



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 15/34 (2006.01)

A61K 36/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0060721

(43) 공개일자 2007년06월13일

(21) 출원번호 10-2005-0120677

(22) 출원일자 2005년12월09일

심사청구일자 2005년12월09일

(71) 출원인 경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 수원캠퍼스내

(72) 발명자 김윤희
서울 강남구 대치동 청실아파트 6-606
정인실
서울 마포구 상암동 월드컵아파트 105-904

(74) 대리인 특허법인 씨엔에스·로고스

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 히레글린 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 재조합 아데노바이러스 및 이를포함하는 신경세포 분화 및 재생용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 HRG(히레글린) 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드(EGF-like domain peptide)를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 재조합 아데노바이러스 및 이를 포함하는 신경세포 분화 및 재생용 약학 조성물에 관한 것으로, HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드 또는 이의 유사체를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 결손 재조합 아데노바이러스 및 상기 재조합 아데노바이러스를 포함하는 신경세포의 이동 및 분화, 신경돌기 성장촉진, 재생 또는 신경손상, 신경질환의 치료용 약학 조성물이 제공된다.

본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스는 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 분비하여 신경간세포의 생존 및 분화를 촉진시킴으로써 신경돌기 성장 촉진작용 및 신경세포의 재생작용이 있다. 따라서 본 발명의 재조합 아데노바이러스 및 이를 포함하는 조성물은 다양한 종류의 퇴행성 신경질환 또는 신경손상 질환의 치료에 효과가 있으며, 특히 치매, 파킨슨 병, 알츠하이머병, 간질, 중풍, 말초신경 손상 등의 예방 및 치료, 그리고 유전자치료법을 이용한 치료에 매우 유용하다.

대표도

도 13

특허청구의 범위

청구항 1.

HRG(히레쿨린) 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드(EGF-like domain peptide) 또는 이의 유사체를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 결손 재조합 아데노바이러스.

청구항 2.

제 1항에 있어서, DNA 서열은 서열목록 1의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 3.

제 1항에 있어서, HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드는 서열목록 4의 아미노산서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 유사체는 GGF(glial growth factor), NDF(Neu differentiation factor), ARIA(Acetylcholin receptor inducing activity), 및 SMDF(sensory and motor neuron derived factor)로 구성된 그룹으로부터 선택된 다른 타입의 펩트 또는 인간 HRG 알파/베타의 EGF-성 도메인 펩타이드인 것을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 유사체는 이를 암호화하는 DNA 서열이 서열목록 1의 염기서열과 90%이상의 상동성을 가지며 신경간세포의 이동 및 분화를 촉진시킬 수 있는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 6.

제 1항에 있어서, DNA 서열이 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 암호화하는 서열과 함께 분비 지시 펩타이드(signal peptide)를 암호화하는 DNA 서열을 더욱 포함함을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 7.

제 6항에 있어서, 상기 분비 지시 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열은 서열목록 2의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 8.

제 1항에 있어서, 상기 DNA 서열을 발현시킬 수 있는 바이러스 프로모터를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 9.

제 8항에 있어서, 바이러스 프로모터는 CMV 프로모터인 것을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 10.

제 1항에 있어서, 표적 세포내에서의 복제를 위해 필요로 하는 게놈의 일부가 결핍된 것을 특징으로 하며, 상기 결핍된 일부는 E1, E3, E4, 및 L1-L5 유전자로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 아데노바이러스,

청구항 11.

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 결손 재조합 아데노바이러스를 포함하는 신경세포의 이동 및 분화, 신경돌기 성장촉진, 재생 또는 신경손상, 신경질환의 치료용 약학 조성물.

청구항 12.

제 11항 있어서, 상기 신경세포가 신경줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13.

제 11항에 있어서, 상기 신경손상, 신경질환이 뇌손상, 뇌질환, 말초신경손상, 근위축성 측색 경화증, 또는 말초신경질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14.

제 13항에 있어서, 상기 뇌손상 또는 뇌질환이 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅톤병, 간질, 중풍, 뇌졸중, 허혈성 뇌질환, 또는 퇴행성 뇌질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15.

제 11항에 있어서, 상기 조성물은 주사가 가능한 형태임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16.

제 11항에 있어서, 상기 결손 재조합 아데노바이러스를 10^6 내지 10^{13} pfu/ml로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 히레글린(HRG) 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드 및 분비지시펩타이드를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 재조합 아데노바이러스에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 재조합 아데노바이러스를 포함하는 신경세포의 분화 및 재생용 약학 조성물에 관한 것이다.

포유동물의 뇌는 신경줄기세포(neuronal stem cell)의 분열과 분화 및 생존과 사멸, 시냅스 형성 등 일련의 과정을 거쳐 체계적인 신경회로망(neural network)을 발생함으로써 복잡한 기능을 수행할 수 있게 된다. 성체시기에도 동물의 뇌신경

세포에서는 신경성장에 필요한 많은 물질을 생산하여 축색돌기(axon)과 수상돌기(dendrite)가 성장하게 되고 새로운 학습과 기억을 할 때마다 시냅스 연결과 신경회로망을 끊임없이 재구성(synaptic remodeling)하므로 분화가 계속된다고 할 수 있다. 신경세포는 세포분화하고 시냅스를 형성하는 과정에서 신경성장인자와 같은 표적유래 생존인자(target-derived survival factor)를 받지 못하면 세포사멸하며 스트레스와 세포독성물질(cytotoxic agent)에 의한 세포사멸은 퇴행성뇌질환의 주요원인이 된다. 동물의 말초신경계는 손상되었을 때는 중추신경계와 달리 축색이 오랜 시간에 걸쳐 재생한다. 신경상해 부위의 뒤쪽 축색은 월러변성(Wallerian degeneration)으로 알려진 과정에 의해 퇴화되고 신경의 세포체는 축색의 성장(axonal regrowth)을 다시 시작하며 슈반세포는 분열한 후 생존과 사멸에 의해 표적신경을 결정하고 다시 분화하는 등, 발생과정을 다시 거쳐 재생하게 된다.

신경재생물질로 가장 가능성이 큰 후보물질은 신경성장인자(neurotrophic factor)이다. 1940 년대에 Hamburger와 Levi-Montalcini들이 Chick embryo limb의 분화과정에서 운동신경세포 생존에 결정적인 물질로 NGF(nerve growth factor)를 발견하였고, 그 후에 뇌에 존재하는 BDNF(brain-derived neurotrophic factor), NT-3(neurotrophic factor-3) 등의 뉴로트로핀(neurotrophin)들이 발견되었다. 아울러 일부 형질전환 동물실험으로 분화된 신경세포 집단의 생존에 필수적인 신경성장인자들의 종류도 밝혀져 있다. 최근에는 이외에도 싸이토카인을 비롯한 여러 종류의 물질이 신경세포의 생존에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 신경성장인자들은 중추신경계와 말초신경계에서 신경간세포의 분열개시, 분열한 세포의 수를 사멸과정으로 조절하는 동시에 분화를 시작하도록 하며, 표적유래성장인자로서 정향 이동된 세포의 생존과 잘못된 방향으로 이동된 세포의 사멸을 유도하여 전시냅스 신경세포의 생존을 조절하는 한편 새로운 시냅스 형성과 재구성을 조절한다. 또한 성체의 신경 생존과 시냅스 가소성 및 신경손상 시 재생하는 과정에서도 유사한 기능을 가질 것으로 추측된다.

신경계에 존재하는 신경성장인자들은 일반적으로 세포막 수용체를 활성화하여 신호전달을 조절하며 신경세포의 반응을 나타낸다. 신경성장인자중 뉴레굴린(neuregulin)은 구조적으로 연관된 유전자과를 이루고 있고 얼터너티브 스플라이싱에 의해 30여개의 다른 형태로 발현된다(Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system (1993) *Nature* 362, 312-318; Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies (2003) *Exp. Cell Res.* 284, 14-30). 뉴레굴린은 타입 I, 타입 II, 타입 III의 세 가지 종류로 크게 나누며 이 중 타입 I 뉴레굴린은 NDF (Neu differentiation factor), 히레굴린(Heregulin; HRG), ARIA(Acetylcholin receptor inducing activity)등으로 불린다(이하 타입 I 뉴레굴린은 히레굴린으로 통칭한다). 타입 II 뉴레굴린은 GGF(glial growth factor)로 불리고 신경계 발달 후기에 주로 발현하며 타입 III 뉴레굴린은 SMDF(sensory and motor neuron derived factor), CRD(Cytein rich domain) 뉴레굴린으로 불린다. 타입 I 뉴레굴린인 히레굴린은 수용체 티로신 키나제인(receptor tyrosine kinase:RTK) ErbB3와 ErbB4와 반응하여 신호전달을 조절하며 중요한 세포질내 신호단백질들의 인산화를 조절하여 신경세포의 반응을 나타낸다. 또 다른 수용체인 ErbB2는 히레굴린이 ErbB3와 ErbB4와 결합한 후에 반응한다(Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during wallerian regeneration (1997) *J. Neurosci.* 17, 1642-1659). 모든 뉴레굴린에는 EGF(epidermal growth factor)-성 도메인이 있으며 이 부분으로만 ErbB 단백질과 결합하여 세포반응을 나타낼 수 있다. 히레굴린은 EGF-성 도메인 옆에 있는 α 와 β 형 도메인에 의해 HRG α 와 β 로 나뉘며 β 는 뉴우런 세포, α 는 비뉴우런 세포에서 발견된다. 히레굴린은 중추 신경계와 말초신경계에서 슈반세포와 신경교세포의 사멸과 증식, 신경세포의 생존과 이동과 분화, 축색 성장 등을 유도한다(Role of neuregulins in glial cell development (2000) *Glia* 29, 104-111; GDNF family ligands activate multiple events during axonal growth in mature sensory neurons (2004) *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 453-459)

신경성장인자를 신경질환 치료에 이용하는 방법으로는 줄기세포에 직접 처리하여 이식할 수도 있으나 유전자 전달 벡터로 바이러스를 이용하여 치료 유전자를 전달하는 유전자 치료를 이용할 수 있다. 본 발명에 사용된 재조합 아데노바이러스(recombinant adenovirus)는 E1B 부위가 삭제된 복제결손 바이러스 매개체(replication defective viral vector)로써 최근 실용적 질환에 치료 유전자의 주입으로서 질환부위에 대한 치료 효과를 거두기 위해 연구되고 있다(Viral vectors for modulating expression in neurons (1996) *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 576-583; Adenovirus vectors for gene delivery (1999) *Curr. Opin. Biotech.* 10, 440-447). 아데노바이러스의 장점은 분열하는 세포에만 감염되는 레트로바이러스(retrovirus)와는 달리 신경이나 근육 세포와 같이 최종적으로 분화한 다양한 종류의 세포에도 감염이 가능하다는 것이다(Gene delivery into the brain using virus vector(1993)*Nature genetics* 3, 187-189; Gene therapy for cerebral vascular disease(1997), *Stroke* 27, 534-539). 그리고 다른 바이러스 매개체에 비해 세포독성이 낮아 안전하며 높은 농도로 정제될 수 있다. 또한 8kb의 비교적 큰 수용능력을 지녔으며 생산하기도 쉽다는 장점을 가지고 있다. 또한 레트로바이러스와 달리 삽입 돌연변이(insertional mutagenesis)가 발생할 위험이 낮다.

이미 보고된 다른 논문에서 아데노바이러스는 폐의 상피세포와 피부, 근육으로의 E. coli β -galactosidase 유전자의 발현 유도시 높은 정도로 발현이 된다는 것을 확인하였다(Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver (1992), *Nature genetics* 1, 372-378 ; Diversity of airway epithelial cell target for in vivo

recombinant adenovirus-mediated gene transfer (1993) *J. Clin. Invest.* 91, 225-234 ; Intraperitoneal in vivo gene transfer in the skin using replication-deficient recombinant adenovirus vector(1994) *J. Invest. Dermatol.* 102, 415-421 ; Immunology of gene therapy with adenoviral vectors in mouse skeletal muscle(1996) *Hum. Mol.* 5 1703-1712). 우리는 재조합 LacZ 아데노바이러스가 HiB5 신경줄기세포에 잘 감염되며 쥐의 신경계에 잘 감염되고 6주 이상 발현되는 양상을 보고한 바 있다(Effective gene transfer into regenerating sciatic nerves by adenoviral vectors: potentials for gene therapy of peripheral nerve injury (2000) *Mol. cells.* 10, 540-545). 따라서 본 발명에서 제작된 재조합 아데노바이러스 HRGβE-Ad는 줄기세포에 감염하고 이식하거나 퇴행성뇌질환의 재생에 직접 사용할 수 있다.

최근에는 성체에도 신경줄기세포가 있다는 것이 확인되고 있으며 줄기세포가 성체의 뇌에서 발생 분화하는 과정은 바로 재생과정이라 할 수 있다 (Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system(1999), *Cell* 96, 25-34). 신경줄기세포는 주로 측뇌실(lateral ventricle)과 맞닿는 줄무늬체(striatum)의 부뇌실 구역(subventricular zone)에서 발견되고 또한 해마(hippocampus)의 치상회에 있는 부뇌실 구역에서 줄기세포들이 분열하여 과립세포로 되며 이 세포들이 분화하여 기능을 가질 수 있다(Functional neurogenesis in the adult hippocampus(2002) *Nature* 415, 1031-1034). 따라서 신경줄기세포의 발생과 분화를 증진하면 신경재생을 촉진할 수 있다. 본 발명에서 이용한 해마원시신경세포주는 pyramid 신경세포가 처음분열을 시작하는 E16에 일차세포배양한 후 ts-SV40 T 항원을 레트로바이러스 감염시켜 클론되었다(Region-specific differentiation of hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain (1991) *Cell* 66, 713-729). 따라서 퍼미시브 온도(33℃)에서는 계속 분열하고, 네퍼미시브 온도인 쥐의 체온(39℃)에서는 분열을 멈추고 분화운명을 들어서면서 많은 세포들이 사멸한다. HiB5 세포주는 유전자치료를 위해 세포이식을 목적으로 만들어 졌으며 성체의 뇌에 이식하면 이동하여 그 주변의 환경에 따라 피라미드 신경세포 또는 신경교세포등으로 분화한다. 즉, 주변에서 오는 신경성장인자등에 의해 운명이 결정되는 것으로 보인다. 흰쥐의 해마에서 신경발생이 시작되는 E16 배아를 일차 배양하면 거의 모든 세포들이 네스틴(nestin)을 발현하고 무혈청배지에서도 상당한 세포 분열을 하며 3-7일 후에 신경과 신경교세포로 분화하므로 이 시기는 원시신경세포가 운명을 결정하는 시기라 할 수 있다. 따라서 HiB5와 같은 신경세포주는 세포 분열, 과 세포분화의 기작을 연구하고 유전자조작을 통한 세포치료제로의 기능을 연구하기에 좋은 시스템이다.

현재의 고령화 사회에서 선진국의 경우 85세 이상의 노인에서 50%가 노인성 치매에 걸리므로 이와 같은 퇴행성 뇌질환의 의료 비용은 천문학적 수치를 기록하여 사회적인 부담이 되고 있다. 또한 현대 산업사회에서 매년 발생하는 척추 신경 장애자만도 미국이 25만 명, 영국이 5만 명으로 이 중 60%는 교통사고에 의해, 30%는 운동 등과 같은 레저 활동 중에 일어난다. 한국에서도 평균수명이 급속도로 증가하고 있고 여가 시간의 증대로 각종 레저 활동 등에 의한 척추신경 및 말초신경손상을 가져오는 사고 발생 빈도가 증가하고 있다. 더욱이 당뇨에 의한 말초신경상해가 증가하는 추세이다. 인간의 경우 중추신경계는 물론 말초신경계도 재생이 어려워 퇴행성 뇌질환 뿐만 아니라 산업재해 및 교통사고, 전쟁불구자 등이 누적되면서 사회문제화 되고 있으므로 신경재생의 촉진제 개발은 2000년대의 산업사회에서 시급히 요구되는 사안이다.

유전자치료법은 인간을 대상으로 1990년 처음 임상시험이 시작된 이래 2002년까지 약 600여건의 임상시험이 3500명의 환자를 대상으로 진행 중이다. 2003년 인간 유전체서열 분석의 완료를 계기로 다양한 유전자 발굴에 따른 새로운 유전자 치료법의 개발은 가속화 될 것이다. 그러나 지금까지 승인된 유전자치료법 중 75%가 암이나 낭포성 섬유증 등의 단일유전 질환의 치료를 목표로 하고 있고 신경질환이나 신경재생을 위한 유전자치료제의 개발은 활발하지 않다 (미국 NIH 재조합 DNA 자문보고서(2002); Gene therapy clinical trials (2002) *J Gene Med.* www. wiley.co.uk/genmed). 그러나 이미 파킨슨씨병의 치료, 감각신경의 재생등에 NT-3, GDNF(glial derived neuronal factor)등의 신경성장인자를 이용한 유전자치료법의 개발이 시도되고 있다 (GDNF family ligands activate multiple events during axonal growth in mature sensory neurons (2004) *Mol. cell. Neurosci.* 25, 4453-4459). 신경 계통의 질환은 뇌기능 연구에 대한 신경과학의 전반적인 연구가 아직 부진한 상태이므로 각종 만성 신경계 질환의 치료 약제개발 또한 난관에 처해 있다. 특히 신경줄기세포의 사용은 이제까지와는 전혀 다른 관점에서 질환을 원인적으로 치료하는 의료계의 혁명적인 새로운 치료법으로 신경줄기세포의 이식 부위에 적합한 신경세포 종류로의 분화의 증진을 도모할 수 있다. 또한 신경세포의 분화와 재생을 촉진하는 유전자치료제의 직접 주입은 이러한 치료를 현실화하고 대중화할 수 있을 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 분비하는 재조합 아데노바이러스를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 아데노바이러스를 포함하는 신경세포의 분화, 성장촉진 및 재생용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성

본 발명은 HRG 베타1의 EGF-성 도메인만을 생성하여 세포외로 분비하는 재조합 아데노바이러스 및 이를 포함하는 신경 세포의 분화, 성장촉진 및 재생용 약학 조성물에 관한 것으로, 본 발명은 신경계의 물리적 손상 및 퇴행성 신경질환, 허혈성 뇌신경 손상, 말초신경 손상에 대한 치료제, 그리고 신경줄기세포 및 유전자 치료제로 매우 유용하게 이용될 수 있다.

이하 본 발명에 대해 보다 상세히 설명한다.

본 발명의 재조합 아데노바이러스는 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드가 분비되도록 고안되었으며, 그 구조는 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드 또는 이의 유사체를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

기존의 재조합 HRG- α 또는 β 의 EGF-성 펩타이드는 주로 ErbB2 단백질이 과발현되는 암세포로 특정 물질을 표적하기 위하여 사용되거나 특정물질과 융합시킨 HRG β -1 EGF-도메인 펩타이드를 박테리아에서 발현시킨 후 정제하여 사용하였다(Heregulin(HRG)-induced mitogenic signaling and cytotoxic activity of a HRG/PE40 ligand toxin in human breast cancer cells (1995) *Cancer Grow. Differ.* 6, 1567-1577; Recombinant Heregulin-Pseudomonas Exotoxin fusion proteins: Interaction with heregulin receptors and antitumor activity in vivo (1998) *Clin. Cancer Res.* 4, 993-1004; In vitro and in vivo behavior of NDF-expanded mpnkey Schwann cells (1998) *Eur. J. Neurosci.* 10, 291-300; Novel gene delivery to human breast cancer cells by targeted Ad5 penton proteins (2001), *Gene Ther.* 8, 1753-1761) 또한 상용의 HRG β -1 EGF-성 도메인 펩타이드는 재조합 단백질로 박테리아에서 발현 후 정제하여 단순히 세포에 처리하거나 단백질 상태로 주사할 수 있는 형태이다 (Amgen사, 미국 캘리포니아, NDG $_{\beta 177-228}$; NeoMarker 사, 미국 캘리포니아, NRG-1 β). 기존의 시도와 비교하여 본 발명에서는 재조합 아데노바이러스가 HRG- β 1의 EGF-성 도메인 펩타이드만을 합성하여 세포 외로 분비하도록 고안함으로써 생체 내로의 주입을 보다 용이하게 하였고 바이러스에 의해 그 지속효과도 향상되었으며 바이러스에 감염된 신경 세포뿐 아니라 주변의 신경 세포의 분화와 재생을 촉진하며 축색의 성장을 유도할 수 있는 것을 확인하였다. 이는 HRG β E-Ad를 줄기세포에 투여하여 치료부위에 이식하면 적절한 신경 세포로의 분화를 유도하고 주변세포의 분화와 재생을 촉진할 것으로 생각 된다. 또한 좌골 신경 손상모델을 통한 실험을 통하여 HRG- β 1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 분비하는 재조합 아데노바이러스를 투여한 군에서 축색의 성장이 촉진되었으며 손상 후 지속적으로 신경검사와 행동검사에서 대조군에 비해 향상된 성적을 나타내어 바이러스에 의한 신경재생 촉진효과를 증명하였다. 따라서 본 발명에서 고안한 HRG β E-Ad는 손상된 신경부위에 직접 주입하여 유전자치료제로도 사용할 수 있으며 이에 더하여 줄기세포에 감염하여 세포치료제로도 사용할 수 있으므로 그 용도가 다양하다.

본 발명의 재조합 아데노바이러스에 포함되는 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드 또는 이의 유사체를 암호화하는 DNA 서열은 서열목록 1의 염기서열을 갖는다. 또한, 상기 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드는 바람직하게 서열목록 4의 아미노산 서열을 포함한다.

HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드의 유사체는 신경간세포의 이동 및 분화를 촉진시킬 수 있는 활성을 보유하는 생성물을 암호화하고, 변형에 의해 얻어지는 임의 서열을 의미하는 것으로 이해된다. 변형은 유전적 및/또는 화학적 성질의 임의 돌연변이, 치환, 결손, 첨가 또는 변형을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 이들 변형은 당업자에게 공지된 기술에 의한 결과물일 수 있다. 본 발명의 의미내의 유사체는 또한 프로브로서 천연 서열 또는 이의 단편을 사용하여 핵산 라이브러리로부터 혼성화에 의해 얻어질 수 있다. 본 명세서에 사용된 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드의 유사체는 예를 들어, GGF(glial growth factor), NDF(Neu differentiation factor), ARIA(Acetylcholin receptor inducing activity), 및 SMDF(sensory and motor neuron derived factor)와 같은 다른 타입의 랫트 또는 인간 HRG 알파/베타의 EGF-성 도메인 펩타이드를 포함하며, 이러한 유사체를 암호화하는 DNA 서열은 서열목록 1의 염기서열과 90%이상의 상동성을 가지며 신경간세포의 이동 및 분화를 촉진시킬 수 있는 활성을 갖는 것을 포함한다.

또한, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 상기 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열과 함께 분비 지시 펩타이드(signal peptide)(서열목록 5)를 암호화하는 DNA 서열을 더욱 포함할 수 있으며, 이때 상기 분비 지시 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열은 서열목록 2의 염기서열을 갖는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 상기 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열과 상기 분비 지시 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열이 융합된 염기서열을 갖는다. 이러한 융합된 DNA 서열의 예를 서열목록 3에 나타내었으며, 그 아미노산 서열을 서열목록 6에 나타내었다(중간에 클로닝을 위한 제한효소 자리로 인해 6개의 뉴클레오타이드(2개의 아미노산)가 첨가됨).

또한, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 상기 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열을 발현시킬 수 있는 바이러스 프로모터를 더욱 포함할 수 있으며, 이때 상기 바이러스 프로모터는 CMV 프로모터를 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명에 사용되는 재조합 아데노바이러스는 표적 세포내에서의 복제를 위해 필요로하는 게놈의 일부가 결핍된 것이며, 상기 결핍된 일부는 E1, E3, E4, 및 L1-L5 유전자로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 E1B 유전자가 결핍된 것이다.

본 발명의 HRG-β1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 분비하는 재조합 아데노바이러스 게놈의 구조를 도 2b에 나타내었다.

본 발명에서는 체외(*in vitro*) 배양된 쥐의 신경줄기세포주의 분화모델과 체내(*in vivo*) 실험에서 좌골신경 손상 동물모델을 사용하여 본 발명의 재조합 아데노바이러스의 신경재생효과를 조사하였다. 발명의 재조합 아데노바이러스에 대하여, 흰 쥐의 신경줄기세포(rat neuronal stem cell ; HiB5) 및 신경별교세포종(rat glioma cell ; C6)을 사용하여 세포에 대한 분화 촉진여부, 히레글린-β1의 수용체이며 신경돌기의 성장과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 ErbB 수용체의 발현 및 활성화를 측정하였다. 또한 흰 쥐의 말초 신경 절단 모델을 이용하여 신경 손상에 대한 신경세포의 복구 및 축색의 성장을 측정하고 바이러스를 직접 주입하는 유전자 치료 방법을 통한 신경회복촉진등을 확인하였다.

따라서, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 신경세포의 분화, 성장촉진, 재생 또는 뇌손상, 뇌질환, 말초신경손상, 근위축성 측색 경화증, 또는 말초신경질환과 같은 신경손상, 신경질환의 치료에 유용할 것으로 판단되며, 줄기세포와 유전자 치료를 이용한 신경손상 재생에 유용할 것으로 판단된다. 특히, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅톤병, 간질, 중풍, 뇌졸중, 허혈성 뇌질환, 또는 퇴행성 뇌질환과 같은 뇌손상 또는 뇌질환에 유용할 것으로 판단된다.

본 발명의 재조합 아데노바이러스는 약학 조성물로서 예를들어, 주사가가능한 형태로 제공될 수 있다. 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 등을 포함할 수 있으며,

본 발명의 약학 조성물은 특히 국소적, 경구적, 비경구적, 비내, 정맥내, 근육내, 피하내, 안내, 또는 경피 경로에 의해 투여하기 위해 배합될 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 제약학적 조성물은 특히 환자의 신경 시스템내로 직접 주입하기 위해 주사가가능한 배합물에 제약학적으로 허용가능한 기초첨가제를 함유한다. 이들 주사가가능한 배합물은 특히 경우에 따라 그들에 첨가될 멸균수 또는 생리학적 살린에 의해 주사가가능한 용액이 구성될수 있게 하는 멸균, 등장성 용액, 또는 건조, 특히 동결건조된 조성물일 수 있다.

주입을 위해 사용된 재조합 아데노바이러스의 투여량은 다른 파라미터, 특히 사용된 투여 양식, 관련된 병변, 또한 필요로하는 치료 기간에 따라 조정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스는 배합되고, 10^6 내지 10^{13} pfu/ml를, 바람직하게, 10^8 내지 10^{12} pfu/ml, 보다 바람직하게 2×10^8 내지 6×10^8 pfu/ml로 구성되는 투여량의 형태로 투여된다.

이하 본 발명을 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명하나, 이들 실시예에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

실시예

<일반적인 분자생물학적 기술>

1) 히레글린의 발현 측정을 위한 프라이머

각 타입에 특이한 프라이머를 이용하여 타입 I, II, III 히레글린의 RNA 발현을 조사하였다. 포워드 프라이머는 타입 I의 클리코-도메인 부위 (5'accactgggacaagccatctt3'), 타입 II의 도메인 부위 (5'aacctcaagaaggaggtcag3'), 타입 III의 N-말단 부위(5'tgaagtgggtatttggac3')를 이용하였으며 리버스 프라이머는 모든 히레글린에 공통적으로 있는 EGF-성 도메인 부위(5'gcagcgatcaccagtaaaactc3')에 상응하는 염기서열을 가진 프라이머를 이용하였다. 일정한 양의 RNA를 사용한 것을 측정하기 위하여 5'gattactgctctggctccta3'과 5'cagtaacagtcgcctagaa3'의 서열을 가진 프라이머를 이용하여 β-액틴의 RNA를 증폭하였다.

2) 재조합 아데노바이러스 제조 시스템

pAdenoshuttle (Microbix사, 캐나다)를 HRG-β1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 암호화하는 cDNA를 아데노바이러스에 삽입하기 위한 플라스미드로 사용하였으며 이로부터 복제 결손 재조합 아데노바이러스를 만들기 위하여 Microbix사 (캐나다)의 pJM17 벡터를 사용하였다. 두 가지의 플라스미드를 인간 배아세포주인 293 세포에 코-트랜스펙션하여 재조합 아데노바이러스를 제조하고, 이를 HRGβE-Ad라 명명하였다.

3) 재조합 아데노바이러스의 증식 및 정제

HRGβE-Ad의 제조 후 2회에 걸쳐 단일 플라이크 정제(single plaque purification)을 한 후 이로부터 293세포에 감염하여 증식하였다. 감염된 293에서 동결, 해동을 5회 하여 아데노바이러스를 추출한 후 이를 다시 CsCl 밀도구배원심분리에 의해 정제하여 -80°C에 보관하였다. 정제한 재조합 아데노바이러스는 293 세포에서 플라크 형성 유닛(plaque forming unit(pfu))를 결정 한 다음 실험에 사용하였다.

4) 신경세포주 배양

환쥐 배아의 해마에서 기원하는 HiB5 세포는 온도 민감성(temperature sensitive) SV40 T-항원을 레트로바이러스로 감염시켜 만들었으므로 34°C에서 배양할 때는 세포분열하나 쥐의 정상체온인 39°C로 옮기면 분열을 멈춘다. 배지는 DMEM에 10% FBS(fetal bovine serum), 페니실린/스트렙토마이신, 글루타민, 소듐 피루베이트(0.11g/L)를 첨가하여 사용하고, 39°C에서 분화 시에는 무혈청 배지(serum-free media)인 N2 (DMEM/F12, 인슐린, 트랜스페린, Putrescine, BSA 포함 ;Botten Stein & Sato., 1979)에 피루베이트를 첨가하여 사용한다.

5) 면역침전법과 면역블롯팅 분석법

HRGβE-Ad에 의하여 합성된 HRG-β1 EGF 펩타이드가 세포외로 분비되어 다른 세포 ErbB 단백질의 활성화가 유도되는 지 검증하기 위하여 HRGβE-Ad가 감염된 HiB5 세포의 배양액을 시간별로 채취한다. 세포배양액을 C6 세포에 10분 동안 처리한 후 NP-40포함 라이시스 버퍼(TBS(Tris buffered saline)에 NP-40, 피로포스페이트 오르토-바나데이트, 플루오라이드, 아프로틴, 펩스테인, 루페틴 첨가)를 넣어 세포를 추출한다. 30분간 얼음에서 반응한 후 10분간 원심분리기로 핵을 제거한다. 각각의 ErbB 단백질에 대한 항체를 이용하여 세포추출물을 면역침전한 후 면역침전물을 SDS-폴리아크릴아미드 겔로 분획한 후 Immobilon-P에 단백질 이전하였다. ErbB2, 3, 4의 인산화 정도를 확인하기 위하여 항 티로신 인산화단백질 항체를 이용한 면역블롯팅(웨스턴 블롯)분석법을 시행한다.

6) 면역화학 염색법(Immunocyto-, histochemistry-double staining)

신경세포특이적 표적단백질(신경세사, 아세틸화 튜블린, GABA등)의 발현을 조사하기 위해, 배양된 세포를 4% 파라포름알데히드로 20분간 고정한 후 0.5% NP-40로 5분간 퍼미어블화(permeabilization)하고, 1% BSA를 함유한 PBS 용액을 사용하여 30분간 차단(blocking)한다. 서로 다른 오리진인 두 종류의 일차 항체로 37°C에서 1시간동안 배양한 후 각 일차 항체를 검출하기위하여 FITC 또는 로다민(rhodamine)이 결합된 이차항체를 다크 챔버에서 배양하였다. 세포를 염색할 경우 세포의 핵은 DAPI로 염색하여 공초점 현미경을 이용해 관찰한다.

좌골신경조직에서 신경세사(neurofilament)나 슈반세포 특이적 표적단백질 S100과 성장하고 있는 축색 특이적 표적단백질 GAP43의 발현을 조사하기 위하여 신경조직은 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정하고 신경말단 쪽의 축색부분(distal stump)에서부터 5 μm로 동결박질(cryosection)하였다. 그 다음 0.1% Triton X-100으로 15분간 퍼미어블화한 후 1% BSA와 15% 정상 혈청을 함유한 PBS를 사용하여 1시간 동안 차단(blocking)한다. 일차항체를 사용하여 4°C에서 약 16시간 반응한 후, FITC 또는 로다민(TRITC)으로 표지된 이차항체로 1시간 다시 반응하고 슬라이드에 고정하여 공초점 현미경으로 관찰하였다.

7) RT-PCR 방법

좌골 신경조직으로부터 TriZol Reagent (Invitrogen, USA)을 이용해 총 RNA를 추출하여 건조시킨 후 DEPC 처리된 증류수를 넣어 녹인 다음 260 nm 파장에서 분광광도계로 농도 및 순도를 측정하고 -20°C에 보관하여 사용하였다. Total RNA 2 μg으로부터 Super ScriptIII first-stranded RT-PCR kit(Invitrogen, 미국)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. RT 산물 1 μl 기준으로 센스 및 안티센스 프라이머 (각 20 pmoles), 1 μl의 10 mM dNTPs, 5 μl의 10X 버퍼 (20 mM Tris-

Cl, 1.5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 0.1 mg/ml 젤라틴, pH 8.4), 1 unit의 *Taq* DNA polymerase (Promega, USA)를 첨가하여 반응액의 전체부피가 50 μ l가 되게 증류수를 첨가하여 DNA thermal cycler (Perkin Elmer 2400, USA)를 사용하여 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물 10 μ l를 2 % 아가로스겔에 전기영동하여 gel documentation system (Bio-Rad Lab, USA)을 이용하여 밀도를 측정, 비교하였다.

8) 재조합 아데노바이러스의 주입 및 흰쥐의 좌골신경 손상모델에의 적용

수컷 Sprague-Dawley 흰쥐(약 250~270g)를 펜토바비탈(pentobarbital)(50mg/kg) 또는 에퀴텐신(Equithensin)(5ml/kg)으로 마취시킨 후 왼쪽 좌골(sciatic notch)를 노출시키고, 좌골신경에서 동맥을 제외하고 신경섬유를 자르거나 #9 혈관봉합사로 양쪽을 묶고 가운데를 홍채 절제 가위(iridectomy scissors)로 자른다. 신경 손상 5일 후에 생리식염수나 각각의 재조합 아데노바이러스(1×10^{11} pfu/ml)를 좌골신경에 세포체 쪽의 축색(proximal)과 신경말단 쪽의 축색부분(distal stump)에 2 μ l (2×10^8 pfu)를 주사한 후 25일째에 좌골신경조직을 각각 얻어 축색의 길이를 측정하고 신경특이적 표지 단백질 발현을 항체를 이용하여 염색한다. 바이러스 주입 후 3주와 5주 때에 흰 쥐를 희생시키기 전 행동관찰 검사를 통하여 신경 재생정도를 측정한다.

9) 축색의 길이 측정

공초점 레이저 주사 현미경(Confocal Laser Scanning Microscopy LSM 510, Carl Zeiss)을 이용해서 축색의 상을 찍는다. 하나의 축색은 한 번에 찍을 수 없기 때문에 축색의 앞부터 뒤까지 약 20장 정도로 나누어서 찍으며 그룹 당 3개의 축색 상을 찍는다. Image examiner program을 이용하여 각 장의 축색 길이를 측정하고 이를 합산하여 축색 한 개의 전체 길이를 산출한 후 각 그룹의 평균을 산출하여 축색의 길이를 결정한다.

10) 행동관찰 실험

행동관찰 실험으로 열판검사(hot plate test)와 신경검사(neurological test)를 실시하였다. 각 성적은 평균값 $\pm$ 표준편차로 나타내었으며 통계 값의 유의성은 아노바 검증법(ANOVA; one-way analysis of variance)을 이용하여 결정하고 $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

열 자극에 대한 회피반응검사인 열판 검사(hot plate test)는 쥐를 52~54℃가 유지되는 열판 위에 놓인 직경 20cm의 아크릴 재질의 원통 안에 넣고 쥐가 열 판에서 움직일 때까지의 시간(초)을 측정하였다. 신경검사는 플레이싱 측정(placing test), 자세 반사측정(postural reflex test), 촉각 플레이싱 측정(tactile placing test)의 세 가지 종류의 검사를 실시하였다. 각 검사에서 성적을 0~3점으로 결정하였고 쥐 한 마리당 각각의 검사를 20회 실행하여 상태와 횟수를 산출하였다.

플레이싱 측정은 쥐가 평형이 유지되고 방해물이 없는 공간에서 앞으로 이동하는 동안 뒷다리가 땅에 닿는 정도를 측정하였다(닿지 않고 다리를 질질 끌면 0점, 1/3이 닿으면 1점, 2/3가 닿으면 2점, 완전히 닿으면 3점). 자세 반사측정(postural reflex test)은 쥐의 꼬리를 잡아 뒷다리가 들리고 앞다리는 바닥에 닿게 한 상태에서 꼬리를 놓아주고 뒷다리가 바닥에 닿을 때 뒷발을 바닥에 디디고 뻗는지를 관찰하였고 쪽 뻗으면 3점, 뻗지 못하면 0점을 산정하였다. 촉각 플레이싱 측정은 쥐를 책상의 모서리에 앞다리를 포함한 몸의 2/3를 넣고 뒷다리만 허공에 떠 있게끔 놓아준다. 정상 쥐는 앞다리와 뒷다리를 이용해서 테이블 위로 올라가지만 좌골신경이 손상되어 촉감이 없으면 뒷다리를 쓰지 못하기 때문에 올라갈 수 없다. 촉감이 있으면 3점, 전혀 무감각하면 0점을 산정하였다. 이 때 1점과 2점의 중간 성적을 보인 경우 쥐의 경우 각 시험마다 20회 정도를 실행하여 상태와 횟수를 평균내서 중간 이상, 이하로 나누어 성적을 결정하였다.

실시에 1. 말초신경재생과정에서 발현하는 신경성장인자의 규명

신경 재생을 촉진하기 위한 치료제의 개발을 위하여 손상된 신경이 재생되는 과정에서 발현이 증가되는 신경성장인자의 종류를 규명하였다(도 1 참조). 흰 쥐의 좌골 신경을 절단한 후 5일(5D), 25일(25D), 5주(5W)후에 좌골 신경을 채취하여 RNA를 분리하였다. 신경성장인자인 히레글린의 각 종류에 특이한 프라이머(상기 <본 발명의 일반적인 실험방법>의 1) 참조)를 이용한 역전사효소-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)으로 조사한 결과, 타입 I 히레글린의 RNA가 신경 손상 후 5일 후에 급격히 증가하며 25일에는 감소하나 신경 재생이 일어나는 시기인 5주 후에 그 발현량이 다시 증가하였다. 타입 II는 손상 후 25일에 그 발현량이 증가하였으나 미비하고, 타입 III는 손상 후 초기(5일)에 발현량이 증가하나 5주 후에는 발현이 다시 감소하는 것을 알 수 있다. 따라서 타입 I 히레글린이 신경재생 촉진을 위한 치료제로서 적합한 후보물질로 생각된다.

실시에 2. HRG 베타1 EGF-성 도메인 펩타이드를 생성하여 세포 외로 분비하는 재조합 아데노바이러스 (HRGβE-Ad)의 제조

1) HRGβE-Ad의 제조

실시에 1의 결과를 근거로 타입 I의 히레클린을 선택하고 이 중 수용체와 결합하여 신경 분화 및 증식의 효과가 있는 것으로 알려진 베타 타입의 EGF-성 도메인만을 치료제 후보물질로 선택하였다. 흰 쥐의 HRG-베타1(neu differentiation factor: NDF42a)에 대한 mRNA를 암호하는 cDNA (NCBI accession number U02322 [gi:408394])로부터 중합효소연쇄반응으로 62개의 아미노산으로 구성된 HRG-β1의 EFG-성 도메인 펩타이드(아미노산 172~232와 시작 메티오닌)를 암호화하는 cDNA (뉴클레오타이드 1451~1646)를 증폭하였다. 이 때 클로닝을 위하여 cDNA의 5'말단에 KpnI 제한효소 자리를, 3' 말단에 BamH1 제한효소 자리가 첨가하도록 고안하였다. HRG-β1의 EFG-성 도메인 펩타이드에 대한 cDNA를 증폭하기 위한 프라이머는 5'gctggtaccatgtccacatcaacatc3'와 5'tcggatccttaatgctttagaagct3'를 사용하였다. TGFβ의 분비 지시 펩타이드(msgpgtaact)를 암호화하는 염기서열은 5'말단에 EcoRI 제한효소자리와 3' 말단에 KpnI 제한효소 자리를 첨가 (5'aattcatgtcgggaccgagaactgcagcaggtac3'와 5'ctgctgcagttcctggtcggcacatg3'; 밑줄 친 부분이 분비 지시 펩타이드의 암호 서열임) 하도록 고안하여 합성한 후 PCR을 이용하여 증폭한 HRG-β1의 EFG-성 도메인 펩타이드를 암호화하는 cDNA와 KpnI 제한효소 자리를 이용하여 융합시키고 융합서열을 EcoRI와 BamH1제한 효소자리를 이용하여 아데노서플렉스에 pCMV 프로모터와 SV40 바이러스의 폴리아데닐화 사이에 클로닝하였다(이하 pHRGβE-adenoshuttle, 도 2a 및 2c 참조). pHRGβE-adenoshuttle은 아데노바이러스의 전체 게놈을 포함한 pJM17(Microbix, Canada)과 함께 293 세포에 코-트랜스펙션하여 재조합을 유도시켜 아데노바이러스의 E1부위가 삭제되고 그 자리에 분비형의 HRGβ-1 EGF-성 도메인 펩타이드를 암호하는 DNA가 삽입된 복제 결손 재조합 아데노바이러스를 제조하였으며, 이를 HRGβE-Ad로 명명하였다(도 2b 참조).

2) 재조합 아데노바이러스(HRGβE-Ad)의 확인

재조합 아데노바이러스 HRGE-Ad는 바이러스 플라크로부터 바이러스 게놈을 분리한 후 중합효소 연쇄반응을 이용하여 HRGβ의 EGF-성 펩타이드가 삽입되었는지 확인하였다 (도 2c와 2d 참조). CMV 프로모터와 SV40 바이러스 폴리(A) 시그널의 서열과 상응하는 프라이머(set1)를 이용한 PCR 반응에서 예상되는 600bp의 DNA가 증폭되었고 HRG-β1의 EGF-성 도메인 펩타이드의 내부에 상응하는 프라이머(set2)를 이용한 PCR 반응에서 예상되는 200bp의 DNA가 증폭되었다. set1의 프라이머는 5'gtgtacggtgggaggtcta3'(CMV)과 5'ttgaaccattattataagctgc3' (SV40)를 사용하였고 set2의 프라이머는 5'ggtaccatgtccacgact3' (HRG-β1 EGF 도메인 1451~1468)와 5'ttaatgctttagaagct3' (HRG-β1 EGF 도메인 1629~1646)를 사용하였다.

실시에 3. HRGβE-Ad에 의한 신경줄기세포에서 기능성 신경세포로의 촉진 효과 확인

본 실시예에서는 흰쥐 배아의 해마에서 기원하는 신경전구세포 HiB5를 이용하여 HRGβE-Ad의 신경세포 분화 촉진 효과를 측정하였다. HiB5 세포는 온도 민감성(temperature sensitive) SV40 T-항원을 레트로바이러스로 감염시켜 만들었으므로 34°C에서 10% 혈청이 첨가된 DMEM 배지에 배양할 때는 분열하지만 쥐의 정상체온인 39°C로 옮기고 무혈청 배지 (serum-free media)인 N2 배지에서 배양하면 분열을 멈춘다. 본 발명에서는 재조합 바이러스를 세포의 분열 조건인 34°C에서 감염하고 24시간 후 N2 배지로 교체한 후 39°C에서 배양하였다.

1) HRGβE-Ad의 감염에 의한 신경줄기세포의 분화 촉진 효과

HRGβE-Ad에 의하여 신경줄기세포가 신경세포로 분화한다는 사실을 확인하기 위해서 재조합 아데노바이러스를 100moi (multiplicity of infection; 바이러스의 수/세포 수)로 HiB5 세포에 감염시킨 후 무혈청 배지에서 배양하고 신경 특이적 표지자인 β-튜불린에 대한 항체를 사용하여 검출하고 형광을 내는 로다민을 붙여놓은 이차항체를 사용하여 형광염색하였다 (도 3 참조). 대조군으로 이용한 바이러스를 감염하지 않은 세포나 (a, b, c) 단순한 재조합 아데노바이러스의 효과를 측정하기 위하여 *E.coli* β-갈락토시다아제를 생성하는 재조합 아데노바이러스 (LacZ-Ad)를 100moi로 감염한 세포에서는 (d, e, f) β-튜불린의 발현이 적었으나 HRGβE-Ad를 감염한 세포에서는(g, h, I) β-튜불린의 발현이 증가됨을 알 수 있다. 세포 핵을 푸른 형광을 내는 DAPI 염색약과 (a, d, g), β-튜불린으로 이중 염색하여 (b, e, h), 겹쳐 사진을 찍어서 HiB5세포가 염색된 것을 보여 준다 (c, f, i).

HRGβE-Ad가 신경돌기의 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 ErbB4의 발현을 유도하여 신경세포로의 분화를 촉진하는지 조사하기 위하여 HRGβE-Ad를 HiB5세포에 10 moi로 감염시킨 후 신경세포 표지자인 신경세사(NF)와 ErbB4에 대한 항체를 이용하여 염색하였다(도 4 참조). 바이러스에 감염되지 않은 세포(a~d)에 비해 HRGβE-Ad(e~h)에서 보다 복잡한 신경돌기의 모습을 보여 신경세포의 분화를 촉진하였으며 이 세포에서 ErbB4의 발현도 촉진되었다. 세포의 핵은 푸른 색을 내는 DAPI로 염색하였고(a, e) 신경세포로의 분화를 나타내는 신경세사는 로다민을 붙여놓은 이차항체를 이용하여(b, f), ErbB4는 FITC를 붙여 놓은 이차항체를 이용하여(c, f) 형광염색하였다. 도 d, h는 이를 삼중으로 겹쳐 놓은 것이다.

ErbB4는 ErbB2와 이종 이량체(heterodimer)를 형성하여 신경재생 과정의 신호 전달에 참여한다. 따라서 HRGβE-Ad가 ErbB4 뿐만 아니라 ErbB2의 발현을 유도하는지 확인하기 위하여 HRGβE-Ad를 HiB5세포에 10 moi로 감염시킨 후 신경세포 ErbB4와 ErbB2에 대한 항체를 이용하여 염색하였다(도 5 참조). 바이러스에 감염되지 않은 세포(a~c)나 같은 moi의 LacZ-Ad를 감염한 세포(d~f) 비해 HRGβE-Ad를 감염시킨 세포(e~h)에서 ErbB4와 ErbB2의 발현이 증가되는 것을 관찰하였다. ErbB4는 FITC를 붙여 놓은 이차항체를 이용하여(a, d, g), ErbB2는 로다민을 붙여놓은 이차항체를 이용하여(b, e, h) 형광염색하였다. 도 c, f, i는 이를 이중으로 겹쳐 놓은 것이다.

따라서 HRGβE-Ad는 성체의 신경줄기세포를 신경세포로 분화시키며 신경돌기의 성장에 중요한 역할을 하는 ErbB4의 발현을 현저히 증가시키지만 ErbB2의 발현도 유도하므로 ErbB4/ErbB2 이종 이량체를 형성하여 신경돌기의 성장을 유도하는 신호전달에 참여할 것으로 판단된다.

2) HRGβE-Ad에 의한 주변세포의 ErbB 수용체 활성화 효과

HRGβE-Ad에 의해 생성된 HRG-β1의 EGF-성 도메인 펩타이드가 세포외로 분비되어 주변의 세포에 영향을 미칠 수 있는지 HiB5 세포와 신경별교세포종에서 유래한 C6 세포주를 이용하여 조사하였다(도 6 참조). HRGβE-Ad를 32°C에서 100 moi로 HiB5 세포에 감염한 후 24시간 후에 세포를 분화 조건인 39°C로 옮김 다음 4시간(4h), 1일(1D), 2일(2D)에 배양액을 채취하였다. 바이러스를 감염하지 않은 세포의 배양액과(C) LacZ-Ad를 100 moi로 감염한 세포의 배양액을(LacZ-Ad) 음성대조군으로 상용의 재조합 GGF(rGGF)(Neomarker사의 제품, Recombinant Human Heregulin β1 Protein Cat. #RP-318-P0A, 미국)를 양성대조군으로 사용하였다. 배양액이나 rGGF를 C6 세포에 10분 간 처리하고 C6 세포를 용출하여 세포액을 얻었다. 세포액에 ErbB2, 3, 4 단백질에 대한 각각의 항체를 첨가하여 세포추출물을 면역침전하고 SDS-폴리아크릴아미드 겔로 분획한 후 Immobilon-P에 단백질 이전하였다. ErbB2, 3, 4의 인산화 정도를 확인하기 위하여 항 티로신 인산화단백질 항체를 이용한 면역블롯팅(웨스턴 블롯)분석법을 시행한 결과 HRGβE-Ad는 39°C에서 배양 후 4시간 후부터 ErbB3를 인산화시킬 수 있는 정도의 활성을 나타내며 2일 후 까지 지속되는 것을 알 수 있다. 이는 상용의 rGGF의 활성 정도와 유사하다. HRGβE-Ad를 감염시킨 후 2일 쯤(2D) 세포의 배양액은 ErbB4의 인산화를 효율적으로 유도하며 이는 rGGF의 활성보다 높았으나 ErbB2의 활성은 유도하지 않으므로 HRGβE-Ad는 ErbB4와 ErbB3를 특이적으로 활성화시키는 것을 알 수 있다. 따라서 HRGβE-Ad는 세포에 감염하여 신경세포로의 분화를 유도할 뿐만 아니라 세포 외로 분비되어 주변 세포의 ErbB3와 ErbB4를 결합하고 활성화시킴으로써 주변세포의 신경세포로의 분화를 촉진할 수 있다.

3) HRGβE-Ad에 기능성 신경세포로의 분화 효과 및 세포이동 촉진 효과

HRGβE-Ad가 감염된 세포나 주변세포의 신경돌기의 증가 등의 분화를 촉진하는 것 뿐 아니라 신경세포의 이동을 촉진하는지 조사하기 위하여 HRGβE-Ad가 감염된 세포에서 세포 이동 표지자인 더블코틴(DCX, doublecortin)과 감마-아미노부티릭 엑시드(GABA)의 발현을 면역세포화학법으로 조사하였다(도 7, 도 8 참조).

도 7은 HRGβE-Ad의 효과를 조사하기 위하여 HiB5세포를 신경세포 표지자인 β-튜블린과 세포 이동 표지자인 DCX에 대한 항체를 이용하여 염색한 사진이다(X200 배율, 지시막대; 50μm). 바이러스에 감염되지 않은 세포(a~d)에 비해 HRGβE-Ad를 10 moi로 감염시킨 세포에서(e~h)에서 β-튜블린과 더블코틴의 발현이 유도되는 것을 알 수 있다. 세포의 핵은 푸른색을 내는 DAPI로 염색하였고(a, e) 신경세포로의 분화를 나타내는 β-튜블린은 FITC를 붙여놓은 이차항체를 이용하여(b, f), 더블코틴은 로다민을 붙여 놓은 이차항체를 이용하여(c, f) 형광염색하였다. 도 d, h는 이를 삼중으로 겹쳐 놓은 것이다.

도 8은 HRGβE-Ad의 효과를 조사하기 위하여 HiB5세포를 신경 특이적 표지자인 신경세사(NF)와 전시냅스 표지물질(presynaptic marker)인 억제성 신경전달물질 GABA에 대한 항체를 이용하여 염색한 사진이다(X200 배율, 지시막대;

50 μ m). 바이러스에 감염되지 않은 세포 (a~d)에 비해 10 moi로 HRG β E-Ad를 감염시킨 세포에서 (e~h)에서 NF와 GABA의 발현이 유도되는 것을 알 수 있다. 세포의 핵은 푸른색을 내는 DAPI로 염색하였고 (a, e) 신경세포로의 분화를 나타내는 NF는 FITC를 붙여놓은 이차항체를 이용하여 (b, f), GABA는 로다민을 붙여 놓은 이차항체를 이용하여 (c, f) 형광염색하였다. 도 d, h는 이를 삼중으로 겹쳐 놓은 것이다.

따라서 HRG β E-Ad는 신경전구세포의 분화와 이동을 촉진하며 전시냅스 기능을 가진 신경세포로 분화시킬 수 있는 활성이 있으므로 신경전구세포와 같은 줄기세포의 이식을 통한 세포 및 유전자 치료과정에서 신경 재생의 효과를 증진시킬 수 있을 것이다.

실시에 4. HRG β E-Ad에 의한 손상된 말초신경계의 재생 촉진 효과 확인

인간의 경우 중추신경계는 물론 말초신경계도 재생이 어렵다. 말초신경계가 발생하고 재생하는 과정에서 슈반세포는 중요한 역할을 한다. 배아가 발생하는 동안에 신경릉(neural crest)에서 기원하는 슈반세포는 축삭이 점유하게 될 곳을 따라 미리 분열하므로 말초 신경계의 축삭이 슈반세포에 의존하여 성장하게된다. 특히 슈반세포는 영양인자(trophic factors)를 생산하여 신경의 생존과 신경돌기 성장을 조절한다. 또한 신경은 축삭에서 여러 종류의 히레굴린(herregulin)을 분비하여 슈반세포의 생존을 증진하고 축삭과 슈반세포의 비율을 조절하며 이때 축삭의 영향을 받지 못한 슈반세포는 사멸한다. 발생후기에 슈반세포는 미엘린 수초를 생산하여 축삭을 감싸서 슈반세포의 분화가 완성된다.

신경발생이 끝난 성체에서, 말초신경이 다친 경우에는 그 상해 부위에서 신경말단 쪽의 축삭부분(distal stump)은 월러퇴행(Wallerian degeneration)이라고 알려진 과정을 통해 점차 퇴화한다. 이때 상해 부위로부터 세포체 쪽의 축삭(proximal stump)은 재성장을 시작한다. 상해 부위의 신경말단 쪽의 축삭부분에서는 퇴화한 축삭과 수초물질을 제거하고 상해 부위로부터 세포체 쪽의 축삭부분은 축삭이 새롭게 자랄 수 있도록 환경을 조성한다(Kwon, Y. Kim, Bhattacharyya, W.V., Cheon, K., Stiles, C.D., and Pomeroy, S.L. (1997) Activation of ErbB2 during Wallerian degeneration of sciatic nerve, *J. Neurosci.* 17, 8293-8299).

신경이 다친 후 슈반세포는 즉시 급격한 분열을 하는데 이것은 축삭과의 접촉 상실이나 축삭이 분비하는 성장인자에 의해 촉진되는 것으로 생각되어왔다. 축삭이 재성장하는 동안에 슈반세포가 축삭에 접촉하면 다시 분화하여 수초를 재생한다. 세포 표면에서의 상호작용 이외에도 슈반세포는 멀리서도 재생하는 축삭에 영향을 줄 수 있다. 신경이 절단된 후 1 cm만 떨어져 있어도 축삭은 신경말단 쪽의 축삭부분을 향해 재생한다. 이때의 축삭의 정향운동은 신경말단 쪽의 축삭부분에 살아있는 슈반세포가 존재해야 일어난다.

말초신경계의 재생과정에서는 먼저 슈반세포가 절단된 축삭으로부터 분리되어 다시 분열능력을 획득하는 탈분화(dedifferentiation) 과정, 상처부위로부터 신경세포의 축삭이 다시 자라나오는 과정, 그리고 다시 자라나온 축삭을 슈반세포가 미엘린 수초로 감싸는 재분화(redifferentiation) 과정과 축삭이 근육까지 자라서 다시 근육세포에 신경근 접합부(neuromuscular junction)를 만드는 과정으로 크게 나눌 수 있다.

본 발명에서는 말초신경계에서 가장 신경섬유가 많이 지나가는 좌골신경을 절단하여 말초신경 손상 모델을 만들고 이 후 재생하는 과정에서 HRG β E-Ad를 말초신경에 직접 주입하여 유전자 치료에 적용하기 위한 실험을 수행하였다. 흰쥐의 좌골신경 손상 5일 후에 생리식염수(saline)나 LacZ-Ad, HRG β E-Ad를 각각 좌골신경의 세포체 쪽의 축삭과 신경말단 쪽의 축삭부분에 2 μ l씩 주사하였다. 사용한 재조합 바이러스는 2-6x10⁸pfu/ml를 사용하였다. 주사한 후 제시된 시간별로 좌골신경조직을 얻어 HRG β E-Ad의 신경 재생 촉진 효과를 측정하였다.

1) 손상된 좌골신경에서 HRG β E-Ad에 의한 슈반세포의 증식 효과

HRG β E-Ad가 좌골 신경 손상 후 탈분화과정에서 슈반세포의 증식을 효율적으로 유도하는 것을 조사하기 위하여 좌골신경 절단 후 바이러스를 주입하고 25일째의 좌골신경조직에서 슈반세포의 발현을 면역조직화학법으로 조사하였다 (도 9 참조). HRG β E-Ad를 주사 한 좌골신경(g~i)에서 식염수를 주입하거나 (a~c) LacZ-Ad를 주입한 신경조직(d~f)에 비하여 신경 특이적 표지자인 신경세사(neurofilament)와 슈반세포의 특이한 표지자인 S100발현이 증가됨을 알 수 있었다. 신경세사는 pan-NF(pan-neurofilament)에 대한 일차 항체와 FITC와 결합된 이차항체를 이용하여(a, d, g), 슈반세포는 S100에 대한 일차 항체와 로다민과 결합된 이차 항체를 이용하여(b, e, h) 염색하였고 도 c, f, i는 이를 겹쳐 놓은 것이다. 따라서 HRG β E-Ad를 주입한 좌골신경에서 슈반세포의 증식이 증가하므로 HRG β E-Ad에 의해 신경 손상 후 탈분화과정이 촉진됨을 알 수 있다.

2) 손상된 좌골신경에서 HRGβE-Ad에 의한 축색 성장 효과

HRGβE-Ad가 좌골 신경 손상 후 축색의 성장을 효율적으로 유도하는 것을 조사하기 위하여 좌골신경 절단 후 바이러스를 주입하고 25일째의 좌골신경조직에서 성장하고 있는 축색의 특이적 표지자인 GAP43의 발현을 면역조직화학법으로 조사하였다(도 10 참조). HRGβE-Ad를 주사 한 좌골 신경(도 10 g~i)에서 식염수를 주입하거나(도 10a~c) LacZ-Ad를 주입한 신경조직(도 10d~f)에 비하여 신경 특이적 표지자인 신경세사(NF-200)와 GAP43의 발현이 증가됨을 알 수 있었다. 신경세사는 pan-200에 대한 일차 항체와 FITC와 결합된 이차항체를 이용하여(a, d, g), 축색은 GAP43에 대한 일차 항체와 로다민과 결합된 이차 항체를 이용하여(b, e, h) 염색하였고 도 c, f, i는 이를 겹쳐 놓은 것이다.

손상된 좌골 신경에서 HRGβE-Ad에 의한 축색의 성장을 면역블롯팅 법을 이용하여 다시 증명하였다(도 11 참조). 좌골신경 절단 후 HRGβE-Ad를 주입한 좌골신경에서 생리식염수(saline)나 대조군 아테노바이러스인 LacZ-Ad를 주입하였을 보다 신경세포 특이적 표지자인 46 kD의 β-튜블린과 180kD, 200kD의 신경세사의 발현이 현저히 증가함을 알 수 있었다. 또한 축색의 성장을 나타내는 GAP43도 대조군에 비해 HRGβE-Ad를 주입한 쥐의 좌골신경에서 현저하게 많은 양이 발현되는 것을 알 수 있었다. 구조 단백질인 액틴(actin)은 모든 시료에서 그 양이 일정하였으므로 신경성장을 나타내는 β-튜블린, NF, GAP43의 발현 증가는 HRGβE-Ad의 효과임을 알 수 있다.

HRGβE-Ad에 의한 신경의 성장 촉진을 재차 확인하기 위하여 바이러스 주입 후 25일째 되는 좌골 신경조직에서 축색의 길이를 현미경으로 측정하였다(도 12, 표1 참조). HRGβE-Ad를 주입하였을 때 축색의 길이는 14508.4 μm로 대조군에 비하여 약 20% 증가하였으며 이 때 P 값은 0.05보다 적어 통계적으로 유의하였다.

[표1]

	식염수	LacZ-Ad	HRG β E-Ad
평균길이 (μm)	12029.0	12725.6	14508.4
표준편차(STDE)	477.69	34.71	104.65
개체수(n)	3	3	3
p value <0.005			

따라서 손상된 좌골 신경에 HRGβE-Ad를 주입하면 신경의 탈분화과정에서 슈반세포의 증식을 촉진시키며 그 이후 신경 세포로부터 축색의 성장을 촉진하는 것을 알 수 있다.

3) 좌골신경 손상 후 HRGβE-Ad에 의한 신경회복 증진 효과

손상된 말초신경이 재생되는 과정에서 HRGβE-Ad에 의해 축색이 근육까지 자라서 신경회복 속도가 증진되는지 조사하였다. 절단된 흰 쥐의 좌골신경에 HRGβE-Ad를 주사한 후 3주와 5주 후에 열판검사(hot plate test)를 실시한 결과 HRGβE-Ad를 주사한 흰 쥐가 대조군에 비하여 열 자극에 대해 더 빨리 회피하였다(도 13, 표2 참조). 5 주째에 지극을 회피하는데 걸리는 시간이 생리식염수를 주사한 쥐를 100%로 하였을 때 LacZ-Ad 투여군은 84%, HRGβE-Ad 투여군은 50%로 감소하였으며 3주에 비해 5주 후에 회복효과가 HRGβE-Ad를 주사한 군에서 대조군에 비해 많이 향상되는 것을 알 수 있었다.

[표2]

	식염수	LacZ-Ad	HRG β E-Ad
3주 (2차)	29.47	25.20	16.12
표준편차(STDE)	2.3243243	4.7924528	1.9803921
개체수(n)	15	15	15
5주 (2차)	30.00	25.00	14.00
표준편차(STDE)	2.889369	3.476892	1.357119
개체수(n)	15	15	15
p value=0.04938			

신경검사(neurological test)에서도 생리식염수나 LacZ-Ad를 주사한 대조군에 비해 HRGβE-Ad를 주사한 군에서 더 좋은 성적을 내었다(도13, 표3 참조).

[표3]

	식염수	LacZ-Ad	HRG β E-Ad
3주	3	3.5	4.7
표준편차(STDE)	0.457	0.475	0.255
개체수(n)	15	15	15
5주	3.8095	4.5417	5.5429
표준편차(STDE)	0.298	0.269	0.240
개체수(n)	15	15	15
p value= 0.003329			

신경검사는 플레이싱 측정(placing test), 자세 반사측정(postural reflex test), 촉각 플레이싱 측정(tactile placing test)의 세 종류로 구성되어 있으며 모두 손상된 좌골 신경의 회복을 측정하도록 고안하였다. 플레이싱 측정은 쥐를 평형이 유지되고 방해물이 없는 공간에 놓아주고 쥐가 앞으로 이동하는 동안 뒷다리가 땅에 닿는 횟수를 측정하는 검사로 신경이 손상된 쥐는 뒷다리를 제대로 땅에 던지 못한다. 자세 반사측정은 쥐의 꼬리를 잡아서 뒷다리를 들고 앞다리는 바닥에 닿게 한 상태에서 꼬리를 놓아주고 뒷다리가 바닥에 닿을 때 촉감을 느낄 수 있는가를 측정하는 검사로 뒷다리가 닿았을 때 정상 쥐는 반사적으로 뒷다리를 들지만 좌골신경이 손상되면 촉감을 느끼지 못하므로 변화가 없다. 촉각 플레이싱 측정은 앞다리를 포함한 몸의 2/3를 들고 뒷다리만 허공에 떠 있게끔 쥐를 테이블 모서리에 놓아준다. 정상 쥐는 앞다리와 뒷다리를 이용해서 테이블 위로 올라가지만 좌골신경이 손상되면 뒷다리를 쓰지 못하기 때문에 올라갈 수 없다. 따라서 HRGβE-Ad 투여군이 신경검사에서 좋은 성적을 얻은 것은 손상된 좌골신경의 회복이 대조군에 비해 빠른 것을 나타낸다.

위의 실험을 통해 말초신경 손상 후 HRGβE-Ad를 투여하면 신경재생과정에서 축색의 성장을 촉진하며 축색이 근육까지 자라서 다시 근육세포에 신경근 접합부를 만들어 신경검사에서 자극에 대한 반응이 향상되는 것으로 생각 할 수 있다. 따라서 HRGβE-Ad는 말초신경 손상 후 신경회복을 목적으로 하는 유전자 치료제로서의 기능을 갖는다.

발명의 효과

본 발명에 따른 재조합 아데노바이러스는 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 분비하여 신경간세포의 생존 및 분화를 촉진시킴으로써 신경돌기 성장 촉진작용 및 신경세포의 재생작용이 있다. 따라서 본 발명의 재조합 아데노바이러스 및 이를 포함하는 조성물은 다양한 종류의 퇴행성 신경질환 또는 신경손상 질환의 치료에 효과가 있으며, 특히 치매, 파킨슨 병, 알츠하이머병, 간질, 중풍, 말초신경 손상 등의 예방 및 치료, 그리고 유전자치료를 이용한 치료에 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

도 1은 쥐의 좌골신경이 손상 받은 후 재생하는 과정에서 시간에 따라 여러 종류 히레굴린(heregulin; HRG) RNA의 생성을 각각의 히레굴린 타입에 특이한 프라이머를 이용한 역전사효소-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)에 의해 보여주는 사진이다. 절단 후 5일(5D)에는 타입 I과 타입 III의 히레굴린 RNA의 발현이 증가하고 25일(25D)에는 타입II의 발현이 증가하는 것을 알 수 있다. 말초신경이 재생하는 시기인 5주(5W)에 히레굴린 타입 I의 RNA의 발현량이 증가함을 보여준다. 세포에서 항상 발현하는 액틴(actin)의 RNA 양으로 모든 시료의 전체 RNA양이 같음을 보여준다.

도 2는 히레굴린 베타I(타입I)(HRG-β1)의 EGF-성 도메인 펩타이드를 생성하여 세포 외로 분비하도록 고안된 아데노바이러스의 제조 방법을 나타낸 그림이다. 도 2a는 분비 지시 펩타이드(signal peptide)를 암호화하는 DNA 서열과 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열을 융합시켜 클로닝한 플라스미드 pHRGβE-Adenosshuttle과 재조합 아데노바이러스를 제조하기 위한 벡터 pJM17을 나타낸다. 도 2b는 도 2a의 두 가지 플라스미드가 293 세포에서 재조합 과정을 거쳐 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 분비하도록 고안된 복제 결손 재조합 아데노바이러스 게놈(pHRGβE-Ad)의 모식도이다. 도 2c는 2b의 네모 부분을 확대하여 보여주는 것으로 8개의 아미노산으로 구성된 분비지시 펩타이드와 융합된 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드가 CMV 프로모터와 SV40 바이러스의 폴리-아데닐화 사이트(polyA) 사이에 클로닝되었음을 나타낸다. 도 2d는 HRGβE-Ad의 게놈안에 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 암호

호화하는 DNA가 삽입되어 있는가를 중합효소 연쇄반응을 이용하여 확인한 아가로스 젤 사진이다. HRGβE-Ad의 게놈을 분리한 후 도 2c에 표시된 프라이머(화살표 1 과 2의 세트)를 이용하여 HRG 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 암호화하는 유전자가 바이러스 게놈 안에 삽입되었는지를 확인하였다.

도 3은 HRGβE-Ad가 신경줄기세포인 HiB5의 분화를 효율적으로 유도하는 것을 면역세포화학법(immunocytochemistry)으로 염색하여 보여주는 사진이다(X200 배율, 지시막대; 50μm). 분화 전인 HiB5 세포에 바이러스를 감염시키지 않은 경우와 대조군으로 *E.coli* β-갈락토시다아제를 발현하는 재조합 아데노바이러스(LacZ-Ad)를 감염시킨 경우에 비해 HRGβE-Ad를 감염시켰을 때 신경특이적 표지자인 β-튜블린의 발현이 유도되는 것을 보여준다. 도 3a~3c는 바이러스를 감염하지 않은 대조군을, 도 3d~3f는 LacZ-Ad를 감염한 세포를, 도 3g~3i는 HRGβE-Ad를 감염한 세포를 보여준다. 도 3a, d, g는 세포의 핵을 DAPI로 염색하여 보여준 사진이고, 도 3b, e, h는 β-튜블린을, 도 3c, f, i는 이 두 사진을 겹쳐서 보여주는 것이다.

도 4는 HRGβE-Ad가 HiB5 세포에서 신경 특이적 표지자인 신경세사(NF)와 신경돌기의 성장을 유도하는데 중요한 역할을 하는 ErbB4의 발현을 증가시키는 것을 면역세포화학법으로 염색하여 보여주는 사진이다(X200 배율, 지시막대; 50μm). 도 4a~4d는 바이러스를 감염시키지 않은 세포이며 도 4e~4h는 HRGβE-Ad를 감염시킨 세포를 보여준다.

도 5은 HRGβE-Ad가 HiB5 세포에서 ErbB4와 ErbB2의 발현을 유도하는 것을 면역세포화학법으로 염색하여 보여주는 사진이다(X200 배율, 지시막대; 50μm). 바이러스를 감염하지 않았을 때와(a~c) LacZ-Ad를 감염시킨 대조군(d~f)에 비해 HRGβE-Ad를 감염시킨 HiB5 세포(g~i)에서 ErbB4와 ErbB2의 발현이 유도되는 것을 보여준다.

도 6는 HRGβE-Ad가 신경세포에 감염한 후, 감염되지 않은 주변세포의 ErbB 단백질의 활성화를 유도하는 것을 ErbB 단백질에 특이한 항체를 이용한 면역침전법과 인산화된 티로신에 특이적으로 반응하는 항체를 이용한 면역블롯팅 분석법에 의해 보여준 것이다. HRGβE-Ad를 HiB5 세포에 감염시킨 후 39°C에서 배양하고 시간에 따라(4시간, 1일, 2일; 4h, 1D, 2D) 채취한 배양액을 C6 세포에 처리하였을 때 감염하지 하지 않은 세포와(C) LacZ-Ad를 감염한 세포의 배양액과 비교하여 ErbB3와 ErbB4의 티로신 인산화가 현저히 증가하는 것을 보여준다. 이는 상용 재조합 GGF(rGGF)를 처리했을 때와 같은 수준이며 ErbB4의 인산화는 오히려 재조합 GGF를 처리하였을 때 보다 더욱 증가하지만 ErbB2의 인산화는 거의 일어나지 않으므로 바이러스에 의해 생성, 분비되는 HRG-β1 EGF-성 펩타이드는 ErbB3와 ErbB4에 특이하게 결합하여 활성화시킴을 알 수 있다.

도 7은 HiB5 세포에 HRGβE-Ad를 감염시켰을 때 기능 특이성 신경세포로 분화되는 것을 신경 특이적 표지자인 β-튜블린과 세포 이동에 관련하는 특이 표지자인 더블코틴(DCX)에 특이한 항체를 이용한 면역세포화학법으로 염색하여 보여주는 사진이다(X200 배율, 지시막대; 50μm). 도 7a~7d는 감염하지 않은 세포이며 도 7e~7h는 HRGβE-Ad에 감염된 HiB5 세포를 보여준다.

도 8은 HRGβE-Ad에 감염된 HiB5 세포에서 신경 특이적 표지자인 신경세사(NF)와 전시냅스 표지물질(presynaptic marker)인 억제성 신경전달물질 감마-아미노부틸릭 엑시드(GABA)가 발현되는 것을 면역세포화학법으로 염색하여 보여주는 사진이다. 도 8a~8d는 감염하지 않은 세포이며 도 8e~8h는 HRGβE-Ad에 감염된 HiB5 세포를 보여준다.

도 9는 HRGβE-Ad가 손상된 흰 쥐의 좌골 신경에서 슈반세포의 증식을 효율적으로 유도하는 것을 면역조직화학법(immunohistochemistry)으로 보여주는 사진이다. 도 8a~8c는 대조군으로 식염수를, 도 8d~8f는 LacZ-Ad를 8g~8i는 HRGβE-Ad를 주사 한 좌골 신경을 주사 후 25일 째에 채취하여 염색한 것이다. HRGβE-Ad를 주사하였을 때 좌골신경에서 신경 특이적 표지자인 pan-NF와 축색을 둘러싸고 있는 신경아교세포인 슈반세포의 특이한 표지자인 S100의 발현이 유도됨을 보여준다.

도 10은 HRGβE-Ad가 손상된 흰 쥐의 좌골신경에서 축색의 성장을 유도하는 것을 신경세포 표지자인 신경세사(NF200)와 성장하고 있는 축색에 특이적인 표지자인 GAP43 단백질과 반응하는 항체를 이용한 면역조직화학법으로 보여주는 사진이다. 도 10a~10c는 대조군으로 식염수를, 도 10d~10f는 LacZ-Ad를, 도 10g~10f는 HRGβE-Ad를 주사한 후 25일째의 좌골신경을 채취하여 염색한 사진이다.

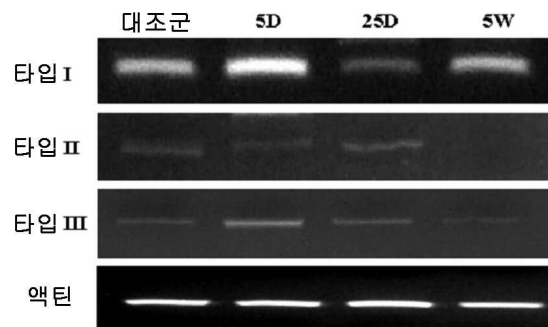
도 11은 손상 후 HRGβE-Ad를 주사한 흰 쥐의 좌골신경에서 축색과 신경세포의 성장이 증가하는 것을 신경세포 특이적 표지자인 β-튜블린과 신경세사, 성장하고 있는 축색 특이적 표지자인 GAP43 항체를 이용한 면역블롯팅 분석법으로 보여주는 그림이다.

도 12는 HRG β E-Ad가 손상된 흰 쥐의 좌골 신경에서 축색 성장을 촉진하는 것을 축색의 길이로 나타낸 그래프이다. 손상된 좌골 신경에 식염수 (saline), LacZ-Ad, HRG β E-Ad를 주사한 후 25일 쯤의 흰쥐 좌골신경의 축색 길이를 나타내었다.

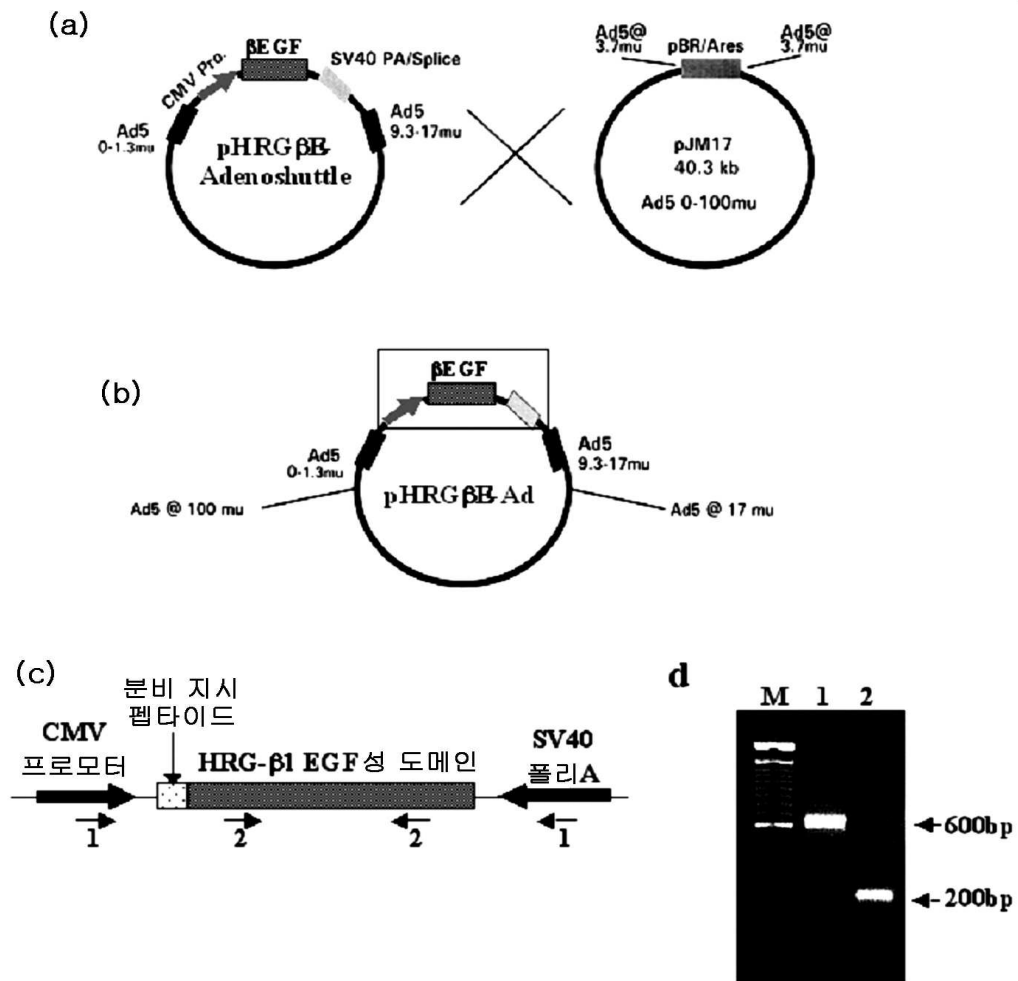
도 13은 절단된 흰 쥐의 좌골신경에 HRG β E-Ad를 주사하였을 때 3주와 5주 후에 신경회복이 촉진되는 것을 행동검사를 통해 보여주는 그래프이다. 도 13a는 식염수나 LacZ-Ad를 주사한 대조군에 비해 HRG β E-Ad를 주사한 흰 쥐가 열판검사 (hot plate test)에서 열 자극에 대해 더 빨리 회피하는 것을 보여준다. 도 13b는 HRG β E-Ad를 주사한 흰 쥐가 신경검사에서 더 좋은 성적을 나타내는 것을 보여준다.

도면

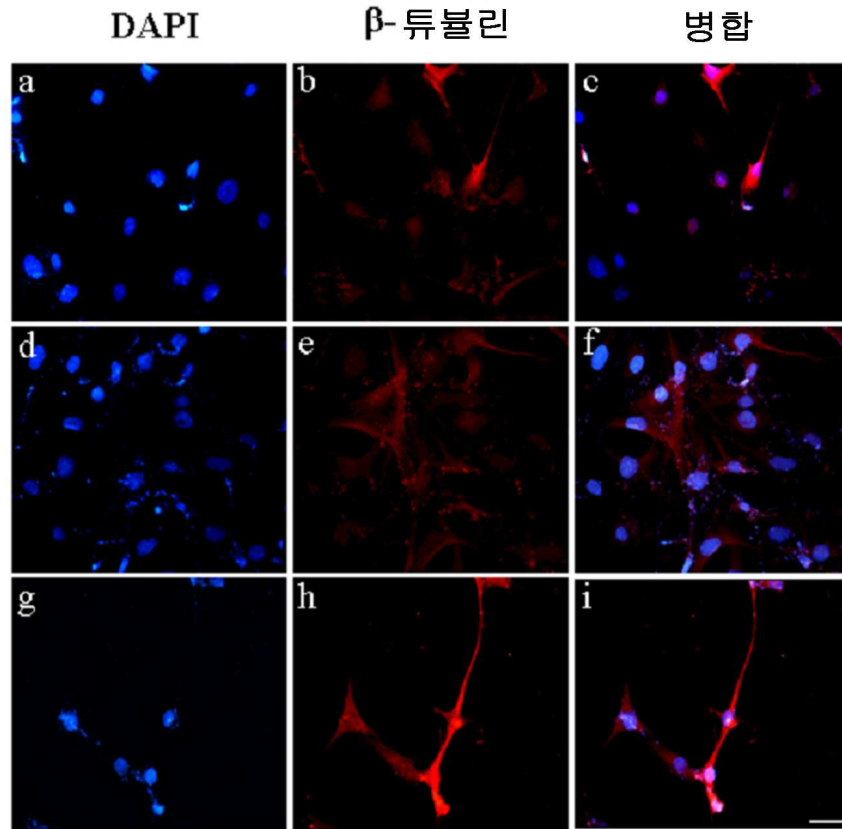
도면1



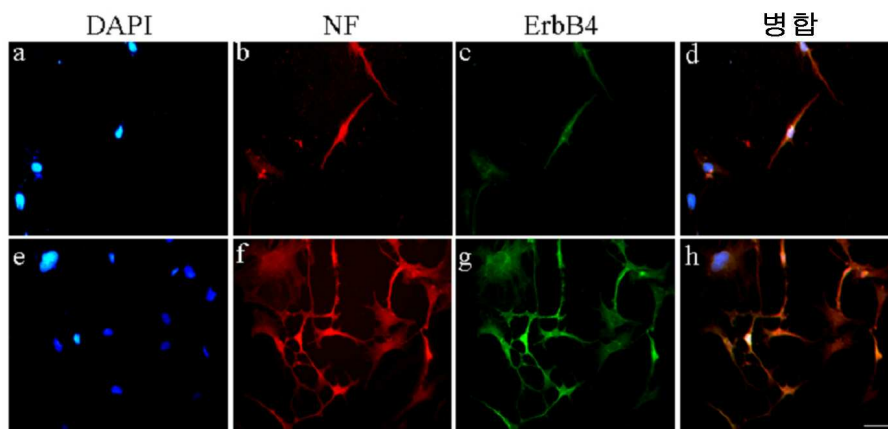
도면2



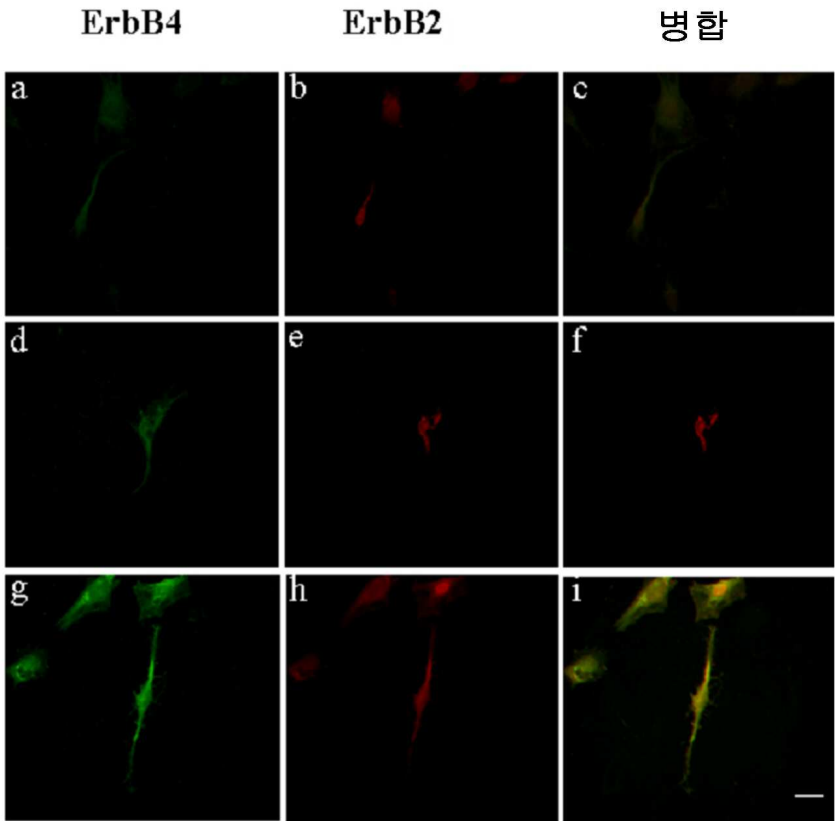
도면3



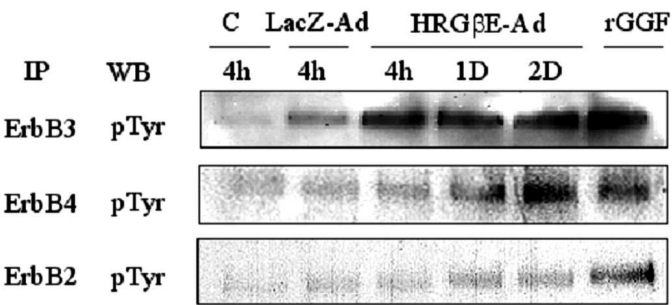
도면4



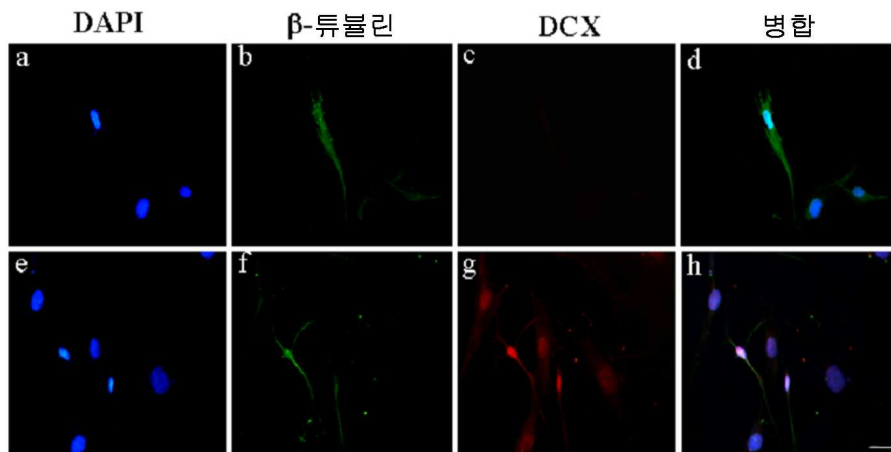
도면5



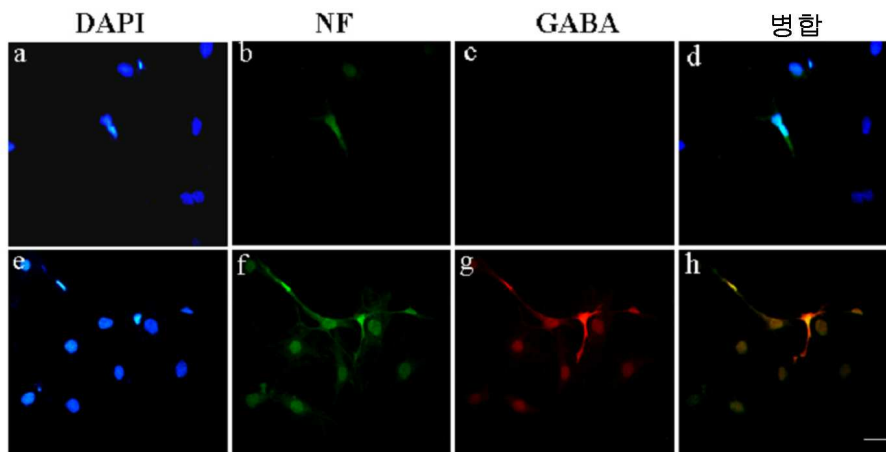
도면6



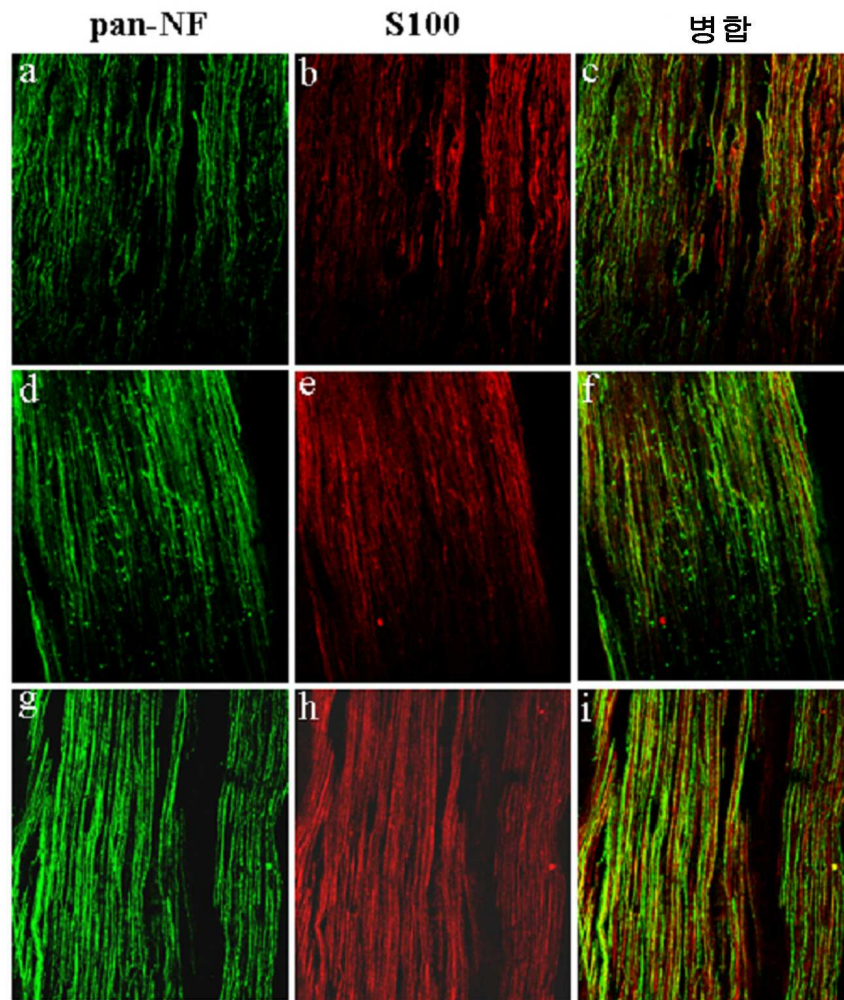
도면7



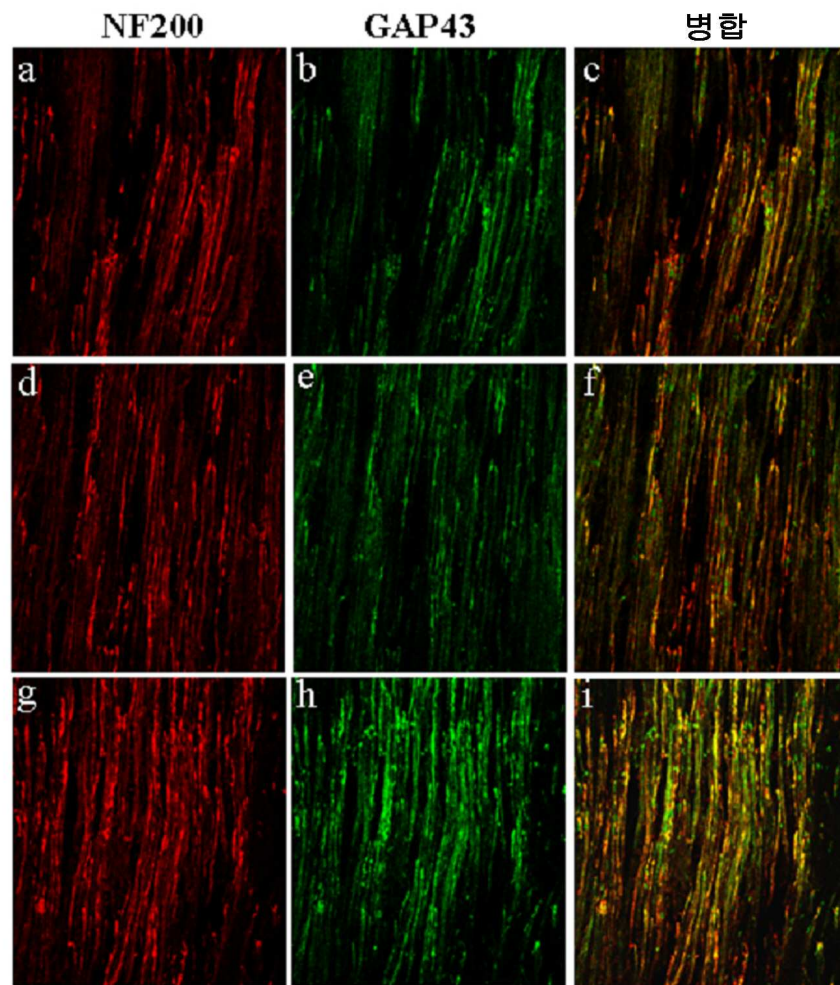
도면8



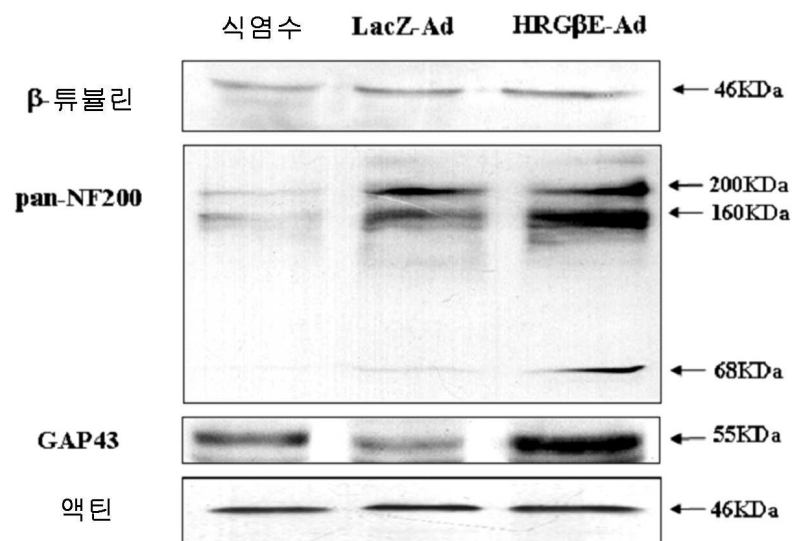
도면9



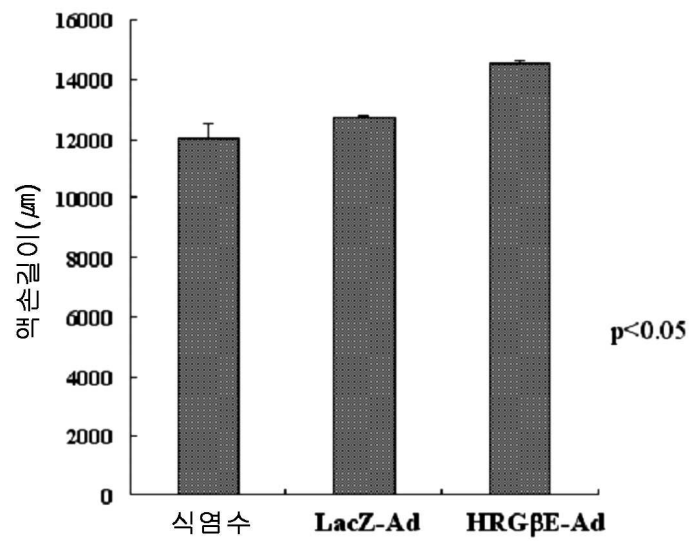
도면10



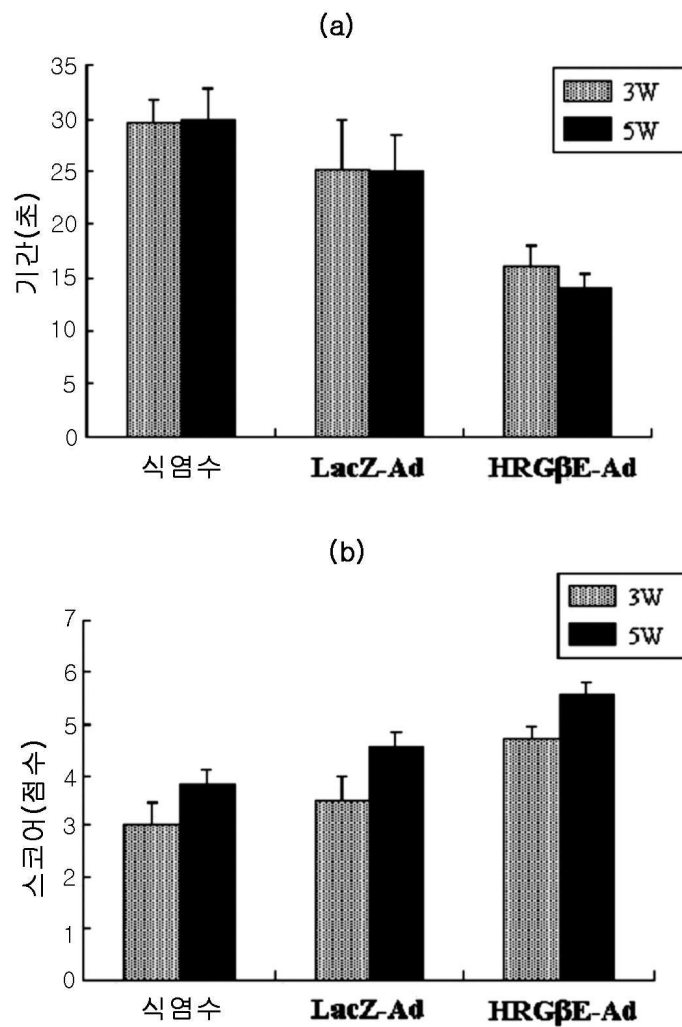
도면11



도면12



도면13



서열목록

<120> Recombinant Adenovirus Comprising DNA sequence Encoding EGF-like domain peptide of Heregulin betal and Pharmaceutical Composition Comprising the Same for the Differentiation and Regeneration of Nerve Cells

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 189

<212> DNA

<213> EGF-like domain peptide of Heregulin betal

<400> 1

atgtccacga ctgggaccag ccatctcata aagtgtgcg agaaggagaa aactttctgt 60

gtgaatgggg gcgagtgctt cacggtgaag gacctgtcaa acccgtaag atacttgtgc 120

aagtgcccaa atgagtttac tggatgatcgt tgccaaaact acgtaatggc cagcttctac 180

aagcattaa 189

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> signal peptide

<400> 2

atgtcgggac caggaactgc agca 24

<210> 3

<211> 219

<212> DNA

<213> fusion of EGF-like domain peptide of Heregulin betal and signal peptide

<400> 3

atgtcgggac caggaactgc agcaggatcc atgtccacga ctgggaccag ccatctcata 60

aagtgtgcg agaaggagaa aactttctgt gtgaatgggg gcgagtgctt cacggtgaag 120

gacctgtcaa acccgtaag atacttgtgc aagtgcccaa atgagtttac tggatgatcgt 180

tgccaaaact acgtaatggc cagcttctac aagcattaa 219

<210> 4
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> EGF-like domain peptide of Heregulin betal

<400> 4
 Met Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Ile Lys Cys Ala Glu Lys Glu
 1 5 10 15
 Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Thr Val Lys Asp Leu
 20 25 30
 Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly
 35 40 45
 Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His
 50 55 60

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> signal peptide

<400> 5
 Met Ser Gly Pro Gly Thr Ala Ala
 1 5

<210> 6
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Fusion of EGF-like domain peptide of Heregulin betal and signal peptide

<400> 6
 Met Ser Gly Pro Gly Thr Ala Ala Cys Thr Met Ser Thr Thr Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser His Leu Ile Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 20 25 30
 Gly Gly Glu Cys Phe Thr Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 35 40 45
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

50

55

60

Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His
65 70