킨다는 것을 입증하였다(Nicklin et al 2000, Circulation 102:231-237). 최근의 연구에서, FGF 표적화 아데노바이러스 벡터는 마우스 내의 tk의 독성을 감소시켰다(Printz et al 2000, Human Gene Therapy 11:191-204).

[0394] 저선량 방사선은 G2/M 상(phase)의 DNA 사슬을 일차적으로 절단하고, 세포막 손상은 바이스텐더 효과를 강화시켜 주고, 그 결과 저선량 방사선과 세포독성 및 항종양 치료법과 병용하면 이를 치료법을 강화시켜 줄 수 있다는 것이 입증되었다. 저선량 방사선은 특히 미세혈관 내피세포의 아폽토시스 시스템을 특이적으로 표적화한다는 것이 입증되었으므로 혈관 내피세포는 특히 이와 같은 병용 요법 또는 보조 요법에 적합하다(Kolesnick et al., Oncogene 2003;22:5897-906). 앤지오스타틴은 저선량 방사선의 치료 효과를 강화한다는 것이 발견되었다(Gorski et al. Can Res 1998;58:5686-89). 그러나, 방사선은 혈관신생을 촉진하는 "조직 치유 인자(tissue repair factors)"를 증대하는 것이 발견되었으므로(Itasaka et al., Am Assoc Canc Res, 2003;abstract 115), 방사선의 효과는 여전히 이해가 부족한 상태에 있다. 마찬가지로, 어떤 화학요법제는 특이적 세포독성 및 아폽토시스 경로를 활성화하는 것이 입증되었다[doxorubicin, cisplatin and mitomycin C induce accumulation of Fas receptor, FADD, and other proapoptotic signals in the FADD/MORT-1 pathway (Micheau et al., BBRC 1999 256:603-07)]. 본 발명의 실시 중에, 저선량 방사선 치료는 PPE-1(3x)의 제어 하의 TK를 포함하는 핵산 구축물 및 간시클로비르 투여의 항종양 및 항 전이 효과에 미치는 명백한 시너지 효과를 가진다는 것이 예기치 않게 발견되었다(실시예 35 및 36, 도 79-86 참조). 이것은 본 발명에 비추어 특이한 관련성인데, 이와 같은 저선량 방사선은 TK 발현 및 치료 효과를 활성화할 수 있고, 독소루비신 화학치료 효과를 특이적으로 강화시킬 수 있고, FADD/MORT-1 아폽토시스 경로를 활성화(Kim et al, JBC 2002;277:38855-62)하는 것으로 알려져 있기 때문이다.

[0395] 이와 같은 병합요법의 효능의 추가의 증거는 실시예 37에 기술되어 있다. 실시예 37은 내피세포(BAEC)(도 91) 내의 독소루비신 및 AdPPE-1 (3x)-Fas-c 키메라 구축물의 병합 투여의 시너지 효과가 설명되어 있다. 따라서, 본 발명의 핵산 구축물 및 약학 조성물은 비정상 혈관신생에 수반되는 질병 또는 증상의 치료를 위해 사용되거나 또는 상기 질병에 대한 기타의 확립되거나 실험된 치료방법(therapeutic regimen)과의 병용하여 상기 질병의 치료를 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 핵산 구축물 또는 핵산 구축물을 코드하는 폴리뉴클레오티드와의 병용에 적합한 암치료용 치료방법은 화학요법, 방사선요법, 광선요법 및 광선역학요법, 수술법, 영양요법, 절제요법, 방사선요법과 화학요법의 병행법, 완두요법, 양자 비임 요법, 면역요법, 세포요법 및 광자 비임 방사선 수술법을 포함한다. 그러나, 이들 요법에 제한되지 않는다.

[0396] 본 발명의 화합물과 공동 투여될 수 있는 항암 약물은 아시비신(Acivicin); 아클라루비신(Aclarubicin); 아코다졸 하이드로클로라이드(Acodazole Hydrochloride); 아크로닌(Acronine); 아드리아마이신(Adriamycin); 아도젤리신(Adozelesin); 알데스로킨(Aldesleukin); 알크레타민(Altretamine); 암보마이신(Ambomycin); 아메탄트론

아세테이트(Ametantrone Acetate); 아미노글루테티미드(Aminoglutethimide); 암사크린(Amsacrine); 아나스트로졸(Anastrozole); 안트라마이신(Anthramycin); 아스파라기나제(Asparaginase); 아스페린(Asperlin); 아자시티딘(Azacitidine); 아제테파(Azetepa); 아조토마이신(Azotomycin); 바티마스타트(Batimastat); 벤조데파(Benzodepa); 비칼루타미드(Bicalutamide); 비산트렌 하이드로클로라이드(Bisantrene Hydrochloride); 비스나파이드 디메실레이트(Bisnafide Dimesylate); 비젤리신(Bizelesin); 블레오마이신 설페이트(Bleomycin Sulfate); 브레카나 소디움(Brequinar Sodium); 브로피리민(Bropirimine); 부술판(Busulfan); 캐티노마이신(Cactinomycin); 칼루스테론(Calusterone); 카라세미드(Caracemide); 카르베티머(Carbetimer); 카르보플라틴(Carboplatin); 카르무스틴(Carmustine); 카루비신 하이드로클로라이드(Carubicin Hydrochloride); 카르젤리신(Carzelesin); 세테핀콜(Cedefingol); 클로람부실(Chlorambucil); 시롤리마이신(Cirolemycin); 시스플라틴(Cisplatin); 클라드리빈(Cladribine); 크리스나톨 메실레이트(Crisnatol Mesylate); 시클로포스파미드(Cyclophosphamide); 시타라빈(Cytarabine); 다카르바진(Dacarbazine); 닥티노마이신(Dactinomycin); 다우노루비신 하이드로클로라이드(Daunorubicin Hydrochloride); 데시타빈(Decitabine); 덱소르마플라틴(Dexormaplatin); 데자구아닌(Dezaguanine); 데자구아닌 메실레이트(Dezaguanine Mesylate); 다이아지퀴온(Diaiquone); 도세탁셀(Docetaxel); 독소루비신(Doxorubicin); 독소루비신 하이드로클로라이드(Doxorubicin Hydrochloride); 드로록시펜(Droloxifene); 드로록시펜 시트레이트(Droloxifene Citrate); 드로모스타놀론 프로피오네이트(Dromostanolone Propionate); 두아조마이신(Duazomycin); 에다트렉세이트(Edatrexate); 에플로르니틴 하이드로클로라이드(Eflornithine Hydrochloride); 엘사미트루신(Elsamitrucin); 엔로플라틴(Enoplatin); 엔프로메이트(Enpromate); 에피프로파인(Epipropidine); 에피루비신 하이드로클로라이드(Epirubicin Hydrochloride); 에르불로졸(Erbulozole); 에소르비신 하이드로클로라이드(Esorubicin Hydrochloride); 에스트라무스틴(Estramustine); 에스트라무스틴 포스페이트 소디움(Estramustine Phosphate Sodium); 에타니다졸(Etanidazole); 에토포시드(Etoposide); 에토포시드 포스페이트(Etoposide Phosphate); 에토프린(Etoprine); 파드로졸 하이드로클로라이드(Fadroazole Hydrochloride); 파자라빈(Fazarabine); 펜레티디드(Fenretinide); 플로수루딘(Flouxuridine); 플루다라빈 포스페이트(Fludarabine Phosphate); 플루오로우라실(Fluorouracil); 플루오로시타빈(Flurocitabine); 포스퀴돈(Fosquidone); 포스트리에신 소디움(Fostriecin Sodium); 켐시타빈(Gemcitabine); 켐시타빈 하이드로클로라이드(Gemcitabine Hydrochloride); 히드록시우레아(Hydroxyurea); 이다루비신 하이드로클로라이드(Idarubicin Hydrochloride); 이포스파미드(Ifosfamide); 일모포신(Imofosine); 인터페론 알파-2a(Interferon Alfa-2a); 인터페론 알파-2b(Interferon Alfa-2b); 인터페론 알파-n1(Interferon Alfa-n1); 인터페론 알파-n3(Interferon Alfa-n3); 인터페론 베타-1a(Interferon Beta-1a); 인터페론 감마-1b(Interferon Gamma-1b); 엘프로프라틴(Iproplatin); 이리노테칸 하이드로클로라이드(Irinotecan Hydrochloride); 란레오티드 아세테이트(Lanreotide Acetate); 레트로졸(Letrozole); 로이프롤리드 아세테이트(Leuprolide Acetate); 리아로졸 하이드로클로라이드(Liarozole Hydrochloride); 로메트렉솔 소디움(Lometrexol Sodium); 로무스틴(Lomustine); 로소잔트론 하이드로클로라이드(Losoxantrone Hydrochloride); 마소프로콜(Masoprocol); 마이탄신(Maytansine); 메클로레타민 하이드로클로라이드(Mechlorethamine Hydrochloride); 메게스트롤 아세테이트(Megestrol Acetate); 멜렌게스트롤 아세테이트(Melengestrol Acetate); 멜파란(Melphalan); 메노가릴(Menogaril); 메르캅토퓨린(Mercaptoperine); 메토트렉세이트(Methotrexate); 메토트렉세이트 소디움(Methotrexate Sodium); 메토프린(Metoprime); 메투레데파(Meturedopa); 미티도미드(Mitindomide); 미토카르신(Mitocarcin); 미토크로민(Mitocromin); 미토길린(Mitogillin); 미토말신(Mitomalcin); 미토마이신(Mitomycin); 미토스퍼(Mitosper); 미토탄(Mitotane); 미토잔트론 하이드로클로라이드(Mitoxantrone Hydrochloride); 마이코페놀산(Mycophenolic Acid); 노코다졸(Nocodazole); 노갈라마이신(Nogalamycin); 오르마플라틴(Ormaplatin); 옥시수란(Oxisuran); 파클리타셀(Paclitaxel); 페가스파르가제(Pegaspargase); 펠리오마이신(Peliomycin); 펜타무스틴(Pentamustine); 페플로마이신 설페이트(Peplomycin Sulfate); 페르포스파미드(Perfosfamide); 페포브로만(Pipobroman); 페포술판(Piposulfan); 피록산트론 하이드로클로라이드(Piroxantrone Hydrochloride); 플리카마이신(Plicamycin); 플로메스탄(Plomestane); 포르피머 소디움(Porfimer Sodium); 포르피로마이신(Porfiromycin); 프레드니무스틴(Prednimustine); 프로카르바진 하이드로클로라이드(Procarbazine Hydrochloride); 퓨로마이신(Puromycin); 퓨로마이신 하이드로클로라이드(Puromycin Hydrochloride); 피라조퓨린(Pyrazofurin); 리보퓨린(Riboprime); 로글레티미드(Rogletimide); 사핀콜(Safingol); 사핀콜 하이드로클로라이드(Safingol Hydrochloride); 세무스틴(Semustine); 십트라젠(Simtrazene); 스파르포세이트 소디움(Sparfosate Sodium); 스파르소마이신(Sparsumycin); 스피로게르마늄 하이드로클로라이드(Spirogermanium Hydrochloride); 스피로무스틴(Spiromustine); 스피로플라틴(Spiroplatin); 스트렙토니그린(Streptonigrin); 스트렙토조신(Streptozocin); 술로페놀(Sulofenur); 탈리소마이신(Talisomycin); 탁솔(Taxol); 테코갈란 소디움(Tecogalan Sodium); 테가푸

르(Tegafur); 텔록산트론 하이드로클로라이드(Teloxantrone Hydrochloride); 템포포르핀(Tempoporfirin); 테니포시드(Teniposide); 테록시론(Teroxirone); 테스토락톤(Testolactone); 티아미프린(Thiamiprime); 티오구아닌(Thioguanine); 티오페파(Thiotepa); 티아졸퓨린(Tiazofuirin); 티라파자민(Tirapazamine); 토포테칸 하이드로클로라이드(Topotecan Hydrochloride); 토레미펜 시트레이트(Toremifene Citrate); 트레스톨론 아세테이트(Trestolone Acetate); 트리시리빈 포스페이트(Triciribine Phosphate); 트리메트렉세이트(Trimetrexate); 트리메트렉세이트 글루코로네이트(Trimetrexate Glucuronate); 트리프토렐린(Triptorelin); 튜블로졸 하이드로클로라이드(Tubulozole Hydrochloride); 우라실 머스타드(Uracil Mustard); 우레데파(Uredopa); 바프레오티드(Vapreotide); 베르테포르핀(Verteporfin); 빈블라스틴 살페이트(Vinblastine Sulfate); 빙크리스틴 살페이트(Vincristine Sulfate); 빈데신(Vindesine); 빈데신 살페이트(Vindesine Sulfate); 비네피딘 살페이트(Vinepidine Sulfate); 빙글리시네이트 살페이트(Vinglycinate Sulfate); 빈로로신 살페이트(Vinleurosine Sulfate); 비노렐빈 타르트레이트(Vinorelbine Tartrate); 빈로시딘 살페이트(Vinrosidine Sulfate); 빈졸리딘 살페이트(Vinzolidine Sulfate); 보로졸(Vorozole); 제니플라틴(Zeniplatin); 지노스타틴(Zinostatin); 조르비신 하이드로클로라이드(Zorubicin Hydrochloride)를 포함한다. 그러나, 이것에 한정되지 않는다. 추가의 항종양제는 "치료학의 약학적 기초(The Pharmacological Basis of Therapeutics)"라는 문헌(Goodman and Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Eighth Edition, 1990, McGraw-Hill, Inc. (Health Professions Division))의 1202-1263 페이지의 제52장의 항종양제(Paul Calabresi and Bruce A. Chabner) 부분 및 그 서문에 기재된 것을 포함한다.

[0397] 리간드 또는 세포독성 프로드러그에 노출된 세포의 표적화가 바람직하지만 본 발명은 상기 리간드 또는 세포독성 프로드러그에 노출되지 않거나 그것에 의해 영향을 받지 않는 세포 내에서의 핵산 구축물의 발현도 고려한다. 이 경우, 본 발명의 방법은 상기 리간드 또는 프로드러그를 형질변환된 세포에 투여하는 단계를 포함한다. 이와 같은 투여는 전술한 투여방법들 중 임의의 투여방법을 이용하여 수행될 수 있다. 상기 리간드 또는 프로드러그는 세포독성의 활성화의 특이성이 높아지도록 예를 들면 항체 결합 표적화를 이용하여 세포 표적 방식으로 투여된다. 세포독성 또는 아폽토시스 활성화 방법은 후술하는 실시예란에 더욱 상세히 기술되어 있다.

[0398] 따라서, 본 발명은 핵산 구축물, 이와 같은 핵산 구축물을 포함하는 약학 조성물 및 과잉의 또는 비정상의 혈관신생을 특징으로 하는 조직 영역 내의 혈관신생을 다운조절하기 위해 상기 구축물을 이용하는 방법을 제공한다.

[0399] 본 발명은 특정의 세포 서브세트 내에서의 표적화 발현을 가능하게 하므로 본 발명은 변경이 가능하고 다양한 종양의 치료를 위해 이용될 수도 있다.

[0400] 따라서, 본 발명의 다른 관점에 따르면 종양의 치료방법이 제공된다.

[0401] 상기 관점에 따른 본 발명의 방법은 종양 세포 내에 전술한 키메라 폴리펩티드 또는 자살 유전자를 발현시키는 것에 의해 수행된다.

[0402] 따라서 본 발명의 상기 관점에 따르면, 폴리펩티드 키메라 또는 자살 유전자의 발현은 가스트린-방출 웨터드(gastrin-releasing peptide; 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], 핵소키나제형 II 프로모터(Hexokinase type II promoter)[AF148512; Katabi MM, Hum Gene Ther. 1999 Jan 20;10(2):155-64.], 또는 L-플라스틴(L-plastin) 프로모터[L05490, AH002870, MMU82611; Peng XY, Cancer Res. 2001 Jun 1;61(11):4405-13]와 같은 종양 특이적 엘리먼트에 의해 유도된다. 그러나, 이를 엘리먼트에 한정되지 않는다.

[0403] 종양 세포 내에서의 폴리펩티드 키메라(예, Fas-c) 또는 자살 유전자의 발현은 이를 세포 내에서의 세포독성 및 /또는 아폽토시스를 활성화하고, 그 결과 세포사를 유도한다. 이것은 종양 성장 저연 또는 정지, 종양 축소의 원인이 된다.

[0404] 본 기술분야의 전문가 후술하는 예시적인 실시예의 실시에 의해 본 발명의 추가의 목적, 장점, 및 신규의 특징을 명확하게 이해할 수 있을 것이다. 또, 본 발명의 다양한 실시예 및 전술한 본 발명의 관점 및 후술된 청구범위는 후술된 실시예에 의해 실험적으로 증명된다.

실시예

- [0406] 하기 실시예를 참조하여 본 발명에 대해 설명한다. 그러나, 본 발명은 이 실시예에 한정되지 않는다.
- [0407] 일반적으로 본 명세서에서 사용된 용어 및 본 발명에서 사용된 실험 과정은 분자, 생화학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술을 포함한다. 이와 같은 기법은 다음의 문헌들에 충분히 설명되어 있다. 참고문헌의 예는 다음과 같다. "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); methodologies set forth in U.S. Pat. Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 and 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); available immunoassays are extensively described in the patent and scientific literature, see, for example, U.S. Pat. Nos. 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 and 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). 이들 모든 문현은 참조로서 본 명세서에 도입되었다. 기타 일반적인 참조문현은 본 명세서를 통해 제공된다. 본 명세서의 실험 과정은 본 기술분야에서 주지된 것으로 생각되고, 독자의 편의를 위해 제공된다. 본 명세서에 기술된 모든 정보는 참조로서 도입된 것이다.
- [0408] 특히 아래에 열거된 다수의 실시예와 관련되어 수행된 실험들은 다음의 방법 및 물질을 이용하였다.
- [0409] 물질 및 방법
- [0410] 세포 배양
- [0411] 루이스 폐암 세포 - (D122-96), 인간 태아 신장 세포 (293) 및 HeLa 세포는 4.5 gr/l의 DMEM에 10%의 소 태아 혈청(fetal calf serum; FCS), 50 U/ml의 폐니실린, 50 ?g/ml의 스트렙토마이신 및 2 mM의 글루타민 (Biological industries, Beit-Haemek, Israel)을 보충한 배지에서 배양되었다. 소 대동맥혈관 내피세포 (Bovine Aortic Endothelial Cells - BAEC), 정상 피부 섬유아세포(Normal Skin Fibroblasts - NSF), HepG2 및 인간 제대 내피세포(Human Umbilical Endothelial Cells - HUVEC-304)(ATCC, USA)는 1.0 gr/l DMEM(Biological industries, Beit-Haemek, Israel)에 5%의 FCS, 50 U/ml의 폐니실린, 50 ?g/ml의 스트렙토마이신 및 2 mM의 글루타민을 보충한 배지에서 배양되었다. 상기 BAEC 세포에는 완전 섬유아세포 성장인자 (Sigma, St. Louis. MO.)가 첨가되었다. RINr1046-38 (RIN-38)는 199 얼리 염(199 Earle's salts)(5.5 mM glucose) 배지에 5%의 FCS(Biological Industries, Beit-Haemek, Israel), 50U/ml의 폐니실린, 50 ?g/ml의 스트렙토마이신 및 2 mM의 글루타민이 보충한 배지에서 배양되었다.
- [0412] 본 명세서에 사용된 "HepG2"는 ATCC-HB-8065를 의미한다.
- [0413] 본 명세서에 사용된 "HeLa"는 ATCC-CCL-2를 의미한다.
- [0414] 본 명세서에 사용된 "인간 기도 상피 세포(Human Bronchial Epithelial cells)" 및 "B2B"는 ATCC-CRL-9609를 의미한다.
- [0415] 본 명세서에 사용된 "HUVEC" 및 "인간 제대정맥 내피세포(Human Umbilical Vein Endothelial Cells)"는 ATCC-CRL-1730를 의미한다.

[0416] 본 명세서에 사용된 "CHO" 및 "차이니즈 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary)"는 ATCC- 61를 의미한다.

하이폭시아 유발

[0418] 트랜스팩션 또는 트랜스덕션 26시간 경과 후 세포는 0.5%O₂, 5% CO₂, 및 잔부의 N₂를 포함하는 기체류에 의해 30분간 세척된 고립된 체임버 내에서 배양되었다. 이 고립된 체임버는 가습된 5%의 CO₂, 37°C 인큐베이터 내에 설치되었다.

세포 및 조직 내의 루시페라제 활성

[0420] PPE-1 프로모터의 정량적 활성을 인비트로 및 인비보 상태에서 실험하기 위해, 루시페라제 유전자 발현계 키트를 이용하였다(Promega Corp., Madison, WI). 트랜스팩션 또는 트랜스덕션 48 시간 경과 후 세포는 세척되었고, 200 ?l의 용해 버퍼(lysis buffer)가 15분간 침가되었다. 세포 용해물은 포집되었고, 15분간(14,000 rpm) 4°C의 온도에서 원심분리되었다. 다음에, 10?l의 부유물이 50?l의 루시페라제 실험 버퍼에 침가되었다. 활성이 조도계(Luminometer) 내에서 20초간 측정되었다.

[0421] 고형 조직 내의 루시페라제 활성을 실험하기 위해, 20mg의 샘플이 절제되고, 1ml의 균질화 용액 내에서 균질화되고, 15분간 (14,000 rpm) 4°C의 온도에서 원심분리되고, 전술한 바와 같이 10 ml의 부유물이 루시페라제 활성을 위해 실험되었다. 실험결과는 루시페라제 광의 단위/1?g 단백질로서 표시되었다. 단백질은 소 혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA)을 이용한 브래드포드 분석법(Bradford assay)을 이용하여 측정되었다.

인비트로 및 인비보에서의 GFP 활성

[0423] 인비트로 상태에서 GFP 발현을 실험하기 위해 세포는 PBS를 이용하여 2회 세척되었고, PBS 내의 4%의 파라포름알데히드 용액을 이용하여 30분간 고정되었다. 고정 후, 형광 현미경법에 의해 실험이 수행되었다.

[0424] 인비보에서 운반된 유전자의 세포 분포를 실험하기 위해, 조직은 0.1 M의 포스페이트 버퍼 내의 4%의 파라포름알데히드 용액 내에서 6시간 동안 4°C온도에서 고정되고, 4°C온도의 30%의 스크로스(sucrose) 내에 밤새 침지되었고, OCT 화합물(Sakura, USA) 내에서 냉동되었다. 조직의 블록은 크리요스타트(cryostat)에 의해 10 ?m의 두께로 절단되었고, 형광 현미경법(FITC 필터)에 의해 직접 관찰되었다.

증식 세포 및 휴지 세포

[0426] 증식 중의 BAEC 및 휴지 상태의 BAEC 내의 PPE-1 프로모터 활성을 비교하기 위해, 세포는 2 그룹으로 나누어졌다. 1. 증식중인 세포 - 10% FCS 배지 내에서 성장 및 감염. 2 휴지상태 세포 - 트랜스덕션 72시간 전에 무혈청 배지(serum free media) 내에서 성장 및 감염됨.

[0427] 모든 세포는 가습된 인큐베이터(5% CO₂, 37°C) 내에서 성장되었다.

재조합 복제 결손 아데노바이러스의 제조

[0429] 다수의 재조합 복제 결손 아데노바이러스(유형 5)가 구축되었다. 루시페라제 유전자(기원: pGL2-basic, 젠뱅크 수탁번호 X65323) 및 SV40 폴리A(polyA) 부위(기원: pGL2-basic, 젠뱅크 수탁번호 X65323)의 상류측에 위치된 쥐과동물 프리프로엔토셀린-1(preproendothelin-1; PPE-1)(배열번호:1)을 포함하는 발현 카세트는 pPAC.p1pA의 BamHI 제한 부위(프로모터가 적은 구축물)를 형성하도록 결합되었다. 상기 GFP 유전자(기원: pEGFP, 젠뱅크 수탁번호 AAB02572)는 PPE-1 프로모터의 Not I 제한부위에 결합되었다. Ad5PPE-1Luc 또는 Ad5PPE-1GFP라고 칭하는 복제 결손 재조합 아데노바이러스가 베커, T.C.(Becker, T.C.) 등에 의해 기술된 아데노바이러스 플라즈미드 pJM17를 이용하여 pPACPPE-1Luc 또는 Ad5PPE-1GFP의 공동 트랜스팩션에 의해 제조되었고(Methods Cell biol. 43, Roth M. (ed). New York. Academic Press, 1994, pp. 161-189), 다음에 재조합 비리온(virions)이 채취되었다.

[0430] 바이러스는 대규모 생산을 위해 준비되었다. 바이러스 주는 $10^9\text{--}10^{12}$ 플레이크 형성 단위(plaque-forming units)/ml (pfu/ml)의 농도로 4°C의 온도에서 보관되었다. 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus; CMV) 전초기(immediate early) 프로모터(젠햄크 수탁번호 U47119)를 포함하는 바이러스 Ad5CMV-Luc 및 Ad5CMV-GFP(Quantum biotechnologies, Carlsbad, Canada)는 PPE-1 바이러스 벡터에 대해 설명된 것과 같은 대규모 생산을 위해 준비되었고, 비조직 특이성 제어로서 사용되었다.

PPE 프로모터의 개질

[0431] 개질된 쥐과동물 PPE-1 프로모터는 43개의 염기쌍 내인성 양성 엘리먼트(-364 내지 -320 bp)의 하류측(-286bp)에 위치된 NheI 제한효소 부위 내에 부(Bu) 등(J. Biol Chem. (1997) 272(19): 32613-32622)에 의해 발견된 양성 전사 엘리먼트의 3개의 카페를 삽입하는 것에 의해 성장되었다.

[0432] 본 명세서에서 "3X"라고 부르는 인해서 단편은 쥐과동물의 PPE-1 프로모터 내에 존재하는 내인성 배열 엘리먼트의 3중 카페(배열번호:1의 뉴클레오티드 배위 407-452)이다. 혈관 내피세포 내의 PPE-1 프로모터의 유도는 이 엘리먼트의 존재에 의존한다는 것이 이전에 부(Bu) 등에 의해 입증되었다(J. Biol Chem. (1997) 272(19): 32613-32622). 상기 3X 단편은 2개의 상보적 단일 사슬의 DNA 사슬의 길이가 96개인 염기쌍을 이용하여 합성되었다(BioTechnology industries; Nes Tziona, Israel) (배열번호:2 및 3). 상기 2개의 단일 사슬의 DNA 단편은 어닐처리되고, 클레노우 단편(Klenow fragment; NEB)을 이용하여 충전되었다. 그 결과 얻어진 이중 사슬 DNA는 길이가 145개의 염기쌍이었고, Nhe-1 제한 부위(배열번호:4)를 포함하였다.

[0433] 상기 3X 단편은 T4 리가제(LIGASE)를 이용하여 쥐과동물 PPE-1 프로모터의 내인성 Nhe-1 부위의 하류측에 결합되었다. 그 결과 얻어진 구축물은 DH5 적격 세포(competent cell) 내에서 증식되었고, 대규모 플라즈미드 제조물은 맥시-프렙 퀴아진 키트(maxi-prep Qiagene kit)를 이용하여 생산되었다.

추가의 플라즈미드

야생형 PPE-1 프로모터

[0434] 1.4kb의 쥐과동물 프리프로엔도셀린-1(PPE-1) 프로모터, SV40 폴리A 신호를 가진 루시페라제 유전자(젠햄크 수탁번호 X 65323) 부위 및 쥐과동물 ET-1 유전자의 제1인트론을 포함하는 PPE-1-루시페라제 카세트(5249bp)는 하라측(Harats) 등(J. Clin. Inv. (1995) 95: 1335-1344)이 이용한 pEL8 플라즈미드(8848bp)로부터 유래된 것이다. 상기 PPE-1-루시페라제 카세트는 추출 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 1%의 아가로스 젤(agarose gel)로부터 DNA 단편을 추출한 후에 BamHI 제한 효소를 이용하여 pEL8 플라즈미드로부터 추출되었다.

프로모터-레스(promoter-less) pPAC.plpA 플라즈미드

[0435] 유형 5의 아데노바이러스의 배열을 포함하는 프로모터-레스 pPAC.plpA 플라즈미드(7594bp)는 pPACCMV.pLpA(8800bp)로부터 유래되었다. CMV 프로모터, 다중 클로닝 부위 및 SV40 폴리아데닐화(polyadenylation) 부위(1206 bp)는 NotI 제한효소에 의해 제거되었다. 단편 DNA는 1%의 아가로스 젤로부터 추출되었다. 선형의 플라즈미드(7594 bp)는 클레노우 단편에 의해 충전되었고, BamHI 링커는 급속 DNA 결합 키트를 이용하여 양 부착단에 결합되었다. 상기 선형의 플라즈미드는 T4 DNA 리가제에 의해 재결합되었고, BamH1 제한 부위를 이용하여 pPAC.plpA를 증폭시켜 주기 위해 형질변환되어 DH5a 적격 세포가 되었다. 상기 플라즈미드는 대규모 생산을 위해 제조되었고, 맥시 프렙 DNA 정제 키트(maxi prep DNA purification kit)에 의해 정제되었다.

pPACPPE-1루시페라제 플라즈미드

[0436] pPACPPE-1루시페라제 플라즈미드는 T4 DNA 리가제를 이용하여 PPE-1-루시페라제 카세트를 pPAC.plpA 플라즈미드의 BamHI 제한 부위에 삽입하는 것에 의해 구축되었다. 이 플라즈미드를 이용하여 DH5a 적격 세포를 형질변환시켰다. 상기 플라즈미드(12843bp)는 대규모 생산을 위해 제조되었고, 맥시 프렙 DNA 정제 키트에 의해 정제되었다.

[0442] *pPACPPE-1GFP* 플라즈미드

[0443] *pPACPPE-1GFP* 플라즈미드는 T4 DNA 리가제에 의해 PPE-1 프로모터의 하류측의 GFP 유전자(pEGFP로부터 유래, 젠뱅크 수탁번호 AAB02572)를 Not I 제한 부위 내에 서브클로닝하는 것에 의해 구축되었다.

[0444] 상기 플라즈미드를 이용하여 DH5a 적격 세포를 형질변환시켰다. 상기 플라즈미드(11,801 bp)는 대규모 생산을 위해 제조되었고, 맥시 프렙 DNA 정제 키트에 의해 정제되었다.

[0445] *pACPPE-13X 루시페라제* 및 *pACPPE-13X GFP* 플라즈미드

[0446] *pPACPPE-1-3X루시페라제* 및 *pPACPPE-1-3XGFP*는 Luc 또는 GFP를 포함하는 pEL8-3X (도 26B 참조)으로부터 BamHI 제한효소에 의해 분해된 PPE-1-3XLuc 또는 PPE-1-3XGFP 카세트를 pPAC.plpA 플라즈미드의 BamHI 제한 부위에 삽입하는 것에 의해 구축되었다. pEL8-3X는 2개의 NheI 부위 사이에 위치된 3중 내피세포 특이적 인핸서 3X(배열번호:7로 표시되는 것)을 포함하는 Not I과 BamHI의 사이에 위치된 개질 쥐과동물 PPE-1 프로모터(1.55kb)(적색)를 포함한다. 상기 프로모터, 루시페라제 또는 GFP 유전자, SV40 폴리A 부위 및 엔도셀린-1 유전자의 제1인트론은 모두 PPE-1 개질 프로모터 카세트라고 칭하는 것으로서, 상기 물질 및 방법판에 기술된 바와 같이 BamHI 제한효소에 의해 분해 및 추출되었다. 상기 플라즈미드(12843bp)는 대규모 생산을 위해 제조되었고, 맥시 프렙 DNA 정제 키트에 의해 정제되었다.

[0447] SV40-루시페라제 레포터 플라즈미드(Promega GmbH, Manheim, Germany)는 BAEC 실험에서 비선택성 프로모터 대조로서 이용되었다.

[0448] **인비트로 실험, DNA 트랜스డ션** - 세포는 24개 또는 96개의 웰 디시(well dish)에 플레이팅된 후 24시간 경과시 트랜스డ션되었다. 샘플 웰 내의 서브컨풀루언트 세포(Subconfluent cells)의 수가 계수되었다. 다음에, 각 웰로부터 성장배지(growth media)가 흡인되었고, 지시된 감염다중도(m.o.i.)에서 지시된 바이러스 벡터가 감염 배지(infection media)(DMEM 또는 RPMI 1640, 2% FBS) 내에 희석되었고, 모노레이어(monolayer)에 첨가되었다. 세포는 실온에서 4시간 동안 배양되었다. 다음에, 전체 배지가 첨가된 후 세포는 37°C의 온도 및 5%의 CO₂에서 72시간 동안 배양되었다.

[0449] 동물

[0450] 모든 동물 실험은 쉬바 의료센터(Sheba Medical Center, Tel-Hashomer)의 동물 보호 및 사용 위원회의 승인을 받았다.

[0451] 상이한 마우스주가 사용되었다:

[0452] (i) 수컷, 3 개월령, 야생형 C57BL/6 마우스(Harlan farms, Jerusalem, Israel).

[0453] (ii) 수컷, 3 개월령, BALB/C 마우스(Harlan farms, Jerusalem, Israel).

[0454] (iii) 수컷 및 암컷, 6 개월령, C57BL/6xSJ129 마우스의 ApoE 유전자 결핍 마우스 교배종(Plump AS. et al. Cell (1991) 71:343-353).

[0455] (iv) 수컷 및 암컷, 3 개월령, 하라츠(Harats) 등(J. Clin. Inv. (1995) 95: 1335-1344)이 생산한 쥐과동물 PPE-1 프로모터(5.9kb)의 제어 하의 루시페라제 유전자의 과발현 마우스.

[0456] 모든 마우스는 리피즈 앤드 애써로우스클로시스 연구소(Lipids and Atherosclerosis Research Institute)에서 육성되었다.

[0457] 정상 마우스의 조직 유전자 발현

[0458] 효율 및 조직 특이성을 분석하기 위해, 10¹⁰ pfu/ml 농도의 Ad5PPE1Luc 또는 Ad5CMVLuc(비조직 특이성 대조군)이

100 ?1의 생리식염수 내에 혼탁된 후, 전술한 바와 같이 마우스의 꼬리 정맥 내에 주입되었다. 루시페라제 활성은 주입 후 1, 5, 14, 30 및 90일 경과시에 분석되었다. 발현된 레포터 유전자의 세포 분포를 특정 (localize)하기 위해, Ad5PPE-1GFP 또는 Ad5CMVGFP(100 μ l의 생리식염수 내의 10^{10} pfu/ml의 농도)가 3 개월령, 수컷 C57BL/6 마우스의 꼬리 정맥 내에 주입되었다. 주입 후 5일 경과시 GFP 발현이 검출되었다. 모든 마우스는 외관이 건강하였고, 간장 또는 기타 조직 내에서 독성 또는 감염이 발생하지 않았다.

[0459] 조직 내의 GFP 활성

[0460] 인비보 상태에서 운반된 유전자의 세포 분포를 실험하기 위해, 주입된 마우스의 조직 샘플을 새로 제조된 4% 파라포름알데히드가 용해된 0.1 M의 인산 완충액 내에 4°C의 온도에서 6시간 동안 고정화시킨 후, 4°C 온도의 30% 스크로스 내에서 밤새 침지되고, OCT 화합물(Sakura, California, USA) 내에서 냉동되었다. 조직 블록은 10 mm 의 두께의 박편으로 절단되고, 형광 현미경 검사법(FITC 필터)에 의해 직접 관찰되었다.

[0461] 종양 이식

[0462] 트리프신/EDTA를 이용하여 루이스 폐암세포(LLC)가 채취되고, PBS를 이용하여 3회 세척되고, 그 생존능력의 평가를 위해 0.1%의 트리판 블루(trypan blue)(Biological industries, Beit-Haemek, Israel)를 이용하여 계수되었다. 마우스 내의 종양 혈관신생의 PPE-1 프로모터 활성의 활성수준을 평가하기 위해 2개의 상이한 종양 모델이 사용되었다.

[0463] 프라이머리 종양 모델에서, 세포(100 ?1의 생리식염수 내에 1×10^6 세포/ml의 농도)는 마우스의 등의 피하에 주사되었다(n=17). 주입 후 21일 경과시 Ad5PPE-1, Ad5PPE-1GFP, Ad5CMV, 또는 Ad5CMVGFP(10^{10} pfu/ml의 농도)가 종양 내(IT) 또는 정맥 내에 주입되었고, 전술한 바와 같이 그 활성이 검출되었다.

[0464] 전이 종양 모델에서, 세포(50 ?1의 생리식염수 내에 5×10^5 cells/ml)는 마우스 발바닥에 주입되었다(n=12). 상기 종양의 직경이 0.7 mm에 도달했을 때, (프라이머리 종양을 가진) 발바닥이 마취상태 및 살균상태 하에서 절제되었다. 절제 후 14일 경과시 바이러스(Ad5PPE-1, Ad5PPE-1GFP, Ad5CMVLuc 또는 Ad5CMVGFP)가 마우스 꼬리 정맥에 주입되었다.

[0465] 양자 종양 실험 모델에서 마우스들은 바이러스 주입 후 5일 경과시 희생되었고, 조직이 절제된 후 루시페라제 또는 GFP 활성이 시험되었다.

[0466] 창상 치유 모델

[0467] 수컷, 3 개월령의 C57BL/6 마우스가 소디움 펜토바비탈(6 mg/kg)의 피하주사에 의해 마취되었다. 마우스의 등이 면도되고, 5 cm의 직선 절개부가 형성되었다. 이 절개부는 4/0 살균 실크사에 의해 즉시 봉합되었다. 치유 중인 창상 내의 혈관신생이 H&E 및 항 폰-빌레브란트 항체(anti von-Willebrand antibody) 면역조직화학 염색법에 의해 2일 간격으로 측정되었다.

[0468] 절개 후 10일 경과시 10^{10} pfu/ml 농도의 Ad5PPE-1Luc 또는 Ad5CMVLuc이 꼬리 정맥에 전신 주입(systemically injected)되었다. 주입 후 5일 경과시, 마우스는 희생되었고, 상기 절개부의 피부 내의 루시페라제 활성 및 대조로서 정상의 반대측 양부분 내의 루시페라제 활성이 분석되었다.

[0469] 조직학적 검사 - 종양 및 전이성 종양 내의 혈관신생의 범위를 평가하기 위해, 조직은 5 μ m의 단편으로 절단되고, 헤마토키실린 및 에오신(Haematoxylin and Eosin; H&E)을 이용하여 염색되었다. 항CD31(rat anti mouse CD31 monoclonal Ab. Pharminogen, NJ, USA) 항체가 종양 모델 내의 신혈관형성의 분석을 위해 사용되었다.

[0470] VEGF 및 PDGF-B 도입유전자 발현을 위한 플라즈미드 및 아데노바이러스 벡터 - 재조합 복제 결손성 아데노바이러스 혈청형 5가 바르다-블룸, N.(Varda-Bloom, N.) 등[Tissue-specific gene therapy directed to tumor

angiogenesis. (2001) *Gene Ther* 8, 819-27]에 의해 기술된 바와 같이 구축되었다. 즉, pACCMV.pLpA 플라즈미드는 쥐과동물 VEGF₁₆₅(젠햄크 수탁번호 M95200) 또는 쥐 PDGF-B(젠햄크 수탁번호 AF162784)의 Cdna를 포함하도록 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus; CMV) 전초기 프로모터의 제어 하에서 개질되었다. CMV 프로모터가 개질된 쥐과동물 프리프로엔토셀린-1(PPE-1-3X) 프로모터에 의해 치환된 pACPPE-1-3X 플라즈미드가 동일 cDNA 배열에 의해 구축되었다. 각 플라즈미드는 pJM17 플라즈미드와 함께 HEK293 세포 내에 트랙스펙션되어 다양한 재조합 아데노바이러스를 생성하였다. 이들 바이러스는 HEK293 세포 내에서 증식되었고, 10¹⁰ PFUs/ml의 농도로 감소되었다. 유사한 방법으로 대조 벡터가 생성되었다.

[0471]

후지 허혈증 마우스 모델 및 유전자 치료법 - 최소 12주령의 수컷 및 암컷의 C57B16 마우스(Harlan Laboratories Ltd., Israel)가 쉬바 의료센터의 동물 보호 및 이용 위원회의 지침에 따라 유지되었다. 후지 허혈증은 전술한 프로토콜[Couffinhal, T. et al. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 152, 1667-79. (1998)]에 기초하여 유발되었다. 즉, 동물이 펜토바비탈 소디움(40 mg/kg, IP)로 마취되었다. 후지를 면도한 후, 복제정맥(saphenous arteries)과 슬와정맥(popliteal arteries)의 분기부의 인접부의 대퇴부 대동맥이 결찰되었다. 결찰 후 5일 경과시, 10⁹ PFU 농도의 다양한 아데노바이러스가 정맥 투여되었다.

[0472]

초음파 활상법 - 결찰 후 7일 간격으로 시너지 초음파 장치(Synergy ultrasound system)(General Electric, USA)를 이용하여 7.5 MHz의 혈관조영 모드(angiographic mode)에서 초음파 활상법이 실시되었다. 동물은 의식이 있는 상태였고, 구속된 상태에서 활상되었다. 동물은 최대 90일간 종래의 조건 하에서 수용되었다.

[0473]

면역조직화학법 - 희생된 허혈증 마우스의 후지 및 간장 조직으로부터 채취한 골격근이 OCT 화합물에 내에서 냉동된 후 저온절단되었다. 내피세포는 쥐의 단클론(monoclonal) 항-CD31 항체(PharMingen, San Diego, CA)를 이용하여 면역염색되었다. 평활근 세포는 마우스 다클론(polygonal) 항-α-SMactin 항체(SIGMA, St. Louis, MO)를 이용하여 면역염색되었다. 배경은 해마톡실린(hematoxylin)으로 염색되었다.

[0474]

인시츄 하이브리다이제이션(*In-situ hybridization*) - 5 μm의 골격근 단편이 허혈증 동물의 양 후지로부터 채취되었다. VEGF₁₆₅ 또는 PDGF-B에 대한 센스 또는 안티센스 DIG-표지된 프로브를 이용한 인시츄 하이브리다이제이션이 수행되었고, 디그옥시게닌(digoxigenin; DIG)이 항-DIG-AP 결합체(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)에 의해 검출되었다. 배경은 메틸 그린으로 염색되었다.

[0475]

화상 처리 - 초음파 화상들은 이미지 프로 플러스 소프트웨어 툴(Image-Pro Plus software tools)(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)을 이용하여 처리되었다. 각 화상에 대해 최대 관류를 표시하는 착색 화소(colored pixels)의 수가 계수되었다.

[0476]

혈관신생 조절제(*Modulators*) - 유전자도입된 마우스는 정상 사료 또는 듀얼 ET-1_{A/B} 수용체 길항제인 보센탄(Bosentan)(Actelion Ltd., Allschwil, Switzerland)을 보충한 사료를 먹였다. 한 마리가 하루 4 g을 먹는 것을 가정하여, 각 마우스는 체중 1kg 당 100 mg의 보센탄이 투여되었다. 동물이 희생된 후 루시페라제 활성, 폐 ET-1 mRNA 수준 및 irET-1 혈청 수준이 측정되었다.

[0477]

통계 분석

[0478]

t-테스트 ANOVA 또는 만-휘트니 랭크 테스트(Mann-Whitney Rank test)를 이용하여 그룹간의 차이점이 통계적으로 분석되었다. 데이터는 평균±표준오차(SE)로서 나타내었다.

[0479] 실험 결과

[0480] 실시예 1

내피세포(BAEC) 및 293 세포 내의 프로-아폽토시스 유전자 활성의 인비트로 분석

[0481] 암의 치료에서, 혈관신생 저항 요법(anti-angiogenic therapy)은 성장하는 종양에 자양분을 공급하는 혈관계의 발달을 표적으로 한다[Folkman J. N Engl J Med (1995) 333(26):1757-63]. 아폽토시스 또는 프로그램 세포사의 연구가 진행됨에 따라, 선택적 및 효과적 세포사 조절제를 코드하는 수많은 유전자가 동정되었다[Strasser et al. Annu Rev Biochem (2000) 69:217-45.].

[0482] 본 실험은 혈관신생 저항 요법에 가장 적합한 제제를 동정하기 위해 다수의 프로-아폽토시스 유전자를 스크리닝(screen)하였다.

[0483] MORT1 (FADD - Fas 관련 사 도메인 단백질(Fas associated death domain protein), 젠뱅크 수탁번호 NM_003824), RIP (수용체-상호작용-단백질(receptor-interacting-protein), 젠뱅크 수탁번호 U25995), CASH (c-FLIP, 젠뱅크 수탁번호 AF010127), MACH (카스파제 8(caspase 8), 젠뱅크 수탁번호 X98172), CPP32 (카스파제 3, 젠뱅크 수탁번호 U13737), 카스파제 9 (U60521) 및 Fas-키메라(Fas-c)를 포함하는 다수의 프로-아폽토시스 유전자(2개의 사 수용체(death receptors)의 전술한 융합)가 TNFR1의 세포외 영역으로부터 구축되었고, Fas의 막투과 영역 및 세포내 영역[Boldin MP et al. J Biol Chem (1995) 270(14):7795-8, 도 1a 참조]은 종래기술의 공지의 클로닝 기법을 이용하여 PCR 증식 및 pcDNA3(Invitrogen, Inc.) 포유동물 발현 벡터 내에 클로닝되었다.

[0484] 이들 프로-아폽토시스 유전자 구축물은 BAEC(소 대동맥혈관 내피세포) 및 비내피세포 대조(non-endothelial control) 세포로서 사용된 293 세포 내의 pGFP와 공동으로 발현되었다. 트랜스펙션 후 24시간 경과시, 세포들은 형광 현미경법을 이용하여 분석되었다. 아폽토시스 세포는 형광 현미경법(도 2a 및 도 2b 참조)을 이용하여 전형적인 형태(즉, 소형이고, 등그런 형상)에 기초하여 동정되었다. 아폽토시스 표현형의 추가의 평가는 전자 현미경을 이용하여 수행되었다(도 3a 내지 도 3f 참조). 아폽토시스 효과의 정량화에 의해 MORT1, TNFR1 및 Fas-키메라는 BAEC 및 293 세포 내에서 높은 아폽토시스 활성을 유발한다는 것이 입증되었다(도 4a 및 도 4b 참조). 카스파제 3 및 9는 작용력이 약했다. 그 이유는 이들 카스파제가 비활성인 효소전구체(zymogen)의 형태이기 때문일 것으로 보인다. 이를 결과에 기초하여, 혈관신생저항 요법에 사용될 아데노바이러스 벡터의 발생을 위해 Fas-키메라(Fas-c) 유전자가 선택되었다.

[0485] 실시예 2

개질 PPE-1 프로모터(PPE-1(3x))의 제어 하에서 Fas-키메라를 코드하는 재조합 아데노바이러스의 생산

[0486] 전체 길이의 Fas-키메라를 코드하는 cDNA는 개질 프리-프로엔도셀린1 프로모터(도 1b 참조)를 포함하는 플라즈미드 pPACPPE1-3x 내에 서브클로닝(subclone)되었다. 재조합 아데노바이러스는 이 플라즈미드 및 pJM17 플라즈미드를 인간 태아 신장 293 세포 내에 공동 트랜스펙션(co-transfection)하는 것에 의해 생산되었다. PCR 증식법(도 5a 참조)에 의해 성공적인 바이러스의 클로닝이 검증되었다.

[0487] 표적 세포 내의 Fas-c의 발현을 측정하기 위해, BAEC 내피세포는 Ad-PPE-1(3x)-Fas-c의 지시된 적정농도(titer)로 트랜스펙션 되었다. 트랜스펙션 후 72시간 경과시 세포는 용해되었고, 세포 단백질은 비활성 SDS-PAGE 겔을 이용하여 용해되었다. 항-TNFR1 항체(Sc-7895, Santa-Cruz Biotech)를 이용하여 웨스턴 블로트 분석(Western blot analysis)이 수행되었다. 도 5b에서 입증되는 바와 같이, 45Kd에서 이동하는 현저한 밴드가 명백히 나타났고, 그 발현은 투여량 의존성(dose-dependent)을 가졌다. 이것은 키메라 단백질의 정확한 폴딩(folding) 및 발현을 시사하는 것이다. 반면, 비트랜스펙션된 내피세포 및 대조군인 공 바이러스벡터(empty viral vector)로 트랜스펙션된 세포 내에는 대응하는 밴드가 나타나지 않았다. 따라서, 이들 결과로부터 Fas-c의 아데노바이러스 매개 유전자 도입은 표적 세포 내의 도입유전자 발현을 유발한다는 것이 확인되었다.

[0488] 실시예 3

[0491] *Ad-PPE-1(3x)-Fas-c* 발현은 내피세포 내의 아폽토시스를 유발한다

[0492] 내피세포의 아폽토시스를 유발하는 *Ad-PPE-1(3x)-Fas* 키메라의 능력이 측정되었다. 도 6a 및 도 6b에 도시되어 있는 바와 같이, 프리-프로엔토셀린 지향된 마데노바이러스 매개의 내피세포의 트랜스덕션의 결과 분명한 대량 세포사가 유발되었고; *Ad-PPE-1(3x)-Fas-c* (10^3 MOI)에 의해 감염된 HUVEC 및 BAEC는 had morphological features of adherent cells undergoing apoptosis including 세포막 블레bbing(blebbing), 라우딩(rounding) 및 수축(shrinking)을 포함하는 아폽토시스 및 배양 접시로부터의 탈락을 유발하는 부착세포의 형태적 특성을 구비하였다. 반면, 동일한 MOI의 대조 바이러스에 의해 감염된 세포는 정상적인 외형 및 성장율을 유지하였다. 100 MOI로 트랜스덕션된 세포는 최소의 세포사만을 나타냈다(데이터 없음).

[0493] *Ad-PPE-1(3x)-Fas-c*의 세포독성에 대한 추가의 평가는 PPE-1 프로모터의 제어 하에서 레포터 유전자 GFP를 발현하는 세포 내에 상기 바이러스를 발현시키는 것에 의해 수행되었다. 도 6c 및 도 6d에서 알 수 있는 바와 같이, 대부분의 트랜스덕션된 세포는 트랜스덕션 후 72시간 경과시 전형적인 아폽토시스 외관을 갖게 되는데 비해, 대조 바이러스 및 *Ad-PPE-GFP*에 의해 트랜스덕션된 세포는 정상적인 외관을 나타냈다.

[0494] *Fas-c*의 세포독성 효과는 크리스털 바이올렛 염색법을 이용하여 정량화되었다. 도 7에 도시된 바와 같이, *Ad-PPE-Fas-c*에 의한 BAEC 및 HUVEC의 감염의 결과 각각 57% 및 65%의 사망률이 얻어졌고, 대조용 바이러스는 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았다.

[0495] 프로-아폽토시스 벡터 *Ad-PPE-Fas-c*의 내피세포 특이성은 이 벡터로 NSF (normal skin fibroblasts; 정상 피부 섬유아세포)를 감염시키는 것에 의해 입증되었다. 낮은 수준의 PPE-1[Varda-Bloom, N. et al. Gene Ther 8, 819-27. (2001)]을 발현하는 상기 세포들은 *Ad-PPE-Fas-c*에 의한 감염에 영향을 받지 않았다. 반면, 재조합 벡터인 *Ad-CMV-Fas-c*는 이들 세포 내에 아폽토시스를 유발하였다.

실시예 4

[0497] *Ad-PPE-1(3x)-Fas-c receptor* 및 *TNF α* 리간드의 동시투여는 프로-아폽토시스 효과를 선택적인 방식으로 증대한다.

[0498] *Fas-c* 발현 세포 내의 아폽토시스 효과를 증대하는 *TNF α*의 성능이 조사되었다. 인간 *TNF α*는 *Ad-PPE-Fas-c*(100 MOI)에 의한 바이러스 감염 후 48시간 경과 된 내피세포 배지에 첨가되었다. 24시간 경과 후 세포의 생존능력이 분석되었다. 도 8에 도시된 바와 같이, *TNF α*(10ng/ml)는 *Ad-PPE-1(3x)-Fas-c* 감염된 세포의 생존능력을 73% 감소시켰고, 반면 *TNF α* 단독 또는 대조 바이러스(*Ad-Luc*)에 의해 감염된 세포에서는 심각한 사망률이 발생되지 않았다.

[0499] *TNF α*의 효과를 입증하기 위해, 세포 특이성이 조사되었다. NSF(정상 피부 섬유아세포), DA3(마우스 유선암), D122 (루이스 폐암) 및 B16 흑색종 세포가 *Ad-PPE-Fas-c* 또는 대조 바이러스에 의해 감염되었다. 48시간 후, 배지에 *TNF α*가 첨가되었고, 크리스털 바이올렛 염색 후 세포의 형태가 평가되었다. 도 9a 내지 도 9e에 도시된 바와 같이, *Ad-PPE-Fas-c*에 의해 감염된 비내피세포는 정상적인 외형을 나타내었고, *TNF α*에 의해 영향을 받지 않았다. 반면, *Fas-c*에 의한 BAEC의 아데노바이러스 매개 감염은 *TNF α*가 첨가되었을 때 세포의 생존능력에 뚜렷한 감소를 가져왔다. CMV 프로모터에 의해 구동된 *Fas-c*의 비선택적 아폽토시스 활성을 내피세포에 미치는 *Ad-CMV-Fas-c*의 *TNF α*-의존성 아폽토시스 효과를 보여주는 도 10a에 도시되어 있다. 지시된 MOI의 *Ad-CMV-Fas-c* 키메라로 감염된 세포의 생존능력은 *TNF α*에 의한 감염 후에 측정되었다.

[0500] 특히, 비내피세포 특이적 벡터인 *Ad-CMV-Fas-c*는 내피세포 및 비내피세포의 양 세포의 *TNF α*-의존성 아폽토시스를 유발한다(도 10b 내지 도 10d 참조).

실시예 5

[0502] *Ad-PPE-1(3x)-Fas-c*는 마우스의 B16 흑색종(melanoma)의 인비보 성장 저연을 유발한다.

[0503] B16 흑색종 마우스 모델은 PPE1-3x 프로모터로부터 발현된 *Fas-c*의 항종양 효과를 실험하기 위해 사용되었다. B16 흑색종 세포(8×10^5)는 40 마리의 C57b1/6 마우스의 측복부에 피하주사되었다. 종양이 촉진 가능한 크기일 때(~5x5 mm), 마우스들은 다음과 같은 4개의 군으로 무작위 분류되었다: (i) 대조군- 생리식염수 주입; (ii)

대조 바이러스(PPE 프로모터에 의해 제어되는 루시페라제를 포함하는 아데노 바이러스); (iii) 프리프로엔토셀린(PPE) 프로모터에 의해 제어되는 Fas-TNF 수용체 키메라 유전자를 포함하는 Ad-PPE1-3x-Fas-c-바이러스; 및 (iv) 비내피세포 특이적 CMV 프로모터에 의해 제어되는 Fas-TNF 수용체 키메라 유전자를 포함하는 Ad-CMV-Fas-c-바이러스.

[0504] 종양의 크기(길이 및 폭)는 핸드 캘리퍼를 이용하여 측정되었다. 도 11a에 도시된 바와 같이, Ad-PPE1-3x-Fas-c 또는 Ad-CMV-Fas-c로 처리된 마우스의 종양의 크기는 대조 마우스에 비해 작았다. 처리기간 말기의 종양의 종량도 Ad-PPE1-3x-Fas-c 처리된 마우스의 것이 더 작았다(도 11b 참조). Ad-PPE1-3x-Fas-c가 주입된 마우스는 뚜렷한 종양 피사를 보였다(도 11c 참조).

[0505] **전이성 질환의 예제: 루이스 폐암 모델:** 전이성 루이스 폐암 모델을 이용하여 PPE-1(3x)-Fas-c 키메라에 의한 발현 특이성 및 종양 성장 억제 효능이 실험되었다. 폐 LLC 전이는 후에 상술된 바와 같이 수컷 C57BL/6J 내에 유발되었다. 마우스들에는 9일 간격으로 바이러스 벡터 AdPPE-1(3x) LUC, AdPPE-1(3x)-Fas-c, 및 AdCMV-Fas-c를 2회씩 주입해 주었다(Greenberger et al, J Clin Invest 2004;113:1017-1024).

[0506] 바이러스 투여 후 6일 경과시 마우스로부터 기관이 채취되었고, PCR법에 의해 Fas-c 발현이 분석되었다. PPE-1(3x)에 의한 Fas-c의 전사 제어에 의해 종양을 가지는 폐에 대해서만 발현이 유도되었고(결과는 표시되지 아니함), 이에 의해 CMV-Fas-c-처리된 마우스 내에서는 Fas-c 발현이 광범위하게 분포되었다(데이터 없음. 참조, Greenberger et al, J Clin Invest 2004;113:1017-1024).

[0507] 또, 처리된 그룹 및 대조 그룹의 폐에 대한 종체적인 병리학적 조사 결과 전이성 종양을 가지는 마우스에 AdPPE-1(3x)-Fas-c를 투여하면 종양의 성장이 억제되고, 폐의 표면상에서 성장 중인 종양의 크기가 줄어든다는 것이 밝혀졌다. 반면, 대조 그룹의 폐는 거의 전부가 종양 조직에 의해 치환되었다(데이터 없음. 참조, Greenberger et al, J Clin Invest 2004;113:1017-1024).

[0508] 또, 처리된 마우스와 대조 마우스의 폐 절편의 조직병리학적 조사, TUNEL, 및 내피세포 특이적 CD31 염색법에 의한 조사 결과 전이성 종양을 가지는 마우스에 AdPPE-1(3x)-Fas-c를 투여하면 종양 내에서 대량 아폽토시스 및 피사가 유발되고, 종양 혈관 내피세포가 광범위하게 손상된다는 것이 밝혀졌다. 이에 의해, 대조 처리된 마우스의 혈관은 영향을 받지 않았다(데이터 없음. 참조, Greenberger et al, J Clin Invest 2004;113:1017-1024).

실시예 6

인비트로에서 3X-PPE-1 플라즈미드 활성의 분석

[0511] PPE-1-3X의 활성을 분석하기 위해, PPE-1-3X 프로모터 플라즈미드 및 비개질 PPE-1 프로모터 플라즈미드 내의 레포더 유전자 발현이 비교되었다. PPE-1-3X 단편이나 비개질 PPE-1 단편을 포함하는 레포터 유전자 플라즈미드 및 레포터 유전자 루시페라제는 내피세포주 및 비내피세포주 뿐 아니라 PPE-1 프로모터를 발현하는 기도 내피세포주(B2B)(전술한 물질 및 방법판 참조) 내에 트랜스펙션되었다. B2B 세포주는 비내피세포주 내에서 PPE-1 프로모터에 의해 3X 엘리먼트의 발현을 감소하는 능력의 지표로서 선택되었다. 트랜스펙션은 리포렉타민(lipofectamine)(Promega Corp., Madison, WI)을 이용하여 달성되었다. β -갈-네오 플라즈미드(β -gal-neo plasmid)는 허용되는 분자 생물학 실무에 따라 각 경우의 트랜스펙션 효율의 지표로서 사용되었다.

[0512] 트랜스펙션 후 48시간 경과시, 용해 완충액(lysis buffer)(Promega Corp., Madison, WI)을 이용하여 세포가 채취되었고, 루미노미터(luminometer)(TD-20e - Turner Designs, Sunnyvale, California)를 이용하여 루시페라제의 활성이 분석되었다. 또, 상이한 형질전환 효율의 표준화를 위해 β -갈 활성이 분석되었다. 결과는 도 12 및 표 2에 요약되어 있다. PPE-3X 제어 하의 루시페라제 활성은 비개질 PPE-1의 제어 하의 루시페라제 활성보다 15-20배 높다. 비내피세포주 내의 최소 발현은 PPE-1 및 PPE-1-3X의 양자를 이용하여 검출되었다. 이것은 인비보 상태에서 유전자를 내피세포에 특이적으로 운반하기 위한 유망한 후보물질이라는 것을 입증해 준다.

표 2 - PPE-1 및 PPE-1-3X 루시페라제 구축물로 트랜스펙션된 세포 내의 루시페라제 활성

플라즈미드	내피세포주 내의 루시페라제 활성	비내피세포주
	HUVEC	BAEC

<i>PPE-1</i>	135.12	1121.3	0.73
<i>PPE-1-3X</i>	768	18331.7	0.32

실시예 7**인비트로에서 *Ad5PPE-1*/루시페라제의 활성 및 특이성**

PPE-1/루시페라제, *PPE-1-3X*/루시페라제, *PPE-1/GFP* 및 *PPE-1-3X/GFP*는 Ad5 플라즈미드 내에 결합되어 *Ad5PPE-1/Luc* 및 *Ad5PPE-1-3X/Luc*, *Ad5PPE-1/GFP* 및 *Ad5PPE-1-3X/GFP*를 생산하였다(Varda-Bloom et al., (2001) Gene therapy 8:819-827). 이들 구축물은 후술되는 바와 같이 독립적으로 분석되었다.

*Ad5PPE-1/Luc*의 활성을 시험하기 위해, B2B(인간 기도 상피세포), BAEC (소 대동맥혈관 내피세포) 및 HUVEC (인간 제대정맥 내피세포)의 트랜스펙션이 수행되었다. 엔도셀린 유전자를 발현하는 이를 3가지 세포주는 내피세포 내의 시험된 구축물의 발현 수준을 나타내는 지표로서 선택되었다. 엔도셀린을 발현하지 않는 RIN(쥐 인슐로마(Rat Insulinoma)) 세포주는 음성 대조군으로서 이용되었고, 동일한 구축물로 트랜스펙션되었다. *Ad5CMVLuc*(CMV 프로모터 제어 하의 루시페라제)는 모든 세포주에서의 비내피세포 특이적 대조로서 사용되었다.

도 13은 높은 루시페라제 발현은 CMV 프로모터보다 *PPE-1* 프로모터를 가지는 내피세포 BAEC 및 HUVEC 세포주 내에서 달성된다는 것을 명확하게 보여준다. 내피세포 기원이 아닌 RIN 세포에서 CMV 프로모터는 *PPE-1* 프로모터에 비해 더 높은 루시페라제 활성을 발생한다. 이 결과는 비개질 *PPE-1* 프로모터의 내피세포 특이성을 입증하는 것이다.

실시예 8***Ad5PPE-3XLuc* 및 *Ad5PPE-3XGFP*의 활성 및 특이성**

특이성 및 발현 수준에 미치는 3X 엘리먼트의 영향을 확인하기 위해 전술한 실시예 7에 기술된 세포주를 *Ad5PPE-3X/Luciferase* 및 *Ad5PPE-3X/GFP* 구축물로 트랜스펙션하였다. 실시예 7과 같이, *Ad5CMVLuc*은 비내시페소 특이적 대조로서 사용되었다. BAEC 및 HUVEC 세포주 내의 높은 루시페라제 발현은 CMV 프로모터에 비해 *PPE-3X* 프로모터의 제어 하에서 검출되었다.

도 14A는 BAEC 세포주 내의 *Ad5PPE-1-3X* 제어 하의 GFP 발현을 도시한 현미경사진이다. 도 14B는 BAEC 세포주 내의 *Ad5CMV*의 GFP 발현을 보여주는 현미경사진이다. 이를 현미경사진으로부터 명확하게 볼 수 있는 바와 같이, *PPE-1-3X* 프로모터는 내피세포에서 더욱 활성이 높다. 이들 결과는 3X 엘리먼트는 *PPE-1* 프로모터의 내피세포 특이성을 손상시키기 않는다는 것을 명확히 나타낸다. 세포 배양물 내의 *PPE-1* 프로모터 및 *PPE-1-3X* 프로모터의 상대적인 활성을 후술하는 실시예 11에 제시되어 있다.

실시예 9***p55* 유전자의 프로-아폽토시스 활성의 인비트로 분석**

PACPPE3X(*PPE-1-3X* 프로모터 포함) 및 PACCMV 내로의 P55 (TNFR1, 젠뱅크 수탁번호 M75866)의 서브 클로닝 후, 이를 플라즈미드 및 GFP(pEGFP-C1 벡터; CLONTECH, Palo Alto, CA)의 공동 트랜스펙션이 전술한 바와 같이 수행되었다. 즉, 상기 유전자는 (루시페라제 유전자 대신) *PPE-1* 프로모터의 하류측에 서브클론되어 T4 DNA 리가제에 의해 NotI 제한 부위내에 도입되고, DH5a 적격세포(competent cells)로 형질전환된다. 트랜스펙션 후 24시간 경과시, 소형의 둥근 아폽토시스 세포들이 정상 세포와 육안으로 구별될 수 있었다. 프로-아폽토시스 플라즈미드에 의해 트랜스펙션된 세포의 전자현미경사진은 전형적인 아폽토시스의 외형을 보임으로써 육안검사 결과를 확인시켜주었다.

PPE-1-3X 프로모터의 제어 하에서, 내피세포 내의 아폽토시스는 p55 단독에 의해서만 유도되었고(도 15), 반면 CMV 프로모터는 어떤 세포 특이적 활성도 보이지 않았다. *PPE-1-3X*의 제어 하의 루시페라제는 실험된 어떤 세포주 내에서도 아폽토시스를 유발하지 않았다. 이 결과는 *PPE-1-3X* 프로모터를 사용하면 내피세포에 특이적인 아폽토시스를 유발할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0528]

실시예 10

[0529]

하이포시아 반응성 엘리먼트(HRE)는 하이포시아 반응성 내피세포 내의 표적 유전자 발현을 강화시킬 수 있다.

[0530]

하이포시아(Hypoxia)는 혈관 색조(tone) 및 구조의 중요한 조절인자(regulator)이다. 하이포시아는 또 (허혈성 심장질환 및 암의 양자에서)(Semenza, G.L. et al. (2000) *Adv Exp Med Biol.*; 475:123-30; Williams, K.J. (2001) *Breast Cancer Res.* 2001; 3:328-31 and Shimo, T. (2001) *Cancer Lett.* 174:57-64) 혈관신생의 강력한 자극이라는 것이 입증되었다. 또, 하이포시아는 에리트로포이에틴(erythropoietin), VEGF, 당분해 효소 및 ET-1를 포함하는 많은 유전자의 발현을 조절하는 것으로 보고되었다. 이들 유전자는 공통의 산소-감지 경로(oxygen-sensing pathway)인 하이포시아 유도 인자-1(hypoxia inducible factor-1; HIF-1)라고 부르는 유도 전사 복합체에 의해 제어된다. 상기 HIF-1 복합체는 표적 유전자의 cis 작용 하이포시아 반응성 엘리먼트(HRE)를 결합하는 것에 의해 하이포시아에 대한 전사적 반응을 매개한다. 상기 HRE은 신타제(Syntase)-2, 에리트로포이에틴 및 기타(엔토셀린-1, ET-1을 포함)의 물질을 포함하는 하이포시아에 응답하는 소수의 유전자의 프로모터 내에 위치하는 보존 배열(conserved sequence)이다. 상기 ET-1 프로모터는 전사개시 부위의 상류측의 -118 bp의 위치에 존재하는 역전된 하이포시아 반응성 엘리먼트를 포함하고, 이 엘리먼트는 7개의 염기쌍을 포함하고, GATA-2 와 AP1 부위의 사이에 위치해 있다(5' GCACGTT 3' - 50개의 염기쌍(배열번호:5)).

[0531]

프리프로엔토셀린-1(PPE-1) 프로모터는 종양 또는 허혈성 조직의 미세환경 내에서 발현의 가능성을 가짐으로써 "종양 조직 특이성" 및/또는 "허혈 조직 특이성"을 가지도록 하는 하이포시아 반응성 엘리먼트(HRE)를 포함한다. 이 HRE의 실제 기능을 평가하기 위해, 루시페라제 또는 GFP 레포터 유전자와 병용되어 아데노바이러스 벡터의 의해 운반되는 PPE-1 프로모터 및 PPE-1-3X 프로모터의 분석이 수행되었다.

[0532]

노르목시아(normoxic) 조건 및 하이포시아 조건(0.5%의 O₂에서 16 시간) 하의 BAEC 세포에서 PPE-1 프로모터 또는 PPE-1-3X 프로모터의 제어 하의 루시페라제 활성이 비교되었다. PPE-1 프로모터 제어 하의 루시페라제 활성은 하이포시아에 노출되었을 때에 비해 5배 높았다(도 16 및 도 17 참조). 또, PPE-1-3X 프로모터의 제어 하의 루시페라제 활성은 하이포시아 조건 하의 것에 비해 2.5배 높았다. 요약하면, 3X 엘리먼트를 PPE-1 프로모터 내에 도입하면, PPE-1-3X 유전자의 노르목시아 발현 수준(normoxic levels of expression)이 비개질된 PPE-1 프로모터에서 관찰되는 것에 비해 높은 경우에도, 하이포시아에 반응하는 하류측 유전자의 발현 수준을 증대시킬 수 있다

[0533]

실시예 11

[0534]

내피세포주 내에서의 PPE-1-3X 및 PPE-1 프로모터 활성의 추가적 평가

[0535]

도 18은 pPPE-1/루시페라제 및 pPPE-1-3X/루시페라제를 이용한 B2B, HUVEC 및 BAEC 트랜스펙션 실험의 결과를 요약한 것이다. B2B, HUVEC 및 BAEC 내의 더 높은 루시페라제 발현(30, 8.5 및 1.5배 이상의 발현)은 PPE-1 프로모터의 제어 하에서보다 PPE-1-3X 프로모터의 제어 하에서 관찰되었다. 이 결과는 전술한 실험 내용을 확인시켜 주는 것으로서 PPE-1-3X는 내피세포에 특이적인 높은 발현 수준을 유도하는데 적합하다는 것을 확립하는 역할을 한다. 인비보 운반(in-vivo delivery)의 관점에서, PPE-1-3X 구축물에 의해 달성되는 높은 발현 수준은 결국 소량의 DNA 투여로 이어진다. 그 결과 특이성을 더욱 증대시키는 역할을 한다.

[0536]

실시예 12

[0537]

인비보에서 Ad5PPE-1Luc의 효율, 특이성 및 안정성

[0538]

실시예 7 내지 실시예 10에서 관찰된 발현의 내피세포 특이성은 세포 배양의 인위적 산물이 아니라는 것을 확인하기 위해, Ad5PPE-1/루시페라제 구축물이 전술한 "정상 마우스의 조직 유전자 발현"란에 기술된 C57BL/6 마우스 내에 주입되었다 인비트로 실험에서와 같이, 음성 대조로서 Ad5CMV/루시페라제가 사용되었다.

[0539]

아데노바이러스 벡터의 주입 후, 혈관이 신생되거나 신생되지 않은 조직 내의 루시페라제의 특이적 활성 및 안정성이 분석되었다. 결과는 도 19(간장 내에서의 발현에 대비되는 루시페라제의 발현) 및 표 3(체내의 총 발현의 백분율로서의 루시페라제의 발현)에 요약되어 있다. 예측되는 바와 같이, Ad5CMV/루시페라제 처리된 마우스

에서 대부분의 루시페라제 활성(총 체내 발현의 80%를 초과)은 간장 내에서 발견되었다. PPE-1 프로모터에 의해 제어되는 루시페라제 활성은 간장 내에서 낮았다(총 체내 발현의 37-54%). PPE-1 유래의 발현은 Ad5CMV/루시페라제 처리된 마우스에 비해(총 체내 발현의 최대 1.8%; 표 2 참조) 대동맥 내에서 더욱 높았다(주입 후 5일 및 14일 경과시에 각각 총 체내 발현의 23-33%). 이 결과는 내피세포 특이성이 세포 배양에서 관찰되었다는 것을 확인시켜 준다. 간장은 고도로 혈관이 형성된 장기임을 기억해야 한다. 따라서, 기관 내의 세포 발현 실험이 후술하는 바와 같이 수행되었다.

표 3 - PPE-1 및 CMV에 기초한 구축물의 주입 후 5일 및 14일 경과시의 기관 내의 루시페라제 발현

[0540]

[0541]

주입 후 경과일	5		14	
	광의 단위/ μg 단백질		광의 단위/ μg 단백질	
기관	PPE-1	CMV	PPE-1	CMV
대동맥	13.0±2.9 (32.7%)	1.4±0.5 (0.56%)	10.6±2.4 (12.6%)	1.3±0.3 (1.1%)
심장	0.2±0.1 (0.5%)	1±0.6 (0.4%)	1.5±0.3 (1.7%)	1.8±0.6 (1.6%)
간장	22.7±4.5 (57%)	219±111.5 (88.6%)	34.9±7.8 (41.6%)	52.8±10.6 (46.8%)
폐	0.2±0.1 (0.5%)	2.3±1.0 (0.9%)	3.6±0.8 (4.3%)	2.0±0.9 (1.8%)
근육	0.3±0.1 (0.7%)	0.8±0.2 (0.3%)	1.2±0.3 (1.4%)	1.5±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%)	45.2±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%)

[0542]

도 41A 및 도 41B는 110 마리의 주입된 마우스의 대동맥(A) 및 간장(B) 내의 절대 루시페라제 활성(광의 단위/ μg 단백질)을 입증한다. 루시페라제 활성은 주입 후 1일(n=13), 5일(n=34), 14일(n=32), 30일(n=20) 및 90일(n=11) 경과시 측정되었다. 대동맥의 측정 결과는 대부분 내피세포 내의 프로모터(PPE-1 또는 CMV)의 활성을 나타내고, 간장의 측정 결과는 대부분 간세포 내의 프로모터의 활성을 나타낸다.

[0543]

실시예 13

[0544]

특이성 및 안정성의 BALB/C 마우스 내의 인비보에서 Ad5PPE-1의 효율

[0545]

관찰된 결과가 특정 동물에 대한 인위적 산물이 아니라는 것을 입증하기 위해 12주령의 BALB/C 마우스(각 그룹의 n=10)에서 실시예 12의 실험이 반복되었다.

[0546]

아데노바이러스 백터에 의한 절대 결과는 C57BL/6 마우스에 비해 BALB/C 마우스가 낮았으므로, 루시페라제 발현은 모든 조직 내의 총 루시페라제 활성의 백분율로서 표시되었다.

[0547]

주입 후 5일 경과시 최고 상대 루시페라제 발현은 Ad5PPE-1 주입된 마우스의 비장(90.9%) 및 Ad5CMV 주입된 마우스의 간장(86.2%)에서 관찰되었다. Ad5PPE-1가 주입된 마우스의 주입 후 5일 경과시의 동맥내 상대 루시페라제 활성(1.75%)에 비해 주입 후 14일 경과시의 동맥내 상대 루시페라제 활성(32.9%)이 크게 증가되는 것이 관찰되었다(도 42A 및 도 42B; Ad5PPE-1Luc - 백색 막대; Ad5CMVLuc - 흑색 막대).

[0548]

이들 결과는 마우스주(mouse strain)에 무관하게 PPE-1 프로모터의 조직 특이성은 간세포에 의한 주입 DNA의 우선 흡수에 불구하고 간세포 발현을 효과적으로 제거하는데 충분한 강도를 가진다는 것을 확인해 준다.

[0549]

실시예 14**인비보에서 Ad5PPE-1에 의해 운반된 유전자의 세포 국제화(Cellular localization)**

[0550]

인비보에서 PPE-1에 의해 발현된 세포의 세포 발현 부위를 확인하기 위해, 아데노바이러스 벡터인 Ad5PPE-1-GFP에 의해 운반된 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein; GFP)이 사용되었다. Ad5CMVGFP(Quantum, Canada)는 비내피세포 특이적 음성 대조로서 사용되었다. 정맥 주사 후 5일 경과시, 마우스들은 희생되었고, 그 조직은 형광 현미경에 의해 분석되었다.

[0551]

Ad5CMVGFP 벡터가 주입된 마우스에서, 대부분의 발현은 간세포 내에서 검출되었고, 간장 내의 내피세포에서는 발현이 검출되지 않았다(도 20A). 명확한 대조에서, Ad5PPE-1-GFP가 주입된 마우스(도 20B 참조)는 간세포에서 발현이 검출되지 않았고, 간장의 혈관 내의 내피세포에서 상단한 발현이 검출되었다. 유사한 결과가 다른 조직에서도 얻어졌다. 여기서 모든 PPE-1 유래의 발현은 내피세포에서 검출되었고, CMV 유래의 발현은 내피세포에서 검출되지 않았다. 이 결과는 내피세포 특이성은 내피세포 및 비내피세포를 보유하는 기관 내에서도 보존된다는 것을 나타낸다. 이와 같은 발견은 성장하는 종양 내의 혈관신생을 방지하기 위한 중요한 의미를 가지는 것이다.

[0552]

실시예 15**인비트로에서 Ad5PPE-1-3X Luc 및 Ad5PPE-1-3X GFP의 효율 및 내피세포 특이성의 실험**

[0553]

세포 내의 레포터 유전자 루시페라제 및 녹색 형광 단백질(GFP)의 발현을 구동하는 Ad5PPE-1 및 Ad5PPE-1-3X의 상대 효능을 결정하기 위해, 전술한 세포주를 이용하여 인비트로 상태에서 내피세포 내의 특이적 활성이 실험되었다. Ad5CMVLuc 및 Ad5CMVGFP는 비조직 특이성 대조로서 이용되었다. Ad5PPE-1Luc 및 Ad5PPE-1GFP는 3X 배열의 첨가에 의해 유도되는 발현 수준의 상대변화를 확인하기 위해 사용되었다.

[0554]

도 21 및 도 22에 요약된 결과는 비내피세포 - 켓 인슐리노마(Rat Insulinoma) - RIN, HeLA, HepG2 및 정상 피부 섬유아세포(NSF)의 활성(도 21 및 도 22 참조)에 비해, PPE-1-3X 프로모터의 제어 하의 루시페라제 활성은 EC 주(소 대동맥혈관 내피세포 - BAEC)에서 5-10배 높다는 것을 나타낸다.

[0555]

도 21은 Ad5PPE-1Luc, Ad5PPE-1-3XLuc, 및 Ad5CMVLuc에 의해 트랜스덕션된 B2B, BAEC 및 RIN 세포 내의 광단위 / μ g 단백질로서 표시된 루시페라제 활성을 보여준다. 최대의 루시페라제 발현은 Ad5CMVLuc에 의해 트랜스덕션된 RIN 세포 내에서 관찰되었으나, 이 구축물은 BAEC 및 B2B 세포 내에서는 발현이 미약하였다. 두 번째로 높은 루시페라제 발현은 Ad5PPE-1-3XLuc에 의해 트랜스덕션된 BAEC 세포 내에서 관찰되었다. Ad5PPE-1Luc는 BAEC 세포 내에서 더 낮은 수준으로 발현되었다. B2B 세포주 내에서 Ad5PPE-1Luc 및 Ad5PPE-1-3XLuc는 거의 동일한 수준으로 발현되었다.

[0556]

전반적으로, PPE-1-3X 프로모터의 제어 하의 내피세포주 내의 루시페라제 활성은 동일한 감염 조건(moi=10)에서 PPE-1 프로모터의 제어 하의 것에 비해 23배 높았고, CMV 프로모터의 제어 하의 것에 비해 23-47배 높았다. 이것은 비내피세포 RIN 내의 루시페라제 발현이 CMV 프로모터(도 21 참조)의 제어 하에서 3000배 높다는 것에도 불구하고 사실이다.

[0557]

PPE-1 및 PPE-1-3X가 기타의 비내피세포 주 내에서 불활성이라는 것을 확립하기 위해, HeLA, HepG2, NSF 세포주가 트랜스덕션되었다. BAEC는 내피세포 대조로서 이용되었다. 도 22는 Ad5PPE-1Luc, Ad5PPE-1-3XLuc 및 Ad5CMVLuc에 의해 트랜스덕션된 HeLA, HepG2, NSF 및 BAEC 세포 내의 루시페라제 활성을 광단위/ μ g 단백질로서 보여준다. Ad5CMVLuc에 의한 트랜스덕션은 HeLA, HepG2 및 NSF 세포 내에 루시페라제 발현의 수준을 향상시키는 원인이 된다. 이들 세포주는 PPE-1의 제어 하에서 루시페라제를 발현하지 않았고, PPE-1-3X 프로모터에 의해서는 루시페라제를 낮은 수준으로 발현하였다. 예상대로, Ad5PPE-1Luc 또는 Ad5PPE-1-3XLuc에 의해 트랜스덕션된 BAEC 세포는 높은 루시페라제 발현을 나타냈다.

[0558]

종합하면, 이들 결과는 PPE-1 프로모터 내에 3X 배열을 도입하면 내피세포주 내에 높은 수준의 발현을 유발시키는 한편 비내피세포 내의 불필요한 발현은 방지한다는 것을 시사한다.

[0559]

PPE-1 프로모터에 3X 배열을 추가하면 또 도 23A 내지 도 23C에 나타나 있는 바와 같이 EC주(소 대동맥혈관 내피세포; BAEC) 내의 녹색 형광 단백질 발현의 수준을 증대시켜준다. 도 23A 내지 도 23C에는 moi=1로 트랜스덕

선된 BAEC 내의 GFP 발현이 도시되어 있다. 이 실험에서 CMV 프로모터를 사용한 경우 GFP의 발현은 관찰되지 않았다.

[0562] 도 23에서, 패널 A는 Ad5PPE-1-3XGFP 트랜스데션된 세포를 나타내고, 패널 B는 Ad5PPE-1GFP 트랜스데션된 세포를 나타내고, 패널 C는 Ad5CMVGFP를 나타낸다. 다시, PPE-1 프로모터 내에 3X 배열을 도입하면 레포터 유전자의 발현이 상당히 증대된다. 이 결과는 내피세포 특이적 인핸서로서 기능하는 3X 배열의 능력은 전사될 하류측 유전자의 기능이 아니라는 것을 시사해준다.

[0563] 또, Ad5PPE-1-3X-GFP 및 Ad5PPE-1GFP 트랜스데션은 비내피세포인 SMC, HeLa, HePG2 및 정상 피부 섬유아세포(NSF) 내에서 GFP 발현을 유발하지 않고, 이에 비해 도 24 내지 도 27에 요약되어 있는 바와 같이 CMV 프로모터 하에서는 높은 발현을 유발하였다.

[0564] 도 24는 Ad5PPE-1-3XGFP(패널 A) 또는 Ad5CMVGFP(패널 B) 중 어느 하나에 의해 트랜스데션(moi=1)된 SMC 내의 GFP의 발현을 보여준다. Ad5CMVGFP 트랜스데션으로부터는 높은 수준의 GFP 발현이 얻어졌으나, Ad5PPE-1-3XGFP 트랜스데션으로부터는 GFP 발현이 얻어지지 않았다.

[0565] 도 25는 HeLa 세포에서 실시된 유사한 실험의 결과를 보여준다. 전계 도면과 같이, 패널 A는 Ad5PPE-1-3XGFP에 의해 트랜스데션된 세포를 나타내고, 패널 B는 Ad5CMVGFP에 의해 트랜스데션된 세포를 나타낸다. 다시, Ad5CMVGFP 트랜스데션으로부터는 높은 수준의 GFP 발현이 얻어졌으나, Ad5PPE-1-3XGFP 트랜스데션으로부터는 GFP 발현이 얻어지지 않았다.

[0566] 도 26은 HepG2 세포에서 실시된 유사한 실험 결과를 보여준다. 전계 도면과 같이, 패널 A는 Ad5PPE-1(3X)GFP에 의해 트랜스데션된 세포를 나타내고, 패널 B는 Ad5CMVGFP에 의해 트랜스데션된 세포를 나타낸다. 다시, Ad5CMVGFP 트랜스데션으로부터는 높은 수준의 GFP 발현이 얻어졌으나, Ad5PPE-1-3XGFP 트랜스데션으로부터는 GFP 발현이 얻어지지 않았다.

[0567] 도 27은 NSF 세포에서 실시된 유사한 실험 결과를 보여준다. 전계 도면과 같이, 패널 A는 Ad5PPE-1-3XGFP에 의해 트랜스데션된 세포를 나타내고, 패널 B는 Ad5CMVGFP에 의해 트랜스데션된 세포를 나타낸다. 다시, Ad5CMVGFP 트랜스데션으로부터는 높은 수준의 GFP 발현이 얻어졌으나, Ad5PPE-1-3XGFP 트랜스데션으로부터는 매우 낮은 GFP 발현이 얻어졌다.

[0568] 이들 결과를 종합하면 높은 수준의 내피세포 특이성 및 높은 수준의 내피세포 발현은 배열번호:7의 3X 배열을 포함하는 개질 PPE-1 프로모터를 이용함으로써 얻어진다는 것을 시사한다.

실시예 16

인비보에서 Ad5PPE-1-3X에 의해 운반된 레포터 유전자의 세포 국제화

[0569] 인비보에서 PPE-1-3X 프로모터의 제어 하에서 발현되는 레포터 유전자의 세포 국제화 패턴(cellular localization pattern)을 결정하기 위해, Ad5PPE-1-3XGFP 및 Ad5PPE-1GFP가 전술한 바와 같이 마우스 내에 주입되었다. 정맥 주입 후 5일 경과시, 마우스들은 희생되었고, 그 조직은 형광 현미경에 의해 분석되었다.

[0570] Ad5PPE-1-3XGFP 주입된 마우스의 간장, 신장 및 비장의 혈관의 내피세포 내에서는 Ad5PPE-1GFP 주입된 마우스에 비해 상당히 높은 GFP 활성이 관찰되었다. 도 28A 및 도 28B는 실험결과를 보여주는 것이다.

[0571] 도 28A는 Ad5PPE-1GFP가 주입된 마우스의 혈관의 내피세포 내의 낮은 수준의 GFP를 보여준다. 도 28B는 구축물에 3X 배열을 첨가한 결과 크게 높아진 GFP 발현 수준을 보여준다.

[0572] 혈관 내피세포 내의 높은 발현에도 불구하고, 간세포, 사구체, 상피세포 및 비세포(도 18 및 도 19 참조) 내에서는 발현이 검출되지 않았다.

[0573] 도 29는 주입된 마우스의 신장 조직으로부터 얻은 결과를 보여준다. Ad5CMVGFP 주입된 마우스(도 29A), Ad5PPE-1GFP(도 29B)주입된 마우스 및 Ad5PPE-1-3XGFP(도 29C) 주입된 마우스는 모두 신장 세포 내에서 낮은 GFP 활성을 나타냈다. 도 29B에서, 혈관벽(화살표로 표시됨) 내에서 약간 높은 GFP 발현을 볼 수 있다.

[0574] 도 30은 주입된 마우스의 비장 조직으로부터 얻은 결과를 보여준다. Ad5CMVGFP 주입된 마우스(도 30A), Ad5PPE-1GFP 주입된 마우스(도 30B) 및 Ad5PPE-1-3XGFP 주입된 마우스(도 30C)는 모두 비장 세포 내에서 낮은 GFP 활성을 나타냈다. Ad5PPE-1-3XGFP 주입된 마우스(화살표로 표시됨)의 혈관 내에서 높은 GFP 활성을 볼 수

있다.

[0577] 이들 결과로부터 PPE-1 및 PPE-1-3X 프로모터는 인비보에서 모두 내피세포 특이성을 가지는 것이 확인되었다. 또한 양 프로모터의 활성은 비증식성 내피세포 조직(즉, 건강한 기관의 혈관) 내에 제한된다는 것을 시사해 준다. 따라서, 종양 혈관신생 모델의 시험이 수행되었다.

실시예 17

인비보 종양 신혈관형성에서 Ad5PPE-1 구축물의 실험

[0579] 종양의 혈관신생 혈관에 대해 레포터 유전자의 특이적 발현을 유도하는 Ad5PPE의 능력을 확인해 보기 위해, 쥐 과동물 LLC 모델(진술한 물질 및 방법론에 기술됨)이 채용되었다. 하나의 실험에서, Ad5PPE-1Luc 또는 Ad5CMVLuc(각각 10^{10} pfu/ml의 농도)의 전신 주입 후 5일 경과시 종양 신혈관형성에서 루시페라제 발현이 실험되었다.

[0580] 본 실험에서, 프라이머리 종양 모델 및 전이성 종양 모델의 양 모델에 대한 Ad5CMVLuc의 전신 주입의 결과, 프라이머리 종양 또는 전이성 폐에서 최소의 발현이 얻어졌다. 이 발현 수준은 투약되지 않은 정상 폐의 CMV에 의해 유도된 루시페라제의 최소 발현과 유사하였다(도 35; 흑색 막대; n=12). 명확한 대조에서, PPE-1 프로모터(도 35; 백색 막대; n=9)의 제어 하에서, 고수준의 혈관신생 폐전이는 빈약하게 혈관이 형성된 프라이머리 종양 및 투약되지 않은 폐 내의 루시페라제 활성에 비해 약 200 배 높은 루시페라제 활성이 수반되었다.

[0581] 간장, 신장, 심장 및 췌장과 같은 비전이성 조직 내의 루시페라제 발현은 최소였다. 대동맥 내의 발현 수준은 전이성 폐의 발현 수준의 약 30%였다.

[0582] LLC 모델의 추가 실험에서 프라이머리 종양 및 전이성 폐의 레포터 유전자의 발현을 국재화(localization)하기 위해 Ad5PPE-1GFP 구축물 및 Ad5CMVGFP 구축물이 채용되었다.

[0583] Ad5PPE-1GFP 주입된 마우스는 종양 세포 내에서는 발현이 검출되지 않았으나, 프라이머리 종양의 혈관 내의 GFP 특이적 발현이 높은 수준을 보였다(도 47C 참조). 이 관찰 결과는 실시예 20에 제시된 LLC 세포 배양 모델의 결과와 일치하는 것이다. 폐전이에서, 대규모 동맥 및 전이성 병灶의 소규모 혈관신생 혈관 내에서 높은 수준의 GFP 발현이 검출되었다(도 47A 참조). 전상 폐 조직 내에서는 발현이 검출되지 않았다. 내피세포 국재화(localization)는 GFP 발현(도 47A) 및 CD31 항체 면역염색법(도 47B)의 공동국재화(co-localization)에 의해 입증되었다. 명확한 대조에서, Ad5CMVGFP 주입된 마우스에서 프라이머리 종양 및 폐전이의 양자에서 GFP 활성을 검출될 수 없었다.

[0584] 도 47C는 Ad5PPE-1GFP의 종양 내 주입 후의 프라이머리 종양의 혈관 내의 GFP 발현을 보여준다. 도 47D는 종양과 종양의 혈관을 보여주는 폐널 C에 정렬된 대조 화상이다.

[0585] 이 결과는 PPE-1 프로모터는 종양 세포 자체 내에 높은 수준의 발현을 유발하지 않지만 종양 내의 혈관 내피세포 내에서, 특히 급속하게 증식하는 혈관신생 혈관 내에서는 높은 수준의 발현을 유발한다는 것을 나타낸다.

[0586] 프라이머리 폐암 모델 내의 Ad5CMV의 종양 내 주입의 결과 종양 조직 내의 높은 루시페라제 발현 및 간장 내의 중간 정도의 발현이 얻어졌다(종양 내의 발현의 10% 정도; 도 53 참조). 전이성 폐 내에서는 발현이 검출되지 않았다. 반면, 종양 내 주입의 경우, PPE-1 프로모터의 제어 하의 루시페라제 발현은 프라이머리 종양 및 전이성 폐 내의 루시페라제 발현 수준과 유사하였고, 간장 내에서는 발현이 검출되지 않았다.

실시예 18

암종 세포 배양계(carcinoma cell culture system) 내의 Ad5PPE-1 구축물의 분석

[0587] 암성 세포(cancerous cells) 내에서 루시페라제 발현을 구동하는 Ad5PPE-1 및 Ad5CMV의 효율을 분석하기 위해, D122-96 루이스 폐암 세포주가 이용되었다.

[0588] 다양한 감염다중도(MOI)의 인비트로 트랜스데션으로 수행되었다. 분석 결과는 양 아데노바이러스 벡터는 이들 세포에 루시페라제 유전자를 트랜스데션할 수 있다는 것을 나타냈다. 그럼에도 불구하고, PPE-1 프로모터에 의해 유도된 루시페라제 활성은 내피세포 내에서 유도된 활성에 비해 LLC 세포 내에서 유도된 활성이 매우 낮았다.

(1000-2500 대 50 광단위/?g 단백질).

표 4 - 루이스 폐암 세포주(D122-96)의 Ad5PPE-1Luc 및 Ad5CMVLuc에 의한 인비트로 트랜스덕션

	<i>MOI = 1</i>	<i>MOI = 5</i>	<i>MOI = 10</i>
<i>AdPPE-1</i>	<i>8.1±0.06</i>	<i>33.95±7.0</i>	<i>50.7±5.0</i>
<i>Ad5CMV</i>	<i>9.3±1.1</i>	<i>47.3±4.0</i>	<i>88.13±10.1</i>

[0592]

[0593]

[0594]

실시예 19

[0595]

인비보 종양 혈관신생 혈관 내의 3X 배열의 효과 분석

[0596]

혈관신생 혈관 내의 PPE-1 프로모터에 미치는 3X 배열의 효과를 확인해 보기 위해, 루이스 폐암(LLC) 전이 모델(전술한 물질 및 방법란에 기술됨)이 이용되었다. 10^{10} 감염단위의 Ad5PPE-1GFP, Ad5PPE-1-3XGFP 또는 Ad5CMVGFP의 정맥 주입 후 5일 경과시, 마우스들은 회생되었고, 그 조직은 전술한 물질 및 방법란에 기술된 것과 같이 분석되었다.

[0597]

도 31A 및 도 31D는 생리식염수 주입된 대조군 마우스들(도 31A), Ad5CMVGFP 주입된 마우스들(도 31B), Ad5PPE-1GFP 주입된 마우스들(도 31C), 및 Ad5PPE-1-3XGFP 주입된 마우스들(도 31D)의 전이성 폐 내의 GFP 발현을 요약한 것이다. 항-CD31 면역염색법(도 31C' 내지 도 20D')은 각 전이성 조직 내의 GFP 발현 위치를 확인해 준다. 분석 결과, 대조군인 생리식염수 주입된 마우스(도 31A)에서는 GFP 발현이 검출되지 않았고, CMV 주입된 마우스의 기도 상피세포 부근에서 약간의 발현이 검출되었으나, 이들 마우스의 전이성 폐의 혈관신생 혈관 내에서는 발현이 검출되지 않았다(도 31B). Ad5PPE-1GFP 주입된 마우스(도 31C 및 도 31C')의 전이성 폐 내에서는 낮은 수준의 GFP 발현이 관찰되었고, 한편 Ad5PPE-1-3XGFP 주입된 마우스(도 31D 및 도 31D')의 새로운 혈관 내에서는 높은 특이적 발현이 관찰되었다.

[0598]

이들 결과는 실시예 15의 인비보 결과와 실시예 7, 8 및 11의 인비트로 결과 사이의 분명한 차이점을 설명한다. PPE-1 및 PPE-1-3X 프로모터는 내피세포 특이적이다. 그러나, 상기 3X 배열은 성장 중인 종양 내의 새롭게 형성되는 혈관과 같은 급속하게 증식 중에 있는 내피세포 조직 내의 발현 수준을 크게 증가시켜 준다.

[0599]

실시예 20

[0600]

종양 혈관신생 혈관 내의 PPE-1 프로모터에 미치는 3X 배열의 효과

[0601]

종양 혈관신생 혈관 내의 PPE-1 프로모터의 효능 및 특이적 활성에 미치는 본 발명의 3X 엘리먼트의 효과를 분석하기 위해, LLC 전이 모델이 사용되었다. 10^{10} pfu/ml 농도의 Ad5PPE-1Luc, Ad5PPE-1-3XLuc, Ad5CMVLuc, Ad5PPE-1GFP, Ad5PPE-1-3X-GFP 또는 Ad5CMVGFP의 정맥 주입 후 5일 경과시, 마우스들은 회생되었고, 그 조직은 전술한 바와 같은 루시페라제 또는 GFP 발현에 대해 분석되었다.

[0602]

도 48은 Ad5PPE-1-3XLuc, Ad5PPE-1Luc 또는 Ad5CMVLuc의 전신 주입 후 정상 폐 내의 루시페라제 발현과 전이성 폐 내의 루시페라제 발현을 비교한 히스토그램이다.

[0603]

실험 그룹은 Ad5CMVLuc (n=7; 흑색 막대), Ad5PPE-1Luc (n=6 ; 회색 막대) 및 Ad5PPE-1-3XLuc (n=13; 갈색 막대)였다. 활성은 광단위/ μ g 단백질로 표시되었다.

[0604]

PPE-1-3X 프로모터의 제어 하의 루시페라제 발현은 정상 폐 내에서의 활성에 비해 전이성 폐 내에서 35배 더 컸고, 3X 엘리먼트가 없는 상태에서 PPE-1 프로모터에 의해 구동되는 발현에 비해 3.5배 더 컸다($p<0.001$). Ad5PPE-1-3XLuc가 주입된 마우스의 다른 조직 내에서는 극히 낮은 루시페라제 활성이 검출되었다. 주입된 각 동물의 간장에 대한 백분율로서 폐 내의 루시페라제 발현을 산정해 본 결과 정상 폐 내에서의 활성에 비해 전이성 폐 내에서의 활성이 10배 증가되었음이 밝혀졌다.

[0605]

특이적 세포 유형에 대해 레포터 유전자의 발현을 국재화하기 위해, GFP 구축물이 이용되었다. 도 50A 및 도 50B는 Ad5PPE-1-3XGFP 주입된 마우스의 전이성 폐 내의 GFP 발현(도 50A)을 보여준다. CD31 항체에 의한 면역

염색(도 50B)은 새로운 혈관 내의 GFP 발현의 위치를 확인해 준다. 대조군인 생리식염수 주입된 마우스에서는 GFP 발현이 검출되지 않았고, 주입된 마우스의 기도 상피세포의 주위에서는 낮은 수준의 발현이 검출되었으나, 전이성 폐의 혈관신생 혈관 내에서는 발현이 검출되지 않았다.

[0606] 요약하면, 이들 결과는 Ad5PPE-1 구축물 내로 3X 엘리먼트를 도입하면 발현 수준이 크게 증가하고, 이 증가된 발현은 종양의 혈관신생 혈관에 대해 특이적이라는 것을 나타낸다. 잠재적으로, 관찰된 효과는 해당 배열이 발현 수준을 더 증가시키기 위해 전술한 하이폭시아 응답(hypoxia response)과 병용될 수도 있다.

실시예 21

PPE-1 하이폭시아 응답의 추가적 특성해석

쥐과동물 PPE-1 프로모터 활성에 미치는 하이폭시아의 효과에 대한 추가의 특성해석을 위해, 소 대동맥혈관 내 피세포(BAEC)가 DNA 플라즈미드(pEL8; 도 37A)에 의해 트랜스펙션되었다. 상기 pEL8 플라즈미드는 쥐과동물 PPE-1 프로모터(1.4kb)(적색), 루시페라제 유전자(1842 bp), SV40 폴리 A 부위 및 엔도셀린-1 유전자의 제1 인트론(first intron)을 포함하고, PPE-1 프로모터 카세트라고 칭하는 모든 것들은 전술한 물질 및 방법란에 기술된 BamHI 제한효소에 의해 분해되고 추출되었다. 트랜스펙션 후, 세포들은 하이폭시아 조건에 노출되었다.

[0607] 18시간 동안 하이폭시아(0.5%의 O₂)에 노출된 트랜스펙션된 BAEC 내의 루시페라제 발현은 노르목식(normoxic) 환경(도 32) 내에서 성장되는 세포 내의 루시페라제 발현에 비해 8배 높았다. 도 32는 쥐과동물 PPE-1 프로모터를 보유하는 플라즈미드에 의해 트랜스펙션된 BAEC 내의 루시페라제 활성(광단위/μg 단백질)은 트랜스펙션된 세포가 하이폭시아 환경 내에서 배양되었을 경우 상당히 더 높았다. 동등한 트랜스펙션 효율은 β- 갈락토시다제 레포터 벡터의 공동 트랜스펙션 및 LacZ 활성의 분석에 의해 확인되었다.

[0608] 아데노바이러스 벡터에 의해 운반되는 쥐과동물 PPE-1 프로모터가 하이폭시아에 의해 업조절(up-regulated) 되는지의 여부를 결정하기 위해, BAEC가 Ad5PPE-1Luc에 의해 트랜스덕션되었다. 이 실험에서 Ad5CMVLuc는 비특이적 대조군으로서 사용되었다. 실험 결과는 도 33(Ad5PPE-1Luc에 의해 트랜스덕션된 BAEC 내의 하이폭시아 루시페라제 활성)에 요약되어 있다. 엄밀한 대비 결과, Ad5CMV 트랜스덕션된 세포(도 33) 내에서 노르목시아(normoxia) 및 하이폭시아 사이에 상당한 차이가 검출되지 않았다.

[0609] PPE-1 프로모터 활성의 강화가 내피세포 특이적인지의 여부를 이해하기 위해, 상이한 세포주(BAEC, B2B, CHO, RIN 및 심근세포)가 Ad5PPE-1 (moi=10)에 의해 트랜스덕션되었고, 하이폭시아(0.5% O₂) 또는 노르목시아 환경에 노출되었다. 실험 결과는 도 34에 요약되어 있다. 루시페라제 발현은 B2B 세포 내에서 약간 증가되었고, 하이폭시아 환경 내에서 배양된 BAEC 세포 내에서는 크게 증가되었다. 다른 세포주 내의 루시페라제 발현은 노르목시아 환경에 비해 하이폭시아 환경에 의해 감소되었다. 이들 결과는 PPE-1 프로모터의 하이폭시아 유도는 주로 내피세포주 내에서 발생한다는 것을 확인해 준다.

실시예 22

PPE-1 하이폭시아 반응에 미치는 3X 배열의 효과

[0610] PPE-1 하이폭시아 반응에 미치는 3X 배열의 효과를 확인하기 위해, BAEC가 Ad5PPE-1Luc 및 Ad5PPE-1(3X)Luc에 의해 트랜스덕션되었다. 트랜스덕션 후, BAEC 세포는 전술한 하이폭시아 환경 또는 노르목시아 환경 내에서 배양되었다. 실험 결과는 도 35에 요약되어 있다. Ad5PPE-1Luc 구축물을 이용한 루시페라제 발현은 하이폭시아에 반응하여 약간 증가되었다(7배; 하이폭시아에서 2578 및 노르목시아에서 322.1). 이에 비해, Ad5PPE-1(3X)Luc 구축물은 하이폭시아에 반응하여 1.5배만 증가되었을 뿐이다(노르목시아 조건에서의 2874.5에서 하이폭시아 조건에서의 4315). 이들 결과는 3X 배열이 PPE-1 프로모터에 첨가되었을 때 관찰되는 높은 노르목시아 발현 수준은 하이폭시아 반응을 어느 정도까지 차단하는 역할을 한다는 것을 시사해 준다.

실시예 23

유전자도입 마우스 모델에서 하이폭시아에 대한 PPE-1의 반응 분석

[0611] 국부적 하이폭시아/허혈에 노출된 조직 내의 쥐과동물 PPE-1 프로모터 활성을 분석하기 위해, 전술한 물질 및

방법란에 기술된 mPPE-1-Luc 유전자도입 마우스가 이용되었다. 이들 마우스는 전술한 바와 같이 국부적 후지 허혈(regional hind limb ischemia)이 유도되었다(Couffinhal T. et al. (1998) Am. J. Pathol. 152:1667-1679). 즉, 이들 마우스는 펜토바르비탈 소디움(40 mg/kg, IP)을 이용하여 마취되었다. 복재동맥(saphenous arteries) 및 슬와동맥(popliteal arteries)의 분기부로부터 약 2 mm 이격된 위치의 우측 대퇴동맥을 결찰하는 것에 의해 일측 후지 허혈이 유도되었다. 관류의 기능 변화가 유도된 것을 확인하기 위해, 4일째 및 14일째에 7.5 MHz 트랜스듀서 및 혈관조영 소프트웨어가 장착된 시너지 초음파 장치(Synergy ultrasound system (GE))를 이용하여 초음파 활성이 실시되었다. 마우스들은 최대 18일간 공지된 조건 하에서 수용되었다.

[0619] 결찰 후 2, 5, 10 및 18일 경과시, 허혈 근육, 비결찰된 정상 근육, 간장, 폐, 및 동맥 내에서의 루시페라제 발현이 분석되었다.

[0620] 도 36에 요약되어 있는 결과는 결찰 후 상기 기간 중에 간장, 폐 및 동맥 내에서는 상당한 변화가 검출되지 않았고, 비결찰된 정상 근육 및 허혈 근육의 양자 내에서는 대퇴 동맥 결찰 후 루시페라제 유전자 발현이 증가했다는 것을 보여준다. 허혈 근육 내에서 최대의 루시페라제 발현은 결찰 후 5일 경과시에 검출되었으나, 비결찰 근육 내에서의 최대 루시페라제 발현은 대퇴 동맥 결찰 후 10일 경과시에 검출되었다. 이것은 PPE-1 프로모터의 하이폭시아 반응이 인비트에서 기능한다는 것을 시사한다. 실험기간 중에 비허혈 근육 내의 루시페라제 발현은 대조군인 비조작된 조직(경과일=0) 내의 발현에 비해 변화되지 않았다. 이에 비해, 허혈 근육 내의 루시페라제 발현은 다른 시점에 비해 5일째의 시점에서 상당히 높았다.

[0621] 5일째의 시점에서 PPE-1에 의해 구동된 루시페라제 발현은 대조군인 비조작된 마우스에 비해 그리고 10일째 및 18일째의 허혈 근육(도 51)에 비해 2.5배 높았다.

[0622] 국부 허혈이 유발된 유전자도입 마우스의 간장, 폐 및 동맥을 포함하는 기타의 비허혈 조직 내의 루시페라제 발현에 의해 허혈 유도 후 18일 내에 상당한 변화가 없었음이 밝혀졌다(도 52).

[0623] 또, 이들 결과는 루시페라제 발현은 낮은 백분율의 내피세포 조직(간장 및 비허혈 근육)에 비해 높은 백분율의 내피세포 조직(폐 및 대동맥)을 보유하는 조직 내에서 더 높다는 것을 확인해 주는 것이다.

실시예 24

내피세포 내의 Ad5PPE-1Luc 활성에 미치는 세포 증식 수준의 효과

[0626] Ad5PPE-1Luc의 효율 및 특이적 활성에 미치는 세포 증식 수준의 효과를 확인하기 위해, 내피세포(BAEC)의 혈관 신생 모델이 인비트로 상태에서 실험되었다. 트랜스덕션된 BAEC가 혈청고갈(serum deprivation)에 의해 휴지상태에 유도되거나 정상적인 증식을 위해 10% FCS 내에서 성장되었다. 즉, 세포는 혈청고갈 후 72시간 경과시 48시간 동안 휴지상태의 세포로서 또는 정상 배지(10% FCS) 내에서 증식 세포로서 트랜스덕션되었다. 루시페라제 활성은 세포 량의 차이의 표준화를 위해 광단위/g 단백질로 표시되었다. 실험 결과는 4개의 대표적 독립된 실험의 3회의 실험의 평균이다.

[0627] PPE-1 프로모터(백색 바아; 도 28)의 제어 하의 루시페라제 발현은 정상 증식 중인 BAEC 내에서 휴지상태의 세포에 비해 4배 높았고, 정상 증식 중인 BAEC 내에서 CMV 프로모터(흑색 막대; 도 28)의 제어 하의 루시페라제 발현에 비해 25배 높았다. 또, 증식 중인 세포 내에서, PPE-1 프로모터의 제어 하의 활성은 CMV 프로모터 제어 하의 활성에 비해 10배 높았다.

[0628] 인비트로의 혈관신생 조건을 모사하기 위해, Ad5PPE-1Luc 활성이 40 ng/ml의 혈관 내피세포 성장 인자(VEGF)의 첨가에 의해 급속 증식하도록 유도된 BAEC 내에서 실험되었다. 이 조건 하의 활성이 정상 증식 중인 세포 내의 활성 및 전술한 휴지 상태의 세포의 활성과 비교되었다. VEGF를 이용하여 세포 증식이 유도된 BAEC 내의 루시페라제 활성은 정상 증식 중인 세포의 것에 비해 44배 높았고, 휴지 상태의 세포(도 40)의 것에 비해 83배 높았다.

[0629] 동시에, 이들 실험은 PPE-1 프로모터의 전사 제어 하의 해당 배열의 활성 수준은 높은 수준의 발현을 유발하는 급속 증식되는 세포 증식의 수준에 관련된다는 것을 나타낸다.

실시예 25

[0631] **죽상동맥경화증(Atherosclerosis) 유도 마우스 내의 PPE-1 프로모터의 분석**

[0632] 죽상동맥경화 혈관 내의 Ad5PPE-1 백터의 효율 및 특이성을 실험하기 위해, 10^{10} pfu/ml 농도의 바이러스 백터가 6개월령의 ApoE 결핍 마우스(Plump, A.S. et al. Cell; 1991; 71:343-353) 내에 전신 주입되었다.

[0633] ApoE 결핍 마우스는 노화됨에 따라 지질이 많은 먹이를 주지 않아도 높은 콜레스테롤 치 및 광범위한 죽상경화형 플레이크를 발생한다. 도 43은 수단-IV에 의해 염색된 ApoE 결핍 마우스로부터 절제된 대동맥 사진이다. 흉대동맥은 소규모 적색으로 염색된 죽상 병소(lesions)를 보유하고, 복부 영역은 심하게 죽상경화되어 있는 것에 주목할 것. (도 43의 출전: Imaging of Aortic atherosclerotic lesions by 125I-HDL and 125I-BSA. A. Shaish et al, Pathobiology - Pathobiol 2001;69:225-9).

[0634] 도 44는 ApoE 결핍 마우스에 Ad5PPE-1Luc(백색 막대; n=12) 및 Ad5CMVLuc(흑색 막대; n=12)의 전신 주입 후 5일 경과시 관찰된 루시페라제 발현을 요약한 것이다. 실험 결과는 소규모 죽상경화 병소를 보유하는 흉부 영역 및 대규모 죽상경화 병소를 보유하는 복부 대동맥 내의 절대 루시페라제 발현으로서 표시되었다.

[0635] PPE-1 프로모터에 의해 제어되는 루시페라제 발현은 죽상경화가 심한 복부 내에서 대조군인 CMV 프로모터의 제어 하의 발현에 비해 6배 높았고, 죽상 경화가 가벼운 흉대동맥에서는 1.6배 높았다.

[0636] Ad5PPE-1Luc 주입된 마우스 내의 2개의 대동맥 영역 사이에서 상당한 차이는 관찰되지 않았고, 한편 병소를 보유하는 복대동맥 내의 낮은 발현에 비해 Ad5CMVLuc 주입된 그룹의 흉대동맥 내에서는 높은 수준의 루시페라제 발현이 관찰되었다.

[0637] 이들 결과는 구성적 프로모터(CMV)는 죽상경화가 가장 심한 영역에서 활동이 정지되는 경향을 가진다는 것과 PPE-1 프로모터는 질환의 진행에 비교적 영향을 받지 않는다는 것을 나타낸다.

[0638] **실시예 26**

[0639] **창상치유 모델에서 PPE-1 프로모터의 분석**

[0640] 치유 중인 창상 혈관에 대해 루시페라제 발현을 유도하는 Ad5PPE-1 구축물의 효율 및 특이적 활성을 분석하기 위해, 전술한 물질 및 방법란에 기술된 바와 같은 쥐과동물의 창상치유가 이용되었다.

[0641] 다른 실험에서와 마찬가지로, 비조직 특이적 대조군으로서 Ad5CMVLuc가 사용되었다. PPE-1 프로모터(도 45; 백색 막대)의 제어 하의 루시페라제 활성은 CMV 제어(도 45; 흑색 막대) 하에서 관찰된 활성에 비해 정상 부위 (6.8 ± 3.2) 및 치유중인 창상 부위(5 ± 1.6)에서 모두 높았다.

[0642] CMV 및 PPE-1 프로모터는 모두 치유 중인 창상 영역 내에서 감소된 발현 수준을 나타내므로 이들 결과는 해석이 곤란하다. 이와 같은 예상치 않은 관찰에도 불구하고, PPE-1 프로모터는 정상 조직 및 치유 중인 조직의 모두에서 CMV 프로모터에 비해 높은 발현 수준을 유도하는 것이 분명하다. 괴사성 상처 조직(necrotic scar tissue)이 존재하는 것은 치유 중인 창상 내의 양 프로모터의 발현 수준의 감소 원인이 될 수 있다.

[0643] **실시예 27**

[0644] **허혈 근육 혈관에 대한 VEGF 및 PDGF-B의 표적화된 발현**

[0645] 혈관신생의 인비보 유도에 의해 내피세포로 구성되는 원시 혈관망이 형성되는 경우가 많다. 이들 신생 혈관은 쉽게 파열되고, 퇴행, 누혈 및 빈약한 관류의 경향이 있다. 이들 문제를 극복하기 위해, 내피세포뿐 아니라 주피세포(즉, 소규모 혈관의 주피세포 또는 대규모 혈관 내의 평활근 세포)를 회복시켜줄 수 있는 다양한 혈관신생 인자의 국부적, 지속적, 투여량 조절되는 운반이 필요하다.

[0646] 개질 프리엔도셀린-1 프로모터인 PPE-1-3X가 허혈지 근육의 내피세포 내에 평활근 세포를 분비의 기점(origin of secretion)을 향해 회복시킴으로써 신생 혈관의 과도한 투과성을 방지하는 내피세포 분비 인자인 VEGF 또는 PDGF-B를 발현하도록 사용되었다.

[0647] 허혈 조직 내의 VEGF 및 PDGF-B의 발현을 결정하기 위해, 인시츄 하이브리다이제이션(*in-situ hybridization*)이 수행되었다. 도 54A 내지 도 54C에 도시된 바와 같이, Ad5PPE-1-3XVEGF 처리된 마우스로부터 채취한 허혈 근육 조직 내에서 VEGF mRNA의 상당한 발현이 검출될 수 있었으나, Ad5CMVVEGF 또는 생리식염수 처리된 마우스의 근

육 단편에서는 본질적으로 신호를 볼 수 없었다. 마찬가지로, Ad5PPE-1-3XPDGF-B 처리된 마우스의 허혈지 근육 내에서는 PDGF-B의 mRNA의 존재가 검출되었으나, Ad5CMVPDGFB 또는 생리식염수 처리된 마우스 내에서는 검출되지 않았다(도 54E 내지 도 54G). 도 12A 내지 도 12E의 신호의 패턴은 혈관구조를 닮아있는 것이 흥미롭다. 특히, 다양한 처리 그룹으로부터 채취한 간장 단편(liver sections)의 실험에서 Ad5CMV 처리된 마우스(도 54D 및 도 54H) 내에서 VEGF 또는 PDGF-B의 대규모 발현이 입증되었으나, Ad5PPE-1-3X 벡터 처리된 마우스(데이터는 표시되지 않음)의 간장 내에서는 발현이 전혀 검출되지 않았다.

[0648] 종합하면, 상기 실험은 Ad5PPE-1-3X는 표적 장기 내의 혈관신생 인자의 측정이 가능한 발현을 조정하는 한편 상기 구성적 Ad5CMV 벡터는 거의 배타적으로 간장 조직 내에서만 도입유전자를 발현했다는 것을 시사하는 것이다.

실시예 28

PPE-매개된 VEGF 발현에 의한 강화된 혈관신생

[0649] Ad5PPE-1-3XVEGF의 치료효과가 종래 보고된 Ad5CMVVEGF의 치료효과와 비교되었다. 10^9 PFU 농도의 치료 벡터 및 레포터 벡터 Ad5CMV루시페라제 및 대조로서 동일 체적의 생리식염수가 대퇴동맥 결찰 후 5일 경과시의 마우스에 전신 투여되었다. 양쪽 허혈지의 내측면의 초음파(US) 화상이 혈관조영 모드에서 활성화되었다. 도 38A 내지 도 38D에 도시된 바와 같이, 결찰 후 21일 경과시 관류신호(signal of perfusion)는 감쇄되었고 대조군 마우스에서 절두형(truncated)이 되었다. 그러나, Ad5PPE-1-3XVEGF 및 Ad5CMVVEGF 처리된 마우스에서는 초음파 화상 내에 연속되고 강화된 신호가 나타났다. 2개의 VEGF 처리 그룹 내의 21일째의 평균 관류 강도(mean intensity of perfusion)는 대조군($p<0.01$)의 것에 비해 3배 높았고, 마우스의 반대측의 정상지(normal limbs)(도 38E)의 것과는 유사하였다. 대퇴동맥 결찰 후 21일 경과시 항 CD-31(내피세포 특이적 표지)를 이용하여 수행된 면역조직화학 분석에 의하면 Ad5CMVVEGF 처리된 그룹에서는 585개의 CD31+세포/ mm^2 , 대조 그룹에서는 485개의 CD31+세포/ mm^2 가 각각 검출되었는데 비해(도 38F), Ad5PPE-1-3XVEGF 처리된 마우스의 허혈 근육 단편 내에서 평균 546개의 CD31+세포/ mm^2 가 검출되었다. 이 데이터는 Ad5PPE-1-3XVEGF를 이용한 단기치료는 Ad5CMVVEGF의 강력한 CMV 프로모터를 이용한 치료와 동일한 효과를 가진다는 것을 보여준다. 또, H&E으로 염색된 마우스의 간장 단편은 간염이나 기타 병리학적 만성 변화(데이터는 표시되지 않음)를 보이지 않았고, 그 결과 간세포 상에 미치는 아데노바이러스의 지향 효과(tropic effect)가 배제되었다.

실시예 29

PPE-조절 발현에 의한 VEGF 유전자 치료의 지속 효과

[0650] 혈관신생유발 인자들의 조직 특이적 발현 대 구성적 발현은 혈관신생의 유도에 관련한 문제가 취급되었다. 관류 및 혈관신생에 미치는 PPE-조절된 VEGF 발현 및 CMV-조절된 VEGF 발현의 효과가 70일간의 장기간 실험을 통해 분석되었다. 전술한 바와 같이 허혈지를 보유하는 마우스가 처리되었다(실시예 28 참조). 초음파 화상은 바이러스 투여 후 1-2주에서 시작되는 양 처리 그룹의 관류 개선이 크게 향상되었음을 보여주었고, 대조군에서는 약간의 변화가 검출되었다(데이터는 표시되지 않음). Ad5PPE-1-3XVEGF 처리의 장기 효과는 대퇴동맥 결찰 후 50일 경과시 및 60일 경과시에 검출되었다. 관류는 Ad5CMVVEGF 처리된 마우스나 생리식염수 처리된 마우스에 비해 Ad5PPE-1-3XVEGF 처리된 마우스 내에서 상당히 증대되었다. Ad5CMVVEGF 처리된 마우스와 대조 처리된 마우스 사이의 관류의 차이는 상기 시간 간격의 경과에 따라 감소되었다. 50일째에, mean intensity of perfusion in the Ad5PPE-1-3XVEGF 처리된 그룹의 평균 관류 강도는 Ad5CMVVEGF 처리된 마우스 또는 생리식염수 처리된 마우스에 비해 약 50% 높았고, 반대측 정상지($p<0.01$, 도 55A)의 것과는 유사하였다. 70일째의 마우스의 희생시, Ad5PPE-1-3XVEGF 처리된 마우스의 근육 단편의 모세혈관의 밀도는 747 CD31+세포/ mm^2 였고, 이 수치는 Ad5CMVVEGF(474 CD31+세포/ mm^2) 그룹 및 대조군(342 CD31+세포/ mm^2)의 것에 비해 각각 57% 및 117% 높은 것이다($p<0.01$, 도 55B).

실시예 30

[0656] PPE-프로모터의 내피세포 특이적 PDGF-B 발현에 의한 강화된 혈관신생

PDGF-B는 파라크린(paracrine) 내피세포 분비된 인자로서, 이것은 평활근 세포의 회복에 의한 혈관 성숙 및 아마도 혈관신생에 관여하는 것으로 입증되어 있다[Edelberg, J.M. et al. *Circulation* 105, 608-13. (2002); Hsu et al. *J Cell Physiol* 165, 239-45. (1995); Koyama, N. et al. *J Cell Physiol* 158, 1-6. (1994)]. 또, PDGF-B는 혈관내막 비후(intimal thickening)[Sano, H. et al. *Circulation* 103, 2955-60. (2001); Kaiser, M., et al. *Arthritis Rheum* 41, 623-33. (1998)] 및 섬유아세포 증식[Nesbit, M. et al. *Lab Invest* 81, 1263-74. (2001); Kim, W.J. et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1364-72. (1999).]에 관련되는 것이 입증되었다. 내피세포 특이적 조절 하에서 혈관신생을 유도하는 PDGF-B의 능력은 인비트로 및 인비보 상태에서 측정되었다.

[0658] Ad5PPE-1-3XPDGFB Ad5PPE-1-3XVEGF(데이터는 표시되지 않음)와 마찬가지로 인비트로에서 내피세포 내의 혈관신생 변화를 유도하였다. 10 MOI의 Ad5PPE-1-3XPDGFB를 보유하는 피브린 코팅된 컬쳐웨어(fibrin coated cultureware) 상에서 배양된 내피세포의 트랜스덕션에 의해 2차원 원형 구조가 형성되고 피브린이 분해되었다.

[0659] 인비보 효과를 위해, 마우스들은 대퇴동맥 결찰 후 5일 경과시 10^9 PFU 농도의 Ad5PPE-1-3XPDGFB가 전신 주입되었다. 결찰 후 30일 경과시 Ad5PPE-1-3XPDGFB 처리된 마우스의 평균 관류 강도는 대조군의 것에 비해 약 90% 높았다(도 56A). 결찰 후 80일 경과시 Ad5PPE-1-3XPDGFB 처리된 마우스의 평균 관류 강도는 대조군의 것에 비해 약 60% 높았다(도 56B).

[0660] 모세혈관 밀도는 결찰 후 35일 경과시 및 90일 경과시에 측정되었다. 단시간 간격에서, Ad5PPE-1-3XPDGFB 처리된 마우스의 혈관 근육 단편 내의 평균 모세관 밀도는 516 CD31+세포/mm^2 였고, 생리식염수 처리된 마우스의 것은 439 CD31+세포/mm^2 였다(도 56C). 결찰 후 90일 경과시의 Ad5PPE-1-3XPDGFB 처리된 마우스 평균 모세혈관 밀도는 566 CD31+세포/mm^2 까지 약간 증가되었으나, 대조군 내에서는 약간의 감소가 검출되었다(378 CD31+세포/mm^2 , 도 56D).

[0661] 이들 결과는 Ad5PPE-1-3XPDGFB 벡터는 그 자체가 강력한 혈관신생 치료제로서, 이것은 투여 후 단기간 내에 혈관신생을 유도할 뿐 아니라 장기간 동안 치료적 효과를 유지할 수 있다는 것을 나타낸다. Ad5PPE-1-3XPDGFB 처리된 마우스의 간장에서는 만성적 변화가 검출되지 않았다.

[0662] 실시예 31

[0663] 내피세포 내의 PDGF-B 발현에 의한 혈관 성숙

[0664] VEGF 및 PDGF-B의 양자의 병행 요법에 의해 혈관신생의 강화 및 혈관성숙이 달성될 수 있다는 가정은 다음의 두 가지 치료 방법을 이용하여 조사되었다: (i) 10^9 PFU의 Ad5PPE-1-3XVEGF 및 Ad5PPE-1-3XPDGFB의 단독 투여; (ii) Ad5PPE-1-3XVEGF의 투여 후 5일 경과시 유사한 양의 Ad5PPE-1-3XPDGFB의 투여. 양 치료 방법은 결과가 동일하였으므로 같은 것으로 불려진다. 결찰 후 90일 경과시, 병행요법과 Ad5PPE-1-3XVEGF 처리된 마우스의 양자는 대조군인 Ad5PPE-1-3XGFP 처리된 마우스에 비해 상당히 높은 모세혈관 밀도를 나타냈으나, 다양한 치료군(도 57B) 중에서는 상당한 차이가 존재하지 않았다. 그러나, 병행치료 그룹 내의 초음파 화상 내의 평균 관류 강도는 Ad5PPE-1-3XVEGF 처리된 그룹에 비해 최대 42%까지 높았다(도 57A). 이와 같은 결과는 병행요법 그룹 및 Ad5PPE-1-3XPDGFB 처리된 마우스의 혈관 근육 내의 소혈관의 성숙에 의해 설명될 수 있다. 병행요법 또는 Ad5PPE-1-3XPDGFB 처리된 마우스로부터 채취된 근육 단편 내의 α -Smactin을 위한 면역염색된 혈관 평활근 세포에서는 상당한 정도의 염색이 관찰되었다(도 57C 및 도 57D). 대조군 마우스 및 Ad5PPE-1-3XVEGF 처리된 마우스 내에서는 희박한 염색이 관찰되었다(도 57E 및 도 57F). 정상지 근육 내의 보다 큰 세동맥(arterioles) 및 소정맥(venules)의 주변에는 현저한 염색이 존재하였다(도 57G). Ad5PPE-1-3XPDGFB 처리된 마우스 내에서 결찰 후 35일 경과시와 같은 조기에 유사한 결과가 얻어졌다(데이터는 표시되지 않음). 결찰 후 35일 경과 된 처리 마우스의 간장 단편에서는 뚜렷한 만성적 변화가 관찰되지 않았다.

[0665] 이들 결과는 결찰 후 50일 경과시의 혈액 관류에 미치는 PDGF-B 단독의 효과 및 병행요법의 효과를 분석하는 별도의 실험에 의해 더욱 확증되었다. 도 58에 도시된 바와 같이, 결찰 후 50일 경과시, 병행요법 그룹 내의 혈액 관류 강도는 정상지의 것과 완전히 닮아있었다. 양 성장 인자의 구성적 발현(CMV 프로모터)가 1/2의 관류

능력만을 나타내므로 상기 효과는 PPE-3X 의존성이다. PDGF-B 단독의 PPE-3X 의존성 발현은 병행요법에 의해 유도되는 관류와 거의 동일한 관류가 생성되도록 조절할 수 있다(즉, 77 %)는 것은 흥미롭다. 그러나, 이와 같은 결과는 구성적 프로모터의 사용시에는 명백하게 나타나지 않는다.

[0666] 이들 결과는 PPE-1-3X 프로모터는 전신 투여에도 불구하고 혈관신생 내피세포 내의 우선 발현을 손상시킴이 없이 치료 유전자의 강력하고 충분하게 활성화시킬 수 있다는 것을 확증해 준다. 더욱, 이들 결과는 PDGF-B가 VEGF와 같은 확립된 혈관신생 성장 인자를 추가로 첨가하지 않은 상태에서 혈관신생 작용을 조절할 수 있는 혈관신생유도 인자라는 것을 입증해준다.

실시예 32

AdPPE-1(3x)-TK 벡터의 구축 및 특성분석

[0667] HSV-TK/GCV는 가장 널리 연구되고 실시되는 종양축소 유전자-드러그(cytoreductive gene-drug)의 조합이다. HSV-TK 포함 플라즈미드에 의해 트랜스펙션되거나 HSV-TK 포함 벡터에 의해 트랜스డ션된 세포는 아시클로비르(aciclovir), 간시클로비르(ganciclovir; GCV), 발시클로비르(valciclovir) 및 팜시클로비르(famciclovir)를 포함하는 드러그 슈퍼 패밀리(drug super-family)에 대해 민감성을 가지게 된다. 구아노신 유사체(guanosine analog)인GCV는 TK와의 병용시 가장 활성이 높은 드러그이다. HSV-TK 양성 세포는 GCV를 GCV 모노포스페이트(GCV monophosphate; GCV-MP)로 인산화시키는 효율이 인간 TK에 비해 수천배나 높은 바이러스 TK를 생산한다. GCV-MP는 천연 티미딘 카나제(native thymidine kinase)에 의해 GCV 디포스페이트로 인산화된 후, 최종적으로는 GCV 트리포스페이트(GCV triphosphate; GCV-TP)로 인산화된다.

[0668] 먼저, 2개의 플라즈미드가 준비되었다. 하나의 플라즈미드는 개질 쥐과동물 프리-프로엔도셀린-1(PPE-13x) 프로모터에 의해 제어되는 HSV-TK를 포함하는 것으로서, 인비트로에서 PPE-1(3x) 프로모터에 의해 제어되는 유전자의 효능을 검사하기 위해 준비되었다. PPE-1(3x) 프로모터 및 아데노바이러스 배열에 의해 제어되는 HSV-TK 유전자를 포함하는 더 큰 플라즈미드는 상동적 재조합에 의한 바이러스 벡터의 생성을 위해 준비되었다. 상기 HSV-TK 유전자(1190 bp)는 2개의 제한효소에 의해 4348 bp의 플라즈미드 pORF-HSV1TK로부터 분해되었다. SalI 제한 부위는 HSV-TK 유전자의 5' 말단에 대향하는 위치에 있고, EcoRI 부위는 3' 말단에 대향하는 위치에 있다. 상기 HSV-TK 유전자는 삽입된 유전자의 상류측의 NotI 제한 부위를 보유하는 3400 bp의 플라즈미드인 pBluescript-SK의 다중 클로닝 부위에 결합되었다(HSV-TK 유전자의 3' 말단의 대향부). 상기 SalI 부위는 클레노 처리(Klenow procedure)되었고, NotI 링커(linker)는 HSV-TK 유전자의 5' 말단에 결합되었다. 상기 HSV-TK 유전자(2개의 NotI 제한 부위가 측방에 위치하는)는 전술한 2개의 플라즈미드 pEL8(3x)-Luc 및 pACPPE-1(3x)-GFP의 NotI 제한 부위 내에 결합되었다.

[0669] 1. 1842 bp의 루시페라제 유전자 대신, pEL8(3x)-Luc라고 명명된 8600 bp의 플라즈미드. 이 플라즈미드에서 2개의 NotI 제한 부위가 측방에 위치한다. pEL8(3x)-TK 플라즈미드는 PPE-1(3x) 프로모터, HSV-TK 유전자, SV-40 폴리-아데닐화 부위 및 쥐과동물 엔도셀린-1 유전자(도 60a)의 제1인트론을 포함한다.

[0670] 2. 1242 bp의 녹색 형광 단백질(GFP) 유전자 대신, 11946 bp의 플라즈미드 pACPPE-1(3x)-GFP. 이 플라즈미드에서 2개의 NotI 제한 부위가 측방에 위치한다(도 60b).

[0671] **개질된 쥐과동물 프리-프로엔도셀린-1 프로모터에 의해 제어되는 HSV-TK 유전자로 무장된 아데노바이러스-5 벡터의 구축.** AdPPE-1(3x)-TK로 명명된 복제능 결핍형 벡터(replication-deficient vector)가 제1세대(E1 유전자는 삭제되고, E3는 미완성인 상태) 아데노바이러스-5 벡터에 기초하여 구축되었다. 재조합 벡터가 종래의 주지의 클로닝 기법을 이용하여 인간 태아 신장-293 세포주(HEK-293) 내에 pACPPE-1(3x)-TK 플라즈미드 및 pJM-17(40.3 kb) 플라즈미드를 공동 트랜스펙션하는 것에 의해 제조되었다. 상기 pJM-17 플라즈미드는 E1 유전자를 제외한 전체 아데노바이러스-5 계놈을 포함한다. 상기 HEK-293 세포주는 trans 상태의 E1 유전자를 보유하므로 상기 E1 삭제를 보상해 준다. 40개의 상동적 재조합 중의 하나는 AdPPE-1(3x)-TK 벡터를 유도하였다.

[0672] ***AdPPE-1(3x)-TK 벡터의 특성분석.*** 재조합 아데노바이러스 내의 TK 도입유전자 및 프로모터의 존재를 확인하기 위해 바이러스 DNA에 대해 PCR 분석이 수행되었다. 2개의 프라이머(primers)가 사용되었다: 포워드 프라이머(forward primer) 5'-ctcttgattttgaactctg-3' (프리-프로엔도셀린 프로모터 배열에서 455-474 bp)(배열번

호:9) 및 리버스 프라이머(reverse primer) 5'-taaggcatgccatgttat-3' (HSV-TK 유전자 배열에서 1065-1084 bp)(배열번호:10). 기타 당 연구소에서 생산된 벡터 프라이머들은 상기 벡터의 순도를 검증하기 위해 사용되었다. 대략 1 kb의 띠(band)는 AdPPE-1(3x)-TK 바이러스(도 61) 내의 PPE-1(3x) 프로모터 및 HSV-TK 유전자의 존재를 입증해 주었다. 그러나, 구축된 아데노바이러스 벡터의 기타 프라이머 중 어느 것도 생성물을 제공하지 않았다. 따라서, 상기 벡터는 순수한 콜로니였다.

[0675] 상기 바이러스는 단일 바이러스 클론을 단리하기 위해 HEK-293 세포 내에서 더욱 정제되었다.

[0676] Viral DNA of AdPPE-1(3x)-TK의 바이러스 DNA는 자외광 하에서 형광을 발하도록 화학적으로 개질된 디데옥시 뉴클레오티드(dideoxy nucleotides)의 존재 하에서 환상 배열 반응(cycle sequencing reactions)에 의해 배열되었다. 4개의 프라이머를 이용하여 전체 도입유전자의 존재가 검증되었다:

[0677] 1. "3x" 엘리먼트에 선행하는 포워드 프라이머 5'-ctcttgattttgaactctg-3' (프리-프로엔도셀린 프로모터 내의 455-474 bp)(배열번호:9).

[0678] 2. 리버스 프라이머 5'-gcagggctaagaaaaagaaa-3' (프리-프로엔도셀린 프로모터 내의 551-570 bp)(배열번호:11).

[0679] 3. 포워드 프라이머 5'-tttcttttcttagccctgc-3' (프리-프로엔도셀린 프로모터 내의 551-570 bp)(배열번호:12).

[0680] 4. HSV-TK 유전자 내의 리버스 프라이머 5'-taaggcatgccatgttat-3' (HSV-TK 유전자 내의 1065-1084 bp)(배열번호:10).

[0681] 프라이머 1(배열번호:9) 및 프라이머 3(배열번호:10) 단독에 의해서는 생성물이 얻어지지 않았으므로, 프라이머 2(배열번호:11) 및 프라이머 3(배열번호:12)가 사용되었다. 실험 결과 *Mus musculus* Balb/c 프리-프로엔도셀린-1 유전자(프로모터 영역 gi|560542|gb|U07982.1|MMU07982[560542](배열번호:1))에 대해 99%의 동일성을 나타냈고, 단순 포진 바이러스(*herpes simplex virus*) gi|59974|emb|V00470.1|HERPES[59974]의 티미딘 키나제 유전자에 대해 99.4%의 동일성을 나타냈다. AdPPE-1(3X)의 배열은 도 92에 상세히 도시되어 있다.

[0682] 상기 3x 배열(도 93)은 내피세포 특이적 양성 전사 엘리먼트의 3중 반복(triplicate repeat)을 포함한다. 이 145 bp의 배열 내에 2개의 완전한 내피세포 특이적 양성 전사 엘리먼트와 전술한 바와 같이 역순의 2개의 단편으로 절단된 하나의 배열이 존재한다.

[0683] **제어 벡터.** PPE-1(3x) 프로모터가 결핍된 아데노바이러스 및 Luc 유전자가 결핍된 아데노바이러스의 2가지 바이러스가 AdPPE-1(3X) 벡터의 대조군의 역할을 위해 구축되었다. AdCMV-TK 벡터(비조직 특이적 프로모터 대조로서 사용됨)는 초기 시토메갈로바이러스(early cytomegalovirus; CMV) 프로모터(도 62c)에 의해 제어되는 HSV-TK 유전자를 포함한다. AdPPE-1(3x)-Luc 벡터는 개질된 쥐과동물 프리-프로엔도셀린-1 프로모터(도 62b)에 의해 제어되는 루시페라제(Luc) 유전자를 포함한다. 바이러스는 대규모 배치에서 성장되었고, 10^9 - 10^{12} 입자/ml의 농도로 -20°C에 보관되었다.

실시예 33

[0684] **간시비르 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 세포독성: 인비트로에서 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 우수한 내피세포 세포독성**

[0685] 내피세포주 내에서 AdPPE-1(3x)-TK의 특이적 내피세포-표적의 세포독성이 인비트로에서 대조 벡터인 AdCMV-TK 및 AdPPE-1(3x)-Luc와 대비함으로써 분석되었다.

[0687] **AdPPE-1(3x)-TK+GCV는 낮은 감염다중도(moi)에서 세포독성을 가진다:** 소의 대동맥혈관 내피세포(BAECs)가 0.1, 1, 10, 100, 및 1000의 감염다중도(moi)로 AdPPE-1(3x)-TK, AdCMV-TK 및 AdPPE-1(3x)-Luc에 의해 트랜스데션되었다. 트랜스데션 후 4시간 경과시 GCV(1 μg/ml)가 첨가되었다. 대조군은 GCV가 없는 벡터 또는 벡터가 없는 GCV에 의해 트랜스데션된 세포로 하였다. 양 대조군은 세포사를 유발하지 않았다(데이터는 표시되지 않음). AdCMV-TK에 비해 상당히 낮은 moi에서, AdPPE-1 (3x) + GCV 처리된 세포의 세포독성을 특징화하는 형태변화(세

포 확대, 신장 및 팽창) 및 명백한 컨플루언스 손실에 주목할 것. AdPPE-1 (3x)-Luc에 의해 트랜스데션된 세포는 정상의 상태(소형, 원형 및 컨플루언트; 도 63 참조)를 유지하였다. 크리스털 바이올렛 염색(도 64)에 의해 측정된 세포 생존능력의 평가는 AdPPE-1(3x)-TK 벡터 및 GCV 투여를 병용하면 강력한 구성적 CMV 프로모터에 의해 제어되는 TK 유전자에 비해 BAE 세포 내에서 낮은 moi에서 더 강력한 세포독성을 나타낸다는 것을 확인해 주었다.

[0688] ***AdPPE-1(3x)-TK+GCV는 낮은 농도의 GCV에서 세포독성을 가진다:*** 전술한 바와 같이 소 대동맥혈관 내피세포 (BAECs)가 AdPPE-1(3x)-TK, AdCMV-TK 및 AdPPE-1(3x)-Luc에 의해 감염다중도 10으로 트랜스데션되고, 트랜스데션 후 4시간 경과시 증가하는 농도의 GCV($0.001\text{-}10 \mu\text{g/ml}$)에 노출되었다.

[0689] GCV가 없는 벡터 또는 벡터가 없는 GCV에 의해 트랜스데션된 대조군 세포는 임의의 농도에서 세포사를 유발하지 않았다(데이터는 표시되지 않음).

[0690] AdCMV-TK에 노출된 세포(중간 시리즈(middle series))에 비해 상당히 낮은 농도의 GCV에서, AdPPE-1 (3x) + GCV 처리된 세포(도 65)의 세포독성을 특징화하는 형태변화(세포 확대, 신장 및 팽창) 및 명백한 컨플루언스 손실에 주목할 것.

[0691] 크리스털 바이올렛 염색(도 66)에 의해 측정된 세포 생존능력의 평가는 AdPPE-1(3x)-TK 벡터 및 GCV 투여를 병용하면 강력한 구성적 CMV 프로모터에 의해 제어되는 TK 유전자에 비해 BAE 세포 내에서 낮은 GCV 농도에서 더 강력한 세포독성을 나타낸다는 것을 확인해 주었다.

[0692] ***AdPPE-1(3x)-TK+GCV 세포독성은 내피세포 특이성을 가진다:*** 내피세포에 대한 AdPPE-1(3x)-TK 벡터의 특이성 및 효능을 평가하기 위해, 내피세포[소 대동맥혈관 내피세포(BAEC), 인간 제대정맥 내피세포(HUVEC)] 및 비내피세포[인간 간암 세포(HepG-2), 인간 정상 피부 섬유아세포(NSF)]가 AdPPE-1(3x)-TK, AdPPE-1(3x)-Luc 또는 AdCMV-TK에 의해 moi =10으로 트랜스데션되었고, 트랜스데션 후 4시간 경과시 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 GCV가 투여되었다. 트랜스데션 후 4일 경과시 세포독성 및 세포 형태 변화가 검출되었다. AdPPE-1(3x)-TK + GCV는 특히 BAEC 및 HUVEC 내에서 세포독성을 유발하였고, AdCMV-TK + GCV는 HepG-2에서만 세포독성을 유발하였다. NSF는 모든 벡터의 moi = 10에서 저항성을 구비하였다. AdPPE-1(3x)-Luc + GCV는 모든 세포 유형에 대해 비독성이었다(도 67). 크리스털 바이올렛 염색(도 68)에 의해 측정된 세포 생존능력의 평가는 AdPPE-1(3x)-TK 벡터 및 GCV 투여를 병용하면 강력한 구성적 CMV 프로모터(AdCMV-TK + GCV)에 의해 제어되는 TK 유전자의 비특이적 세포독성에 의해 시너지 효과를 가지는 내피세포 특이적 세포독성을 나타낸다는 것을 확인해 주었다.

[0693] 비내피 NSF 세포가 AdPPE-1(3x)-TK, AdPPE-1(3x)-Luc 또는 AdCMV-TK에 의해 높은 moi (=100)에서 트랜스데션되고, 트랜스데션 후 4시간 경과시 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 GCV가 투여되면, 세포 형태에 미치는 AdPPE-1(3x)-TK+GCV의 효과가 전혀 관찰되지 않았다(도 69).

[0694] 이에 비해, 강력한 CMV 프로모터(AdCMV-TK+GCV)의 제어 하의 TK에 의해 처리된 세포는 강력한 비특이적 세포독성을 보여줌으로써, 극히 높은 감염다중도에서도 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 내피세포 선택적 세포독성 및 간시클로비르 투여를 확인해 주었다.

[0695] 종합하면, 이들 결과는 AdPPE-1(3x)-TK 벡터가 인간 내피세포를 포함한 내피세포의 사멸을 특이적으로 유도할 수 있다는 것을 최초로 밝힌 것이다. 더욱, AdPPE-1(3x)-TK 벡터는 GCV 프로드러그에 의해 충분히 제어되고, 비교적 낮은 GCV 농도에서 상당한 활성을 가진다. 마지막으로, 상기 아데노바이러스 벡터의 내피세포 트랜스데션 효능이 비록 낮지만, 내피세포 사멸의 효과는 크다.

실시예 34

[0696] **간시클로비르 투여 및 PPE-1 프로모터 제어 하의 TK의 치료적 효과: 인비보에서 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 우수한 내피세포 세포독성**

[0697] AdPPE-1(3x)-TK의 특이적 내피세포 표적화 세포독성의 치료적 효능이 인비보 상태에서 암의 형성 및 전이성 성장의 동물 모델에서 GCV 및 대조 벡터인 AdCMV-TK 및 AdPPE-1(3x)-Luc의 전신 투여와 대비함으로써

[0699]

PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 인비보 발현 및 간시클로비르(GCV) 투여에 의한 루이스 폐암(LLC)의 전이 성장의 억제의 시너지 효과: 루이스 폐암은 전이의 가능성이 높은 심각한 악성 암의 양호한 특성을 가진 동물 모델이다. 내피세포 프로모터인 Tie/Tek 및 GCV (dePalma et al, Nat Med 2003;9:789-795) 및 VEGF 프로모터 및 인비트로의 GCV(Koshikawa et al Canc Res 2000;60:2936-41)를 보유하는 시코카인(cytokine) IL-2 (Kwong et al , Chest 119;112:1332-37)를 이용하여 HSV-TK의 병행요법이 시도되었다. AdPPE-1(3x) and GCV on metastatic disease, AdPPE-1(3x) 및 GCV 전신 투여가 전이성 질환에 미치는 효과를 분석하기 위해, 좌측 발에 종양 세포를 접종하는 것에 의해 LLC 폐전이가 유도되었고, 프라이머리 종양이 발생되는 즉시 발이 절단되었다. 프라이머리 종양 제거 후 5일 경과시 아데노바이러스 백터[AdPPE-1(3x)-TK + GCV; AdCMV-TK + GCV; GCV 가 없는 AdPPE-1(3x)-TK]가 정맥 투여되었다.

[0700]

마우스 배제(mice exclusion)는 다음과 같이 수행되었다: 22 마리는 프라이머리 종양이 발생하지 않았으므로 배제되고, 1 마리는 백터 주입 실패로 인해 배제되고, 8 마리는 폐전이의 흔적이 없는 상태에서 폐사되었다. 배제된 마우스들 중에서 18 마리는 등록 전에 배제되었고, 6 마리는 그룹 1(AdPPE-1(3x)-TK + GCV), 2 마리는 그룹 2(AdCMV-TK + GCV), 3 마리는 그룹 3(AdPPE-1(3x)-TK without GCV), 2 마리는 그룹 4(Saline +GCV)로부터 배제되었다. 마우스들은 백터 주입 후 24일째 회생되었다. 이날 대조군(생리식염수 + GCV 및 GCV가 없는 AdPPE-1(3x)-TK) 내의 마우스 중 25%는 폐전이의 확대로 인해 폐사되었다. 도 70은 처리군 및 대조군으로부터 채취된 대표적인 폐 조직을 보여주는 것으로서, AdCMV-TK + GCV, GCV가 없는 AdPPE-1 (3x)-TK 및 아데노바이러스가 없는 GCV에 의해 처리된 마우스에 비해, AdPPE-1 (3x) -TK+ GCV 처리된 마우스의 폐 내의 상당히 감소된 전이 확대 범위를 보여준다.

[0701]

AdPPE-1(3x)-TK + GCV 처리된 마우스의 회생시의 전이의 평균 중량(전이성 질환의 범위의 표시)은 GCV가 없는 AdPPE-1(3x)-TK에 의해 처리된 마우스의 것에 비해 3.3배 작았다(평균±표준오차: 각각 0.3g±0.04 대 0.8g±0.2; p<0.05). AdCMV-TK + GCV 처리된 마우스 또는 생리식염수 + GCV 처리된 마우스의 전이의 평균 중량은 다른 그룹의 것과 통계적으로 차이가 없었다(도 71).

[0702]

PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 인비보 발현 및 간시클로비르(GCV)의 전이성 폐 조직에 미치는 세포독성 효과: LLC 전이 성장에 미치는 AdPPE-1(3x) 및 GCV 투여의 효과의 기작을 결정하기 위해, 전이 폐로부터 채취된 폐 조직상에 혜마톡실린 및 에오신 염색이 실시되었다(도 72a 내지 도 72c). GCV가 없는 AdPPE-1(3x)-TK 또는 생리식염수 + GCV(도 72a)에 의해 처리된 마우스로부터 채취된 폐전이 내에서 경도의 주변 괴사(peripheral necrosis)가 검출되었다. AdPPE-1(3x)-TK + GCV로 처리된 마우스로부터 채취된 폐 조직으로부터 폐포(alveolar) 및 기관지주위 단핵구 침윤(peribronchial mononuclear infiltrates)이 확인되었으나, GCV가 없는 AdPPE-1(3x)-TK 또는 생리식염수 + GCV로 처리된 마우스로부터 채취된 폐에서는 침윤이 전혀 검출되지 않았다. GCV가 없는 AdPPE-1(3x)-TK 또는 생리식염수 + GCV(도 72b 및 도 72c)로 처리된 마우스로부터 채취된 전이에 비교되는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV 처리된 마우스로부터 채취된 폐전이로부터 단핵구 침윤 클러스터(clusters)가 검출되었다. AdCMV-TK + GCV에 의해 처리된 마우스로부터 채취된 시편 내에서도 최소의 괴사 및 단핵구 침윤이 검출되었다. 이 결과는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV가 폐전이에서 중심 괴사 및 단핵구 침윤을 유발한다는 것을 시사하는 것이다.

[0703]

LLC 폐전이에 미치는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV의 억제 효과의 원인이 되는 세포사의 특성을 결정하기 위해, 아폽토시스의 분석용 폐 조직에 대해 TUNEL 및 항-카스파제-3 염색이 실시되었다. GCV가 없는 AdPPE-1(3x)-TK 또는 생리식염수 + GCV(도 73a 및 도 73b)에 의해 처리된 마우스에 비해 AdPPE-1(3x)-TK + GCV 처리된 마우스로부터 채취된 폐전이로부터 다수의 아폽토시스 종양 세포가 검출되었다. AdCMV-TK + GCV 처리된 마우스로부터 채취된 시편에 비해, AdPPE-1(3x)-TK + GCV 처리된 마우스의 폐로부터 채취된 시편의 조직병리학적 단편으로부터 종양 세포의 아폽토시스를 나타내는 상당히 광범위한 DNA 손상(TUNEL, 도 73a) 및 카스파제-3(도 73b)가 입증되었다. 더욱 중요하게도, 전이 폐로부터 채취된 조직병리학적 단편의 TUNEL 및 카스파제-3 염색에 의해 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV가 정맥 주입된 마우스(도 74)의 폐전이의 혈관(내피세포) 영역의 강화된 아폽토시스가 나타났다. 이것은 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 인비보 발현에 의한 전이성 세포 아폽토시스 강화 및 간시클로비르(GCV) 투여의 시너지 효과를 나타낸다. 이 결과는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV의 전신 투여가 종양 세포 아폽토시스를 대량 유발한다는 것을 시사하는 것이다. 더욱, 혈관 내피세포 아폽토시스는 대량의 전이 중심괴사 및 아폽토시스의 기작이 될 수 있다.

[0704]

PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK 발현 및 간시클로비르(GCV) 투여는 인비보 상태의 전이성 질병에서 항-혈관신생 효과를 가진다: CD-31은 혈관신생의 특징적 내피세포 표지(marker)이다. 전신성 AdPPE-1(3x)+GCV의 항전이 효과(anti-metastatic effects)에 대한 내피세포의 관련성을 결정하기 위해 전이성 폐조직에 대해 항 CD-31 염색이 실시되었다. 도 75a 내지 도 75d는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV 처리된 마우스의 폐전이 내의 혈관신생 혈관은 길이가 짧고, 연속성 및 분기가 없고, 경계가 불분명하다는 것을 보여준다(도 75a 내지 도 75c). GCV가 없는 AdPPE-1(3x)-TK로 처리된 마우스 또는 생리식염수 + GCV로 처리된 마우스의 폐전이 내의 혈관신생 혈관은 풍부한 분기(branching) 및 뚜렷한 경계를 가지는 길이가 긴 혈관임이 입증되었다(도 75a). AdCMV-TK + GCV 처리된 마우스의 폐전이 내에서도 AdPPE-1(3x)-TK 처리된 마우스(도시 생략)에 비해 매우 작은 수이기는 하지만 최소의 비정상 혈관구조가 검출되었다. 내피세포의 증식을 위한 상기 혈관신생저항 효과의 특이성은 간장 혈관에 대해 영향을 미치지 않는다는 것에 의해 입증된다(도 75c). 컴퓨터를 이용한 혈관밀도 측정(Image Pro-Plus, Media Cybernetics Incorporated)의 결과 AdPPE-1(3x)-TK + GCV 처리군의 폐전이 내의 소규모 혈관밀도는 GCV가 없는 AdPPE-1(3x)-TK 처리군에 비해 1.5배 작다는 것이 입증되었다($40107.7 \mu\text{m}^2$ 대 $61622.6 \mu\text{m}^2$)(도 75d).

[0705]

종합하면, 이들 결과는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV의 전신 투여는 전이의 중심괴사(central metastatic necrosis) 및 혈관신생 내피세포 아폽토시스의 고도의 선택적 유도(selective induction)를 통해 아폽토시스를 유발한다는 것을 시사한다.

[0706]

Systemic AdCMV-TK + GCV의 전신 투여는 LLC 폐전이를 보유하는 마우스 내에 간독성(hepatotoxicity)을 유발한다. 아데노바이러스 벡터의 전신 투여의 주요 부작용 중의 하나는 간독성이므로 유도된 LLC 종양을 보유하는 C57BL/6 마우스 내에서 간의 형태가 분석되었다. 처리된 간장 조직 및 대조 간장 조직의 혜마톡실린 및 에오신 염색된 단편을 분석한 결과, 구성적 프로모터인 AdCMV-TK + GCV의 제어 하에서 TK로 처리된 마우스로부터 채취된 간장은 문맥 및 문맥주변의 단핵구 침윤물 및 소규모의 컨플루언트 괴사영역(confluent necrotic areas)를 나타내고, AdPPE-1(3x)-TK+GCV로 처리된 마우스 및 대조군은 최소의 단핵구 침윤물 및 간세포 핵 비대(도 76)를 나타낸다는 것이 입증되었다. 이들 결과는 CMV 프로모터의 제어 하의 TK의 구성적 발현이 명백한 간독성을 가지는데 비해, 혈관신생 특이적 AdPPE-1(3x)-TK+GCV 처리에서는 간장의 형태에 대한 부작용이 관찰되지 않았다.

[0707]

인비보에서 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 정확한 기관 특이적 발현: PPE-1(3x) 프로모터의 제어 하의 HSV-TK 발현이 미치는 항-전이 효과의 기관 특이성 및 조직 특이성의 범위를 분석하기 위해, 아데노바이러스 벡터에 의해 처리된 LLC 폐전이를 보유하는 마우스의 다양한 기관으로부터 채취된 조직에 대해 HSV-TK 및 β -액틴(actin) 프라이머를 이용한 PCT 분석이 실행되었다.

[0708]

9마리의 15주령의 C57BL/6 수컷 마우스가 사용되었다. LLC 폐전이는 종양 세포를 좌측 발에 접종하여 유도되었고, 프라이머 종양이 발생한 즉시 발이 절단되었다. 프라이머 종양의 제거 후 14일 경과시 아데노바이러스 벡터(AdPPE-1(3x)-TK 및 AdCMV-TK) 또는 생리식염수가 정맥주입되었다. 벡터의 주입 후 6일 경과시 마우스들은 회생되었고, 전술한 바와 같이 채취된 기관으로부터 RNA가 추출되었다. 이 RNA에 대해 역전사 PCT이 수행되었고, HSV-TK 및 β -액틴 프라이머를 이용하여 PCR이 수행되었다. 양성 HSV-TK 발현이 AdPPE-1(3x)-TK 처리된 마우스의 폐 내에서 검출되었고, 간장에서는 HSV-TK 발현이 검출되지 않았다. 대조적으로, 고도의 양성 HSV-TK 발현이 AdCMV-TK 처리된 마우스의 간장에서 검출되었고, 폐에서는 검출되지 않았다(도 77). β -액틴에 대해 수정된 컴퓨터 밀도측정계(Optiquant, Packard-Instruments)에 의해 AdPPE-1(3x)-TK 처리된 마우스의 폐/간장의 발현 비율은 11.3이고, AdCMV-TK 처리된 마우스의 폐/간장의 발현 비율은 5.8이라는 것이 입증되었다. 이들 결과는 AdPPE-1(3x)-TK 처리된 마우스는 혈관신생이 풍부한 기관, 즉 전이성 폐 내에서 HSV-TK 유전자를 압도적으로 발현하고, CMV 프로모터(AdCMV-TK 처리된 마우스)의 제어 하의 TK의 발현은 간장(도 77)과 같은 코자키(Coxsackie) 아데노바이러스 수용체가 풍부한 기관 내에서 현저하다는 것을 입증하는 것이다. 또 강력한 양성 HSV-TK 발현이 AdPPE-1(3x)-TK 처리된 마우스가 고환 내에서 검출되었다. 하나의 가설에 제한됨이 없이, AdPPE-1(3x)-TK 처리된 마우스 내에서의 양성 발현은 생식선 내의 내피세포 프로모터의 높은 발현에 의해 설명될 수 있다. AdCMV-TK 처리된 마우스 내의 양성 발현은 고도의 양성 β -액틴 띠(band)와 유사하게 비교적 높은 RNA 용출에 의해 설명된다. 종합하면, 이들 결과는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV의 전신 투여는 중심 전이 괴사의 유도 및 혈관신생 내피세포 아폽토시스의 선택적 유도를 통해 안전하고 조직 특이적 방식으로 고도의 악성 암의

전이를 억제할 수 있다는 것을 나타낸다.

실시예 35

[0710] 방사선요법과 병행되는 간시클로비르 투여 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK: 인비보에서 내피세포 세포 독성의 시너지 효과

복합 방식의 항암 요법은 약물의 투여량 및 치료기간을 줄여주고 그 결과 부작용을 줄여주는 면에서 그리고 각 치료 기작(참조예, Fang et al, Curr Opin Mol Ther 2003;5:475-82)의 시너지 효과로부터 유발되는 치료 효능의 면에서 개개의 요법에 비해 상당한 이점이 있다. 복합 방식의 치료법에서 AdPPE-1(3x)-TK + GCV 투여의 효능을 시험하기 위해, Balb/C 마우스 내의 느리게 성장하는 프라이머리 CT-26 결장암 및 C57B1/6 마우스 내의 전이성 루이스 폐암에 대해 단일회(single-dose radiotherapy) 방사선요법과 AdPPE-1(3x)-TK + GCV의 전신 투여 요법을 병행한 효과가 평가되었다.

[0712] 단일회 5 Gy 선량의 방사선요법은 비독성이었고, 프라이머리 CT-26 결장암 종양을 보유하는 Balb/C 마우스에 대해 치료효과가 부족하다: 치료효과가 부족하고 비독성인 방사선량을 찾아내기 위해 20 마리의 8주령 BALB/C 수컷 마우스의 좌측 대퇴부에 CT-26의 결장암이 접종되었다. 종양의 직경이 4-6 mm에 도달된 즉시 마우스들은 단일 회 국부 방사선 조사되었다. 4가지 방사선량이 평가되었다: 0 Gy(흑색 원), 5 Gy(백색 원), 10 Gy(흑색 삼각형), 또는 15 Gy(백색 삼각형). 종양 체적[식 $V = \pi / 6x a^2 x \beta$ (a 는 단축, β 는 장축)]에 의해 산출]은 매일 장축 및 단축을 측정하여 평가되었다. 마우스의 건강상태는 관찰 및 체중측정을 통해 매일 모니터링되었다. 10 Gy의 선량 및 15 Gy의 선량은 미처리된 마우스에 비해 종양 진행을 억제하였다(각각 $p=0.039$, $p=0.029$). 그러나, 5 Gy의 선량은 부분적이고 또 통계적으로 중요하지 않은 종양 진행의 지연을 유도하였고(도 78a), 이 5 Gy의 선량에 의해 처리된 마우스에서는 체중감소(도 78b)나 비정상 거동도 검출되지 않았다. 이를 결과에 기초하여, 단일회 5 Gy 선량의 방사선요법이 병행 치료법 실험에서 사용되었다.

[0713] 5 Gy 선량의 국부 조사와 병행된 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 인비보 발현 및 간시클로비르(GCV) 투여에 의한 프라이머리 결장암 종양 진행의 억제: 100마리의 8주령의 수컷 Balb/C 마우스에 CT-26 결장암 종양 세포가 접종되었다. 종양의 크기가 4-6 mm에 달하는 즉시, 10^{11} PFU의 바이러스 벡터[AdPPE-1 (3x)-TK 또는 AdCMV-TK] 가 꼬리 정맥 내에 주입되었고, 14일 동안 매일 GCV가 복강내 주입되었다(100 mg/kg체중). 벡터의 투여 후 3일 경과시, 마우스에 5 Gy 선량의 방사선이 국부 조사되었다. 종양의 체적이 식 $V = \pi / 6x a^2 x \beta$ (a 는 단축, β 는 장축)에 따라 평가되었다. 희생된 마우스가 촬영되었고, 종양 및 간장 시편이 조직분석을 위해 채취되었다.

[0714] AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법은 기타 다른 치료법에 비해 종양의 진행을 억제하였다. 평균 종양 억제 기간은 약 2주였고, 이 기간은 아데노바이러스의 활성의 지속기간과 일치하였다. AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법 처리된 그룹의 평균 종양 체적 진행은 AdPPE-1(3x)-TK + GCV 처리 그룹($p=0.04$) 및 AdCMV-TK + GCV 처리 그룹($p=0.008$)의 것에 비해 작았다. 더욱, 이 그룹(AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법) 내의 평균 종양 체적 진행은 모든 다른 그룹의 누적평균 종양 체적 진행($p=0.0025$), 모든 조사되지 않은(non-irradiated) 그룹의 누적평균 종양 체적 진행(AdPPE-1(3x)-TK + GCV, Ad5CMV-TK + GCV, AdPPE-1(3x)-TK-GCV없음 및 생리식염수 + GCV; $p=0.0005$), 및 다른 조사된 그룹의 누적평균 종양 체적 진행(Ad5CMV-TK + GCV + 방사선요법, AdPPE-1(3x)-TK-GCV없음 + 방사선요법 및 생리식염수 + GCV + 방사선요법; $p=0.041$)(도 79a 및 도 79b)에 비해 작았다. 방사선요법은 비표적화된 벡터인 AdCMV-TK($p=0.04$)(도 79c 내지 도 79f)에 비해 혈관신생 내피세포 전사 표적화된 벡터인 AdPPE-1(3x)-TK만을 상당히 강화시켜주었다. 방사선요법이 없는 상태에서 모든 바이러스 벡터를 이용한 치료방법은 효과가 없었다.

[0715] 종합하면, 이들 결과는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법의 병행요법이 인비보에서 CT-26 결장암 종양 발달에 타월한 시너지적 종양 억제 효과를 발휘한다는 것을 나타낸다.

[0716] AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법의 병행요법은 대량의 종양 괴사를 유발한다: AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사

선요법의 병행요법의 항-종양 효과의 기작을 결정하기 위해, 종양 조직에 대해 혜마톡실린 및 에오신 염색이 실시되었다. 종양 조직은 세포과형성성(hypercellular)이고, 농축되고, 높은 분열지수(mitotic index)를 보유하였다. 모든 그룹에서 괴사 및 괴사영역 내의 육아조직의 2가지 엘리먼트가 검출되었다. 방사선조사가 포함된 치료법에 의해 처리된 마우스로부터 채취된 종양은 방사선조사되지 않은 마우스에 비해 넓은 괴사면적 및 육아조직을 나타냈다. 이들 그룹에서, 괴사(도 80a) 및 육아조직(도 80b)이 가장 지배적이다. AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법에 의해 처리된 마우스는 단편면적의 대략 55%-80%(도 80)으로서 가장 광범위한 괴사 및 육아조직(도 80a 및 도 80b)을 나타냈다. 방사선요법을 사용하지 않은 AdPPE-1(3x)-TK + GCV로 처리된 마우스로부터 채취된 종양은 다른 비조사된 그룹(데이터는 표시되지 않음)에 비해 비교적 넓은 괴사면적을 나타냈다. 이들 결과는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법은 대량의 중심 종양 괴사를 유발하고, 이를 괴사는 부분적으로 육아조직에 의해 치환되는 것을 시사한다.

[0717] AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법은 내피세포 및 대량의 종양 아폽토시스를 유발한다.: AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법이 결장암 조직에 미치는 억제 효과에 기인된 세포사의 특징을 결정하기 위해, 아폽토시스 세포를 입증하기 위해 종양 조직에 대해 TUNEL 및 항-카스파제-3 염색이 수행되었다. TUNEL 염색의 결과 방사선조사된 그룹 내의 중심 괴사 영역을 둘러싸고 있는 아폽토시스 종양 세포가 입증되었다. More apoptotic tumor cells were detected in tumors taken from mice treated with AdPPE-1(3x)-TK + GCV combined with radiotherapy than in any other group (도 30a). 종양 단편의 항-카스파제-3 염색에 의해서도 동일한 아폽토시스 세포 패턴이 검출되었다. 더욱, 아폽토시스 종양 세포(백색 화살표)에 의해 둘러싸여 있는 괴사 영역은 사형상(구불구불한 형상)이고, 독특하게 증대된 혈관밀도를 포함하였다(도 81b). 아폽토시스 영역 내의 혈관의 내피세포는 양성 항-카스파제-3 염색을 나타냈다(도 82).

종합하면, 이들 결과는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법에 의해 결장암 종양 내의 괴사 영역의 주위의 대량의 종양 세포 아폽토시스가 유발된다는 것을 시사한다. 더욱, 종양 아폽토시스 영역 내의 증대된 혈관신생 혈관 밀도, 괴사의 형상 및 아폽토시스 면적 및 내피세포 아폽토시스의 존재는 혈관신생 조직의 손상에 수반되는 혈관주변의 괴사를 나타낸다.

[0719] AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법의 병행요법은 인비보에서 종양 발달에 혈관신생저항 효과를 가진다: CD-31은 혈관신생의 특징적 내피세포 지표이다. 병행요법이 내피세포에 미치는 직접적인 영향을 입증하기 위해, 종양 조직에 대해 항 CD-31 면역 염색이 수행되었다. 방사선 조사만을 포함하는 치료법에 의해 처리된 마우스로부터 채취된 종양 단편 내의 혈관신생은 길이가 짧고, 연속성 및 분기가 없고, 경계가 불분명하였다. GCV 없이 벡터만 투여했을 때 비정상이 유발되지 않았고(도 83a), AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법의 병행요법은 가장 광범위한 혈관 비정상(도 32a)을 입증해 주었다. 간장 혈관은 영향을 받지 않았다(도 83b). 이들 결과는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법의 병행요법은 혈관신생 혈과 내에 대규모 혈관 파열을 유발한다는 것을 나타낸다.

[0720] CT-26 결장암 종양을 보유하는 마우스 내에 AdPPE-1(3x)가 없는 AdCMV-TK + GCV를 전신 투여하면 간독성을 유발한다: 아데노바이러스 벡터의 전신 투여의 부작용 중의 하나는 간독성이므로, 벡터 처리된 마우스, 병행요법 처리된 마우스 및 대조군 마우스로부터 채취된 간장 조직에 대해 혜마톡실린 및 에오신 염색이 실시되었다. 모든 처리 그룹 내의 간장 단편은 확대된 간세포핵 및 쿠퍼 세포 이상증식을 나타냈다. 가장 현저한 변화는 AdCMV-TK + GCV + 방사선요법 또는 AdCMV-TK + GCV 요법(Figure 84)에 의해 처리된 마우스 내에서 입증되었다. 이들 그룹 사이의 간장의 기능(간장 효소 SGOT, SGPT) 또는 신장의 기능(요소, 크레아티닌(creatinine))의 혈장 표지는 차이가 발견되지 않았다. 간장 내피세포는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법(도 84, 우측 패널)에 의해 영향을 받지 않았다는 것에 주목해야 한다. 이들 결과는 CMV 프로모터에 의해 제어되는 HSV-TK 발현 아데노바이러스 벡터는 비교적 간독성을 가지는 것을 입증해준다.

종합하면, 이들 결과는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV는 정맥 투여가 안전하다는 것을 시사해준다. 더욱, 상기 벡터는 비독성의 국부 조사된 방사선과 병행되었을 때에만 느리게 성장하는 프라이머리 종양의 진행을 효과적으로 억제 한다. 단일의 가설에 제한됨이 없이, 아폽토시스를 통한 종양 혈관신생의 특이적 억제는 종양 억제의 기작인 것으로 생각된다. 더욱, AdPPE-1 (3x)-TK 벡터의 세포독성 활성은 GCV의 투여 및 방사선요법에 의존한다.

[0722]

실시예 36

[0723]

방사선요법과 간시클로비르의 투여 및 PPE-1 (3x) 프로모터 제어 하의 TK의 병행요법: 일비보 전이암에서의 시너지적(Synergic) 생존능력의 향상

[0724]

AdPPE-1(3x)-TK+GCV의 혈관신생 활성 및 단일회 방사선요법의 병합요법이 암에서의 장기간 생존능력에 미치는 효과를 평가하기 위해, 급속하게 전이하는 루이스 폐암 모델 내의 전신 투여 백터 + GCV + 방사선요법이 선택되었다.

[0725]

단일회 5 Gy선량의 국부 방사선 조사는 루이스 폐암 전이를 보유하는 C57BL/6 마우스에 대해 비독성 및 치료효과부족(sub-therapeutic)을 나타낸다: 35마리의 8주령 C57BL/6 수컷 마우스의 좌측 벨바닥에 LLC 세포가 접종되었다. 프라이머리 종양이 발생하는 즉시 전신 마취 하에서 발이 절단되었다. 발의 절단 후 8일 경과시, 전신 마취 하의 마우스의 흉벽에 단일회의 방사선이 조사되었다. 5가지 방사선 조사량이 평가되었다: 0, 2, 50, 10 및 15 Gy. 프라이머리 종양의 제거 후 3-4주 경과시, 방사선이 조사되지 않은 마우스는 체중이 감소하기 시작했는데, 이것은 전이성 질병의 신호이다. 따라서, 프라이머리 종양의 제거 후 28일이 마우스의 희생일로 계획되었다. 마우스의 건강상태는 관찰 및 체중측정을 통해 매일 모니터링되었다. 15 Gy의 선량으로 처리된 6마리의 마우스 중 5마리는 방사선 조사 후 5일 경과시 폐사되었고, 폐전이의 징후는 없었다. 마우스 배제는 다음과 같이 수행되었다: 1마리는 다른 그룹에 비해 프라이머리 종양 발달이 2주 지연되었으므로 배제되었다. 3마리의 마우스는 조사과정에서 폐사되었으므로 해부되지 않았다. 배제된 마우스들 중에서 1마리는 등록(enrollment) 전에 배제되었고, 1마리는 미처리 그룹으로부터 배제되었고, 1마리는 2Gy 선량 그룹으로부터 배제되었고, 1마리는 5Gy 선량 그룹으로부터 배제되었다. 10 Gy 선량으로 처리된 마우스의 평균 전이 중량은 다른 그룹의 것보다 작았으나, 5 Gy($p=0.001$)(도 85a) 선량으로 처리된 그룹에 비해서는 통계적인 차이만이 존재하였다. 앞서 언급된 바와 같이, 15 Gy의 선량으로 처리된 마우스는 5일 내에 폐사되었고, 전이의 징후는 없었다. 10 Gy의 선량으로 처리된 마우스는 방사선 조사 후 10일 경과시 일시적인 약간의 체중 감소가 나타났다(도 85b). 단일회의 5 Gy 선량의 방사선요법은 치료효과가 없고(도 85a), 비독성(도 85b)으로, 이것은 병행치료의 실험에 사용되었다.

[0726]

치료효과가 부족한 방사선요법 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 발현 및 간시클로비르(GCV)의 투여의 병행요법에 의한 쥐과동물 폐암 내의 전이성 질환의 시너지적 억제: 180 마리의 8주령 수컷 Balb/C 마우스의 좌측 벨바닥에 LLC 세포가 접종되었다. 프라이머리 종양이 발생된 즉시 전신 마취 하에서 발이 절단되었다. 발의 절단 후 5일 경과시, 10^{10} PFU의 백터[AdPPE-1(3x)-TK 또는 AdCMV-TK]가 꼬리 정맥 내에 주입되었고, 14일 동안 매일 GCV가 복강내 주입되었다(100 mg/kg). 백터의 주입 후 3일 경과시, 단일회 5 Gy의 선량의 방사선이 전신 마취 하의 마우스의 흉벽에 대해 조사되었다.

[0727]

마우스들은 6개의 그룹으로 분류되었다: 1. Ad5PPE-1(3x)-TK + GCV, 2. Ad5CMV-TK + GCV, 3. 생리식염수 + GCV, 4. Ad5PPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법, 5. Ad5CMV-TK + GCV + 방사선요법, 및 6. 생리식염수 + GCV + 방사선요법. 마우스 배제: 4마리는 발의 절단 직후 폐사되었고, 4마리는 프라이머리의 종양의 크기가 등록하기에는 너무 커서 제외되었고, 7마리는 프라이머리 종양의 발달이 지연되었으므로 배제되었고, 12마리는 폐전이의 징후가 없는 상태에서 폐사되었고, 1마리는 양쪽 눈이 배출되었으므로 배제되었다. 배제된 마우스들 중에서, 14마리는 등록 전에 배제되었고, 2마리는 그룹 1로부터 배제되었고, 2마리는 그룹 2로부터 배제되었고, 2마리는 그룹 3으로부터 배제되었고, 4마리는 그룹 4로부터 배제되었고, 3마리는 그룹 5로부터 배제되었고, 1마리는 그룹 6으로부터 배제되었다.

[0728]

AdPPE-1(3x)-TK + GCV + 방사선요법에 의해 처리된 마우스는 임의의 다른 처리 그룹($p=0.05$)(도 86a)에 비해 충분히 긴 기간 동안 생존하였다. 더욱, 방사선요법은 비표적화된 백터인 AdCMV-TK($p=0.04$)(도 86b 내지 도 86d)에 비해 혈관신생 내피세포 전사-표적화 백터인 AdPPE-1(3x)-TK만을 충분히 강화하였다. 이들 결과는 전신 투여된 AdPPE-1(3x)-TK 백터 + GCV + 단일회 방사선요법의 병행요법은 전이성 질환에서의 생존율을 시너지적으로 증대한다는 것을 보여준다.

[0729]

실시예 37

[0730] **PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 Fas 및 TNFR 키메라 유전자의 이중요법: 독소루비신(doxorubicin)을 이용한 인비트로에서 내피세포 특이성의 시너지적 강화**

[0731] 화학요법 및 HSV/TK이외의 "자살 유전자"의 혈관신생 내피세포 특이적 발현의 병행요법의 효능을 실험하기 위해, Fas-키메라(Fas-c, 전술한 설명 참조)와 조합된 PPE-1(3x) 프로모터를 구비하는 AdPPE-1 (3x)-Fas-c가 앤트라사이클린 글리코사이드 독소루비신(anthracycline glycoside doxorubicin(DOX))과 함께 BAE세포에만 투여되었다.

[0732] BAE 세포의 세포 생존율(크리스털 바이올렛 염색에 의해 측정된 생존능력(%))에 의해 측정된 아폽토시스는 AdPPE-1 (3x) - Fas-c + DOX에 의해 처리된 마우스가 AdPPE-1 (3x) - Fas-c 처리된 마우스나 DOX 단독 처리된 마우스(도 91)에 비해 상당히 높았다.

[0733] 이들 결과는 PPE-1 (3x) 프로모터가 추가의 치료적 유전자 구축물의 직접 유효한 내피세포 특이적 발현에 이용될 수 있다는 것과, PPE-1 (3x) 의존성의 아폽토시스 유발성 Fas-c 발현 및 화학요법의 병행요법은 효율이 높은 시너지적 내피세포 아폽토시스를 유발한다는 것을 나타낸다.

[0734]

실시예 38

[0735] 조건부 복제 아데노바이러스 벡터

[0736] 물질 및 실험 방법

[0737] **세포 배양:** 소 대동맥혈관 내피세포(BAEC) 및 인간 정상 피부 섬유아세포 - NSF 세포주는 10%의 가열불활성화 FCS, 100 mg/ml의 폐니실린 및 100 mg/ml의 스트렙토마이신을 함유하는 저 글루코스(low glucose)의 DMEM 내에서 배양되었다. HeLa (인간 경부 상피 선암(Human cervix epithelial adenocarcinoma)), 루이스 폐암 세포 (D122-96) 및 293(인간 태아 신장) 세포주는 10%의 가열불활성 FCS, 100mg /ml의 폐니실린, 100 mg/ml의 스트렙토마이신을 포함하는 고 글루코스(high glu)의 DMEM 내에서 배양되었다. 인간 제대 내피세포 - HUVEC (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.)는 EGM-2 불렛 키트(Bullet kit)(Clonetics, Bio-Whittaker, Inc., MD, USA) 내에서 배양되었다. 인간 폐암 세포주(A549)는 10%의 가열불활성 FCS, 100 mg/ml의 폐니실린 및 100 mg/ml의 스트렙토마이신을 함유하는 MEM 내에서 배양되었다. 모든 세포는 37°C, 5% CO₂, 습기가 있는 환경 내에서 성장되었다.

[0738] **플라즈미드 및 바이러스 벡터의 구축물:**

[0739] **플라즈미드 클로닝:** 반딧불이 루시페라제의 cDNA는 pcDNAlII 발현 플라즈미드(CMV 프로모터 영역 보유, Invitrogen)의 복수의 클로닝 부위(site)에 서브 클로닝되고, PPE1-3x 프로모터 및 아데노바이러스-5 DNA 배열의 일부를 보유하는 pPACPPE-1.plpA에 서브 클로닝된다. 제3의 플라즈미드는 pPACPPE-1.plpA 플라즈미드로부터 PPE-1 프로모터의 제1 인트론을 삭제하는 것에 의해 클로닝되었다. 상기 3종의 플라즈미드는 본 발명자들의 연 구소에서 사전에 클로닝되어 세포 배양 트랜스펙션에 이용되었다.

[0740] **복제 결손성(replication deficient) 벡터의 클로닝:** FAS-키메라의 cDNA는 pPACPPE-1.plpA 플라즈미드 및 pPACCMV.plpA 플라즈미드 내에 클로닝되었다. 이를 플라즈미드는 대부분의 아데노바이러스-5 계놈을 보유하는 pJM17에 의해 공동 트랜스펙션(co-transfected)되었고, 칼슘 포스페이스법(calcium phosphate method)을 이용하여 293 인간 태아 신장 세포주(ATCC) 내에 공동 트랜스펙션되었다. 이 세포주는 바이러스 복제에 필요한 E1 유전자를 포함하도록 설계되었으나 pPAC.plpA 플라즈미드나 pJM17 플라즈미드 내에는 포함되지 않는다. 이를 플라즈미드는 세포 내에서 상동적 재조합되고, 약 2주 후 재조합 바이러스가 형성되고 복제를 개시하여 최종적으로 세포 용해를 유발한다. 바이러스 콜로니가 분리 및 전파되고, 그들의 정확한 삽입 배향(insert orientation)이 PCR에 의해 검증된다. 복제 결손성 벡터는 공기 기술의 클로닝 기법에 의해 사전에 준비되었다.

[0741] **조건부 복제 아데노바이러스(CRAD)의 구축:** 이 CRAD는 AdEasy법(Stratagene, LaJolla CA)을 이용하여 구축되었다. 아데노바이러스-5 DNA 배열의 일부를 포함하는 플라즈미드인 pShuttle-MK는 다음과 같이 개질되었다: pShuttle(Stratagene, La Jolla, CA)의 복수의 클로닝 부위 및 우측 아암(arm)은 미드카인(Midkine; mk) 프로모터 및 연속적 아데노바이러스 E1 영역에 의해 치환되었다. 다음에, 상기 MK 프로모터는 인트론이 없는 PPE1-3x에 의해 치환되었다. 제2의 플라즈미드는 IRES 배열(출처: p IRES-EYFP 플라즈미드, BD Biosciences) 및 FAS-키메라 cDNA를 상기 프로모터 및 E1 사이에 서브클로닝하는 것에 의해 구축되었다. IRES는 동일한 전사로부터 2개의 단백질의 번역을 허용한다. 그 결과 얻어진 2개의 셔틀(shuttle)은 PmeI분해(digestion)에 의해 선형화된 다음 대장균인 BJ5183ADEASY-1(Stratagene) 내로 형질전환된다. 이 유형의 박테리아는 E1 및 E3 유전자 영역을 제외한 대부분의 아데노바이러스-5 배열을 포함하는 pADEASY-1 플라즈미드에 의해 이미 형질전환되어 있다. 이 플라즈미드는 박테리아 내(pShuttle 및 pADEASY-1의 사이)에서 상동적 재조합이 이루어지므로, 완전한 벡터 게놈을 형성한다. 다음에 상기 재조합물은 PacI 분해되고, 칼슘 포스페이트법에 의해 293 인간 태아 신장 세포주(ATCC) 내에 트랜스펙션된다. 이 과정의 나머지 과정은 복제 결손 벡터에 대해 설명한 과정과 같다.

[0742] 양성 대조 바이러스 CMV-E1는 E1 유전자에 선행하여 일반 프로모터인 CMV(사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus))를 서브클로닝하는 것에 의해 구축되었다. CMV-E1 바이러스는 어디에나 존재하는 것으로서 내피세포에 대해 특이성을 가지지 않는다.

[0743] 다음의 복제 결손 벡터 및 CRAD은 전술한 방법에 따라 구축되었다.

[0744] 복제 결손 벡터:

[0745] PPE-1(3x)-FAS, CMV-FAS, CMV-LUC (LUC – 루시페라제 레포터 유전자의 약어), PPE-1(3x)-LUC.

[0746] CRAD:

[0747] PPE-1(3x)-CRAD, PPE-1(3x)-Fas-CRAD, CMV-E1

[0748] **트랜스펙션 실험:** BAEC 및 HeLa 세포는 24개의 웰 플레이트 내에서 60-70%의 컨플루언스(confidence)으로 배양되었다. 공동 트랜스펙션은 0.4 mg/웰(well)의 발현 구축물 및 트랜스펙션 효율의 대조군으로서 0.04mg/웰의 pEGFP-C1 벡터(CLONTECH, Palo Alto, CA)를 이용하여 실시되었다. 트랜스펙션을 위해 리포펙타민(Lipofectamine) 및 리포펙타민 플러스(Lipofectamine plus)(Invitrogen, Carlsbad, CA)가 사용되었다. 37°C의 온도에서의 배양 후 3시간 경과시, 트랜스펙션 혼합물을 성장 배지로 교체되었다.

[0749] **트랜스덕션 실험:** Vectors (PPE-FAS, CMV-FAS, CMV-LUC, PPE-LUC)는 10, 100, 1000, 10000의 감염다중도(moi)에 도달하기 위해 감염 성장 배지(정상 성장 배지에서의 10% 대신 2%의 FCS를 함유함)를 이용하여 회석되었다. 감염다중도는 "바이러스의 수/표적 세포"로서 산정되었다. 표적 세포(BAEC 및 293)는 트랜스덕션의 시행 24시간 전에 접종되었다. 트랜스덕션이 시행되는 날, 세포의 성장 배지는 각각 96개의 웰 플레이트 또는 60 mm의 플레이트의 0.1 또는 2 ml의 감염 배지 내에 소망하는 감염다중도로 혼합된 바이러스를 포함하는 용액으로 대체되었다. 세포는 4시간 동안 배양된 후 트랜스덕션된 세포에 새로운 배지가 첨가되었다.

[0750] 벡터 복제 및 아폽토시스 유도의 평가는 각각 PFU 적정(하기 참조) 및 파포퍼센티지 키트(ApoPercentage kit)(Accurate Chemical, Westbury, NY)에 의해 수행되었다. 또 세포 생존능력의 지표로서 플레이트의 표면에 부착된 세포의 양을 측정하기 위해 크리스털 바이올렛 염색법이 이용되었다.

[0751] **바이러스 적정 실험 - 플레이크 형성 단위 분석(PFU):** 바이러스 주는 적정되고 -80°C의 온도에서 보관되었다. 293 세포의 서브컨플루언트(80%) 배양물은 2시간 동안 연속 회석용(10^{-2} ~ 10^{-13}) 감염배지에 의해 회석된 바이러스 벡터에 의해 감염되었다. 2시간 후 상기 배지는 PBS에 의해 세척되었고, 한천중층(agar overlay)에 의해 치환되었다. 약 2주일 후 플레이크(plaques)가 명백한 최고 회석이 PFU/ml (PFU – 플레이크 형성단위)의 단위의 농도로 고려되었다.

[0752] 결과

[0753] **세포독성 유전자 발현은 아데노바이러스 복제를 강화시켜 준다:** 아폽토시스 유도가 바이러스 복제에 미치는 영향을 시험하기 위해, 293 세포주(인간 태아 신장 세포주) 내에서 CMV-FAS 복제가 실험되었다. 이 세포주 내에서 바이러스는 복제의 결과로서 FAS-c 또는 세포 용해에 의해 아폽토시스를 유발할 수 있다. 초기(바이러스 감염 후 수시간) 아폽토시스는 바이러스 복제와 간섭할 수 있고, 후기(바이러스 감염 후 수일) 아폽토시스는 바이러스 확산을 강화시켜 줄 수 있다.

[0754] CMV-FAS의 아폽토시스 유발 능력을 실험하기 위해, BAEC가 트랜스덕션되었고, 세포 아폽토시스는 ELISA-크리스탈 바이올렛 생존능력 분석법(도 89)에 의해 평가되었다. CMV-FAS는 최고 농도(10000 moi)에서 활성화 리간드(TNF- α)가 없는 상태에서 아폽토시스를 유발하였으나, 저 농도에서는 아폽토시스를 유발하기 위해 리간드의 첨가가 필요하였다.

[0755] 세포와 세포 사이의 CMV-FAS 확산은 293 세포 내의 플레이크 발생에 의해 분석되었다. 플레이크는 플레이크 발생 속도 및 플레이크의 치수에 따라 관찰되는 바와 같이(도 88 및 도 89) 아폽토시스 비유발성 벡터 CMV-LUC에 비해 CMV-FAS를 이용하는 경우 최고 발생속도로 발생되었다.

[0756] 인트론을 보유하는 상태 및 인트론을 보유하지 않는 상태의 PPE1-3x 프로모터의 RNA 전사 유발 능력은 루시페라제 레포터 유전자(도시 생략)에 의해 분석되었으나, 중요한 차이는 관찰되지 않았다.

[0757] 이들 결과는 아폽토시스를 유발하는 킬러(killer) 유전자(예, FAS)를 보유하는 전술한 혈관신생의 내피세포 특이적 바이러스 구축물인 AdPPE-1(3x)과 같은 아데노바이러스 벡터의 복제는 숙주 세포의 추가적인 아폽토시스 용해(apoptotic lysis)에 의해 강화될 수 있다는 것을 나타낸다.

실시예 39

[0759] **VEGF 발현의 PPE-1 (3x) 제어는 신혈관형성 및 배양된 조직의 생존력을 강화시켜 준다.**

[0760] 인비트로 및 인비보에서 엔도셀린 프로모터의 제어 하의 VEGF의 발현이 배양 조직 구축물의 혈관형성에 미치는 효과를 연구하기 위해, 세포가 Ad5PPEC-1-3x VEGF에 의해 감염되었고, 구축물은 혈관형성에 미치는 효과를 밝혀내기 위해 분석되었다.

[0761] 도 91a는 Ad5PPEC-1-3x VEGF에 의한 세포 감염이 배양된 구축물 내에 형성된 혈관상 구조물의 수 및 크기에 미친다는 것을 보여준다. 구축물은 배지에 VEGF를 보급하거나 보급하지 않은 상태에서 성장되었다(50ng/ml). 유사한 구축물이 Ad5PPEC-1-3x VEGF 바이러스 또는 대조 GFP 아데노바이러스(4시간 동안)에 의해 감염되었다. 2주 후 배양액 중에서 구축물이 고정되고, 매립되고, 절단된 후, 염색되었다.

[0762] 배지에 VEGF를 첨가하는 것과 세포를 Ad5PPEC-1-3x VEGF로 감염시켜 주는 것을 비교해 본 결과, Ad5PPEC-1-3x VEGF 바이러스에 의해 감염된 샘플이 혈관수 및 혈관면적의 백분율에서 4-5배 높다는 것이 발견되었다(도 91a).

[0763] 인비보 연구에서, 3종의 상이한 모델을 사용하여 인비보의 임플란트의 생존력, 분화, 융합 및 혈관형성을 분석하였다. 이들 모델은 (i) SCID 마우스의 등(back)의 피하 이식, (ii) Implantation into the quadriceps muscle of 누드 렛(nude rats)의 대퇴사두근 내의 이식, 및 (iii) 누드 마우스의 전복부 근육 단편을 상기 구축물로의 치환을 포함하였다.

[0764] 이들 구축물에는 숙주 혈관이 침투하였다. Ad5PPEC-1-3x VEGF 바이러스에 의해 감염된 구축물은 대조 구축물에 비해 혈관 구조가 증대되었음이 나타났다.

[0765] 인비보에서 조직 배양된 구축물의 생존력 및 융합을 평가하기 위해, 본 발명자들은 루시페라제에 기초하는 활성화 시스템을 이용하였다. 상기 인비보 활성화 시스템(IVIS)은 전신 투여된 루시페린(luciferin)과 국부적으로 생산되는 루시페라제의 상호반응에 의해 발생되는 광을 검출하도록 작동한다. 구축물은 루시페라제를 코드하는 아데노 수반 바이러스(Adeno Associated Virus; AAV) 벡터에 의해 이식하기 전 48시간 동안 감염되었다. 다음에 상기 구축물은 누드 마우스의 전복부 근육 내에 배치되었다. AAV-루시페라제가 수술시 양성 대조로서 각 마우스의 좌하지(left lower extremity) 내에 주입되었다. 수술 후 3-4주 경과시, 조직 배양된 구축물에 대한 관류(perfusion)를 평가하기 위해 루시페린이 마우스 내에 주입되었다.

[0766] Ad5PPEC-1-3x VEGF에 의해 감염(및 다음에 AAV-루시페라제에 의해 감염)된 구축물은 AAV-루시페라제 단독에 의해 감염된 대조 구축물에 비해 높은 시그널(signal)을 보유하였다(결과는 표시되지 않음). 종합하면, 이들 결과는 Ad5PPEC-1-3x VEGF의 인비트로 감염은 이식된 배양 조직 구축물의 생존력 및 혈관형성을 강화시켜 줄 수

있다는 것을 시사한다.

실시예 40

혈관신생 요법에 의한 PPE-1(3X) 프로모터의 인비보 활성화

혈관신생의 발현에 대한 많은 조직들의 공통된 반응은 혈관 항상성(vascular homeostasis)(참조, Hahn et al, Am J Med 1993, 94:13S-19S, and Schramek et al, Semin Nephrol 1995;15:195-204)을 지배하는 자동조절되는 자기분비 피드백 루우프(auto-regulated autocrine feedback loops)에 의해 생성되는 복합신호(complex signaling)에 응답하는 내인성 혈관신생 경로의 업조절(upregulation)이다. 상기 기작(mechanism)이 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 핵산 배열의 발현에 영향을 미치는 방법을 결정하기 위해, 강력한 혈관신생 드러그 보센탄(Bosentan)을 투여한 상태 및 투여하지 않은 상태의, PPE-1(3x) 대조[PPE-1 (3x)-LUC] 하의 루시페라제(LUC) 유전자를 포함하는 본 발명의 핵산 구축물에 의해 혈질전환된 유전자 도입 마우스의 조직 내에서 인비보 수준의 발광이 측정되었다. 보센탄(TracleerTM)은 현재 다양한 적응증 특히 폐동맥 고혈압 및 폐섬유증을 위해 임상적으로 승인된 이중 엔도셀린 수용체(ETA 및 ETB) 길항제이다.

본 발명의 PPE-1(3x)-LUC 구축물 또는 하라츠(Haratz) 등(J Clin Invest 1995;95:1335-44)에 의해 상세히 설명된 PPE-1-LUC 구축물을 보유하는 유전자 도입 마우스가 전술한 바와 같은 본 기술분야에 공지된 클로닝 방법에 의해 생산되었다. 10주령의 PPE-1(3x)-Luc 또는 PPE-1-LUC 유전자 도입 마우스(각 그룹은 n=5)의 구강을 통해 사료 또는 100 mg/kg/일의 보센탄이 첨가된 사료가 30일간 공급되었다. 마우스들은 처리 마지막 날 회생되었고, 전술한 방법론에 기술된 바와 같이 마우스의 기관은 발광강도의 측정을 위해 채취되었다.

도 94는 PPE-1 (3x) 프로모터는 유전자 도입 마우스 내의 재조합 유전자의 조직 특이적 과발현을 부여한다는 것을 보여준다. 통상 엔도셀린 활성이 큰 기관(심장 및 대동맥) 및 엔도셀린 활성이 작은 기관(뇌, 기도 및 폐)은 간장 또는 신장에 비해 발광강도가 중대하는 것이 입증되었다. 그러나, 대부분의 기관의 발광강도는 보센탄의 투여(도 94)에 의해 현저히 증대(심장 조직에서 최대 40%의 증대)됨으로써, 엔도셀린 수용체 길항제, 특히 전체 혈관신생 억제제는 본 발명의 내피세포 특이적 프로모터를 활성화시킬 수 있다는 것 그리고 조직 특이적 방법으로 PPE-1 (3x) 전사적 제어 하에서 도입유전자의 발현을 더욱 강화한다는 것을 나타내 준다. 세포내 프리프로엔도셀린-1 mRNA 및 순환 중인 엔도셀린-1의 농도를 측정한 결과, PPE-1 프로모터의 제어 하의 루시페라제를 발현하는 유전자 도입 마우스에 엔도셀린 수용체 길항제(예, 보센탄)를 투여하면 조직 엔도셀린-1 전사가 증대되고(도 97a), 혈청 내에서 검출되는 면역활성 엔도셀린-1이 증대된다(도 97b)는 것이 밝혀졌다.

PPE-1 프로모터의 제어 하의 유전자 생성물의 발현의 강화의 특이성을 더욱 결정하기 위해, 이중 엔도셀린 길항제 보센탄을 보유한 엔도셀린 수용체 활성의 억제 효과가 ET-1_A(BQ123, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 및 ET-1_B(BQ788, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)의 개개의 특이적 길항제에 의한 억제 효과와 비교되었다. 도 96은 PPE-1 프로모터(전술한 플라즈미드 pEL8-LUC)의 제어 하 또는 SV40 프로모터의 제어 하에서 루시페라제 발현 플라즈미드에 의해 트랜스펙션된 후, 1시간 동안 ET-1 수용체 길항제 보센탄, BQ123 또는 BQ788로 처리된 소 대동맥혈관 내피세포(BAEC) 배양물 내에서 측정된 루시페라제 활성을 비처리된 대조군에 대한 백분율로서 보여준다.

PPE-1 프로모터의 제어 하의 루시페라제 활성은 보센탄 처리 및 BQ788 처리시 상당한 증가했고, BQ123(ET-1_A 길항제)처리시에는 증가하지 않았다. 보센탄 및 BQ788 처리(1 μM)의 결과 처리되지 않은 대조군에 비해 루시페라제 활성이 각각 1.6배 및 1.3배 증가되었다(도 96). SV40-루시페라제 트랜스펙션된 세포 내에서는 상당한 증가가 관찰되지 않았다(데이터는 표시되지 않음).

종합하면, 이들 결과는 ET_B 억제제(blockade)에 반응하는 프리프로엔도셀린-1 mRNA의 농도 증가는 PPE-1 프로모터 활성의 증가에 의해 매개되는 것으로서, ET-1 수용체 억제제에 반응하는 PPE-1 제어 하의 유전자 전사를 강화하는 것을 시사한다는 것을 보여준다. 더욱, 증가된 PPE-1 프로모터 활성은 단기간 처리 및 장기간 처리의 인비트로 및 인비보의 양자에서 검출될 수 있다.

전술한 바와 같이, PPE-1 mRNA 농도는 PPE-1 프로모터의 제어 하에서 루시페라제 레포터 유전자를 발현하는 유전자 도입 마우스 내의 루시페라제 활성과 관련이 있다. 따라서, 이 모델은 고혈압, 암 및 급성 신부전을 포함하는 상이한 병태생리학 상태에서 ET-1의 발현을 평가하기 위해 사용될 수도 있다.

[0776] **실시예 41**

[0777] **PPE-1(3x)프로모터의 제어 하에서 인비보 발현된 도입유전자는 면역원이 아니다.**

[0778] 전술한 바와 같이, 다른 장기간 치료법과 같이 유전자 치료법은 발현된 유전자도입 단백질에 대한 지속적 노출에 대해 내인성 숙주 면역 반응이 수반되는 경우가 많다. 유전자도입 단백질에 의한 면역 자극(Immune stimulation)은 치료 효과의 감소, 염증, 및 때로는 심각한 부작용을 일으키는 원인이 된다. 본 발명의 cis 활성 조절 엘리먼트를 이용하여 발현된 도입유전자에 대한 숙주 면역 반응을 실험하기 위해, LLC 미소전이소(micrometastases)를 보유함과 동시에 Fas-TNF-R1 키메라(Ad5PPE-1(3x) Fas-c 및 Ad5CMV Fas-c) 또는 LUC 레포터 유전자(Ad5PPE-1(3x) Luc)(그룹당 6마리)를 보유하는 벡터로 처리된 마우스에서 아데노바이러스 핵손(hexone) 및 TNF-R1에 대한 항체 적정이 실시되었다. 대조군 마우스는 생리식염수로 처리되었다.

[0779] 벡터는 5일간의 간격으로 3회 주입되었다. 마지막 벡터 주입 후 10일 경과시 마우스들이 회생되었고, 아데노바이러스 및 삽입된 도입유전자에 의해 발현되는 단백질인 인간 TNF-R1에 대한 항체의 농도를 ELISA 분석을 이용하여 측정하였다.

[0780] 예기치 않게, 인간 TNF-R1에 대한 항체의 농도가 Ad5-PPE(3x)-Fas-c 처리된 마우스 내의 검출 농도보다 낮고, 반면에 비특이적 Ad5-CMV-fas 벡터(도 95b)로 처리된 마우스 내에서는 비교적 높다는 것이 발견되었다. 아데노바이러스 핵손 항원에 대한 항체 적정은 상이한 바이러스 주입된 그룹에서 유사하였다.(도 95a). 이들 결과는 본 발명의 PPE-1(3x) 구축물을 사용하여 발현된 도입유전자는 계통발생학적 근접성에도 불구하고 숙주 면역계에 내성을 가진다는 것을 시사한다.

[0781] **실시예 42**

[0782] **코르티코스테로이드(Corticosteroid) 처리는 내피세포 내의 도입유전자의 발현을 강화시켜 준다.**

[0783] 최근, 코르티코스테로이드(택사메타손)의 투여는 인비트로 및 인비조에서 염증유발성 유전자의 발현을 억제하고, 재조합 유전자의 발현 효율을 최적화함으로써, 재조합 아데노바이러스 감염된 내피세포(Murata, et al Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:1796-803)의 면역 관련 장해 및 아폽토시스 관련 장해의 일부를 방지할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 코르티코스테로이드가 내피세포 내의 바이러스 매개 도입유전자 발현을 강화할 수 있는지의 여부를 실험하기 위해, 루시페라제 리포터 코드 배열 또는 녹색 형광 단백질(GFP) 레포터 코드 배열을 포함하는 아데노바이러스 구축물에 의해 감염된 BAEC 세포가 트랜스펙션 이전에 택사메타손으로 처리되었다.

[0784] 도 98은 단백질 총중량(μg) 당 루시페라제의 백분율로서 측정된 루시페라제 발현이 CMV 프로모터(Ad-CMV-LUC)의 제어 하에서 아데노바이러스 발현 루시페라제에 의해 감염되기 전에 3 μM 의 택사메타손에 의해 처리된 BAEC 세포 내에서 3배 이상 증대되었음을 보여준다. 1000의 감염다중도에서 가장 현저한 효과가 나타났다. 도 99는 코르티코스테로이드 처리된 마우스의 녹색의 강화에 의해 표시된, PPE-1 프로모터의 제어 하에서 활성의 재조합 녹색 형광 단백질(GFP)의 내피세포 BAEC 내의 발현을 도시한 것이다.

[0785] 따라서, 코르티코스테로이드는 내피세포 내에서 바이러스 매개된 도입유전자의 발현을 강화시킬 수 있고, 본 발명의 방법과 함께 사용될 수 있다.

[0786] **실시예 43**

[0787] **혈관신생 특이적 CRAD 벡터**

[0788] **물질 및 방법:**

[0789] PPE1-3x 프로모터(AdPPE3x-E1)에 의해 제어된 CRAd의 구축: 혈관신생 내피 특이적 복제 결핍 아데노바이러스 벡터 AdPPE3X-E1 CRAd가 상기 실시예 38에 기술된 바와 같이 AdEasy법을 이용하여 구축되었다. 셔틀 플라스미드(shuttle plasmid)의 미드카인(Midkine; mk) 프로모터는 PPE1-3X로 대체되었다. 얻어진 셔틀 플라스미드 pPPE-E1이 PmeI 소화(digestion)에 의해 선형화되고, 다음에 E1 및 E3 유전자 영역을 제외한 아데노바이러스-5 배열의 대부분을 포함하는 pADEASY-1 플라스미드에 의해 변형된 대장균 BJ5183ADEASY-1으로 변형되었다. 완전

한 벡터 계놈이 박테리아 내에서의 상동적 재조합에 의해 생성되었다. 재조합체가 293 인간 배신장(embryonic kidney) 세포주 내에 트랜스펙션되었다. 용해 후, 바이러스 콜로니가 번식되고, 그들의 정확한 삽입 위치가 PCR에 의해 검증되었다.

[0790] 양성 대조 바이러스 AdCMV-E1 및 음성 대조 AdPPE3X-GFP의 구축화 및 클로닝은 전술한 실시예 38에 상술한 바와 같다. AdPPE3x-GFP는 PPE1-3x 프로모터의 제어 하에서 녹색 형광 단백질(GFP) 유전자를 코드한다. 이것은 복제 결핍 아데노바이러스 제어로서 작용한다. AdPPE3X-E1, AdCMV-E1 및 AdPPE3X-GFP의 개략 맵은 도 100에 도시되었다.

결과

[0792] **PPE 3X 프로모터의 제어 하에서 CRAD의 혈관신생 특이적 복제:** AdPPE3x-E1가 내피 세포 내에서 특이적으로 복제될 수 있는지의 여부를 평가하기 위해, 내피 세포주 및 비내피 세포주 내의 바이러스 벡터의 복제를 시험하였다. 인간 제정맥 내피 세포(HUVEC), 및 비내피 정상 피부 섬유아세포(NSF), HepG2(간암세포) 및 A549(인간 기관지암 세포)를 1의 MOI(MOI는 표적 세포당 바이러스의 수로서 계산된다)에서 AdCMV-E1, AdPPE3x-E1 또는 AdPPE3x-GFP로 감염시켰다. AdPPE3x-GFP(E1-결핍 비복제 아데노바이러스)는 음성 대조로서 사용되었다. AdCMV-E1은 양성 대조로서 사용되었다. 세포 및 배지가 감염 72시간 이후의 지정된 시점들에서 채집되고, E4 유전자를 위한 실시간 PCR 정량분석되었다. E4는 3종의 모든 벡터 내에 존재하고, 그 카피의 수는 바이러스 카피의 수를 위한 지표(indicator)이다. 유도배수(Fold-induction)가 각 시점에서의 바이러스 계놈 카피의 수를 바이러스 감염 2시간 후에 얻어진 바이러스 계놈 카피의 수로 나누는 것에 의해 계산되었다. 상대 카피의 수는 AdCMV-E1의 카피의 수를 AdPPE3x-E1의 카피의 수로 나누는 것에 의해 계산되었다.

[0793] 실험된 모든 세포주에서, AdCMV-E1 및 AdPPE3X-E1은 복제되었고, AdPPE3x-GFP(복제-결핍 음성 대조)는 복제되지 않았다(도 101a-d). HUVECs에서 AdPPE3X-E1은 AdCMV-E1에 상당하는 수준으로 복제되었다(도 101e). 그러나, 비-내피 세포에서는 AdCMV-E1가 AdPPE3X-E1에 의해 신속하게 복제되었고, 그러므로 AdCMV-E1 및 AdPPE3X-E1의 비율은 감염 24시간, 48시간 및 72시간에서 증대되었다(도 101e).

[0794] 상이한 세포주들 사이의 바이러스 복제율의 차이가 밝혀졌다. 예를 들면, AdCMV-E1은 감염 72 시간 후 A549 세포 내에서 바이러스 카피의 수가 104배 이상의 수준에 도달하였고, 반면에 HUVEC 내에서는 바이러스 카피의 수가 103배 이하의 수준에 도달하였다.

[0795] 이 결과는 AdPPE3X-E1가 AdCMV-E1에 의해 내피 세포 내에서 우선적으로 복제한다는 것을 입증해준다.

[0796] **AdPPE3X-E1는 내피 세포 내에서 우선적으로 확산된다:** 내피 세포 내에서의 AdPPE3x-E1의 선택적 복제가 내피 세포 내에서의 선택적 확산으로 이어지는지를 시험하기 위해, HUVEC 및 HepG2(간암 세포)를 1의 MOI로 AdCMV-E1 or AdPPE3X-E1로 감염시키고, 다음에 감염 48시간 및 96시간 후에 바이러스 헥손(viral hexon)을 위해 면역조직화학적으로 염색시켰다.

[0797] 바이러스 헥손은 시간의존적 방식으로 AdPPE3X-E1 및 AdCMV-E1으로 감염된 HUVEC 및 HepG2 내에서 검출될 수 있었다. 그러나, AdCMV-E1에 의한 HepG2의 감염 후 바이러스 헥손을 위한 양성-염색된 세포의 양은 AdPPE3X-E1 감염 후의 것에 의해 상당히 높았다. 대조적으로, AdPPE3x-E1에 의해 감염된 후의 바이러스 헥손을 위해 양성-염색된 HUVEC 세포의 양은 AdCMV-E1에 의해 감염된 후의 것과 대략 유사하였다. 이것은 AdPPE3X-E1이 AdCMV-E1에 의해 간장 세포(간암 세포) 내에서 빈약하게 확산되지만 내피 세포 내에서는 유사한 범위까지 확산된다는 것을 나타낸다. 종합하면, 이들 결과는 AdPPE3X-E1의 유효한 그리고 선택적인 내피 세포 복제를 의미한다.

인비트로에서의 AdPPE3X-E1의 특이적 내피 세포변성 효과:

[0799] 숙주 세포 내에서의 아데노바이러스의 복제는 결국 숙주 세포 용해로 이어진다. AdPPE3X-E1가 내피 세포 내에서 복제되고 우선 확산되므로, 인비트로에서 내피 세포 내에서의 용해의 유도가 내피 세포 및 비-내피 세포에서 평가되었다.

[0800] 인간 제정맥 내피 세포(HUVEC), 및 비내피 정상 피부 섬유아세포 (NSF), HepG2(간암 세포) 및 A549(인간 기관지암 세포)를 AdCMV-E1, AdPPE3x-E1 또는 AdPPE3x-GFP로 1, 10, 100, 1000의 MOI로 감염시켰다. AdPPE3x-GFP(도

100)가 음성 대조로 사용되었다. 비-특이적 AdCMV-E1가 양성 대조로 사용되었다. 세포의 생존능력을 감염 7일 후에 크리스털 바이올렛 반정량적 분석법 또는 정량적 MTS 분석법을 통해 평가하였다.

[0801] 도 103a-h는 감염 7일 후 AdPPE3X-E1 및 AdCMV-E1에 의해 감염된 HUVECs는 E1-결핍된 AdPPE3X-GFP에 의해 트랜스데션된 세포에 비해 세포 생존능력의 현저한 감소를 도시한 것이다. 따라서, 내피 세포주에서, AdPPE 3X-E1 및 AdCMV-E1의 양 벡터의 감염은 유사한 용해 효과를 가진다. 대조적으로, AdCMV-E1 및 AdPPE3X-E1의 세포독성 사이의 명확한 차이가 비-내피 세포 내에서 관찰되었다. AdPPE3X-E1가 각각 NSF 세포 또는 A549 및 HepG2 세포 내에서 AdCMV-E1에 의해 유도된 동일한 세포독성에 도달하기 위해서는 10배의 MOI 또는 100배의 MOI가 필요하였다(도 103a-d). 유사한 결과가 정량적 MTS 분석에서 관찰되었다. 여기서, AdCMV-E1 바이러스는 100, 10 및 1의 MOI에서의 NSF, HepG2 및 A549 내에서 세포 생존능력의 70-95% 감소를 유발하였고(p -값 < 0.01), 이에 반해 AdPPE3X-E1은 최소한의 세포독성을 유발하였다(도 103e-h). AdPPE3X-E1 및 AdCMV-E1에 의해 감염된 HUVEC은 100 및 10의 MOI에서 세포 생존능력의 80-100% 감소를 보였고(p -값 < 0.01), 한편 E1-결핍된 AdPPE3X-GFP에 의해 트랜스데션된 세포 내에서는 세포 생존능력의 감소가 관찰되지 않았다.

[0802] 따라서, 이들 결과는 AdCMV-E1 감염의 비선택적 세포변성 효과에 비교하여, AdPPE3X-E1에 의한 감염은 내피 세포 내에서의 선택적 세포변성 효과로 이어진다는 것을 의미한다.

[0803] **AdPPE3X-E1는 Matrigel® 내의 HUVEC에 의해 인비트로의 혈관신생을 억제한다:** Matrigel® 모델을 이용하여 인비트로에서의 혈관신생에 미치는 AdPPE3X-E1 감염의 효과를 실험하였다. 내피 세포는 Matrigel에 의해 코팅된 표면상에서 복잡한 거미줄 형태의 망상구조(networks)를 형성하였다. 이 망상구조는 미소혈관의 모세혈관계(capillary systems)를 강력하게 시사하는 것으로, 인비트로 및 인비보에서의 혈관신생 연구를 위한 분석시료로서 사용된다. 광학 현미경 및 형광 현미경을 이용하여, (세포집단이나 분기점들을 연결하는 세포의 연장으로서 정의된) 모세관 형성을 관찰하고 정량화하였다.

[0804] 도 104a-c는 AdCMV-E1 및 AdPPE3X-GFP에 의해 감염된 HUVEC 및 감염되지 않은 세포가 모세관 형태의 망상구조를 형성한 것을 보여준다. 대조적으로, AdPPE3X-E1에 의해 감염된 HUVEC은 모세관 구조로의 분화에 실패하였다(도 104d). 모세관 형태의 구조물의 수는 각각 AdCMV-E1 또는 AdPPE3X-GFP에 의해 감염된 세포에 의해 AdPPE3X-E1에 의해 감염된 세포 내에서 92% 및 95% 만큼 감소하였다(P < 0.01) (도 105). 모세관 형태의 구조물의 형성도 AdPPE3X-GFP(P < 0.05)에 의해 감염된 세포에 의해 AdCMV-E1에 의해 감염된 세포 내에서 37%만큼 감소된 것이 관찰되었다. AdPPE3X-GFP 및 AdPPE3X-E1의 중감염(Co-infection)은 세포가 확실히 바이러스에 의해 감염되었는 것 및 도입유전자(transgene) GFP가 발현되었다는 것을 확인해 준다(도 106a-106b).

[0805] 이들 결과는 AdPPE3X-E1에 의한 감염이 효과적으로 그리고 특이적으로 인비트로에서의 혈관신생을 억제하는 것, 및 AdCMV-E1, AdPPE 3X-E1에 의해 특이적으로 효과적으로 복제한다는 것을 입증한다.

실시예 44

AdPPE3X-E1 혈관신생-특이적 CRAd 벡터의 인비보 특이성 및 효능

물질 및 방법:

코튼랫 폐전이 모델:

코튼랫의 LCRT 세포주 및 피하종양의 형성은 앞에서 기술되었다. 피하종양은 폐로 전이되는 경우가 많다는 것이 관찰되었다. 폐전이의 유도를 평가하기 위해, LCRT 세포를 코튼랫의 협복 내에 피하주사하였다. 3마리의 코튼랫은 주사하지 않고, 대조로 사용하였다. 동물의 체중을 피하주사 후 28일 동안 격일로 측정하였다. 주사 10일 후, 18일 후, 25일 후 및 28일 후에 각각 2마리, 3마리, 3마리, 및 7마리의 뱃을 도살하였다. 도살의 최종일은 2마리의 뱃이 폐사된 시점에서 결정되었다. 부검시의 해부 후에 종양의 중량, 종양의 체적 및 폐전이의 중량이 측정되었다.

[0811] 동물들의 체중은 28일에 대조 그룹에서 최대 10%까지 그리고 종양을 가진 그룹에서 최대 15%까지 서서히 증대되었고, 20일 내지 25일(도 111a)에 현저한 차이가 발생하였다. 이 차이는 종양의 중량의 증가가 원인일 수 있다. 급격한 중량감소가 25일 내지 28일에 종양을 가진 뱃에서 관찰되었다. 뱃들은 감소된 활동에 의해 컨디션이 나쁘고 폐로해 보였다.

[0812] 종량의 체적 및 중량은 10일의 $0.92 \pm 0.23 \text{ cm}^3$ 및 $1.05 \pm 0.45 \text{ g}$ 으로부터 18일의 $4.04 \pm 0.12 \text{ cm}^3$ 및 $4.10 \pm 0.68 \text{ g}$ 까지, 및 25일의 $13.03 \pm 0.36 \text{ cm}^3$ 및 $20.80 \pm 6.93 \text{ g}$ 으로부터 28일의 $15.14 \pm 4.36 \text{ cm}^3$ 및 $15.04 \pm 2.98 \text{ g}$ 까지 서서히 증대되었고, 10일의 종양 체적 및 중량에 비해 18일에 현저하고, 18일의 종양 체적 및 중량에 비해 15일 및 28일에 현저하다(도 111b 및 111c). 종양의 괴사성 출혈소(hemorrhagic focus)가 20일 이후의 대부분의 뱃에 형성되었다(도 111f).

[0813] 폐전이의 중량은 10일의 $0.4 \pm 0 \text{ g}$ 으로부터 18일의 $0.47 \pm 0.07 \text{ g}$, 25일의 $0.97 \pm 0.12 \text{ g}$ 및 28일의 $1.04 \pm 0.09 \text{ g}$ 까지 증대되었고, 18일의 전이의 중량에 비교했을 때 25일 및 28일에 현저하였다(도 23D). 매크로 전이(Macrometastases)가 18일에 존재하지 않았으나 25일 이후에 관찰되었다. 각 폐에서 최대 치수가 1-3 mm인 10-15개의 적색 결절(reddish nodule) 또는 백색 결절이 발견되었다(도 111g 및 111h). 이들 결절은 연질 내지 경질이었고, 이들의 대부분은 폐 유조직(parenchyma) 내에 존재하였다. 우선되는 특정 폐소엽은 존재하지 않았고, 분산 패턴은 산란되었다. 폐조직의 폐 종양 침착물로의 대치는 28일에 관찰되었다. 병리조직학적 분석에 의해 25일 및 28일의 폐에서 경도의 울혈(congestion)이 발견되었고, 경도 내지 중도의 폐포벽의 후벽화가 발견되었다. 신생물 결절(neoplastic nodule)은 난형세포 내지 다중 유사분열상을 가진 방추세포로 구성되었다. 대부분의 신생물 결절은 전이를 둘러싸고 있는 만성 염증과 관련이 있었다. 18일에 소수의 혈관도 확인되었고, 폐포벽 및 혈관을 따라 폐의 마이크로전이(micrometastases)도 관찰되었다(도 111i, 111j). 육안에 의한 병리학 수준에서, 타기관으로의 전이는 발견되지 않았다.

[0814] 실험의 마지막 단계에서 도살된 뱃은 모두 폐전이를 가지고 있었다. 마이크로전이는 피하주사 18일 이후부터 확인되었고, 28일까지 모든 동물은 광범위한 폐전이를 발생하였다.

결과

[0815] 코튼랫에서 *AdPPE3X-E1*에 의해 유도된 인비보의 일반 독성 및 간독성의 평가: 인간 아데노바이러스는 마우스 내에서 복제되지 않으므로, 코튼랫(*Sigmodon hispidus*) 내의 인비보에서의 *AdPPE3X-E1*의 투여에 의해 유도된 간 및 일반독성 효과가 평가되었다. 코튼랫은 인간 아데노바이러스의 반허용상태의 숙주(semipermissive host)로 간주되므로 즉, 인간 아데노바이러스가 코튼랫 내에서 인간 내에서의 복제에 비교했을 때 경도의 정도로 복제되므로 코튼랫이 사용되었다. 새로운 치료방법의 임상적 적용에서 간독성의 결정적 중요성 때문에 그리고 특히 아데노바이러스의 전신 투여가 간조직을 주로 트랜스덕션하므로 간독성이 모니터링되었다.

[0816] 10^{11} 개의 바이러스 입자/랫의 *AdCMV-E1*이 정맥주사된 코튼랫은 24시간 후에 컨디션이 나빠진 것으로 보이고, 탈모가 발생하고, 활동이 감소하고, 약간 체중감소가 발생하였다(도 107). 이와 대조적으로, 동일한 양의 *AdPPE3X-E1*, *AdPPE3X-GFP* 또는 생리식염수로 처리된 동물들은 분명한 신체적 변화 또는 행동 변화를 보이지 않았다. 따라서, 고용량을 사용하더라도 *AdPPE3X-E1*의 전신 투여에 의해 일반 독성이 유도되지 않았다.

[0817] 간독성을 간손상의 마아커로서 통상적으로 사용되는 플라즈마 AST 및 ALT 수준의 측정에 의해 정량화하였다. *AdPPE3X E1* 및 *AdPPE 3X-GFP*의 정맥 투여는 간장의 효소량에 무시할 수 있는 영향을 미치고, 한편 *AdCMV-E1*의 투여는 간특이적 혈장 트랜스아미나아제(hepatospecific plasma transaminases)의 양을 상승시켰다(도 108). *AdPPE3X-E1* 벡터의 투여 0일 후 또는 14일 후에 현저한 차이가 측정되지 않았다(데이터는 도시되지 않음).

[0818] 간의 병리조직학적 분석 결과, 정맥주사 6일 후 간염, 간세포의 널리 확산된 종창(swelling) 및 팽창(ballooning) 및 *AdCMV-E1*에 의해 유도된 염증성 괴사성 병소(간염을 나타냄)가 밝혀졌다(도 109d). 생리식염수 처리된 그룹에서는 간염이 관찰되지 않았다(도 109a). *AdPPE3X-E1* 처리된 뱃(도 109c) 및 *AdPPE3X-GFP* 처리된 뱃(도 109b)의 간 절편에서 경도의 간염이 관찰되었다. 또 주사 14일 후 처리된 모든 뱃의 간 절편에서도 경도의 간염이 관찰되었다. 그러나, 전신 투여 0일 후 현저한 조직학적 변화는 관찰되지 않았다(데이터는 도시되지 않음).

[0820] 이들 결과는 *AdCMV-E1*의 전신투여는 투여 6일 후 즉각 일반 독성 및 간독성을 강하게 유발하지만, *AdPPE3X E1*의 전신 투여는 비복제 대조 벡터(*AdPPE3x-GFP*)와 유사하게 동일한 동물에서 최소한의 간독성만을 유발한다는 것을 의미한다. 가장 중요한 것은 *AdPPE 3X-E1*의 전신 투여가 주입된 뱃은 폐사율이 0이고, *AdPPE 3X-E1*의 정맥주사 14일 후까지 모든 뱃은 상태가 양호하고, 현저한 독성의 증거가 없었다는 것이다. 따라서, 이들 결과는 *AdPPE3X-E1*가 안전하게 전신투여될 수 있다는 것을 나타낸다.

- [0821] ***AdPPE3X-E1는 코튼랫에서 인비보에서 Matrigel® 플러그 상의 혈관신생을 억제한다:*** Matrigel® 모델은 인비보에서 혈관신생에 미치는 AdPPE3X-E1의 영향을 시험하기 위해 사용되었다. Matrigel® bFGF와 같은 혈관신생 인자와 결합되었을 때 내피 세포 이동 및 모세관 형성을 유발한다.
- [0822] 감염 14일 후, bFGF가 보충된 Matrigel® 생리식염수를 이용하여 재현탁시켜 세포 침윤 및 모세관 형성을 유발시켰다(도 110a). AdPPE3X-GFP 또는 AdCMV E1의 추가는 bFGF가 보충된 Matrigel® 내에서 세포의 침투 과정에 영향을 미치지 않았다(도 110c 및 110d). 대조적으로, 모세관 형성이 없는 최소의 세포 침투가 AdPPE3X-E1과 함께 재현탁된 Matrigel® 플러그 내에서 관찰되었다(도 110b). 조직학적 분석(도 110e)의 결과, AdPPE3X-E1 처리는 다른 그룹(스코어 2 및 3)(도 110e)에 비해 플러그(스코어 1 및 2) 내의 세포 침윤 및 증식을 감소시킨다는 것이 밝혀졌다.
- [0823] 상기 결과는 혈관신생 특이적 프로모터(예, AdPPE3X-E1)의 제어 하에서 복제 결핍 아데노바이러스는 코튼랫의 인비보 혈관신생을 효과적으로 억제할 수 있다는 것을 입증한다.
- [0824] ***Ad-PPE3X-E1의 전신 투여는 폐전이 성장을 억제했다:*** 폐전이에 미치는 AdPPE3X-E1의 영향을 평가하기 위해, 전술한 바와 같이 코튼랫에 폐전이를 유발시켰다. LCRT 세포의 주입 15일 후, (무작위로 4개 그룹(n=4)으로 나누어진) 랫의 심장의 좌심실 내에 $100 \mu\text{l}$ 의 AdPPE3x-E1, AdPPE3x-GFP, AdCMV-E1 또는 생리식염수(대조) 내의 6×10^{10} 개의 바이러스 입자를 직접 주입하였다. 바이러스 주입을 위한 시간은 사전의 폐전이 형성 실험에 기초하여 선택되었다. 상기 실험에서 마이크로전이가 18일에 관찰되었고, 평균 생존율이 LCRT 세포의 주입 후 28일인 것으로 평가되었다. 따라서, LCRT 세포 주입 15일 후가 마이크로전이 형성을 위한 최적의 시간이 될 것으로 예측되었다.
- [0825] 랫의 체중, 종양의 외양, 종양의 치수 및 건강상태(well being)가 매일 모니터되었다. 랫들은 생리식염수가 주입된 2마리의 랫이 전이로 폐사되었을 때(23일째)에 도살되었다. 도살 일자에 하기의 파라미터가 측정되었다: 종양의 중량 및 체적, 간 및 폐의 중량, 혈장요소(plasma urea), 크레아티닌, 요산, ALT, AST, LDH, CPK, 알부민 및 ALP. 종양, 비장, 폐, 뇌, 간장, 신장 및 심장의 조직을 3 부분으로 나누었다: 1 부분은 아데노바이러스 핵손의 면역조직화학 분석을 위해 화합물 내에서 냉동되고, 2 부분은 급속 냉동(snap frozen) 후, 바이러스 게놈(E4)을 위해 qRT-PCR을 위해 -80°C 에 저장되고, 3부분은 조직화학 분석을 위해 PBS-완충 4% 포르말린 내에 고정되었다.
- [0826] 동물들의 체중은 유사한 속도로 서서히 증대되었다. 랫들은 LCRT 세포의 주입 23일 후 도살되었다. 측정된 파라미터들에서 현저한 차이는 발견되지 않았으나, 폐전이의 중량은 AdPPE3X-E1 처리된 그룹에서 생리식염수 처리된 그룹에 비해 55%만큼 감소되었다($p < 0.05$, 도 112).
- [0827] [바이러스 게놈(E4)을 위한 qRT-PCR에 의해] 감염된 기관 및 감염되지 않은 기관의 바이러스 복제는 AdPPE 3X-E1가 간조직(도 113b)에 비해 전이성 폐조직(도 113a) 내에서 강력하고 그리고 선택적으로 복제된다는 사실을 보여준다.
- [0828] 이들 결과는 AdPPE3x-E1에 의해 강력하고 그리고 특이적인 항전이 효과(anti-metastasis effect)가 유발된다는 것을 명확하게 나타낸다.
- [0829] 종합하면, 이들 결과는 AdPPE3X-E1와 같은 PPE 3X 제어된 CRAd의 내피 특이성이 인비트로 및 인비보에서 입증되었음을 보여준다. 인비트로에서, 이것은 E4 바이러스 유전자의 정량적 PCR 분석에 의해 그리고 핵손 항원(hexon antigen)을 위한 면역염색에 의해 입증되었다. 내피 세포 내에서의 AdPPE3X-E1의 복제율은 AdCMV-E1(비선택적 복제 아데노벡터 대조)의 복제율과 유사하였으나, 비내피 세포 내에서는 최대 60배까지 감소되었다. 더욱, AdPPE3X-E1 및 AdCMV-E1에 의해 감염된 내피 세포는 세포 생존능력에서 유사하게 90%의 감소를 보였고, AdCMV-E1만이 비내피 세포에서의 세포 생존능력의 감소를 유발하였다. 비복제 E1-결핍된 AdPPE3x-GFP에 의해 트랜스డ션된 세포 내에서는 세포 생존능력의 감소가 관찰되지 않았다. 혈관신생을 위한 인비트로 마트리겔(matrigel) 모델에서, AdPPE3X-E1에 의해 감염된 내피 세포는 대조 벡터에 의해 감염된 내피 세포와 달리 모세관 형태의 구조물을 형성하지 않았다.
- [0830] 인비트로 독성 시험의 결과, 코튼랫은 10^{11} 개의 바이러스 입자/랫의 AdPPE3X-E1 또는 대조 벡터의 정맥주사에

내성이 있고, AdCMV-E1-처리된 그룹에서 일시적인 체중 감소 및 간독성이 있다는 것이 입증되었다.

[0831] 인비트로 시험에서, AdPPE3X-E1는 코튼랫의 인비보 Matrigel® 모델에서 혈관신생을 현저히 감소시켰고, AdPPE3X-E1의 전신 투여는 생리식염수 처리된 랫에 비해 폐전이의 양을 55%($P < 0.05$)만큼 감소시켰다. 대조 아데노벡터에서는 현저한 감소가 관찰되지 않았다. 정량적 PCR 분석에 의해 혈관신생 기관 내의 AdPPE3X-E1의 선택적 복제가 입증되었다. 그 바이러스 카피의 수는 대조 벡터에 비해 폐전이 내에서 2배 내지 5배 증대되었다. AdPPE3X-GFP에 비해 다른 기관 내에서는 현저한 차이가 관찰되지 않았다.

[0832] 따라서, 혈관신생 특이적 프로모터(예, AdPPE3X-E1)의 제어 하의 CRAd 벡터는 선택적으로 복제하고, 내피 세포를 용해할 수 있고, 혈관신생 모델 내에서 향상된 효과를 가질 수 있다. 가장 중요하게는, AdPPE3X-E1의 전신 투여는 전신 독성의 증거 없이 면역능력이 있는 동물 모델(LCRT 코튼랫 폐전이) 내에서 전이 성장을 억제하는 것이 분명하다.

[0833] 명확화를 위해 별도의 실시예들에서 기술된 본 발명의 어떤 특징들은 단일 실시예 내에 조합될 수 있다. 반대로, 간략화를 위해 단일의 실시예에서 기술된 본 발명의 다양한 특징들은 별개의 적절한 실시예에 분리하여 제공될 수 있다.

[0834] 이상에서 본 발명은 특정의 실시예에 관련하여 기술되었으나, 본 기술분야의 전문가는 많은 변경례 및 개조례를 실시할 수 있다. 따라서, 첨부된 청구항의 정신 및 범위 내에 속하는 모든 변경례 및 개조례는 본 발명에 포함된다. 본 명세서에 언급된 모든 공보, 특히 및 특허출원은 참조문헌으로서 도입된 것이다. 또, 본 명세서의 참조문헌의 인용 및 확인은 상기 참조문헌을 본 발명의 종래기술로서 승인하는 것으로 해석해서는 안 된다.

도면의 간단한 설명

[0153] 도 1a 및 도 1b는 TNFR1의 세포외 영역 및 Fas의 막투과 및 세포내 영역으로부터 구축되어 pcDNA3 플라즈미드 내에 클론화(a)되거나 아데노바이러스 벡터(b) 내에 클론화된 Fas 키메라 유전자의 개략도이다.

[0154] 도 2a-b는 프로아폽토시스 유전자(pro-apoptotic genes), Fas 키메라 및 TNFR1의 아폽토시스 활성을 도시한 도면이다.

[0155] 도 2a는 pcDNA-3-TNFR1(하측 폐널) 또는 대조용 공백터(empty vector; 상측 폐널) 및 GFP를 코드하는 발현 플라즈미드로 트랜스펙션된 소과의 대동맥 내피세포(BAEC)를 보이는 도면이다.

[0156] 도 2b는 pcDNA-3-Fas-c (하측 폐널) 또는 대조용 공백터(상측 폐널) 및 GFP를 코드하는 발현 플라즈미드로 트랜스펙션된 293 세포를 보이는 도면이다. 트랜스펙션된 세포는 형광 현미경 검사법을 이용하여 시각화되었고, 아폽토시스 활성은 형태학적으로 결정되었다.

[0157] 도 3a 내지 도 3f는 프로아폽토시스 유전자로 트랜스펙션된 BAEC 세포의 전자현미경사진이다. 트랜스펙션 24시간 후 BAEC 세포는 2.5%의 글루타알데히드로 고정되었고, 처리되었다. 일련의 도면들은 아폽토시스 과정의 연속 단계를 나타낸 것이다.

[0158] 도 4는 트랜스펙션된 BAEC 및 293 세포의 표시된 프로아폽토시스 유전자의 아폽토시스 활성을 정량화하는 히스토그램이다.

[0159] 도 5a는 AdPPE-Fas-c의 PCR 분석도이다. 레인 1 및 레인 2는 PPE-1 프로모터 및 Fas-c 유전자를 포함하는 프라이머를 이용하여 얻어진 PCR 생성물이다. 레인 3 및 레인 4는 Fas-c 프라이머를 이용하여 얻어진 PCR 생성물이다. 레인 5 및 레인 6은 주형 DNA가 없는 상태에서 얻어진 PCR 생성물이다.

[0160] 도 5b는 AdPPE-Fas-c 트랜스펙션된 BAEC 세포의 웨스턴 블롯(western blot) 분석도이다. 단백질 샘플들은 SDS-PAGE에 의해 용해되고, 니트로셀룰로스막으로 운반되고, TNFR1의 세포외 부분에 대한 폴리클로날 항체를 이용하여 조사되었다. 레인 1 및 레인 2는 pcDNA3-Fas-c BAEC 트랜스펙션된 세포(양성 대조)이다. 레인 3 및 레인 4는 AdPPE-Fas-c 바이러스의 표시된 MOI에 의해 트랜스펙션된 BAEC 세포이다. 레인 5는 트랜스펙션되지 않은 세포이다. 레인 6 및 레인 7은 AdPPE-Luc의 표시된 MOI에 의해 트랜스펙션된 BAEC 세포이다.

[0161] 도 6a 내지 도 6d는 내피세포의 아폽토시스에 미치는 Fas-키메라 과발현의 효과를 도시한 현미경사진이다. BAEC 세포는 Ad-PPE-1-3x-Fas-키메라(도 6a); Ad-PPE-1-3x-루시페라제(luciferase)(도 6b); Ad-PPE-1-3x-Fas-키메라 및 Ad-PPE1-3x-GFP (도 6c); 각각 MOI 1000에서 Ad-PPE-1-3x-루시페라제 및 Ad-PPE-1-3x-GFP(도

6d)을 이용하여 감염시켰다. 현미경사진은 감염 후 72시간 경과시 x10의 배율로 촬영되었다.

[0162] 도 7은 내피세포에 미치는 Ad-PPE-1-3x-Fas-키메라의 아폽토시스 특이적 효과를 도시한 히스토그램이다. 내피 세포(BAEC, HUVEC) 및 비내피세포(정상 피부 섬유아세포-NSF)의 생존능력은 Ad-PPE-1-3x-Fas-키메라 또는 대조 (루시페라제) 바이러스에 의한 감염 후 72시간 경과시 크리스털 바이올렛 스테이닝법(crystal violet staining)을 이용하여 정량화되었다.

[0163] 도 8은 Fas 키메라 매개 아폽토시스에 미치는 TNF α 투여의 용량 반응 효과(dose response effect)를 도시한 도면이다. BAEC는 Ad-PPE-1-3x-Fas-c로 감염되었다. 감염 후 48시간 경과시 성장 배지에 TNF가 표시된 용량만큼 첨가되었다. 그 후 24시간 경과시 크리스털 바이올렛 분석법을 이용하여 생존능력이 판정되었다.

[0164] 도 9a 내지 도 9e는 TNF α 리간드 및 Fas-c 수용체의 공동작용에 의해 매개된 내피세포 특이적 아폽토시스를 보여주는 현미경사진이다. 도시된 세포들은 -PPE-1-3x-Fas-c에 의한 감염 후 48시간 경과시 TNF α (10 ng/ml)의 존재 하에서 또는 비존재하에서 배양되었고; 감염 후 72시간 경과시 크리스털 바이올렛 스테이닝이 수행되었다.

[0165] 도 10a는 내피세포에 미치는 Ad-CMV-Fas-c의 TNF α 의존성 아폽토시스 효과를 보여주는 용량 반응 곡선도이다. 표시된 MOI의 Ad-CMV-Fas-키메라에 의해 감염된 BAEC 세포의 생존능력은 TNF α 를 이용한 배양 후에 판정되었다.

[0166] 도 10b 내지 도 10d는 비내피세포 NSF 상에 미치는 TNF α 리간드 및 Ad-CMV-Fas-키메라의 아폽토시스 효과를 보여주는 도면이다. 도 10b는 대조 바이러스에 의해 감염된 NSF이다. 도 10c는 Ad-CMV-Fas-키메라에 의해 감염된 NSF이다. 도 10d는 Ad-CMV-Fas-키메라에 의해 감염되고 TNF(10 ng/ml)를 이용하여 배양된 NSF이다.

[0167] 도 11a 내지 도 11c는 Ad-PPE-1-3x-Fas-c의 인비보 상태의 항종양 효과를 도시한 도면이다. B16 멜라노마 세포로 접종된 마우스들은 Ad-PPE-1-3x-Fas-c, Ad-CMV-Fas-키메라, 대조 바이러스 또는 종양이 촉진이 가능한 경우에는 생리식염수가 정맥 주입되었다.

[0168] 도 11a는 치료기간 중에 측정된 종양의 면적이다. 도 11b는 치료기간의 말기의 종량의 중량이다. 도 11c는 Ad-PPE-1-3x-Fas-c 치료된 마우스 및 대조 마우스의 종양의 상태를 나타내는 사진이다.

[0169] 도 12는 대조로서 B2B 세포주(내피세포를 발현하는 기관지 세포주)를 사용한 소과 내피세포주 및 인간 내피세포주 양자의 루시페라제에 미치는 본 발명에 따른 인핸서 엘리먼트의 효과를 나타내는 히스토그램이다.

[0170] 도 13은 다양한 세포주의 루시페라제 발현에 미치는 아데노바이러스 벡터 내의 본 발명의 프로모터의 내피세포 특이성을 나타내는 히스토그램이다.

[0171] 도 14A 및 도 14B는 각각 본 발명의 Ad5PPE-1-3X의 제어 하의 GFP 발현(도 14A) 및 BAEC 세포주의 Ad5CMV 대조 구축물(도 14B)을 나타내는 현미경사진이다.

[0172] 도 15는 내피세포 또는 비내피세포 내의 pACPPE-1-3Xp55, pACPPE-1-3X 루시페라제 및 pCCMVp55에 의해 유도된 아폽토시스(%)의 히스토그램이다.

[0173] 도 16은 하이폭시아 반응에 미치는 본 발명에 따른 인핸서 엘리먼트의 프로모터 구축물에의 도입 효과를 나타내는 히스토그램이다.

[0174] 도 17은 하이폭시아 반응에 미치는 본 발명에 따른 인핸서 엘리먼트의 아데노벡터 구축물의 프로모터에의 도입 효과를 나타내는 히스토그램이다.

[0175] 도 18은 소과 내피세포 및 인간 내피세포(엔도셀린 발현 세포주)의 발현 수준 상에 미치는 본 발명에 따른 인핸서 엘리먼트의 프로모터에의 도입 효과를 나타내는 히스토그램이다.

[0176] 도 19는 내피세포 프로모터(PPE-1) 또는 대조(CMV) 프로모터를 포함하는 아데노바이러스 구축물의 주입 후 다양한 기관 내에서 관찰되는 레포터 유전자의 발현 수준을 나타내는 히스토그램이다.

[0177] 도 20A 및 도 20B는 각각 Ad5CMVGFP 구축물 및 Ad5PPE-1-GFP 구축물에 의해 감염된 마우스의 간장 내에서의 각 구축물의 세포 발현을 나타내는 현미경사진이다.

[0178] 도 21은 내피세포주 및 비내피세포주 내에서의 발현 수준에 미치는 본 발명에 따른 인핸서 엘리먼트의 프로모터 내로의 도입 효과를 나타내는 히스토그램이다.

[0179] 도 22는 내피세포주 및 비내피세포주 내에서의 발현 수준에 미치는 본 발명에 따른 인핸서 엘리먼트의 프로모터 내로의 도입 효과를 나타내는 히스토그램이다.

- [0180] 도 23A 내지 도 23C는 Ad5PPE-1-3XGFP 유전자도입 세포, Ad5PPE-1GFP 유전자도입 세포 및 Ad5CMVGFP 유전자도입 세포의 GFP 발현을 나타내는 현미경사진이다.
- [0181] 도 24A 및 도 24B는 각각 Ad5PPE-1-3XGFP 및 Ad5CMVGFP의 moi-1에 의해 유전자도입된 SMC 내의 GFP 발현을 나타내는 도면이다.
- [0182] 도 25A 및 도 25B는 각각 Ad5PPE-1-3XGFP 및 Ad5CMVGFP의 moi-1에 의해 유전자도입된 HeLa 세포 내의 GFP 발현을 나타내는 도면이다.
- [0183] 도 26A 및 도 26B는 각각 Ad5PPE-1-3XGFP 및 Ad5CMVGFP의 moi-1에 의해 유전자도입된 HepG2 세포 내의 GFP 발현을 나타내는 도면이다.
- [0184] 도 27A 및 도 27B는 각각 Ad5PPE-1-3XGFP 및 Ad5CMVGFP의 moi-1에 의해 유전자도입된 NSF 세포 내의 GFP 발현을 나타내는 도면이다.
- [0185] 도 28A 및 도 28B는 각각 Ad5PPE-1GFP 구축물 및 Ad5PPE-1-3XGFP 구축물이 주입된 마우스의 혈관의 내피세포 내의 GFP 발현을 나타내는 현미경사진이다.
- [0186] 도 29A 내지 도 29C는 각각 Ad5CMVGFP 주입된 마우스(도 29A), Ad5PPE-1GFP 주입된 마우스(도 29B; 화살표로 표시된 혈관벽 내에서 약간 높은 수준의 GFP 발현이 관찰된다) 및 Ad5PPE-1-3XGFP 주입된 마우스(도 29C)의 신장 조직의 현미경사진이다.
- [0187] 도 30A 내지 도 30C는 각각 도 29A 내지 도 29C의 실험을 비장 조직에 대해 실시한 결과의 현미경사진이다.
- [0188] 도 31A 내지 도 31D는 생리식염수가 주입된 대조 마우스의 전이성 폐암 내에서의 GFP 발현(도 31A), Ad5CMVGFP가 주입된 마우스의 전이성 폐암 내에서의 GFP 발현(도 31B), Ad5PPE-1GFP가 주입된 마우스의 전이성 폐암 내에서의 GFP 발현(도 31C), 및 Ad5PPE-1-3XGFP가 주입된 마우스의 전이성 폐암 내에서의 GFP 발현(도 31D)을 보이는 도면이다. Anti Cd31 면역염색(immunostaining)(도 31C' 내지 도 31D')은 각 전이 조직 내에서의 GFP 발현 및 CD31 발현의 공국재화(co-localization)를 확인해 준다.
- [0189] 도 32는 트랜스펙션된 세포가 하이폭시아 조건 하에서 배양되었을 때 쥐과동물의 PPE-1 프로모터를 포함하는 플라즈미드에 의해 트랜스펙션된 BAEC 내의 루시페라제 활성(광의 단위/mg 단백질)이 크게 높아지는 것을 보여주는 히스토그램이다.
- [0190] 도 33은 Ad5PPE-1Luc 및 Ad5CMVLuc를 사용하여 얻어진 도 32와 유사한 히스토그램이다.
- [0191] 도 34는 다른 세포주 내의 하이폭시아 영향을 보이는 도 33과 유사한 히스토그램이다.
- [0192] 도 35는 BAEC 세포 내의 PPE-1 하이폭시아 응답에 미치는 본 발명의 3X 배열의 영향을 보여주는 히스토그램이다. 세포는 Ad5PPE-1Luc 및 Ad5PPE-1-3XLuc에 의해 트랜스డ션되었다.
- [0193] 도 36은 대퇴동맥결착(femoral artery ligation) 후의 PPE-1-Luc 유전자도입 마우스의 다양한 조직 내에서의 루시페라제 발현의 수준을 보여주는 히스토그램이다.
- [0194] 도 37A 및 도 37B는 본 발명에 관련되어 채용된 구축물의 플라즈미드 맵이다.
- [0195] 도 38A 내지 도 38F는 마우스의 허혈지(ischemic limb) 내에서의 혈액관류(blood perfusion) 및 혈관신생에 미치는 Ad5PPE-1-3XVEGF 및 Ad5CMVVEGF의 효과를 보이는 도면이다. 도 38A 내지 도 38D는 동맥결착 후 21일 경과시 포획된 다양한 처리 그룹의 마우스의 허혈지 내의 관류의 초음파 혈관조영 사진이다. 황색 신호는 강한 관류를 나타낸다. 사진의 우측은 사지(time)의 말단부를 나타낸다. 도 38A는 Ad5PPE-1-3XVEGF 처리된 마우스; 도 38B는 Ad5CMVVEGF 처리된 마우스; 도 38C는 대조군으로서, 생리식염수로 처리된 마우스; 도 38D는 대조군으로서 정상 사지를 나타낸다. 도 38E 및 도 38F는 다양한 처리 그룹의 초음파 혈관조영 사진 내의 신호의 평균 강도(도 38E) 및 다양한 처리 그룹의 CD31의 수 + 세포수/mm²로서 측정된 평균 모세혈관 밀도(도 38F)이다.
- [0196] Ad5PPE-1Luc(백색 막대) 및 Ad5CMVLuc(흑색 막대)에 의해 트랜스డ션된 증식 상태 및 휴지 상태의 소과동물의 동맥 내피세포(BAEC) 내에서의 루시페라제 활성을 보여주는 히스토그램이다.
- [0197] 도 40은 정상 증식 상태, 휴지 상태 및 VEGF의 첨가 후의 급속 증식 상태 중의 Ad5PPE-1Luc에 의해 트랜스డ션 된 BAEC 내에서의 루시페라제 활성을 보여주는 히스토그램이다.
- [0198] 도 41A 및 도 41B는 Ad5PPE-1Luc 및 Ad5CMVLuc 정상 주입된 C57BL/6 마우스의 대동맥(도 41A) 및 간장(도 41

B)에서의 루시페라제 활성(광의 단위/ μg 단백질)을 보여주는 히스토그램이다. 활성은 주입 후 1 (n=13), 5 (n=34), 14 (n=32), 30 (n=20) 및 90 (n=11)일 경과시에 측정되었다.

[0199] 도 42A 및 도 42B는 정상 주입된 BALB/C 마우스 내에서의 Ad5PPE-1Luc(백색 막대) 또는 Ad5CMVLuc(흑색 막대)의 주입 후 5일 경과 후(도 42A) 및 14일 경과 후(도 42B)(각 시점에서 n=10)에 검출된 상대 루시페라제 활성(광의 단위/ μg 단백질)을 보여주는 히스토그램이다. 활성은 각 마우스의 몸통의 총 루시페라제 발현의 백분율로서 표현되어 있다.

[0200] 도 43은 Sudan - IV으로 착색된 ApoE 결핍 마우스로부터 해부된 대동맥을 보여주는 종래기술의 사진이다. 흉대 동맥은 적색으로 착색된 아테로성 동맥경화증(atherosclerotic lesion) 부분이 적고, 복부 영역은 적색으로 착색된 아테로성 동맥경화증 부분이 많다(출전: Imaging of Aortic atherosclerotic lesions by ^{125}I -HDL and ^{125}I -BSA. A. Shaish et al, Pathobiology 2001;69:225-29).

[0201] 도 44는 ApoE 결핍 마우스에게 Ad5PPE-1Luc(백색 기둥; n=12) 또는 Ad5CMVLuc(흑색 기둥; n=12)을 전신 주입한 후 5일 경과시 검출된 절대 루시페라제 활성(광의 단위/ μg 단백질)을 보여주는 히스토그램이다. 복대동맥으로부터 관찰된 루시페라제 활성은 높은 병변 수준(high lesion levels)이고, 흉대동맥으로부터 관찰된 루시페라제 활성은 낮은 병변 수준이다.

[0202] 도 45는 회복기 창상의 C57BL/6 유도 마우스에게 Ad5PPE-1Luc(흑색 막대) 또는 Ad5CMVLuc(백색 막대)를 전신 주입한 후 5일 경과시 절대 루시페라제 활성(광의 단위/ μg 단백질)을 보여주는 히스토그램이다.

[0203] 도 46은 정상 폐, 루이스 폐암 유발 마우스의 전이성 폐암 및 원발 종양의 루시페라제 활성을 보여주는 히스토그램이다. 루이스 폐암은 원발성 종양 모델의 경우 등에, 전이성 폐암의 경우 발바닥에 D122-96 세포를 주입하여 유발시켰다. 루시페라제 활성은 Ad5PPE-1Luc(n=9; 백색 기둥) 또는 Ad5CMVLuc(n=12; 흑색 기둥)을 전신 주입 후 5일 경과시 측정되었다. 활성은 광의 단위/mg 단백질로서 표시된다.

[0204] 도 47A 내지 도 47D는 Ad5PPE-1GFP의 종양내 주입 후 LLC 포함하는 마우스의 폐 및 종양 내의 GFP 발현 및 조직 형태를 도시한 현미경사진이다. 조직은 OCT 내에서 냉동되고, 크리요스타트(cryostat)에 의해 10 μm 의 치수로 절단되었다. 모든 사진은 25x의 배율로 촬영되었다. 도 47A는 폐전이의 혈관신생 혈관 내의 GFP 발현; 도 47B는 도 47A의 단편의 CD31 항체 면역염색(immunostaining); 도 47C는 원발성 종양의 혈관 내의 GFP 발현; 도 47D는 혈관을 보여주는 C 단편의 위상차 현미경사진이다.

[0205] 도 48은 Ad5CMVLuc, Ad5PPE-1Luc 및 Ad5PPE-1-3X-Luc가 주입된 정상 폐와 루이스 폐암 유발 마우스의 전이성 폐 내에서의 루시페라제 발현을 보여주는 히스토그램이다. 루이스 폐암은 전이성 모델의 경우 발바닥에 D122-96 세포를 주입하여 유발시켰다. 루시페라제 활성은 Ad5CMVLuc (n=7; 흑색 막대), Ad5PPE-1Luc (n=6; 회색 막대, 또는 Ad5PPE-1-3XLuc (n=13; 갈색 막대)의 전신 주입 후 5일 경과시 측정되었다. 활성은 광의 단위/mg 단백질로서 표시되어 있다.

[0206] 도 49는 Ad5CMV, Ad5PPE-1Luc 및 Ad5PPE-1(3X)이 주입된 정상 폐 및 루이스 폐암 유발 마우스의 폐전이 내에서의 간장 활성(여기서, 간장은 100%이다)의 백분율로서 루시페라제 활성을 보여주는 히스토그램이다.

[0207] 도 50A 및 도 50B는 Ad5PPE-1-3X-GFP가 주입된 LLC 폐전이를 가지는 마우스 내의 GFP 발현(도 50A)의 공국재화 및 CD31 면역염색(도 50B)을 보여주는 현미경사진이다.

[0208] 도 51은 PPE-1 루시페라제 유전자도입 마우스의 대퇴동맥결착 후 2, 5, 10 및 18일 경과 후 근육(허혈 및 정상) 내의 루시페라제 활성(광의 단위/ μg 단백질) 및 대조군(비결착 마우스, 경과일은 0; 각 그룹에 대해 n=8)의 루시페라제 활성을 보여주는 히스토그램이다.

[0209] 도 52는 PPE-1 루시페라제 유전자도입 마우스의 대퇴동맥결착 후 5(n=6), 10(n=6) 및 18(n=8)일 경과 후 간장, 폐 및 근육(허혈 및 정상) 내의 대동맥 내의 루시페라제 활성(광의 단위/ μg 단백질) 및 대조군(비결착 마우스, 경과일은 0)의 루시페라제 활성을 보여주는 히스토그램이다.

[0210] 도 53은 원발 종양 내에 Ad5CMVLuc (흑색 막대) 또는 Ad5PPE-1Luc (백색 막대)를 주입한 LLC 마우스의 간장, 폐 및 원발 종양 내에서 검출된 루시페라제 활성(광의 단위/ μg 단백질)을 보여주는 히스토그램이다.

[0211] 도 54A 내지 도 54H는 다양한 도입유전자의 조직 특이적 발현 또는 구성적 발현의 조직 분포를 보여주는 인시츄 하이브리다이제이션(in-situ hybridization) 사진이다. 도 54A 내지 도 54C는 Ad5PPE-1-3XVEGF 처리된 마우스 (도 54A); Ad5CMVVEGF 처리된 마우스(도 54B); 생리식염수 처리된 마우스(도 54C); Ad5CMVVEGF 처리된 마우스

의 간장 절편의 허혈 근육 상의 VEGF 특이적 안티센스 프로브(antisense probe)를 구비한 인시츄 하이브리다이제이션 사진(도 54D)이다. 화살표는 확실하게 염색된 세포를 지시한다. 도 54E 내지 도 54G는 Ad5PPE-1-3XPDGF-B 처리된 마우스(도 54E); Ad5CMVPDGFB 처리된 마우스(도 54F); 생리식염수 처리된 마우스(도 54G); Ad5CMVPDGFB 처리된 마우스의 간장 절편의 허혈 근육 상의 PDGF-B 특이적 안티센스 프로브를 구비한 인시츄 하이브리다이제이션 사진(도 54H)이다.

[0212] 도 55A 및 도 55B는 마우스 허혈지의 혈액관류 및 혈관신생에 미치는 Ad5PPE-1-3XVEGF 및 Ad5CMVVEGF에 미치는 장기적 효과를 보여주는 히스토그램이다. 도 55A는 대퇴 동맥 결찰 후 50일 경과시 다양한 처리 그룹의 US 이미지 내의 평균 신호 강도이다. 도 55B는 대퇴 동맥 결찰 후 70일 경과시 다양한 처리 그룹의 CD31수+세포수/mm²로 측정된 평균 모세혈관 밀도이다.

[0213] 도 56A 내지 도 56D는 마우스 허혈지의 신혈관형성에 미치는 Ad5PPE-1-3XPDGF-B의 장기적 효과를 보여주는 히스토그램이다. 도 56A 및 도 56B는 US 이미지에 의해 측정된 평균 혈관 관류 밀도이다(도 56A는 대퇴 동맥 결찰 후 30일 경과시; 도 56B는 대퇴 동맥 결찰 후 80일 경과시). 도 56C 및 도 56D는 다양한 처리 그룹의 CD31수+세포수/mm²로 측정된 평균 모세혈관 밀도이다(도 56C는 대퇴 동맥 결찰 후 35일 경과시; 도 56D는 대퇴 동맥 결찰 후 90일 경과시).

[0214] 도 57A 내지 도 57G는 마우스 허혈지의 신혈관형성 및 혈류에 미치는 PDGF-B 및 VEGF만을 사용한 혈관신생 요법 또는 내피세포 특이적 프로모터 또는 구조적 프로모터의 조절 하에서 병용시의 혈관신생 요법의 장기적 효과를 보여주는 히스토그램이다. 도 57A는 대퇴 동맥 결찰 후 80일 경과시의 다양한 처리 그룹의 US 이미지 내의 평균 신호 강도이다. 도 57B는 대퇴 동맥 결찰 후 90일 경과시의 다양한 처리 그룹의 CD31수+세포수/mm²로 측정된 평균 모세혈관 밀도이다. 도 57C 내지 도 57G는 대퇴 동맥 결찰 후 90일 경과시의 허혈지 근육 내의 성숙 혈관을 향한 평활근 세포 동원(recruitment)을 보여준다. 평활근 세포는 항-α-Smactin 항체(적색, X20)를 이용하여 면역염색되었다. 도 57C는 Ad5PPE-1-3XPDGF-B 처리된 마우스; 도 57D는 병용처리된 마우스; 도 57E는 Ad5PPE-1-3XVEGF 처리된; 도 57F 대조로서, Ad5PPE-1-3XGFP 처리된 마우스; 도 57G는 정상의 반대측 사지(대혈관만 염색되어 있는 것에 주의)를 나타낸다.

[0215] 도 58은 동맥 결찰 후 50일 경과시의 마우스 허혈지 내의 혈관관류 상에 미치는 PDGF-B 단독의 효과 또는 혈관신생 유발 인자 VEGF와의 병용에 의한 효과를 보여주는 도면이다.

[0216] 도 59는 유전자 지향성 효소 프로드러그 치료법(gene-directed enzyme prodrug therapy; GDEPT)의 기본 원리의 개략 설명도이다.

[0217] 도 60A 및 도 60B는 플라즈미드 pEL8(3x)-TK의 개략 구조 맵이다. 도 60A는 플라즈미드 pEL8(3x)-TK의 개략 구조 맵이다. 도 60B는 플라즈미드 pACPPE-1(3x)-TK의 개략 구조 맵이다.

[0218] 도 61은 자외선 형광에 의해 가시화된 AdPPE-1(3x)-TK 벡터의 PCR 생성물의 아가로스 겔 분석도이다.

[0219] 2개의 프라이머가 사용되었다: 포워드 프라이머(forward primer) 5'-ctttgattctgaactctg-3' (프리프로엔도셀린 프로모터 배열에서 455-474 bp)(배열번호:9) 및 리버스 프라이머(reverse primer) 5'-taaggcatgccattgttat-3' (HSV-TK 유전자 배열에서 1065-1084 bp)(배열번호:10). 다른 벡터에 특이적인 프라이머는 PCR 생성물을 형성하지 않았다. 1 kb 뱀드는 AdPPE-1(3x)-TK 바이러스 내의 PPE-1(3x) 프로모터 및 HSV-TK 유전자를 검증한다. 레인 1: 100 bp 크기의 마아커 래더(marker ladder). 레인 2: pACPPE-1(3x)-TK 플라즈미드. 레인 3: AdPPE-1(3x)-TK 바이러스. 레인 4: DNA 없음.

[0220] 도 62A 내지 도 62C는 벡터 AdPPE-1(3x)-TK(도 62A), 벡터 AdPPE-1(3x)-Luc(도 62B) 및 벡터 AdCMV-TK(도 62C)의 개략적인 선형 맵이다.

[0221] 도 63은 PPE-1 (3x)의 제어 하의 TK의 우수한 내피세포 세포독성을 보여주는 일련의 현미경사진들이다. 소 대동맥혈관 내피세포(BAEC)는 0.1, 1, 10, 100, 및 1000의 감염다중도(multiplicity of infections; m.o.i.)로 AdPPE-1(3x)-TK, AdCMV-TK 및 AdPPE-1(3x)-Luc으로 트랜스데ク션되었다. 트랜스데크션 4시간 경과 후 GCV (1 μg/ml)가 첨가되었다. 대조군은 GCV가 없는 벡터 또는 벡터가 없는 GCV로 트랜스데크션된 세포였다. 실험은 각 모든 그룹당 12개의 웰(wells) 씩 96개의 웰 플레이트(well plates)에서 2회 수행되었다. 양 대조군은 세포사를 발생하지 않았다(데이터 없음). 세포독성을 특징화하는 형태변화(세포 확대, 신장 및 팽창) 및 AdCMV-TK보다 상당히 낮은 감염다중도(m.o.i.)에서 AdPPE-1 (3x) + GCV처리된 세포 내에서 명백한 세포독성(컨플루언스(confluence) 손실)에 주목할 것. AdPPE-1 (3x)-Luc로 트랜스데크션된 세포는 정상의 상태(소형, 원형, 컨플루언

트)로 유지되었다.

[0222] 도 64는 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 내피세포 세포독성을 설명하는 그래프이다. BAEC가 96개의 웨플레이트 내에 준비되고, 도 13에 도시된 바와 같이 트랜스덕션되고, 트랜스덕션 후 4시간 경과시 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 GCV가 첨가되었다. 벡터의 첨가 후 10일 경과시, 크리스털 바이올렛 염색법을 이용하여 세포의 생존능력이 측정되었다. 높은 감염다중도(m.o.i.)에서의 AdPPE-1 (3x)+ GCV의 우수한 세포독성에 주목할 것.

[0223] 도 65는 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 내피세포 세포독성 및 간시클로비르 투여의 우수한 시너지를 보여주는 일련의 현미경사진이다. 소 동맥혈관 내피세포(BAEC)는 10의 감염다중도 전술한 바와 같이 AdPPE-1(3x)-TK, AdCMV-TK 및 AdPPE-1(3x)-Luc으로 트랜스덕션되었고, 트랜스덕션 후 4시간 경과시 증가하는 농도의 GCV에 노출되었다(0.001-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도). 대조군은 GCV가 없는 벡터 또는 벡터가 없는 GCV로 트랜스덕션되었다. 실험은 모든 그룹에 대해 12월씩, 96개의 웨 플레이트에서 2회 실행되었다. 양 대조군은 세포사를 발생하지 않았다(데이터 없음). 세포독성을 특징화하는 형태변화(세포 확대, 신장 및 팽창) 및 AdCMV-TK에 노출된 세포보다 상당히 낮은 GCV 농도에서 AdPPE-1 (3x) + GCV처리된 세포 내에서 명백한 세포독성(컨플루언스(confluence) 손실)에 주목할 것.

[0224] 도 66은 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 내피세포 세포독성 및 간시클로비르 투여의 시너지를 보여주는 그래프이다. BAEC는 96개의 웨 플레이트 내에서 준비되었고, 도 65에 도시된 바와 같이 트랜스덕션되었고, 트랜스덕션 후 4시간 동안 증가하는 농도(0.0001-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 GCV가 첨가되었다. 벡터 첨가 후 10일 경과시, 크리스털 바이올렛 염색법을 이용하여 세포의 생존능력이 측정되었다. AdCMV-TK의 강한 구조적 TK 발현에 비해, 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 GCV 농도에서 AdPPE-1 (3x)+ GCV의 우수한 세포독성에 주목할 것.

[0225] 도 67은 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 특이적 내피세포 세포독성 및 간시클로비르 투여의 시너지를 보여주는 일련의 그래프이다. 내피세포[소 동맥혈관 내피세포(BAEC), 인간 제대 정맥 내피세포(HUVEC)] 및 비내피세포[인간 간암 세포(HepG-2), 인간 정상 피부 섬유아세포(NSF)]는 10의 m.o.i.에서 AdPPE-1(3x)-TK, AdPPE-1(3x)-Luc 또는 AdCMV-TK로 트랜스덕션되고, 트랜스덕션 후 4시간 경과시 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 GCV가 투여되었다. 실험은 모든 그룹에 대해 12개의 웨씩 총 96개의 웨 플레이트 내에서 2회 실시되었다. 트랜스덕션 후 4일 경과시 세포독성 및 세포의 형태변화가 현미경에 의해 측정되었다. BAEC 및 HUVEC 배양물 내의 AdPPE-1(3x)-TK+ GCV의 우수한 세포독성 효과[세포독성을 특징화하는 형태변화(세포 확대, 신장 및 팽창) 및 세포독성(컨플루언스 손실)] 및 HepG-2 및 NSF 배지 내의 세포독성이 없는 것(소형이고, 원형이고, 컨플루언트(confluent)가 유지되는 세포)에 주목할 것. AdPPE-1(3x)-Luc + GCV는 모든 종류의 세포에 대해 무독성이었다.

[0226] 도 68은 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 특이적 내피세포 세포독성 및 간시클로비르 투여의 시너지를 보여주는 히스토그램이다. 내피세포(BAEC 및 HUVEC) 및 비내피세포(HepG-2 및 NSF)는 96개의 웨 플레이트 내에 준비되었고, 도 67에 도시된 바와 같이 트랜스덕션되고, 트랜스덕션 후 4시간 경과시 증대하는 농도(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 GCV가 첨가되었다. 벡터의 첨가 후 10일 경과시, 크리스털 바이올렛 염색법을 이용하여 세포의 생존능력이 측정되었다. AdCMV-TK + GCV의 비특이적 세포독성에 비해 우수한 AdPPE-1 (3x) + GCV의 내피세포 특이적 세포독성에 주목할 것.

[0227] 도 69는 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 내피세포 선택적 특이성 및 극단의 감염다중도의 간시클로비르 투여를 보여주는 일련의 현미경사진이다. 비내피세포(NSF)는 도 66에 도시된 바와 같이 높은 m.o.i.(=100)로 AdPPE-1(3x)-TK, AdPPE-1(3x)-Luc 및 AdCMV-TK로 트랜스덕션되었고, 트랜스덕션 후 4시간 경과시 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 GCV가 투여되었다. 실험은 각 그룹당 12개의 웨씩 총 96개의 웨 플레이트 내에서 2회 수행되었다. 트랜스덕션 후 4일 경과시 세포독성 및 세포 형태변화가 현미경을 이용하여 검출되었다. AdCMV-TK+GCV의 비특이적 세포독성에 비해, NSF 세포의 형태에 미치는 AdPPE-1(3x)-TK+GCV의 영향이 부족한 것에 주목할 것.

[0228] 도 70은 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 인비보 발현에 의한 전이성장의 억제 및 간시클로비르(GCV) 투여의 시너지를 보여주는 일련의 현미경사진이다. 루이스 폐암(LLC)의 폐전이는 14주령의 수컷 C57BL/6 마우스의 좌측 발바닥에 LLC 종양 세포를 접종하는 것에 의해 유발되었고, 프라이머리 종양의 크기가 7 mm에 도달했을 때 상기 좌측 발바닥이 절단되었다. 5일 후, 10^{11} PFU 농도의 아데노바이러스 벡터[AdPPE-1(3x)-TK + GCV; AdCMV-TK + GCV; AdPPE-1(3x)-TK-GCV없음]가 꼬리 정맥 내에 주입되었고, 14일 동안 100 mg/kg의 GCV가 꼬리 정맥 내에 주입되었다. 마우스들은 벡터 주입 후 24일째 회생되었고, 조사 분석을 위해 폐가 제거되었다. 대조 마우스는 생리식염수 및 GCV가 주입되었다. AdCMV-TK + GCV, GCV가 없는 AdPPE-1 및 아데노바이러스가 없는 GCV로 처리된 마우스에 비해 AdPPE-1 (3x) + GCV 처리된 마우스의 폐 내의 전이의 확대범위 상당히 축소되었음

에 주목할 것.

[0229] 도 71은 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 인비보 발현에 의한 전이성장의 억제 및 간시클로비르(GCV) 투여의 시너지를 보여주는 히스토그램이다. 폐전이는 C57BL/6 마우스에서 유도되었고, 마우스들은 10^{11} PFU 농도의 아데노바이러스 벡터[AdPPE-1(3x)-TK + GCV; AdCMV-TK + GCV; AdPPE-1(3x)-TK-GCV 없음] 및 전술한 바와 같이 GCV (100 mg/kg)로 처리되었다. 마우스들은 벡터 주입 후 24일째 되는날 희생되었고, 폐전이의 분석을 위해 폐가 절제되었다. 대조 마우스들은 생리식염수 및 GCV가 주입되었다. GCV가 없는 경우(85%를 초과) 및 AdCMV-TK + GCV 및 생리식염수 + GCV 대조(75%를 초과)의 전이 덩어리에 비해, AdPPE-1 (3x) + GCV 처리된 마우스 내의 전이 덩어리의 상당한 억제에 주목할 것.

[0230] 도 72a 내지 도 72c는 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 인비보 발현에 의한 전이성 병리학의 억제 및 간시클로비르(GCV) 투여의 시너지를 보여주는 폐전이의 조직학적 단면도이다. 폐전이는 C57BL/6 마우스에서 유도되었고, 마우스들은 10^{11} PFU 농도의 아데노바이러스 벡터[AdPPE-1(3x)-TK + GCV; AdCMV-TK + GCV; AdPPE-1(3x)-TK-GCV 없음] 및 전술한 바와 같이 GCV (100 mg/kg)로 처리되었다. 마우스들은 벡터 주입 후 24일째 되는날 희생되었고, 폐전이 조직(도 72a 및 도 72b) 또는 폐 조직(도 72c)이 절단되고, 혈마토실린 및 에오신으로 염색되었다. AdPPE-1 (3x) + GCV에 의해 처리된 폐의 전이 내에 대규모의 중심괴사(central necrosis) 및 수많은 단핵구 침윤물(mononuclear infiltrates) 덩어리에 주목할 것(도 72a 및 도 72b 참조).

[0231] 도 73a 및 도 73b는 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 인비보 발현에 의한 종양 아폽토시스의 강화 및 간시클로비르(GCV) 투여의 시너지 향상을 보여주는 것으로서, TUNEL 및 폐전이의 항-카스파제-3로 염색된 유도 LLC 폐전이의 조직병리학적 단편을 나타낸 것이다. 도 71a 및 도 71b에 기술된 바에 따라 유도되고 준비된 LLC 폐전이의 단편은 파라핀 내에 고정 및 매립되고, 클레노-프래그E1(Klenow-FragE1)(Oncogene, Cambridge, MA) (도 73a) 및 항-카스파제-3-특이적 면역조직병리학(도 73b)을 이용한 디옥시뉴클레오티드 트랜스페라제 매개성 dUTP-닉 엔드(nick end)-표지법(TUNEL)에 의해 아폽토시스의 지표로서 분석되었다. AdPPE-1 (3x)-TK+GCV가 정맥 내에 주입된 마우스의 폐전이 내의 강화된 아폽토시스에 주목할 것.

[0232] 도 74a 및 도 74b는 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 인비보 발현에 의한 종양 아폽토시스의 강화 및 간시클로비르(GCV) 투여의 시너지 향상을 보여주는 것으로서, TUNEL 및 폐전이의 항-카스파제-3로 염색된 유도 LLC 폐전이의 조직병리학적 단편을 나타낸 것이다. TUNEL 및 폐전이의 항-카스파제-3로 염색된 유도 LLC 폐전이의 조직병리학적 단편을 나타낸 것이다. 도 73a 및 도 73b에 기술된 바에 따라 유도되고 준비된 LLC 폐전이의 단편은 파라핀 내에 고정 및 매립되고, 클레노-프래그E1(Klenow-FragE1)(Oncogene, Cambridge, MA)(도 74a) 및 항-카스파제-3-특이적 면역조직병리학(도 74b)을 이용한 디옥시뉴클레오티드 트랜스페라제 매개성 dUTP-닉 엔드(nick end)-표지법(TUNEL)에 의해 아폽토시스의 지표로서 분석되었다. 흑색 화살표는 적혈구를 나타내고, 적색 화살표는 아폽토시스 내피세포를 나타내고, 백색 화살표는 아폽토시스 종양 세포를 나타낸다. AdPPE-1 (3x)-TK+GCV가 정맥 내에 주입된 마우스의 폐전이의 혈관(내피세포) 영역 내의 강화된 아폽토시스에 주목할 것.

[0233] 도 75a 내지 도 75d는 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 인비보 발현에 의한 혈관신생의 억제 및 간시클로비르(GCV) 투여의 시너지 향상을 보여주는 것으로서, 쥐과동물 폐암 조직의 면역조직병리학적 단편을 나타낸 것이다. 도 73a 및 도 73b에 기술된 바에 따라 유도되고 준비된 LLC 폐전이(도 75a), 간장(도 75c) 및 정상 폐조직(도 75b)의 단편은 파라핀 내에 고정 및 매립되고, 항-CD-31 면역 형광분석법에 의해 혈관신생의 지표로서 분석되었다. AdPPE-1(3x)-TK + GCV 처리된 마우스의 폐전이 내의 짧고 불분명한 혈관 및 불연속성 또는 분기(branching)에 주목할 것. 도 75d는 폐전이 혈관형성(혈관신생)의 컴퓨터에 기초한 혈관밀도 측정(Image Pro-Plus, Media Cybernetics Incorporated)을 보여주는 히스토그램이다. 좌측 막대: AdPPE-1(3x)TK+GCV; 우측 막대: AdPPE-1(3x)TK no GCV.

[0234] 도 76은 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 인비보 발현에 의한 간독성(hepatotoxicity)의 부재 및 간시클로비르(GCV) 투여를 보여주는 것으로서, 쥐과동물의 간장의 조직병리학적 조직 단편을 나타낸 것이다. 도 73a 및 도 73b에 기술된 바에 따라 유도되고 준비된 LLC 폐전이를 보유한 마우스의 간장으로 취한 단편은 파라핀 내에 고정 및 매립되고, 혈마토실린 및 에오신에 의해 염색되었다. 구조적으로 발현된 AdCMV-TK+GCV(우측 폐널)에 의해 처리된 마우스의 간장 내의 심각한 세포독성에 비해, AdPPE-1-TK+GCV (3x)(좌측 폐널)에 의해 처리된 마우스의 간장 내의 세포독성 지표가 존재하지 않는 것에 주목할 것.

[0235] 도 77은 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 기관 특이적 발현 및 간시클로비르(GCV) 투여를 보여주는 RT-PCR 분석도이다. 도 73a 및 도 73b에 기술된 바에 따라 LLC 폐전이는 9마리의 15주령의 수컷 C57BL/6 마우스

내에 유도되고 준비되었다. 프라이머리 종양의 제거 후 14일 경과시 아데노바이러스 벡터[AdPPE-1 (3x)-TK and AdCMV-TK], 및 생리식염수 대조가 정맥 주입되었다. 마우스들은 벡터 주입 후 6일 경과시 희생되었고, 기관이 채취되었다. 후술되는 바와 같이 상이한 기관의 RNA가 추출되었고, PPE-1 (3x) 및 HSV-TK 전사는 PPE-1(3x) 프로모터를 가지는 RT-PCR PCR 및 HSV-TK 유전자 프라이머에 의해 증폭되었다. PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 내피세포 특이적 발현에 주목할 것(하측 패널의 중앙).

[0236] 도 78a 및 도 78b는 Balb/c 쥐과동물 대장암 종양 모델 내의 치료량 이하의 조사(irradiation) 및 비독성 조사의 범위를 보여주는 그래프이다. 8주령의 20마리의 Balb/c 수컷 마우스의 좌측 대퇴부에 CT-26 대장암 세포가 접종되고, 종양의 직경이 4-6 mm에 달했을 때, 전신마취 하에서 0, 5, 10, 또는 15 Gy로 국부조사(local irradiation) 되었다. 종양의 체적(도 76a)을 구하기 위해, 종양축은 식 $V = \pi / 6x a^2 x \beta$ (a 는 단축이고, β 는 장축이다)에 따라 계산되었다. 5 Gy의 조사량에 의해 일부에만 통계적으로 중요하지 않은 종양 진행의 지연이 유도되었고(도 78a 참조), 상당량의 중량 손실도 발생하지 않았다(도 78b 참조).

[0237] 도 79a 내지 도 79g는 치료량 이하의 방사선요법(sub-therapeutic radiotherapy) 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 발현 및 간시클로비르(GCV) 투여의 병용에 의한 쥐과동물 대장암 내의 종양 성장의 억제의 시너지 효과를 도시한 것이다. 8주령의 100 마리의 수컷 Balb/C 마우스에 CT-26 대장암 종양 세포가 접종되었다. 종양의 축이 4-6 mm에 도달했을 때, 10^{11} PFU 농도의 바이러스 벡터[AdPPE-1 (3x)-TK or AdCMV-TK]가 꼬리 정맥 내에 주입되었고, 표시된 바와 같이 14일 동안 매일 복강내에 GCV가 주입되었다(100 mg/kg 체중). 벡터 투여 후 3일 경과시, 마우스들은 국소 5 Gy 선량으로 조사되었다. 종양의 체적은 식 $V = \pi / 6x a^2 x \beta$ (a 는 단축이고, β 는 장축이다.)에 따라 산정되었다. 도 79a는 벡터 주입 후 14일 경과시의 평균 종양 체적 ± 표준오차이다. 도 79b는 방사선요법으로 치료된 그룹에서 시간경과에 따른 평균 종양 체적의 변화를 보여준다. 도 79c는 AdPPE-1(3x)-TK + GCV 처리된 마우스의 시간경과에 따른 평균 종양 체적의 변화를 보여준다. 도 79d는 AdCMV-TK + GCV 처리된 마우스의 시간경과에 따른 평균 종양 체적의 변화를 보여준다. 도 79e는 대조 생리식염수 + GCV 처리된 마우스의 시간경과에 따른 평균 종양 체적의 변화를 보여준다. 도 79f는 GCV가 없는 상태에서 AdPPE-1(3x)-TK 처리된 마우스의 시간경과에 따른 평균 종양 체적의 변화를 보여준다. 도 79g는 희생 당일의 Balb/C 마우스의 CT-26 프라이머리 종양의 거시적 병리학(gross pathology)의 일례를 나타낸다. 방사선요법은 비표적화 벡터인 AdCMV-TK($p=0.04$)(도 79c 내지 도 79f 참조)에 비해, 혈관신생 내피세포 전사 표적화 벡터인 AdPPE-1(3x)-TK만을 상당히 강화하는 것에 주목할 것. 모든 바이러스 벡터에 의한 치료방법은 방사선요법이 없는 상태에서는 효과가 없었다.

[0238] 도 80a 및 도 80b는 치료량 이하의 방사선요법(sub-therapeutic radiotherapy) 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 발현 및 간시클로비르(GCV) 투여의 병용에 의한 쥐과동물 대장암 내의 종양 괴사 유도의 시너지 효과를 보여주는 프라이머리 CT-26 종양의 조직병리학 단편을 나타낸 것이다. 도 79a 내지 도 79g에 기술된 바에 따라 유도되고 준비된 CT-26 대장암 종양의 단편은 파라핀 내에 고정 및 매립되고, 헤마토실린 및 에오신에 의해 염색되었다. AdPPE-1 (3x)+GCV+저선량의 방사선요법의 병용에 의한 괴사 영역(도 80a) 및 육아조직(granulation tissue) 영역(도 80b)에 주목할 것.

[0239] 도 81a 및 도 81b는 방사선요법 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 인비보 발현의 병용에 의한 내피세포 및 종양 아폽토시스의 강화 및 간시클로비르(GCV) 투여의 시너지 효과를 보여주는 것으로서, TUNEL 및 항-카스파제-3로 염색된 유도 프라이머리 대장암 종양의 조직병리학적 단편을 나타낸다. 도 77a 내지 도 77g에 기술된 바에 따라 유도되고 준비된 CT-26 프라이머리 대장암 종양의 단편은 파라핀 내에 고정 및 매립되고, 클레노-프래그E1(Klenow-FragE1)(Oncogene, Cambridge, MA)(도 81a) 및 항-카스파제-3-특이적 면역조직병리학(도 81b)을 이용한 디옥시뉴클레오티드 트랜스페라제 매개성 dUTP-닉 엔드(nick end)-표지법(TUNEL)에 의해 아폽토시스의 지표로서 분석되었다. 방사선요법 및 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV의 정맥 내 주입의 병용에 의해 처리된 마우스의 종양 내의 대규모 아폽토시스(도 81a) 및 카스파제-3-양성 내피세포(81b)에 주목할 것.

[0240] 도 82는 방사선요법 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 인비보 발현 및 간시클로비르(GCV) 투여의 병용에 의한 내피세포 및 종양 아폽토시스의 강화의 시너지 효과를 보여주는 것으로서, 항-카스파제-3로 염색된 유도 프라이머리 대장암 종양의 조직병리학적 단편을 나타낸다. 도 79a 내지 도 79g에 기술된 바에 따라 유도되고 준비된 CT-26 프라이머리 대장암 종양의 단편은 파라핀 내에 고정 및 매립되고, 항-카스파제-3-특이적 면역조직병리학에 의해 아폽토시스의 지표로서 분석되었다. 흑색 화살표는 적혈구를 나타내고, 적색 화살표는 아폽토시스 내피세포를 나타내고, 백색 화살표는 아폽토시스 종양 세포를 나타낸다. GCV 의존성 아폽토시스 효과에

주목할 것.

[0241] 도 83a 및 도 83b는 방사선요법 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 인비보 발현 및 간시클로비르(GCV) 투여의 병용에 의한 종양 혈관형성의 억제의 강화의 시너지 효과를 보여주는 것으로서 간장 조직과 항-CD-31에 의해 염색된 유도 프라이머리 대장암 종양의 조직병리학 단편을 나타낸다. 도 79a 내지 도 79g에 기술된 바에 따라 유도되고 준비된 간장 조직(도 83b) 및 CT-26 프라이머리 대장암 종양의 단편은 파라핀 내에 고정 및 매립되고, 면역조직병리학을 위해 내피세포 특이적 항-CD-31과 반응되었다. 흑색 화살표는 적혈구를 나타내고, 적색 화살표는 아폽토시스 내피세포를 나타내고, 백색 화살표는 아폽토시스 종양 세포를 나타낸다. 간장 세포(도 83b) 내의 정상 혈관구조에 비해 방사선요법 및 AdPPE-1 (3x)-TK+GCV의 정맥 주입의 병용에 의해 처리된 마우스의 종양 내의 광범위한 혈관 파열에 주목할 것.

[0242] 도 84는 방사선요법 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하 및 간시클로비르(GCV) 투여의 TK의 발현의 조직-특이적 세포독성을 보여주는 것으로서 마우스의 간장 조직의 조직병리학 단편을 나타낸다. 벡터(AdPPE-1 (3x)-TK 및 AdCMV-TK) 및 GCV에 단독으로 그리고 병용 상태로 노출된 마우스의 간장으로부터 취한 단편은 파라핀 내에 고정 및 매립되고, 혜마톡실린 및 애오신에 의해 염색되었다. AdCMV-TK 및 간시클로비르를 보유하는 전형적인 경도의 간독성(좌측 패널) 및 AdPPE-1 (3x)-TK 처리된 간장 내의 혈관 이상이 존재하지 않는 것(우측 패널)에 주목할 것.

[0243] 도 85a 및 도 85b는 C57B1/6 폐암 전이 모델의 치료량 이하의 조사(irradiation) 및 비독성 조사의 범위를 보여주는 그래프이다. 8주령의 35 C57B1/6 수컷 마우스의 좌측 발바닥에 루이스 폐암(Lewis Lung Carcinoma; LLC) 세포가 접종되고, 프라이머리 종양의 제거 후 8일 경과시 전신마취 하에서 0, 5, 10, 또는 15 Gy의 선량으로 흉벽에 조사되었다. 마우스들은 종양 제거 후 28일 경과시 회생되었다. 체중의 감소는 전이성 질병을 시사하였다. 5 Gy의 선량은 치료효과가 없고(도 85a 참조), 독성도 없었다(도 85b 참조).

[0244] 도 86a 내지 도 86d는 방사선요법 및 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 TK의 발현 및 간시클로비르(GCV) 투여의 병용에 의한 쥐과동물 폐암의 전이성 질환의 억제의 시너지 효과를 보여준다. 8주령의 180 마리의 수컷 Balb/C 마우스의 좌측 발바닥에 LLC 세포가 접종되었다. 프라이머리 종양이 발생하는 즉시 전시마취 하에서 발이 절단되었다. 발의 절단 후 5일 경과시, 10^{10} PFU 농도의 벡터[AdPPE-1(3x)-TK or AdCMV-TK]가 꼬리 정맥 내에 주입되었고, 14일간 매일 GCV (100 mg/kg)가 복강내 주입되었다. 벡터 주입 후 3일 경과시, 마우스의 흉벽을 대상으로 단일의 5 Gy 선량의 방사선이 전신마취 하에서 조사되었다. 도 86a은 조사되고, 벡터 처리되지 않은 마우스의 55일간의 생존능력을 보여준다. 도 86b은 AdPPE-1(3x)-TK처리된 마우스의 생존능력을 보여준다. 도 86c는 AdCMV-TK처리된 마우스의 생존능력을 보여준다. 도 86d는 생리식염수 처리된 대조 마우스의 생존능력을 보여준다. 방사선요법은 비표적화 벡터인 AdCMV-TK(도 86b 내지 도 86d 참조)에 의해 혈관신생 내피세포 전사 표적화 벡터인 AdPPE-1(3x)-TK만을 상당히 강화시켜주는 것에 주목할 것. 모든 바이러스 벡터에 의한 치료방법은 방사선요법이 없는 상태에서는 효과가 없었다.

[0245] 도 87a 내지 도 87c는 CMV 프로모터의 제어 하의 Fas-c의 내피세포 세포독성을 보여주는 일련의 히스토그램이다. 소 대동맥혈관 내피세포(BAEC)는 100 moi(좌측), 1000 moi(우측) 및 10000 moi(좌하측)의 CMV-FAS (암색) 또는 CMV-LUC (회색, 음성 대조)로 트랜스덕션된 후 72시간 경과시, 및 상이한 농도의 인간 TNF-α 리간드의 첨가 후 24시간 경과시에 크리스탈 바이올렛으로 염색되었다. 높은 moi 및 TNF-α 농도에서 BAE 세포의 생존능력이 감소되는 것에 주목할 것.

[0246] 도 88은 CMV-LUC(적색 사각형)에 대비되는 CMV-FAS(청색 마름모꼴)를 보유한 293 세포의 강화된 바이러스 복제의 확대를 보여주는 플레이크(plaque) 발달 그래프이다. CMV-FAS 및 CMV-LUC의 CsCl-띠형성 스톡(CsCl-banded stocks)의 적정농도는 후술하는 바와 같은 PFU 실험에 의해 결정되었다. 데이터는 2-3일 간격의 혈소판 실험에 의한 혈소판의 수(로그 스케일)로서 작도되었다.

[0247] 도 89a 및 도 89b는 CMV-루시페라제에 비해 CMV-Fas-c를 보유하는 바이러스 감염(플레이킹(plaquing))의 세포-세포 사이의 높은 전파율을 보여주는 293 세포 배양물의 일련의 사진이다. 감염 후 4일 경과시, CMV-FAS(좌측) 및 CMV-LUC(우측)의 플레이크 사진이 촬영되었다. CMV-FAS의 혈소판은 CMV-LUC의 혈소판에 비해 명백하게 크다. 이것은 아폽토시스에 의해 유도된 것으로 생각되는 세포-세포간 전파 비율이 높은 것을 나타낸다.

[0248] 도 90은 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하 및 간시클로비르(GCV) 투여의 Fas-c의 내피세포 특이적 세포독성의 시너지 효과를 보여주는 히스토그램이다. BAE 세포는 벡터(PPE-1 (3x)-FAS)의 트랜스덕션(10^3 moi) 후 48시간 경과시 100 Nm의 독소루비신(Doxorubicin)에 노출되었다. Dox+PPE-fas= 독소루비신(Doxorubicin)+PPE-1 (3x)-

Fas-c (오렌지색); Dox= 독소루비신 단독 (녹색); PPE-FAS=PPE-1 (3x)-FAS (적색); 비처리=흑색. 세포는 벡터 트랜스덕션 후 96시간 경과시 크리스털 바이올렛으로 염색되었고, 세포의 생존능력은 현미경에 의해 평가되었다. AdPPE-1 (3x)-Fas-c 및 독소루비신 사이의 내피세포 세포독성의 상당한 시너지 효과에 주목할 것.

[0249] 도 91a 및 도 91b는 엔도셀린(PPE-1 3X)의 제어 하에서 VEGF에 의한 배양조직 구축물 내의 우수한 혈관신생의 유도를 보여주는 그래프이다. 조직배양된 구축물(공개되지 않은 과정)은 배지에 VEGF를 보급(50ng/ml)하거나 보급하지 않은 상태에서 성장되었다. 유사한 구축물이 Ad5PPEC-1-3x VEGF 바이러스 또는 대조 Ad5PPEC-1-3x GFP 아데노바이러스(대조 바이러스)(4시간 동안)에 의해 감염되었다. 배양 후 2주 경과시, 초기 구축물은 고정되고, 매립되고, 절단되고, 염색되었다. 혈관신생(Vascularization)은 혈관수/mm² 및 혈관신생된 단면적의 백분율로서 표시되었다. 도 91a는 Ad5PPEC-1-3x VEGF에 의한 세포의 감염이 배양된 구축물 내에 형성된 혈관과 같은 구조의 수 및 크기에 대해 유도작용을 가진다는 것을 보여준다. VEGF 배지에 노출된 구축물에 비해 Ad5PPEC-1-3x VEGF-트랜스덕션된 조직 구축물(VEGF 바이러스) 내의 혈관신생의 양 파라미터의 비약적인 증가(4-5배)에 주목할 것. 도 91b는 Ad5PPEC-1-3x GFP 대조군에 비해 Ad5PPEC-1-3x VEGF에 의해 감염된 세포를 이용하여 성장된 이식조직 구축물의 우수한 생존능력 및 혈관신생을 보여주는 LUC 발광 강도의 히스토그램이다.

[0250] 도 92는 야생형 쥐과동물 PPE-1 프로모터의 DNA 배열이다. 이 프로모터는 내인성 내피세포 특이적 양성 전사 엘리먼트(흑색 이밸리체), NF-1 응답 엘리먼트(분홍 이밸리체), GATA-2 엘리먼트(적색 이밸리체), HIF-1 응답성 엘리먼트(청색 이밸리체), AP-1 부위(site)(녹색 이밸리체), CAAT 신호(오렌지색 이밸리체) 및 TATA 박스(자색 이밸리체)를 포함한다.

[0251] 도 93은 개질된 쥐과동물 프리-프로엔도셀린-1 프로모터의 3x 단편의 배열이다. 이 단편은 2개의 완전한 내피 세포 특이적 양성 전사 엘리먼트(적색) 및 원 배열의 역전된 반쪽들 사이에 위치되는 2개의 부분(청색): 배열번호:15 (전사 엘리먼트 배열번호:6의 3' 부분의 뉴클레오티드), 및 배열번호:16 (전사 엘리먼트 배열번호:6의 5' 부분의 뉴클레오티드)을 포함한다.

[0252] 도 94는 유전자도입 마우스 내의 PPE-1 (3x) 프로모터의 제어 하의 LUC 유전자의 발현의 조직 특이적이고 보센탄 유도된(Bosentan-induced) 강화를 보여주는 히스토그램이다.

[0253] 도 95a 및 도 95b는 ELISA에 의해 측정된 PPE-1(3x) 프로모터의 제어 하에서 발현된 도입유전자에 대한 숙주 면역 반응의 결핍을 보여주는 히스토그램이다. the PPE-1(3x) Fas-c 처리된 마우스(도 95b 참조) 내에서 유발된 최소의 항 TNF-R1 반응에 대비되는 비특이적 항-아데노벡터(anti-adenovector) 반응(도 95a 참조)에 주목할 것.

[0254] 도 96은 내피세포 내의 PPE-1 프로모터의 제어 하의 LUC 유전자 발현의 ET-B 특이적 강화를 보여주는 히스토그램이다. 소 대동맥혈관 내피세포는 전술한 바와 같이 PPE-1-루시페라제 구축물(pEL-8)에 의해 일시적으로 감염되었다. 상이한 농도의 엔도셀린 길항제를 이용하여 처리된 후 1시간 경과시 루시페라제의 상대활성이 계산되었다. 루시페라제 상대활성은 광 단위/β-갈اكت토시다제(galactosidase)로서 계산되었다. β-갈اكت토시다제 활성은 구조적 활성의 lacZ 구축물의 동시 트랜스펙션(co-transfection)에 의해 얻어진다. 계산 값들은 처리되지 않은 세포(농도 0 μM = 100%)에 대한 상대값으로 표시된다. 계산 값들은 트리플리케이트(triplicates)의 평균 ± 표준오차이다. *P < 0.05는 처리되지 않은 세포에 비교되었다(스튜던트 t 검정). BQ788을 이용한 LUC 발현의 투여량 의존성의 ET-1_B 특이적 강화(회색 막대), 및 ET-1_A 특이적 억제제인 BQ123에서의 강화 결핍(흑색 막대들)에 주목할 것.

[0255] 도 97A 및 도 97B는 ET-1_A 및 ET-1_B 억제제 보센탄 유전자도입 마우스의 프리프로엔도셀린 합성 및 분비의 강화를 보여주는 히스토그램이다. 프리프로엔도셀린-1(PPE-1) 프로모터의 제어 하에서 LUC 유전자를 발현하는 유전자도입 마우스는 30일동안 보센탄(100 mg/kg)으로 처리되었다. 도 97A는 유전자도입 동물의 폐로부터 추출된 총 RNA의 히스토그램이다. 도 97B는 프리프로엔도셀린-1 Mrna 수준(반정량(semi-quantitative) RT-PCR에 의해 측정)의 히스토그램이다. 이들 값은 β-액틴(actin)으로 표준화된 후, 임의의 단위의 그래프로 표시되었다. 도 97B는 대조군의 면역반응 엔도셀린-1(ET-1)의 수준(백색 막대) 또는 보센탄 처리된 마우스(회색의 빛금 친 막대)를 보여준다. 결과는 5마리의 마우스 대 대조군인 처리되지 않은 마우스(스튜던츠 t 검정)의 평균±표준오차로서 표시되었다.

[0256] 도 98은 아데노바이러스 벡터에 의해 형질전환된 내피세포 내의 재조합 단백질 발현의 코르티코스테로이드(corticosteroid)에 의한 강화를 보여주는 히스토그램이다. BAEC는 3 μM의 덱사메타손(dexamethasone)(회색 막대) 또는 비스테노이드(no steroids)(흑색 막대)에 48시간 동안 노출된 후, 구조적 CMV 프로모터의 제어 하에

서 LUC 유전자를 보유하는 아데노바이러스 구축물에 의해 10-10⁴의 MOI로 감염되었다. 재조합 유전자 발현은 세포 내의 % 루시페라제/μg 총 단백질로서 표시되었다. 모든 MOI의 코르티코스테로이드에 의한 발현은 지속적으로 강화(MOI가 1000일 때 최대 300%까지 강화)되는 것에 주목할 것.

[0257] 도 99는 PPE-1 프로모터의 제어 하의 재조합 단백질의 내피세포 내에서 코르티코스테로이드에 의해 발현의 강화를 보여주는 형광 현미경사진이다. BAEC는 텍사메타손(3 μM)에 48시간 동안 노출된 후 AdPPE-GFP(100의 MOI, 48시간 동안)에 의해 감염되었다. 현미경사진은 대조군(상측) 및 텍사메타손 처리된 BAEC(하측)의 2개의 웰을 나타낸다. 텍사메타손 처리된 세포 내의 상당히 강한 녹색 형광 신호에 주목할 것.

[0258] 도 100은 조건부 복제 아데노벡터 AdPPE3X-E1(혈관신생 내피 특이적, 레포터 배열 없음), AdCMV-E1(비-조직 특이적, 레포터 유전자 없음) 및 AdPPE3X-GFP(혈관신생 내피 특이적, 녹색 형광 단백질(GFP) 레포터 유전자)의 개략 맵이다;

[0259] 도 101a-101e는 본 발명의 혈관신생 내피 특이적 아데노바이러스 벡터의 내피세포 특이적 복제를 도시한다. 도 101a-c는 비내피 인간 기관지암 세포(A549)(도 101a), 간암 세포(HepG2)(도 101b) 및 정상 피부 섬유아세포(NSF)(도 101c), 및 qRT-PCR에 의한 내피 인간 제정맥 내피세포(HUVEC) (도 101d)의 아데노바이러스 자손 생성물의 양을 도시한다. 세포 단분자층을 1의 감염다중도(MOI)에서 AdPPE3x-E1, AdCMV-E1 및 AdPPE3x-GFP 아데노바이러스로 감염시켰다. 세포 및 배지(medium)으로부터 회수된 바이러스의 양을 qRT-PCR에 의한 감염 후 2시간, 24시간, 48시간 및 72시간에 분석하였다. 시간 경과에 따른 아데노바이러스 복제의 수의 증가배수(fold-increase)가 제1회의 측정(2h)에 대해 상대적으로 계산되었다. 도 101e는 0시간, 24시간(1일), 48시간(2일) 및 72시간(3일)의 각 그룹에서 상대적인 바이러스 카피 수(copy numbers)를 보여주는 막대그래프이다. 이 상대적인 복제수는 AdCMV-E1의 복제수를 AdPPE3x-E1의 복제수로 나누는 것에 의해 계산되었다. 비내피세포 내의 AdPPE3X-E1의 복제는 부족하고, HUVEC 내의 복제는 고수준임에 주목해야 한다.

[0260] 도 102a-102h는 내피세포 내에서의 본 발명의 혈관신생 내피 특이적 아데노바이러스 벡터의 우선 복제(preferential replication) 및 감염력(infectivity)을 보여주는 현미경사진이다. 24개의 웰 플레이트(well plates) 내에서 배양시킨 비내피 HepG2 세포(도 102a, 102b, 102e 및 102f) 및 내피 HUVEC (도 102c, 102d, 102g 및 102h)를 1의 MOI에서 비특이적 대조 벡터 AdCMV-E1(도 102a-102d) 또는 AdPPE3X-E1(도 102e-102h)로 감염시키고, 96시간 동안 배양하였다. 48시간(도 102a, 102c, 102e 및 102g) 및 96시간(도 102b, 102d, 102f 및 102h)에서의 바이러스 복제는 배양물을 염소-항-헥손(hexon) 항체(갈색)를 이용하여 면역염색하는 것에 의해 검출되었다. 배율-100배;

[0261] 도 103a-103h는 본 발명의 혈관신생 내피 특이적 아데노바이러스 벡터에 의한 감염의 내피 특이적 세포변성 효과를 도시한 것이다. 도 103a-d는 1개의 웰 당 10⁵개의 비내피 세포(A549, 도 103a; HepG2, 도 103b; 및 NSF, 도 103c) 및 내피세포(HUVEC, 도 103d)를 AdPPE3x-E1 및 대조 AdCMV-E1 및 AdPPE3x-GFP 아데노바이러스 벡터로, 사용량을 증가(1, 10, 100 및 1000 MOI)시켜가면서, 감염시킨 7일 후에 실시된 반정량적 세포독성 시험의 대표결과를 보여주는 세포 배양물의 사진이다. 감염 7일 후, 잔존 생존 세포를 크리스털 바이올렛(청색 영역)으로 염색하였다. 도 103e-f는 비내피 A549(도 103e), HepG2(도 103f) 및 NSF(도 103g) 및 내피 HUVEC(도 103h) 세포의 단분자층 배양물을, 표시된 MOI에서, AdPPE3X-E1(암회색 막대) 및 대조 벡터 AdCMV-E1(담회색 막대) 및 E1-결핍(deleted) AdPPE3X-GFP (흑색 막대)로 감염시킨 결과를 도시한 막대그래프이다. 비감염 세포(MOI=0)는 대조 배양물이었다. 세포 생존능력을 감염 7일 후에 MTS 분석을 이용하여 정량적으로 분석하였다. 분석값들은 3회의 평균±표준오차이다 *P < 0.01;

[0262] 도 104a-104d는 본 발명의 혈관신생 내피 특이적 아데노바이러스 벡터에 의한 감염의 혈관신생 억제 효과를 설명하는 현미경사진이다. 6개의 웰 플레이트 상의 HUVEC 단분자층을 이더 목(either mock) 벡터(도 104a), 대조 AdCMV-E1 벡터(도 104b), E1-결핍(deleted) AdPPE3x-GFP(도 104c) 및 AdPPE 3X-E1 바이러스(도 104d)로 10 MOI에서 3회 감염시켰다. 모세관 형성에 미치는 AdPPE 3X의 효과를 평가하기 위해, 감염된 세포 및 비감염된 대조를 Matrigel® 상에 접종하고, 자발적인 모세관의 형성이 배양 8시간 후에 광학현미경에 의해 기록되었다.

[0263] 도 105는 상기 도 104a-104d에 도시된 바와 같은 본 발명의 혈관신생 내피 특이적 아데노바이러스 벡터의 혈관신생 억제 효과의 정량적 표현을 보여주는 막대그래프이다. 정량적 평가를 위해, 모세관은 세포집단이나 분기 점들을 연결하는 세포의 연장으로서 정의되었다. AdPPE3x-E1로 감염된 세포 내의 모세관상의 구조물의 수는, AdCMV-E1 또는 AdPPE3x-GFP로 각각 감염된 세포에 비교했을 때, 92% 및 95% 만큼 적다(P<0.01)는 것에 주목해

야 한다.

[0264] 도 106a-106b는 도 104a-104d에 도시된 HUVEC 단분자층 배양물의 형광 현미경사진이다. HUVEC 단분자층 배양물을 AdPPE3x-E1(도 106a) 및 AdPPE3x-GFP(도 106b)로 동시 감염시키고, 모세관의 형성을 형광현미경을 이용하여 기록하여, 세포들이 실제로 각각의 바이러스에 의해 감염되었음을 입증하였다;

[0265] 도 107은 인비보에서 본 발명의 혈관신생 내피 특이적 아데노바이러스 벡터를 이용한 감염의 일반적 독성 효과의 결핍을 도시한 그래프이다. 3마리의 코튼랫(cotton rats)의 그룹에 1×10^{11} 개의 AdPPE3X-E1 입자(흑색 삼각형), AdCMV-E1 입자(백색 삼각형) 및 AdPPE3X-GFP 입자(백색 사각형) 또는 생리식염수 대조(흑색 사각형)를 정맥주사하였다. 비조직 특이적 AdCMV-E1 감염의 상당한 체중감소에 비해 AdPPE3X-E1 및 AdPPE3X-GFP 감염은 체중에 미치는 영향이 없다는 것에 주목해야 한다.

[0266] 도 108은 인비보에서 본 발명의 혈관신생 내피 특이적 아데노바이러스 벡터의 감염의 간장 특이적 독성 효과의 결핍을 도시한 막대그래프이다. 코튼랫의 혈장 샘플이 상기 도 107에 도시된 바와 같이 바이러스 벡터의 주입 6일 후에 간장 독성 마아커인 알라닌 아미노트랜스페라아제(alanine aminotransferase; ALT) 및 아스파르테이트 아미노트랜스페라아제(aspartate aminotransferase; AST)의 수준을 측정하기 위해 분석되었다;

[0267] 도 109a-109d는 인비보에서 본 발명의 혈관신생 내피 특이적 아데노바이러스 벡터의 감염의 간장 특이적 독성 효과의 결핍을 도시한 조직 절편의 현미경사진이다. 상기 도 107에 도시된 바와 같이 감염된 코튼랫을 감염 6일 후에 도살시키고, 간장을 제거하여 절편화하고, 혜마톡실린 및 애오신을 이용하여 염색하고, 간장독성의 증거를 조사하였다. 도 109a는 생리식염수 대조; 도 109b는 AdPPE 3X-GFP; 도 109c는 AdPPE 3X-E1; 도 109d는 AdCMV-E1이다. 조직 특이적 AdPPE 3X E1 또는 AdPPE 3X-GFP의 감염의 간장독성 효과가 없다는 것에 주목해야 한다. 배율=200배;

[0268] 도 110a-110e는 코튼랫의 본 발명의 혈관신생 내피 특이적 아데노바이러스 벡터에 의한 인비보에서의 Matrigel® 플리그의 혈관신생 억제를 보여주는 현미경사진(도 110a-110d) 및 막대그래프(도 110e)이다. 코튼랫에 주사하기 전에 Matrigel® 플리그를 10^9 개의 AdPPE 3X E1(도 110b), AdPPE3X-GFP(도 110c) 또는 AdCMV-E1(도 110d) 바이러스 입자를 가진 또는 바이러스가 없는 상태(도 110a)의 생리식염수 및 bFGF 내에 혼탁시켰다. 주사 14일 후(도 110a-110d)의 혜마톡실린 및 애오신에 의해 염색된 Matrigel® 플리그의 조직절편은, AdPPE 3X-E1 처리된 플리그(도 110b)를 제외하고, 뚜렷한 혈관신생 및 세포 침윤을 보인다(배율=200배). 도 110e는 도 110a-110d에 도시된 절편들의 조직학적 분석 그래프이다. 분석값은 평균土표준오차이고, 그룹당 N=4이다;

[0269] 도 111a-111j은 랫의 LCRT 폐전이 모델의 성장 특성을 도시한 그래프(도 111a-111d), 현미경사진(도 111e-111h) 및 병리조직사진(도 111i-111j)이다. LCRT 세포를 코튼랫의 피하에 주사하고(0일), 일반 파라미터(체중, 도 111a) 및 종량의 조직 특이적 파라미터 및 전이성장(종양 체적, 도 111b; 종양 중량, 도 111c; 폐전이 중량, 도 111d)을 격일로 28일간 평가하였다. 종양을 가진 랫에 대해 N=18이고, 생리식염수가 주입된 대조에 대해 n=3이다. 도 111a의 각 막대는 평균체중土표준오차 * $P < 0.05$ 대 대조를 표시한다. 도 111b의 종량 체적은 후술하는 실시예에 기술된 바와 같이 계산되었다. 각 막대는 평균土표준오차를 나타내고, 10일, 18일, 25일 및 28일의 각각에 대해 n = 2, 3, 3 및 7이다. * $P < 0.05$ 대 체중, 10일; ** $P < 0.05$ 대 체중, 10일 및 18일. 도 111c의 종양 중량의 각 막대는 평균土표준오차를 나타내고, 10일, 18일, 25일 및 28일의 각각에 대해 n = 2, 3, 3 및 7이다. * $P < 0.05$ 대 체중, 10일; ** $P < 0.05$ 대 체중, 10일 및 18일. 도 111d의 폐전이 중량은 각 종양을 가진 기관으로부터 정상 함수상태의 기관의 평균 중량(average normal wet organ weight; 400 mg)을 제하는 것에 의해 계산되었다. 각 바이는 평균土표준오차를 나타내고, 10일, 18일, 25일 및 28일의 각각에 대해 n = 2, 3, 3 및 7이다. ** $P < 0.05$ 대 체중, 10일 및 18일. 도 111e는 코튼랫의 협복(flank)의 대표적 LCRT 종양의 사진이다. 도 111f는 코튼랫의 협복의 중심 피사(central necrosis) 및 출혈 상태의 대표적 LCRT 종양의 사진이다. 도 111g 및 111h는 LCRT 세포 주입 25일 후 및 28일 후의 랫의 대표적 폐표면의 사진이다. 화살표: 폐표면 상의 전이. LCRT 세포의 주입 25일 후(도 111i) 또는 18일 후(도 111j)의 랫의 폐의 혜마톡실린 및 애오신 염색된 절편의 현미경사진으로서, 세기관지 부근의 전이(도 111i, 화살표=세기관지, 점선 화살표=전이, 배율=100배) 및 마이크로전이(도 111j, 화살표=전이, 배율=200배)를 보여준다;

[0270] 도 112는 본 발명의 혈관신생 내피 특이적 아데노바이러스 벡터의 전신투여에 의한 인비보에서의 폐전이 성장의 효율적인 억제를 보여주는 막대그래프이다. LCRT 폐전이는 암컷 코튼랫에서 발생되었다. 도시된 바와 같이 AdPPE3x-E1, AdCMV-E1, AdPPE3x-GFP, 또는 생리식염수를 전신투여(심장의 좌심실에 투여)하였다. 종양의 조직

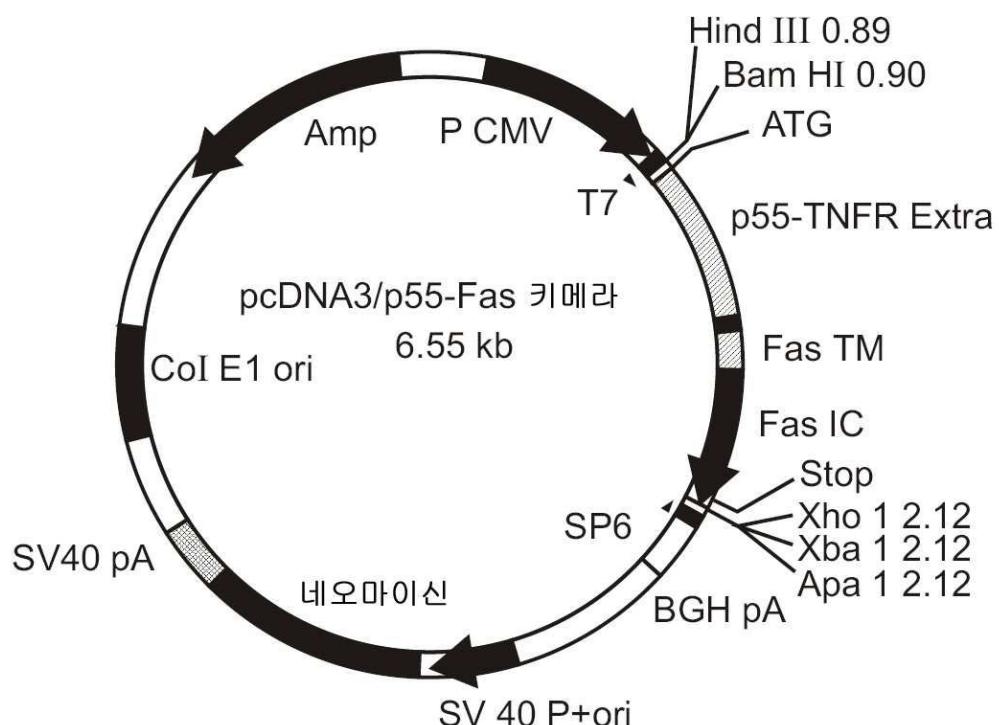
량(tumor burden)에 기인된 조직 중량은 각 종양을 가진 기관으로부터 정상 합수상태의 기관의 평균 중량(400 mg)을 제하는 것에 의해 계산되었다. 각 바이는 평균±표준오차를 나타내고, n = 8이다. 이방향 분산분석(two-way Anova)에 기초한 $^*P < 0.05$ 대 생리식염수 그룹. 혈관신생 특이적 AdPPE 3X-E1 바이러스 벡터의 우수한 억제력에 주목해야 한다.

[0271]

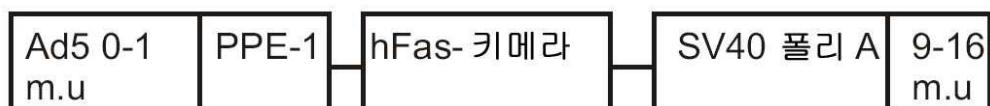
도 113a - 113b는 본 발명의 혈관신생 내피 특이적 아데노바이러스 벡터의 강력한 전이 특이적 바이러스 복제를 도시한 막대그래프이다. 전이 성장은 의해 코튼랫 내에서 상기 도 111 및 112에 도시된 LCRT 세포의 주입에 의해 유도되었다. 바이러스 DNA는 아데노바이러스 E4 배열의 정량적 PCR 증폭에 의해 감염 8일 후의 폐조직(도 113a) 또는 간장조직(eh 113b)으로부터 추출된 DNA 내에서 검출되었다. 상대적 바이러스 E4 복제수는 생리식염수 처리된 대조(생리식염수=1)의 조직에서 검출된 E4 카페 수에 대한 각 샘플의 증가배수로서 정의된다.

도면

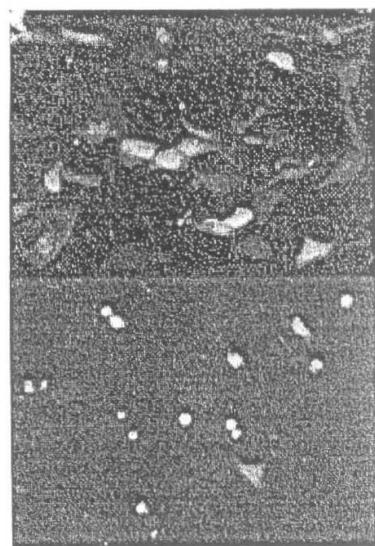
도면1a



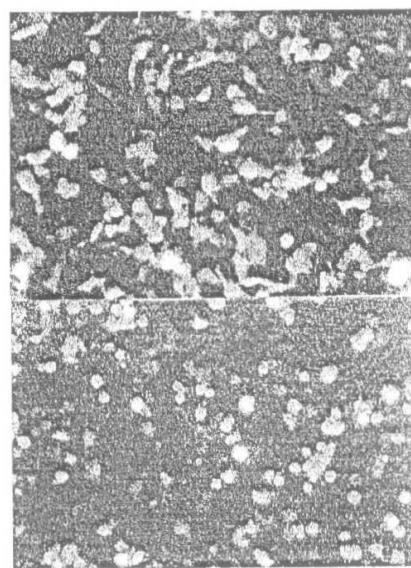
도면1b



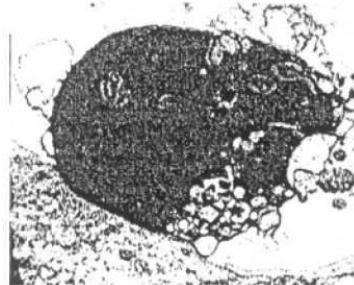
도면2a



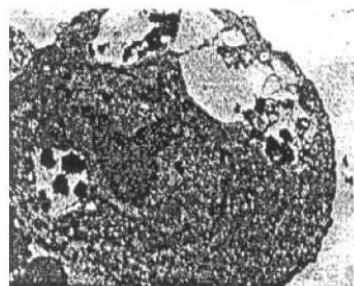
도면2b



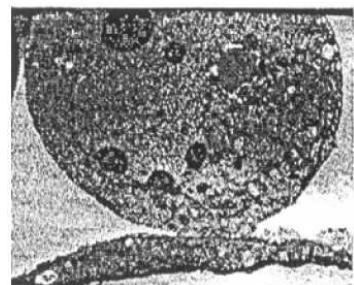
도면3a



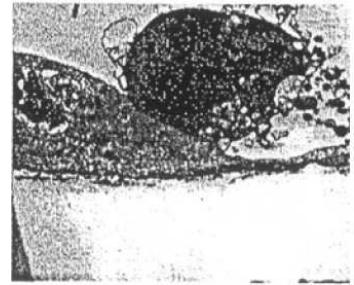
도면3b



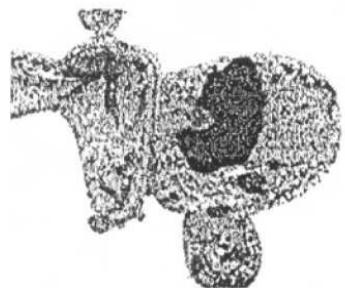
도면3c



도면3d



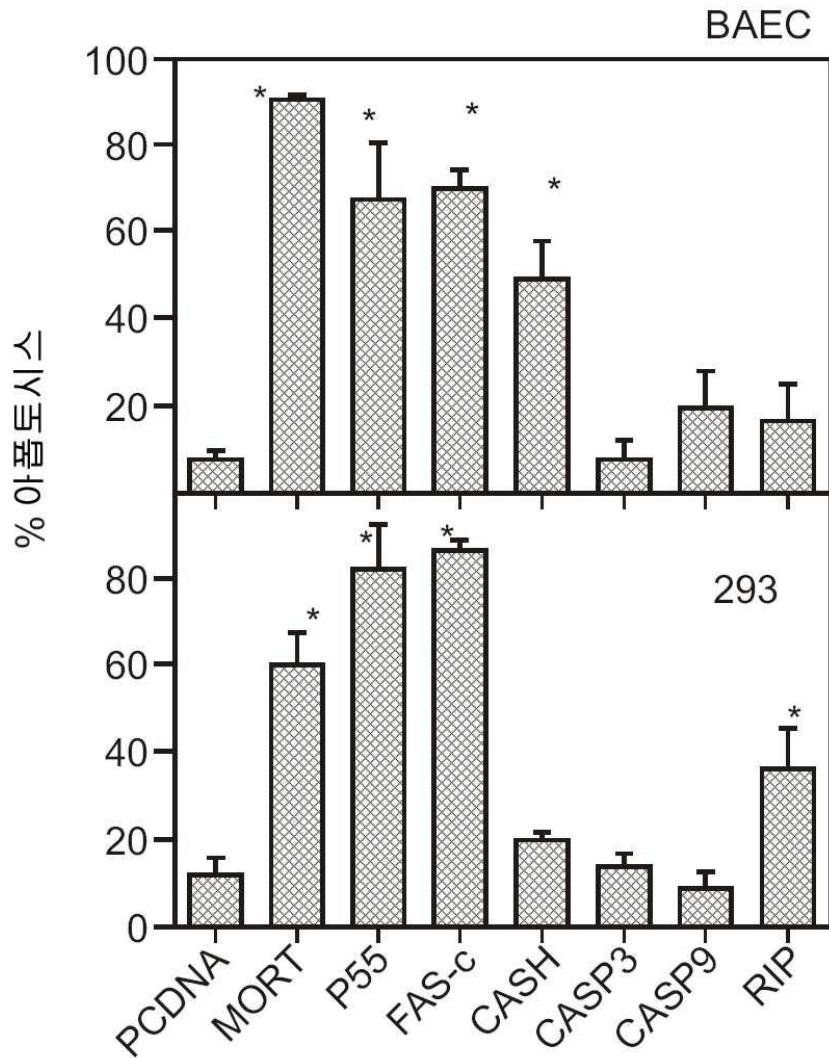
도면3e



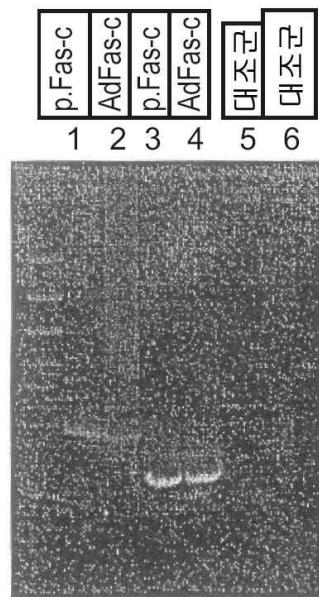
도면3f



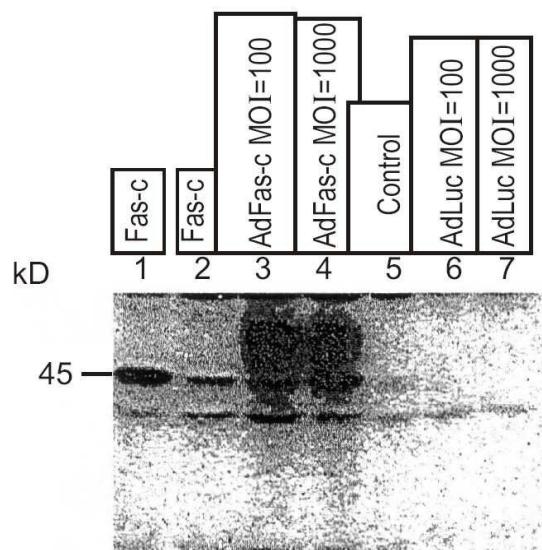
도면4



도면5a

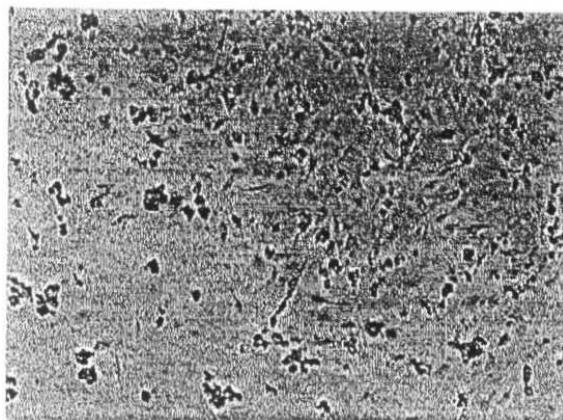


도면5b



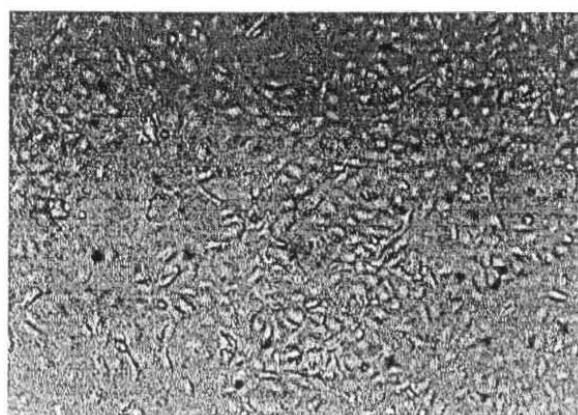
도면6a

Ad-PPE-Fas-c



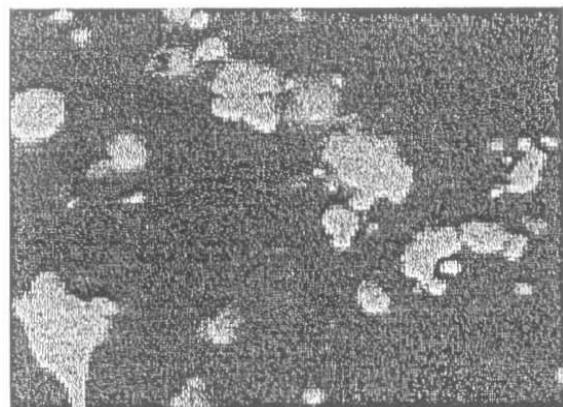
도면6b

Ad-PPE-Luc

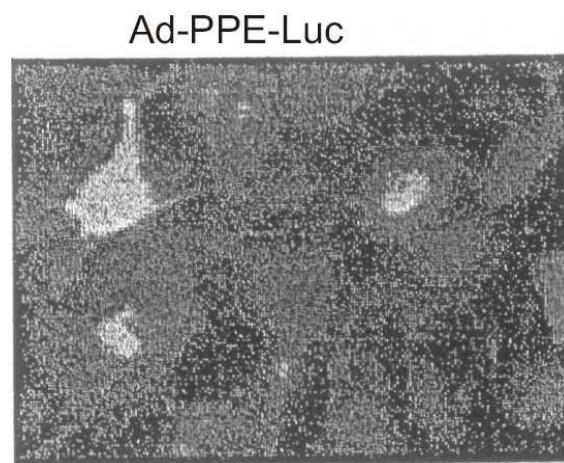


도면6c

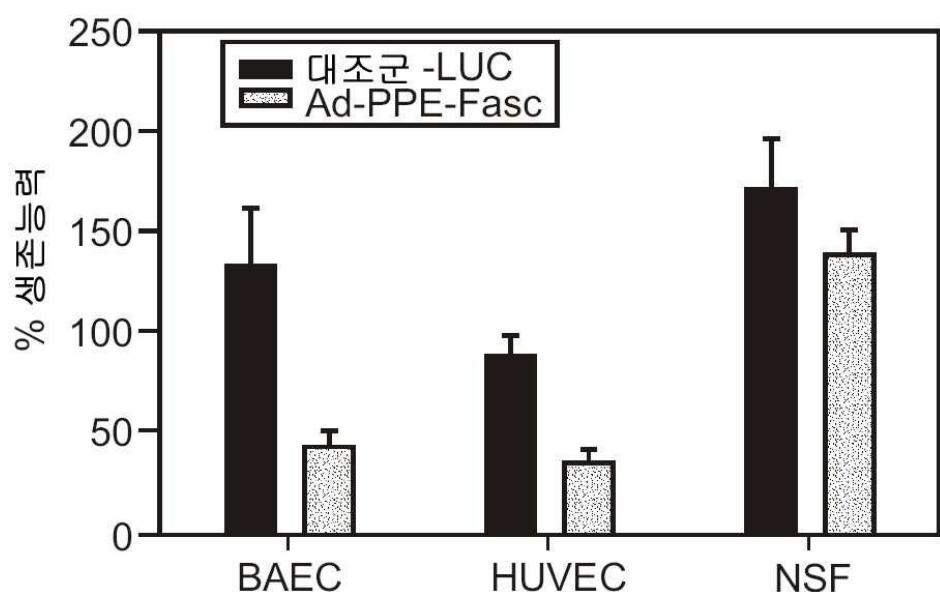
Ad-PPE-Fas-c



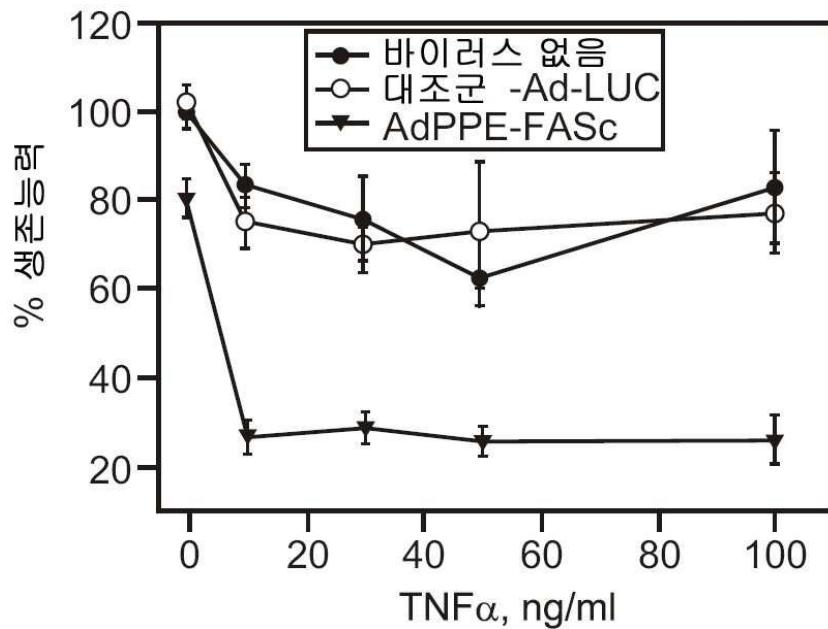
도면6d



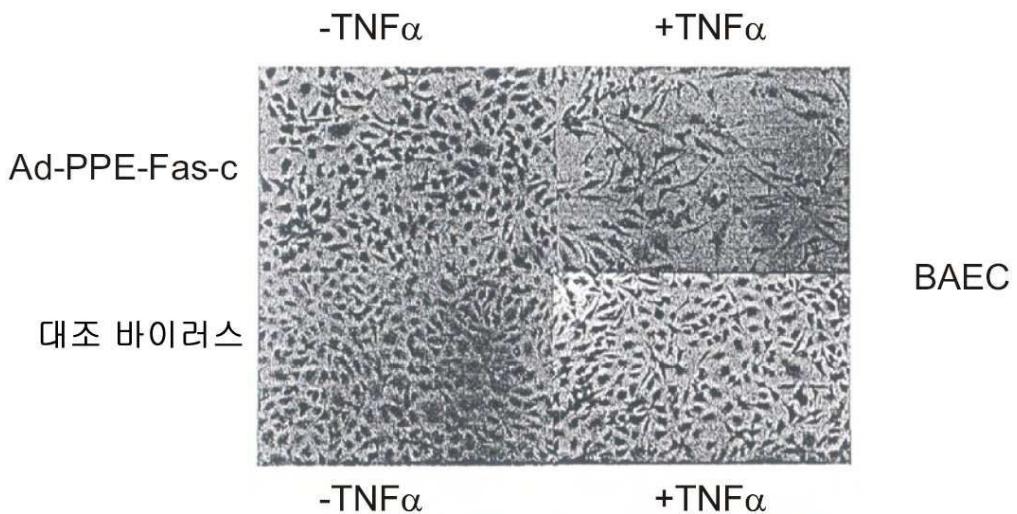
도면7



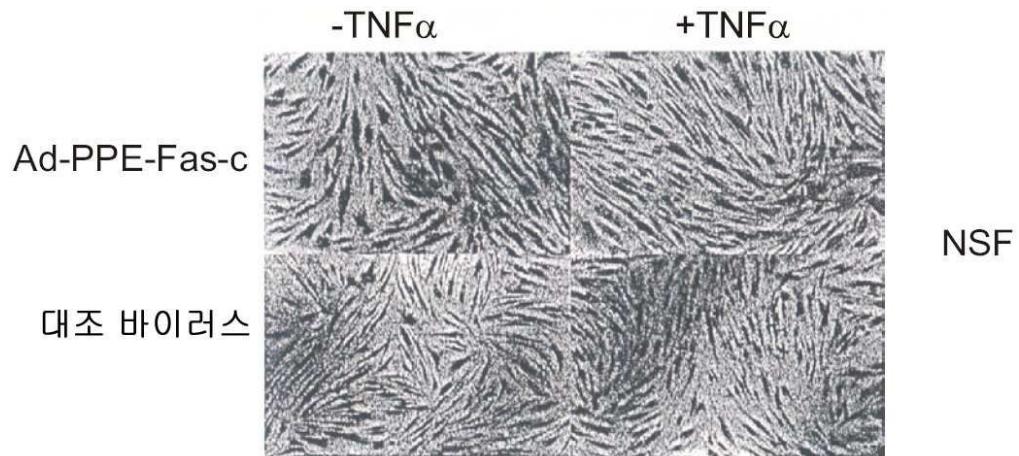
도면8



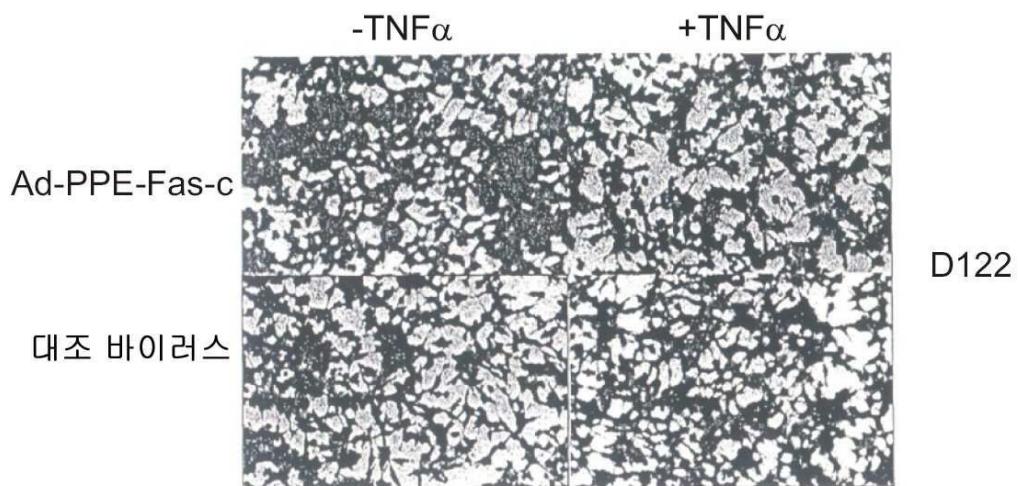
도면9a



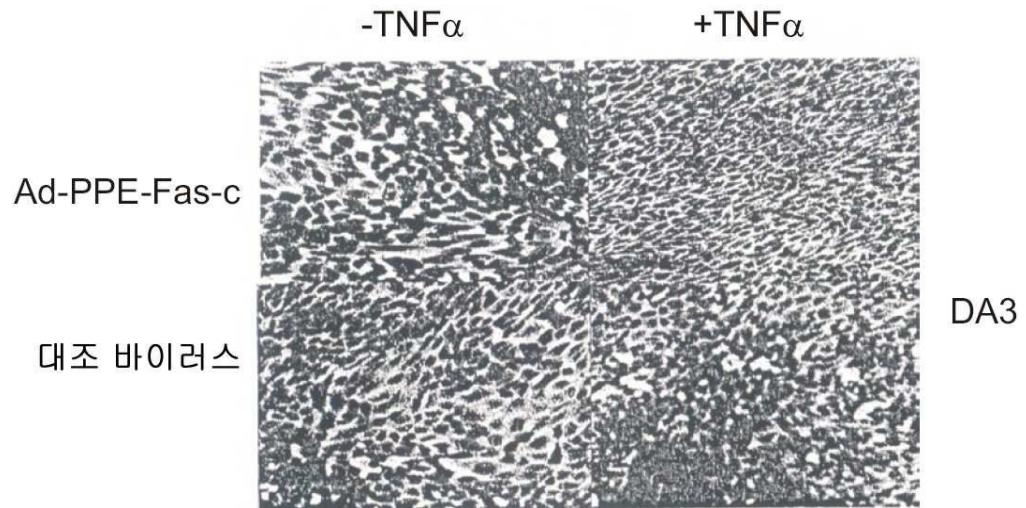
도면9b



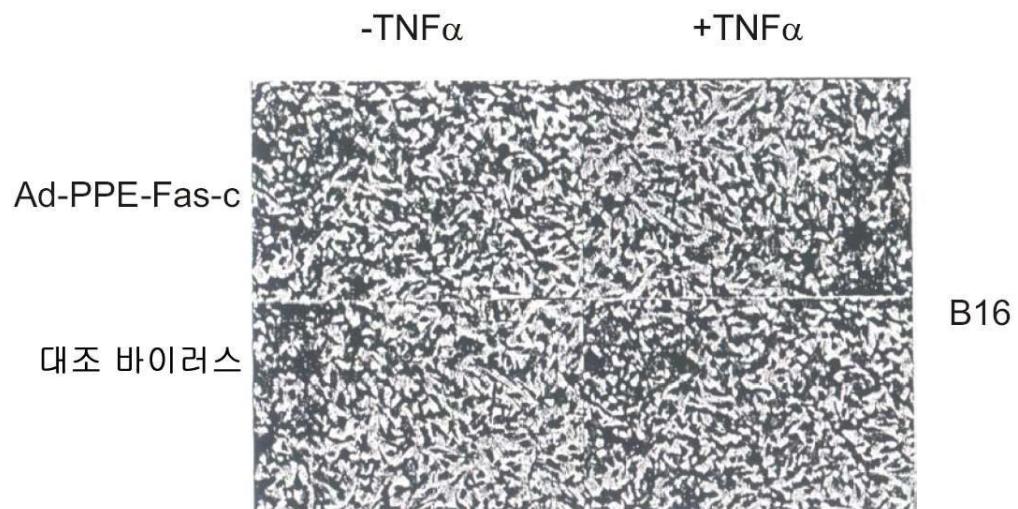
도면9c



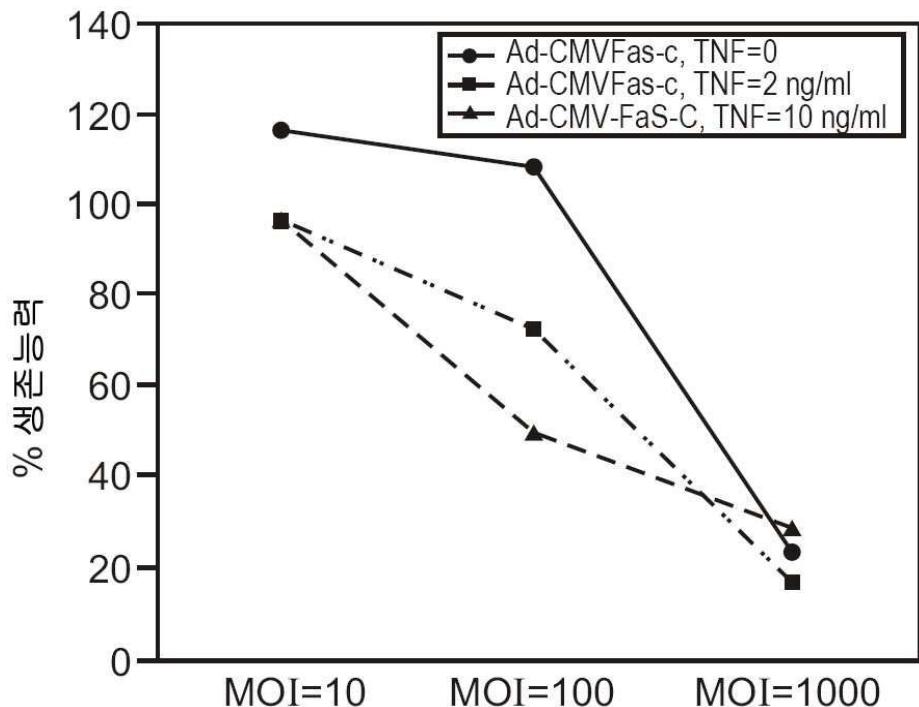
도면9d



도면9e



도면10a



도면10b

대조 바이러스



도면10c

Ad-CMV-Fas-c

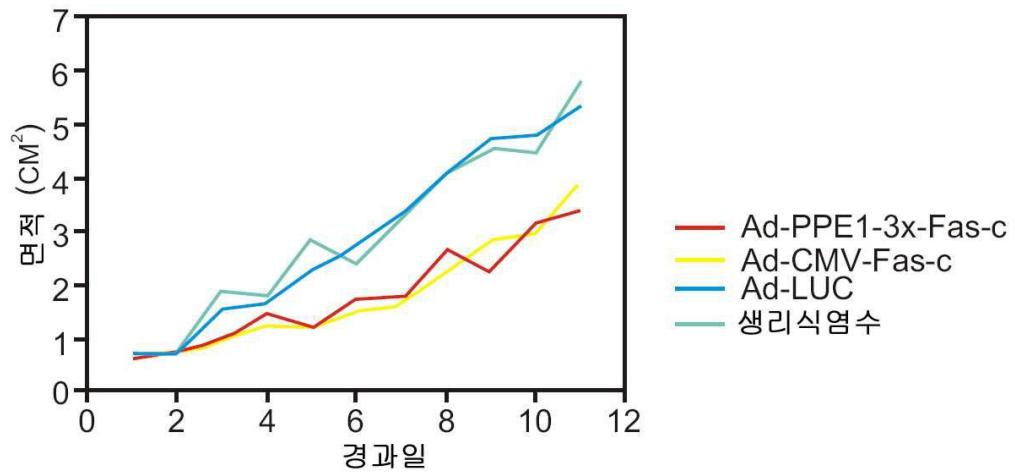


도면10d

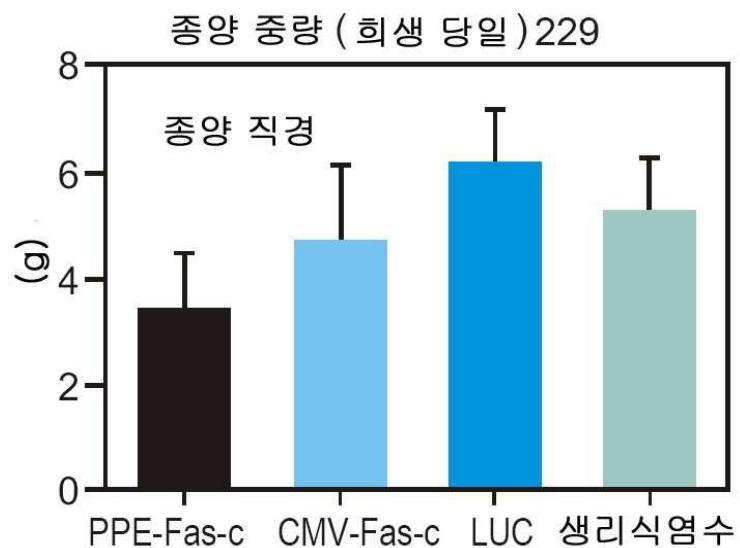
Ad-CMV-Fas-c
+TNF α



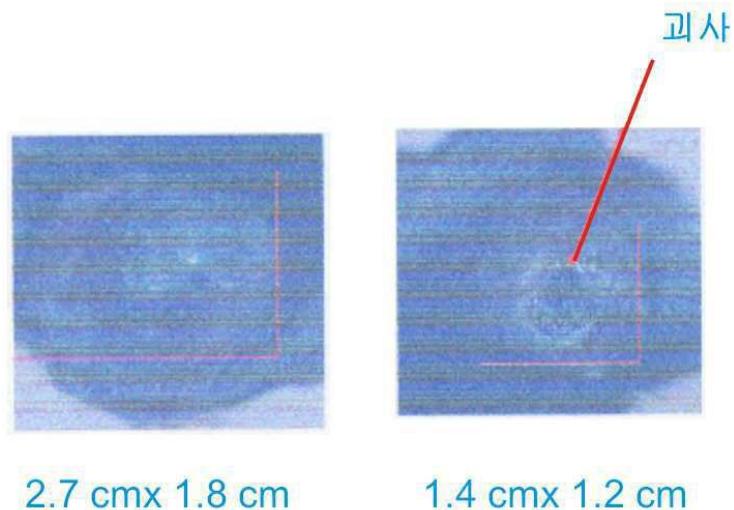
도면11a



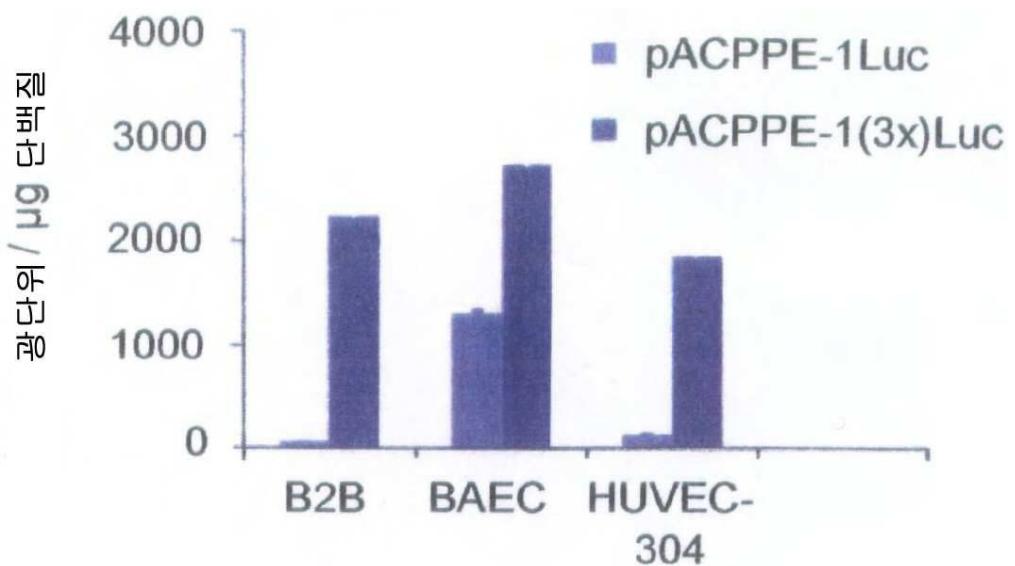
도면11b



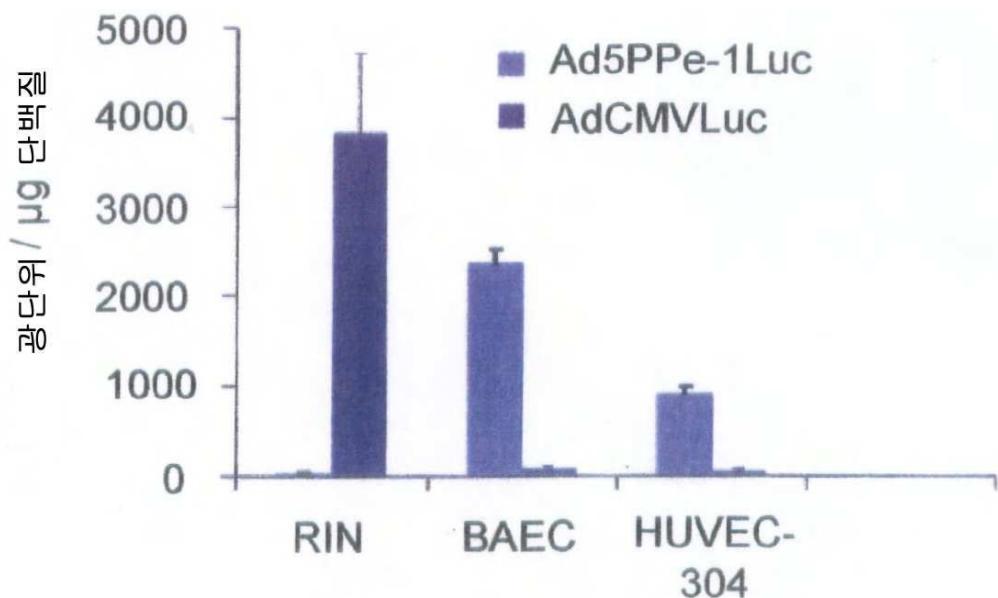
도면11c



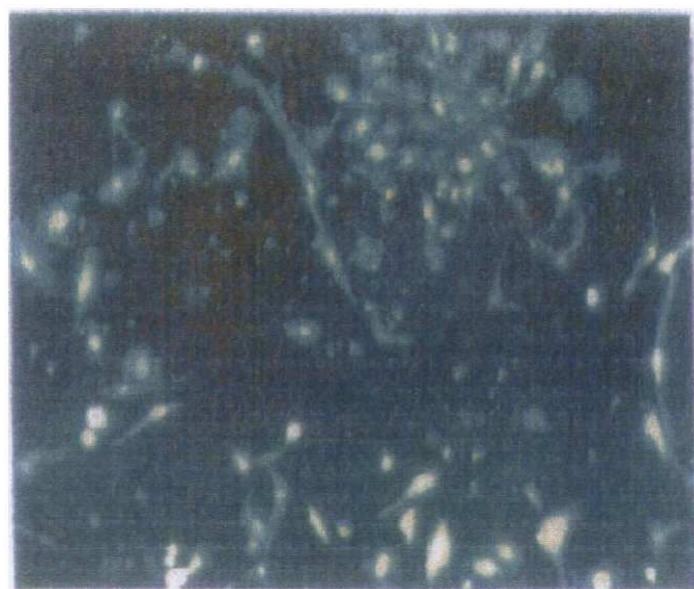
도면12



도면13



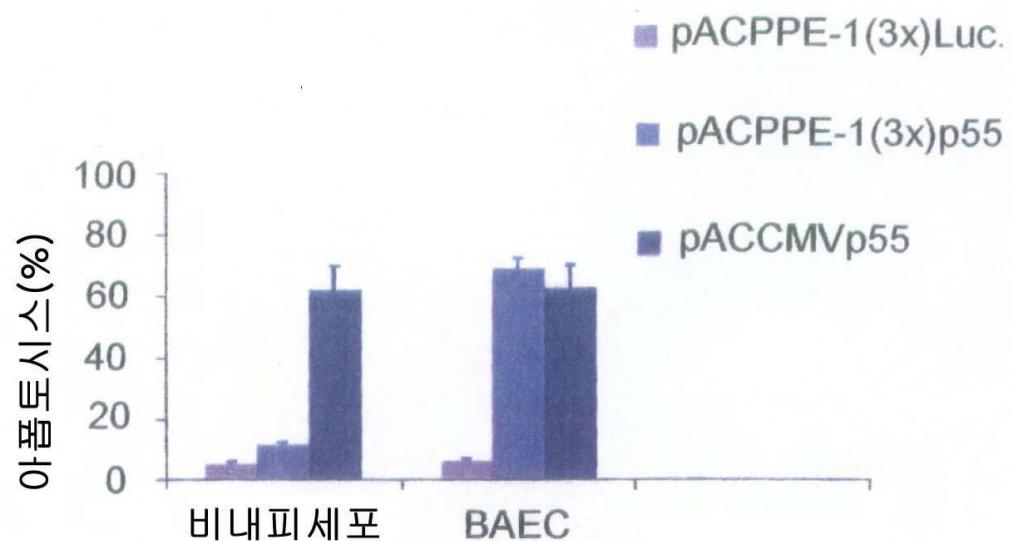
도면14a



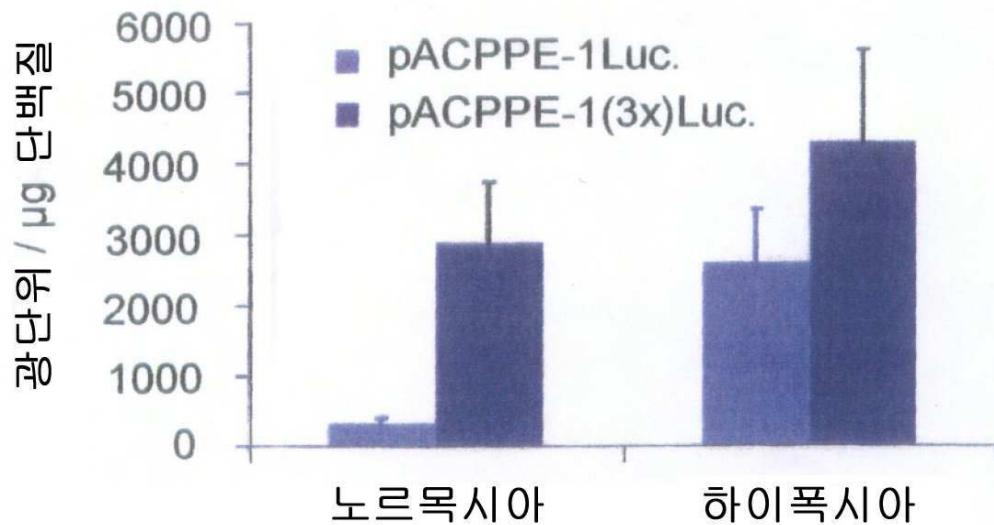
도면14b



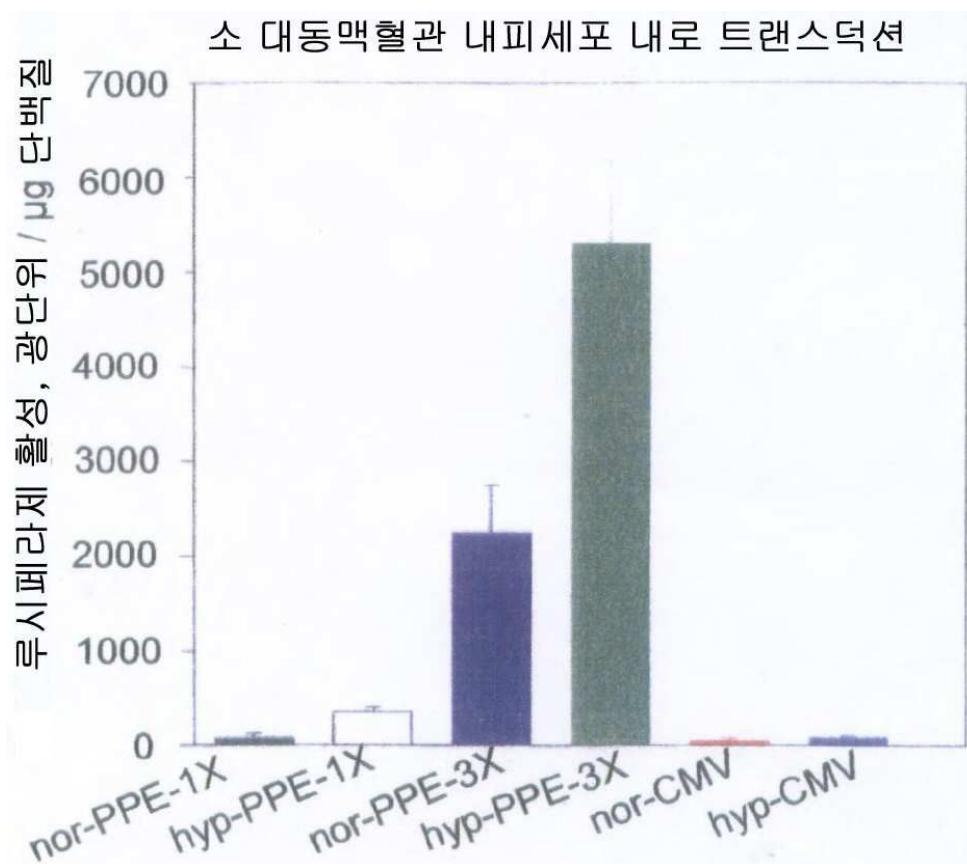
도면15



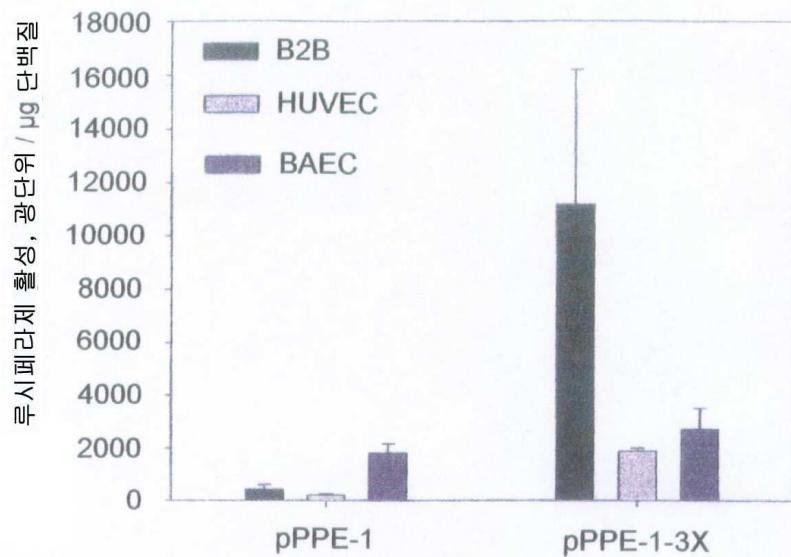
도면16



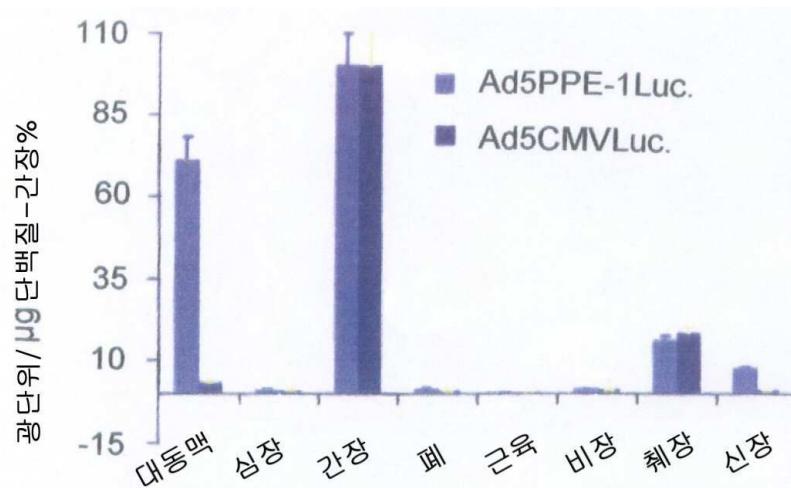
도면17



도면18



도면19

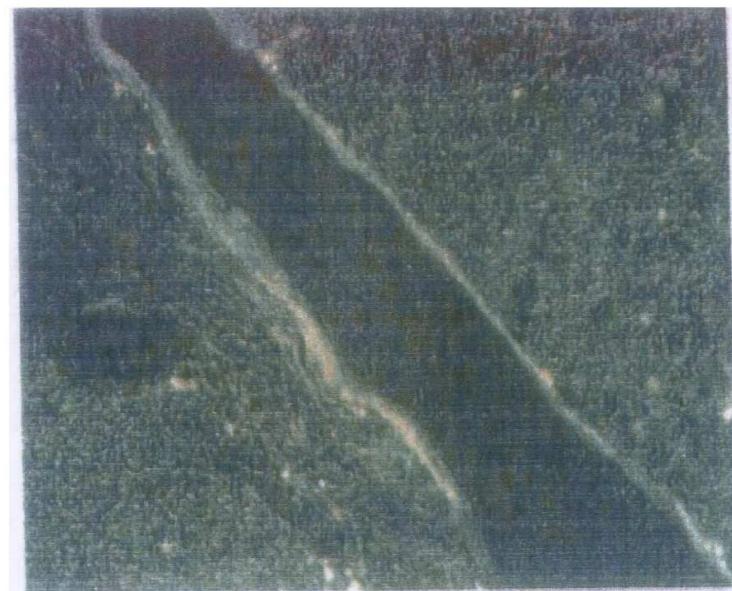


도면20a



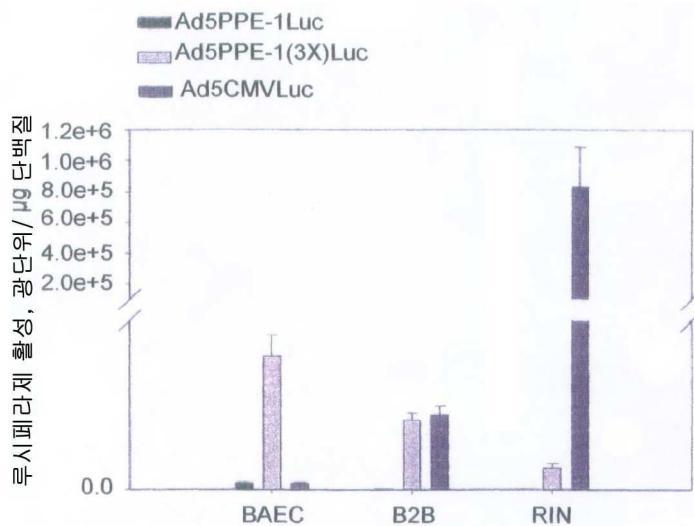
CMV

도면20b

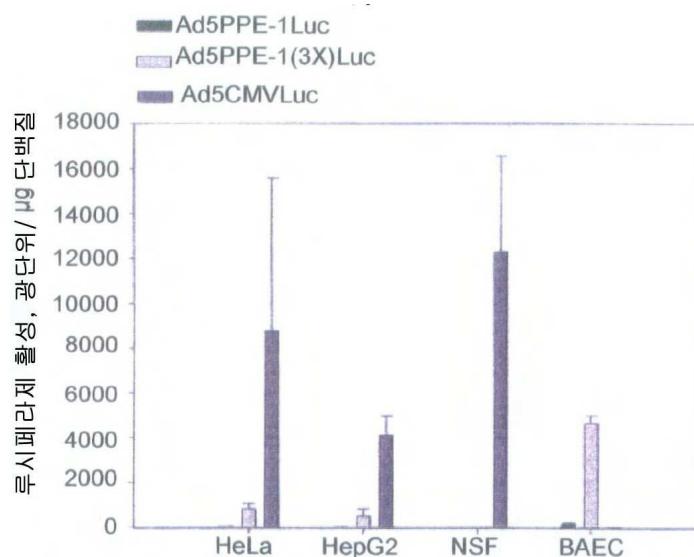


PPE

도면21



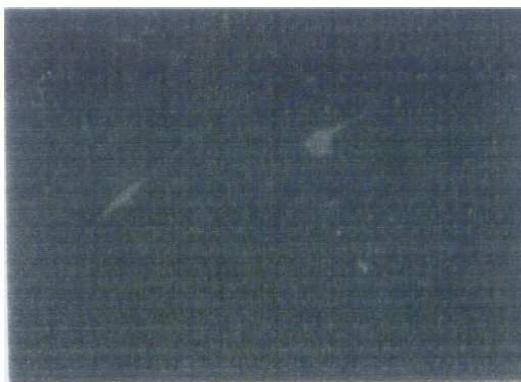
도면22



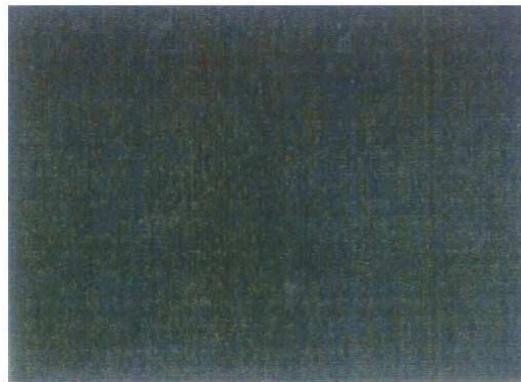
도면23a



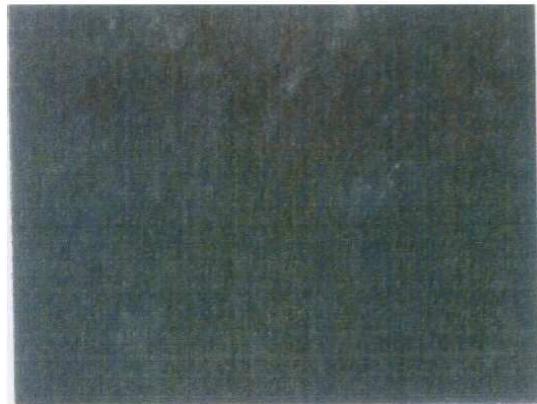
도면23b



도면23c



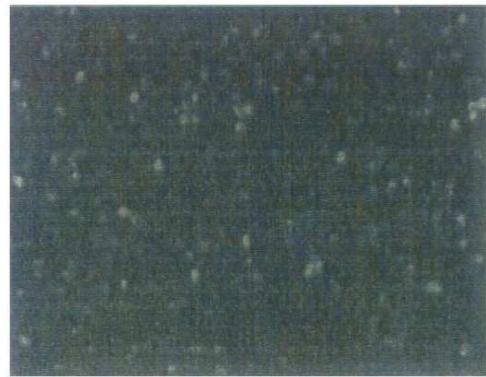
도면24a



도면24b



도면25a



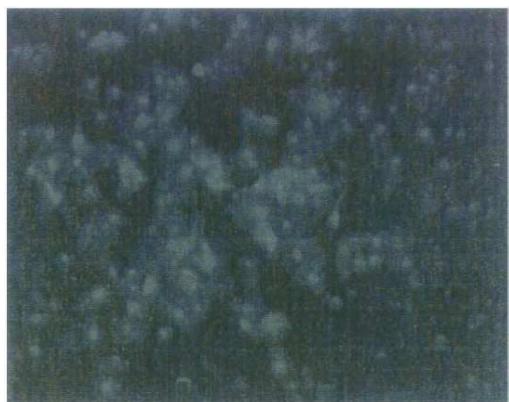
도면25b



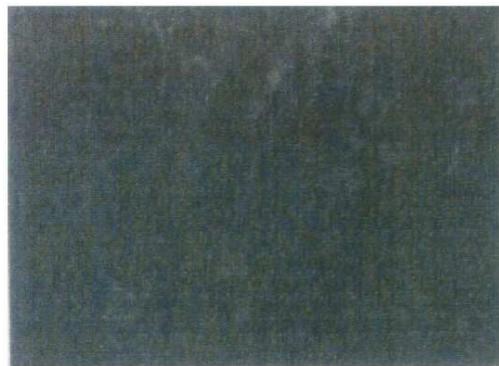
도면26a



도면26b



도면27a



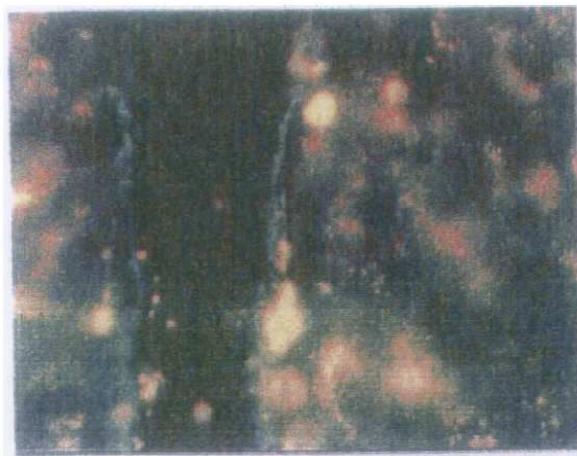
도면27b



도면28a



도면28b



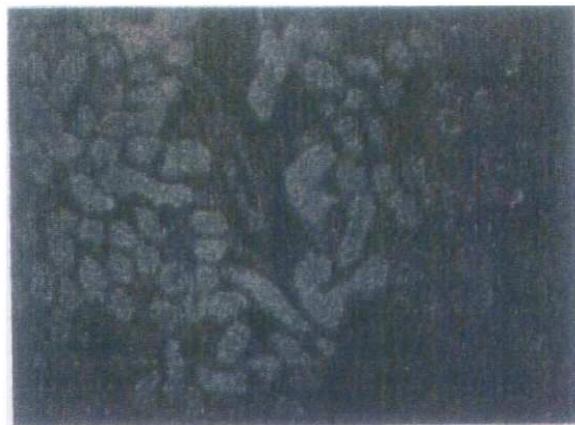
도면29a



도면29b



도면29c



도면30a



도면30b



도면30c



도면31a



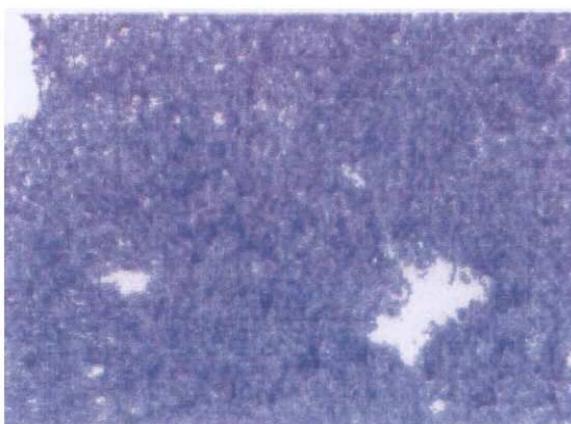
도면31b



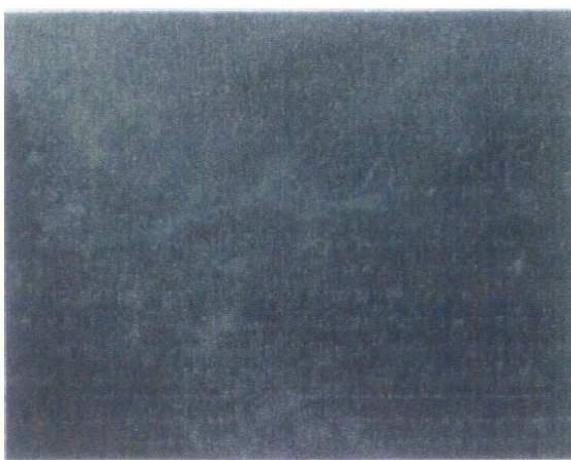
도면31c



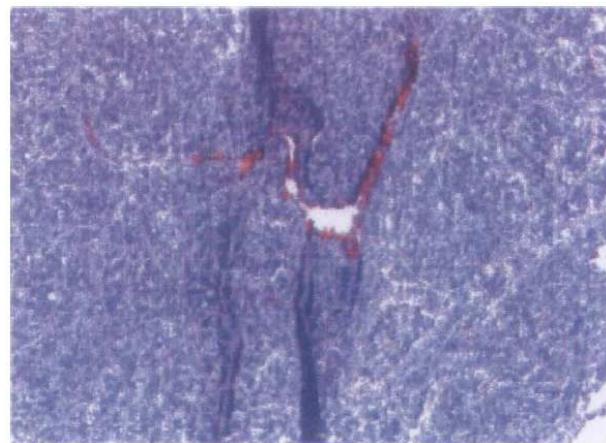
도면31c1



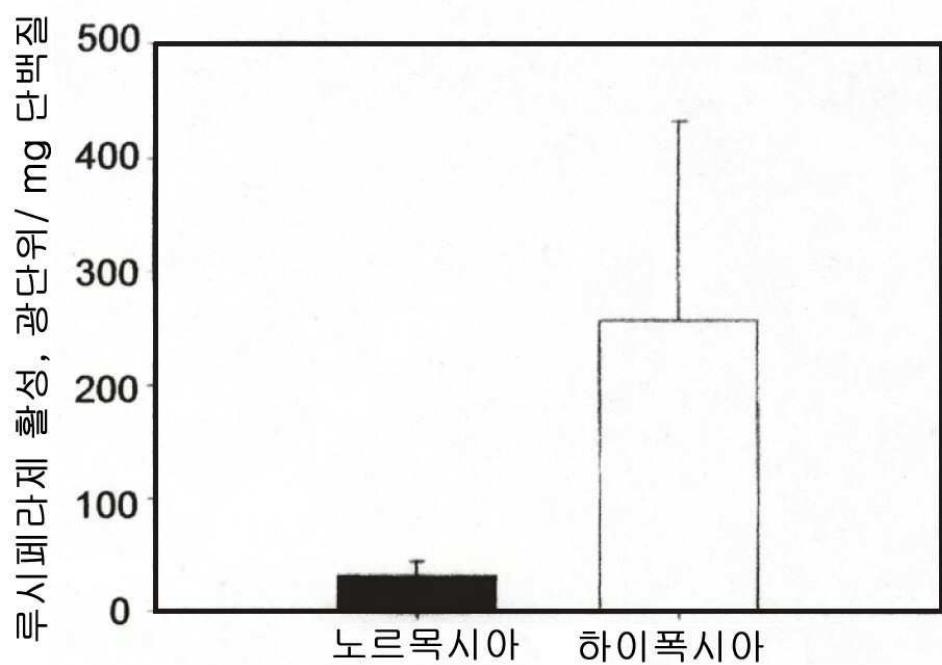
도면31d



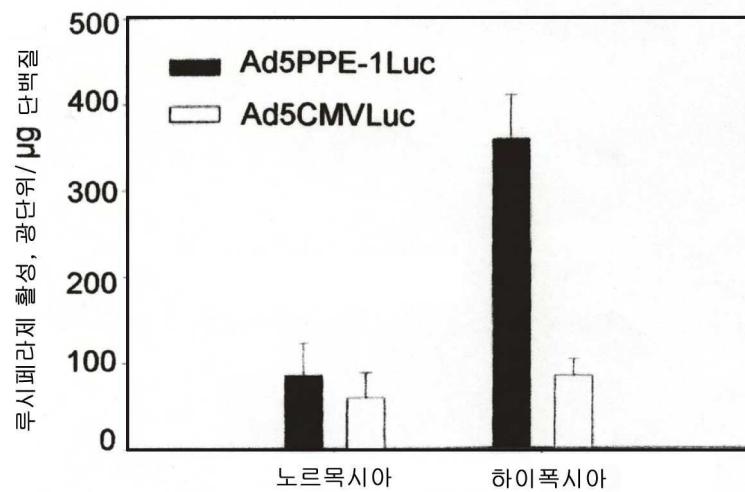
도면31d1



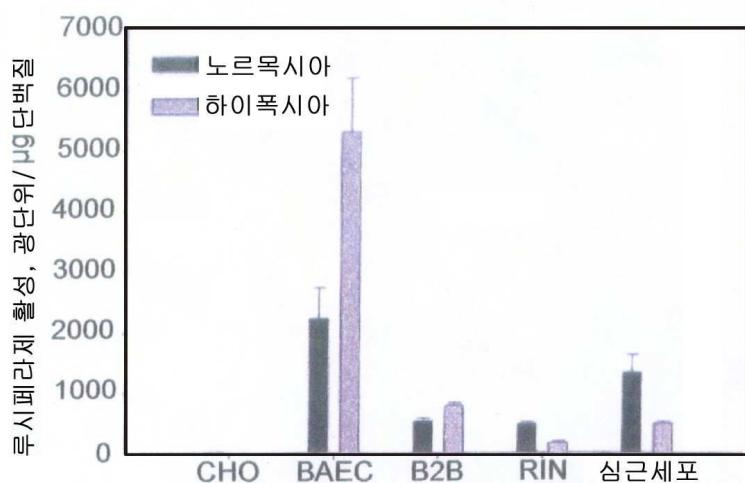
도면32



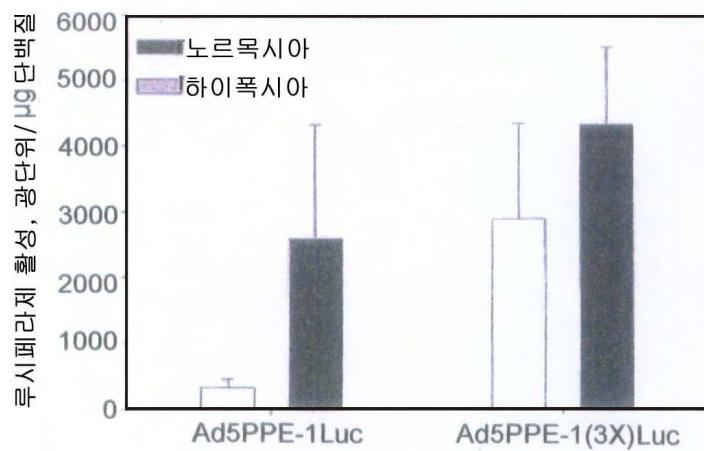
도면33



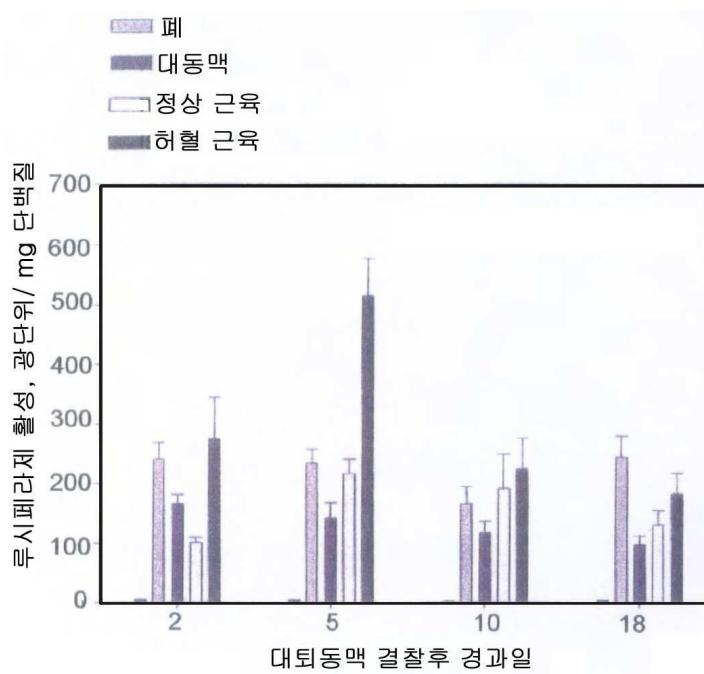
도면34



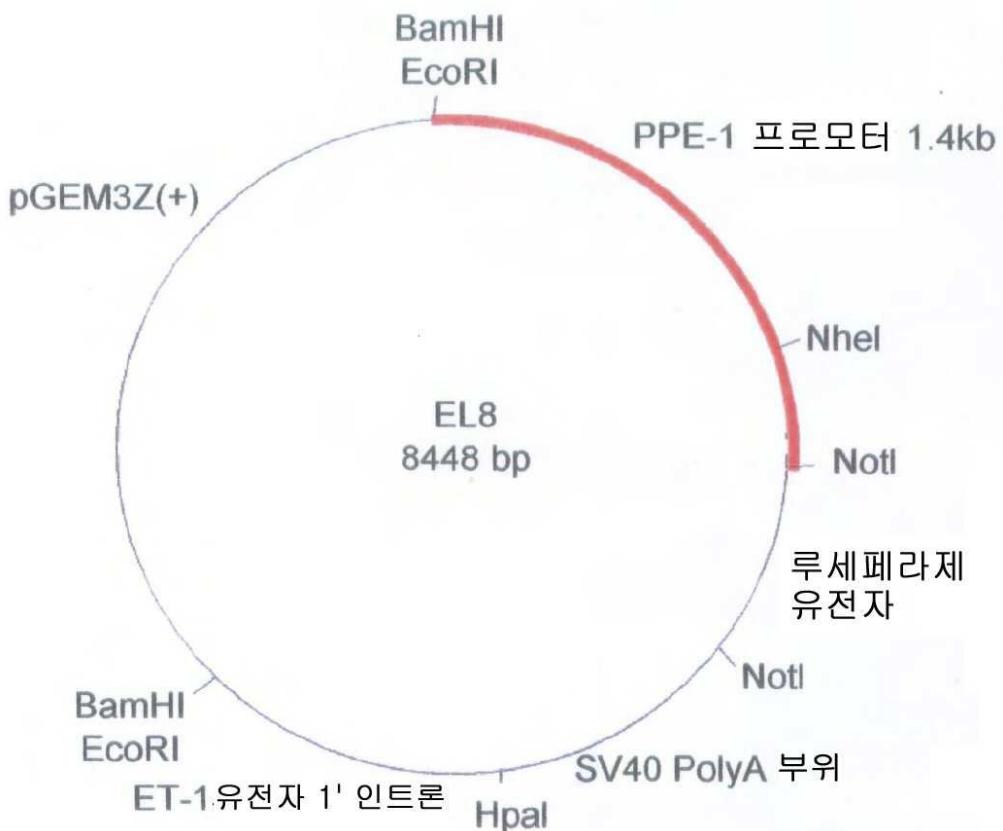
도면35



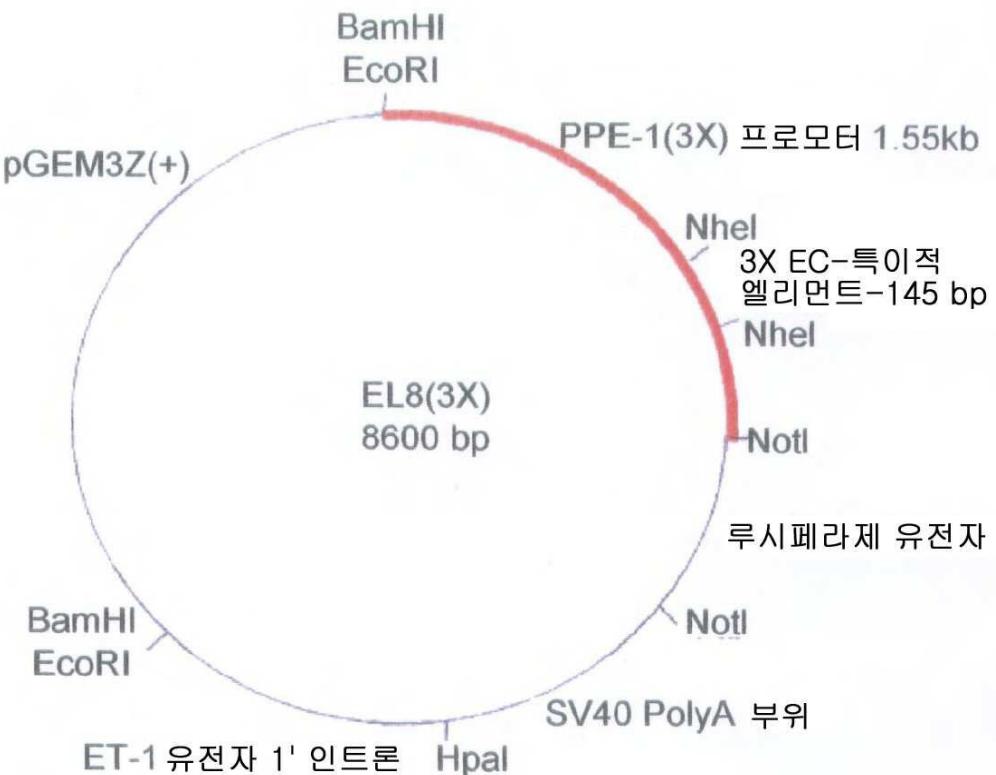
도면36



도면37a



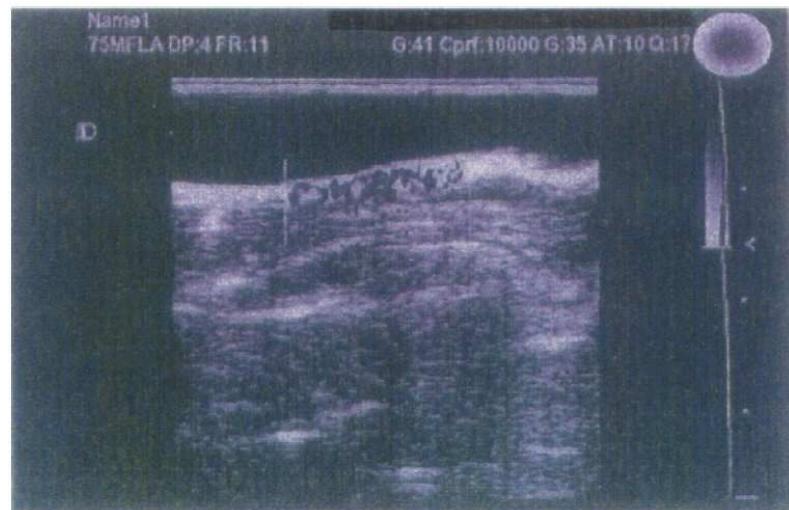
도면37b



도면38a



도면38b



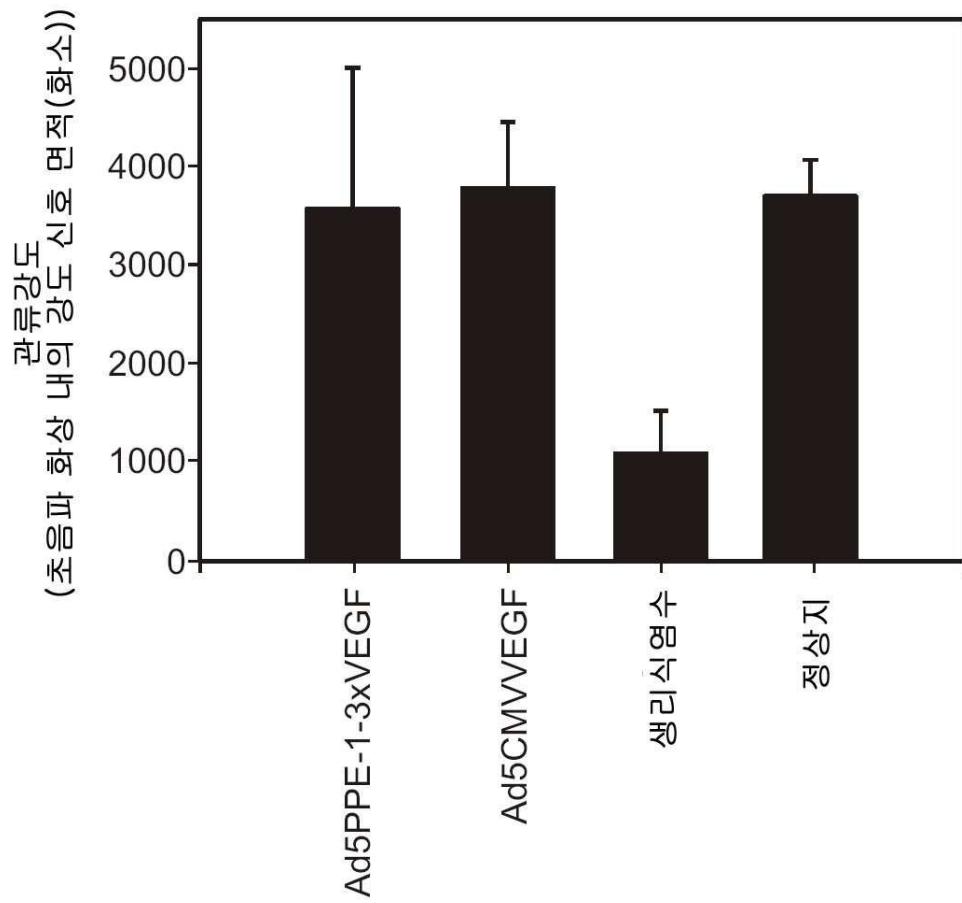
도면38c



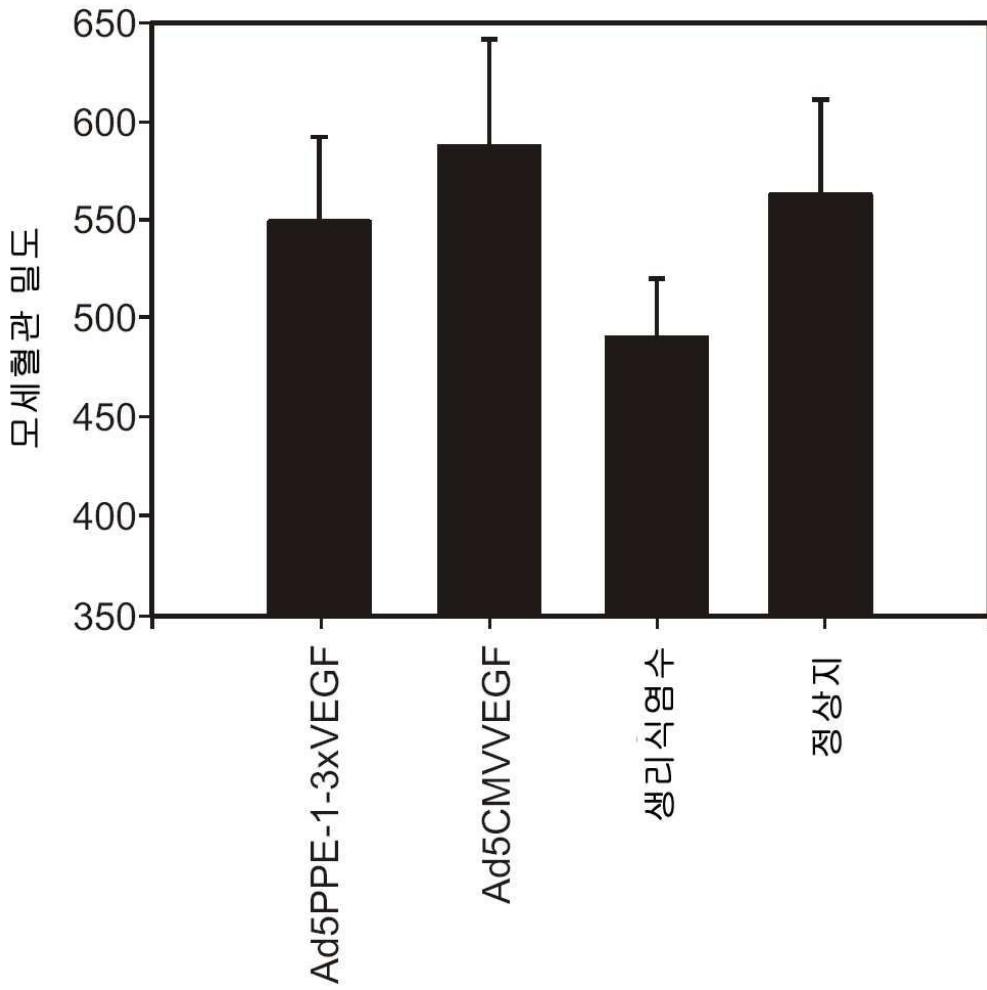
도면38d



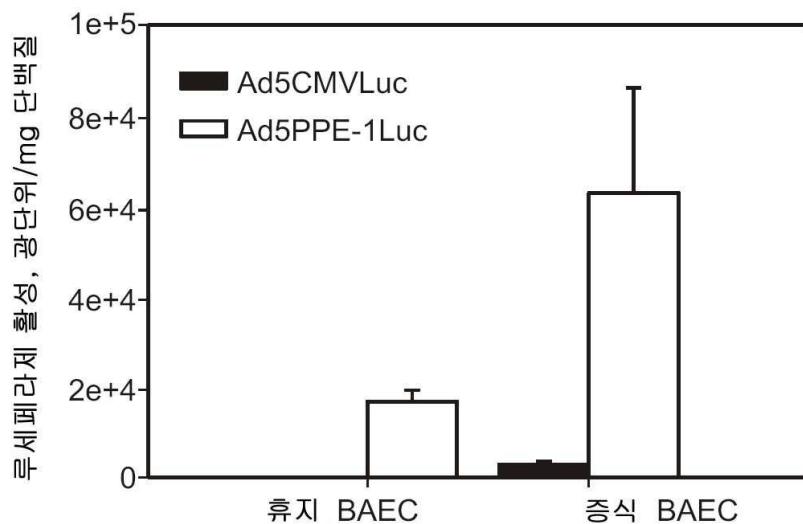
도면38e



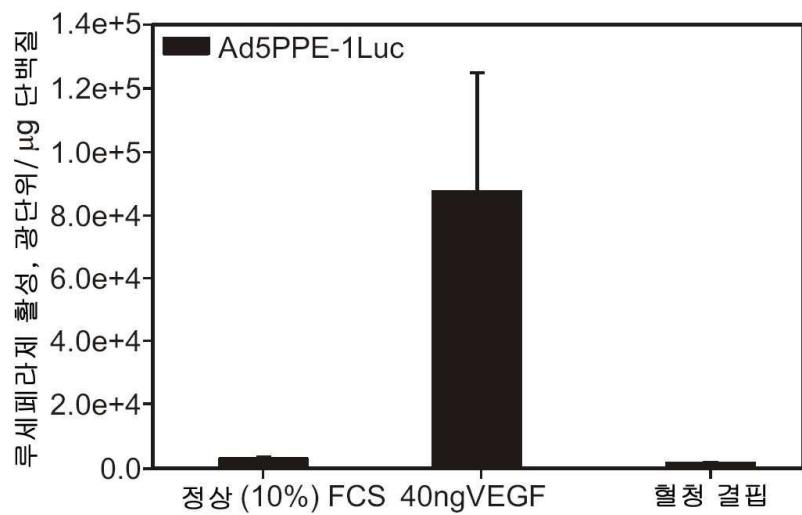
도면38f



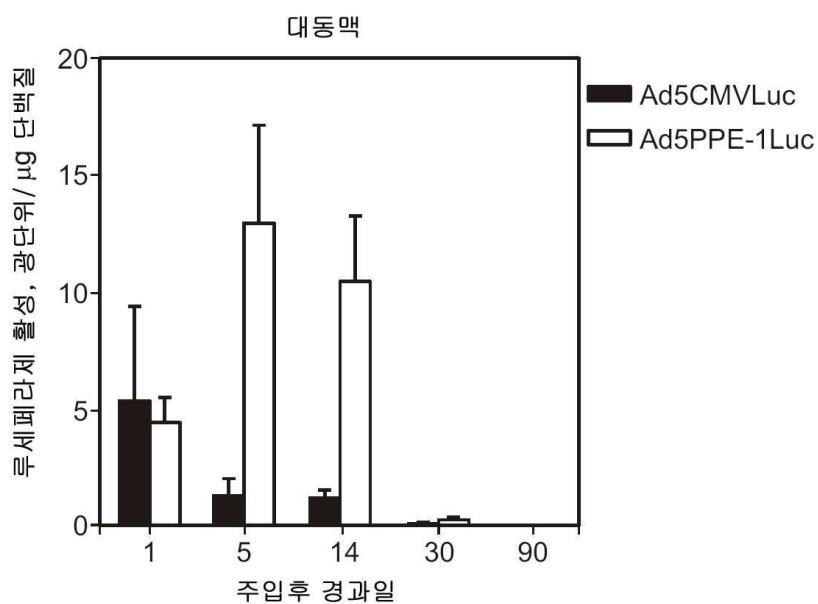
도면39



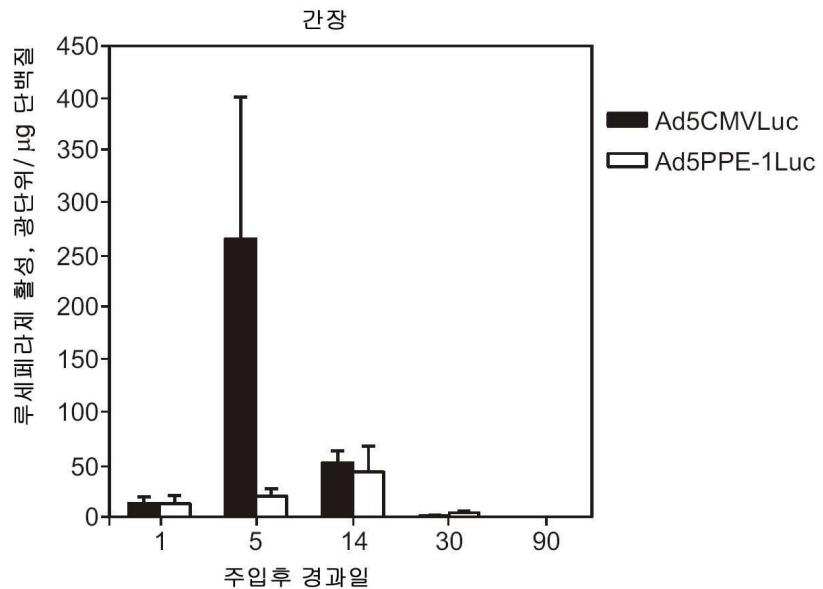
도면40



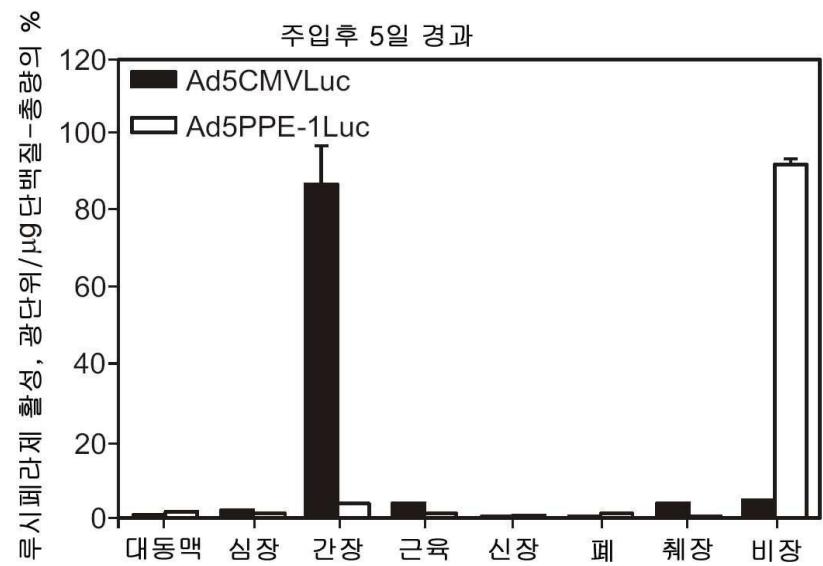
도면41a



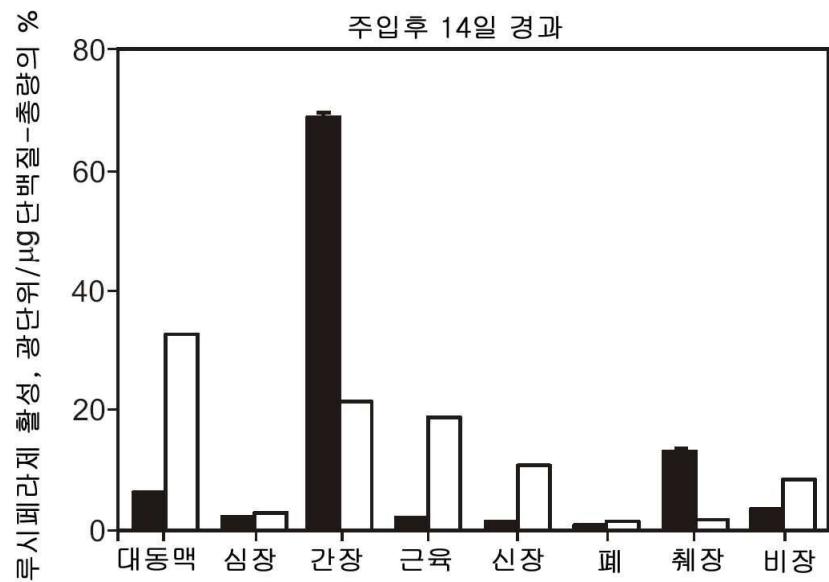
도면41b



도면42a



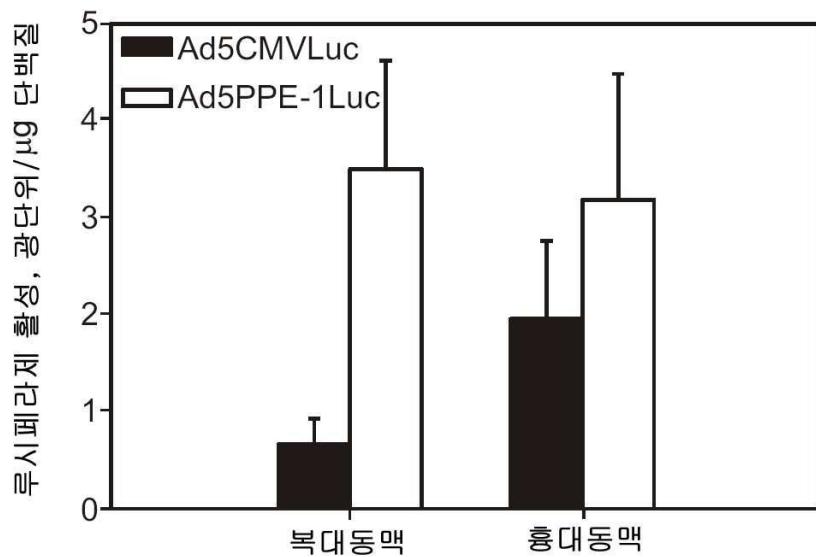
도면42b



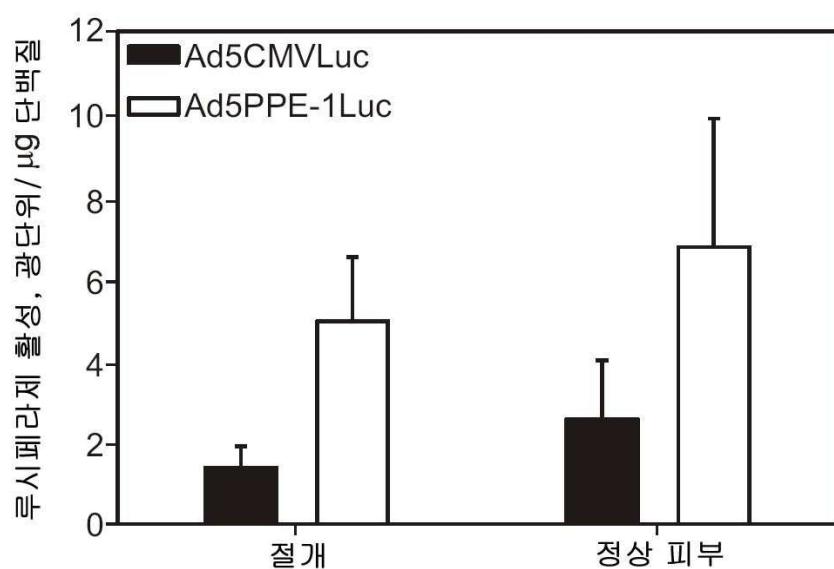
도면43



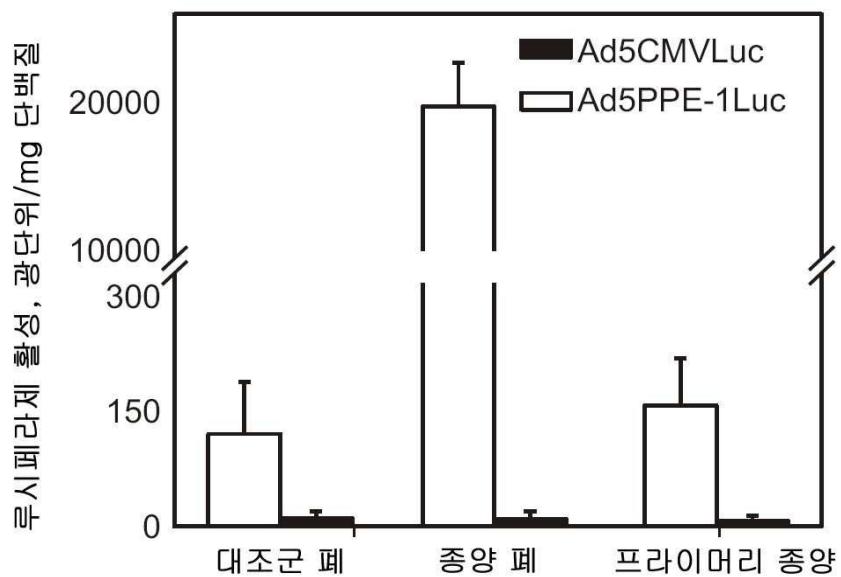
도면44



도면45



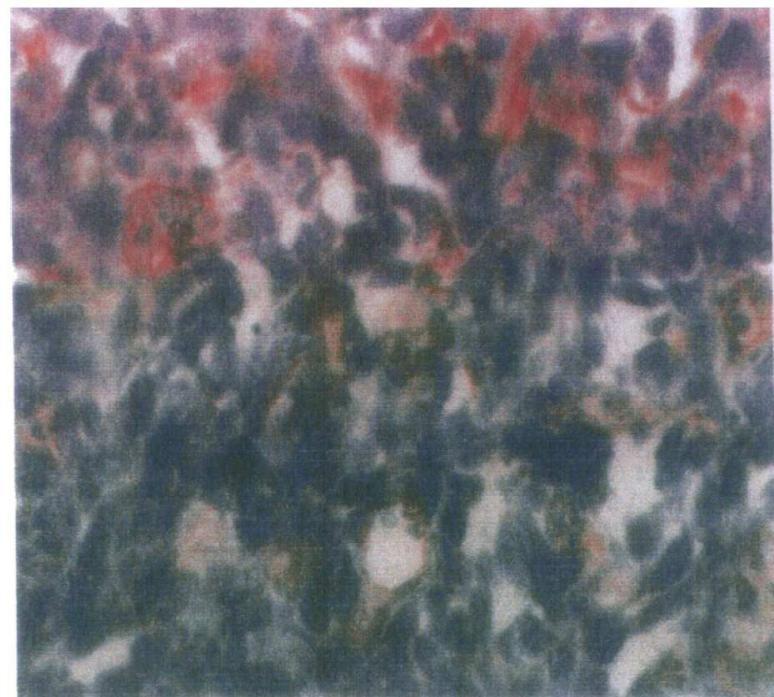
도면46



도면47a



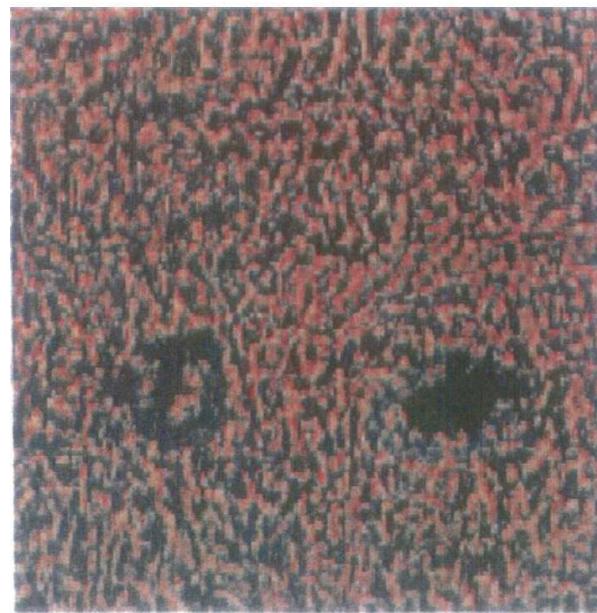
도면47b



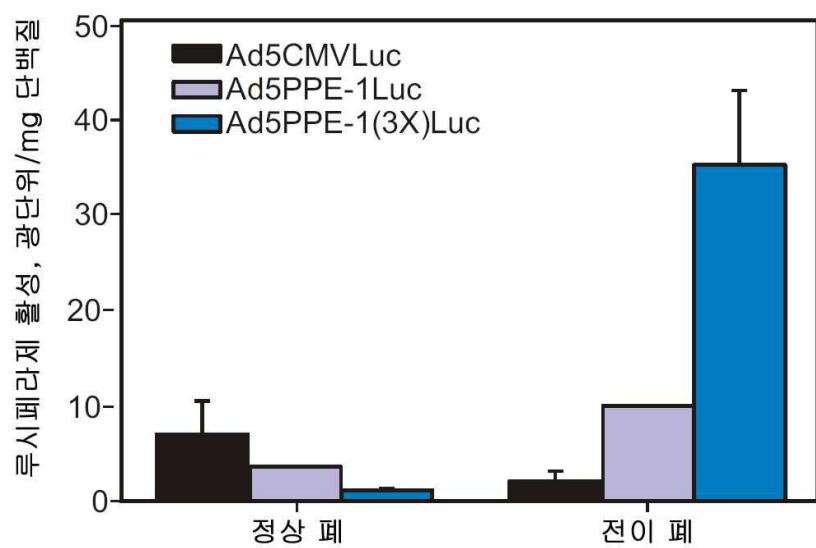
도면47c



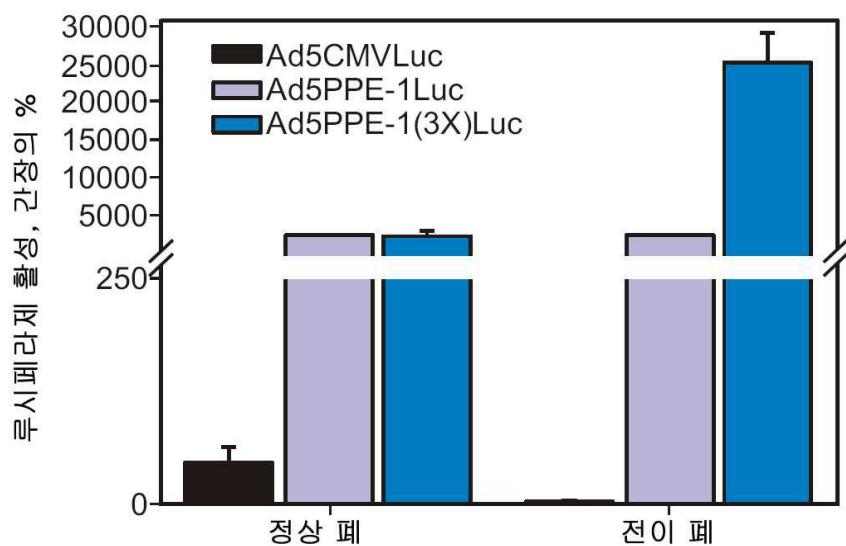
도면47d



도면48



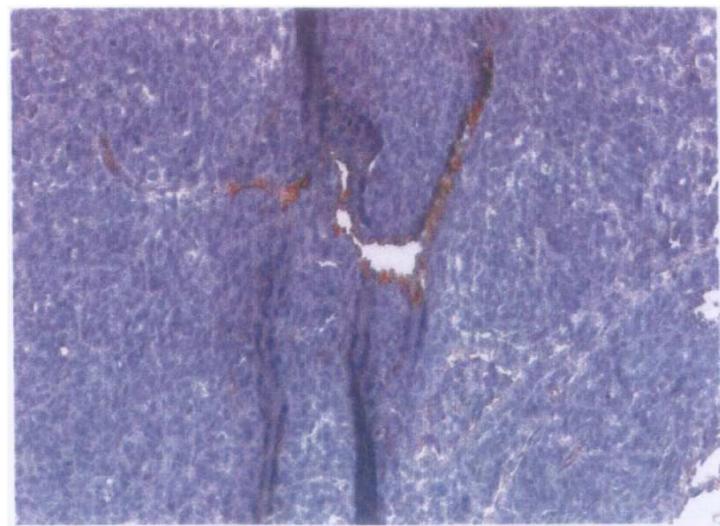
도면49



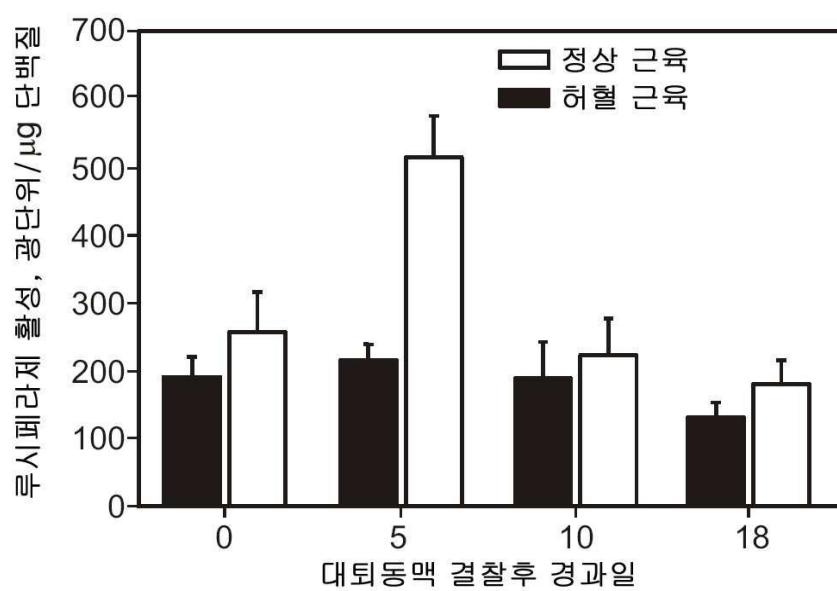
도면50a



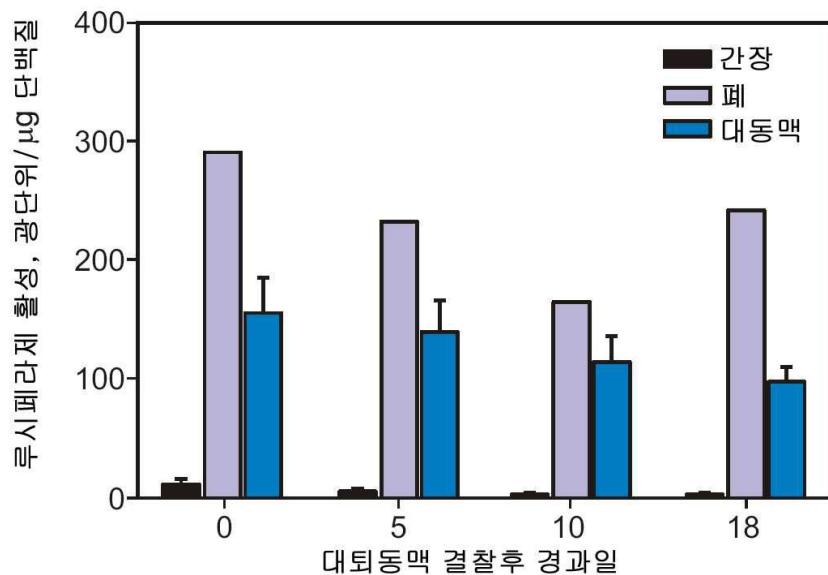
도면50b



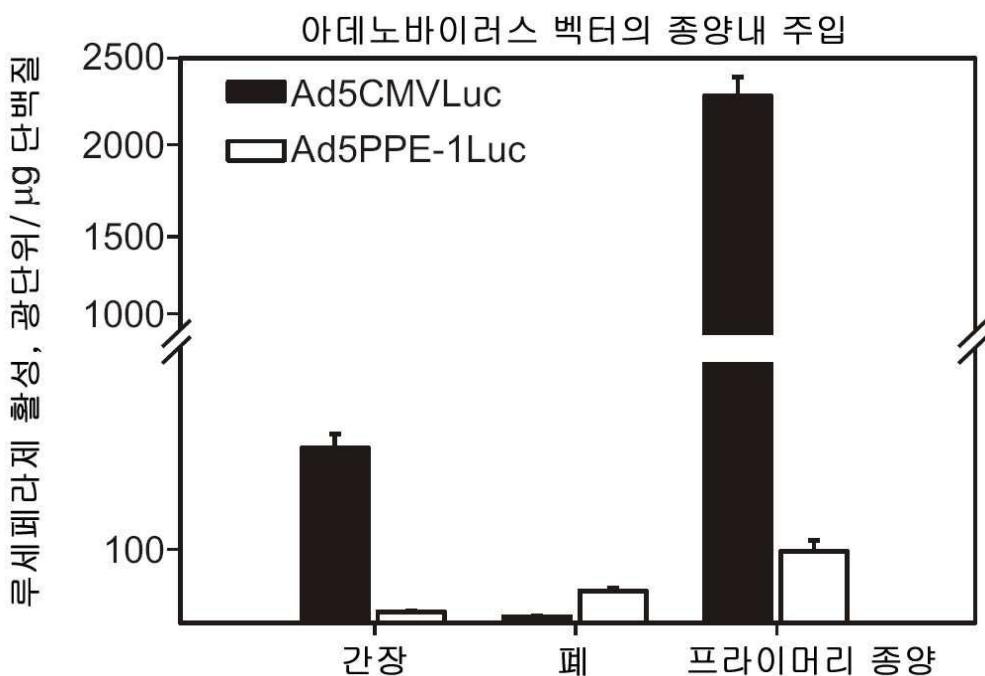
도면51



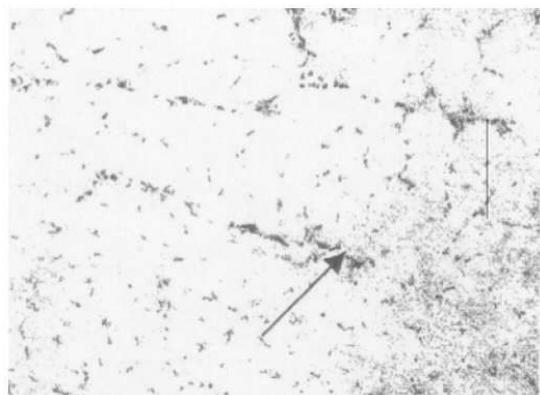
도면52



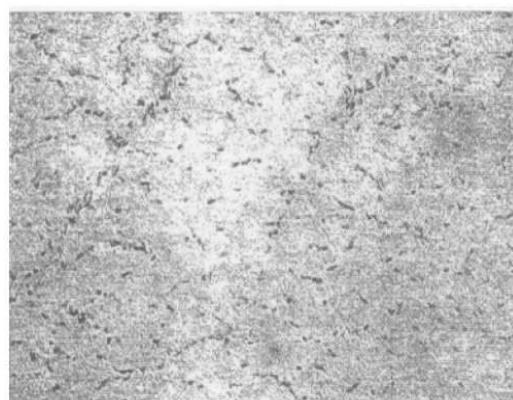
도면53



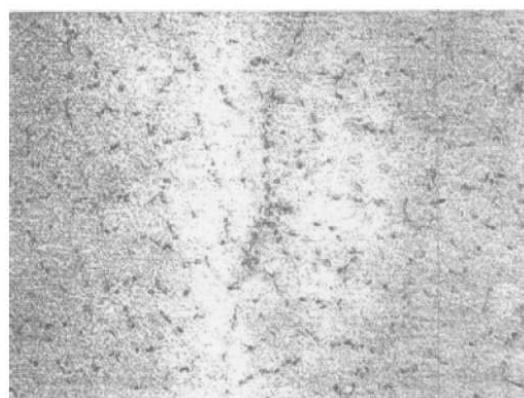
도면54a



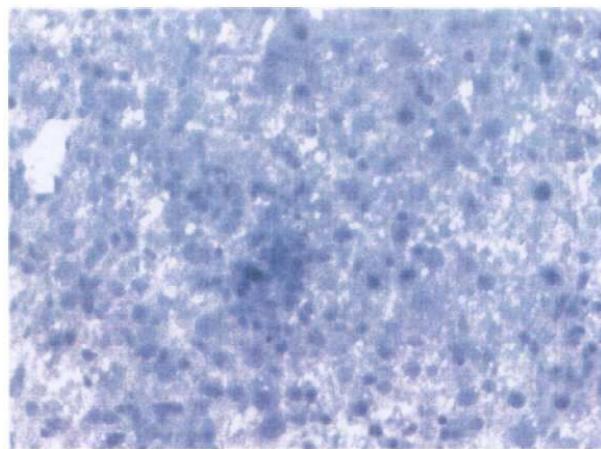
도면54b



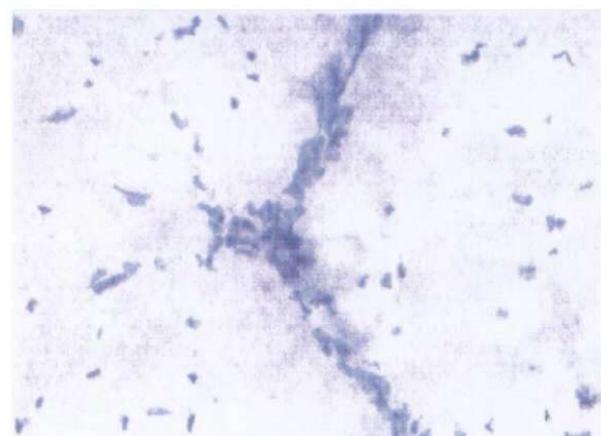
도면54c



도면54d



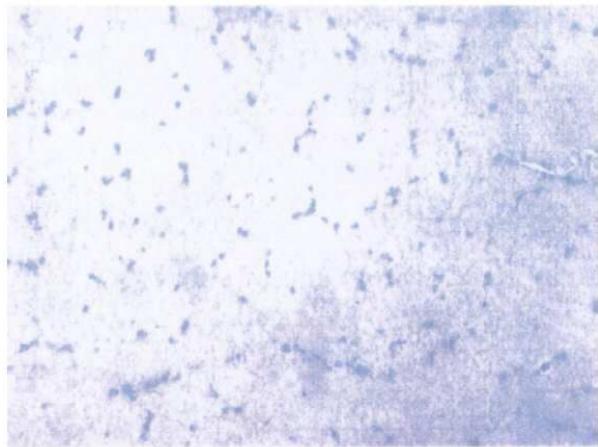
도면54e



도면54f



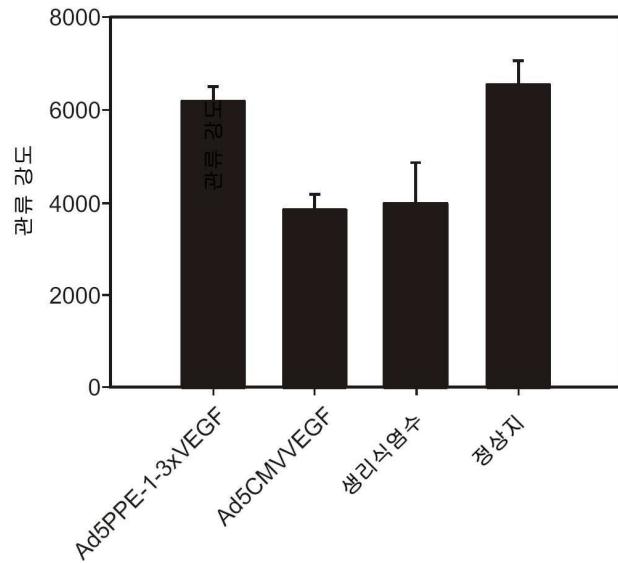
도면54g



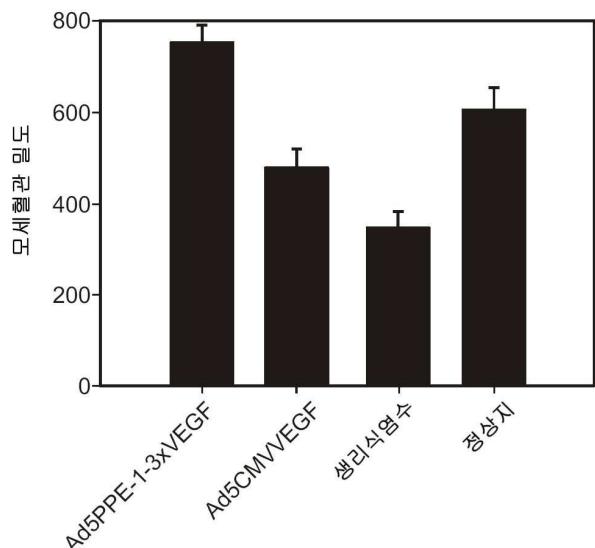
도면54h



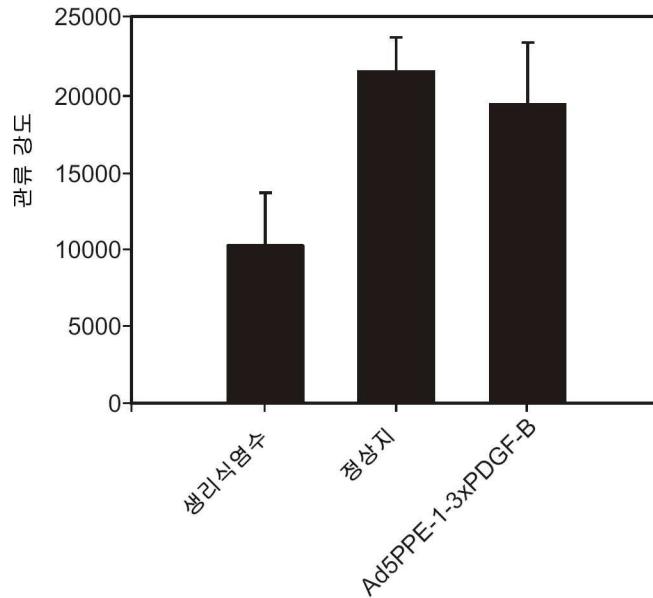
도면55a



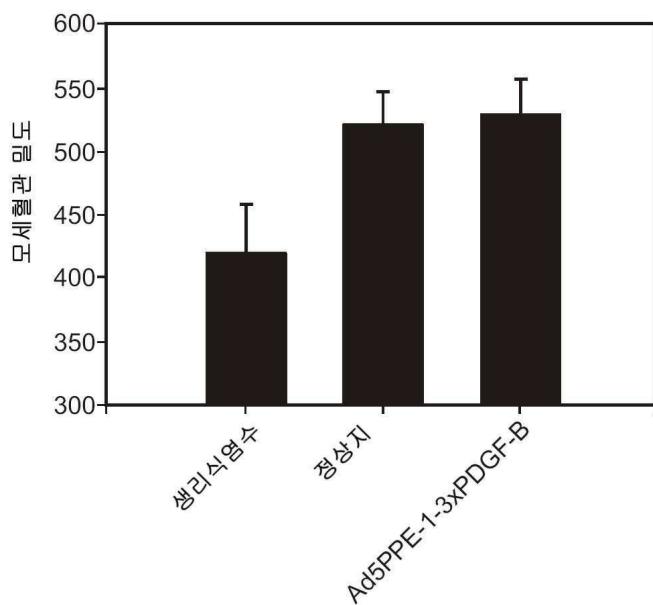
도면55b



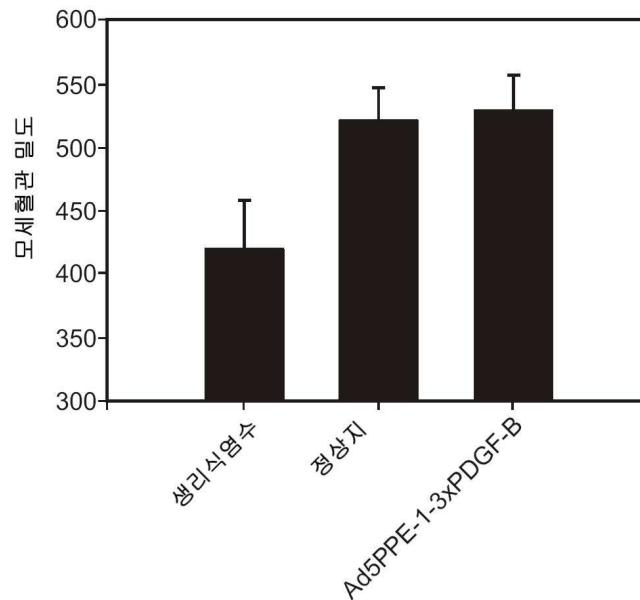
도면56a



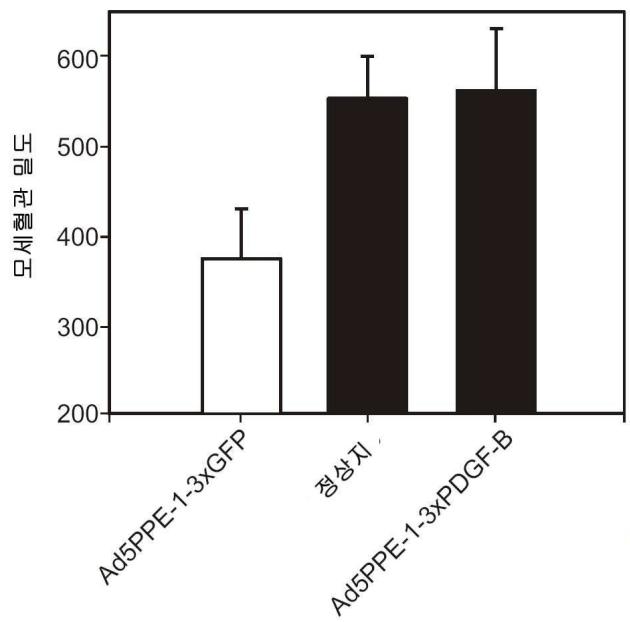
도면56b



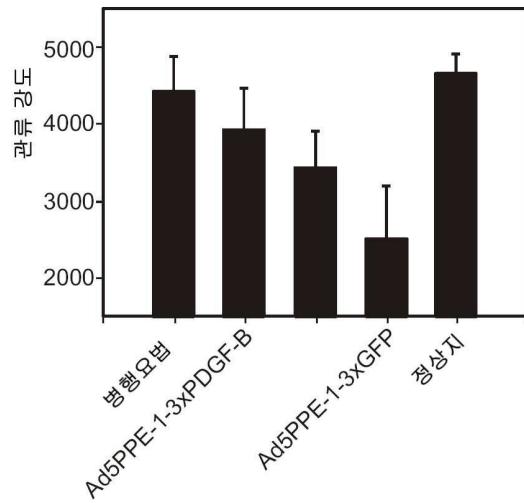
도면56c



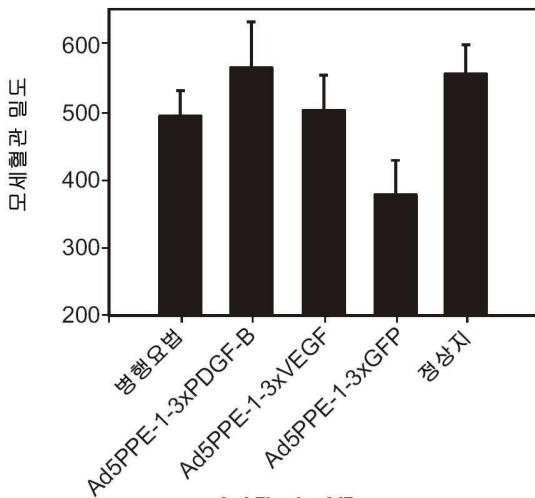
도면56d



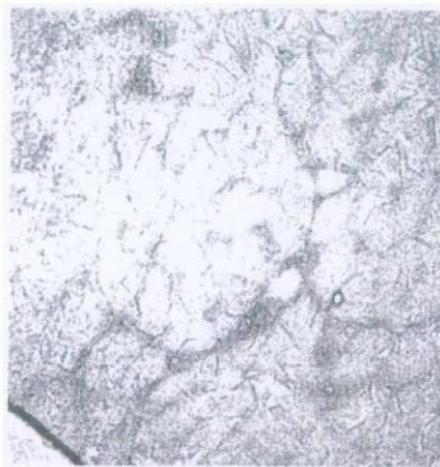
도면57a



도면57b



도면57c



도면57d



도면57e



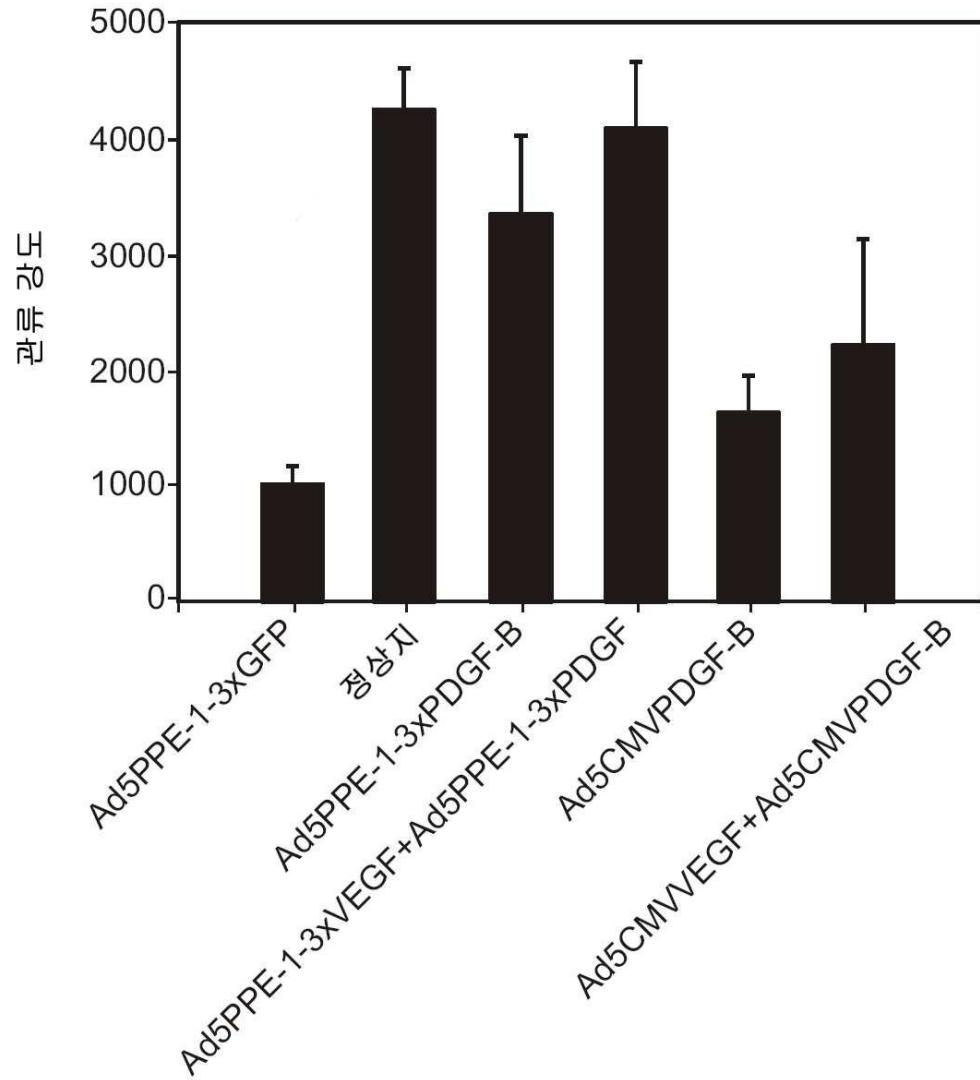
도면57f



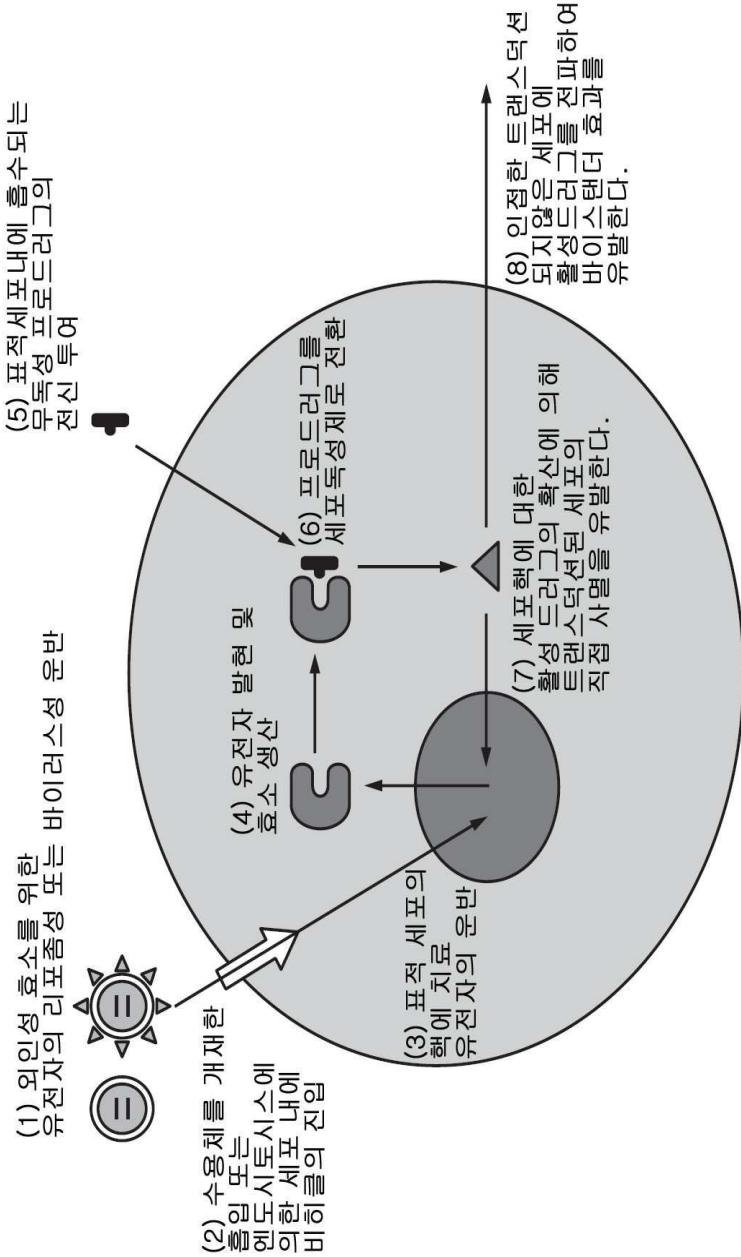
도면57g



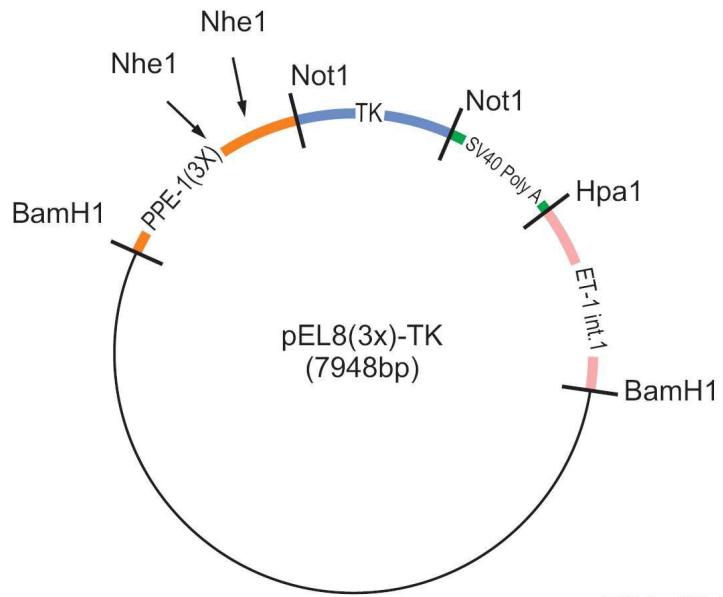
도면58



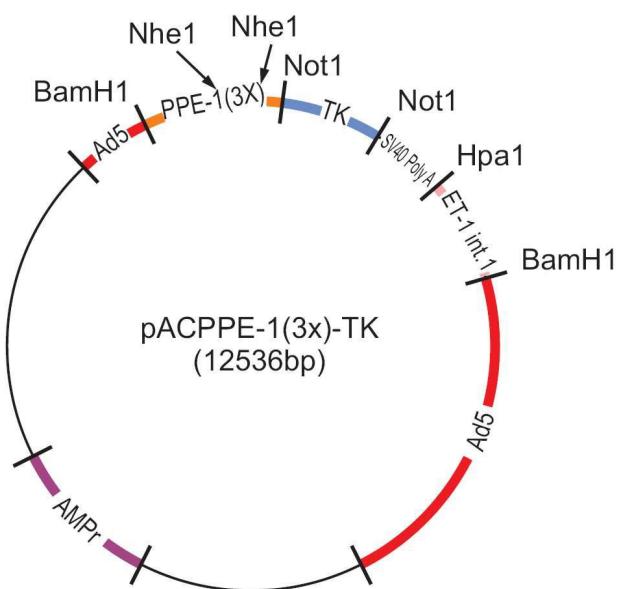
도면59



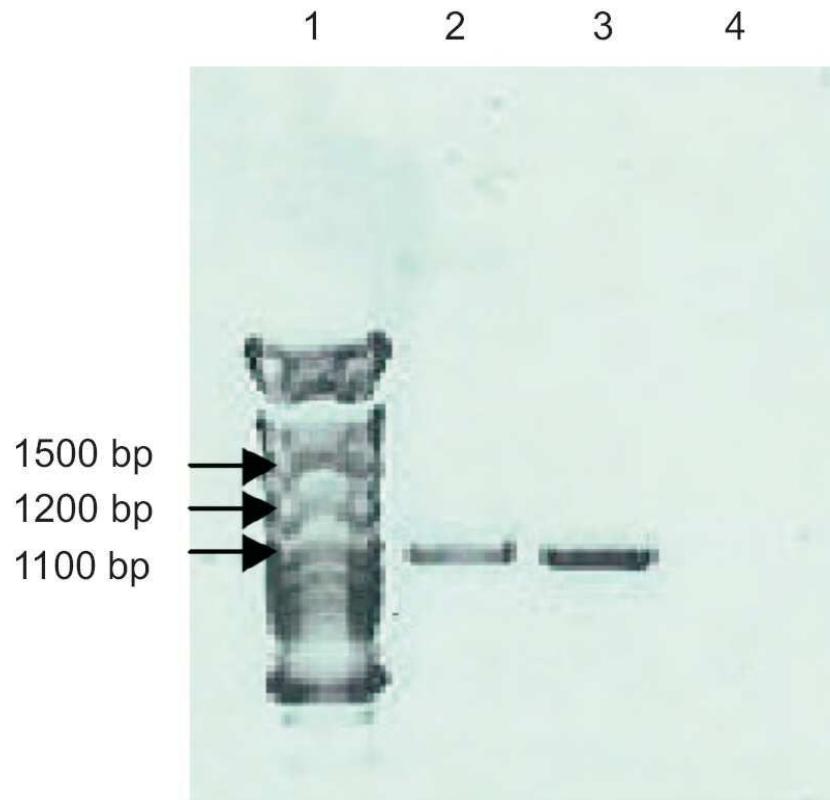
도면60a



도면60b



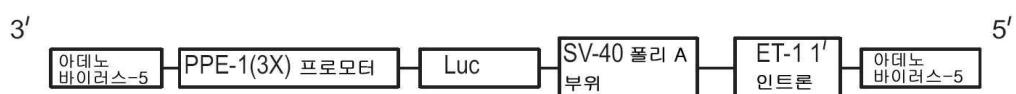
도면61



도면62a



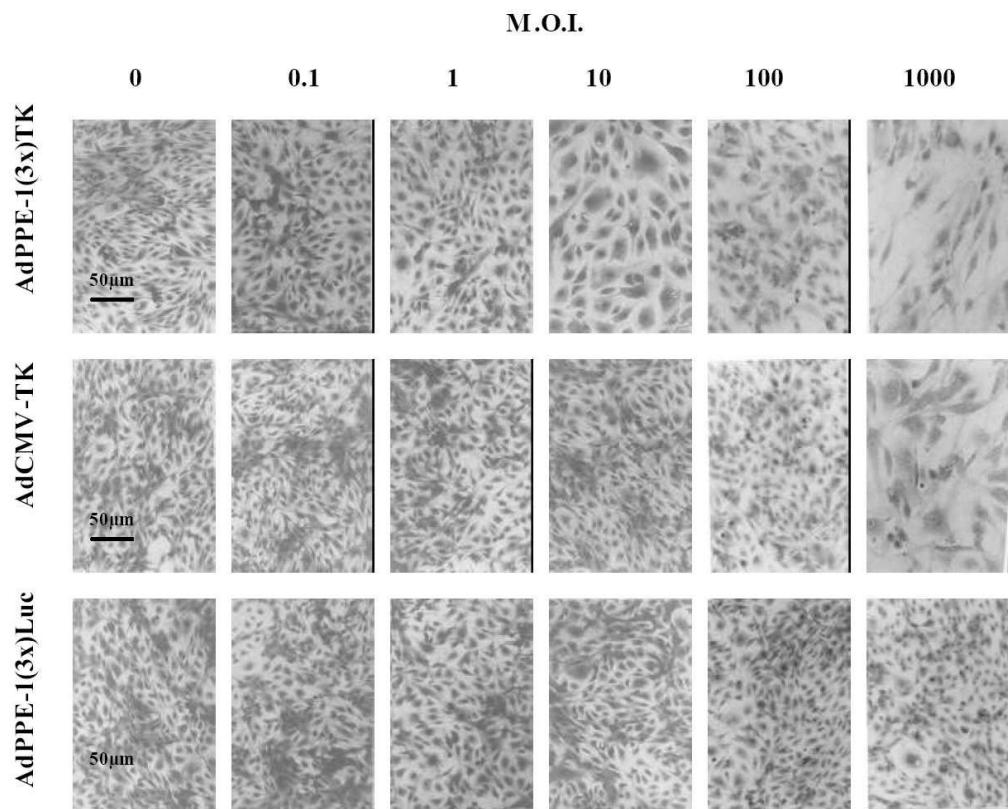
도면62b



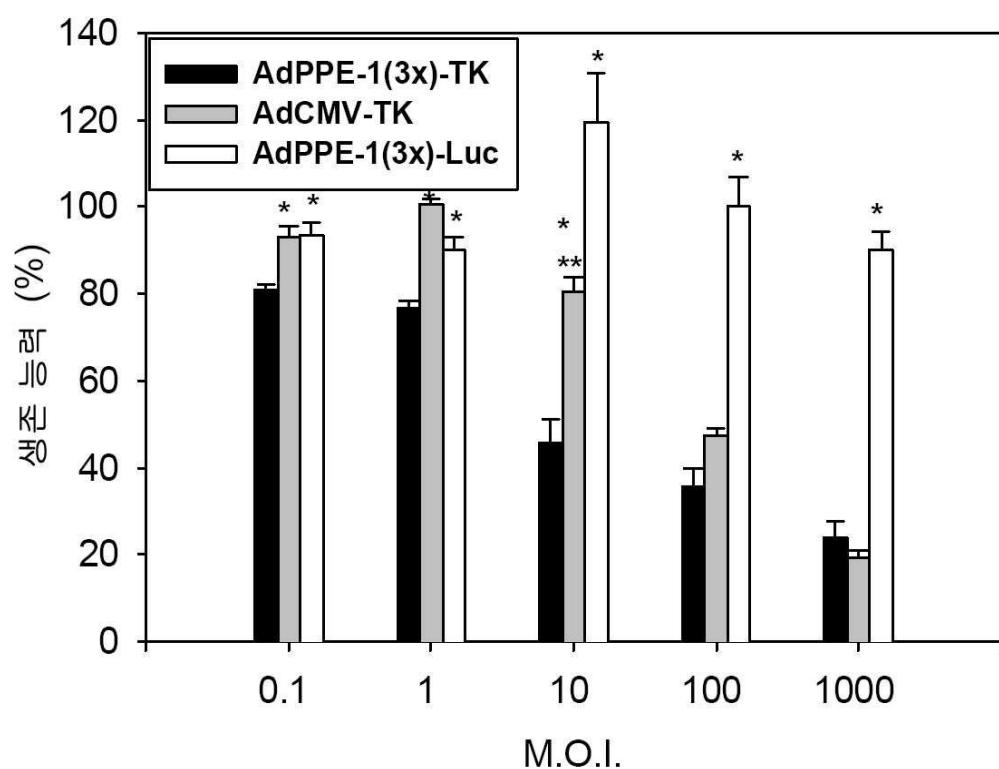
도면62c



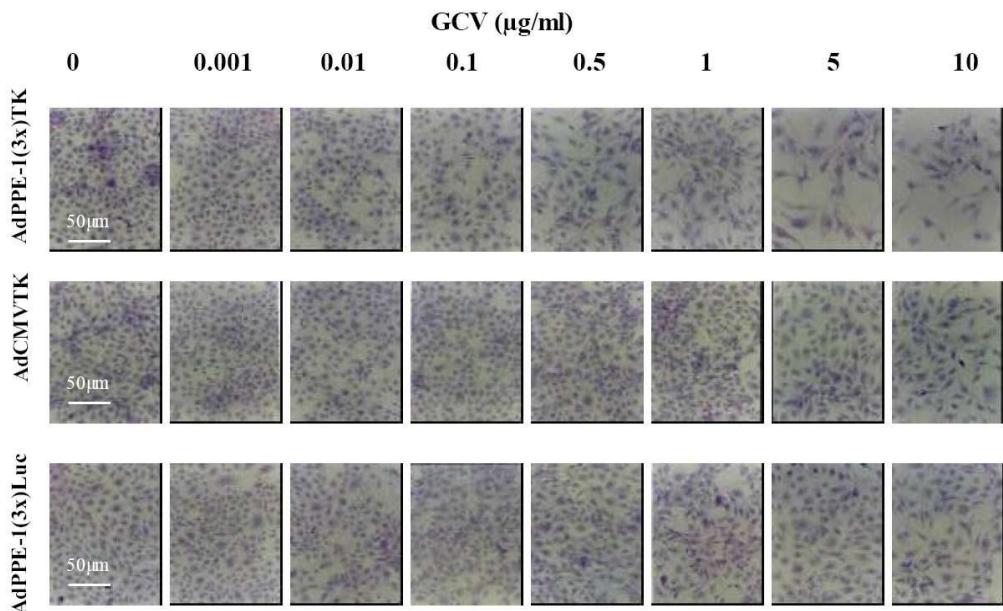
도면63



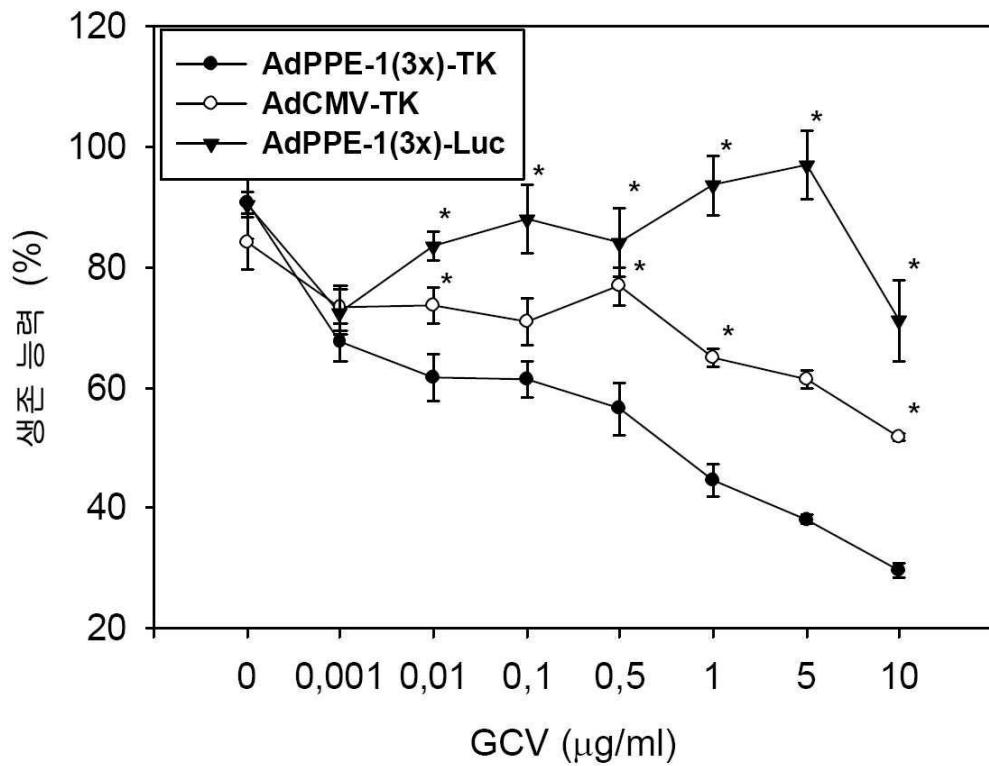
도면64



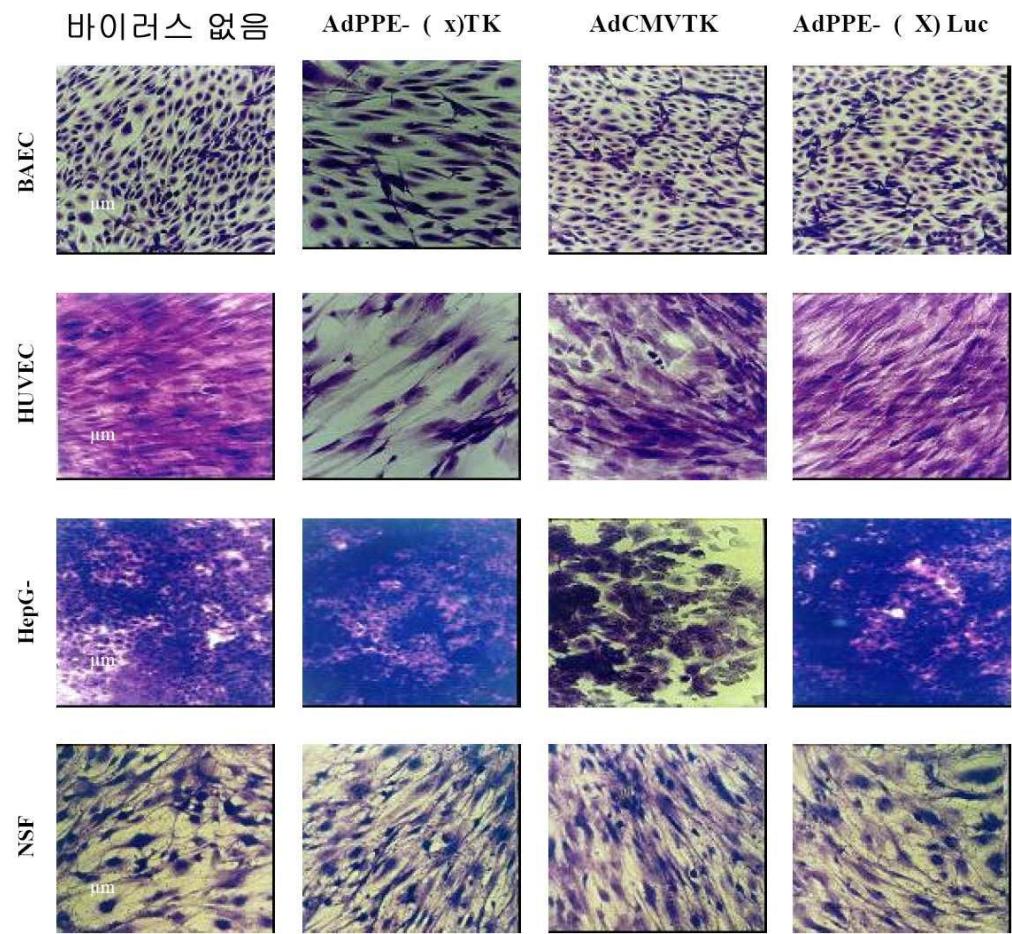
도면65



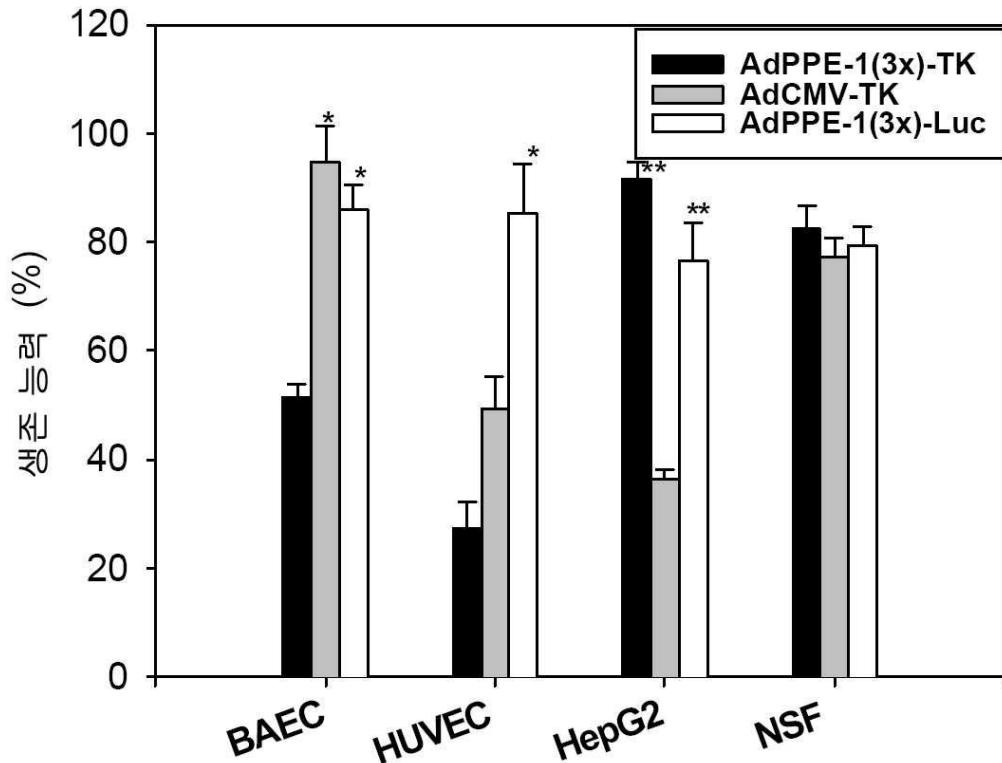
도면66



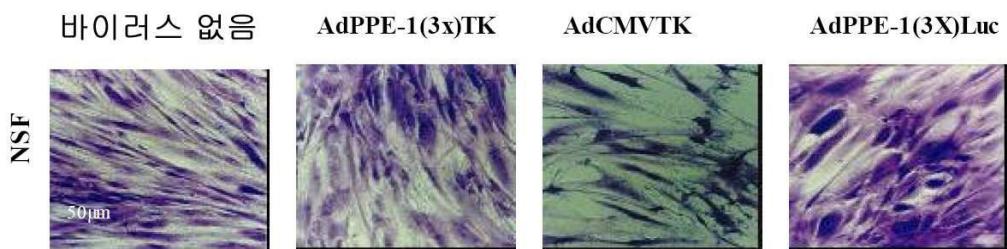
도면67



도면68

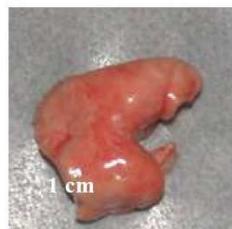


도면69



도면70

AdPPE-1(3x)TK
+GCV



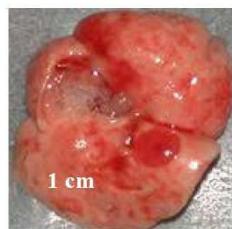
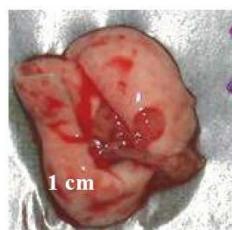
AdPPE-1(3x)TK
No GCV



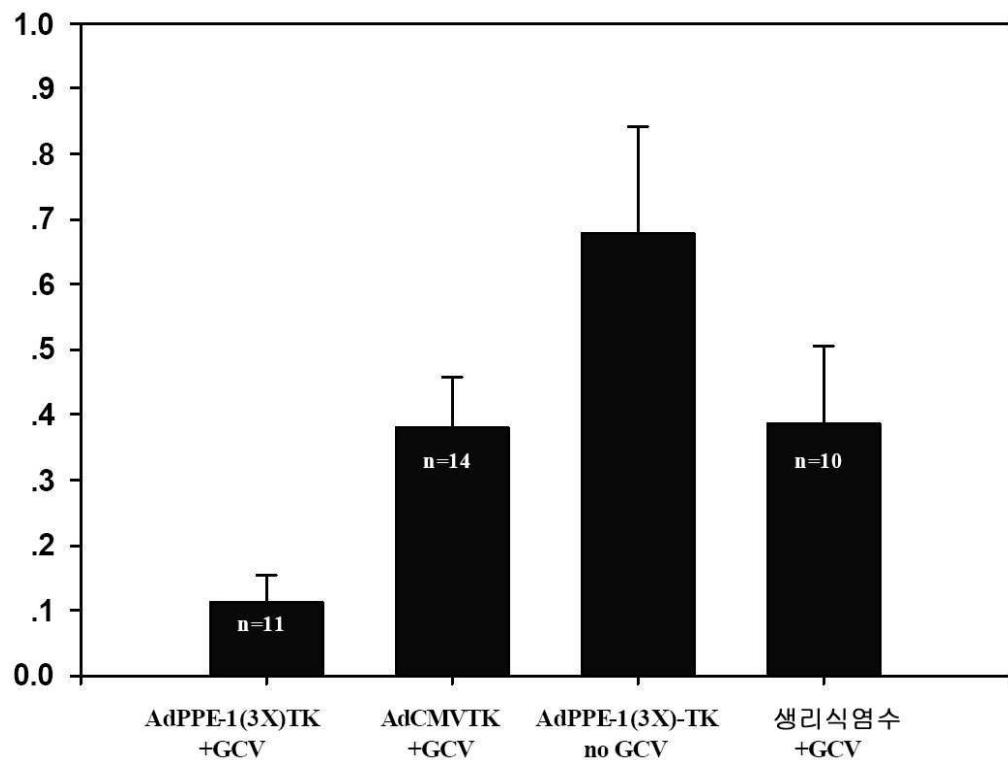
AdCMVTK
+GCV



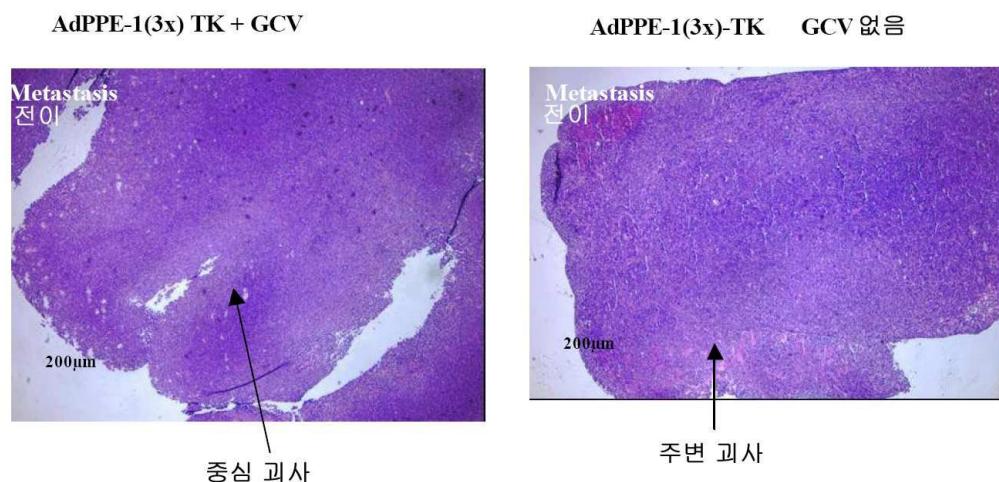
생리식염수+GCV



도면71

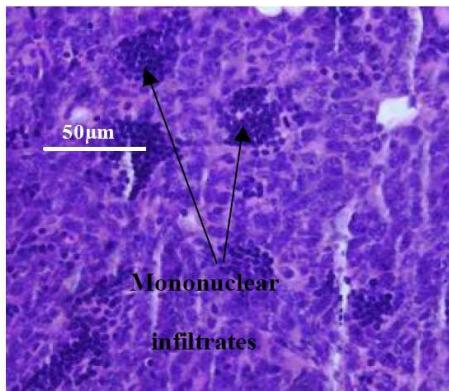


도면72a

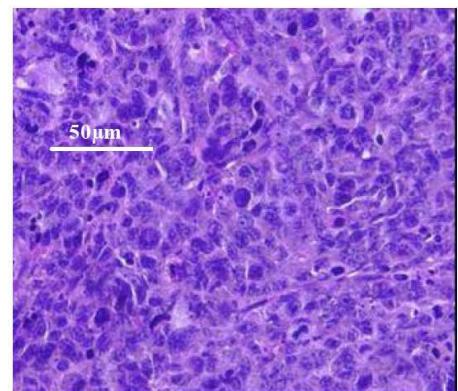


도면72b

AdPPE-1(3x)TK + GCV

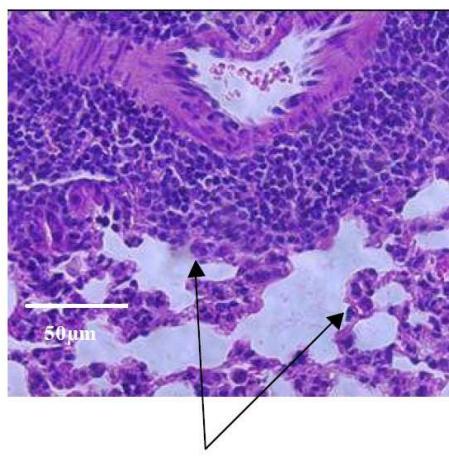


AdPPE-1(3x)TK GCV 없음

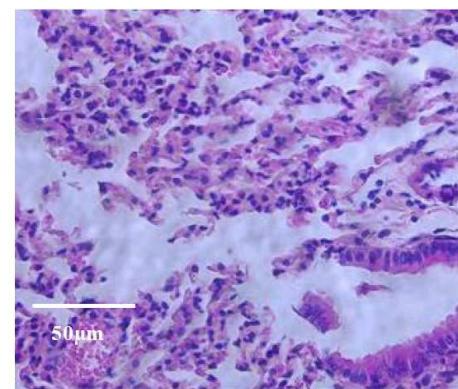


도면72c

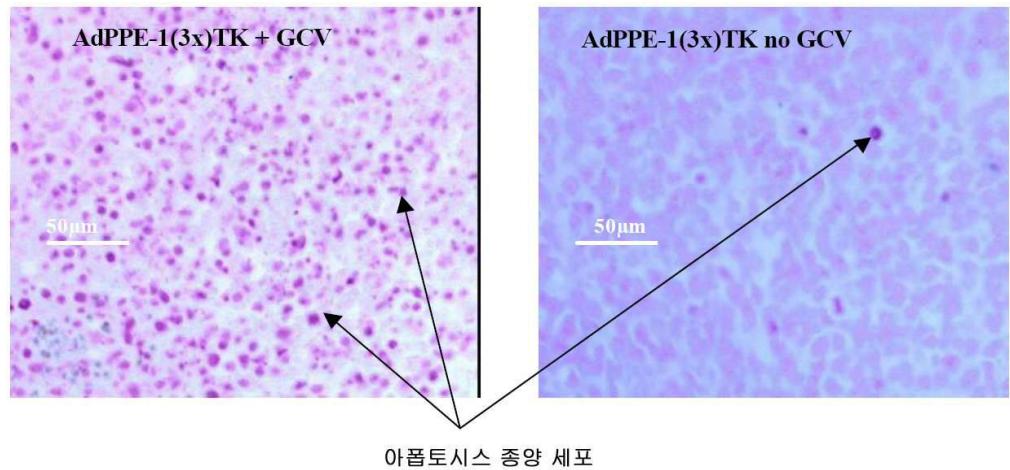
AdPPE-1(3x)TK + GCV



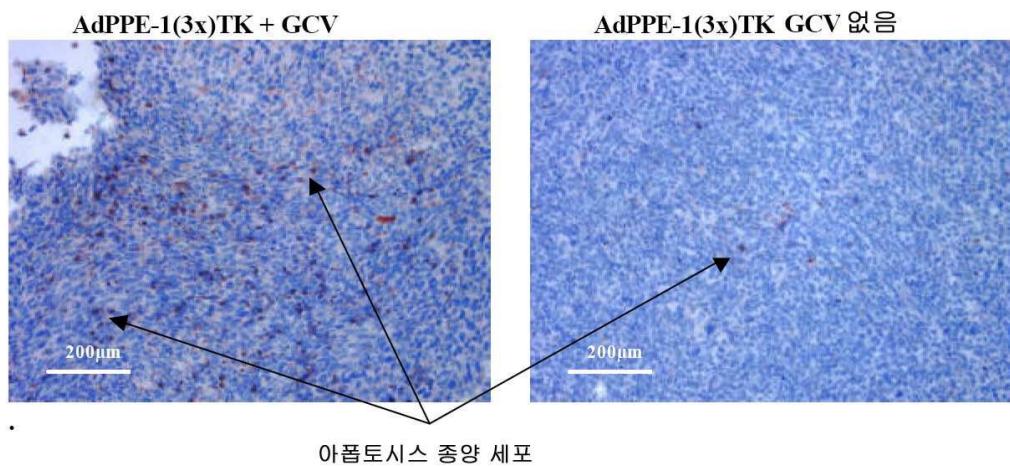
AdPPE-1(3x)TK GCV 없음



도면73a

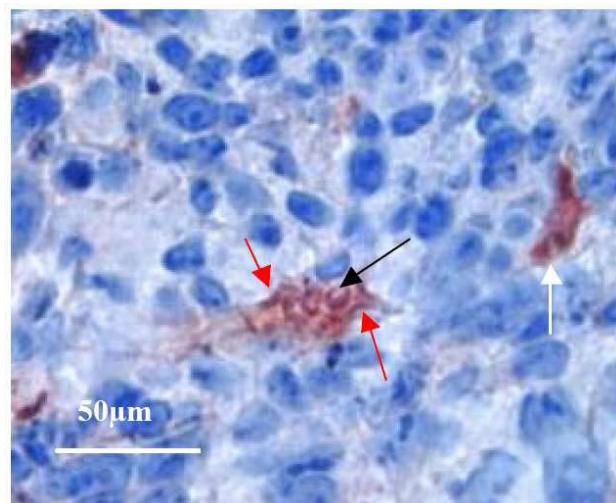


도면73b



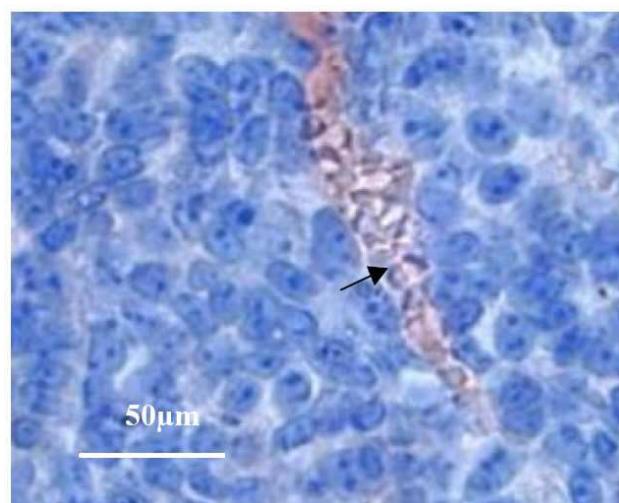
도면74a

AdPPE-1(3x)TK + GCV



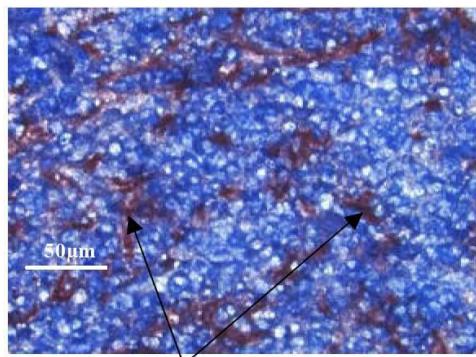
도면74b

AdPPE-1(3x)TK GCV 없음



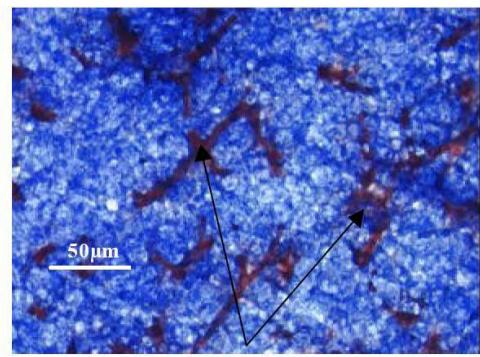
도면75a

AdPPE-1(3x)TK + GCV



분기 또는
불연속이 없는
짧은 혈관

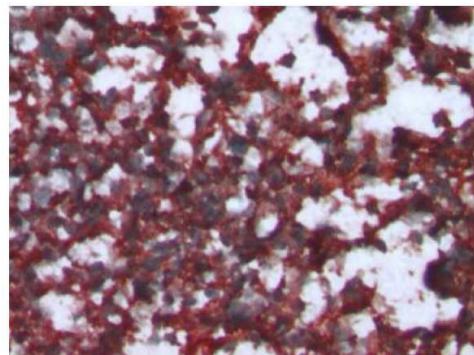
AdPPE-1(3x)TK GCV 없음



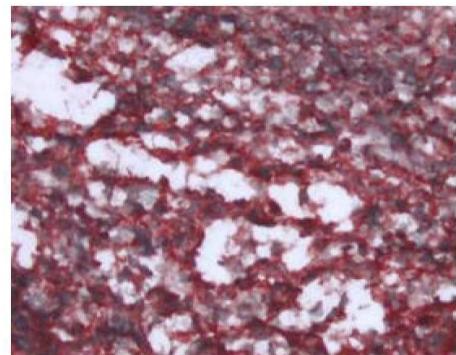
명확한 경계 및
분기를 가지는
다수의 혈관

도면75b

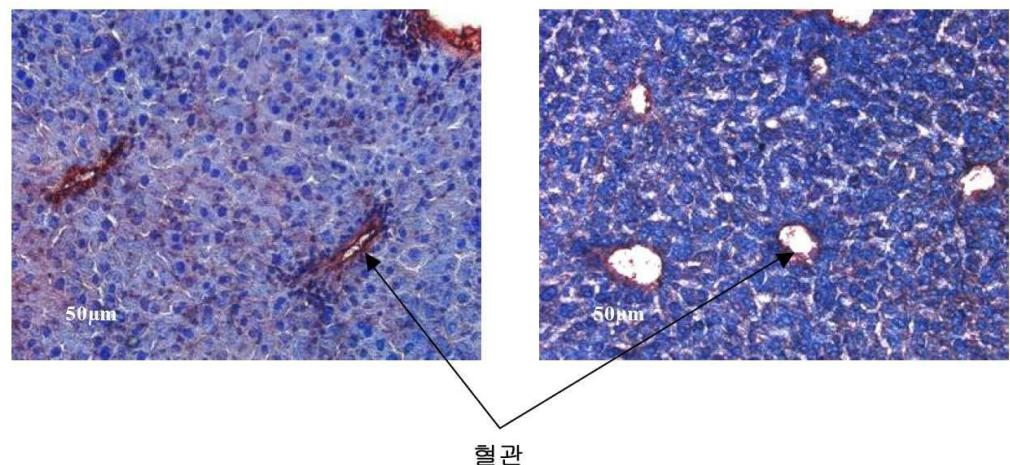
AdPPE-1(3x)TK + GCV



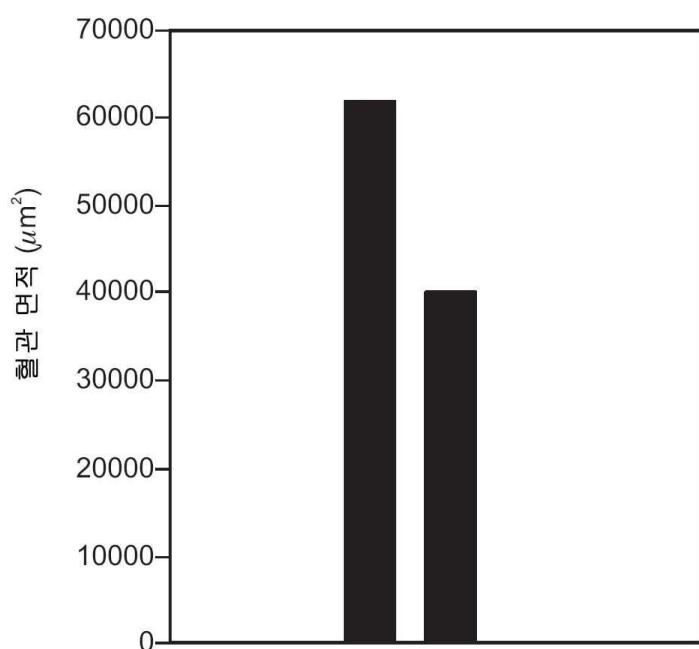
AdPPE-1(3x)TK GCV 없음



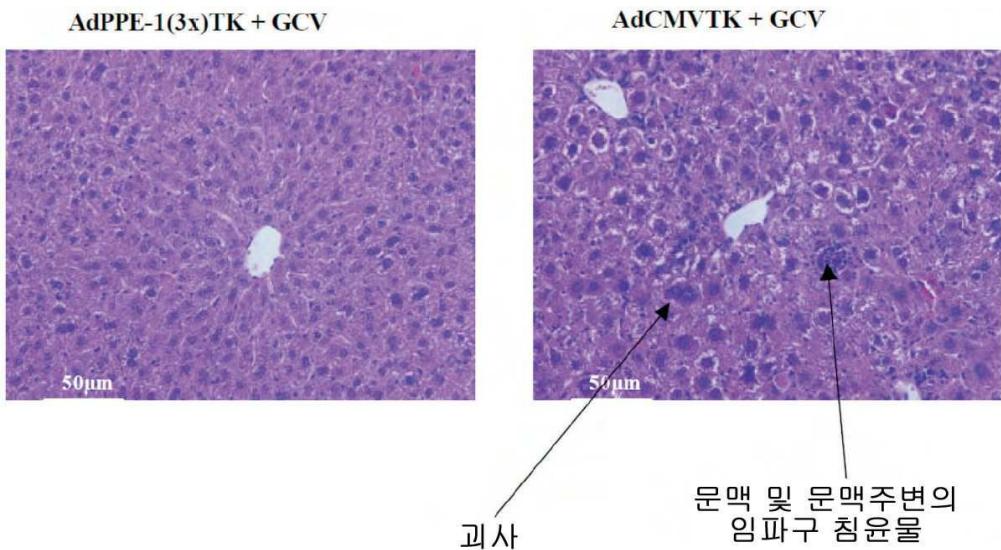
도면75c



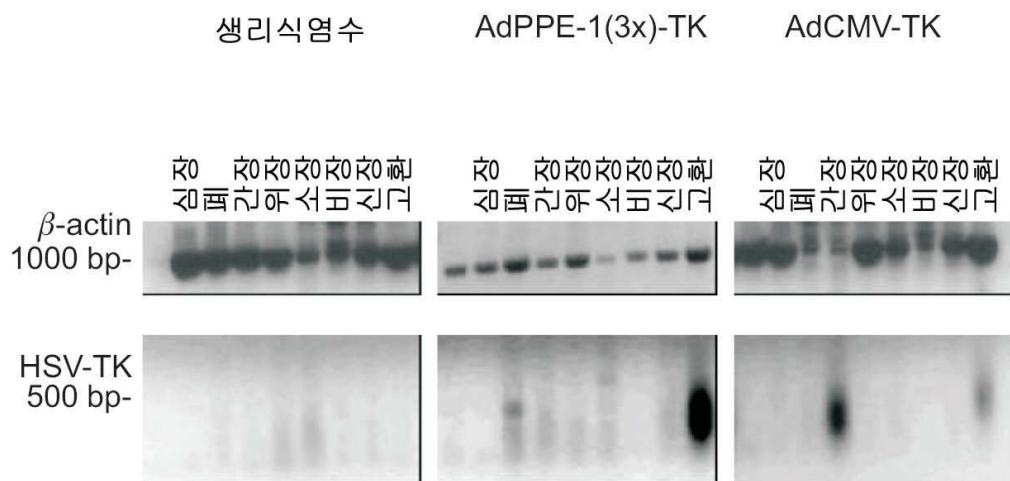
도면75d



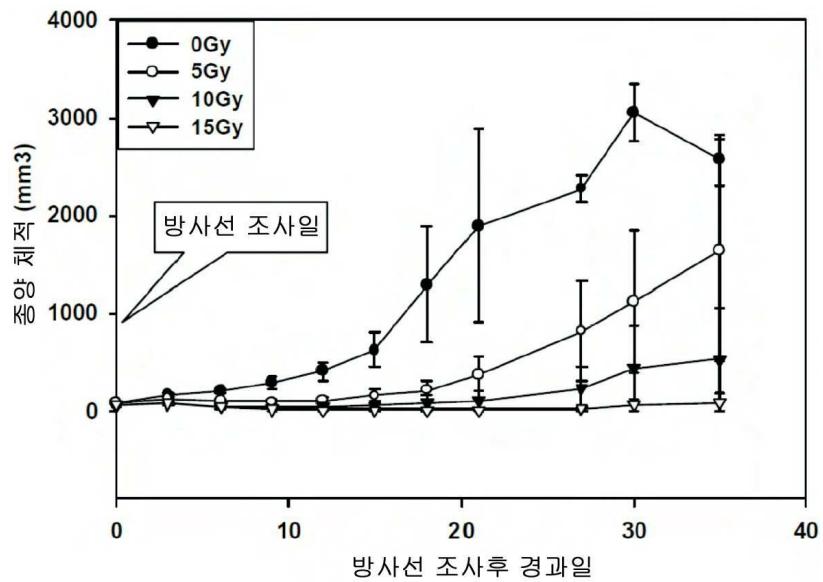
도면76



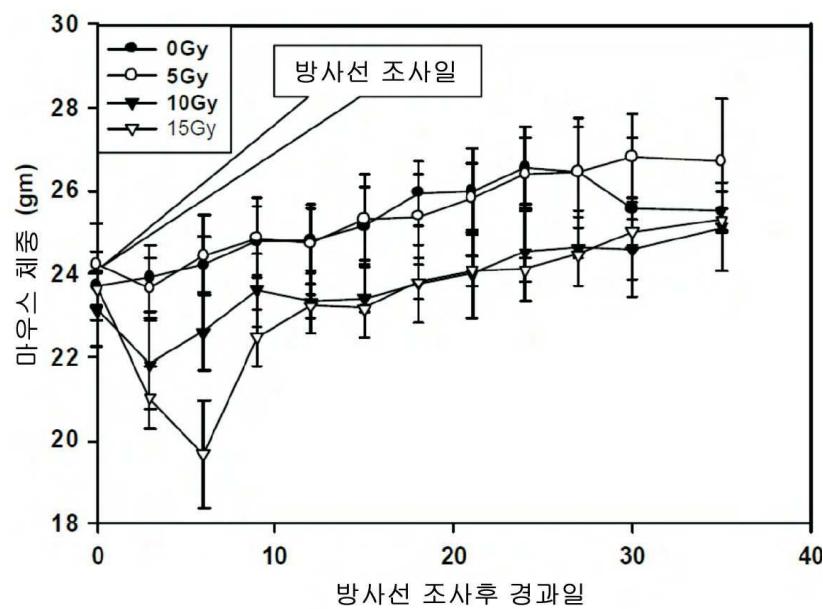
도면77



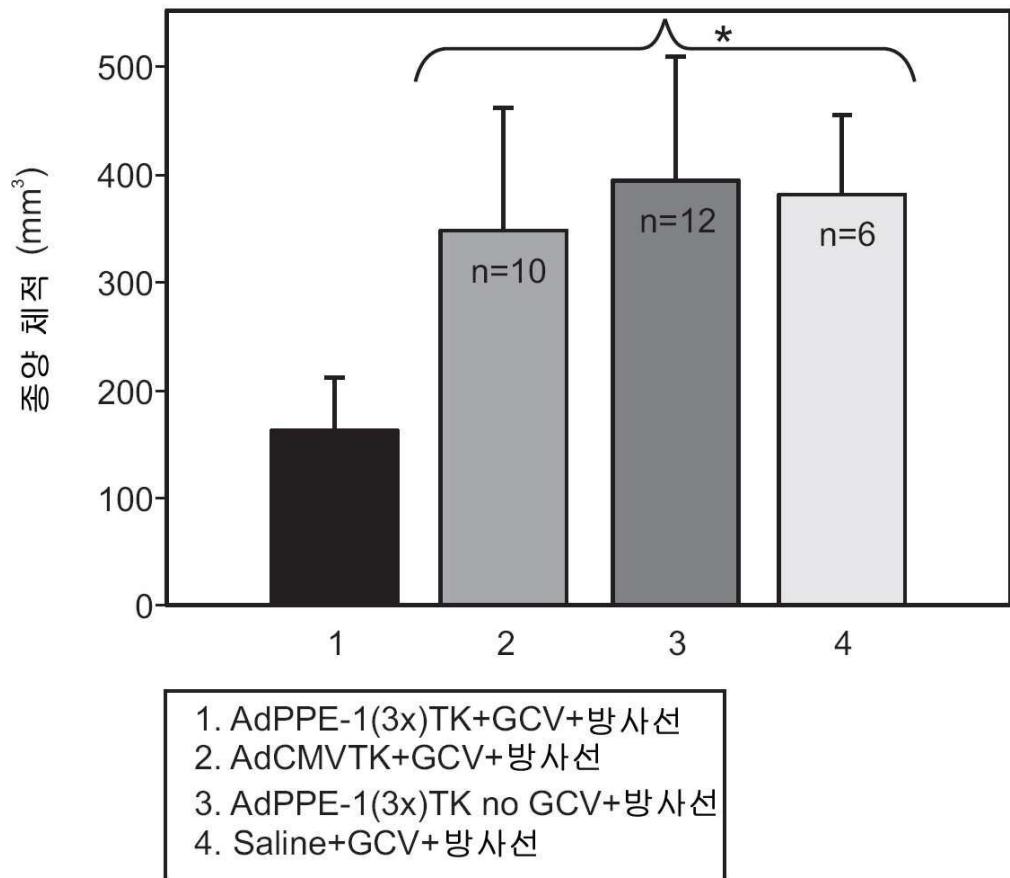
도면78a



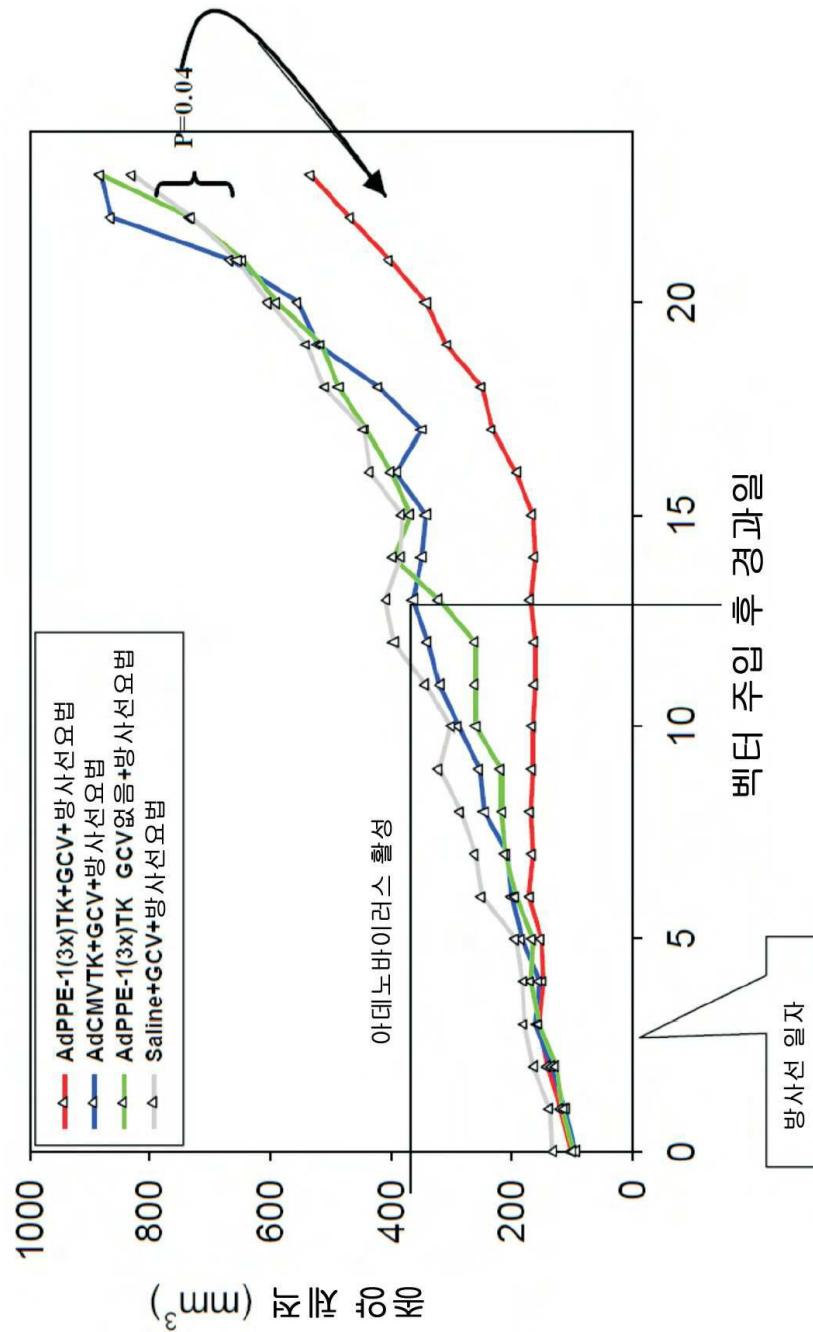
도면78b



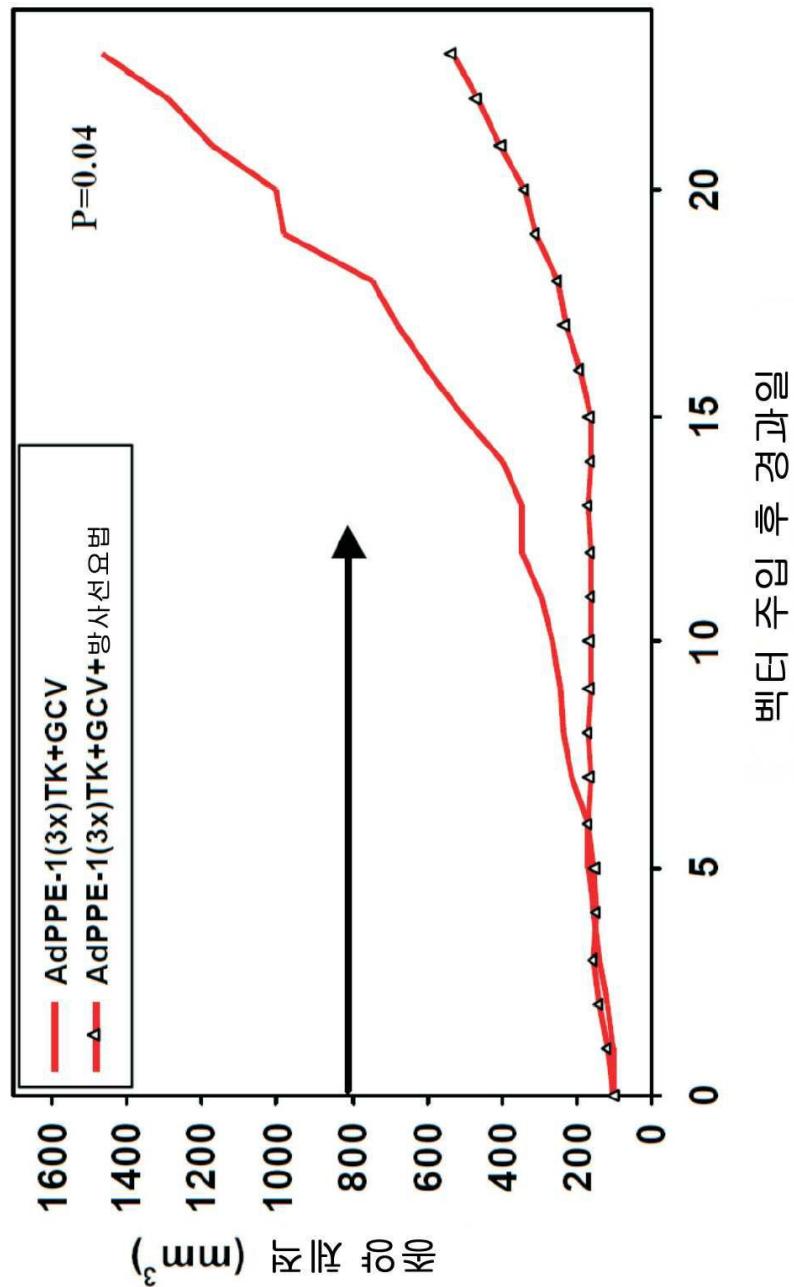
도면79a



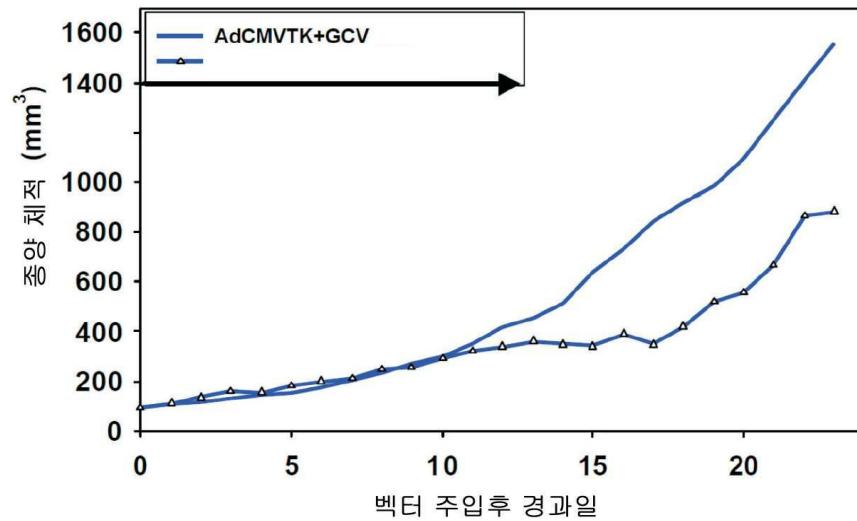
도면79b



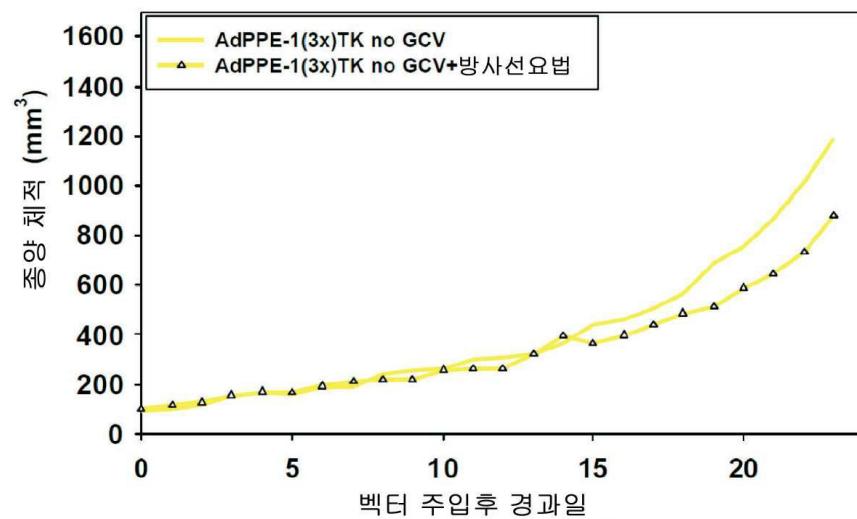
도면79c



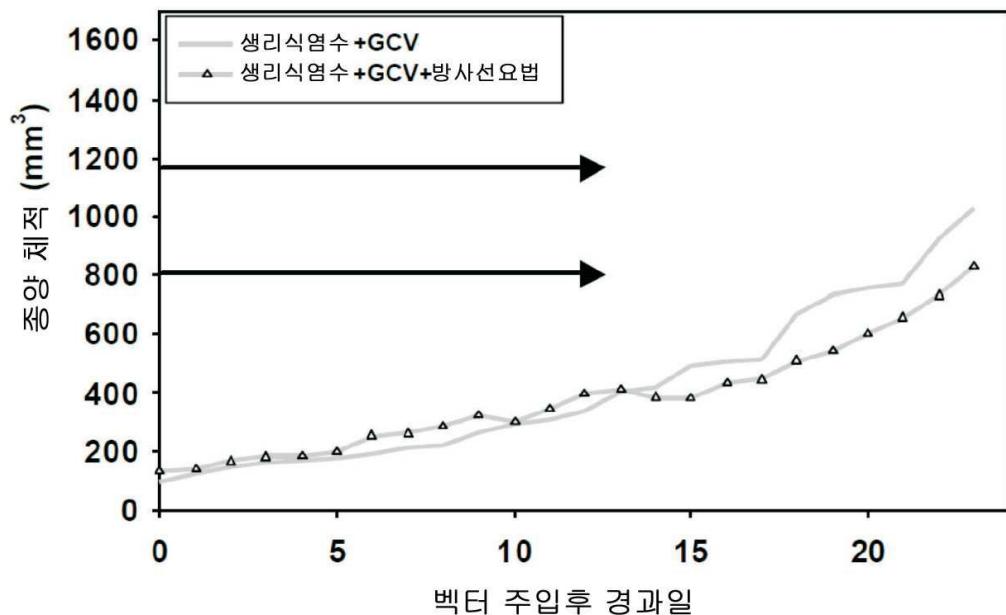
도면79d



도면79e



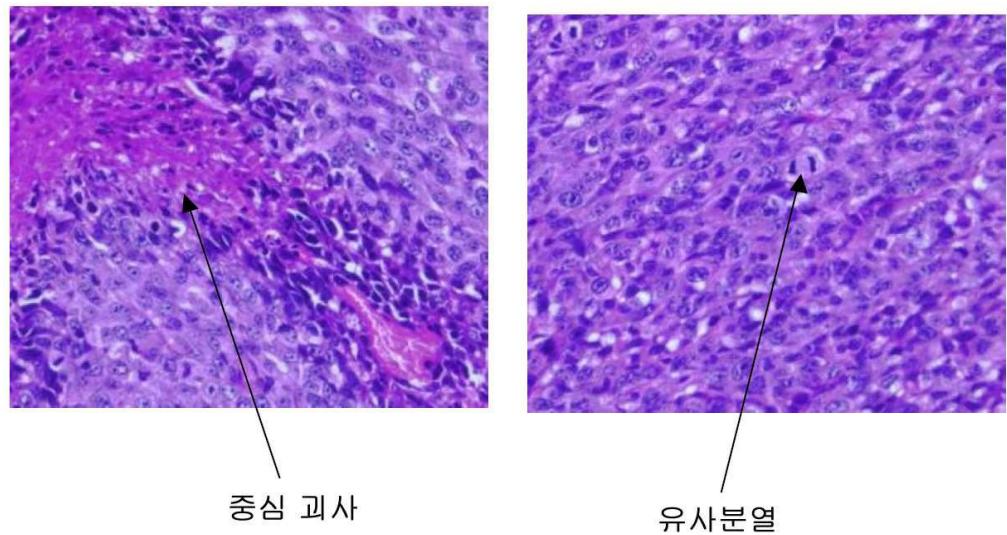
도면79f



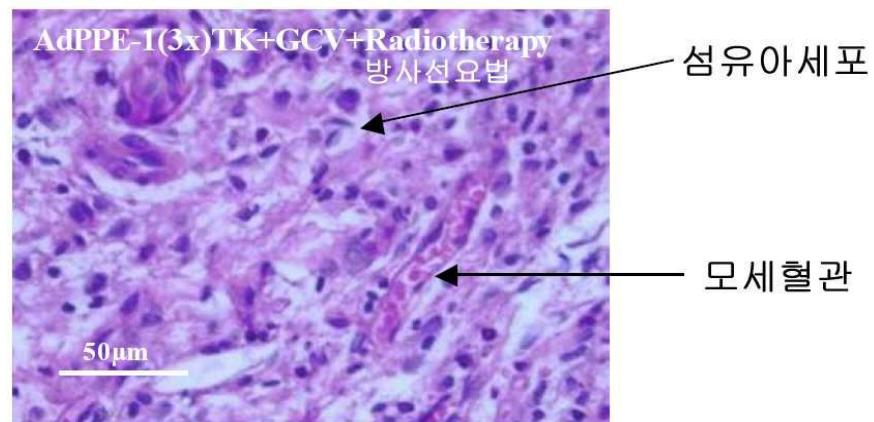
도면79g



도면80a



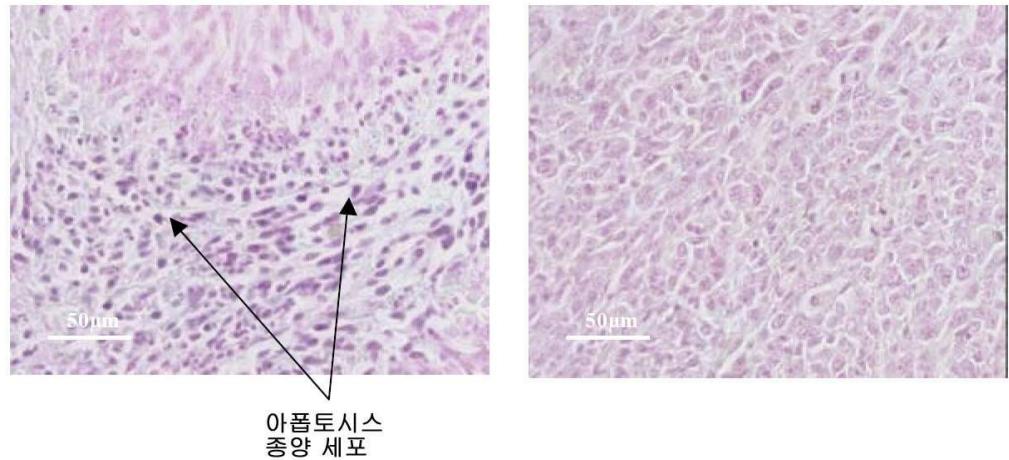
도면80b



도면81a

AdPPE-1(3x)TK+GCV+방사선요법

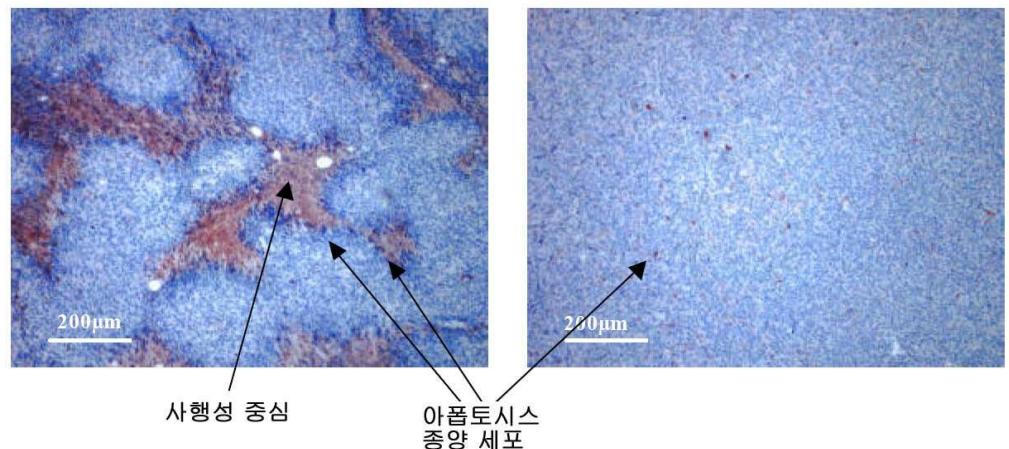
AdPPE-1(3x)TK GCV 없음



도면81b

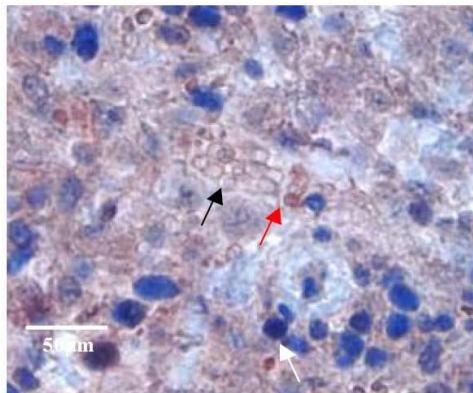
AdPPE-1(3x)TK+GCV+방사선요법

AdPPE-1(3x)TK GCV 없음

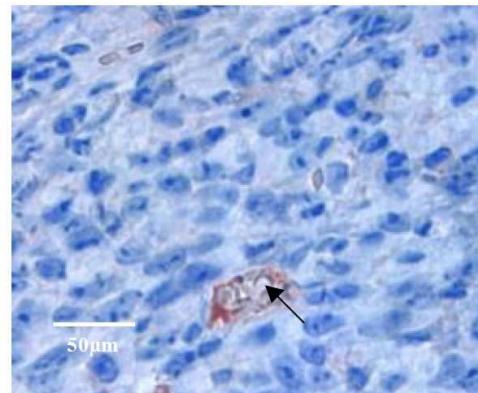


도면82

AdPPE-1(3x)TK+GCV+방사선요법

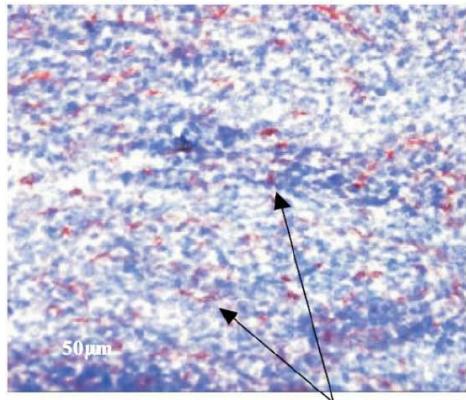


AdPPE-1(3x)TK GCV 없음



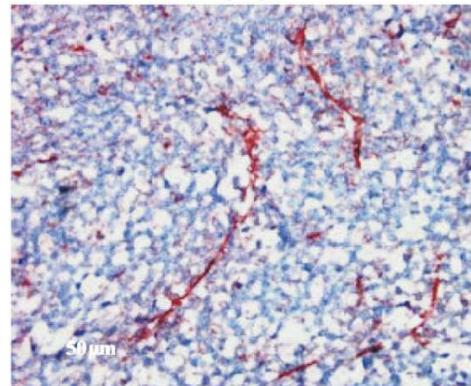
도면83a

AdPPE-1(3x)TK+GCV+방사선요법

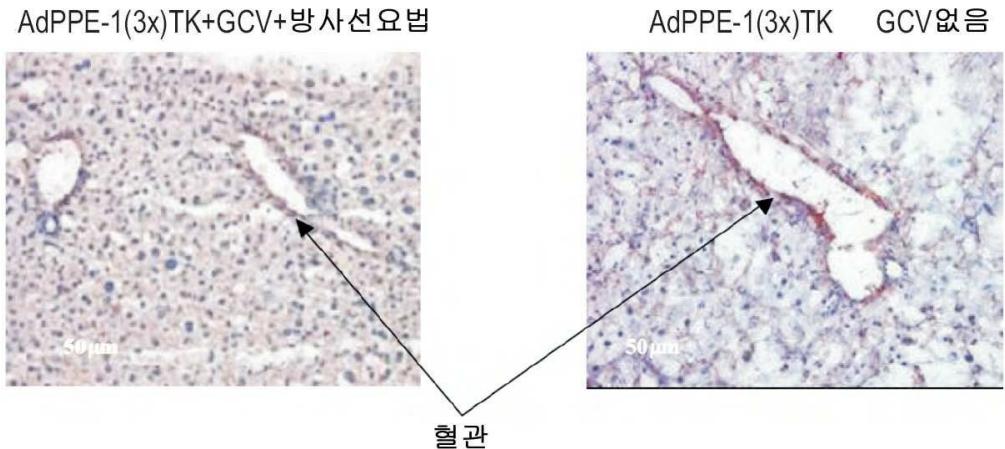


연속성이 없는
짧은 혈관

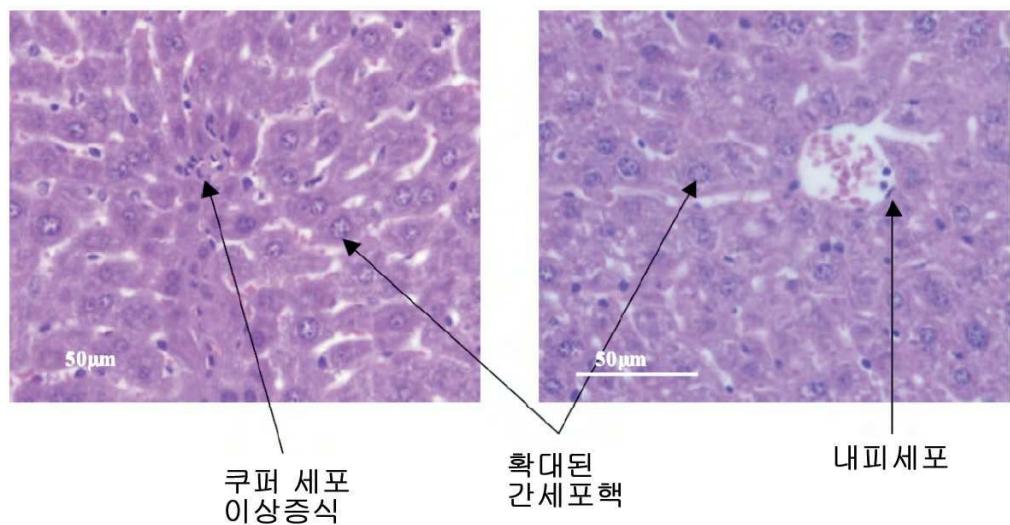
AdPPE-1(3x)TK GCV 없음



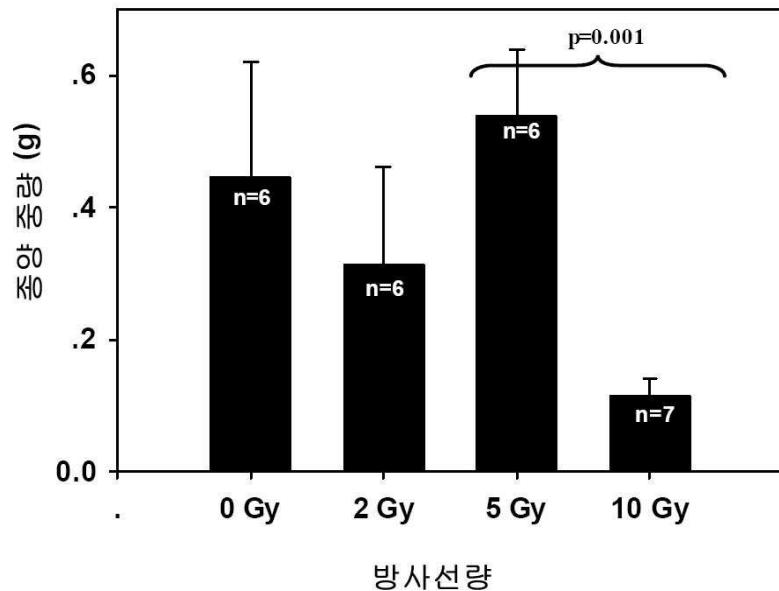
도면83b



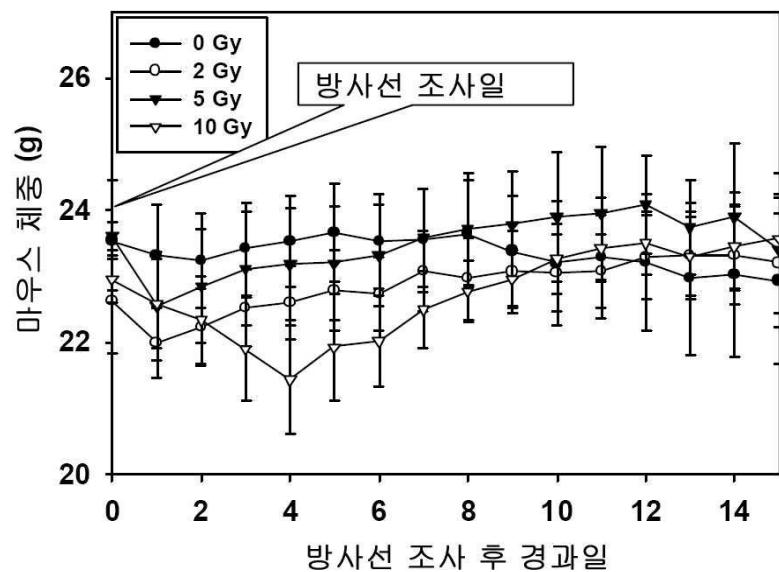
도면84



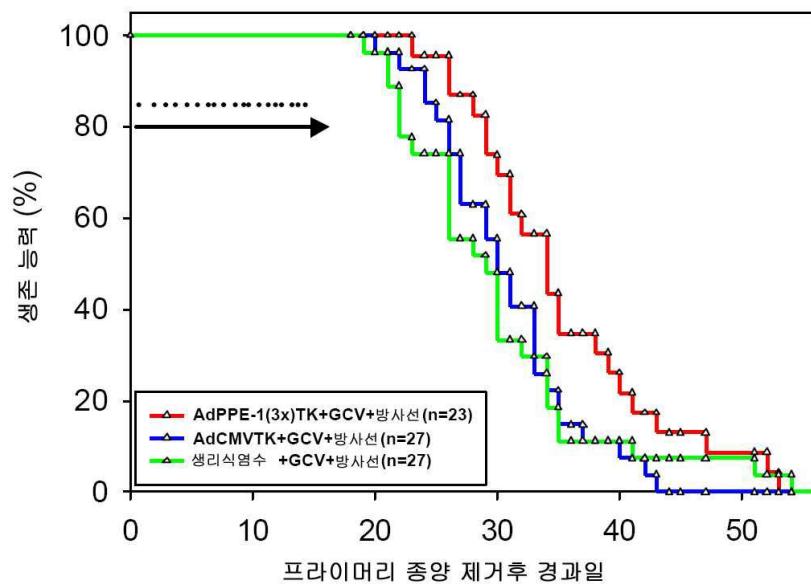
도면85a



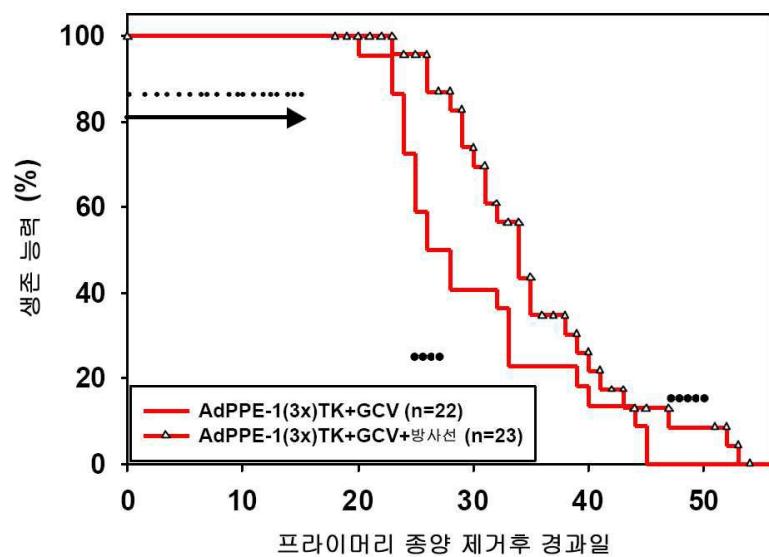
도면85b



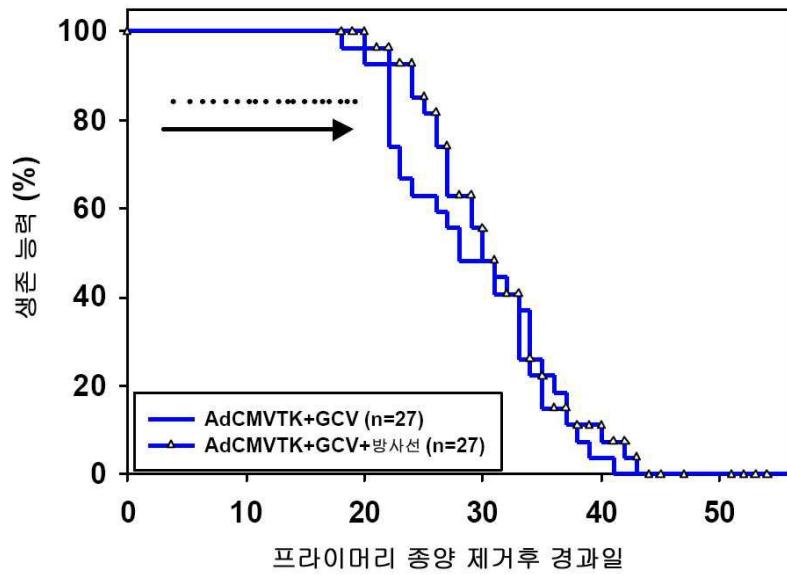
도면86a



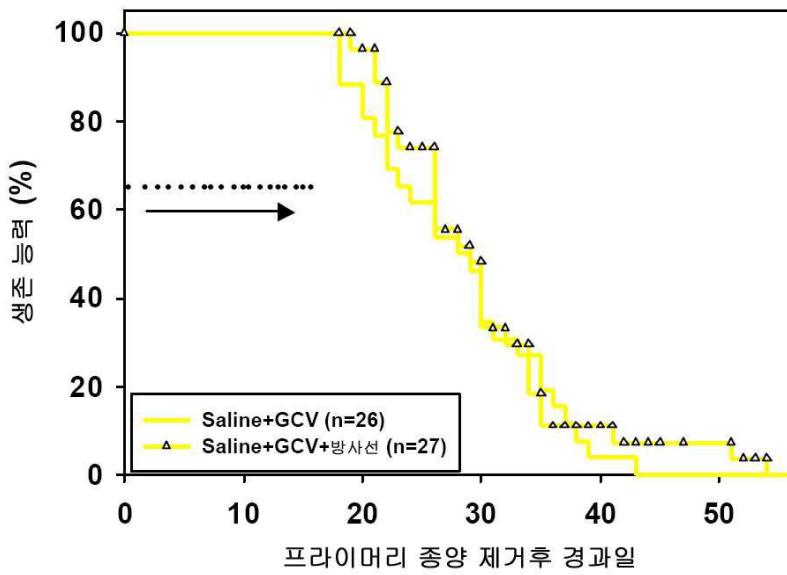
도면86b



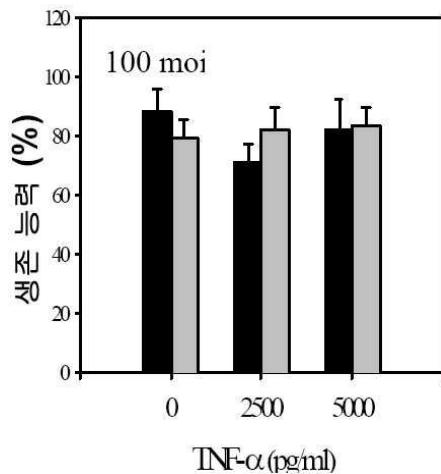
도면86c



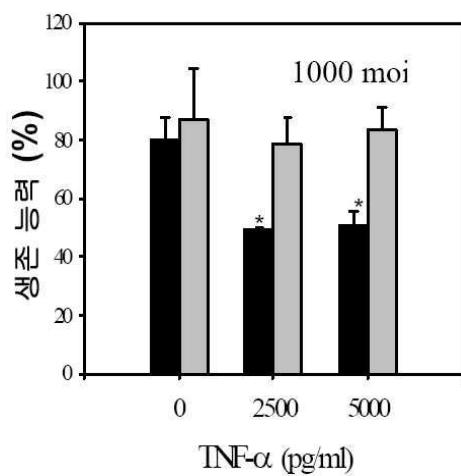
도면86d



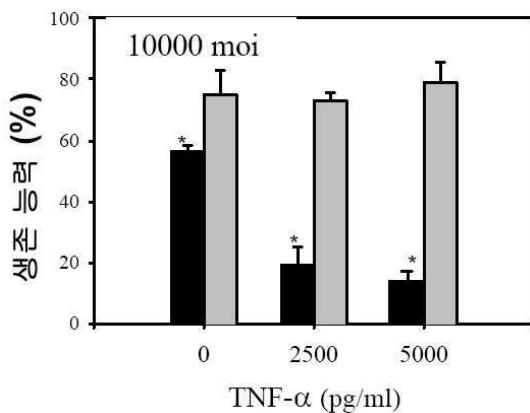
도면87a



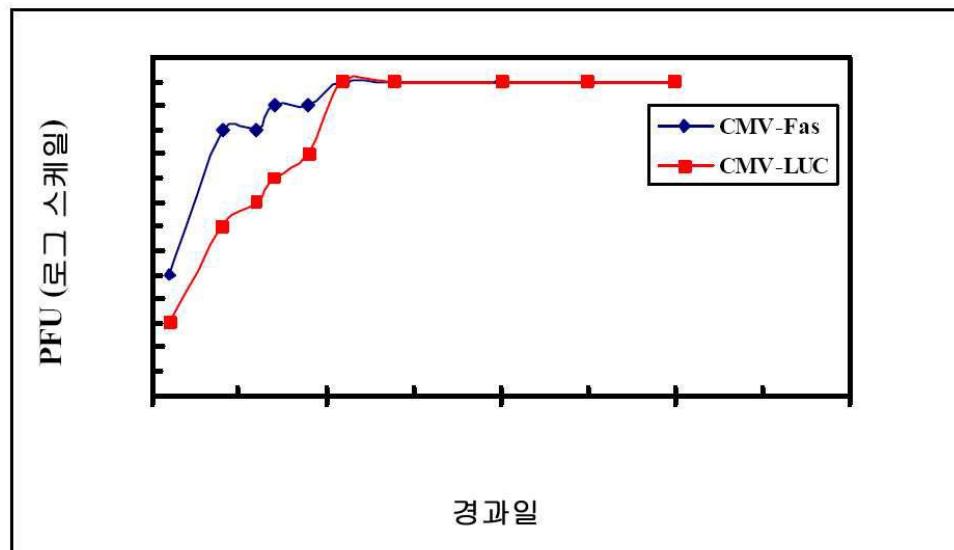
도면87b



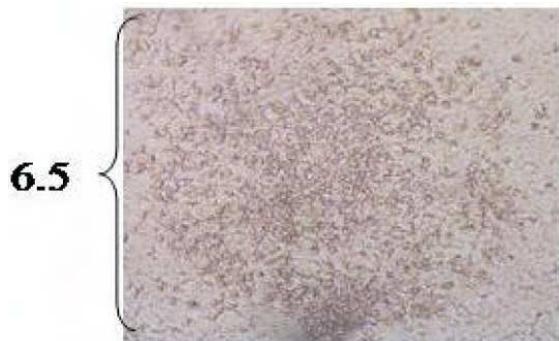
도면87c



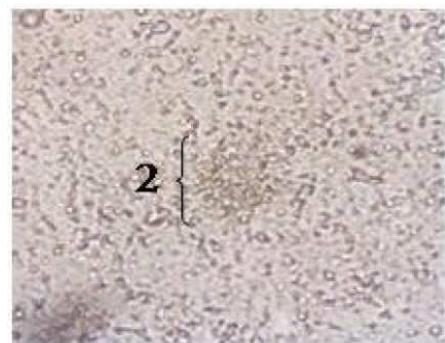
도면88



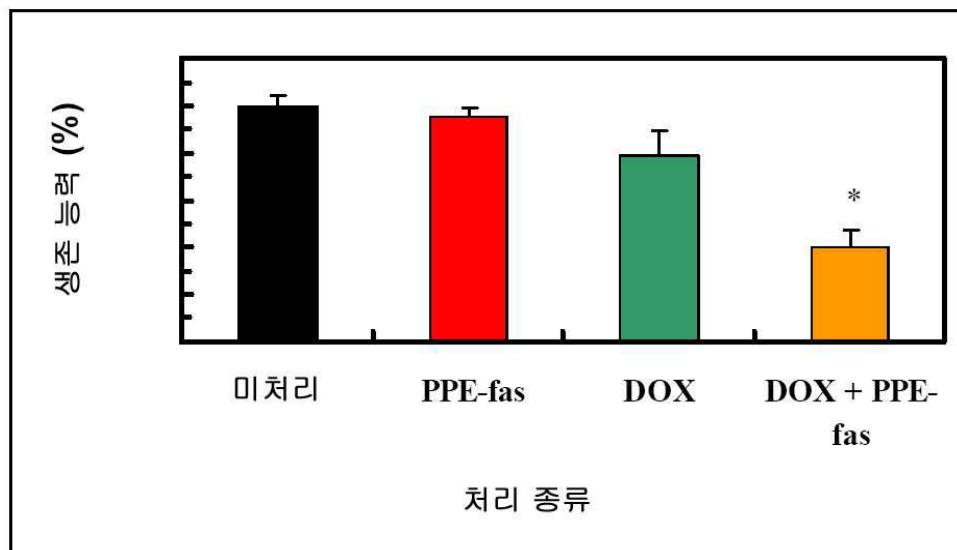
도면89a



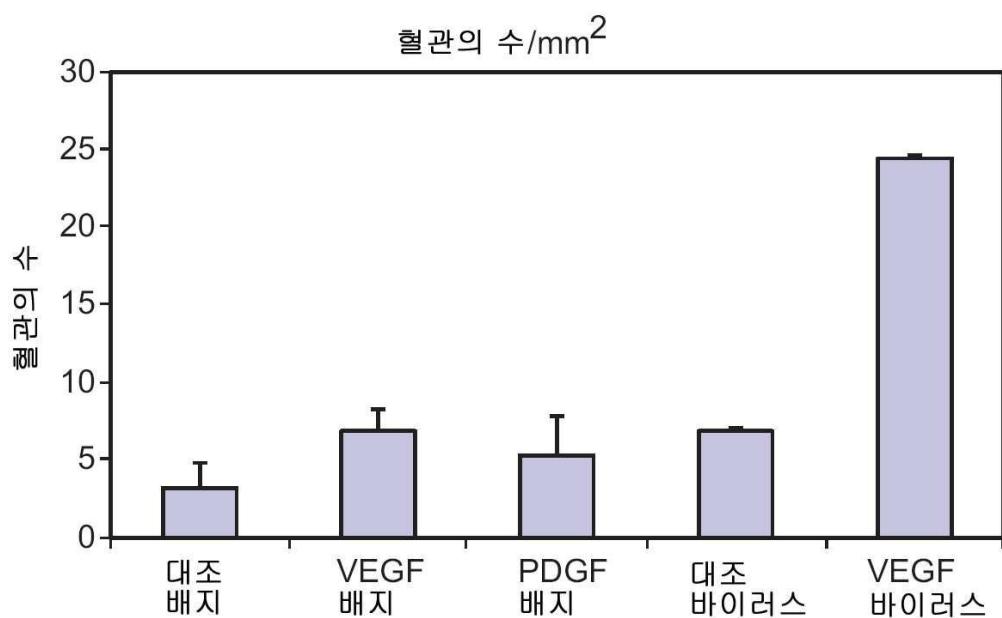
도면89b



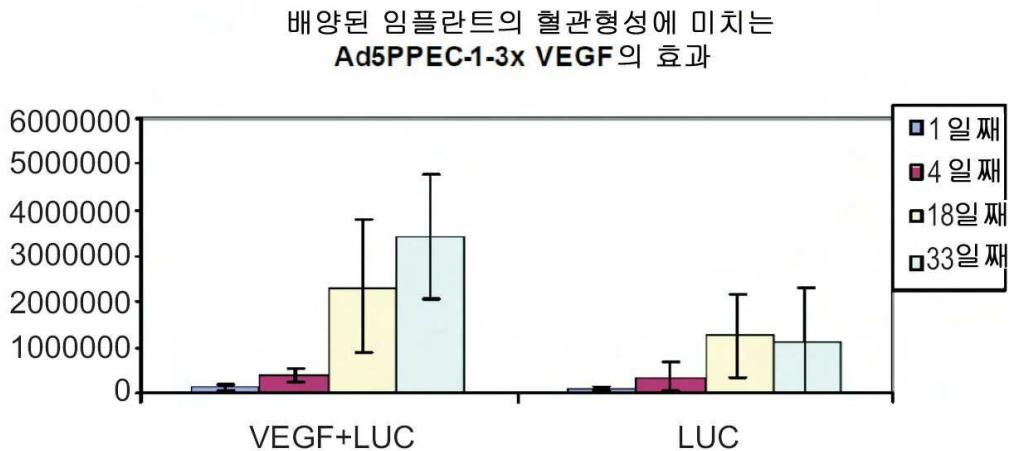
도면90



도면91a



도면91b



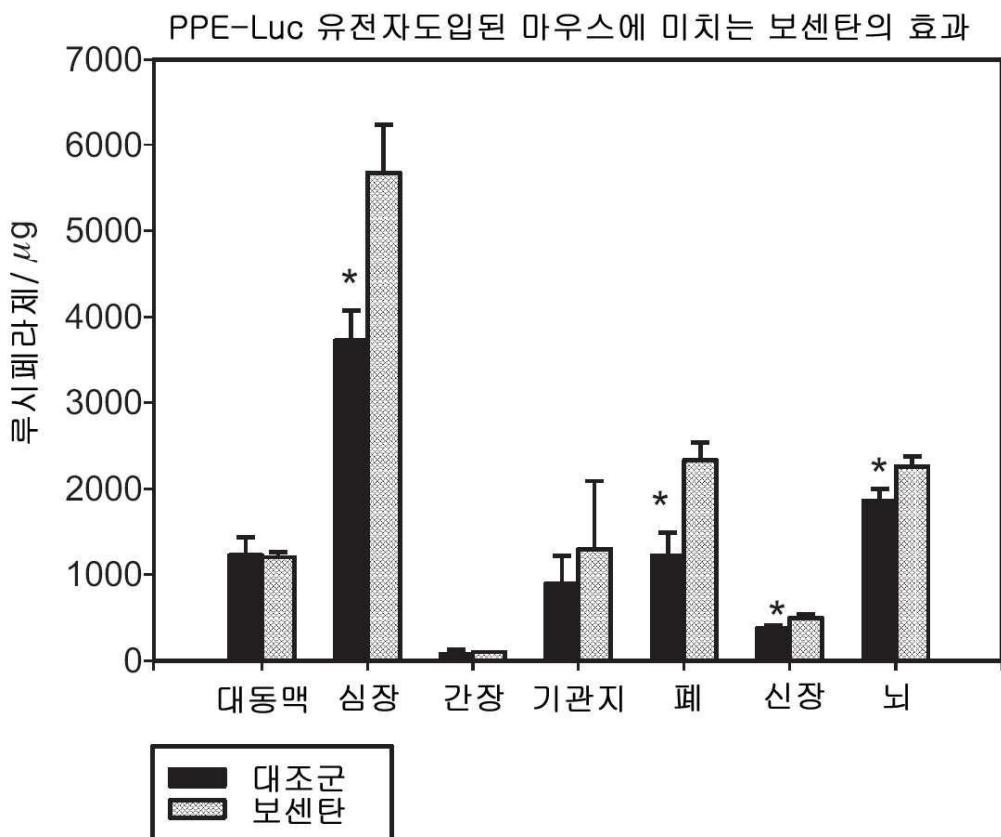
도면92

gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgttagtgc cttctgatcg gcgatactag ggagataagg
atgtacccca caaaaaccaca ttgtgtgt tatcattatt atttagttt ctttccttgc taactcttgc cggaaatctt
ctcacccca atgcgaagta cttagttt gaaaagactt ggtggaaagggt gtgggtgtgg aaaagttaggg tggatcttcca
aactaatctt gttccccccc cggcccaacta gctgggattc aagagcgaag agtggggatc gtcccttgtt tgatccaga
agacataaaaa gggaaaatcaa gtgaacaatg atcagccccca cttccaccccc accccccctgc ggcgcacaaa
tacaatcttat ttaatt *gtacttccatctttcatccaaatggggtgacttgccttgcgt* aaactcttgc attcttgcac
tctggggctg *gcagctagca* aaaagggaaag cgggctgtc ctctctgcag gttctgcagc ggtctctgc
tagtgggtgtt ttcttttc tttagcccttc ccctggatgt tcagacggcg gggctgtccttgc tctgaagttt ggcgtattt
cctcttagagc cgggtctat *cttgcgtgc acgtgcgt* tgggtacta *atcacaat* aacattgtttt agggtctggaa
taaagtccaga gctgtttacc cccactctat aggggttcaa *tataaaaagg* cggggagaa ctgtccagttt cagacgcgtt
cttgcaccccg cgctgagagc ctgaccgggt ctgtccctgt gtccttgcgc gtcgtccccc ggcgtccccc gacgttttgc
ccccagtttggaa agggccactt gctgaggacc ggcgtgagat cttaaaaaaa aacaaaaaaac aaaaaacaaaa
aaaacccaga ggcgtatcaga ggcgaccagac accgtcttgc ttgagtttcca ttgcacccg agttttttt
ttttcccttt tccccactt tctgaccctt ttgcagaatg gatttttc cctgtatcctt ctctctgcgtt ttcgtactt
tccaaggagc tccagaaca ggtggccgc acttgcgtt cttctactt cagcgcagca gttatcgctt ctgttttcca
cttttcctt tttttttttt ttcatctttt ctttttttattt ttttttttta attactgaag ctccagcgcg aagtgcctta caattaattt
acttctgtgtt gaagcgaag aaataaaaaacc cctgttttggaa tacagctgac tacaaccggat ttttttttttgcatcatc ctcc-1334

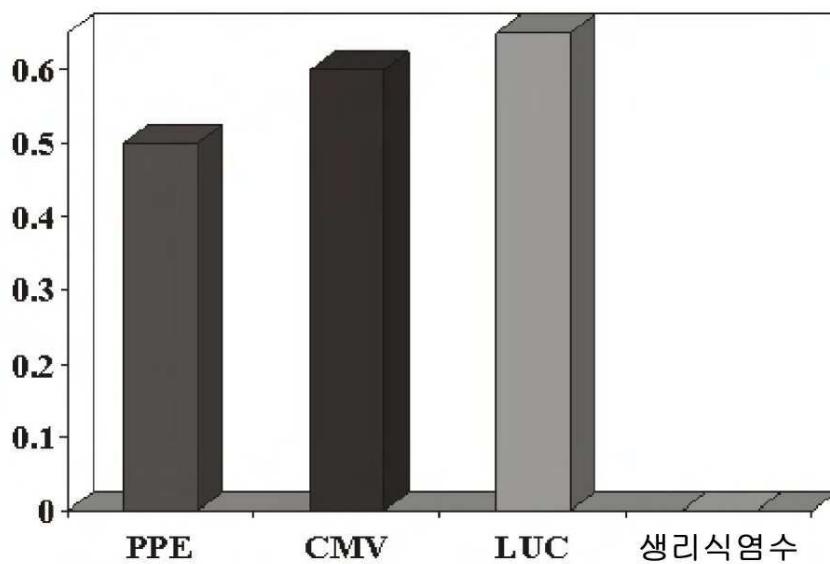
도면93

5'- **gtacttcatactttcattccaatggggtgactttgcttctggag** ggtgactttgcttctggag cca
gtacttcatactttcatt **gtacttcatactttcattccaatggggtgactttgcttctggag** gcttagctgccag
-3'

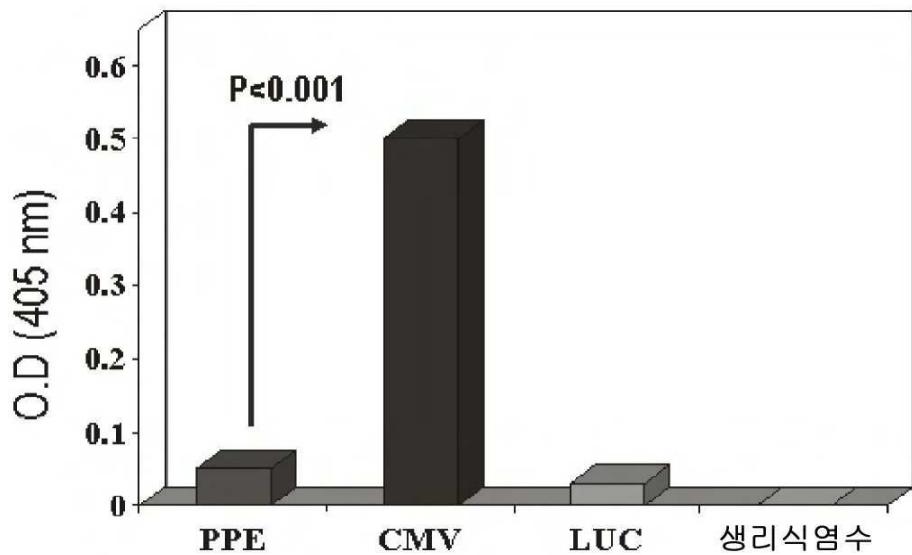
도면94



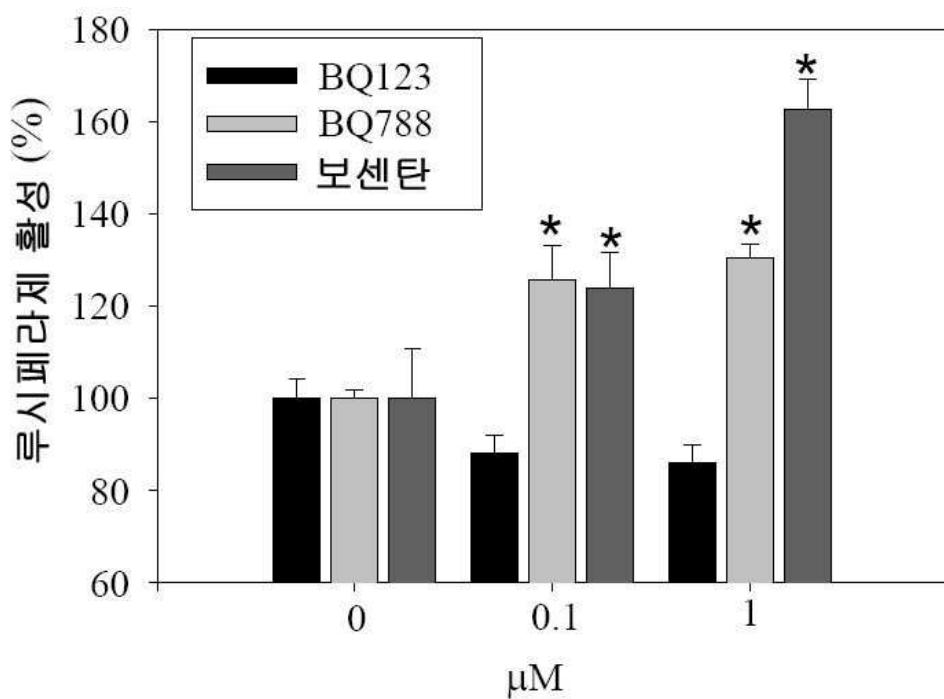
도면95a



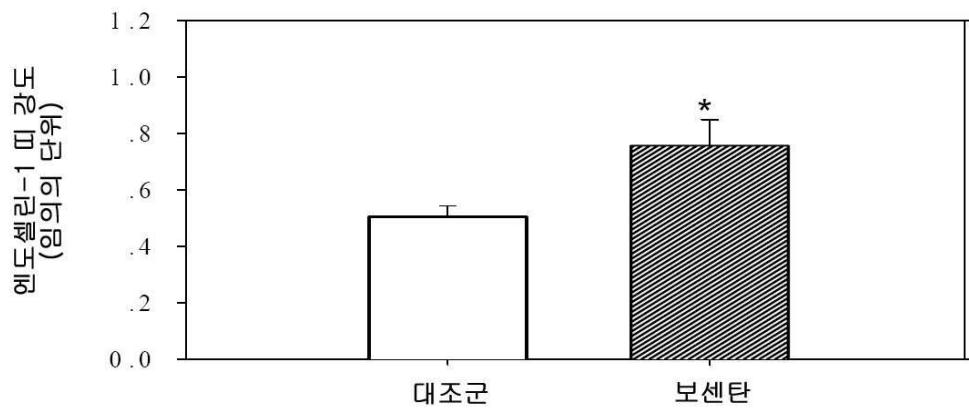
도면95b



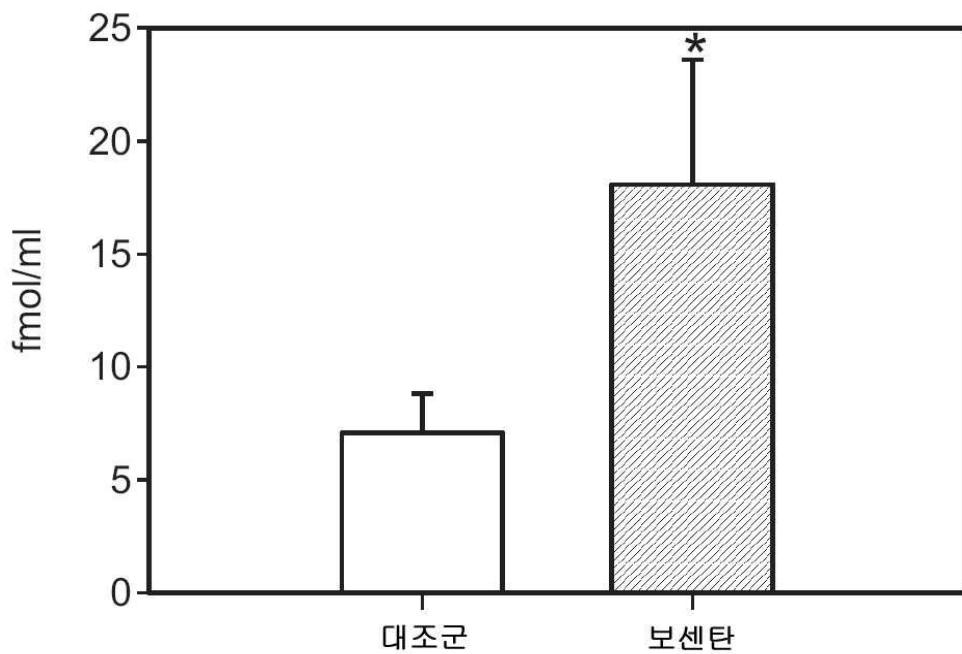
도면96



도면97a

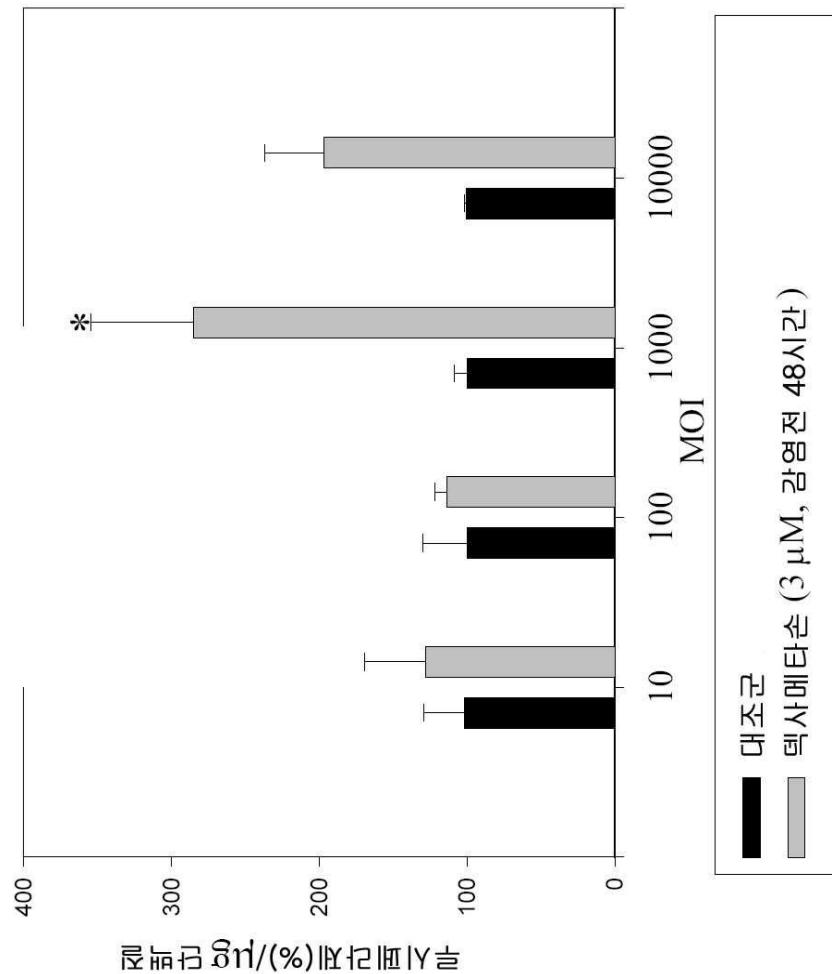


도면97b



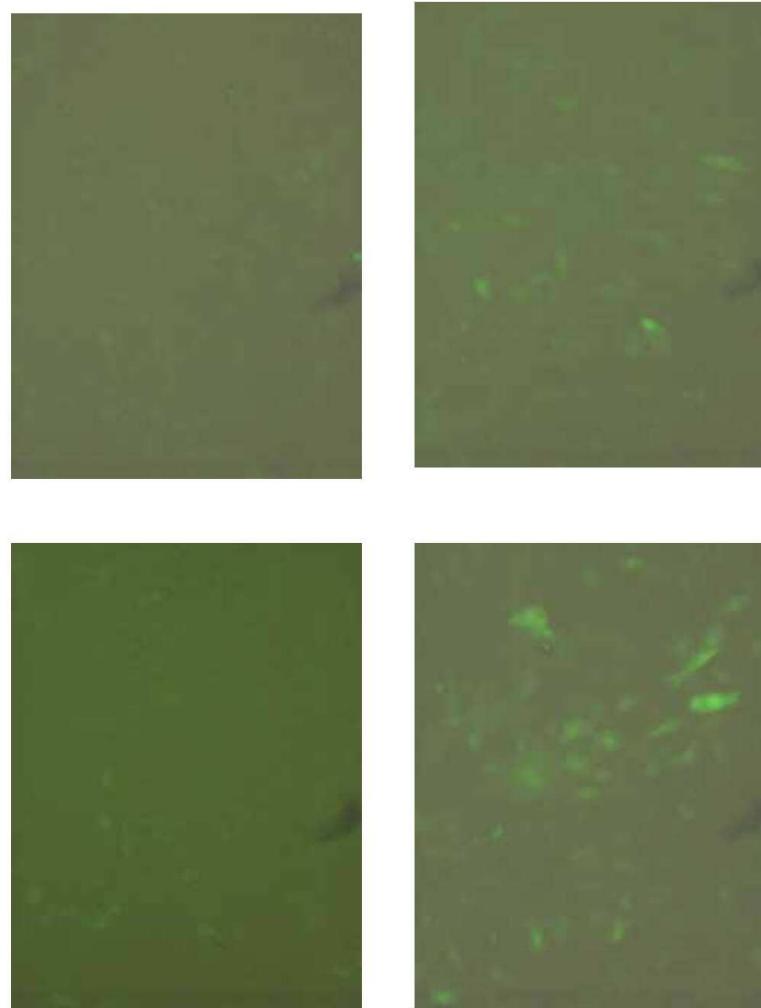
도면98

BAEC - AdCMV-LUC, 감염후 2일 결과



도면99

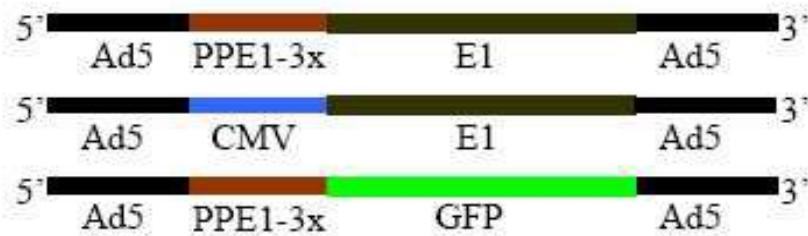
AdPPE-GFP (100 MOI)



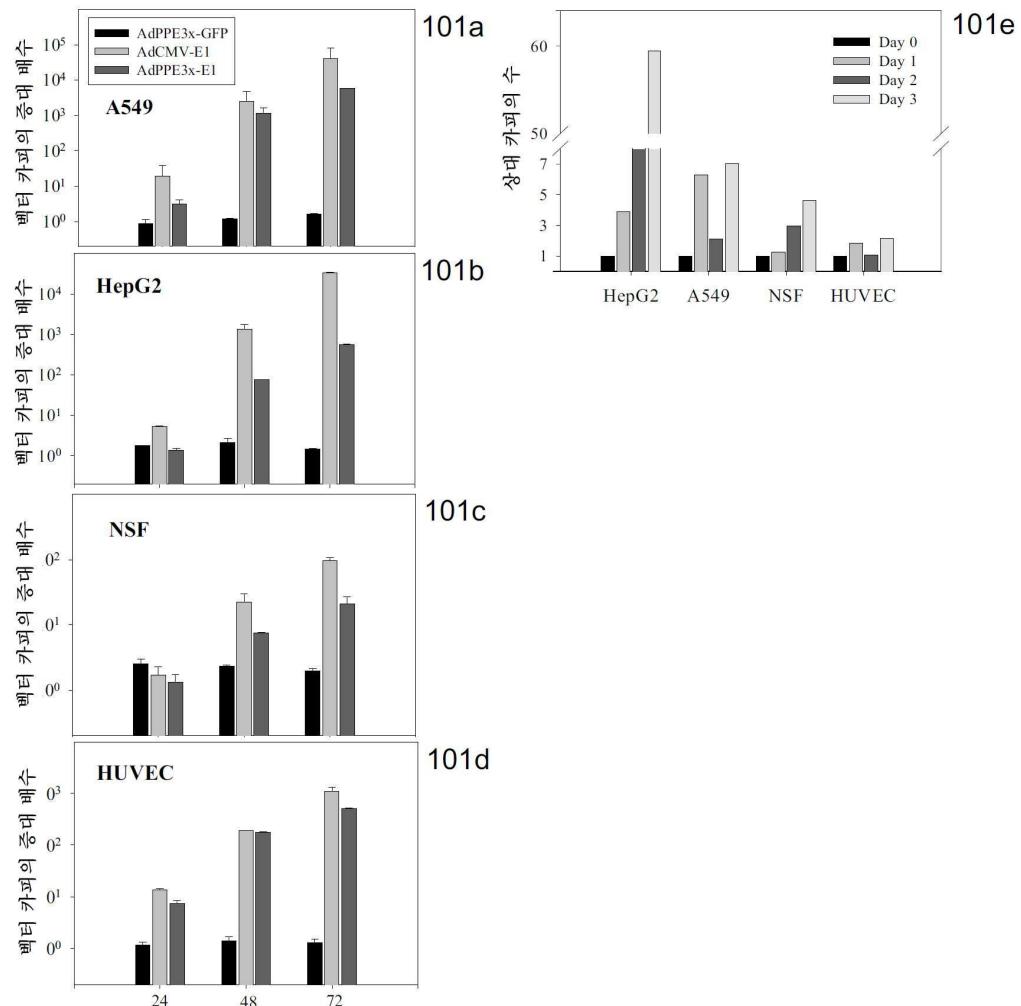
미침리

Dex 3 μ M

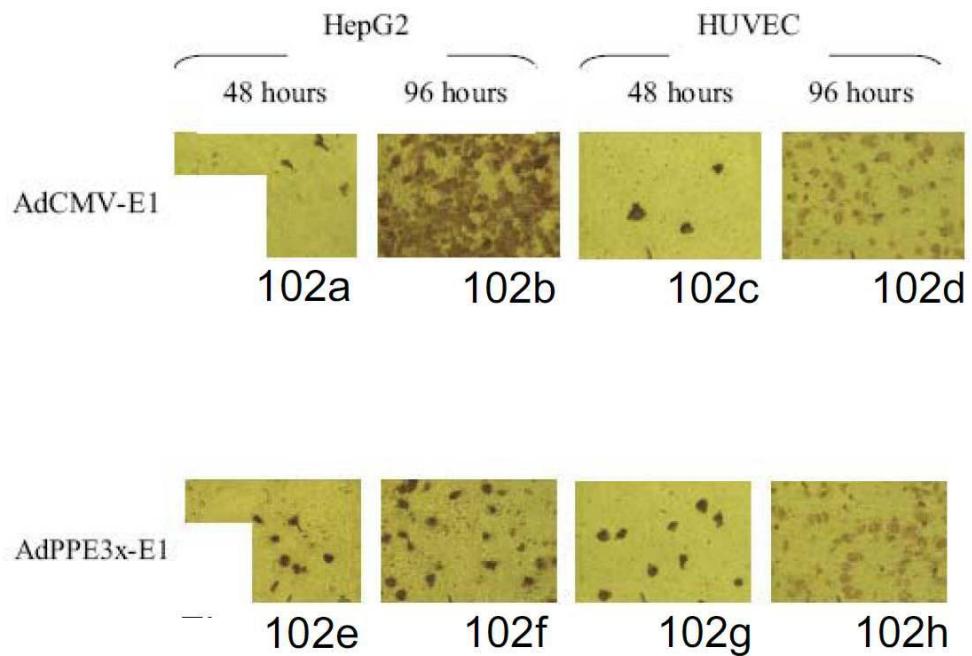
도면100



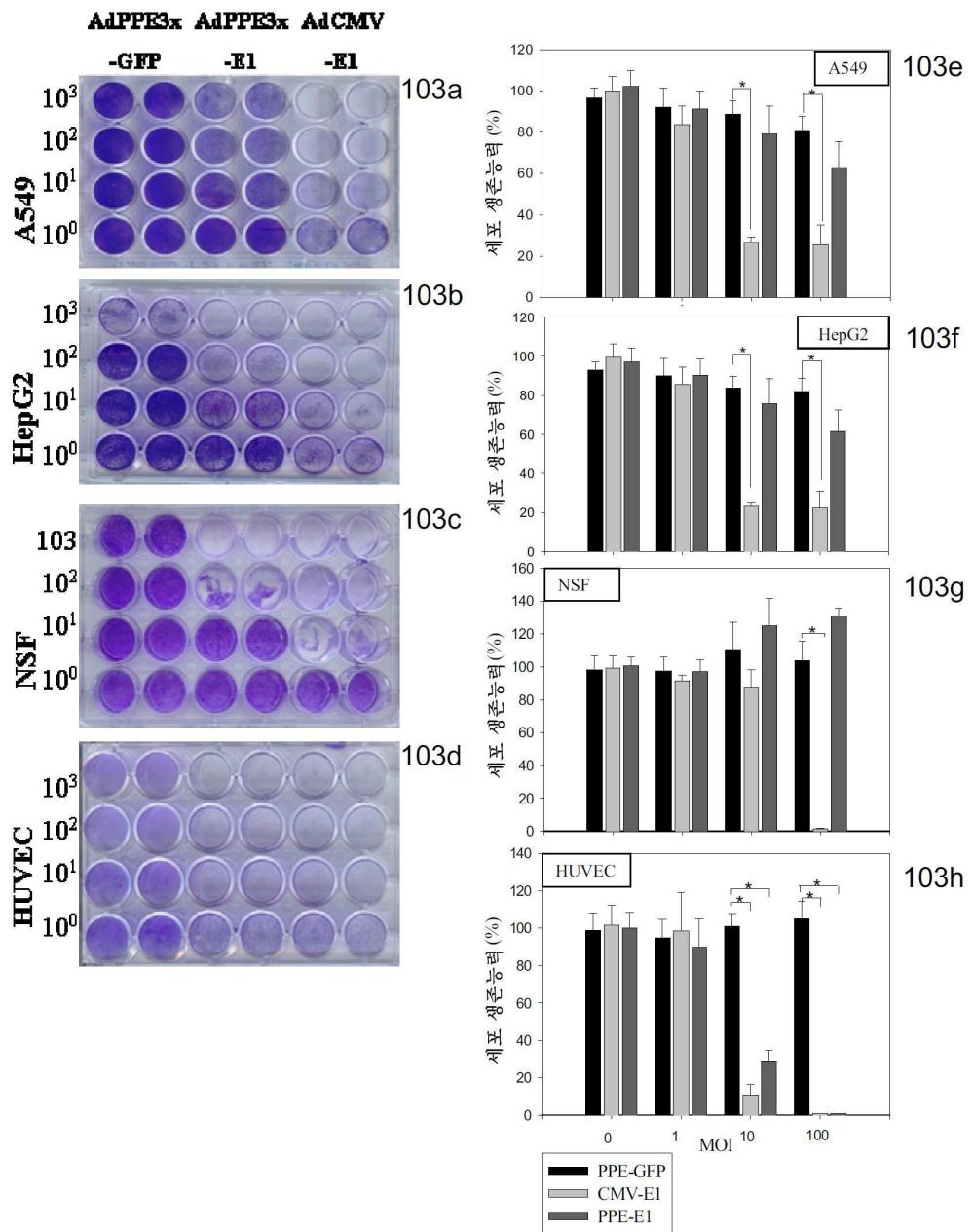
도면101



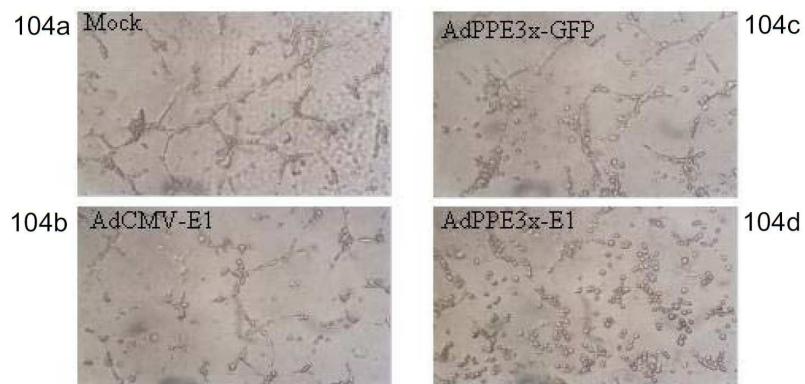
도면102



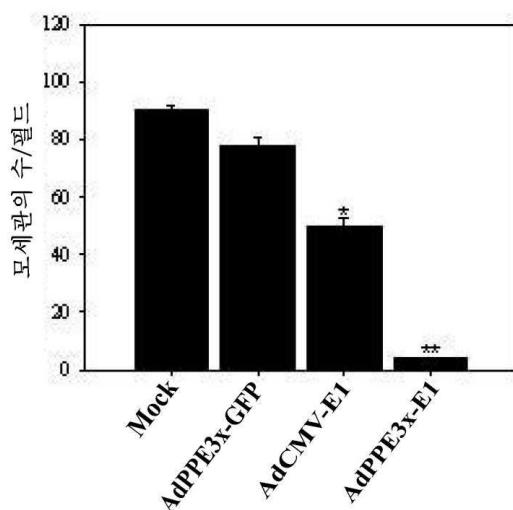
도면103



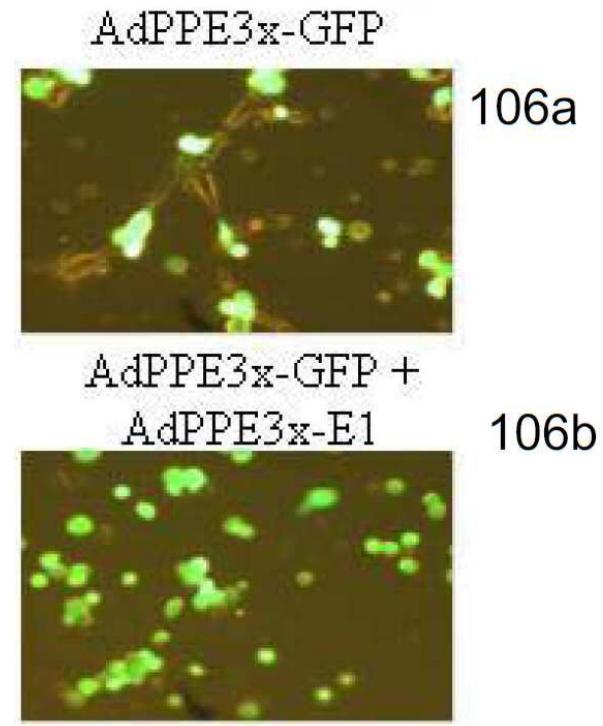
도면104



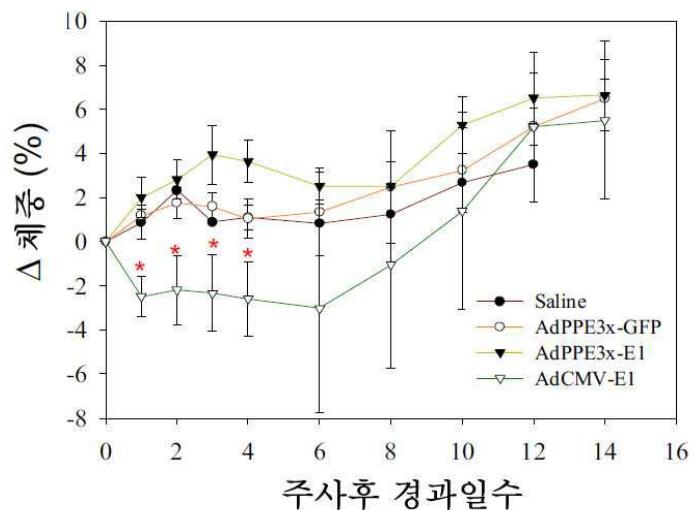
도면105



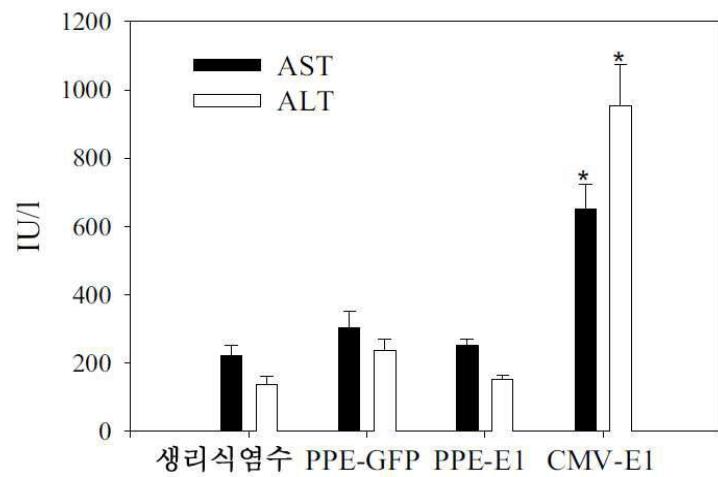
도면106



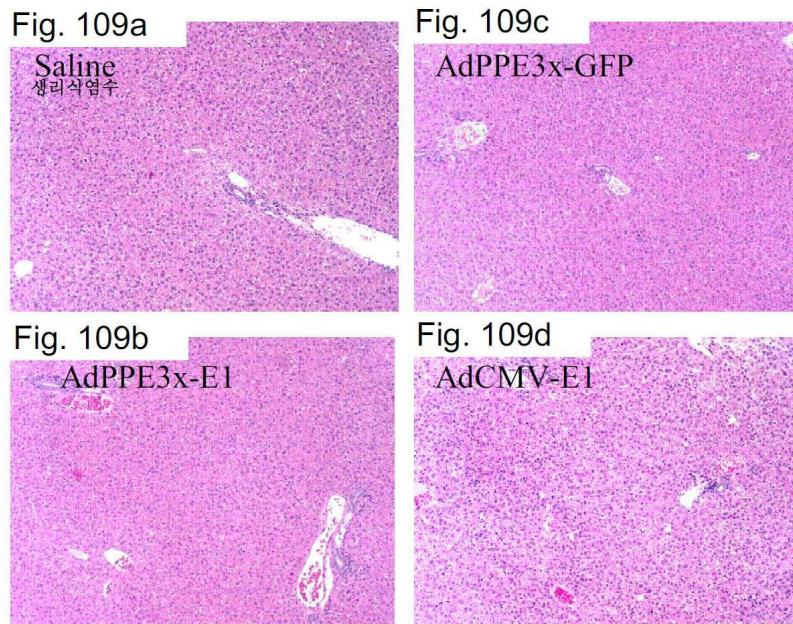
도면107



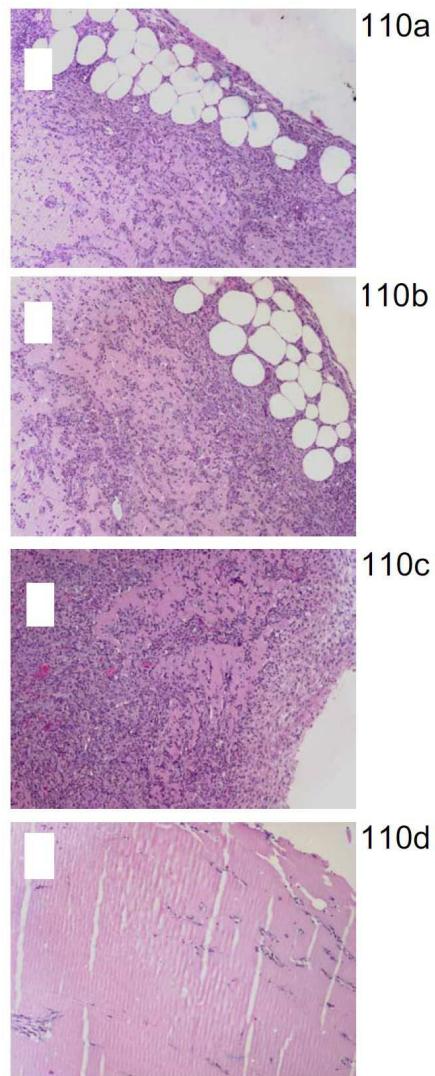
도면108



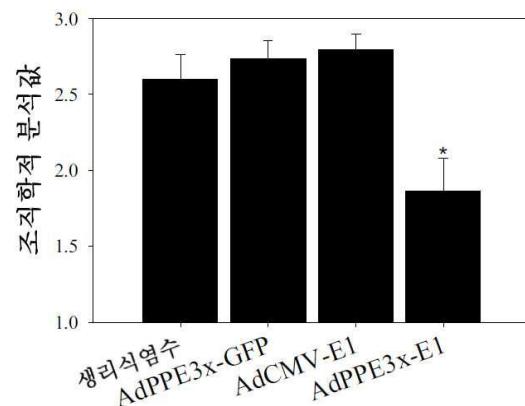
도면109



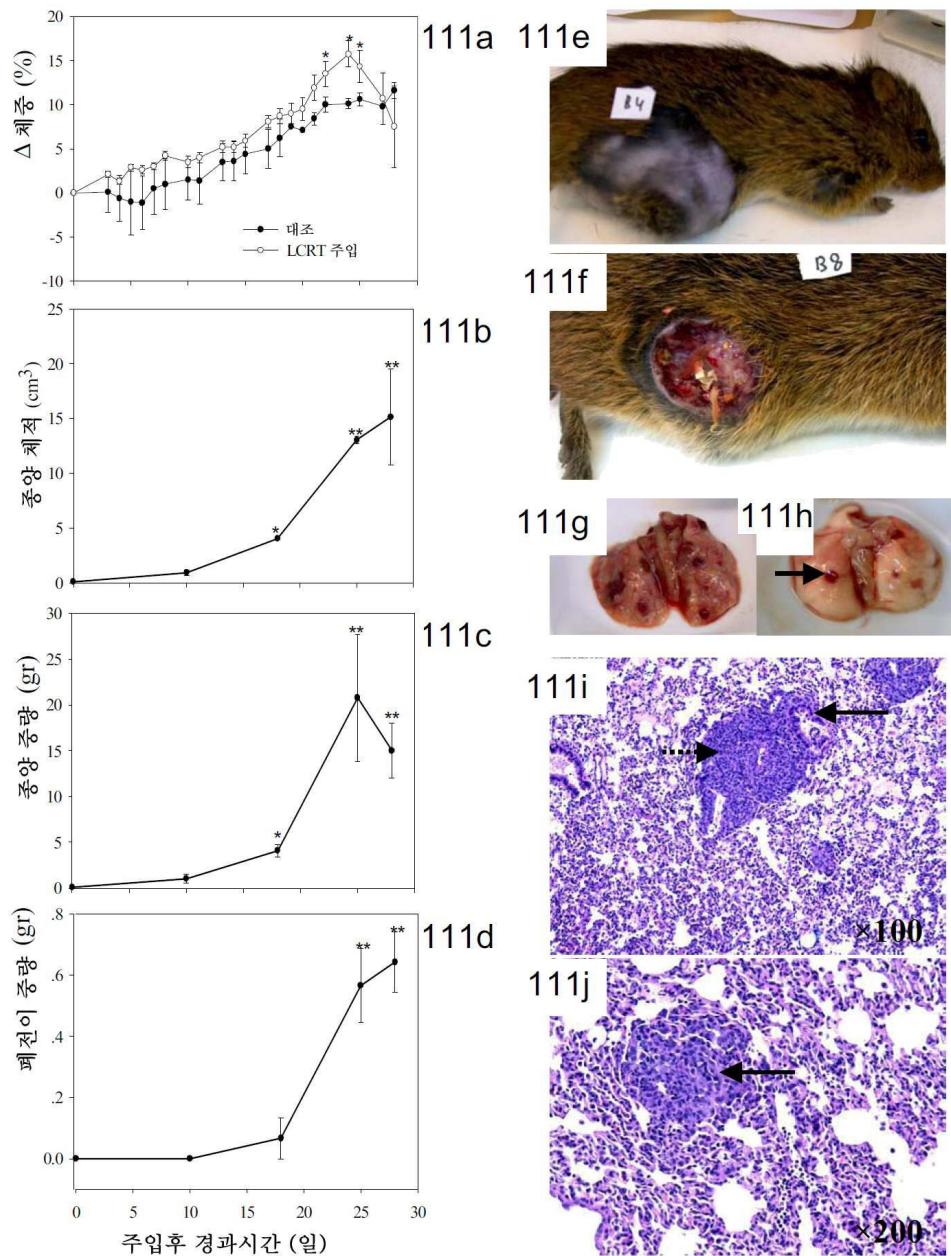
도면110



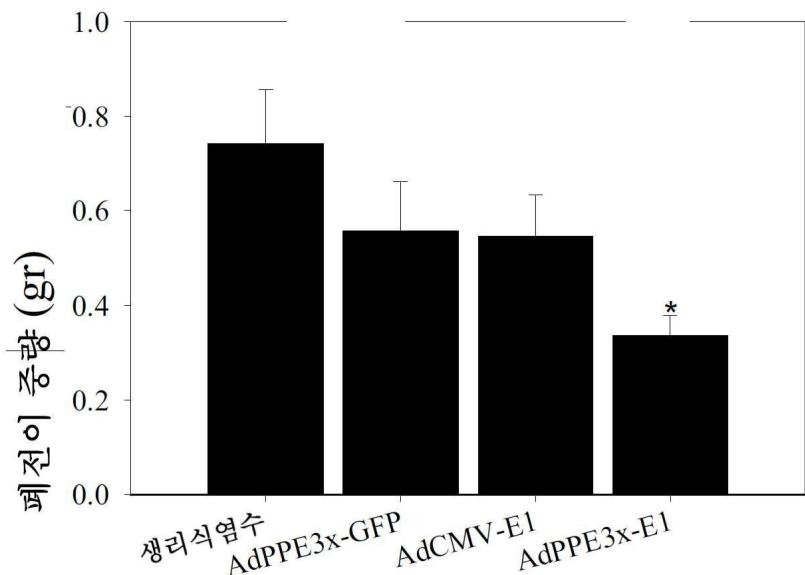
도면110e



도면111



도면112



도면113

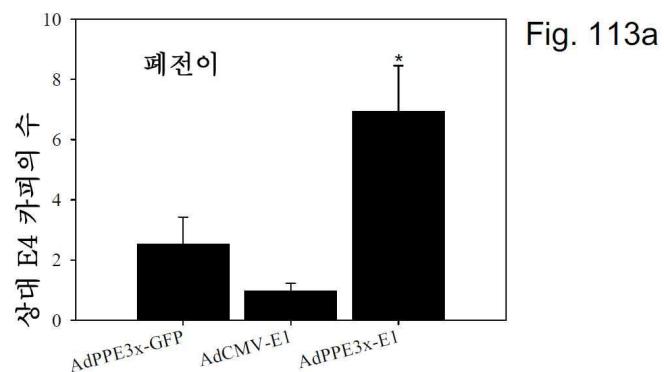


Fig. 113a

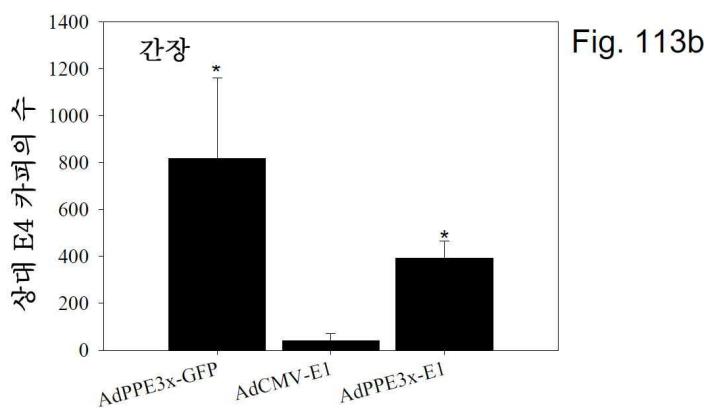


Fig. 113b

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> VASCULAR BIOGENICS LTD.
 Harats, Dror
 Greenberger, Shoshana
 BREITBART Eyal
 BANGIO Livnat

<120> PROMOTERS EXHIBITING ENDOTHELIAL CELL SPECIFICITY AND METHODS OF
 USING SAME FOR REGULATION OF ANGIOGENESIS

<130> 43177

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 1334
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 1	
gtgtgtgt gtgtgtgt gtgtgtgt gtgtgtgt gtgtgtgt gtgtgtgt	60
cttctgatcg	
gcgatactag ggagataagg atgtacctga caaaaccaca ttgttgtgt tatcattatt	120
attttagttt ctttccttgc taactcctga cggaatctt ctcaccaa atgcgaagta	180
cttttagttt gaaaagactt ggtggaaagg gtgggtgtgg aaaagttaggg ttagttcca	240
aactaatctg gttcccccgc cggcccgatgt gctgggattc aagagcgaag agtgggatc	300
gtccccctgt ttgatcagaa agacataaaa ggaaaatcaa gtgaacaatg atcagccccca	360
cctccacccc accccctgc gcgccgacaa tacaatctat ttaattgtac ttcatacttt	420
tcatatccaaat ggggtgactt tgcttcgtt gaaactctt attttgaac tctggggctg	480
gcagcttagca aaagggaaag cgggctgctg ctctctgcag gttctgcagc ggtctctgtc	540
tagtgggtgt tttcttttc ttagccctgc ccctggattt tcagacggcg ggcgtctgcc	600

tctgaagtta gccgtgattt cctctagagg cggtcttat ctctggctgc acgttgccgt	660
tgggtgacta atcacacaat aacattgttt agggctggaa taaagtcaaga gctgtttacc	720
cccactctat aggggttcaa tataaaaagg cggcggagaa ctgtccgagt cagacgcgtt	780
cctgcaccgg cgctgagagc ctgaccgggt ctgctccgt gtccttgcgc gctgcctccc	840
ggctgccccgc gacgcattcg ccccagtggaa agggccactt gctgaggacc gcgcgtgagat	900
cta aaaaaaaaaaaaaa aacaaaaaaaaac aaaaaacaaaaaaa aaaacccaga ggcgatcaga gcgaccagac	960
accgtccctc tcgtttigca tttagtcca ttgcacccg agtttcttt ttccctttt	1020
tccccactct tctgacccct ttgcagaatg gattatttc ccgtgatctt ctctctgctg	1080
ttcgtgactt tccaaggagc tccagaaaca ggtaggcgcc acttgcata ttctactt	1140
cagcgcagca gttatcgctt ctgtttcca cttttttc ttctttctt ttcatcttt	1200
ccttttattt tattttttta attactgaag ctccagcagc aagtgcctta caattaatta	1260
acttctgtgt gaagcgaaag aaataaaacc cctgtttgaa tacagctgac tacaaccgag	1320
tatcgcatag cttc	1334

<210> 2
<211> 96
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 2	
gctagcgtac ttcatcttt tcattccat ggggtgactt tgcttctgga gggtgacttt	60
gcttctggag ccaatggta ctcatcttt ttcat	96

<210> 3
<211> 96
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 3
gctagcctcc agaagcaaag tcacccatt ggaataaaa gtatgaagta caatgaaaag 60

tatgaagtac ccattggctc cagaagcaaa gt cacc 96

<210> 4
<211> 6
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Nhe-1 restriction site

<400> 4
gctagc 6

<210> 5
<211> 6
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<223> Hypoxia responsive element - E-box

<400> 5
gcacgt 6

<210> 6
<211> 44
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Murine endothelial specific enhancer elemet

<400> 6
 gtacttcata ctttcattc caatgggtg acttgcttc tgga 44

<210> 7
 <211> 143
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> A triplicate copy of a murine enhancer sequence originated from
 the PPE-1 promoter

<400> 7
 gtacttcata ctttcattc caatgggtg acttgcttc tgagggtga ctggcttct 60

ggagccagta cttcatactt ttcattgtac ttcatacttt tcattcaat ggggtgactt 120

tgcttctgga ggcttagctgc cag 143

<210> 8
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> EDC fragment

<400> 8
 ctggagggtg acttgcttc tgaggccagt attcatact tttcatt 47

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 9
ctttgattc ttgaactctg 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 10
taaggcatgc ccattgttat 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 11
gcagggctaa gaaaaagaaa 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 12
tttcttttc ttagccctgc 20

<210> 13
<211> 1334
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 13

gtgtgtgt gtgtgtgt gtgtgtgt gtgtgtgt gtgtgtgtatctgtacg	60
gcgatactag ggagataagg atgtacctga caaaaccaca ttgttgttgc tatcattatt	120
atttatgttt ctttccttc taactcctga cgaaatctt ctacaccaa atgcgaagta	180
cttagttt gaaaagactt ggtggagggttgg aaaagttaggg tggatccat	240
aactaatctg gttcccccc cgccccagta gctgggattc aagagcgaag agtgggatc	300
gtcccccgtt ttagatcgaa agacataaaa ggaaaatcaa gtgaacaatg atcagccccca	360
cctccacccc accccccctgc gcgcgcacaa tacaatctat ttaattgtac ttcatacttt	420
tcatatccat ggggtgactt tgcttcgga gaaactcttg atttttgaac tctggggctg	480
gcagctagca aaaggggaag cgggctgctg ctctctgcag gttctgcagc ggtctctgtc	540
tagtgggtt ttttttttcc ttagccctgc ccctggatttgc tcagacggcg ggcgtctgcc	600
tctgaagtta gccgtgattt cctctagagc cgggttttat ctctggctgc acgttgctgt	660
tgggtgacta atcacacaat aacattgtttt agggctggaa taaagtcaaa gctgtttacc	720
cccaacttat aggggttcaa tataaaaagg cggcggagaa ctgtccgagt cagacgcgtt	780
cctgcaccgg cgctgagagc ctgaccgggt ctgctccgt gtccttgcgc gtcgcctccc	840
ggctgccccgc gacgctttcg cccagtgaa agggccactt gctgaggacc gcgctgagat	900
ctaaaaaaaaaa aacaaaaaaaaac aaaaaacaaaaa aaaacccaga ggcgtatcaga gcgaccagac	960
accgtcctct tcgttttgc tttagtttca ttgtcaaccg agtttctttt ttttcctttt	1020
tccccactct tctgaccctt ttgcagaatg gattatttc ccgtgtatctt ctctctgt	1080
ttcgtgactt tccaaggaggc tccagaaaca ggttaggcgcc acttgcgtat ctttctactt	1140
cagcgcagca gttatcgctt ctgttttca ctttctttc tttttttctt ttcattttt	1200

ccttttatt tattttta attactgaag ctccagcagc aagtgccta caattaatta	1260
acttctgtgt gaagcgaaag aaataaaacc cctgttgaa tacagctgac tacaaccgag	1320
tatcgcatag cttc	1334
<210> 14	
<211> 1799	
<212> DNA	
<213> human herpesvirus 1	
<400> 14	
cagctgttc atccccgtgg cccgttgctc gcgttgctg gcggtgtccc cggaagaaat	60
atatttgcatt gtcttagtt ctatgatgac acaaaccgg cccagcgct tgcattggc	120
gaattcgaac acgcagatgc agtcggggcg gcgcggtccg aggtccactt cgcatattaa	180
ggtgacgcgt gtggcctcga acaccgagcg accctgcagc gacccgctta acagcgtaa	240
cagcgtgccg cagatcttgg tggcgtgaaa ctcggcacc tcttcggcca ggcgttgta	300
gaagcgcgta tggcttcgta cccggccat caacacgcgt ctgcgttcga ccaggctgca	360
cgttctcgcg gccatagcaa ccgacgtacg gcgttgccgc ctgcggcga gcaagaagcc	420
acggaagtcc gcccggagca gaaaatgcc acgtactgc gggttatata agacggtccc	480
cacgggatgg gaaaaaccac caccacgcaa ctgctgggtgg ccctgggttc gcgcgacgat	540
atcgctctacg tacccgagcc gatgacttac tggcgggtgc tggggcttc cgagacaatc	600
gcaaacatct acaccacaca acaccgcctc gaccagggtg agatatcggc cggggacgcg	660
gcgggtggtaa tgacaagcgc ccagataaca atggcatgc cttatgcgt gaccgacgcc	720
gttctggctc ctcataatcg gggggaggct gggagctcac atgccccgcc cccggccctc	780

accctcatct tcgaccgcca tcccatcgcc gccctcctgt gctaccggc cgcgcggtac	840
cttatggca gcatgacccc ccagggcgtg ctggcggtcg tggccatcg cccggcacc	900
ttgcccgca ccaacatcgt gcttggggcc ctccggagg acagacacat cgaccgcgt	960
gccaaacgcc agcgccccgg cgagcggctg gacctggcta tgctggctgc gattggccgc	1020
gttacggc tacttgccaa tacggtgccgg tatctgcagt gcggcggtc gtggcgagg	1080
gactgggac agcttcggg gacggccgtg cggcccgagg gtggcgagcc ccagagcaac	1140
cgggcccac gacccatat cggggacacg ttatttaccc tgttcggc ccccgagt	1200
ctggcccca acggcgacct gtataacgt tttgcgtgg ccttggacgt ctggccaa	1260
cgccctccgtt ccatgcacgt cttaatcctg gattacgacc aatggccgc cggtggccgg	1320
gacgcccctgc tgcaacttac ctccggatg gtccagaccc acgtcaccac cccggctcc	1380
ataccgacga tatgcgacct ggccgcacg ttggccggg agatggggga ggctaactga	1440
aacacggaaag gagacaatac cggaaaggAAC ccgcgtatg acggcaataa aaagacagaa	1500
taaaacgcac gggtgttggg tcgtttgttc ataaacgcgg ggttcggtcc cagggtggc	1560
actctgtcga taccggaccc agacccatt gggccaata cggccgtt tttctttt	1620
ccccacccca cccccaagt tcgggtgaag gcccaggct cgcagccaac gtcggggcgg	1680
caggccctgc catagccact ggcccggtgg gtttagggacg ggtcccccata tgggaatgg	1740
tttatggttc gtgggggtta ttatggggcggtgg ggtctgggtgg acgacccag	1799

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> A portion of an endothelial transcription element

<400> 15

ggtgactttg cttctggag

19

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> A portion of an endothelial transcription element

<400> 16

gtacttcata cttttcatt

19