



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0038921
 (43) 공개일자 2009년04월21일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>C07K 14/47</i> (2006.01) <i>A61K 38/17</i> (2006.01)
 <i>C07H 21/04</i> (2006.01) <i>C12N 5/10</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2009-7004288
 (22) 출원일자 2009년02월27일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2009년02월27일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IL2007/000959
 국제출원일자 2007년07월31일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2008/015675
 국제공개일자 2008년02월07일</p> <p>(30) 우선권주장
 60/834,157 2006년07월31일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 바스콜라 바이오제닉스 리미티드
 이스라엘 60 376 오 예후다, 조나단 네타냐후 스트리트 6</p> <p>(72) 발명자
 브라이트바르트 에알
 이스라엘 73127, 하쉬모나임, 하이츠하르 스트리트 27
 벤지오 리브나트
 이스라엘 49317, 페타크-티크바, 시베디아 스트리트 4
 탈 레쉬프
 이스라엘 60407 오 예후다, 네베 사브운, 데켈 스트리트 5, 아파트먼트 # 20</p> <p>(74) 대리인
 황의만</p> |
|---|---|

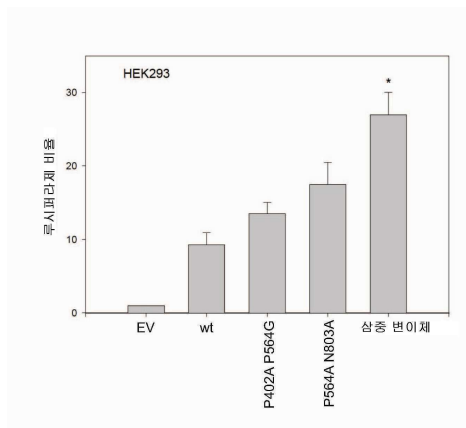
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 허혈 관련 의학적 증상을 치료하는 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 이의 치료 용도

(57) 요약

HIF-1알파의 아미노산 서열을 가지며, 안정하게 발현되고 상시 활성인 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드가 개시된다. 이에 의해 암호화된 분리된 폴리펩타이드류와 이의 용도가 또한 개시된다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

HIF-1 α 의 아미노산 서열을 가지며, 안정적으로 발현되고 상시 활성 (constitutively active)인 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 핵산 서열은 서열 번호 1에 설정된 바와 같은, 분리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 서열 번호 2에 설정된 바와 같은, 분리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 서열 번호 3에 적어도 90% 상동이고, 서열 번호 3의 프롤린 402에 상응하는 위치에서 변이, 서열 번호 3의 564 위치의 프롤린에 상응하는 위치에서 변이, 및 서열 번호 3의 아스파라긴 803에 상응하는 위치에서 변이를 포함하는, 분리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 5

HIF-1 α 아미노산 서열을 가지며, 안정적으로 발현되고 상시 활성인 폴리펩타이드를 암호화하는 아미노산 서열을 포함하는, 분리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 서열 번호 2에 설정된 바와 같은, 분리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 서열 번호 3에 적어도 90% 상동이고, 서열 번호 3의 프롤린 402에 상응하는 위치에서 변이, 서열 번호 3의 564 위치의 프롤린에 상응하는 위치에서 변이, 및 서열 번호 3의 아스파라긴 803에 상응하는 위치에서 변이를 포함하는, 분리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 8

제 1 항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 작제물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 시스-조절성 요소를 더 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 시스-조절성 요소는 프로모터 요소를 포함하는, 핵산 작제물

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 프로모터 요소는 내피세포 특이성 프로모터 요소인, 핵산 작제물.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 내피세포 특이성 프로모터 요소는 PPE-I 프로모터의 적어도 하나의 복제본을 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 PPE-I 프로모터는 서열 번호 4에 설정된 바와 같은, 핵산 작제물.

청구항 14

제 9 항에 있어서, 상기 시스-조절성 요소는 저산소증 반응 요소를 더 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 15

제 8 항의 핵산 작제물을 포함하는 세포

청구항 16

활성 제제로서 제 8 항의 핵산 작제물 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 17

저산소증 또는 허혈증, 감소된 조직 관혈류 또는 '저혈류'를 포함하는 것과 연관된 의학적 상태를 치료하는 방법에 있어서, 필요한 대상체에게, 대상체의 세포에서 제 5 항의 폴리펩타이드를 상향 조절할 수 있는 제제를 치료학적으로 효과적인 양으로 투여하여, 혈관형성-관련 질환을 치료하는 것을 포함하는 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 제제는 제 5 항의 폴리펩타이드인, 방법.

청구항 19

제 17 항에 있어서, 상기 제제는 제 8 항의 핵산 작제물인, 방법.

청구항 20

제 14 항에 있어서, 상기 투여하는 것은 전신적으로 수행되는, 방법.

청구항 21

제 17 항에 있어서, 허혈증과 연관된 상기 의학적 상태는 상처 치유, 허혈성 뇌졸중, 허혈성 심장 질환, 말초 혈관성 질환, .신동맥 질환, 위장관 병변, 화상, 피부 이식, 혈관 이식편, 장기 치료, 골 회복 질환, 간 질환, 자궁 질환, 망막 혈관형성 질환, 골 재생 질환, 연골 수리 질환, 및 평활근 세포 질환으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 방법.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 허혈 관련 의학적 증상을 치료하는 폴리펩타이드류, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드류, 및 이의 치료 용도에 관한 것이다.

배경기술

<2> 혈관생성은 기존의 것들로부터 새로운 혈관이 나오는 것이다. 이것은 여성 출산 과정과 같은 다양한 생리적 조건은 물론, 종양, 조직, 허혈성 및 외상 치유를 위시한 다양한 병리적 조건하에서 일어난다.

<3> 허혈성 심장 질환은 산업화된 많은 국가에서 주된 사망 원인이고, 이것으로 미국에서만, 매년 500,000 명 이상 죽는다. 현재 치료 방식은 약물 요법, 관상동맥 확장술 (coronary angioplasty), 및 좀 더 침습적인 관상동맥 우회술 (coronary artery bypass grafting, CABG)을 포함한다.

<4> 그러나, 이러한 모든 경우에서, 관련 동맥의 크기, 적절한 원격 맥관구조의 결여, 폐색을 야기하는 동맥성 병변의 복잡성, 및 환자의 일반적인 임상 여건을 위시한 기술적 문제들로 인해, 종종 허혈성 조직을 재맥관화하는 것이 저해된다.

<5> 최근에 개발된 좀 덜 침습적인 방식은 치료적 혈관생성(therapeutic angiogenesis)이다. 이러한 용어는 허혈성 조직의 신혈관형성을 향상시키는 것을 의도하여, 따라서 허혈을 완화시키는 전구혈관생성 인자의 도입을 지칭하는 것이다. 치료적 혈관생성의 분야에 두 가지 주요 방법이 사용되었다; 첫 번째는 DNA 단독 형태로 또는 바이러스성 담체와 같이 연합된 형태로 존재하는, 다양한 사이토카인을 전달하는 혈관생성 유전자 요법으로서, 가장 공통적으로 사용되는 것은 혈관내피 성장인자 (VEGF) 및 섬유아세포 성장인자 (FGF)이다. 좀 더 최근에 개발된

방법은 완전히 분화된 세포, 내피 전구 세포 또는 중간엽 간세포를 사용하는 세포 요법이다. 이러한 두 가지 방법은 동물 모델에서 그리고 초기 단계 임상 시험에서 성공을 나타냈다.

- <6> 그러나, 치료적 혈관형성이 허혈성 질환을 앓는 환자에게 진정한 임상적 대안이 되기 위해서는 넘어야 할 많은 난관이 존재한다.
- <7> 혈관형성 유전자 요법에서, 이러한 난관은 도입유전자(transgene) 발현의 조직 특이성에 대한 필요, 전달 담체의 선택, 투여량과 시간의 적절성, 투여 방식의 적절성, 및 부종과 종양 발달과 같은 부작용의 잠재성을 포함한다.
- <8> 혈관형성적 유전자 요법의 성공에 대한 다른 제한요건은 새롭게 형성되는 혈관의 성숙화 및 이의 후속적인 퇴화가 결여되어 있어, 상당한, 오래 지속되는 치료적 효과를 막는다는 것이다. 이것은 전달된 혈관형성 유전자가 상대적으로 짧은 시간 동안 발현되어서 혈관 성숙화 및 평활근 세포의 사용을 허용하지 않게 하기 때문이거나 또는 다중 혈관형성 인자들이 발생 될 혈관 성숙화에 요구되기 때문이다. 한 가지 가능한 해결책은 다중 혈관형성 인자를 동시에 활성화시킬 수 있고, 따라서 생리적 혈관형성을 좀더 밀접하게 유도할 수 있는 상류 혈관형성 조절자를 사용하는 것이다. 그러한 인자는 저산소증 유도 인자 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)이다.
- <9> 저산소증 유도 인자-1 (HIF-1)은 저산소증 동안 40개가 넘는 유전자를 활성화시키는, 산소 결핍시 반응하는 전사 인자 및 마스터 조절자이다. 이것은 두 개의 서브유닛으로 구성된 이종이량성 (heterodimeric) 전사 인자이다; 서브유닛 α 는 산소의 농도에 의해 엄격히 제어되고 있고 저산소증 동안 유도되는 반면, 서브유닛 β 는 산소 긴장관계에 상관없이 항상 발현된다.
- <10> HIF-1 α 는 두 개의 트랜스활성화 (transactivation) 도메인 (N-TAD 및 C-TAD) 및 한 개 산소-의존성 분해 도메인 (ODD)을 포함한다. 단백질 폰-히펠-린도우 (von-Hippel-Lindau, VHL)은 정상적인 산소 조건 하에서 HIF-1 α 의 ODD와 반응하고 E3-유비퀴틴 리가제 복합체의 부분으로서 작용하여, HIF-1 α 를 프로테오솜 분해로 처리하게 한다. 저산소증에서, HIF-1 α 는 HIF-1 β 와 이량화되고 핵에서 그의 타겟 유전자의 전사를 활성화시킨다.
- <11> 최근, VHL과 HIF-1 α 의 상호작용은 HIF-1 α 단백질 내의 두 개 특이적 잔기를 프롤릴 하이드록실화시킴으로써 가능하게 된다는 것이 밝혀졌다 (Epstein, A.C. 등..2001, Cell 107, 43-54. Masson, N. 등, 2001, Embo J20, 5197-206).
- <12> 세 개 프롤릴 하이드록실라제 (PHD 1-3)들은 정상적인 산소 조건 하에서 HIF-1 α 를 하이드록실화 한다는 것이 발견되었다. PHD 1 및 2는 잔기 402 및 564에서 하이드록실화하는 반면, PHD 3는 잔기 564에서만 하이드록실화한다.
- <13> HIF-1 α 조절의 두 번째 메커니즘은 2002년에 밝혀졌고 (Lando, D 등, 2002, Science 295, 858-61), HIF-1 저해 인자 (FIH-1)라고도 불리는, 아스파라지닐 하이드록실라제에 의해 수행되는, 잔기 803에서 HIF-1 α 를 아스파라지닐 하이드록실화를 포함한다. 이러한 하이드록실화는 HIF-1 α 과 조인자 p300과의 상호작용을 방지하여, HIF-1 α 의 전사 작용을 방해한다.
- <14> 따라서, 정상적인 산소 조건 하에서는, 상기 두 가지 조절 메커니즘은 HIF-1 α 활성에서의 감소를 담당하고 있는데, 한 가지는 프롤릴 하이드록실화를 통한 안정성에 관계된 것이고, 다른 하나는 아스파라지닐 하이드록실화를 통한 전사 활성화에 관한 것이다.
- <15> 이러한 프롤릴 및 아스파라지닐 하이드록실라제들은 모두 2-옥소글루타레이트 및 철 의존성인 디옥시케나제들이고, 세포성 산소에 대한 이들의 요구로 인하여, 산소 센서로서의 이들의 활성화에 대한 기초가 된다.
- <16> 잔기 402 및 564에서의 두 개 점 돌연변이는 HIF-1 α 와 VHL과의 상호작용을 폐지하여, HIF-1 α 가 항상 안정하게 되도록 하는 것이 밝혀졌다 (Masson 등, 2001, Embo J 20, 5197-206). 이러한 결과의 돌연변이체 HIF-1 α 는 HRE-루시페라제 작제물의 발현을 주도하는 데 있어서, 저산소성 처리와 같이 활성적이다. 잔기 564 및 803에서의 두 가지 돌연변이는 저산소 의태 철 킬레이터인 2,2'-디피리딜로 처리하여 얻어지는 것과 유사한, HIF-1 α 전체 전사 작용을 부여한다는 것을 나타내고 있다 (Lando 등., 2002, Science 295, 858-61).
- <17> 케라틴 14 프로모터의 조절하에서 잔기 401 내지 602가 삭제된 돌연변이체 hHIF-1 α 를 발현하고 있는 유전자이식(transgenic) 마우스는 피부에서 혈관신생을 증가시킨다는 것을 나타내었다 (Elson, D. A. 등, 2001, Genes Dev 15, 2520-32). 이러한 마우스들은 HIF-1 α 의 타겟으로 알려진, Glut-1 및 VEGF의 mRNA의 상향조절 (up-regulation)을 나타내고 있다. VEGF 과발현 마우스와 비교하여, 이러한 마우스들은 덜 새며 및 더 큰 성숙성을

보이는 혈관들을 가지고 있다. 이것은 HIF-1 α 가 VEGF 단독과는 달리, 생리적 혈관형성 반응과 유사하게, 다중 혈관형성 인자 (예, 적혈구생성촉진인자)의 활성화를 유도한다는 사실에 의해 설명될 수 있다. 이에 더하여, HIF-1 α 는 VEGF의 많은 이형(isoforms) 및 다른 유전자의 활성화를 유도하고, 다시금 더욱 밀접하게 생리적 반응을 모방하게 하며, 이는 단일 이형의 투여로 활성화될 수 없는 것이다.

- <18> HIF-1 α 의 상시 (constitutive) 활성화 형태는 2000년에 처음으로 혈관형성 유전자 요법으로 시험되었다 (Vincent, K.A. 등, 2000, Circulation 102, 2255-61). 이것은 CMV 프로모터의 조절하에 단순 포진 바이러스 (HSV)의 트랜스활성화 도메인 VP 16에 부착된 HIF-1 α 의 DNA 결합 도메인 및 이량화 도메인을 포함한다. 결과된 돌연변이체는 시험관내에서 HIF 타겟 유전자를 유도할 수 있었다. 단독 DNA로서 국소 투여시, 마우스 뒷다리 허혈증 모델에서 모세혈관 밀도 및 혈액 관류 증가를 야기하였다. 동일한 작제물은 또한 래트 MI 모델에서 IM 주사시, 치료적 효과를 나타내었다 (Shyu, K.G. 등, 2002, Cardiovasc Res 54, 576-83).
- <19> CMV 프로모터의 제어하에 있는, 잔기 401-602가 결실된, 항상 활성적 돌연변이 HIF-1 α 를 발현하는 아데노바이러스는 망막의 비-허혈성 조직에서 혈관형성을 유도할 수 있었다 (Kelly, B.D. 등, 2003 Circ Res 93, 1074-81).
- <20> 전술한 두 개의 작제물은 HIF-1 α 분자의 큰 결실체를 가지고 있고, 천연 HIF-1 α 트랜스활성화 도메인 (N-TAD 및 C-TAD) 중 하나 또는 둘 다를 결여하고 있고, 이는 HIF-1 α 의 활성화 능력 및 특이성을 감소시키는 결과를 낳을 수 있다. 또한, HIF-1 α 는 다양하고 비특이성 프로모터인 CMV의 조절 하에서 이러한 작제물을 발현하고, 이는 비특이성 발현 및 잠재적인 부작용으로 인하여 그 적용을 제한할 수 있다.
- <21> 다양한 투여 경로를 사용하여 상기 치료적 유전자를 허혈성 부위에 전달해 왔고, 말초 허혈증인 경우, 혈관내 및 근육내 투여, 및 심근 허혈증인 경우 심근내, 심막 내 및 동맥 내 경로를 포함한다. 정맥 내 경로는 침습적 과정의 필요가 없이 용이하게 접근 가능한 것, 기술적 안정성, 저비용은 물론 많은 환자군에 접근 가능성을 포함하는 장점을 부여한다. 그러나, 이의 명백한 임상적 특성에도 불구하고, 이러한 투여 경로를 사용하는 것은, 타겟 기관에서는 낮은 트랜스유전자 발현을 주도하게 되는 것과 더불어 비-타겟 기관에서의 원치 않는 발현으로 전신적 부작용을 결과하게 되고, 이는 투여되는 투여량을 제한하게 하는 백터의 전신적 분포로 인하여 일반적으로 사용하지 않는다. 이러한 제한은, 또한, 치료 효능을 제한하는 경향이 있다. 전구-혈관형성 유전자의 원치 않는 발현은 병리적 혈관형성을 유도할 수 있고, 이는 종양 발달 및 망막병증에 이를 수 있고, 따라서 허용될 수 없다. 그러므로, 트랜스유전자 발현을 허혈성 타겟 기관으로 특이적으로 지향하게 하는 능력은 효과적이고 안전한 전신적 투여에 가장 중요하다.
- <22> 따라서, 전구-혈관형성 인자와 함께 이를 운반하는 안전하고 효과적인 방법에 대한 필요가 인식되어 있고 이를 가지는 것이 유리하다.

발명의 상세한 설명

- <23> 본 발명의 일 관점에 따라서, HIF-1 α 의 아미노산 서열을 가지며, 안정하게 발현되고 상시 활성적인 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- <24> 후술하는 본 발명의 바람직한 구체예에서 다른 특징에 따라서, 상기 핵산 서열은 서열 번호 1에 설정된 것이다
- <25> 전술한 바람직한 구체예의 다른 특징에 따라서, 상기 아미노산 서열은 서열 번호 2에 설정된 것이다.
- <26> 전술한 바람직한 구체예의 다른 특징에 따라서, 상기 아미노산 서열은 서열 번호 3에 적어도 90% 상동성이고 및 서열 번호 3의 프롤린 402에 상응하는 위치에 돌연변이, 서열 번호 3의 프롤린 564에 상응하는 위치에서 돌연변이 및 서열 번호 3의 아스파라진 803에 상응하는 위치에서 돌연변이를 포함한다.
- <27> 본 발명의 다른 관점에서, HIF-1 α 아미노산 서열을 가지며, 안정하게 발현되고 상시 활성인, 폴리펩타이드를 암호화하는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩타이드를 제공한다.
- <28> 전술한 바람직한 구체예에서 다른 특징에 따라서, 상기 아미노산 서열은 서열 번호 2에 설정된 것이다.
- <29> 전술한 바람직한 구체예에서 다른 특징에 따라서, 상기 아미노산 서열은 서열 번호 3에 적어도 90% 상동성이고 서열 번호 3의 프롤린 402에 상응하는 위치에 돌연변이, 서열 번호 3의 프롤린 564에 상응하는 위치에 돌연변이 및 서열 번호 3의 아스파라진 803에 상응하는 위치에 돌연변이를 포함한다.
- <30> 본 발명의 다른 관점에 따라서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 작제물을 제공한다.

- <31> 전술한 바람직한 구체예에 있어서 다른 특징에 따라서, 상기 핵산 작제물은 시스-조절성 인자를 더 포함한다.
- <32> 전술한 바람직한 구체예에서 다른 특징에 따라서, 상기 시스-조절성 인자는 포프로모터 요소를 포함한다.
- <33> 전술한 바람직한 구체예에서, 다른 특징에 따라서, 상기 프로모터 요소는 내피특이성 프로모터 요소이다.
- <34> 전술한 바람직한 구체예에서 다른 특징에 따라, 상기 내피 특이성 프로모터 요소는 PPE-1 프로모터의 적어도 하나의 복사본을 포함한다.
- <35> 전술한 바람직한 구체예에서 다른 특징에 따라, 상기 PPE-1 프로모터는 서열 번호 4에 설정된 것이다.
- <36> 전술한 바람직한 구체예에서 다른 특징에 따라, 상기 시스-조절성 인자는 저산소증 반응 요소를 포함한다.
- <37> 본 발명의 다른 관점에 따라서, 상기 핵산 작제물을 포함하는 세포를 제공한다.
- <38> 본 발명의 다른 관점에 따라서, 활성 성분으로서 상기 핵산 작제물 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- <39> 본 발명의 다른 관점에 따라서, 저산소증 또는 허혈증, 감소된 조직 관혈류 또는 '저혈류'를 포함하는 것과 연관된 의학적 조건을 치료하는 방법을 제공하는바, 상기 방법은 대상체의 세포에서 본 발명의 폴리펩타이드를 상향 조절할 수 있는 제제를 치료적으로 유효한 양을, 이를 필요로 하는 대상체에 투여하여 혈관생성-관련 질환을 치료하는 것을 포함한다.
- <40> 전술한 바람직한 구체예에서 다른 특징에 따라, 상기 제제는 상기 폴리펩타이드이다.
- <41> 전술한 바람직한 구체예에서 다른 특징에 따라, 상기 제제는 상기 핵산 작제물이다.
- <42> 전술한 바람직한 구체예에서 다른 특징에 따라, 상기 투여하는 것은 전신적으로 수행되는 것이다.
- <43> 전술한 바람직한 구체예에서 다른 특징에 따라, 허혈증과 연관된 질병 또는 조건은 상처 치유, 허혈성 뇌졸중, 허혈성 심장 질환, 말초혈관성 질환, .신동맥 질환, 위장관 병변, 화상, 피부 이식, 혈관 이식편, 장기 치료, 골 회복 질환, 간 질환, 자궁 질환, 망막 혈관형성 질환, 골 재생 질환, 연골 수리 질환, 및 평활근 세포 질환으로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- <44> 본 발명은 허혈증과 연관된 의학적 상태에 대한 신규의 치료법을 제공함으로써 현재 알려진 것들의 단점을 성공적으로 극복한다.
- <45> 다르게 정의되지 않는 한, 본 출원서에 사용된 모든 기술적 및 학문적 용어들은 본 발명이 속해 있는 기술 분야에서 통상의 기술자에 의해 공통적으로 이해되는 것과 같은 의미를 가진다. 본 명세서에서 기술된 것들과 유사하거나 동일한 방법들과 재료가 비록 본 발명의 실제 또는 시험에 사용될 수 있으나, 적절한 방법 및 재료를 하기 제시한다. 본 명세서의 언급된 모든 출판물, 특허 출원서, 특허 및 다른 참고 자료물은 전체적으로 본 발명의 참고문헌에 기입된다. 논쟁 될 경우, 정의한 것을 포함하는, 본 특허 명세서는 조절될 것이다. 또한, 재료, 방법 및 실시예들은 설명하기 위한 것일 뿐, 제한적으로 의도된 것이 아니다.

실시예

- <58> 본 발명은 HIF-1 α 폴리펩타이드류 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드류, 이를 포함하는 약학적 조성물 및 이를 제조하고 사용하는 방법에 관한 것이다.
- <59> 상세하게는, 본 발명은 허혈증 관련 질환의 치료에 사용될 수 있다.
- <60> 본 발명의 적어도 하나의 구체예를 상세하게 설명하기 전에, 본 발명은 후술하는 설명에서 설정되거나 또는 하기 실시예에서 예증된 상세물에 그 적용이 한정되지 않는다는 것이 이해되어야 할 것이다. 본 발명은 다른 구체예도 가능하거니와, 다양한 방식으로 실행되거나 수행될 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용된 구절 및 용어들은 설명의 목적으로만 사용되었고 제한하는 것으로 간주되어서는 안 된다는 것이 이해되어야 한다.
- <61> 저산소증-유도 인자 1 α (HIF-1 α)는 이중이량성 전사 인자로서 낮은 산소 농도에로의 반응에 주요 조절자이고, 및 치료적 혈관형성에 대한 잠재적 후보자로서 제안되어 왔다. HIF-1 α 의 안정화는 점 돌연변이 P402A 및 P564G에 의해 이루어질 수 있고 [Masson 등, 2001, Embo J 20, 5197-206] 이의 C-트랜스활성화 도메인 (C-TAD)의 상시 활성은 점 돌연변이 N803A에 의해 이뤄질 수 있다 [Lando 등, 2002, Science 295, 858-61].
- <62> 본 발명을 실시하는 중에, 본 발명자들은 상기 세 가지 돌연변이 P402A P564G N803A를 조합하고 있는 HIF-1 α 의

변이 형태 (삼중 변이)를 유전공학적으로 만들어서, HIF-1 α 가 안정하고도 상시 활성적인 것으로 만들었다. 놀랍게도, 상기 삼중 변이는, 도 1A-B에 나타난 바와 같이, 두 가지 공지된, HIF-1 α 의 이중 변이 형태와 비교할 때, 저산소증 반응 요소에 연결된 리포터 유전자의 발현에 상승 효과를 나타내었다. 따라서, 본 발명자들은 단순히 HIF-1 α 분자의 안정화가 아닌, HIF-1 α C-트랜스활성화 도메인의 상시 활성화는 최적의 HIF-매개 전사 및 전구 혈관형성적 효과에 필수적이라는 것을 보였다.

- <63> 따라서, 본 발명의 삼중 변이 HIF-1 α , 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 사용하여 혈관 생성과 연관된 질환 또는 상태를 치료할 수 있다.
- <64> 도 2G-H에서 설명된 바와 같이, 본 발명의 삼중 변이체는, 시험관내 혈관 생성 시험에서 증명되듯이, P402A P564G 및 P564A N803A 이중 변이체보다 더 큰 혈관생성 능력을 보인다. 또한, 도 4A-F에 설명된 바와 같이, 본 발명의 삼중 변이HIF-1 α 를 발현하는 아데노바이러스는 마우스 뒷다리 허혈성 모델에서 야생형 HIF-1 α 를 발현하는 아데노바이러스 및 대조군에 비하여, 혈관류가 향상되고 모세혈관 밀도가 증가된 것을 나타내었다. 개질된 프리프로엔도텔린-1 프로모터는 허혈성 내피 세포에서 특이적 발현을 허용하는 것으로 밝혀졌다 (도 3C 및 3F). 그러한 프로모터의 조절 하에서 상기 삼중 변이체 HIF-1 α 를 발현시키는 것은 상시 활성 프로모터의 제어 하에서 상기 삼중 변이체를 발현하는 것에 비하여 전위(ectopic) 발현 및 전신적 부작용을 감소시켰다 (도 5A-N 및 6A-D).
- <65> 따라서, 본 발명의 일 관점에 따라서, HIF-1 α 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드를 암호화하는 아미노산 서열을 포함하는 분리된, 안정적으로 발현되고 상시 활성인 폴리펩타이드를 제공한다.
- <66> 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "HIF-1 α "는 HIF-1 α 의 적어도 활성 부분 (예, HIF-1 α 활성을 가지는 부분)을 지칭한다. 바람직하게는 본 발명의 HIF-1 α 는 인간 HIF-1 α , 예, GenBank Accession No: NM001530 이다.
- <67> 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "HIF-1 α 활성"은 HIF-1 α 의 적어도 전사 인자 활성, 예를 들어, 타겟 혈관 생성 유전자를 전사적으로 상향 조절하는 HIF-1 α 의 능력을 지칭한다. 전사 인자로서 작용하기 위해서, HIF-1 α 는 HIF-1 β 와 이량화하고 및 P300와 같은 조인자와 결합한다. 따라서, 본 발명의 HIF-1 α 는 바람직하게는 기능성 DNA 결합 도메인 및 기능성 조인자와 HIF-1 β 결합 도메인을 포함한다. 본 발명의 HIF-1 α 는, 예를 들어, 아미노 또는 카르복시 말단 아미노산들을 포함하지 않아야 하며 이는 이러한 말단 서열들이 HIF-1 α 활성에 요구되지 않기 때문이다.
- <68> 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "상시 활성"은 세포의 산소성 상태에 의해 조절되지 않는 전사적 활성을 포함하는 HIF-1 α 를 지칭한다.
- <69> 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "안정적으로 발현되는"은 저산소증에 반응하여 프로테아좀성 분해 증가에 처하지 않는 폴리펩타이드를 지칭한다.
- <70> 따라서, 상기 폴리펩타이드의 수명은 폰-히켈-린도우 (VHL)의 존재에 의해 변경되지 않는다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리펩타이드류는 야생형 폴리펩타이드류 (즉, 변이를 포함하지 않는 것)의 수명보다 적어도 2 배 이상, 심지어는 바람직하게는 5 배 더 크다.
- <71> 본 발명의 이러한 관점의 바람직한 구체예에 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드는 서열 번호 3과 적어도 50 % 상동성, 더욱 바람직하게는 적어도 60 % 상동성, 더욱 바람직하게는 적어도 70 % 상동성, 더욱 바람직하게는 적어도 80 % 상동성, 및 가장 바람직하게는 적어도 90 % 상동성이고 및 서열 번호 3의 프롤린 402에 상응하는 위치에 돌연변이, 서열 번호 3의 564에 있는 프롤린에 상응하는 위치에서 돌연변이 및 서열 번호 3의 아스파라진 803에 상응하는 위치에서 돌연변이를 포함한다.
- <72> 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "돌연 변이"는 야생형 서열 (GenBank Accession No: NM001530 (GI:31077212))에 비하여 아미노산 서열에서의 변화를 지칭한다.
- <73> 상기 돌연 변이는 결실 또는 치환을 포함할 수 있다. 예증적 돌연 변이들은 위치 402에서 프롤린에 상응하는 알라닌, 위치 564에서 프롤린에 상응하는 글리신, 및 위치 803에서 아스파라진에 상응하는 알라닌을 포함한다.
- <74> 따라서, 바람직한 구체예에 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드는 서열 번호 2에 설정되어 있는 것이다.
- <75> 또한, 본 발명의 폴리펩타이드는 서열 번호 3의 다른 보존적 변이를 포함할 수 있다.
- <76> 용어 "보존적 변이"는, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 아미노산 잔기를 다른 생물학적으로 유사한 잔기에

의해 치환되는 것을 지칭한다. 보존적 변이의 예는 이소루이신, 발린, 루이신 또는 메티오닌과 같은 하나의 소수성 잔기를 또 다른 잔기에 대하여 치환하는 것, 또는 하나의 극성 잔기를 또 다른 잔기에 대하여 치환하는 것으로, 예를 들어, 리신 대신에 아르기닌, 아스파르트 산 대신에 글루탐산 또는 아스파라진 대신에 글루타민을 치환하는 것을 포함한다. 용어 "보존적 변이"는 또한, 미치환된 원래의 아미노산 대신에 치환된 아미노산을 사용하는 것을 포함하는 바, 이는 상기 치환된 폴리펩타이드에 대해 생성된 항체들이 상기 미치환된 폴리펩타이드와도 면역 반응을 한다는 조건하에서이다.

- <77> 단백질 공학의 방법들, 예를 들어, 디스플레이 기술들을 사용하여, 본 발명의 HIF-1 α 은 물론 HIF-1 α 의 활성 부분에 안정성 및 상시 활성을 부여하는 다른 돌연 변이를 밝힐 수 있다.
- <78> 디스플레이 라이브러리를 제작하는 방법들은 당해 분야에 공지되어 있다. 그러한 방법들은, 예를 들어, Young AC, 등, "The three-dimensional structures of a polysaccharide binding antibody to *Cryptococcus neoformans* and its complex with a peptide from a phage display library: implications for the identification of peptide mimotopes" *J Mol Biol* 1997 Dec 12;274(4):622-34; Giebel LB 등. "Screening of cyclic peptide phage libraries identifies ligands that bind streptavidin with high affinities" *Biochemistry* 1995 Nov 28;34(47): 15430-5; Davies EL 등, "Selection of specific phage-display antibodies using libraries derived from chicken immunoglobulin genes" *J Immunol Methods* 1995 Oct 12;186(1):125-35; Jones C RT al. "Current trends in molecular recognition and bioseparation" *J Chromatogr A* 1995 Jul 14;707(1):3-22; Deng SJ 등. "Basis for selection of improved carbohydrate-binding single-chain antibodies from synthetic gene libraries" *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 May 23;92(11):4992-6; 및 Deng SJ 등. "Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display" *J Biol Chem* 1994 Apr 1;269(13):9533-8에 설명되어 있고, 이것들은 본 출원서에 참조문헌으로 기재되어 있다.
- <79> 본 발명의 HIF-1 α 에 안정성 및 상시 활성을 부여하는 다른 돌연 변이들은 컴퓨터 생물학을 사용하여 밝힐 수 있다. 예를 들어, 다양한 변이된 HIF-1 α 펩타이드 서열들은 다양한 삼차원적 컴퓨터 도구들을 사용하여 안정성 및 상시 활성을 부여하는 능력에 대하여 컴퓨터 분석될 수 있다. RIBBONS (Carson, M., 1997. *Methods in Enzymology* 277, 25), O (Jones, TA. 등, 1991. *Acta Crystallogr.* A47, 110), DINO (DINO: Visualizing Structural Biology (2001) <http://www.dino3d.org>); and QUANTA, INSIGHT, SYBYL, MACROMODE, ICM, MOLMOL, RASMOL and GRASP (reviewed in Kraulis, J., 1991. *Appl Crystallogr.* 24, 946)과 같은, 삼차원 구조 모델을 보여주는 데 유용한 소프트웨어 프로그램들을 사용하여 전망되는 돌연변이 펩타이드 서열들을 모델화하여 유용한 돌연변이들을 동정할 수 있다.
- <80> 용어 "폴리펩타이드"는, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 천연 폴리펩타이드류 (분해 생성물, 합성된 폴리펩타이드류 또는 재조합 폴리펩타이드류) 및 펩타이드 유사체 (peptidomimetics) (전형적으로, 합성된 폴리펩타이드류)는 물론, 예를 들어, 상기 폴리펩타이드류가 체내에서 더욱 안정되게 또는 세포로 더 잘 투과할 수 있게 하는 돌연변이를 가질 수 있는, 폴리펩타이드 유사체인, 펩토이드류 (peptoids) 및 세미펩토이드류를 포함한다. 그러한 돌연 변이들은 CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH 또는 CF=CH를 포함하나 이에 한정되지 않는 폴리펩타이드 결합 변이, 백본 변이 및 잔기 변이를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 펩타이드 유사체 화합물을 제조하기 위한 방법들은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, *Quantitative Drug Design*, CA. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992)에 설명되어 있으며, 이 문헌은 본 출원서에 전적으로 설정된 것 같이 참조문헌에 등재된다. 이러한 점에서 추가의 상세 내용은 하기에 제공된다.
- <81> 폴리펩타이드 내에서, 폴리펩타이드 결합 (-CO-NH-)은 예를 들어, N-메틸화 결합 (-N(CH₃)-CO-), 에스테르 결합 (-C(R)H-C-O-O-C(R)- N-), 케토메틸렌 결합 (-CO-CH₂-), R이 임의의 알킬, 예를 들어, 메틸인 α -아자 결합 (-NH-N(R)-CO-) 카르바 (carbaO 결합 (-CH₂-NH-), 하이드록시에틸렌 결합 (-CH(OH)- CH₂-), 티오아마이드 결합 (-CS-NH-), 올레핀성 이중 결합 (-CH=CH-), 레트로 아마이드 결합 (-NH-CO-), R이 탄소 원자에 자연적으로 제시되어 있는 "정상" 측쇄인 폴리펩타이드 유도체 (-N(R)-CH₂-CO-)에 의해 치환될 수 있다.
- <82> 이러한 돌연 변이들은 상기 폴리펩타이드 사슬을 따라서 임의의 결합에서 심지어는 동시에 수 군데에서 (2-3) 발생할 수 있다.
- <83> 천연 방향족 아미노산류, Trp, Tyr 및 Phe은 페닐글리신, TIC, 나프틸알라닌 (NoI), Phe의 고리-메틸화된 유도체, Phe의 할로겐화된 유도체, 또는 o-메틸-Tyr와 같은 합성된 비천연적 산을 대신하여 치환될 수 있다.

- <84> 이에 더하여, 본 발명의 폴리펩타이드류는 또한 하나 이상의 개질된 아미노산류 또는 하나 이상의 비-아미노산 단량체 (예, 지방산, 복합 탄수화물 등)을 포함할 수 있다.
- <85> 본 명세서 및 하기 청구 범위에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아미노산" 또는 "아미노산류"는 20 개의 천연적으로 발생하는 아미노산류; 예를 들어, 하이드록시프롤린, 포스포세린, 및 포스포트레오닌을 포함하는, 생체 내에서 종종 번역 후 개질된 아미노산류; 및 2-아미노아디프 산, 하이드록시리신, 이소테스모신, 노르-발린, 노르-루이신 및 오르니틴을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 다른 희귀 아미노산류를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 용어 "아미노산"은 D- 및 L-아미노산류 둘 다를 포함한다.
- <86> 하기 표 1 및 2는 본 발명에서 사용될 수 있는 천연적으로 발생하는 아미노산류 (표 1) 및 통상적이지않고 개질된 아미노산류 (표 2)를 기재하고 있다.

표 1

<87>

<88>

아미노산	삼문자 약어	일문자 표식
알라닌	Ala	A
아르기닌	Arg	R
아스파라진	Asn	N
아스파르트 산	Asp	D
시스테인	Cys	C
글루타민	Gln	Q
글루탐산	Glu	E
글리신	Gly	G
히스티딘	His	H
이소루이신	Ile	I
루이신	Leu	L
리신	Lys	K
메티오닌	Met	M
페닐알라닌	Phe	F
프롤린	Pro	P
세린	Ser	S
트레오닌	Thr	T
트립토판	Trp	W
타이로신	Tyr	Y
발린	Val	V
상술한 임의의 아미노산	Xaa	X

<89>

표 2

Non-conventional amino acid	Code	Non-conventional amino acid	Code
α -aminobutyric acid	Abu	L-N-methylalanine	Nmala
α -amino- α -methylbutyrate	Mgab	L-N-methylarginine	Nmarg
aminocyclopropane-carboxylate	Cpro	L-N-methylasparagine	Nmasn
aminoisobutyric acid	Aib	L-N-methylaspartic acid	Nmasp
aminonorbornyl-carboxylate	Norb	L-N-methylcysteine	Nmceys
cyclohexylalanine	Chexa	L-N-methylglutamine	Nmgin
cyclopentylalanine	Cpen	L-N-methylglutamic acid	Nmglu
D-alanine	Dal	L-N-methylhistidine	Nmhis
D-arginine	Darg	L-N-methylisoleucine	Nmile
D-aspartic acid	Dasp	L-N-methylleucine	Nmleu
D-cysteine	Dcys	L-N-methyllysine	Nmlys
D-glutamine	Dgin	L-N-methylmethionine	Nmmtet
D-glutamic acid	Dglu	L-N-methylnorleucine	Nmnle
D-histidine	Dhis	L-N-methylnorvaline	Nmnva
D-isoleucine	Dile	L-N-methylornithine	Nmorn
D-leucine	Dleu	L-N-methylphenylalanine	Nmphe
D-lysine	Dlys	L-N-methylproline	Nmpro
D-methionine	Dmet	L-N-methylserine	Nmser
D-ornithine	Dorn	L-N-methylthreonine	Nmthr
D-phenylalanine	Dphe	L-N-methyltryptophan	Nmtrp
D-proline	Dpro	L-N-methyltyrosine	Nmtyr
D-serine	Dser	L-N-methylvaline	Nmval
D-threonine	Dthr	L-N-methylethylglycine	Nmetg
D-tryptophan	Dtrp	L-N-methyl-t-butylglycine	Nmtbug
D-tyrosine	Dtyr	L-norleucine	Nle
D-valine	Dval	L-norvaline	Nva
D- α -methylalanine	Dmala	α -methyl- α -aminobutyrate	Maib
D- α -methylarginine	Dmar	α -methyl- γ -aminobutyrate	Mgab
D- α -methylasparagine	Dmas	α -ethylcyclohexylalanine	Mchexa
		α -methylcyclopentylalanine	Mcpen
		α -methyl- α -naphthylalanine	Manap

<90>

D- α -methylaspartate	n	Dmas	α -methylpenicillamine	Mpen
D- α -methylcysteine	p	Dmcy	N-(4-aminobutyl)glycine	Nglu
D- α -methylglutamine	s	Dmgl	N-(2-aminoethyl)glycine	Naeg
D- α -methylhistidine	n	Dmhis	N-(3-aminopropyl)glycine	Norn
D- α -methylisoleucine		Dmile	N-amino- α -methylbutyrate	Nmaabu
D- α -methylleucine		Dmle	α -naphthylalanine	Anap
D- α -methyllysine	u	Dmlys	N-benzylglycine	Nphe
D- α -methylmethionine		Dmm	N-(2-carbamylethyl)glycine	Ngin
D- α -methylornithine	et	Dmor	N-(carbamylmethyl)glycine	Nasn
D- α -methylphenylalanine	n	Dmph	N-(2-carboxyethyl)glycine	Nglu
D- α -methylproline	e	Dmpr	N-(carboxymethyl)glycine	Nasp
D- α -methylserine	o	Dmser	N-cyclobutylglycine	Ncbut
D- α -methylthreonine		Dmthr	N-cycloheptylglycine	Nchep
D- α -methyltryptophan		Dmtrp	N-cyclohexylglycine	Nchex
D- α -methyltyrosine		Dmty	N-cyclodecylglycine	Ncdec
D- α -methylvaline		Dmva	N-cyclododecylglycine	Ncdod
D- α -methylalanine	l	Dnma	N-cyclooctylglycine	Ncoct
D- α -methylarginine	la	Dnma	N-cyclopropylglycine	Ncpro
D- α -methylasparagine	rg	Dnma	N-cycloundecylglycine	Ncund
D- α -methylaspartate	sn	Dnma	N-(2,2-diphenylethyl)glycine	Nbhm
D- α -methylcysteine	sp	Dnmc	N-(3,3-diphenylpropyl)glycine	Nbhe
D-N-methylleucine	ys	Dnml	N-(3-indolylethyl)glycine	Nhtrp
D-N-methyllysine	eu	Dnml	N-methyl- γ -aminobutyrate	Nmgabu
N-methylcyclohexylalanine	ys	Nmch	D-N-methylmethionine	Dnmmtet
D-N-methylornithine	exa	Dnmo	N-methylcyclopentylalanine	Nmcpen
N-methylglycine	rn	Nala	D-N-methylphenylalanine	Dnmphe
N-methylaminoisobutyrate		Nmai	D-N-methylproline	Dnmpro
N-(1-methylpropyl)glycine	b	Nile	D-N-methylserine	Dnmser
N-(2-methylpropyl)glycine		Nile	D-N-methylserine	Dnmser
N-(2-methylpropyl)glycine		Nleu	D-N-methylthreonine	Dnmthr
D-N-methyltryptophan		Dnmtr	N-(1-methylethyl)glycine	Nva
D-N-methyltyrosine	p	Dnmt	N-methyl-naphthylalanine	Nnnap
D-N-methylvaline	yr	Dnmv	N-methylpenicillamine	Nmpen
γ -aminobutyric acid	al	Gabu	N-(<i>p</i> -hydroxyphenyl)glycine	Nhtyr
L- <i>t</i> -butylglycine		Tbug	N-(thiomethyl)glycine	Ncys
L-ethylglycine		Etg	penicillamine	Pen
L-homophenylalanine		Hphe	L- α -methylalanine	Mala
L- α -methylarginine		Marg	L- α -methylasparagine	Masn
L- α -methylaspartate		Masp	L- α -methyl-t-butylglycine	Mtbug
L- α -methylcysteine		Mceys	L-methylethylglycine	Mctg
L- α -methylglutamine		Mgin	L- α -methylglutamate	Mglu

<91>

L- α -methylhistidine	Mhis	L- α -methylhomo phenylalanine	Mhphe
L- α -methylisoleucine	Mile	N-(2-methylthioethyl)glycine	Nmet
D-N-methylglutamine	Dnmg In	N-(3-guanidinopropyl)glycine	Narg
D-N-methylglutamate	Dnmg lu	N-(1-hydroxyethyl)glycine	Nthr
D-N-methylhistidine	Dnmh is	N-(hydroxyethyl)glycine	Nser
D-N-methylisoleucine	Dnmil e	N-(imidazolethyl)glycine	Nhis
D-N-methylleucine	Dnml eu	N-(3-indolylethyl)glycine	Nhtrp
D-N-methyllysine	Dnml ys	N-methyl- γ -aminobutyrate	Nmgabu
N-methylcyclohexylalanine	Nmch exa	D-N-methylmethionine	Dnmmt
D-N-methylornithine	Dnmo m	N-methylcyclopentylalanine	Nmpen
N-methylglycine	Nala	D-N-methylphenylalanine	Dnmphe
N-methylaminoisobutyrate	Nmai b	D-N-methylproline	Dnmpro
N-(1-methylpropyl)glycine	Nile	D-N-methylserine	Dnmser
N-(2-methylpropyl)glycine	Nleu	D-N-methylthreonine	Dnmthr
D-N-methyltryptophan	Dnmtr p	N-(1-methylethyl)glycine	Nval
D-N-methyltyrosine	Dnmt yr	N-methyl-naphthylalanine	Nmanap
D-N-methylvaline	Dnmv al	N-methylpenicillamine	Nmpen
γ -aminobutyric acid	Gabu	N-(<i>p</i> -hydroxyphenyl)glycine	Nhtyr
L- <i>t</i> -butylglycine	Tbug	N-(thiomethyl)glycine	Ncys
L-ethylglycine	Etg	penicillamine	Pen
L-homophenylalanine	Hphe	L- α -methylalanine	Mala
L- α -methylarginine	Marg	L- α -methylasparagine	Masn
L- α -methylaspartate	Masp	L- α -methyl- <i>t</i> -butylglycine	Mtbug
L- α -methylcysteine	Mcys	L-methylethylglycine	Metg
L- α -methylglutamine	Mgin	L- α -methylglutamate	Mglu
L- α -ethylhistidine	Mhis	L- α - methylhomophenylalanine	Mhphe
L- α -thylisoleucine	Mile	N-(2-methylthioethyl)glycine	Nmet
L- α -methylleucine	Mleu	L- α -methyllysine	Mlys
L- α -methylmethionine	Mmet	L- α -methylnorleucine	Mnle
L- α -methylnorvaline	Mnva	L- α -methylornithine	Morn
L- α -methylphenylalanine	Mphe	L- α -methylproline	Mpro
L- α -methylserine	mser	L- α -methylthreonine	Mthr
L- α -ethylvaline	Mtrp	L- α -methyltyrosine	Mtyr
L- α -methylleucine	Mval Nnbhm	L-N- methylhomophenylalanine	Nmhph
N-(N-(2,2-diphenylethyl) carbonylmethyl-glycine	Nnbh m	N-(N-(3,3-diphenylpropyl) carbonylmethyl(1)glycine	Nnbhe
1-carboxy-1-(2,2-diphenyl ethylamino)cyclopropane	Nmbc		

<92>

<93> 본 발명의 분리된 폴리펩타이드류는 표준 고상 기술을 사용하는 것과 같이 생화학적으로 합성될 수 있다. 이러한 방법들은 배타적 고상 합성법, 부분 고상 합성법, 단편 축합법, 전통적인 용액 합성법들을 포함한다. 이러한 방법들은 바람직하게는, 재조합 기술 (예, 핵산 서열에 의해 암호화되지 않은)에 의해서 생성될 수 없고 따라서 상이한 화학을 포함하는 경우 또는 짧은 펩타이드류를 합성할 때, 사용된다.

<94> 고상 폴리펩타이드 합성 과정은 당해 분야에 공지되어 있고, John Morrow Stewart 및 Janis Dillaha Young, Solid Phase Polypeptide Syntheses (2판, Pierce Chemical Company, 1984)에 더 상세히 기술되어 있다.

<95> 합성 폴리펩타이드류는 예비 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있고 [Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and Co. N.Y.] 및 이의 조성은 아미노산 시퀀싱을 통해 확인될 수 있다.

<96> 재조합 기술들을 사용하여 본 발명의 분리된 폴리펩타이드류를 생성하는 것이 바람직한데 이는 이러한 기술들이 상대적으로 긴 폴리펩타이드류 (예를 들어, 20 개가 넘는 아미노산들) 및 이의 많은 양을 생성하기에 더 적합하기 때문이다. 그러한 재조합 기술들은 Bitter 등, (1987) Methods in Enzymol. 153:516-544, Studier 등. (1990) Methods in Enzymol. 185:60-89, Brisson 등. (1984) Nature 310:511-514, Takamatsu 등. (1987) EMBO J. 6:307-311, Coruzzi 등. (1984) EMBO J. 3:1671-1680 and Brogli 등., (1984) Science 224:838-843, Gurley 등. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565 및 Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463에 의해 설명되어 있다.

<97> 이러한 기술들을 사용하여 본 발명의 폴리펩타이드를 시험관 내에서, 생체 외에서 및 생체 내에서 생성할 수 있다 (두 개의 후자는 하기에 더 설명된다).

<98> 재조합 기술을 사용하여 본 발명의 분리된 HIF-1 α 폴리펩타이드를 생성하기 위해, 그러한 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 사용할 수 있다. 예증적 핵산 서열은 서열 번호 1

에 설정되어 있다.

- <99> 용어 "핵산 서열"은 천연적으로 발생하는 염기, 당 및 공유결합성 뉴클레오시드 간 연결 (예를 들어, 백본)으로 구성된 데옥시리보핵산 서열은 물론 각각의 천연적으로 발생하는 부분에 유사하게 기능하는 비천연적으로 발생하는 부분을 가진 올리고뉴클레오시드들을 지칭한다. 그러한 돌연 변이들은 본 발명에 의해 사용될 수 있는 데 재조합 발현이 여전히 허용되는 경우에 그러하다.
- <100> 본 발명의 이러한 관점에 따른 HIF-1 α 의 핵산 서열은 상보적 폴리뉴클레오타이드 서열 (cDNA), 게놈성 폴리뉴클레오타이드 서열 및/또는 복합 폴리뉴클레오타이드 서열 (예를 들어, 상술한 것들의 조합)일 수 있다.
- <101> 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "상보적 폴리뉴클레오타이드 서열"은 역전사효소 또는 임의의 다른 RNA 의존성 DNA 폴리머라제를 사용하여 메신저 RNA의 역전사의 결과로 파생된 서열을 지칭한다. 그러한 서열은 후속적으로 DNA 의존성 DNA 폴리머라제를 사용하여 생체 내 또는 시험관 내에서 증폭될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "게놈성 폴리뉴클레오타이드 서열"은 염색체로부터 유래한 (분리된) 서열을 지칭하는 것으로, 따라서 이것은 염색체의 연속적인 부분을 표시한다.
- <102> 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "복합 폴리뉴클레오타이드 서열"은 적어도 부분적으로 상보적이고 적어도 부분적으로 게놈성인 서열을 지칭한다. 복합 서열은 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 데 필요한 임의의 엑손성 서열들은 물론 이들 사이에 끼어 있는 임의의 인트론성 서열을 포함할 수 있다. 상기 인트론성 서열들은 다른 유전자를 포함하는 임의의 소스에서 나올 수 있고 전형적으로는 보존된 스플라이싱 신호 서열을 포함할 것이다. 그러한 인트론성 서열들은 시스-작용 발현 조절 요소들을 더 포함할 수 있다. 재조합 기술을 사용하여 본 발명의 HIF-1 α 폴리펩타이드류를 생성하기 위해, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드류를 핵산 발현 벡터에 결합하여, 상기 폴리뉴클레오타이드 서열이 시스 조절 서열 (예를 들어, 프로모터 서열)의 전사적 제어 하에 놓이게 한다.
- <103> 다양한 원핵 또는 진핵 세포를 호스트-발현 시스템으로 사용하여 본 발명의 폴리펩타이드류를 발현시킬 수 있다. 이러한 것들은 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하고 있는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA로 형질전환된 박테리아; 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하고 있는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모; 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는, 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 양배추 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)에 의해 감염된, 또는 Ti 플라스미드와 같은 재조합 플라스미드 발현 벡터로 형질전환된 식물 세포 시스템과 같은 미생물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- <104> 본 발명의 이러한 구체예에 사용하기에 적합한 구성적 프로모터들은 가장 환경적 조건 및 사이코메갈로바이러스 (CMV) 및 라우스 사르코마 바이러스 (RSV)와 같은 대부분의 세포 타입 하에서 기능되는 (예를 들어, 전사를 이행할 수 있는) 서열을 포함한다.
- <105> 본 발명의 이러한 구체예에 사용되기에 적합한 유도성 프로모터들은 테트라사이클린-유도성 프로모터를 포함한다 (Sroub, M.A., 등., 2003. *Thromb. Haemost.* 90: 398-405).
- <106> 본 발명의 이러한 구체예에 따른 발현 벡터는 이러한 벡터가 원핵생물, 진핵생물 또는 바람직하게는 둘 다에서 (예를 들어 서틀 벡터) 복제 및 통합하기에 적합하게 만드는 추가의 서열을 포함할 수 있다. 전형적인 클로닝 벡터들은 전사 및 번역 개시 서열들 (예를 들어, 프로모터들, 인핸서들) 및 전사 및 번역 종결자 (예를 들어 폴리아데닐화 신호들)를 포함한다.
- <107> 진핵성 프로모터들은 두 가지 형태의 인지 서열, TATA 박스 및 상류 프로모터 요소를 포함한다. TATA 박스는 전사 개시 위치에서 25-30 염기쌍 상류에 위치하고 있고, RNA 폴리머라제를 RNA 합성을 개시하게끔 지시하는데 연관된다고 판단되고 있다. 다른 상류 프로모터 요소들은 전사가 개시되는 속도를 결정한다.
- <108> 인핸서 요소들은 연계된 상동 또는 이중 프로모터로부터 1,000 배나 높게 전사를 자극할 수 있다. 인핸서들은 전사 개시 위치로부터 하류 또는 상류에 놓여 있을 활성적이다. 바이러스로부터 유도된 많은 인핸서 요소들은 광범위한 숙주 범위를 가지며 다양한 조직에서 활성적이다. 예를 들어, SV40 초기 유전자 인핸서는 많은 세포 유형에 적합하다. 본 발명에 적합한 다른 인핸서/프로모터 조합들은 폴리오마 바이러스, 인간 또는 쥐 사이토메갈로바이러스 (CMV)로부터 유도되는 것들, 쥐 백혈병 바이러스, 쥐 또는 루우스 사르코마 바이러스 및 HIV와 같은 다양한 레트로바이러스로부터의 긴 반복체를 포함한다. 참조. *Enhancers and Eukaryotic Expression*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1983, 이는 본 출원서에 참조 문헌으로 기재된다.

- <109> 본 발명의 발현 벡터로부터 발현된 폴리펩타이드의 번역 효율을 증가시키기 위해 폴리아데닐화 서열들은 또한 발현 벡터에 첨가될 수 있다. 두 개 명확한 서열 요소가 정확하고 효과적인 폴리아데닐화에 요구된다: 상기 폴리아데닐 위치로부터 하류에 위치한 GU 또는 U가 많은 서열들 및 11-30 뉴클레오타이드 상류에 위치한, 6 개 뉴클레오타이드 AAUAAA의 매우 보존적인 서열이다. 본 발명에 적합한 종결 및 폴리아데닐화 신호들은 SV40으로부터 유도된 것들을 포함한다.
- <110> 진술한 요소에 더하여, 본 발명의 발현 벡터는 일반적으로, 클론된 핵산의 발현 수준을 높이려고 또는 재조합 DNA를 운반하는 세포의 동정을 용이하게 하는 다른 특수 요소를 포함한다. 예를 들어, 많은 동물 바이러스들은 허용된 세포 유형에서 바이러스성 게놈의 여분의 염색체성 복제를 촉진하는 DNA 서열들을 포함한다. 이러한 바이러스성 리플리콘을 가지는 플라스미드들은, 적절한 인자들이 플라스미드 상에 있는 유전자에 의해 또는 숙주 세포의 게놈으로 제공받는 한, 에포좀적으로 복제된다.
- <111> 상기 벡터는 진핵성 리플리콘을 포함할 수도 안 할 수도 있다. 진핵성 리플리콘이 존재한다면, 상기 벡터는 적절한 선택 마커를 이용하여 진핵 세포에서 증폭될 수 있다. 상기 벡터가 진핵성 리플리콘을 포함하지 않는다면, 어떠한 에포솜의 증폭도 가능하지 않다. 대신에, 재조합 DNA가 상기 프로모터가 원하는 핵산의 발현을 지시하는 공학적으로 조작된 세포의 게놈 속으로 통합된다.
- <112> 본 발명의 발현 벡터는, 예를 들어, 내부 리보솜 입구 위치 (IRES)와 같은 단일 mRNA로부터 수 개의 단백질을 번역하는 것을 허용하는 추가의 폴리뉴클레오타이드 서열 및 프로모터-키메라 폴리펩타이드의 게놈성 통합을 위한 서열을 더 포함할 수 있다.
- <113> 포유동물 발현 벡터용의 예는 인비트로젠(Invitrogen)으로부터 구입할 수 있는 pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, Promega로부터 구입할 수 있는 pCI, 스트라타젠(Stratagene)으로부터 구입할 수 있는 pBac, pPbac, pBK-RSV 및 pBK-CMV, 클론테크(Clontech)로부터 구입할 수 있는 pTRES 및 이의 유도체를 포함하지만, 이에 한정하지 않는다.
- <114> 레트로바이러스와 같은 진핵성 바이러스로부터 얻은 조절 요소를 포함하는 발현 벡터들은 또한 본 발명에서 사용될 수 있다. SV40 벡터들은 pSVT7 및 pMT2을 포함한다. 소 유두종 바이러스로부터 유도된 벡터들은 pBV-IMTHA을 포함하고, 엡스타인 바 (Epstein Barr) 바이러스로부터 유도된 벡터들은 pHEBO, 및 p205를 포함한다. 다른 예증적 벡터들은 pMSG, pAV009/A+, pMT010/A+, pMAMneo-5, 마칼로바이러스 pDSVE, 및 SV-40 초기 프로모터, SV-40 후기 프로모터, 메탈로티오네인(metallothionein) 프로모터, 쥐의 유선 종양 바이러스 프로모터, 라우스 사르코마 바이러스 프로모터, 폴리헤드린 프로모터, 또는 진핵 세포에서 발현에 효과적이라고 나타나는 다른 프로모터의 지시하에서 단백질 발현을 허용하는 임의의 다른 벡터를 포함한다.
- <115> 다양한 방법들을 사용하여 본 발명의 발현 벡터를 세포로 유입시킬 수 있다. 그러한 방법들은 일반적으로 Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), Ausubel 등., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang 등, Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega 등, Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988), 및 Gilboa 등. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]에 설명되어 있고, 예를 들어, 안정된 또는 일시적 형질감염, 리포펙션, 전기천공법, 및 재조합 바이러스성 벡터로 감염시키는 것을 포함한다. 양성-음성 선택 방법에 대하여는 미합중국 특허 번호 제 5,464,764 호 및 제 5,487,992 호를 참조할 수 있다.
- <116> 많은 양의 재조합 폴리펩타이드를 발현하게 하는, 효과적인 조건 하에서 형질전환된 세포를 배양한다. 효과적인 배양 조건은, 단백질 생성을 허용하는 효과적인 배양액, 생물반응기, 온도, pH 및 산소 조건을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 효과적인 배양액은 세포가 배양되어 본 발명의 재조합 폴리펩타이드를 생성하는 임의의 배양액을 지칭한다. 그러한 배양액은 일반적으로, 동화될 수 있는 탄소, 질소 및 인산 원, 및 적절한 염, 미네랄, 금속 및 비타민과 같은 다른 영양분을 가지는 수용액을 포함한다. 본 발명의 세포는 통상적인 발효 생물반응기, 진탕 플라스크, 시험관, 마이크로적정 접시 및 페트리 판에서 배양될 수 있다. 배양하는 것은 재조합 세포에 적절한 온도, pH 및 산소 농도에서 수행될 수 있다. 그러한 배양 조건은 당해 분야의 통상의 기술을 가진 자의 기술 내에 있다.
- <117> 상기 삽입된 암호화 서열 (상기 폴리펩타이드를 암호화하는)의 전사 및 번역에 필요한 요소를 함유하는 것

외에, 본 발명의 발현 작제물은 또한 상기 발현된 폴리펩타이드의 안정성, 생성, 정제, 수율 또는 활성을 최적화시키는 데 공학적으로 조작된 서열들을 포함할 수 있다.

- <118> 생성에 사용된 벡터 및 호스트 시스템에 따라서, 본 발명의 결과된 폴리펩타이드류는 제조합 세포 내에 머무를 수 있고, 발효 배양액으로 분비될 수 있고, E. coli에서 원형질막 주위 공간 (periplasm)과 같이 두 개의 세포막 사이의 공간으로 분비될 수 있고 ; 또는 세포의 외부 표면상에 또는 바이러스 막 상에 남아 있을 수 있다.
- <119> 배양으로 일정 시간을 보낸 후, 상기 제조합 폴리펩타이드를 회수한다.
- <120> 용어 "제조합 폴리펩타이드를 회수하는 것"은, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 상기 폴리펩타이드를 함유하는 전체 발효 배양액을 수집하는 것을 지칭하며 분리 또는 정제의 추가의 단계를 내포할 필요는 없다.
- <121> 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드류는 친화 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 여과, 전기영동, 소수성 상호작용 (hydrophobic interaction) 크로마토그래피, 젤 여과 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 콘카나발린 (concanavalin) A 크로마토그래피, 크로마토포커싱(chromatofocusing) 및 차등 용해화와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는, 다양한 일반적인 단백질 정제 기술을 사용하여 정제될 수 있다.
- <122> 용이하게 회수하기 위해, 상기 발현된 코딩 서열을 조작하여 본 발명의 폴리펩타이드 및 융합된 절단가능한 분체를 암호화하게 할 수 있다. 그러한 융합 단백질은 상기 폴리펩타이드가 친화 크로마토그래피에 의해 손쉽게 분리되도록; 예를 들어, 상기 절단 가능한 분체에 특이성인 컬럼 상에 부동화시킴으로써 분리되도록 고안될 수 있다. 절단 장소가 상기 폴리펩타이드 및 상기 절단 가능한 분체 사이에서 조작되어 있는 경우, 상기 폴리펩타이드는 이러한 위치에서 상기 융합 단백질을 특이적으로 절단하는 적절한 효소 또는 제제로 처리함으로써 크로마토그래피 컬럼으로부터 방출될 수 있다 [예를 들어, 참조 Booth 등., Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); 및 Gardella 등, J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)].
- <123> 본 발명의 폴리펩타이드류를 생성한 후, 변이 형태를 특이적으로 인식하지만 천연 형태는 인식하지 않는 항체들을 생성할 수 있다. 그러한 항체들은 이의 발현을 증명하는데 유용할 수 있다.
- <124> 본 발명의 폴리펩타이드류는 혈관 형성적 효과를 포함하기 때문에, 이들은 허혈증과 연관된 질병 또는 상태를 치료하는 데 사용될 수 있다.
- <125> 따라서, 본 발명의 다른 관점에 따라서, 허혈증과 연관된 질병 또는 상태를 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은 필요한 대상자에게 본 발명의 폴리펩타이드류를 상향 조절할 수 있는 제제를 치료적으로 유효한 양을 투여하는 것을 포함한다.
- <126> 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료하는 것"은 혈관형성-관련 질환에 연관된 증상을 예방, 완화 또는 감소시키는 것을 지칭한다. 바람직하게는, 혈관형성 관련 질환과 연관된 증상을 치유, 예를 들어, 실질적으로 없애는 것을 의미한다.
- <127> 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대상자"는 임의의 (예, 포유동물) 대상자이고, 바람직하게는 인간 대상자이다.
- <128> 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "저산소증"은 감소된 산소의 상태를 지칭한다. 이러한 것은 폐가 손상되었거나 혈류가 감소되는 경우 일어난다.
- <129> 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "허혈증"은 혈류의 감소를 지칭하는 것으로, 이것은 피떡에 의한 (혈전), 임의의 외부 순환 물질에 의한 (색전), 또는 동맥경화와 같은 혈관 질환에 의한 혈동맥 또는 정맥의 방해로 일어날 수 있는 것이다. 다르게는, 허혈증은 동맥이 방해되지 않았지만, 산소에 대한 타겟 조직 요구량이 공급에 비하여 상대적으로 증가될 때 발생할 수 있다. 혈류에서의 감소는 갑작스럽게 시작되고 짧게 지속될 수 있거나 (급성 허혈증) 또는 느리게 개시되고 길게 지속되거나 또는 빈번하게 나타날 수 있다 (만성 허혈증). 급성 허혈증은 종종, 국소적이고, 비가역적 조직 괴사와 관련되고 (경색), 반면에 만성 허혈증은 통상적으로 일시적 저산소증 손상과 연관이 있다. 관류의 감소가 연장되거나 또는 심각해질 경우, 그러나, 만성 허혈증도 경색과 연관될 수 있다. 경색되는 것은 통상적으로 비장, 신장, 폐, 뇌 및 심장에서 일어나며, 내장 경색, 폐 경색, 허혈성 뇌졸중 및 심근 경색과 같이 질환을 야기한다.
- <130> 본 발명은 따라서 급성, 일시적 또는 만성이든지 간에, 임의의 허혈성 사건과 관련된 의학적 상태를 치료하는 것에 적용되는 방법에 관한 것이다. 급성 허혈성 사건은 수술, 장기 이식, 경색 (예, 뇌, 내장, 심근, 폐 등), 외상, 모욕 또는 상해 등과 관련된 것들을 포함할 수 있다. 허혈증과 연관된 만성적 사건들은 고혈압, 당뇨병,

폐색성 동맥 질환, 만성 정맥 부전증, 레이노 병 (Raynaud's disease), 간경변, 선천성 심장 질환, 전신성 경화증 등을 포함할 수 있다.

- <131> 허혈증과 연관된 다른 질병 또는 질환들은 상처 치유, 위내장 병변, 자가면역 질환 및 신경변성 질환을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- <132> 특수 조건의 예는, 상처 치유, 허혈성 발작, 허혈성 심장 질환, 말초 혈관 질환, 신장 동맥 질환, 위내장 병변, 화상, 피부 이식, 혈관 이식물, 장기 재생(예, 생체 외 및 생체 내), 골 회복 질환, 간질환, 자궁 질환, 망막 혈관형성 질환, 골 재생 질환, 연골 재생 질환, 및 평활근 세포 질환을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- <133> 일 구체예에 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드류를 상향 조절할 수 있는 제제는 본 발명의 HIF-1 α 폴리펩타이드류이다, 즉 상기 폴리펩타이드류를 생성하고 후속적으로 대상체에 투여한다. 본 발명의 분리된 폴리펩타이드류를 생성하는 방법은 상기 설명되어 있다.
- <134> 본 발명의 HIF-1 α 폴리펩타이드류가 혈관형성의 위치 (즉 내피세포를 증식하는 것)에 제공되는 것이 바람직하게 때문에, 바람직하게는 상기 폴리펩타이드류를 국소적으로 전달하거나 또는 타겟된 전달 시스템 (즉, 타겟된 리포솜)을 포함한다.
- <135> 본 발명의 HIF-1 α 폴리펩타이드류를 혈관형성의 위치에 타겟하는 특히 바람직한 방법은 타겟된 유전자 요법에 의한 것이다.
- <136> 유전자 요법은, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 관심의 유전성 물질 (예, DNA 또는 RNA)를 호스트에 전달하여 유전적인 또는 후천적인 질병, 상태 또는 표현형을 치료하는 것을 지칭한다. 관심의 유전 물질은 생체 내 생성이 요구되는 생성물(예, 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드, 기능적 RNA5 안티센스)를 암호화하고 있다. 예를 들어, 관심의 유전 물질은 치료적 가치가 있는 호르몬, 수용체, 효소, 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 암호화할 수 있다. 검토용으로, 일반적으로, "Gene Therapy" (Advanced in Pharmacology 40, Academic Press, 1997)를 참조할 수 있다.
- <137> 유전자 요법에 대한 두 가지 기본적인 방식이 개발되었다: (1) 생체 외 및 (2) 생체 내 유전자 요법. 생체 외 유전자 요법에서, 세포를 환자로부터 얻어서 시험관 내에서 배양하면서 치료한다. 일반적으로, 기능적으로 대체된 유전자가 적절한 유전자 전달 담체/방법 (형질감염, 형질유도, 상동적 재조합 등) 및 필요한 만큼 발현 시스템을 통해 상기 세포로 도입되고 난 후, 그 개질된 세포를 배양액에서 증폭시키고 상기 호스트/환자에게 되돌리는 것이다. 이러한 유전적으로 재이식된 세포들은 그 자리에서 형질감염된 유전 물질을 발현하는 것으로 나타나고 있다. 상기 세포는 상기 대상체에 자가성이거나 비자가성일 수 있다. 비자가 유래된 세포들은 몸체에 투여시 면역 반응을 유도하기 쉽기 때문에, 몇 가지 방법이 개발되어 비자가성 세포의 거부 경향을 감소시켰다. 이러한 것들은 수용체 면역 시스템을 억제하거나, 비자가성 세포를 이식 전에 면역분리 (immunisolating) 반투과막으로 감싸는 것이다.
- <138> 생체 내 유전자 요법에서는, 타겟 세포들을 대상체로부터 제거하는 것이 아니고, 전달될 유전 물질을 수용자 유기체의 세포로 그 자리로, 즉 수용체 내로 유입된다. 다른 구체예에서는, 호스트 유전자가 결함이 있으면, 상기 유전자를 그 자리에서 고친다(Culver, 1998. (Abstract) Antisense DNA & RNA based therapeutics, February 1998, Coronado, CA).
- <139> 이러한 유전적으로 변경된 세포들은 형질감염된 유전 물질을 그 자리에서 발현하는 것으로 나타난다.
- <140> 특이성을 부여하기 위해, 바람직하게는 본 발명의 폴리펩타이드류를 발현시키는 데 사용되는 핵산 작제물은 내피 세포-특이성 프로모터 서열 요소를 포함한다. 상기 내피세포 특이성 프로모터 요소는, 예를 들어, 서열 번호 4에 설정된 PPE-1 프로모터의 적어도 하나 복사본을 포함할 수 있다. 본 발명의 핵산 작제물에 의해 이용될 수 있는 적합한 프로모트/인핸서의 예는 내피세포-특이성 프로모터: 프리프로엔도텔린-1, PPE-I 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(1 1):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 [Y1 1653; Rius C, Blood 1998 Dec 15;92(12):4677-90], 폰 빌레브란트 인자 [AF152417; Collins CJ Proc Natl Acad Sci U S A 1987 Jul;84(13):4393-7], KDR/flk-1 프로모터 [X89777, X89776; Ronicke V, Circ Res 1996 Aug;79(2):277- 85], FLT-I 프로모터 [D64016 AJ224863; Morishita K, : J Biol Chem 1995 Nov 17;270(46):27948-53], Egr-1 프로모터 [AJ245926; Sukhatme VP, Oncogene Res 1987 Sep-Oct;1(4):343-55], E-셀렉틴 프로모터 [Y12462;Collins T J Biol Chem 1991 Feb 5;266(4):2466-73], 내피성 부착 분자 프로모터들 (endothelial adhesion molecule

promoters): ICAM-I [X84737; Horley KJ EMBO J 1989 Oct;8(10):2889-96], VCAM-I [M92431; Iademarco MF, J Biol Chem 1992 Aug 15;267(23):16323-9], PECAM-I [AJ313330 X96849; CD31, Newman PJ, Science 1990 Mar 9;247(4947): 1219-22], 혈관 평활근 특이성 요소 (vascular smooth-muscle-specific elements): CarG box X53154 및 동맥 카르복시펩티다제-유사 단백질 (aortic carboxypeptidase-like protein (ACLP) 프로모터 [AF332596; Layne MD, Circ Res. 2002; 90: 728-736] 및 동맥 우선 발현 유전자 (Aortic Preferentially Expressed Gene)-1 [Yen-Hsu Chen J. Biol. Chem., Vol. 276, Issue 50, 47658-47663, December 14, 2001] 을 포함한다. 다른 적합한 내피세포 특이성 프로모터들은, 예를 들어, EPCR 프로모터 (미국 특허 제 6,200,751호 Gu 등에 발행) 및 VEGF 프로모터(미국 특허 출원 공개 제 5,916,763호 Williams 등에 발행)과 같이 당해 분야에 공지되어 있다.

- <141> 바람직하게는, 본 발명의 핵산 작제물은 저산소증 반응 요소, 예를 들어, 서열 번호 5에 설정된 서열의 적어도 하나 복사본을 더 포함한다. HIF-1은 그러한 반응 요소와 결합하기 때문에, 그러한 반응 요소의 조절 하에서 발현된 HIF-1 α 도입유전자(transgene)는, 차례로, 상기 프로모터를 더 활성화시켜야 하며, 따라서, 양성적인 피드백 고리를 형성하여, 전사적 반응을 향상시킨다.
- <142> 생체 내 및 생체 외 양쪽 유전자 요법으로 감염시켜 핵산을 도입하는 것은 다른 방법들에 비하여 수 가지 장점을 나타내고 있다. 그들 감염 본질로 인하여 더 높은 효율이 얻어질 수 있다. 더욱이, 바이러스들은 매우 특수화되어 있고 일반적으로 특이 세포 유형을 감염시키고 거기에서 증식한다. 따라서, 이들의 자연적인 특이성을 사용하여 상기 벡터들을 특이 세포 유형으로 생체 내에서 또는 세포의 조직 또는 혼합된 배액액에서 타겟할 수 있다. 또한, 바이러스성 벡터들을 특이 수용체 또는 리간드로 개질하여 수용체 매개 사건을 통해 타겟 특이성을 변경할 수 있다.
- <143> 또한, 재조합 바이러스성 벡터들은 횡적 감염 (lateral infection) 및 특이성 타겟화와 같은 장점들을 보이기 때문에 소정의 핵산을 생체 내 발현시키는 데 유용하다. 횡적 감염은, 예를 들어, 레트로바이러스와 생애 주기에서 본래 타고난 것이고 및 단일 감염된 세포가 많은 후손 비리온들을 생성하고 이들은 나와서 인근 세포를 감염시키는 과정이다. 그 결과는 넓은 면적이 빠르게 감염된다는 것으로, 이의 대부분은 처음에는 원래 바이러스 입자에 의해 감염되지 않은 것들이다. 이것은, 감염성 인자가 오로지 딸 자손으로 통해서만 확산되는 수직 유형 감염과는 대비된다. 횡적으로 확산될 수 없는 바이러스성 벡터를 또한 생성할 수 있다. 이러한 특성은, 소망하는 목적이 타겟된 세포의 국한된 수에만 특이화된 유전자를 유입하는 것일 때, 유용할 수 있다.
- <144> 진술한 바와 같이, 바이러스들은 매우 특수화된 감염성 인자들로서, 많은 경우에, 호스트 방어 기작을 회피하도록 진화되었다. 일반적으로, 바이러스들은 특이적 세포 유형에 감염하고 증식된다. 바이러스 벡터의 타겟팅 특이성은 이의 천연적 특이성을 이용하여 소정의 세포 유형을 특이적으로 타겟하며 이에 따라 재조합 유전자를 감염된 세포로 유입시킨다. 본 발명의 방법들에 사용될 벡터는 타겟될 세포 유형에 의존하며 당해 분야의 숙련자들에게는 공지된 것이다.
- <145> 비록 후술하는 실시예에서 설명된 실험에 아데노바이러스들이 사용되었지만, 본 발명의 작제물은 당해 분야의 통상의 기술자들에 의해서 다른 바이러스성 전달 시스템으로 용이하게 적용될 수 있음이 이해될 것이다.
- <146> 레트로바이러스성 벡터들을 감염성 입자로서 기능하거나 또는 시초의 단일 감염 단계만 거치도록 제조할 수 있다. 전자의 경우, 바이러스의 계놈을 개질하여 그것이 모든 필요한 유전자, 조절 서열들 및 포장 신호를 유지하게 하여 새로운 바이러스성 단백질과 RNA를 합성하게 한다. 일단 이러한 분자들이 합성되면, 호스트 세포는 RNA를 새로운 바이러스 입자들로 포장하고 이들은 다음번의 감염을 수행할 수 있게 된다. 벡터의 계놈을 또한 조작하여 소정의 재조합 유전자를 암호화하고 발현시킨다. 비감염성 바이러스성 벡터의 경우, 일반적으로 벡터 계놈을 변이시켜 RNA를 바이러스성 입자로 캡슐화시키는 바이러스성 포장 신호를 파괴한다. 그러한 신호가 없으면, 형성되는 임의의 입자들은 계놈을 포함하지 않을 것이고, 따라서 후속적인 감염 단계로 진입할 수 없다. 상기 특이 유형의 벡터들은 의도하는 적용에 좌우된다. 실제 벡터들은 또한 당해 분야 내에서 공지되어 있고 즉시 이용가능하거나 공지된 방법을 사용하여 당해 분야에 숙련된 사람에 의해서 제작될 수 있다.
- <147> 조건적으로 복제하는 아데노바이러스성 벡터를 사용하여 세포를 형질유도하는 것은 바이러스 감염의 타겟 세포 분해 및 확산에 훨씬 더 효과적이기 때문에, 핵산 작제물은 조건적으로 복제하는 아데노바이러스를 포함할 수 있다.
- <148> 내피세포 특이성 프로모터를 함유하는, 바이러스성 벡터들은 또한 그 바이러스 벡터의 타겟팅을 향상시키는 다른 접근 방식과 조합하여 사용될 수 있다. 그러한 접근 방법은 짧은 펩타이드 리간드 및/또는 이중 특이성 또

는 이중기능성 분자 또는 이중 특이성 항체 (diabodies)를 포함한다 (Nettelbeck 등. Molecular Therapy 3:882:2001).

- <149> 본 발명의 폴리펩타이드류 및 폴리뉴클레오타이드류를 그 자체로 개별적으로 또는 약학적 허용 담체와 혼합되어 지는 약학 조성물의 부분으로서 제공될 수 있다.
- <150> 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "약학 조성물"은 본 명세서에서 설명된 하나 이상의 활성 성분과, 생리적으로 적합한 담체 및 부형제와 같이 다른 화학적 성분과의 혼합 제조물을 지칭한다. 약학 조성물의 목적은 화합물을 유기체에 투여하는 것을 용이하게 하기 위해서이다.
- <151> 본 명세서에서, 용어 "활성 성분"은 상기 생물학적 효과를 담당할 수 있는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 제조물을 지칭한다.
- <152> 후술하는 바와 같이, 용어 "생리적 허용 담체" 및 "약학적 허용 담체"는 상호 교환적으로 사용될 수 있고 유기체에 뚜렷한 자극을 야기하지 않고 투여된 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 무력화하지 않는 담체 또는 희석제를 지칭한다. 보조제는 이러한 용어의 정의 하에 있다. 약학적 허용 담체에 포함된 성분들 중 하나는 예를 들어, 유기 및 수성 매체 둘 다에 광범위한 용해성을 가진 생체적합성 폴리머인, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이다 (Mutter 등. (1979)).
- <153> 여기서, 용어 "부형제"는 활성 성분의 투여를 더 용이하게 하기 위해 약학 조성물에 첨가되는 불활성 성분을 지칭한다. 부형제의 비제한적인 예는 탄산 칼슘, 인산 칼슘, 전분의 다양한 당류와 유형, 셀룰로즈 유도체, 젤라틴, 식물성 오일 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.
- <154> 약물의 제형화 및 투여에 대한 기술은 "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, 최신판에서 설명되어 있고, 이는 본 명세서에 참조문헌으로 기재된다.
- <155> 적합한 투여 경로는, 예를 들어, 경구, 직장, 경점막 (transmucosal), 경비 (transnasal), 장관 (intestinal), 또는 근육내, 피하내, 척수내 주사는 물론 수막내, 직접적인 심실내, 정맥내, 복강내, 비강내 또는 안내 (intraocular) 주사를 포함하는 비경구 전달을 포함할 수 있다.
- <156> 대안적으로, 제조물을 전신적 방식보다는 국소적 방식, 예를 들어, 환자 몸의 특정 부위에 제조물을 직접 주사하는 것을 통해 투여할 수 있다.
- <157> 제조합 벡터를 수 가지 방식으로 투여할 수 있다. 내피 세포 특이성 프로모터를 포함하는 벡터들을 사용한다면, 예를 들어, 이들 타겟 특이성을 이용할 수 있고 결론적으로 질환 부위에 국소적으로 투여할 필요가 없다. 그러므로, 본 발명의 일 구체예에 따라서, 상기 핵산 작제물을 전신적으로 (예, 정맥내 또는 피하내) 투여할 수 있다. 실시예 5에 설명된 바와 같이, 내피 세포 특이성 프로모터와 연계된 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 전신성 방식으로 투여하면, 상기 활성 프로모터와 연계된 동일한 폴리뉴클레오타이드를 전신성 투여한 것보다 훨씬 더 높은 안전성 양상을 보이는 것은 물론 질환 부위에서 더 효과적으로 혈관형성을 촉진한다.
- <158> 바이러스성 벡터를 척수액으로 주사하는 것을, 특히 신경퇴행성 질환의 경우, 투여 방식으로서 또한 사용할 수 있다. 주사 후, 상기 바이러스성 벡터들은 이들이 주사에 적절한 타겟 특이성을 가진 세포를 인식할 때까지 순환할 것이다.
- <159> 본 발명의 약학적 조성물은 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들어, 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 당의정화, 분말화, 에멀전화, 캡슐화, 봉입화, 또는 동결건조화 방법의 수단으로 제조될 수 있다.
- <160> 본 발명에 따라서 사용되는 약학적 조성물은 약학적으로 사용될 수 있는 제조물로 상기 활성 성분을 가공하기 쉽게 하는 부형제 및 보조제를 포함하는, 하나 또는 그 이상의 생리적으로 허용가능한 담체를 사용하여 통상적인 방식으로 조제될 수 있다. 적절한 조제물은 선택되는 투여 경로에 달려있다.
- <161> 주사의 경우, 본 발명의 활성 성분들은 수용액으로, 바람직하게는, 헨크스 용액(Hank's solution), 링거액 또는 생리학적 염 완충액과 같이 생리학적으로 수용되는 완충액으로 조제될 수 있다. 경점막 투여를 위해서는, 투과될 장애물에 적합한 투과제를 조제물에 사용한다. 그러한 투과제는 일반적으로 당해 분야에 공지되어 있다.
- <162> 경구 투여의 경우, 상기 화합물들은 활성 화합물들을 당해 분야에 공지된 약학적 허용 담체와 조합함으로써 용이하게 조제될 수 있다. 그러한 담체들은 본 발명의 화합물들을 환자에 의한 경구 섭취용으로서 정제, 알약, 당의정, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로서 조제할 수 있는 것이다.

- <163> 경구용 약학적 제조물은 고품 부형제를 사용하여, 조건적으로는 필요하다면 적절한 보조제를 첨가한 후 혼합물을 파쇄하고 과립 혼합물을 가공하여 정제 또는 당의정으로 만듦으로써 제조될 수 있다. 적절한 부형제는, 특히, 락토즈, 수크로즈, 만니톨 또는 소르비톨을 포함하는 당류와 같은 충전제; 예를 들어, 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 검 트라가칸스, 메틸 셀룰로즈, 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈, 소듐 카르보메틸셀룰로즈와 같은 셀룰로즈 제조물; 및/또는 폴리비닐피롤리돈 (PVP)와 같은 생리적으로 허용되는 폴리머들이다. 조건적으로, 가교된 폴리비닐 피롤리돈, 아가 또는 알긴산이나 소듐 알지네이트와 같은 이의 염과 같은 붕해제를 첨가할 수 있다.
- <164> 당의정은 적절한 코팅물이 부여될 수 있다. 이러한 목적을 위해, 아라비아 검, 탈크, 폴리비닐 피롤리돈, 카르보폴 (carbopol) 젤, 폴리에틸렌 글리콜, 티타늄 옥사이드, 락커 용액 및 적절한 유기 용매 또는 용매 혼합물을 조건적으로 함유할 수 있는 농축된 당 용액을 사용할 수 있다. 색소 또는 염료를 정제 또는 당의정에 첨가하여 활성 화합물의 상이한 용량 조합을 확인하거나 특징 지을 수 있다.
- <165> 경구적으로 사용될 수 있는 약학적 조성물은 젤라틴으로 만든 압입식 (push-fit) 캡슐은 물론, 젤라틴과, 글리세롤이나 소르비톨과 같은 가소제로 만든 연하고, 밀봉된 캡슐을 포함한다. 상기 압입식 캡슐은 락토즈와 같은 충전제, 전분과 같은 결합제, 탈크나 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제, 및 조건적으로 안정제와 혼합하여 상기 활성 성분을 포함할 수 있다. 연질 캡슐에서, 상기 활성 성분들을 지방유, 액체 과라핀 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적절한 액체에 용해하거나 현탁할 수 있다. 이에 더하여, 안정제를 첨가할 수 있다. 경구 투여용의 모든 조제물은 선택된 투여 경로에 적합한 투여 형태로 있어야 한다.
- <166> 부갈 (buccal) 투여의 경우, 상기 조성물들은 통상적인 방식으로 조제된 정제 또는 로젠지의 형태를 취할 수 있다.
- <167> 비강 흡입을 통한 투여용으로서, 본 발명에 따른 용도의 활성 성분들은 통상적으로, 적절한, 추진체, 예를 들어, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로프로플루오로메탄, 디클로로-테트라플루오로에탄 또는 이산화탄소를 사용하여 압축 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이 분사의 형태로 전달된다. 압축된 에어로졸의 경우, 계량된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함으로써 투약 단위체를 결정한다. 젤라틴 캡슐 및 디스텐서에 사용하기 위한 카트리지는 상기 화합물과, 락토즈 또는 전분과 같은 적절한 분말 베이스와의 분말 혼합물을 함유하여 조제할 수 있다.
- <168> 본 명세서에서 설명된 제조물들은 비경구적 투여용으로, 예를 들어, 볼러스(bolus) 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구적 투여용으로 조성될 수 있다. 주사용 조제물은 단일 투여 형태, 예를 들어, 앰플 또는 조건적으로 첨가된 보존제를 가지는 다중투여 용기에 제공될 수 있다. 이러한 조성물은 유성 또는 수성 담체의 현탁액, 용액 또는 에멀전일 수 있고, 현탁화, 안정화 및/또는 분산화제와 같은 조성 체제를 포함할 수 있다.
- <169> 비경구 투여용 약학적 조성물은 수용성 형태로 있는 활성 제조물의 수용액을 포함한다. 추가로, 상기 활성 성분의 현탁액을 적절한 유성 또는 수성 기재 주사 현탁액으로서 제조할 수 있다. 적절한 친유성 용매 또는 담체는 참깨유와 같은 지방 오일, 에틸 올레이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스테르류로서 제조될 수 있다. 수성 주사 현탁액은 소듐 카복시메틸 셀룰로즈, 소르비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 높이는 물질을 포함할 수 있다. 조건적으로, 상기 현탁액은 상기 활성 성분의 용해도를 높여 고도로 농축된 용액의 제조를 가능하게 하는 적절한 안정화제 또는 체제를 또한 포함할 수 있다.
- <170> 대안적으로, 상기 활성 성분은 사용 전에, 적절한 담체, 예를 들어, 멸균된, 발열물질이 없는 물을 기반한 용액과 조성할 수 있는 분말 형태로 있을 수 있다.
- <171> 본 발명의 제조물은 또한 코코아 버터 또는 다른 글리세라이드류와 같은 통상적인 좌약 기제를 사용하여 좌약 또는 관장기 (retension enemas)와 같은 직장 조성물로 조제될 수 있다.
- <172> 본 발명의 맥락에 사용하기에 적합한 약학적 조성물은 의도한 목적을 달성하기에 효과적인 양으로 상기 활성 성분이 포함되는 조성물을 포함한다. 더욱 상세하게는, 치료적으로 효과적인 양은 질병의 증상을 방지, 완화 또는 개선하기에 또는 처리되는 대상자의 생존을 늘리는 데 유효한 활성 성분의 양을 의미한다.
- <173> 치료적으로 효과적인 양의 결정은 당해 분야의 숙련자의 능력 내에 있다.
- <174> 본 발명의 방법에 사용된 임의의 제조물에 대하여, 상기 치료적으로 효과적인 양 또는 투여량은 먼저 시험관 시험으로부터 계산될 수 있다. 예를 들어, 투여량을 동물 모델에서 조제하고 그러한 정보를 사용하여 인간에게서 유용한 투약량을 더 정확하게 결정할 수 있다.

- <175> 본 명세서에서 설명된 활성 성분들의 독성 및 치료 효능은 시험관 내에서, 세포 배양물에서 또는 실험 동물에서 표준 약학 절차를 통해 결정될 수 있다. 이러한 시험관 내 및 세포 배양 시험과 동물 연구에서 얻어진 데이터를 인간에 사용하는 투약량의 범위를 설정하는 데 사용할 수 있다. 투약량은 사용된 투약 형태 및 이용되는 투여 경로에 따라 변할 수 있다. 투여의 정확한 조성, 경고 및 투약량은 환자의 조건에 비추어 개별 의사에 의해 선택될 수 있다 [참조, 예를 들어, Fingl, 등., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p. 1].
- <176> 치료될 상태의 병세 정도 및 반응성에 의존하여, 투여하는 것은 치료 과정을 수 일 또는 수 주간 지속할 것인가 또는 치유가 될 때까지 또는 질병 상태의 완화가 일어날 때까지에 따라서 단일 또는 복수 투여일 수 있다.
- <177> 투여될 조성물의 양은, 물론, 처리될 대상체, 병세의 정도, 투여 방식, 처방 의사의 진단 등에 달려있다.
- <178> 본 발명의 폴리펩타이드류 및 폴리뉴클레오타이드류를 각 제제 자체적으로 처리하는 것에 비하여, 추가의 활성 제제와 같이 대상체에 제공하여 향상된 치료 효과를 얻을 수 있다는 것이 이해될 것이다. 그러한 요법에서, 조합 요법과 연관될 수 있는 부작용들을 회피하게 하는 수단들 (예를 들어, 상보제제를 투여하고 선택하는)을 강구해야 한다.
- <179> 양립할 수 있는 약학적 담체에 조성된 본 발명의 제조물을 포함하는 조성물을 제조하여, 적절한 용기에 담고, 및 지시 상태의 치료에 대한 표시를 붙일 수 있다.
- <180> 본 발명의 조성물은, 바람직하게는, 상기 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투약 형태를 포함할 수 있는 FDA 승인 키트와 같은 팩 또는 디스펜서 장치로 제공될 수 있다. 상기 팩은, 예를 들어, 폴리스터 팩 (blister pack)과 같은 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 상기 팩 또는 디스펜서는 투여에 대한 지시문이 동반될 수 있다. 상기 팩 또는 디스펜서는 또한 약학물의 제조사, 사용 및 판매를 규제하는 행정적 기관에 의해 발행된 형태로서, 상기 조성물 또는 인간이나 수의 투여의 형태에 대한 상기 기관의 승인을 나타내는, 통지서가 용기 내에 동봉될 수 있다. 그러한 통지서는, 예를 들어, 미합중국 식품의약국에 의해 처방 약물에 대하여 승인한 라벨의 형태 또는 승인된 삽입물 형태일 수 있다.
- <181> 본 발명의 추가적인 목적들, 장점들 및 신규한 특징들은 하기 제한적으로 의도한 것이 아닌 실시예를 궁구하면, 당해 분야에서 통상의 숙련자들에게는 명백하게 될 것이다. 또한, 본 발명의 다양한 구체예 및 관점들 각각은 상기 설명된 바와 같이 및 후술하는 청구 범위에서 청구되는 바와 같이, 하기 실시예에서 그 실험적 지지점을 발견할 것이다.
- <182> **실시예**
- <183> 이제 하기 실시예를 설명할 것이며, 이는 상기 설명된 내용과 함께 본 발명을 비 제한적 방식으로 설명하고 있다.
- <184> 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 기술 용어들 및 본 발명에서 이용된 실험실 과정들은 분자적, 생화학적, 미생물학적 및 재조합 DNA 기술을 포함한다. 그러한 기술들은 상세하게 문서에 설명되어 있다. 참조, 예를 들어, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook 등., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel 등., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson 등., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren 등. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 다음에 설명된 방법론 미국 특허 제 4,666,828 호; 4,683,202 호; 4,801,531 호; 5,192,659 호 및 5,272,057 호; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites 등. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); 이용가능한 면역분석법들은 하기 특허 및 과학 문헌에 광범위하게 설명되어 있다. 참조, 예를 들어, 미국 특허 제 3,791,932 호; 3,839,153 호; 3,850,752 호; 3,850,578 호; 3,853,987 호; 3,867,517 호; 3,879,262 호; 3,901,654 호; 3,935,074 호; 3,984,533 호; 3,996,345 호; 4,034,074 호; 4,098,876 호; 4,879,219 호; 5,011,771 호 및 5,281,521 호; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., 편집 (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., 편집 (1985); "Transcription and

Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., 편집 (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R.I., 편집 (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 등. "Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); 이 모든 문헌은 전체로서 본 명세서에 참조 문헌에 기재된다. 다른 일반적인 참조 문헌들은 이러한 서류를 통틀어 제공된다. 그곳에 있는 절차들은 당해 분야에 공지된 것으로 판단되고 독자의 편의상 제공된다. 여기에 포함된 모든 정보는 본 명세서상에 참조문헌으로 기재된다.

<185> 실시예 1

<186> 삼중 돌연변이 HIF-1 α 는 P402A P564G 및 P564A N803A 이중 돌연변이들보다 더 큰 전사적 활성을 나타낸다

<187> HIF-1 α 내에서의 점 돌연변이 P402A 및 P564G는 종양 억제자 VHL과의 상호작용을 폐기하여, 이의 후속적 프로테오솜성 분해를 막는 것으로 이미 밝혀져 있다. 이것은 정상적인 산소 상태 기간 동안 안정화된 HIF-1 α 를 결과하게 되고, 저산소성 조건과 비견할 만한 활성 수준에 이르게 된다. 유사하게도, 점 돌연변이 P564A N803A를 가지는 HIF-1 α 가 저산소성 의사 (mimetic) 철 킬레이터 (chelator) 2,2'-디피리딜로 처리 후, 정상 산소 상태에서 야생형 HIF-1 α 와 동일하게 활성적이라는 것이 증명되었다. 본 발명자는 세 가지 돌연 변이를 조합하면 변이된 HIF-1 α , 즉, '삼중 변이체'를 나타내고 이는 P402A P564G 변이체보다 더 활성적이고 P564A N803A 변이체보다 더 안정할 수 있다고, 따라서 이를 치료적 혈관생성 목적에 더 강력하게 된다는 가정을 하였다.

<188> 재료 및 방법

<189> 세포 배양: 하기 세포주들을 사용하였다: 소 동맥 내피 세포 (bovine aortic endothelial cells, BAEC)는 N. Savion (Goldschleger Eye Institute, Sheba Medical Center)로부터 증여받았다. 인간 배아 신장 세포 (human embryonic kidney cells, HEK293)는 ATCC (American Type Culture Collection) (Rockville, Maryland, USA)로부터 구입하였다. 293 세포를 20-26 계대 배양하여 사용하였다. HeLa 세포는 Y. Keisary (Tel Aviv University)로부터 증여받았다. 인간 제대 정맥 EC (HUVECs)는 기술된 바와 같이 생성되었다 [Jaffe, E.A., 등, J Clin Invest 52, 2745-56 (1973)]. 신장 세포 암종 (renal cell carcinoma, RCC) 세포들은 G. Lavi. (Angiogenesis Institute, Sheba Medical Center)로부터 증여받았다. BAEC, HEK293 세포 및 RCC를 10% FCS, 2 mM 글루타민 및 100 U/ml 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM에서 배양하였다. HeLa 세포는 10% FCS 및 100 U/ml 페니실린/스트렙토마이신으로 보충된 MEM 배지에서 배양되었다. HUVEC은 EGM-2 및 2 % FCS (Clonetics, San-Diego, California, USA)에서 유지되었다. 모든 세포들은 에서 5 % CO₂-가습 배양기 내에서 37°C로 유지되었다.

<190> 발현 작제물: pEF-bos 플라스미드 내에 있는 야생형 HIF-1 α 및 P564A N803A HIF-1 α 변이를 M. Whitelaw (Adelaide University)로부터 얻었다. P402A P564G HIF-1 α 변이를 함유하고 있는 pcDNA3 플라스미드를 PJ. Ratcliffe (Oxford University)으로부터 얻었다. pCR3.1-H A-FIH-I 안티센스 플라스미드를 G. Semenza (Johns Hopkins University)으로부터 얻었다. p2.1 HRE-루시페라제를 ATCC (American Type Culture Collection) (Rockville, Maryland, USA)로부터 구입하였고 이에 대하여는 이미 기술되어 있다 [Mahon, P.C., 등., Genes Dev 15, 2675-86 (2001)].

<191> 플라스미드 SV40- β -gal를 Promega (Madison WI, USA)로부터 구입하였다. 삼중 돌연변이 HIF-1 α 를 P564A N803A HIF-1 α 변이를 Bsu26I/NotI으로 절단하여 얻은 단편물을 Bsu26I/NotI 절단 P402A P564G HIF-1 α 벡터에 삽입하여 제작하였다. 상기 플라스미드의 무흠결 온전성은 DNA 시퀀싱으로 확인하였다. 형질감염 실험을 위해, 야생형 및 변이 HIF-1 α cDNA를 pcDNA3 벡터에 서브클론 하였다 (InvitrogenCorp., Carlsbad, California, USA).

<192> 일시적 형질감염 실험: HEK 293, BAEC 및 RCC 세포를 24-웰 플레이트 상에서 삼 겹으로 배치하고 리포펙타민 플러스 (Lipofectamine Plus) 시약 (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA)을 제조사의 지침에 따라 사용하여 200 ng p2.1 HRE-luciferase, 100 ng pSV40- β -gal 및 pcDNA3 빈 (empty) 벡터, 야생형 HIF-1 α , P402A P564G, P564A N803A 또는 삼중 변이의 각 100 ng로 공동 형질감염시켰다. FIH-I 안티센스 실험에 대해서는, 리포펙타민 플러스 시약을 사용하여 100 ng p2.1 HRE-luciferase, 100 ng pSV40- β -gal, 100 ng의 pcDNA3 빈 벡터, 야생형 HIF-1 α , P402A P564G, P564A N803A 또는 삼중 변이 및 0-400 ng의 pcDN A3 -HA-FIH-I 안티센스 또는 pcDNA3로 형질감염을 실시하였다. 48시간 후, 루시페라제 및 β -gal 활성을 β -gal 어세이 시스템

(Promega, Madison WI, USA)을 제조사 지침에 따라 사용하여 조사하였다. 후속적으로, 터너 루미노미터 (Turner Luminometer) 모델 20e (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하여 루시퍼라제를 측정하였다. β-gal 농도를 사용하여 루시퍼라제 활성 결과를 형질감염 효율에 대하여 표준화하였다. HeLa에서의 RT-PCR 실험의 경우, 상기 다양한 플라스미드들을 300 ng 사용하여 24-웰 플레이트 상에서 리포펙타민 플러스 시약으로 형질감염시켰다. 폴리마그 (Polymag) (ChemiceLL, GmbH, Berlin, Germany)를 제조사의 지침에 따라 사용하여, 60 mm 접시에서 배양된 HUVEC에 플라스미드들을 자기감염 (magnofection) 시켰다. 지시된 바와 같이, 150 μM 2,2'-디피리달을 세포 용해 16 시간 전에 처리하였다.

<193> **루시퍼라제 및 β-갈락토시다제 분석:** β-gal 분석 시스템 (Promega, Madison WI USA)을 제조사 지침에 따라 사용하여 루시퍼라제 및 β-gal 활성을 분석하였다. β-gal 수준을 사용하여 루시퍼라제 활성 결과를 형질감염 효율에 대하여 표준화하였다.

<194> **RT-PCR 분석:** 형질감염 48 시간 후, 세포를 용해하고 전체 RNA를 키트 (RNeasy miniprep kit, Qiagen, Valencia, CA)를 제조사의 지침에 따라 사용하여 분리하였다. 다음, RNA를 FastStart PCR Master 키트 (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 cDNA로 역전사하였다. 하기 유전자에 대하여 반-정량성 (semi-quantitative) RT-PCR을 실시하였다: HIF-1α, GAPDH, VEGF, 카르본 안하이드라제 9 (CA-9) 및 PDGF-B. 프라이머, 어닐링 온도 및 사이클 수를 하기 표 3에 상세하게 기재하였다.

<195> **표 3**

유전자	프라이머 및 서열번호	어닐링 온도 (°C)	주기 수
HIF-1α	순방향:GTCGGACAGCCTACCAACAGAG 서열번호 6 역방향:GTAACTTGATCCAAAGCTCTGAG 서열번호 7	60	24
CA-9	순방향:CACGTGGTTCACCTCAGCAC 서열번호 8 역방향:방향:CAGCGATTTCTTCCAAGCG 서열번호 9	60	30
VEGF	순방향:CAGCGCAGCTACTGCCATCCAATCGAGA 서열번호 10 역방향:GCTTGTCACATCTGCAAGTACGTTTCGTTTA 서열번호 11	59	34
PDGF-B	순방향:ATCGCCGAGTGCAAGACGCG 서열번호 12 역방향:AAGCACCATTGGCCGTCGA 서열번호 13	60	34
GAPDH	순방향:역방향:방향:CACAGTCCATGCCATCAC 서열번호 14 역방향:TCCACCACCCTGTTGCTGTA 서열번호 15	60	24

<197> **결과**

<198> 인간 배아 신장 293 (HEK293) 및 소 동맥 내피 세포 (BAEC) 둘 다에서, 일시적으로 형질감염된 삼중 변이 HIF-1α는 정상 산소 상태에서 P402A P564G 및 P564A N803A 이중 변이에 비하여 전사 활성이 2 내지 2.5 배 증가하였다 (도 1A-B).

<199> 상기 삼중 변이는 또한 HIF-1α 타겟 유전자의 mRNA 유도를 더 높게 나타낸다. 이를 이해, 상이한 변이체로 HeLa 세포의 일시적 형질감염시킨 후, mRNA 추출 및 RT-PCR 분석을 실시하였다. 도 1C에 나타난 바와 같이, HIF-1α 작계물로 형질감염된 모든 세포에서의 HIF-1α의 mRNA는 후속 형질감염에서 예상되듯이, 비어있는 (empty) 벡터 대조군과 비견되고 및 훨씬 더 높다. 기존의 결과와 일치하는바, 상기 삼중 변이 HIF-1α은 HIF-1α 타겟 유전자들인 카르본 안하이드라제 9 (CA-9), VEGF 및 PDGF-B의 mRNA를 상기 이중 변이체들 및 야생형 HIF-1α보다 더 크게 유도하게 한다. VHL에 의해 매개되는 P564A N803A 변이체의 단백질 분해는 이론적으로는 여전히 프롤릴 하이드록실화에 노출되어 있는 그의 P402 잔기로 인하여 발생할 수 있다. 상기 삼중 변이체 및

P564A N803A 변이체 사이의 전사 유도에 대한 관찰된 차이가 VHL-매개 분해로 인한 것이라는 것을 증명하기 위해, VHL-결핍 신장세포 암종 (RCC) 세포주를 사용하였다. 정상 산소 상태에서 RCC에 HIF-1 α 변이체들을 일시적으로 형질감염시킨 후 루시퍼라제의 HRE-매개 전사를 조사하여 야생형 HIF-1 α 의 활성화에서의 증가가 안정화된 P402A P564G 변이의 수준까지 일어난다는 것을 밝히며, 이는 프로테오좀성 분해를 저해하는 것을 나타내었다 (도 1D). 예상되는 바와 같이, 상기 P564A N803A 변이체의 활성이 상기 삼중 변이체의 수준으로 증가하는 것이 관찰되었다.

<200> 상기 P402A P5645G 변이체는, 비록 안정화되어 있지만, 그의 불활성화를 이끄는, FIH-1에 의해 잔기 N803에서 이론적으로 여전히 하이드록실화될 수 있고, 이것은 이것과 상기 삼중 변이체 간의 전사에서의 관찰된 차이를 가장 가능성 있게 설명하는 것이 된다. HEK293에서 안티센스 녹아웃 처리에 의한 FIH-1의 저해로 인해, 정상 산소 상태에서 야생형 HIF-1 α 에 의해서 HRE-매개 전사를 양적-의존적으로 증가하게 한다 [도 1E]. 예상되는 바와 같이, FIH-1 저해는 상기 삼중 변이체 보다 P402A P564G 변이체 활성을 더 크게 유도하게 하며, 이는 FIH-1 정말로 최소한 부분적으로라도 상기 삼중 변이체의 기준에 관찰된 더 높은 활성화에 대하여 담당하고 있다는 것을 나타낸다.

<201> **실시예 2**

<202> **C-트랜스활성화 도메인의 활성화는 최적의 HIF-1 α -매개 혈관형성에 필수적이다.**

<203> 상기 삼중 변이체의 증가된 전사 능력의 중요성을 치료적 혈관형성 관점에서 평가하기 위하여, 상기 HIF-1 α 작제물들을 인간 제대 정맥 내피 세포 (HUVEC)로 형질감염시킨 후 시험관 내 혈관생성 분석을 이용하여, 상이한 변이체들을 비교하였다.

<204> **재료 및 방법**

<205> **시험관 내 혈관형성 분석:** 60 mm 접시에 배양된, 형질감염된 또는 감염된 HUVEC들을 EGM-2 배지에서 24 시간 유지한 후, EBM-2 배지로 교환하였다. 분석하기 전에, 세포를 EBM-2에서 24 시간 더 배양하였다. 다음, 세포를 트립신으로 처리하고 성장인자가 감소된 매트릭셀 (Matrigel) (BD Biosciences, USA)로 미리 코팅된 24-웰 플레이트에 웰당 50,000 세포의 농도로 접종하였다. 모세혈관 및 혈관 형성을 8 시간 추적하였다. 5 개의 무작위 현미경 상에서 고배율 현미경당 모세혈관 가지 수를 계수함으로써 모세혈관 형성의 정량화를 수행하였다.

<206> **VEGF ELISA:** 60 mm 접시에서 배양한, 형질감염된 또는 감염된 HUVEC을 EGM-2 배지에서 24 시간 유지한 후, EBM-2 배지로 교환하였다. 세포를 EBM-2 배지에서 24 시간 더 배양 후, 세포 용해 완충액 (20 mM Tris pH 7.5 함유 PBS, 완전 미니 프로테아제 저해제 카테일 정제를 함유한 1 % Triton, Roche Diagnostics, GmbH, Germany)을 첨가하였다. 세포 용해물을 10,000 rpm에서 15 분간 원심분리시켰다. 인간 VEGF 단백질에 대하여 제조사 지침에 따라서 (R&D Systems) ELISA를 실시하였다.

<207> **웨스턴 블롯 분석:** HUVEC을 60-mm 배양접시에 배양하고 약간 무성하게 (subconfluence) 성장시켰다. 세포를, 전술한 바와 같이, Ad-PPE-Triple, Ad-CMV-Triple, Ad-CMV-wt 또는 Ad-CMV-GFP로 감염시켰다. 용해하고 단백질 내용물을 평가한 후 (Micro BCA; Pierce Biotechnology Inc., Rockford, Illinois, USA), 동일한 양의 단백질을 포함하는 샘플들을 SDS-PAGE로 분리하고 Optitran BA-S83 강화된 니트로셀룰로즈 막 (Schleicher & Schuell BioScience Inc., Keene, New Hampshire, USA)으로 옮겼다. 이 막을 마우스 항-인간 HIF-1 α 다중클론성 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA)로 탐침한 후, HRP-접합 이차 항체 및 ECL 반응을 실시하였다.

<208> **결과**

<209> 상기 빈 (empty) 벡터는 관형성을 일으키지 않는 반면, 모든 HIF-1 α 작제물VEGF 및 FCS 양성 대조군들을 혈관형성을 자극하였다 (도 2A-F). 야생형 HIF-1 α 및 P402A P564G은 유사한 정도로 관형성을 자극하였지만, 둘 다 P564A N803A 및 상기 삼중 변이체에 비하여 혈관형성 효과가 유의하게 감소되었다 ($p < 0.001$) (도 2G). 이러한 발견과 일치하는바, wt-HIF 1 α 또는 P402A P564G로 처리 후, HUVEC 내의 VEGF 단백질 농도는 P564A N803A 또는 삼중 변이체로 처리한 것과 매우 유사하거나 유의하게 낮았다 ($p=0.029$) (도 2H). P564A N803A 또는 삼중 변이체로 처리하면, wt-HIF1 α 및 P402A P564G에 비하여, 각각 6 배 및 10 배 VEGF 단백질 증가를 나타내었다 (도 2H). 이러한 결과들은 HIF-1 α 의 안정성이 부족하다는 것과 및 상시 활성화 C-TAD가 HIF-1 α 의 최대 혈관형성적 효과에 필수적이라는 것을 알려준다. P564A N803A 및 상기 삼중 변이체 간의 어떠한 차이도 발견되지 않았다. 이것은 하이드록실라제 효소를 포화시킨 높은 HIF-1 α 과발현으로 인한 것이고, 따라서 안정성으로

인한, 도 1D에서 RCC 내에서 발견되는 상태와 유사한 임의의 차이를 덮어준다.

<210> 실시예 3

<211> 허혈증에서 PPE-1-Sx 프로모터의 발현 및 특이성

<212> 전신 전구-혈관형성적 유전자 요법의 실행가능성 및 안정성에 대한 필수 조건은 타겟 허혈성 조직 내에서의 충분히 확고하고 특이적인 발현이다. 허혈증의 조건에서 개질된 PPE-1 프로모터의 발현 및 특이성을 특성화하기 위해, PPE-1-3x의 조절하에서 GFP를 발현하는 아데노바이러스를 사용하였다 (Ad-PPE-1-3x-GFP).

<213> 재료 및 방법

<214> 아데노바이러스성 벡터의 제작: Vector Biolabs (Philadelphia, USA)에서 Ad-PPE-Triple, Ad-CMV-Triple, 및 Ad-CMV-wt 벡터를 상동 재조합을 통해서 제조하였다. 바이러스성 작제물의 성공적인 제작은 PCR로 확인하였고, 이 후, 두 번의 플라크 정제과정을 실시하였다. 바이러스성 플라크들을 HEK293에서 대량 증폭하였고, 이 후 CsCl 정제하였다.

<215> 동물: 12 주령 암컷 C57BL/6J 마우스 (Harlan Laboratories Ltd., Jerusalem, Israel)를 사용하였다. 모든 동물 과정은 세바 메디컬 센터 (Sheba Medical Center)의 동물 보호 및 사용 위원회 (Animal Care and Use Committee)의 승인을 얻었다.

<216> 뒷다리 허혈성 모델 및 아데노바이러스 주사: 12 주령 C57BL/6J 암컷 마우스를 케타민 및 자일라진 혼합물로 마취시켰다. 이들을 Couffmhal 등.¹⁵에 의해 설명된 절차를 변형하여 뒷다리 허혈 처리하였다. 좌측 대퇴부 동맥을 덮고 있는 피부를 절개한 후, 깊은 및 얇은 대퇴부 동맥으로 분지되는 지점 근처에 있는 및 슬와 동맥 근처에 있는 대퇴부 동맥을 결찰한다. 다음, 결찰 부위 간의 동맥 부분을 제거하고 모든 측쇄를 도려낸다. 국소 근육내 주사를 위해, 2×10^{10} VP 또는 식염수 $20 \mu\text{l}$ 를 수술시 세 지점 각각에 주사하였다: 대퇴사두근 (quadriceps femoris), 내전근 (adductor) 및 장판지근 (gastrocnemius). 전신 정맥내 주사의 경우, 1×10^{11} VP 또는 식염수 $100 \mu\text{l}$ 를 수술 7 일 후 꼬리 정맥을 통해 주사하였다.

<217> GFP 분석: 바이러스 주사 7 일 후, 마우스를 희생시키고, 장판지근 근육 조직을 수집하고 4 % 파라포름알데히드를 함유한 0.1 M 인산염 완충액에서 4°C에서 24 시간 고정시키고, 30 % 수크로즈 용액 내에서 4°C에서 48 시간 침지시킨 후, OCT 화합물 (Sakura, CA, USA)로 동결시켰다. 조직 덩어리들을 동결조직 절편기 (cryomicrotome)를 사용하여 $5 \mu\text{m}$ -두께 횡단편으로 절단하고 형광 현미경 (FITC filter) 하에서 직접 관찰하였다. 모든 조직 과정은 얼은 빛에서 수행하여 GFP 희석을 방지하였다.

<218> 결과

<219> 마우스를 대퇴 동맥의 결찰에 의한 뒷다리 허혈증에 처하거나, 모의 (sham) 과정에 처한 후, Ad-PPE-1-3x-GFP를 근육 내 주사하였다. 대조군 동물에는 Ad-CMV-GFP 또는 식염수를 주사하였다. Ad-CMV-GFP 주사 후 GFP 발현이 허혈성 및 비허혈성 근육의 근세포 및 내피 세포 양쪽에서 근육 조직적 부위에서 검출되었다. 반면에, Ad-PPE-1-3x-GFP 주사 후 GFP 발현은 허혈성 근육의 내피 세포에서 검출되었지만, 비허혈성 근육에서는 발현이 확인되지 않았다. 이러한 결과는 상기 개질된 PPE-1 프로모터의 내피세포 및 허혈성 조건으로의 특이성을 증명하고 있다.

<220> 바이러스가 몸안에서 퍼지게 되고 오직 적은 분량만이 타겟 장기에 도달하게 되는 정맥내 전신 주사 후에, 상기 프로모터가 발현으로 이어지는 지를 조사하기 위해, Ad-PPE-1-3x-GFP를 정맥 내 투여하였다. 이를 위해, 뒷다리 허혈증으로 또는 모의 과정에 처해진 마우스에 수술 7 일 후에 꼬리 정맥을 통해 Ad-PPE-1-3x-GFP 및 대조군으로서 Ad-CMV-GFP 또는 식염수를 투여하였다. 대퇴부 동맥 결찰 조직 후, 허혈성 뒷다리에서의 혈류가 정상 다리의 10% 미만으로 떨어지고 및 본 발명의 모델에서는 거의 부재하기 때문에, 주사 전에 7 일간의 대기 기간이 두어서 충분한 맥관화가 발달하게 하고, 따라서 바이러스가 허혈성 타겟에 도달하게 하였다. 도 3A-F에 나타난 바와 같이, Ad-CMV-GFP의 전신적 주사 후 허혈성 및 비허혈성 근육 양쪽의 조직학적 부분에서 GFP의 비특이성 발현이 검출되는 반면 (도 3B 및 3E), Ad-PPE-1-3x-GFP 주사 후 허혈성 근육의 내피 세포에서만 GFP가 특이적으로 발현되는 것이 나타난다 (도 3C 및 3F).

<221> 실시예 4

<222> Ad-PPE-Triple HIF-1a의 국소 주사는 허혈성 신혈관형성을 증폭시킨다.

<223> 하기 실험을 수행하여 PPE-1-3x 프로모터의 발현 하에서 아데노 바이러스-매개 삼중 변이 HIF-1 α 으로 근육내 처리하면 생체 내에서 혈관형성을 촉진하는 지를 조사하였다.

<224> **재료 및 방법**

<225> **뒷다리 혈류의 모니터링:** 마우스를 마취시키고 37°C에서 가열판에 5 분간 올려놓아 온도 변화를 최소화시켰다. 수술 직후, 수술 7, 14, 21 및 28 일 후, 혈류 기기 (laser Doppler perfusion imager system, Moor Instruments Ltd., UK)를 사용하여 뒷다리 혈류를 측정하였다. 낮은 빛/또는 무 관류 신호는 푸른 색으로 표시 되는 반면, 최고 관류 신호는 붉은 색으로 표시된다. 컬러 사진들을 기록하고 허혈성 및 비허혈성 뒷다리의 평균 관류를 계산하여 분석하였다. 주위 빛 및 온도와 같은 변수에 대처하기 위해, 결과물을 좌측 (허혈성) 대 우측 (비허혈성) 뒷다리에서의 관류 비율로 표시하였다.

<226> **모세혈관 밀도의 면역조직화학 및 정량화:** 28 일째 희생시킬 때, 뒷다리 근육 조직을 떼어내고 티슈-테크 (Tissue-Tek) OCT 화합물 (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, California, USA)에 동결시키고 횡적으로 동결 절단하였다. EC들을 래트 단일클론성 항-CD31 항체 (Pharmingen, San Diego, California, USA)로 면역염색시켰다. 배경은 헤마톡실린으로 염색하였다.

<227> **결과**

<228> 마우스에 뒷다리 허혈증을 유도한 후, Ad-PPE-1-3x-Triple, Ad-CMV-Triple 또는 Ad-CMV-wt를 근육내 주사하였다. 대조군 동물에 Ad-CMV-Luc 또는 식염수를 주사하였다. 혈류, 임상적 결과 및 혈관형성의 지표를 28 일간의 기간에 걸쳐 조사하였다. 수술 직후, 허혈성 다리에서의 혈류는 모든 마우스 군에서 정상 다리의 10% 미만으로 떨어졌다. 21 일째까지, Ad-CMV-Triple 또는 Ad-PPE-1-3x-Triple로 처리된 마우스는 Ad-CMV-wt, Ad-CMV-Luc 또는 식염수 대조군으로 처리된 마우스에 비해 유의하게 증가된 뒷다리 혈류량을 나타내었다 (도 4A). 28 일째까지, Ad-CMV-Triple 및 Ad-PPE-1-3x-Triple 둘 다는 허혈성 다리에서의 관류를 정상 다리에서의 약 50%까지 향상시켰고, Ad-CMV-wt 또는 대조군 처리물보다는 유의하게 더 증가시켰다 (도 4A-B). 더욱이, Ad-CMV-Triple 또는 Ad-PPE-Triple로 처리하면, Ad-CMV-wt 또는 대조군으로 처리한 마우스에서는 현저하게 나타나는 허혈성-유도 발가락 괴사 및 자가절단을 상당히 감소시켰고, 이는 허혈성 다리로 혈류가 향상되었다는 것과 일치한다 (도 4C-D). 혈류 발견 결과와 일치하는바, CD31 염색 후 근육 모세혈관 밀도의 정량화에 따르면, Ad-CMV-Triple 및 Ad-PPE-1-3x-Triple로 처리된 동물에서의 모세혈관 대 근섬유 비율이 Ad-CMV-wt 및 대조군-처리된 동물에서보다 더 높다는 것이 밝혀졌다 (도 4E 및 4F).

<229> **실시예 5**

<230> **Ad-PPE-1-3x-Triple을 전신 투여하면 Ad-CMV-Triple에 비하여 더 안전하고 및 부작용을 나타내지 않는다.**

<231> 하기 실험을 수행하여 Ad-CMV-Triple의 전신 투여에 대한 Ad-PPE-1-3x-Triple의 전신 투여의 안전성 프로필을 비교하였다. 대부분의 아데노바이러스가 주사 부위에 집중되는 국소 근육 내 주사와는 달리, 꼬리 정맥을 통한 정맥 내 주사 후, 대부분의 아데노바이러스는 간에 도달하고 이로 이전되었다. 따라서, 치료의 안전성과 관련하여, 간 기능에서의 임의의 변화 및 마우스에서 일어나는 다른 전신적 징후를 모니터링하는 것이 특히 중요하다.

<232> **재료 및 방법**

<233> **혈청 빌리루빈, AST 및 ALT의 측정:** 주사 5 및 21 일 후에 마우스 혈청을 얻었고 자동 분석기를 사용하여 분석하였다.

<234> **모세혈관 밀도의 면역조직화학 및 정량화:** 실시예 4에서 기술한 바와 같이 실시하였다.

<235> **뒷다리 혈류의 모니터링:** 실시예 4에서 기술한 바와 같이 실시하였다.

<236> **통계 방법:** SigmaStat (SPSS Science, Chicago, Illinois, USA)를 사용하여 통계 분석을 실시하였다. 시험관 내 연구에는 일원 반복 분산 분석 (one-way repeated-measures ANOVA)을 실시하였고, 뒷다리 허혈증 모델에 대해서는 스튜던츠 (Student's) 시험을 사용하였다; 0.05보다 적은 P는 유의한 것으로 간주되었다. 데이터는 평균 \pm SEM으로 표시하였고 SigmaPlot 또는 마이크로소프트 엑셀 (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA)을 사용하여 도시화하였다.

<237> **결과**

<238> 뒷다리 허혈증에 복속된 마우스에 수술 7 일 후에 꼬리 정맥을 통해 전신적으로 Ad-PPE-1-3x-Triple, Ad-CMV-

Triple 및 Ad-CMV-wt을 주사하였고, Ad-CMV-Luc 및 식염수를 대조군으로서 사용하였다. 주사 1 일 후, 식염수 처리된 것을 제외한 모든 마우스 군이 몸무게 감소를 나타내었다. 그러나, 다른 모든 아데노바이러스-처리 마우스들은 주사 후 3 일째까지 원래 체중을 되찾았으나, Ad-CMV-Triple 처리된 마우스는 지속적으로 체중 감소가 되어 4 일째에는 10% 감소되었고, 이는 전신적 질환을 나타낸다 (도 5A). 주사 5 일 후에 마우스의 간기능 시험을 실시하였고 식염수 대조군에 비하여 Ad-CMV-Triple 처리 마우스에서 혈청 빌리루빈이 뚜렷이 25 배 증가한 것이 나타났고, 이는 심각한 황달 현상을 나타낸 것이다. Ad-CMV-wt는 좀 더 약한 혈청 빌리루빈 증가를 야기 하였다 (도 5C). 또한, Ad-CMV-Triple, Ad-CMV-wt 및 또한 Ad-CMV-Luc로 처리된 마우스에서 5 일째까지 혈청 AST 및 ALT 수준이 심대하게 높아졌다 (도 5B 및 5D). Ad-CMV-Triple 처리된 마우스에 의해 나타나는 간장 질환의 명백한 전신적 증상과는 달리, Ad-PPE-Triple로 처리된 마우스는 어떠한 질환 증상도 보이지 않았고 식염수 처리된 마우스와 비견되는 혈청 빌리루빈, AST 및 ALT 수준을 가졌다. 이러한 발견 내용에 따라서, 5 일째 희생된 마우스의 간 조직학적 절편은 Ad-CMV-Triple 처리된 마우스에서는 심각한 염증 및 임파성 침입을 나타낸 반면, Ad-PPE-1-3x-Triple, Ad-CMV-Luc 및 식염수 대조군은 아무런 병리를 나타내지 않았다 (도 5E-N). 처리군에서는 약한 임파성 침입이 나타났다. 간 병리의 이러한 급성 상태 후에, 상기 Ad-CMV-Triple 처리 마우스는 점진적인 부분 회복을 나타냈다. 이들은 체중을 다시 얻었고, 주사 후 28 일째까지, 이들 혈청 빌리루빈 수준은 정상으로 되돌아 왔다. 그러나, 이들의 혈청 AST 및 ALT들은 Ad-PPE-1-3x-Triple 및 식염수 대조군 처리 마우스에 비하여 여전히 높았고, Ad-CMV-wt 및 Ad-CMV-Luc 군과 비슷하였다. 이러한 부분적 간 회복은 Ad-CMV-triple로 처리된 동물에서 약한 잔류 임파성 침입을 보이면서, 주사 후 21 일째부터 간 조직학적 절편물에서 나타났다 (도 5E-N).

<239> 처리 후, Ad-PPE-Triple로 처리된 마우스는, 허혈성 뒷다리의 혈액 관류에 있어서, Ad-CMV-Triple 및 다른 모든 처리 군에 비하여 유의하게 큰 향상을 보였고, 이는 수술 후 21 일째에 처음 나타났고, 수술 후 28 일째에 정상 다리의 약 45% 관류에 달한 반면, Ad-CMV-Triple 군에서는 30%에 그쳤다 (도 6A-B). 상기 허혈성 뒷다리의 임상 결과는 상기 증가 된 혈류와 일치하며, 이는 Ad-PPE-Triple 마우스 대 모든 다른 군에서의 발가락 괴사 및 자가절단에서 현저히 감소하게 하는 것을 나타낸다 (도 6C-D). 이에 더하여, CD31 염색 후 근육 모세혈관 밀도를 정량화한 결과 하면 Ad-PPE-1-3x-Triple로 처리한 군에서 모세혈관 대 근섬유 비율이 상기 Ad-CMV-Triple 및 모든 다른 군에서보다 더 높은 비율을 나타내었다(도 6E-F).

<240> 명쾌하게 하기 위해, 개별적인 구체예들의 맥락에서 설명된 본 발명의 특정 특징은 단일 구체예에서 또한 조합적으로 제공될 수 있다. 역으로, 간결하게 하기 위해, 단일 구체예의 맥락에서 설명된 본 발명의 다양한 특징들은 또한 분리적으로 또는 임의의 적절한 조합으로 제공될 수 있다는 것이 이해된다.

<241> 비록 본 발명이 특정 구체예와 연계하여 설명되었지만, 많은 변경, 변화 및 개질이 당해 분야의 숙련자들에게는 명확해 질 것이라는 것이 명백하다. 따라서, 첨부되는 청구 범위의 사상과 범위 내에 있는 그러한 변경, 변화 및 개질을 포함하는 것으로 의도된다. 본 명세서에서 언급된 모든 공개물, 특허 및 특허 출원서는 각 개별 공개물, 특허 또는 특허 출원서가 특별히 및 개별적으로 본 명세서에 참조문헌으로 등재되는 것과 같이 동일한 정도로 전체적으로 본 명세서에 참조문헌으로 통합된다. 이에 더하여, 본 명세서상에서의 임의의 참조문헌의 인용 또는 식별표시는 그러한 참조문헌이 선행 기술로서 본 발명에 이용가능하다는 승낙으로서 해석되어서는 안 된다.

도면의 간단한 설명

<46> 본 발명의 첨부되는 도면을 참조하여 오로지 예증적 방식으로 설명된다. 지금 도면을 상세히 참조하는바, 나타난 상세 내용은 예증적 방식으로 및 본 발명의 바람직한 구체예의 예시적 논의의 목적으로 제시되며 및 본 발명의 원리 및 개념적 관점의 가장 유용하고 용이하게 이해될 수 있는 설명이라고 판단되는 것을 제공하는 과정에서 제시되는 것임을 강조한다. 이점과 관련하여, 본 발명의 기초적인 이해에 필요한 것보다 더 상세하게 본 발명의 구조적 상세점을 나타내도록 하는 어떠한 시도도 하지 않았고, 도면으로 제시된 설명은 당해 분야의 숙련자에게는 본 발명의 수 개 유형이 실제로 구체화될 수 있는 방법을 명백히 나타내고 있다.

<47> 도면에서:

<48> 도 1A-E는 삼중 변이체 HIF-1 α의 전사특성을 P402A P564G 및 P564A N803A 이중변이체에 대하여 나타난 막대그래프 및 사진이다. HRE-매개 전사는 HEK293 (도 1A) 및 BAEC (도 1B)에서 p2.1 HRE-luc과 다양한 HIF-1 α 플라스미드들 또는 pcDNA3 대조군의 공-형질감염 후, 측정하였다. 데이터는 루시퍼라제 비율로서 표시하였고 β-gal에 대하여 표준화하였다 (평균±S.D). 이중 변이체들에 비하여 *p<0.001. 도 1C는 HIF-1 α 플라스미드들 또는 pcDNA3 대조군으로 형질감염 48 시간 후에 HeLa 세포로부터 분리된 mRNA를 RT-PCR 분석한 것이다. 2,2'-

디피리딜 (2,2'-DP)로 처리한 결과가 도 1D에 설명되어 있다. HRE-매개 전사는 p2.1 HRE-luc 및 다양한 HIF-1 α 플라스미드들 또는 pcDNA3 대조군으로 공-형질감염 후, VHL-결핍 신장 세포 암종 세포에서 측정하였다. 데이터는 루시퍼라제 비율로 표시하였고 및 β -gal에 대하여 표준화하였다 (평균 \pm S.D). * p < 0.001 및 + p = 0.003 대. P402A P564G 변이체. HEK293 세포들에 p2.1 HRE-루시퍼라제, HIF-1 α 플라스미드들 및 지시된 양의 F1H-1 안티센스로 공-형질감염시켰다 (도 1E). 데이터는 루시퍼라제 비율로 표시하고 β -gal에 대하여 표준화하였다 (평균 \pm S.D).

- <49> 도 2A-H는 상기 삼중 변이 HIF-1 α 가 P402A P564G 및 P564A N803A 이중 변이체보다 더 큰 혈관형성능을 나타내는 것을 설명하는 사진 및 막대 그래프이다. 도 2A-F는 pcDNA3 (도 2A), wt-HIF-1 α (도 2B), P402A P564G (도 2C), P564A N803A (도 2D), 삼중 변이체 (도 2E) 또는 VEGF (도 2F)로 형질감염된 HUVEC에서의 시험관 내 혈관형성 시험의 대표적인 사진이다. 도 2G는 고배율 현미경 시야당 모세혈관 분지체의 수를 계수함으로써 정량화한, 형질감염된 HUVEC의 혈관 형성을 나타낸 막대 그래프이다. 결과들은 5 개의 무작위 현미경 시야의 평균 \pm S. D.로 표시하였다. 도 2H는 ELISA에 의해 결정된 바와 같이, 형질 된 HUVEC의 VEGF 단백질 농도를 설명하는 막대그래프이고 결과는 평균 \pm S.D.로 표시하였고 * p = 0.029 P402A P564G에 대하여.
- <50> 도 3A-H는 PPE1-3x 프로모터의 내피세포 및 허혈 특이성을 설명하는 형광 현미경 부분의 사진이다. 도 3A-F는 뒷다리 허혈증 또는 모의 실험에 복속된 장딴지 근의 형광 현미경 부분을 나타낸 것으로, 이는 7 일 후에 식염수 (도 3A 및 3D), Ad-CMV-GFP (도 3B 및 3E), 또는 Ad-PPE-1-3x-GFP (도 3C 및 3F)로 꼬리 정맥을 통해 전신적으로 주사되었다. 도 3G-H는 Ad-PPE-1-3x-GFP로 처리된 마우스의 장딴지 근육의 부분을 형광 현미경 사진으로 (도 3G) 또는 위상 현미경 사진으로 (도 3H) 나타낸 것으로 GFT 발현 내피 세포 (화살머리부분)로 구성된 모세혈관 (화살표) 내의 적혈구를 보여준다.
- <51> 도 4A-F는 허혈 후 혈관형성이 국소적 Ad-CMV-Triple 및 Ad-PPE-Triple 처리에 의해 증폭되는 것을 나타낸다. 도 4A는 좌측 대퇴부 절찰 직후, 7, 14, 21 및 28 일 후 측정된 허혈성 사지에서의 혈류를 나타낸 선 그래프이다. 데이터는 좌측 (허혈성) 대 우측 (비허혈성) 사지 관류의 비율로서 표시된다. 식염수, n = 8; Ad-CMV-Luc, n = 11; Ad-CMV-wt, n = 11; Ad-CMV-Triple, n = 12; Ad-PPE-Triple, n = 11. 도 4B는 수술 후 28 일째에 허혈성 (좌측) 및 비허혈성 (우측)의 대표적인 레이저 도플러 혈류 이미지를 나타내고 있다. 색깔 코드된 이미지에서, 정상적인 관류는 붉은 색으로 표시되어 있고 낮은 및/또는 무 관류는 푸른색으로 표시되어 있다. 도 4C는 수술 후 21 일째에 마우스 뒷다리의 대표적인 사진이다. 도 4D는 수술 후 21일까지 발가락 괴사를 보이는 마우스의 백분율을 나타내는 막대 그래프이다. 도 4E-F는 대퇴부 절찰 28 일 후, 장딴지 근육 부분으로부터 얻은 모세혈관의 대표적인 CD31 염색 (도 4E) 및 정량화 (도 4F)를 나타낸다. * p <0.01.
- <52> 도 5A-N은 전신 투여 후 Ad-PPE-Triple이 Ad-CMV-Triple보다 덜 독성적이라는 것을 나타낸다. 도 5A는 식염수 또는 아데노바이러스의 전신 주사 후, 시간에 따라서 마우스 체중의 변화를 나타내는 점 그래프이다. 도 5B-D는 식염수 또는 아데노바이러스의 전신 주사 후 5 및 21 일째에 혈청 빌리루빈 (도 5B), AST (도 5C) 및 ALT (도 5D) 수준을 나타내는 막대 그래프이다. 도 5E-N는 식염수 (도 5E-F), AdCMV-Luc (도 5G-H), AdCMV-wt (도 5I-J), AdCMV-triple (도 5K-L), AdPPE-triple (도 5M-N)의 전신적 주사 후 5 일째 (도 5E, G, I, K 및 M) 및 21 일째 (도 5F, H, J, L 및 N)에 마우스 간의 조직학적 부분을 나타낸다.
- <53> 도 6A-F는 허혈 후 혈관형성이 전신적 Ad-PPE-Triple 처리에 의해 증가되나 but not by Ad-CMV-Triple 처리에 의해서는 안 된다는 것을 설명한다. 도 6A는 좌측 대퇴부 동맥 절개 직후, 및 7, 14, 21 및 28 일째에 측정된 허혈성 사지에서의 혈류를 나타낸 점 그래프이다. 데이터는 좌측 (허혈성) 대 우측 (비허혈성) 사지 관류의 비율로 표시된다. 식염수, n = 9; Ad-CMV-Luc, n = 8; Ad-CMV-wt, n = 9; Ad-CMV-Triple, n = 7; Ad-PPE-Triple, n = 8. 도 6B는 수술 후 21 일째까지 발가락 괴사를 나타내는 마우스의 백분율을 나타내는 막대 그래프이다. 도 6C는 수술 후 21 일째 마우스 뒷다리의 대표적인 사진이다. 도 6D는 수술 후 28 일째에 허혈성 (좌측) 및 비허혈성 (우측) 사지의 대표적인 레이저 도플러 혈류 이미지이다. 컬러 코드화된 이미지에서, 정상적인 관류는 붉은 색으로 낮거나 및/또는 무관류는 푸른색으로 표시된다. 도 6E-F는 대퇴부 동맥 절찰 28 일 후에 장딴지 근육의 부위로부터 얻은 모세혈관의 대표적인 CD31 염색 (도 6E) 및 정량화 (도 6F)를 나타낸다. * p <0.01.
- <54> 도 7A는 HIF-1 α 발현 아데노 바이러스들이 BAEC에서 HRE-매개 전사 능력의 비교를 나타낸다. BAEC을 p2.1 HRE-Luc로 형질감염시키고, 24 시간 후에 MOI 20 또는 MOI 200에서 아데노 바이러스로 감염시켰다. 데이터는 루시퍼라제 광 유닛으로 표시된다 (평균 \pm S. D.).
- <55> 도 7B는 HeLa 세포에서 HIF-1 α 의 웨스턴 블랏을 나타낸 것이다. HeLa 세포를 Ad-CMVGFP, AD-CMV-wtHIF-1 α ,

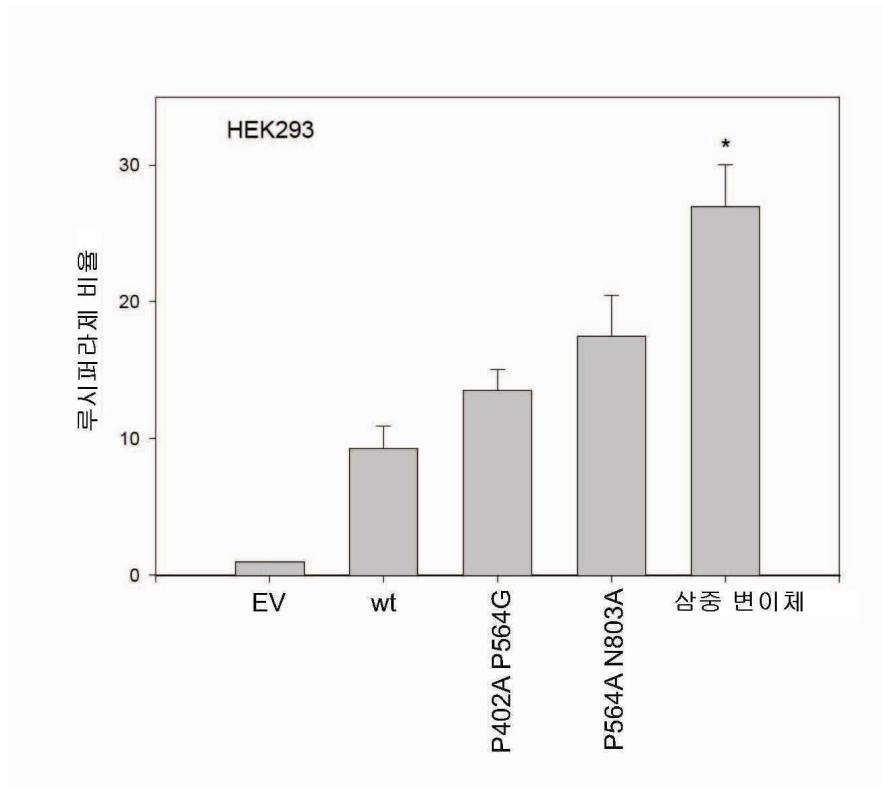
Ad-CMV-Triple 또는 Ad-PPE1-3x-Triple로 감염시켰거나 모조 감염시켰다 (mock infection). 웨스턴 블랏팅은 감염 48 시간 후에 수행하였다.

<56> 도 7C-G는 HUVEC 에서 HIF-1 α 발현 아데노바이러스에 대한 시험관 내 혈관형성 분석을 나타낸다. HUVEC은 모조 감염되었거나 (C), Ad-CMV-GFP (D), Ad-CMV-wtHIF-1 α (E), Ad-CMV-Triple (F) 또는 Ad-PPE1-3x-Triple (G)로 감염되었다. 48 시간 후, 시험관 내 혈관형성 분석을 실시하였다. 도 C-G는 혈관 형성에 대한 대표적인 사진이다.

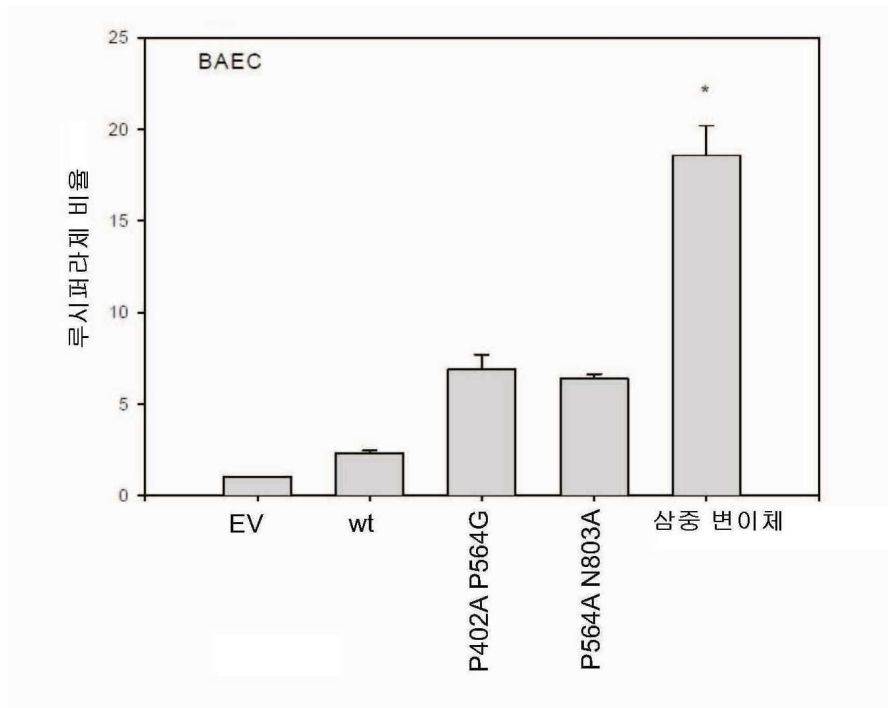
<57> 도 7H는, ELISA로 측정된, 감염된 HUVEC 세포의 VEGF 단백질 농도를 나타내는 막대그래프이고, 결과는 평균 \pm S.D로 표시된다. *p = 0.01 vs. Ad-CMV-wtHIF-1 α .

도면

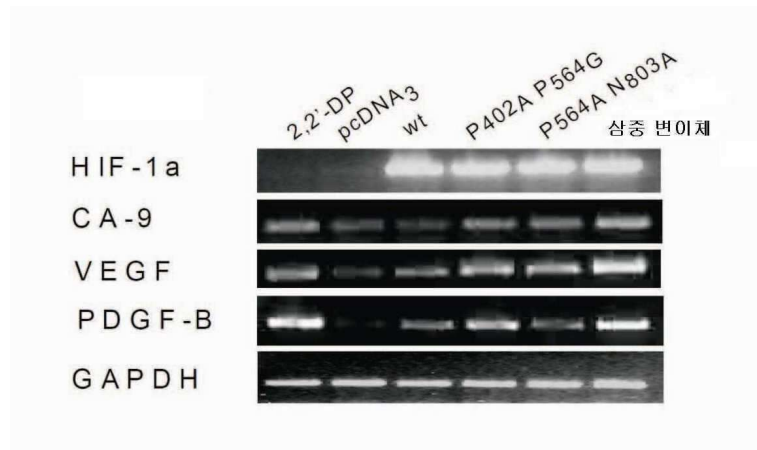
도면1a



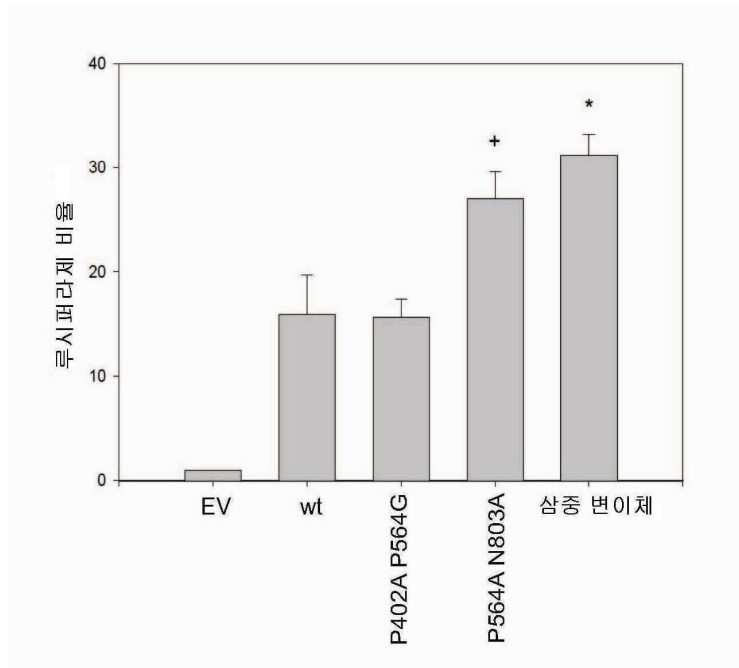
도면1b



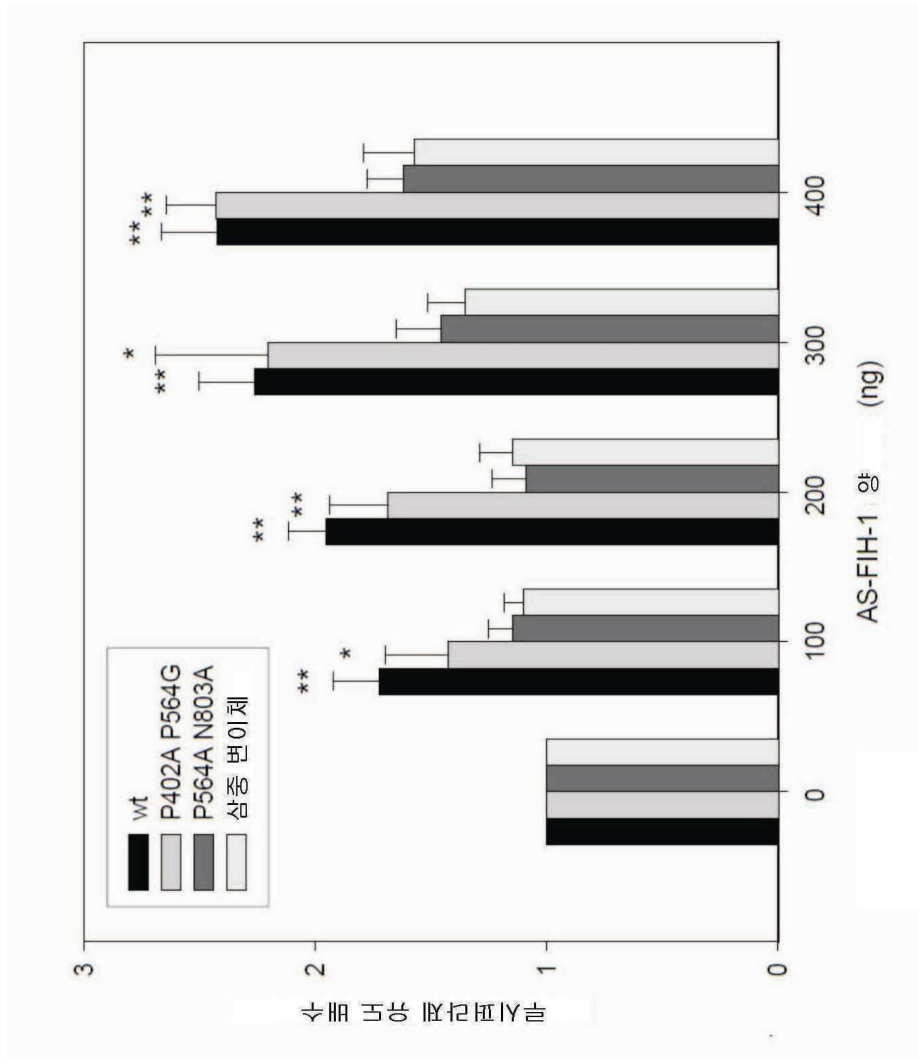
도면1c



도면1d



도면1e



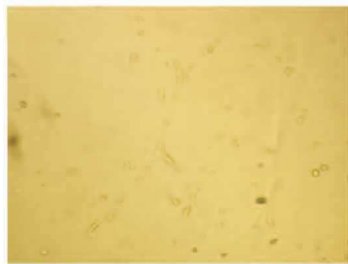
도면2a



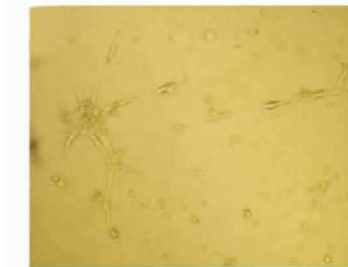
도면2b



도면2c



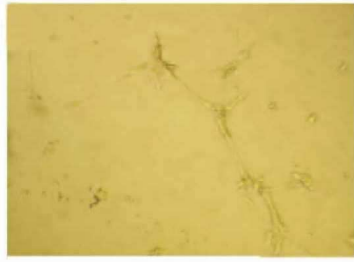
도면2d



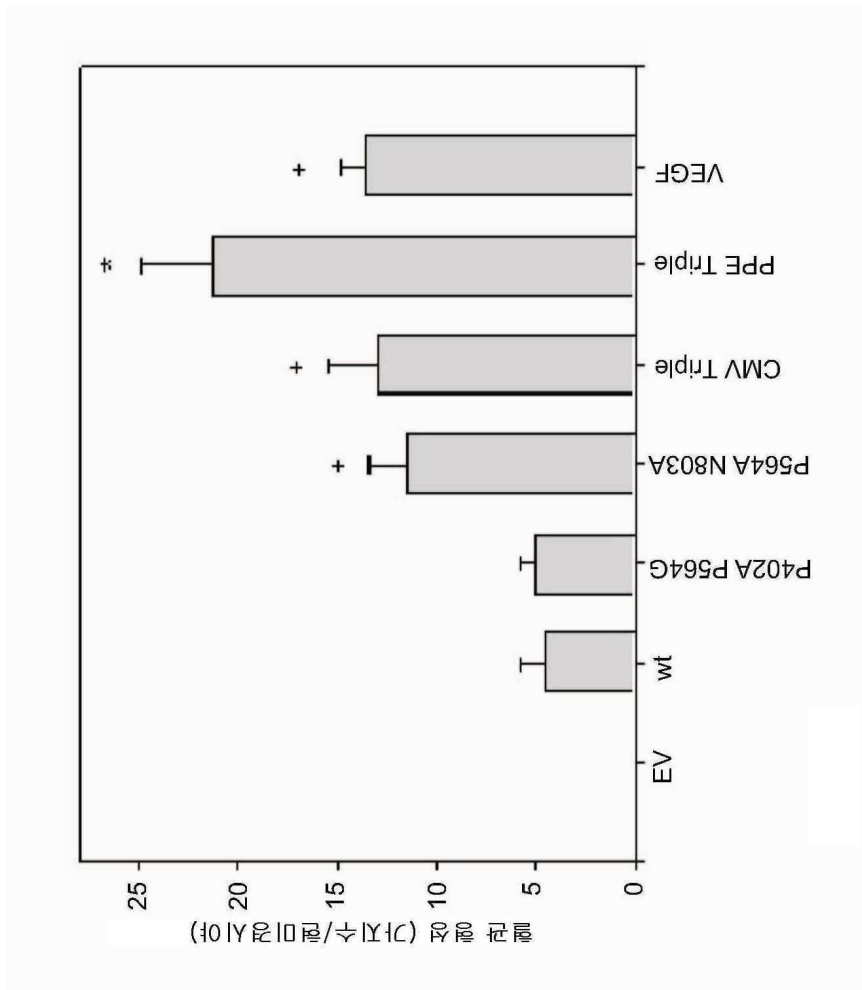
도면2e



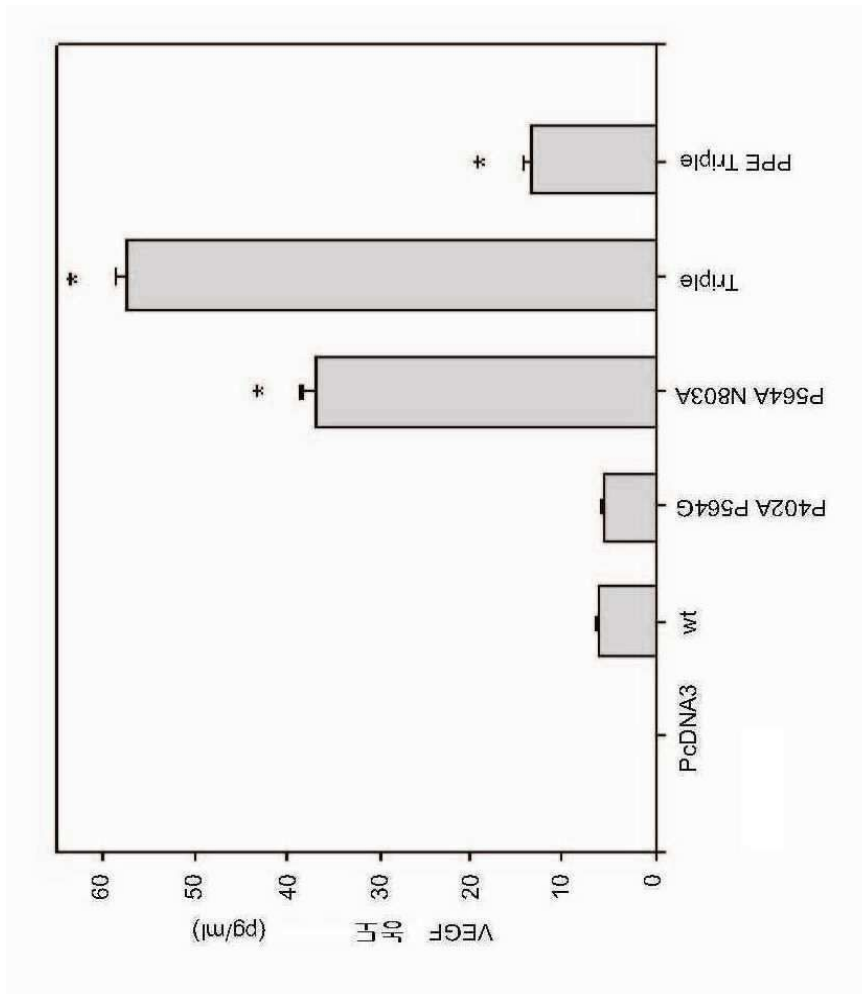
도면2f



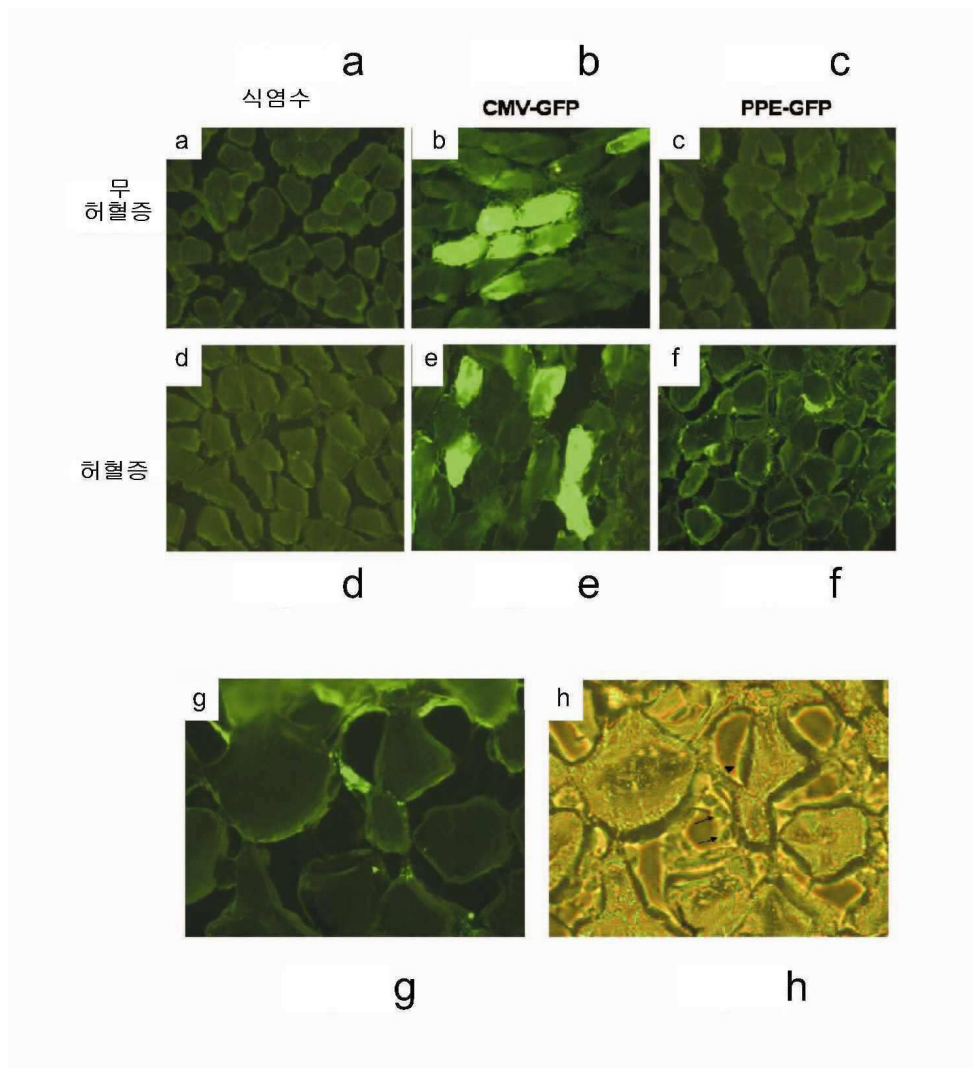
도면2g



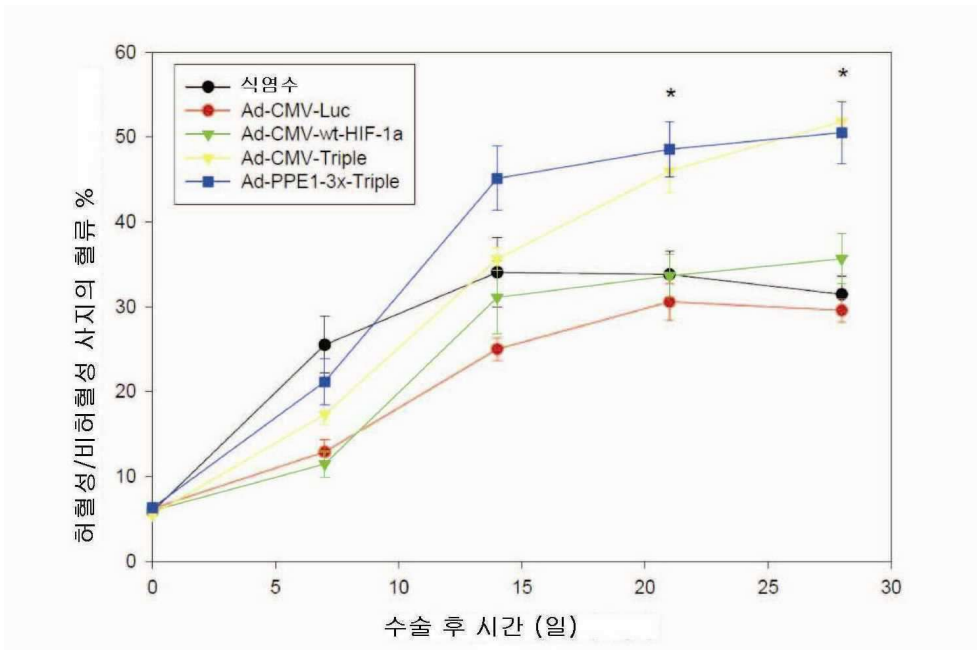
도면2a



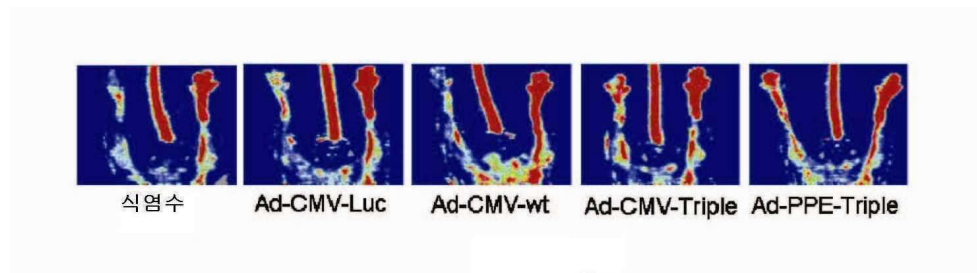
도면3



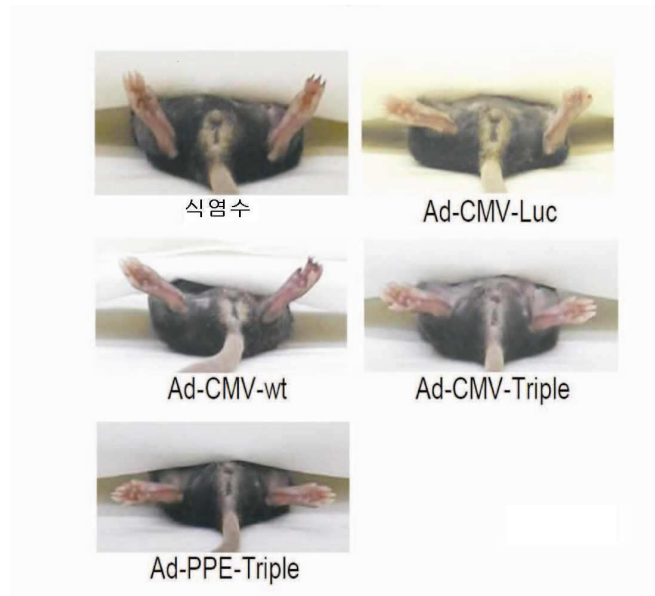
도면4a



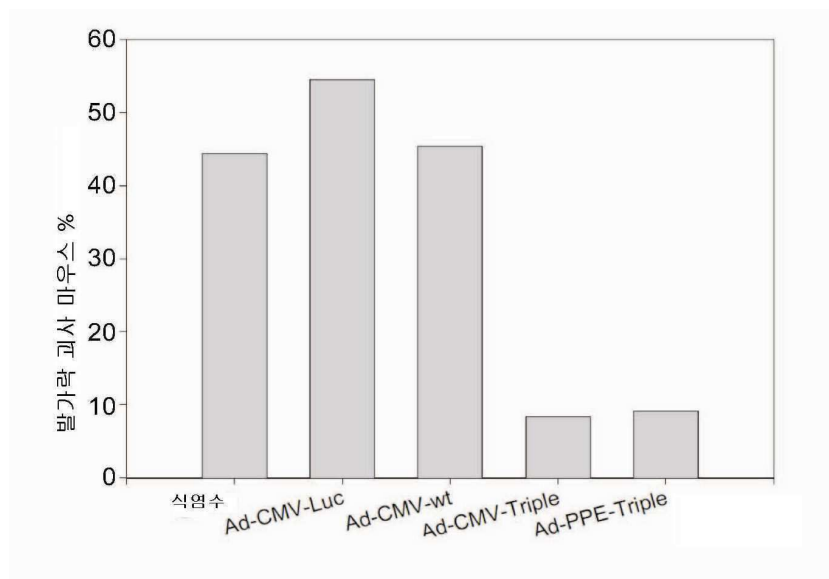
도면4b



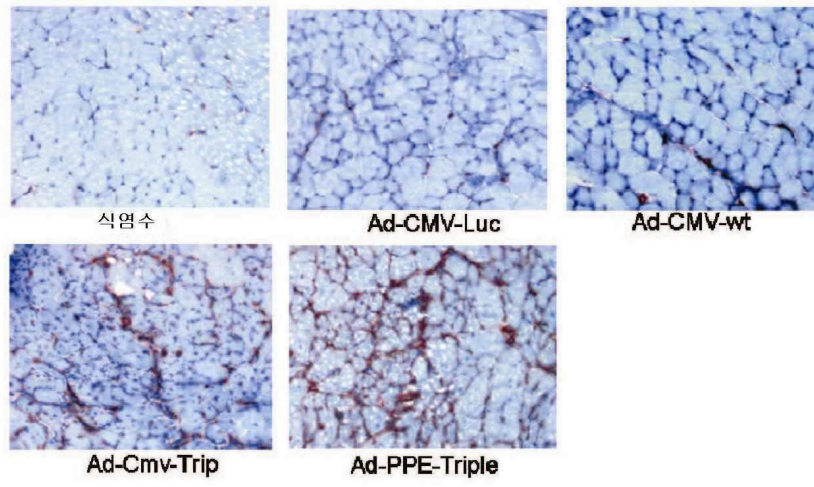
도면4c



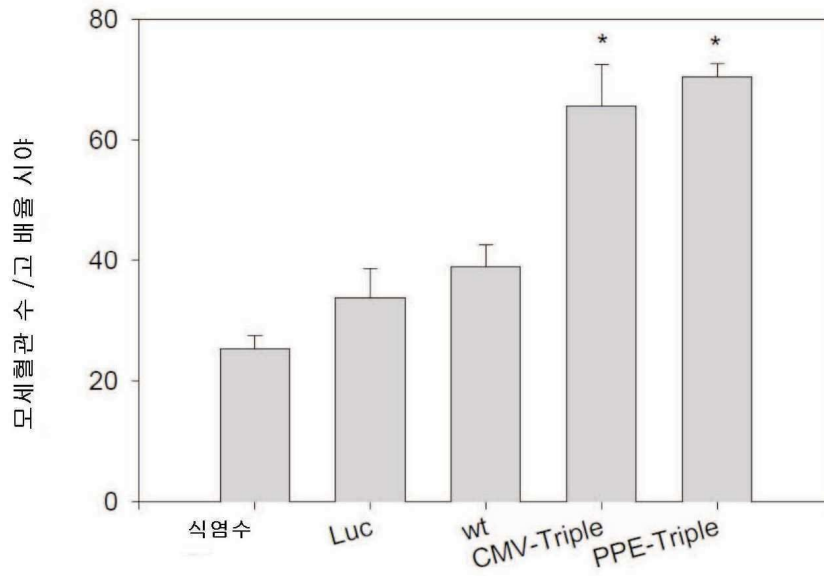
도면4d



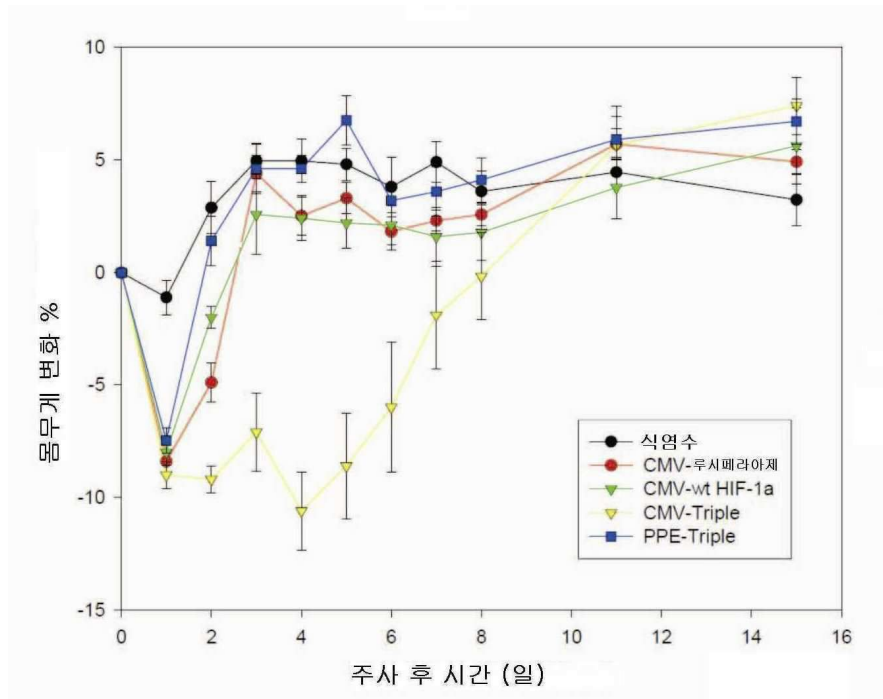
도면4e



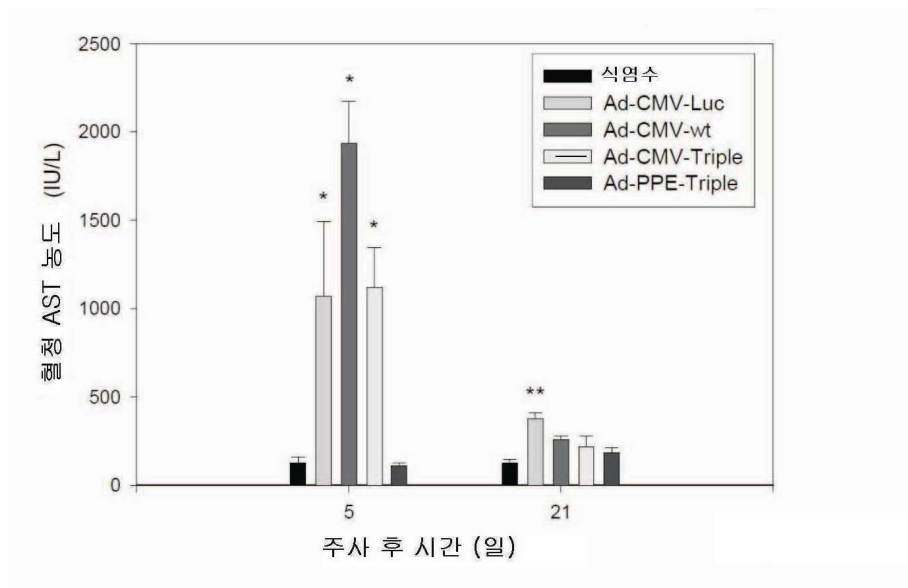
도면4f



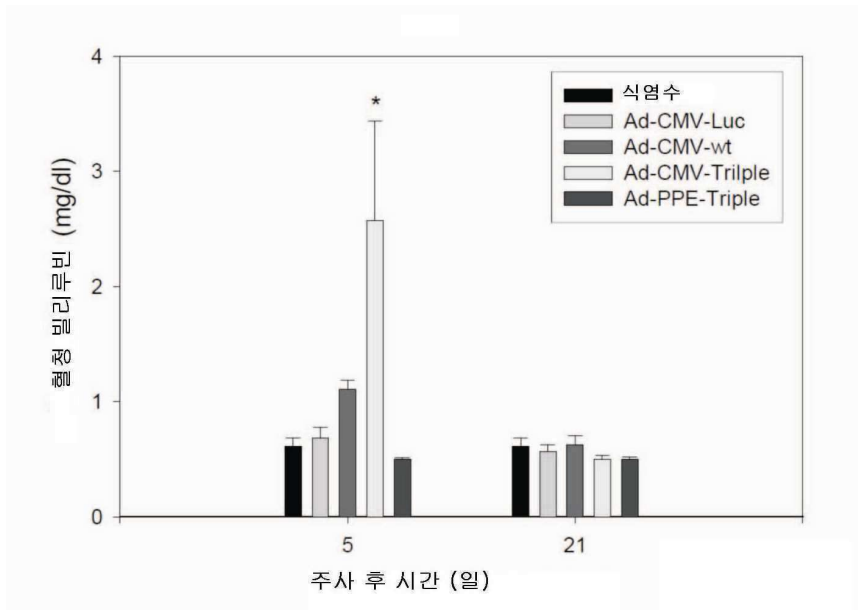
도면5a



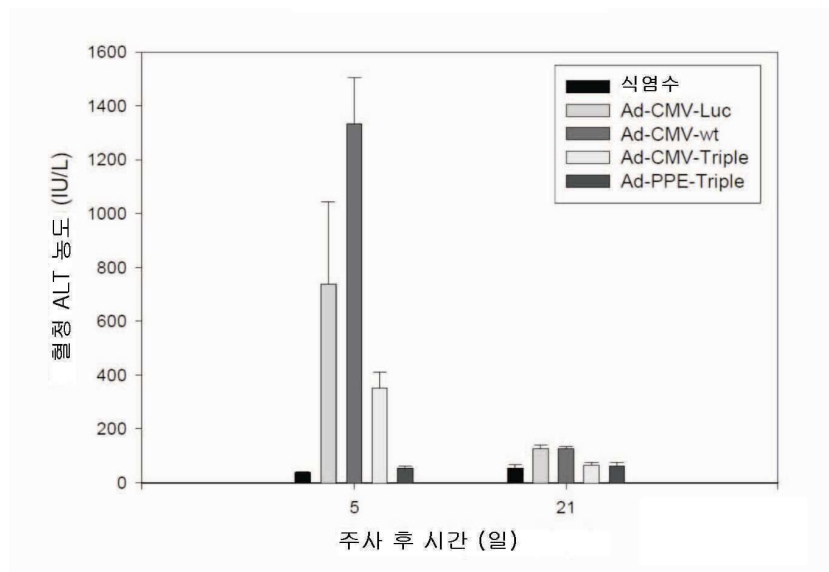
도면5b



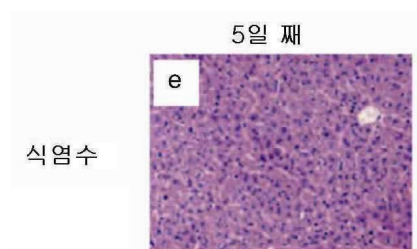
도면5c



도면5d



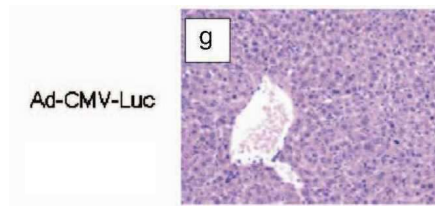
도면5e



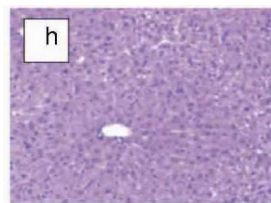
도면5f



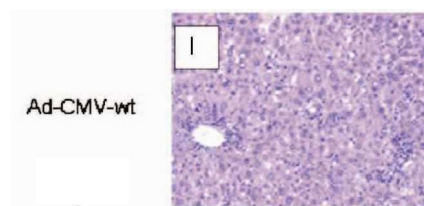
도면5g



도면5h



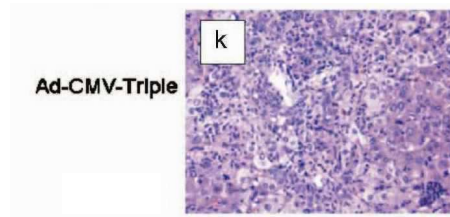
도면5i



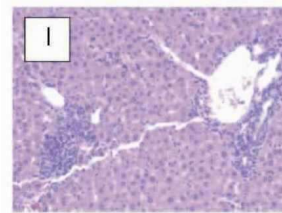
도면5j



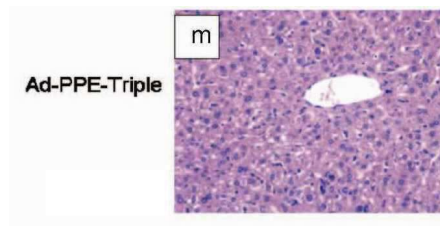
도면5k



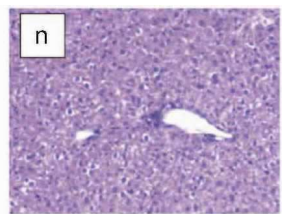
도면5l



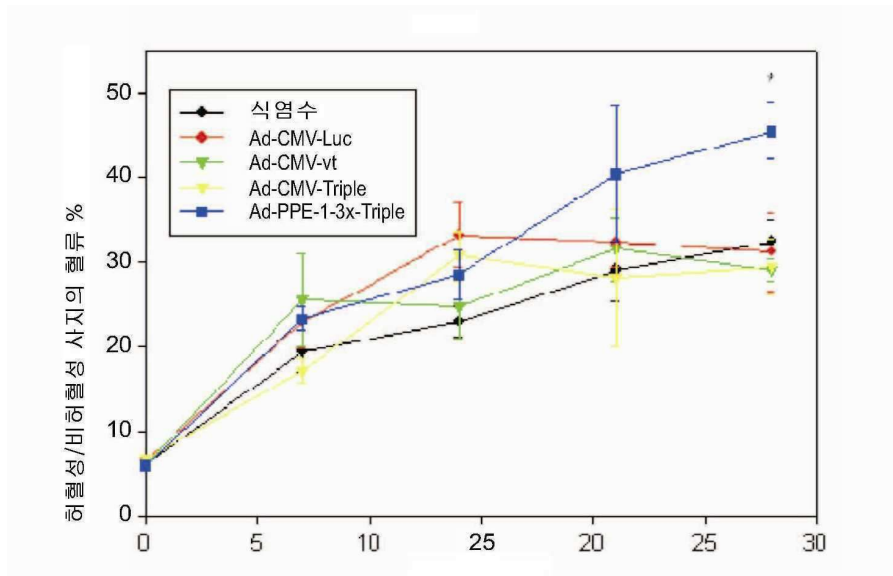
도면5m



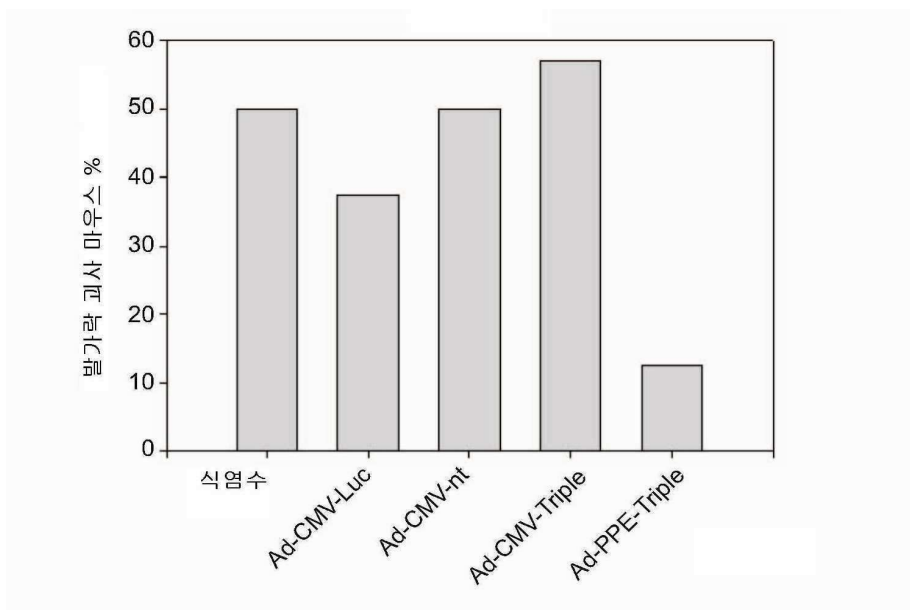
도면5n



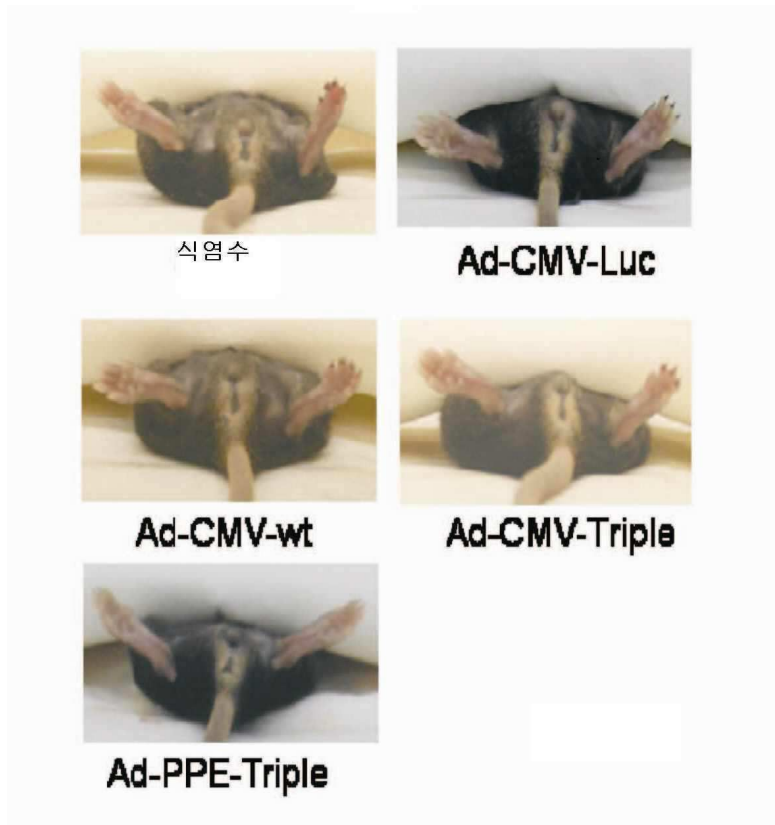
도면6a



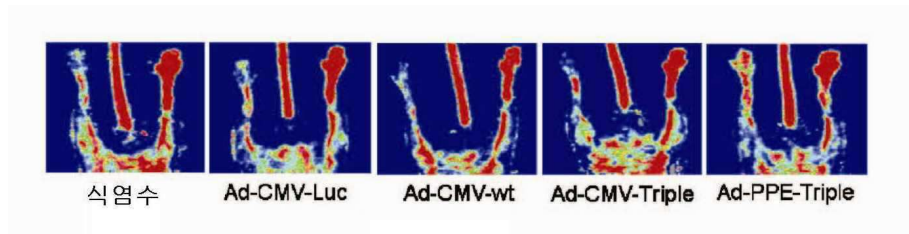
도면6b



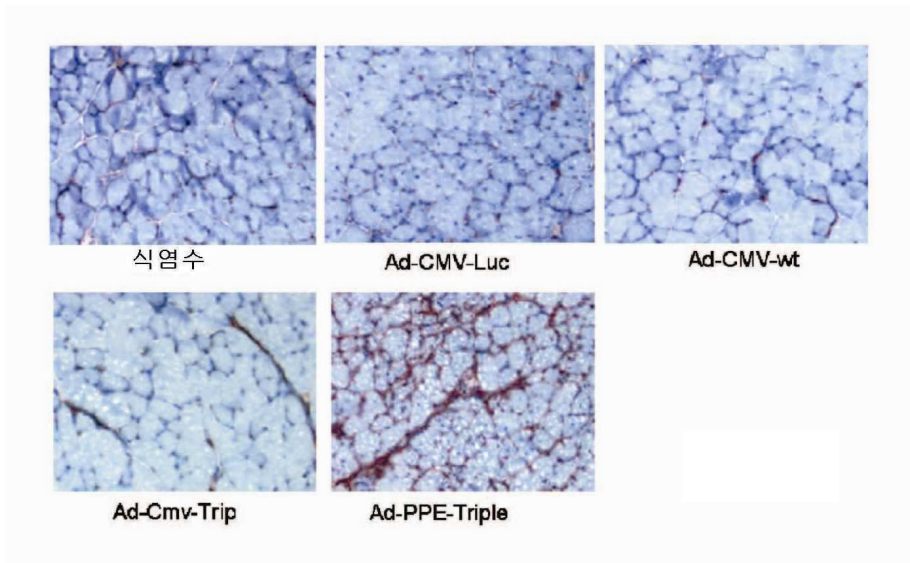
도면6c



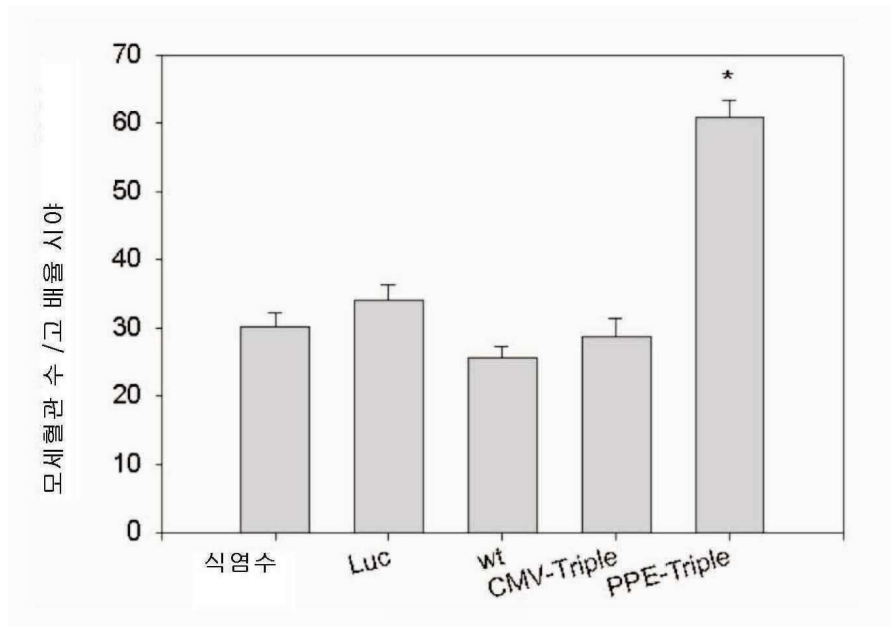
도면6d



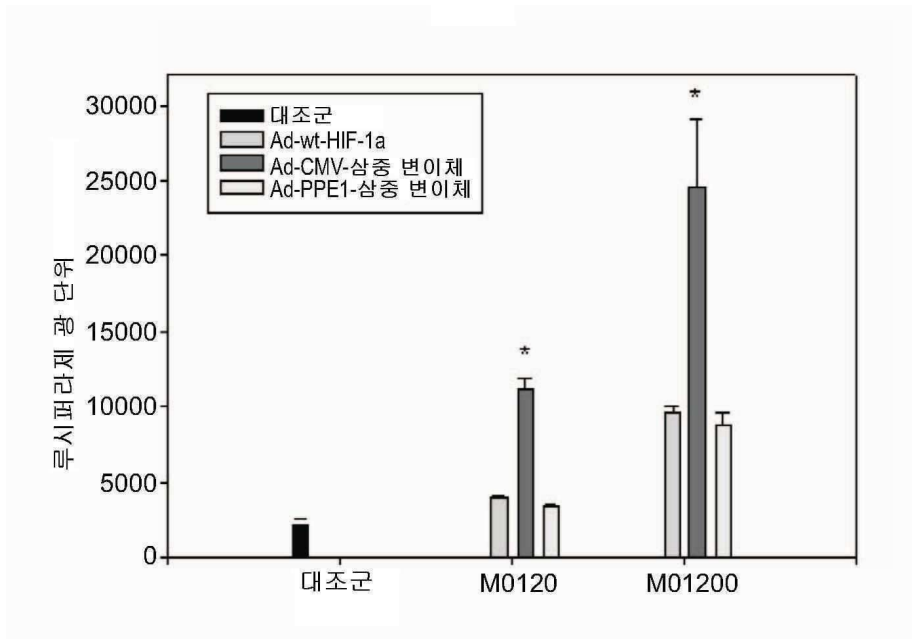
도면6e



도면6f



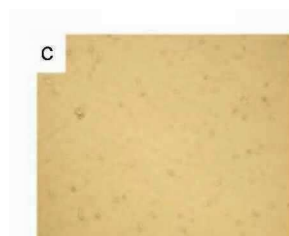
도면7a



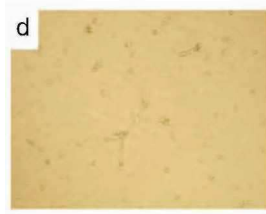
도면7b



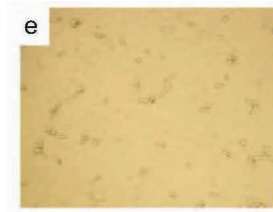
도면7c



도면7d



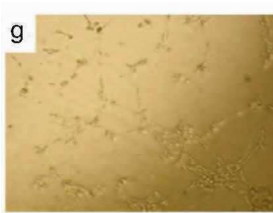
도면7e



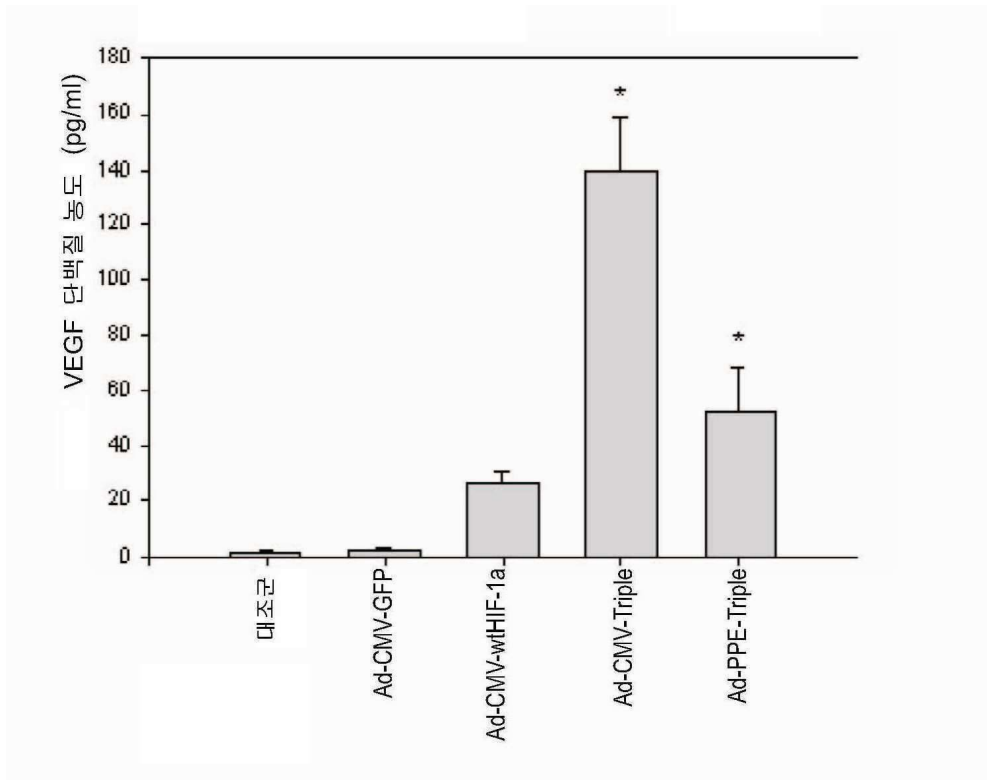
도면7f



도면7g



도면7h



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> VASCULAR BIOGENICS LTD.

BREITBART, Eyal

BANGIO, Livnat

TAL, Reshef

<120> POLYPEPTIDES AND POLYNUCLEOTIDES ENCODING SAME AND USE THEREOF IN THE TREATMENT OF MEDICAL CONDITIONS ASSOCIATED WITH ISCHEMIA

<130> 41795

<160> 15

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2481

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Triple mutant HIF-1a coding sequence

<400> 1

atggagggcg ccggcggcgc gaacgacaag aaaaagataa gttctgaacg tcgaaaagaa 60

aagtctcgag atgcagccag atctcggcga agtaaagaat ctgaagtttt ttatgagctt 120

gctcatcagt tgccacttcc acataatgtg agttcgcatac ttgataaggc ctctgtgatg 180

aggcttacca tcagctatit gcgtgtgagg aaacttctgg atgctggtga ttggtatatt 240

gaagatgaca tgaagcaca gatgaattgc ttttatttga aagccttgga tggttttgtt 300

atggttctca cagatgatgg tgacatgatt tacatttctg ataatgtgaa caaatacatg 360

ggattaactc agtttgaact aactggacac agtgtgtttg attttactca tccatgtgac 420

catgaggaaa tgagagaaat gcttacacac agaaatggcc ttgtgaaaaa gggtaaagaa 480

caaaacacac agcgaagctt ttttctcaga atgaagtga ccctaactag ccgaggaaga 540

actatgaaca taaagtctgc aacatggaag gtattgcact gcacaggcca cattcacgta 600

tatgatacca acagtaacca acctcagtgt gggataaaga aaccacctat gacctgcttg 660

gtgctgattt gtgaacccat tctcaccaca tcaaatattg aaattccttt agatagcaag 720

actttctca gtcgacacag cctggatatg aaattttctt attgtgatga aagaattacc 780

gaattgatgg gatatgagcc agaagaactt ttaggccgct caatttatga atattatcat 840

gctttggact ctgatcatct gacaaaaact catcatgata tgtttactaa aggacaagtc 900

accacaggac agtacaggat gcttgccaaa agaggtggat atgtctgggt tgaactcaa 960

gcaactgtca tatataacac caagaattct caaccacagt gcattgtatg tgtgaattac 1020

gttgtgagtg gtattattca gcacgacttg attttctccc tcaacaacac agaattgtgc 1080

cttaaaccgg ttgaatcttc agatatgaaa atgactcagc tattaccaaa agttgaaatca 1140

gaagatacaa gtagcctctt tgacaaaactt aagaaggaac ctgatgcttt aactttgctg 1200

gccgcagccg ctggagacac aatcatatct ttagattttg gcagcaacga cacagaaact 1260

gatgaccagc aacttgagga agtaccattia tataatgatg taatgctccc ctcaccaaac 1320

gaaaaattac agaataaaa tttggcaatg tctccattac ccaccgctga aacgccaaag 1380

ccacttcgaa gtagtgctga ccctgcactc aatcaagaag ttgcattaaa attagaacca 1440

aatccagagt cactggaact ttcttttacc atgcccaga ttcaggatca gacacctagt 1500

ccttccgatg gaagcactag acaaagtcca cctgagccta atagtcccag tgaatattgt 1560

ttttatgtgg atagtgatat ggtcaatgaa ttcaagtgg aattggtaga aaaacttttt 1620

gctgaagaca cagaagcaaa gaaccattt tctactcagg acacagattt agacttgag 1680

atgttagctg gctatatccc aatggatgat gacttccagt tacgttcctt cgatecagttg 1740

tcaccattag aaagcagttc cgcaagccct gaaagcgcaa gtcctcaaag cacagttaca 1800

gtattccagc agactcaaat acaagaacct actgctaag ccaccactac cactgccacc 1860

actgatgaat taaaacagt gacaaaagac cgtatggaag acattaaaat attgattgca 1920

tctccatctc ctaccacat acataaagaa actactagtg ccacatcatc accatataga 1980

gatactcaaa gtcggacagc ctcaccaaac agagcaggaa aaggagtcac agaacagaca 2040

gaaaaatctc atccaagaag ccctaactg ttatctgtcg ctttgagtca aagaactaca 2100

gttctgagg aagaactaaa tccaaagata ctagctttgc agaatgctca gagaaagcga 2160

aaaatggaac atgatggttc actttttcaa gcagtaggaa ttggaacatt attacagcag 2220

ccagacgate atgcagctac tacatcactt tcttggaac gtgtaaaagg atgcaaatct 2280

agtgaacaga atggaatgga gcaaaagaca attatnttaa tacctctga tttagcatgt 2340
 agactgctgg ggcaatcaat ggatgaaagt ggattaccac agctgaccag ttatgattgt 2400
 gaagttgctg ctctatatac aggcagcaga aacctactgc aggggaaga attactcaga 2460
 gctttggatc aagtaactg a 2481

<210> 2
 <211> 826
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Triple mutant HIF-1a

<400> 2

Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
 20 25 30

Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
 35 40 45

Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
 50 55 60

Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
 65 70 75 80

Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
 85 90 95

Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile

290

295

300

Tyr Arg Met Leu Ala Lys Arg Gly Gly Tyr Val Trp Val Glu Thr Gln
305 310 315 320

Ala Thr Val Ile Tyr Asn Thr Lys Asn Ser Gln Pro Gln Cys Ile Val
325 330 335

Cys Val Asn Tyr Val Val Ser Gly Ile Ile Gln His Asp Leu Ile Phe
340 345 350

Ser Leu Gln Gln Thr Glu Cys Val Leu Lys Pro Val Glu Ser Ser Asp
355 360 365

Met Lys Met Thr Gln Leu Phe Thr Lys Val Glu Ser Glu Asp Thr Ser
370 375 380

Ser Leu Phe Asp Lys Leu Lys Lys Glu Pro Asp Ala Leu Thr Leu Leu
385 390 395 400

Ala Ala Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn
405 410 415

Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn
420 425 430

Asp Val Met Leu Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu
435 440 445

Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser
450 455 460

Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro
465 470 475 480

Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp
485 490 495

Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu
 500 505 510

Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val
 515 520 525

Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr
 530 535 540

Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu
 545 550 555 560

Met Leu Ala Gly Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser
 565 570 575

Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser
 580 585 590

Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln
 595 600 605

Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu
 610 615 620

Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala
 625 630 635 640

Ser Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser Ala Thr Ser
 645 650 655

Ser Pro Tyr Arg Asp Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro Asn Arg Ala
 660 665 670

Gly Lys Gly Val Ile Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro Arg Ser Pro
 675 680 685

Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val Pro Glu Glu
 690 695 700

Glu Leu Asn Pro Lys Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln Arg Lys Arg
 705 710 715 720

Lys Met Glu His Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly Ile Gly Thr
 725 730 735

Leu Leu Gln Gln Pro Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Trp
 740 745 750

Lys Arg Val Lys Gly Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly Met Glu Gln
 755 760 765

Lys Thr Ile Ile Leu Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly
 770 775 780

Gln Ser Met Asp Glu Ser Gly Leu Pro Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Cys
 785 790 795 800

Glu Val Ala Ala Pro Ile Gln Gly Ser Arg Asn Leu Leu Gln Gly Glu
 805 810 815

Glu Leu Leu Arg Ala Leu Asp Gln Val Asn
 820 825

- <210> 3
- <211> 826
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Glu Gly Ala Gly Gly Ala Asn Asp Lys Lys Lys Ile Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Arg Arg Lys Glu Lys Ser Arg Asp Ala Ala Arg Ser Arg Arg Ser Lys
 20 25 30

Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His Gln Leu Pro Leu Pro His
 35 40 45

Asn Val Ser Ser His Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile
 50 55 60

Ser Tyr Leu Arg Val Arg Lys Leu Leu Asp Ala Gly Asp Leu Asp Ile
 65 70 75 80

Glu Asp Asp Met Lys Ala Gln Met Asn Cys Phe Tyr Leu Lys Ala Leu
 85 90 95

Asp Gly Phe Val Met Val Leu Thr Asp Asp Gly Asp Met Ile Tyr Ile
 100 105 110

Ser Asp Asn Val Asn Lys Tyr Met Gly Leu Thr Gln Phe Glu Leu Thr
 115 120 125

Gly His Ser Val Phe Asp Phe Thr His Pro Cys Asp His Glu Glu Met
 130 135 140

Arg Glu Met Leu Thr His Arg Asn Gly Leu Val Lys Lys Gly Lys Glu
 145 150 155 160

Gln Asn Thr Gln Arg Ser Phe Phe Leu Arg Met Lys Cys Thr Leu Thr
 165 170 175

Ser Arg Gly Arg Thr Met Asn Ile Lys Ser Ala Thr Trp Lys Val Leu
 180 185 190

His Cys Thr Gly His Ile His Val Tyr Asp Thr Asn Ser Asn Gln Pro
 195 200 205

Gln Cys Gly Tyr Lys Lys Pro Pro Met Thr Cys Leu Val Leu Ile Cys
 210 215 220

Glu Pro Ile Pro His Pro Ser Asn Ile Glu Ile Pro Leu Asp Ser Lys
 225 230 235 240

Thr Phe Leu Ser Arg His Ser Leu Asp Met Lys Phe Ser Tyr Cys Asp
 245 250 255

Glu Arg Ile Thr Glu Leu Met Gly Tyr Glu Pro Glu Glu Leu Leu Gly
 260 265 270

Arg Ser Ile Tyr Glu Tyr Tyr His Ala Leu Asp Ser Asp His Leu Thr
 275 280 285

Lys Thr His His Asp Met Phe Thr Lys Gly Gln Val Thr Thr Gly Gln
 290 295 300

Tyr Arg Met Leu Ala Lys Arg Gly Gly Tyr Val Trp Val Glu Thr Gln
 305 310 315 320

Ala Thr Val Ile Tyr Asn Thr Lys Asn Ser Gln Pro Gln Cys Ile Val
 325 330 335

Cys Val Asn Tyr Val Val Ser Gly Ile Ile Gln His Asp Leu Ile Phe
 340 345 350

Ser Leu Gln Gln Thr Glu Cys Val Leu Lys Pro Val Glu Ser Ser Asp
 355 360 365

Met Lys Met Thr Gln Leu Phe Thr Lys Val Glu Ser Glu Asp Thr Ser
 370 375 380

Ser Leu Phe Asp Lys Leu Lys Lys Glu Pro Asp Ala Leu Thr Leu Leu
 385 390 395 400

Ala Pro Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn
 405 410 415

Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn
 420 425 430

Asp Val Met Leu Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Gln Asn Ile Asn Leu
 435 440 445

Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser
 450 455 460

Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro
 465 470 475 480

Asn Pro Glu Ser Leu Glu Leu Ser Phe Thr Met Pro Gln Ile Gln Asp
 485 490 495

Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu
 500 505 510

Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val
 515 520 525

Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr
 530 535 540

Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu
 545 550 555 560

Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser
 565 570 575

Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser
 580 585 590

Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln Gln Thr Gln Ile Gln
 595 600 605

Glu Pro Thr Ala Asn Ala Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Asp Glu Leu
 610 615 620

Lys Thr Val Thr Lys Asp Arg Met Glu Asp Ile Lys Ile Leu Ile Ala
 625 630 635 640

Ser Pro Ser Pro Thr His Ile His Lys Glu Thr Thr Ser Ala Thr Ser
 645 650 655

Ser Pro Tyr Arg Asp Thr Gln Ser Arg Thr Ala Ser Pro Asn Arg Ala
 660 665 670

Gly Lys Gly Val Ile Glu Gln Thr Glu Lys Ser His Pro Arg Ser Pro
 675 680 685

Asn Val Leu Ser Val Ala Leu Ser Gln Arg Thr Thr Val Pro Glu Glu
 690 695 700

Glu Leu Asn Pro Lys Ile Leu Ala Leu Gln Asn Ala Gln Arg Lys Arg
 705 710 715 720

Lys Met Glu His Asp Gly Ser Leu Phe Gln Ala Val Gly Ile Gly Thr
 725 730 735

Leu Leu Gln Gln Pro Asp Asp His Ala Ala Thr Thr Ser Leu Ser Trp
 740 745 750

Lys Arg Val Lys Gly Cys Lys Ser Ser Glu Gln Asn Gly Met Glu Gln
 755 760 765

Lys Thr Ile Ile Leu Ile Pro Ser Asp Leu Ala Cys Arg Leu Leu Gly
 770 775 780

gtgtctctct gcaggttctg cagcggcttc tgtctagtgg gtgttttctt tttcttagcc 660

ctgcccttgg attgtcagac ggcggcgctc tgcctctgaa gttagccgtg atttctctca 720

gagccgggtc ttatctctgg ctgcacgttg cctgtgggtg actaatcaca caataacatt 780

gtttagggtt ggaataaagt cagagctggt taccctcact ctataggggt tcaatataaa 840

aaggcggcgg agaactgtcc gagtccagaag cgttcctgca ccggcgctga gaccctgacc 900

cggctctctc cgctgtcctt gcgcgctgcc tcccggctgc ccgcgacgt ttcgccccag 960

tggaagggcc acttgctg 978

<210> 5
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Hypoxia response element

<400> 5
 gcacgt 6

<210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 6
 gtcggacagc ctaccaaac agag 24

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 7
 gttaacttga tccaaagctc tgag 24

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 8
 cacgtggttc acctcagcac 20

<210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 9
 cagcgatttc ttccaagcg 19

<210> 10
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 10
 cagcgcagct actgccatcc aatcgaga 28

<210> 11

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 11
 gcttgtcaca tctgcaagta cgttcgttta 30

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

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 12
 atcgccgagt gcaagacgcg 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 13
 aagcaccatt ggccgtccga 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 14
 accacagtcc atgcatcac 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 15
tccaccacc tgttgctgta 20