



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년11월21일
 (11) 등록번호 10-1464360
 (24) 등록일자 2014년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12N 7/01 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
 A61K 35/76 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0126963
 (22) 출원일자 2012년11월09일
 심사청구일자 2012년11월09일
 (65) 공개번호 10-2014-0060184
 (43) 공개일자 2014년05월19일
 (56) 선행기술조사문헌
 Clin. Cancer Res. 2008, vol. 14, no. 1, pp. 281-290.*
 Mol. Cells. 2012.06.30., vol. 33, pp. 553-562.*
 KR1020100024055 A
 KR1020090048382 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 대웅
 경기도 성남시 중원구 갈마치로 244 (상대원동)
(주)네오믹스
 서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교 105-1동
 유전공학특화 창업보육센터 2층 212호 (신림동)
 (72) 발명자
김기남
 경기 용인시 기흥구 동백8로 90, 2404동 801호 (동백동, 백현마을모아미래도아파트)
송대준
 경기 용인시 처인구 포곡읍 두계로 72, 102동 401호 (이공파크빌아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 김정희

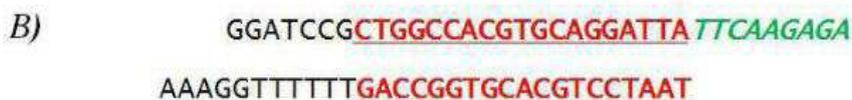
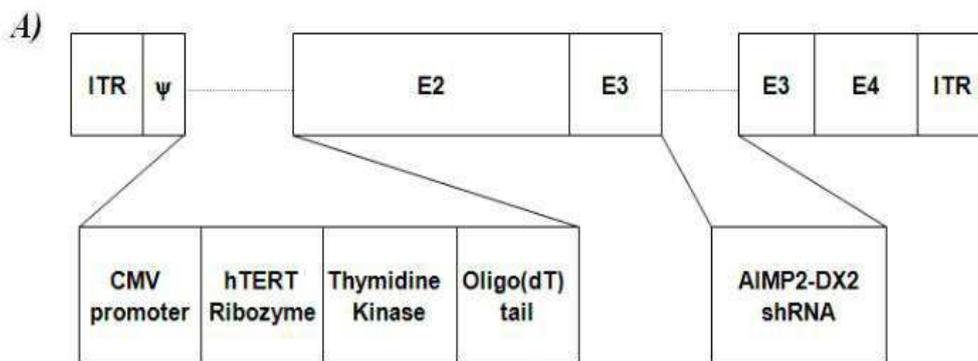
(54) 발명의 명칭 **리보자임과 shRNA를 함유하는 아데노바이러스 및 이를 포함하는 암 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 암치료용 아데노바이러스에 관한 것으로, 더욱 자세하게는, hTERT 리보자임과 치료용 유전자인 HSVtk(Herpes simplex virus thymidine kinase)가 연결된 유전자 구조체에, 추가적으로 AIMP2-DX2 특이적 shRNA가 포함된 유전자 구조체를 함유하는 암치료용 아데노바이러스에 관한 것이다.

본 발명의 아데노바이러스를 함유하는 암치료용 조성물은 기존의 항암제 또는 종래의 hTERT(human telomerase reverse transcriptase) 리보자임을 함유하는 아데노바이러스 보다 높은 종양억제 활성을 나타내어, 뛰어난 암치료 효능을 나타낼 것으로 기대된다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

이정은

경기 용인시 기흥구 동백8로 126, 2503동 1605호
(동백동, 백현마을모아미래도아파트)

이세희

경기 오산시 오산로132번길 10, 216동 2204호 (원
동, 대림e-편한세상2단지아파트)

김승우

경기 군포시 산본로 299, 223동 1105호 (금정동,
층무1차아파트)

이정우

서울 구로구 신도림로 78, 309동 2102호 (신도림동, 신도림3차동아아파트)

김영인

경기 용인시 기흥구 강남서로67번길 5, (구갈동)

김성훈

서울 강남구 남부순환로363길 30, 102동 1105호 (도곡동, 쌍용예가아파트)

민정현

경기 용인시 기흥구 동백7로 56, 1107동 602호 (동백동, 호수마을서해그랑블)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-G-1-A-Y0-E-32
부처명	지식경제부
연구관리전문기관	한국산업기술진흥원
연구사업명	광역경제권선도산업육성사업
연구과제명	혁신형 폐암치료제 개발
기 여 율	1/1
주관기관	주식회사 대응
연구기간	2009.12.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

AIMP2(ARS-interacting multi-functional protein 2) 단백질의 엑손 2영역이 결실된 단백질인 AIMP2-DX2의 mRNA에 특이적인 서열번호 1의 염기서열을 가지는 shRNA 핵산분자 및 hTERT(human telomerase reverse transcriptase) 리보자임을 함유하는 아데노바이러스.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, HSVtk(herepes simplex virus thymidine kinase) 유전자를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 아데노바이러스.

청구항 4

제1항 또는 제3항 중 어느 한 항의 아데노바이러스를 함유하는 폐암, 간암, 유방암, 신장암, 피부암 및 골육종으로 구성되는 군에서 선택되는 암의 치료용 조성물.

청구항 5

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 암 치료용 아데노바이러스에 관한 것으로, 더욱 자세하게는, hTERT 리보자임과 치료용 유전자인 HSVtk(Herpes simplex virus thymidine kinase)를 코딩하는 유전자가 연결된 유전자 구조 체에, 추가적으로 AIMP2-DX2 특이적 shRNA가 포함된 유전자 구조 체를 함유하는 암 치료용 아데노바이러스 및 이를 포함하는 암 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 암으로 인한 사망률은 국내·외를 막론하고 해마다 증가하는 추세이다. 암은 세계적으로 감염성 질환 및 심혈관계 질환과 더불어 주요한 사망원인 중 하나로 손꼽히고 있다. 세계보건기구(WHO)의 세계 보건 보고서(World Health Report)에 따르면, 2004년 총 사망자의 12.5%인 7,121,000명이 암으로 사망하였으며, 식습관, 환경의 변화 및 수명연장으로 인하여 향후 25년 내에 암 발생인구가 매년 약 3천만 명으로 늘어나고, 이중 2천만 명의 인구가 암으로 사망할 것으로 예상하고 있다.

[0003] 현재 암치료를 사용되는 방법은 크게 외과적 수술, 방사선 치료 및 약물치료가 있는데, 이들 방법은 암치료를 위해 독자적으로 사용되거나 두 가지 이상의 방법이 병용되고 있으며, 근래에는 생명과학분야의 눈부신 발전에 힘입어 생물요법제가 급성장하고 있다.

[0004] 생물요법제는 신체 본연의 면역 기능을 회복시키거나 증가시킴으로써 암세포의 활동력을 약화시켜 암의 진행을 막는 것을 치료적 근거로 삼고 있다. 신체의 면역 체계가 제 기능을 발휘할 때 암세포들을 효과적으로 사멸시킬 수 있으나, 그렇지 않은 경우 암세포가 쉽게 증식하거나, 또는 다른 병원균들이 쉽게 공격을 가할 수 있게 된다. 생물요법제의 상기 단점을 보완하기 위해 외과적 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등과 같은 다른 치료법

들과 같이 사용되기도 한다. 현재 생명과학분야에서 관심을 받고 있는 생물요법제로는 안티센스 항암제 및 혈관 생성 억제제를 들 수 있다. 안티센스 항암제는 암세포의 특이적 mRNA에 상보적으로 결합할 수 있는 DNA단편을 사용하여, mRNA의 프로세싱 또는 단백질의 발현을 저해하는 방법으로, 암세포의 사멸을 유도하는 것이다. 인간 게놈 프로젝트의 결과로 인하여 30,000여개의 유전자 서열이 관독되고, 100,000여개의 mRNA서열을 알 수 있게 되었다. 이로써 암세포와 연관된 mRNA 후보군에 대한 정보가 대량 확보되면서, 신호전달 체계와 관련된 유전자, 세포사멸(apoptosis) 및 세포 증식에 관련된 유전자들에 대한 안티센스 항암제를 스크리닝하여 임상 실험 중에 있다.

[0005] 유전자 전달 기술은 크게 바이러스를 수송체로 사용하는 방법(viral vector-based transfer method), 합성 인지질이나 합성 양이온성 고분자 등을 사용하는 비바이러스성 방법(non-viral delivery method) 및 세포막에 일시적인 전기자극을 가하여 유전자를 도입하는 전기 투과법(electroporation) 등의 물리적 방법으로 구분할 수 있다.

[0006] 상기 전달 기술 중에서, 바이러스 수송 체를 사용하는 방법은 치료유전자로 대체된 유전자를 지니는 일부 또는 전체의 복제능력이 결손된 벡터로서 유전인자의 전달이 효율적으로 이루어질 수 있기 때문에 유전자치료를 위해 선호하는 방법이다.

[0007] 바이러스 수송체 또는 바이러스 벡터로 사용되는 바이러스로는 RNA 바이러스 벡터(레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등)와 DNA 바이러스 벡터(아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터 등)가 있으며, 이 외에도 단순포진 바이러스 벡터(herpes simplex viral vector), 알파 바이러스 벡터(alpha viral vector) 등이 있다. 이 중에서도 특히 연구가 활발히 진행되고 있는 것은 레트로바이러스와 아데노바이러스이다.

[0008] 숙주세포의 게놈에 통합기능이 있는 레트로바이러스(Retrovirus)의 특징은 인체에 해가 없지만 통합 시 정상세포의 기능을 억제할 수 있고, 다양한 세포에 감염되고, 증식이 쉬우며, 1~7 kb 정도의 외부 유전자를 수용할 수 있고, 복제결핍 바이러스를 생성할 수 있는 능력이 있다는 것이다. 그러나, 유사분열 이후의 세포에 감염되기 힘들며, in vivo 상태에서 유전자 전달이 어렵고, 체세포 조직을 항시 in vitro에서 증식하여야만 한다는 단점도 지니고 있다. 또한, 레트로바이러스는 원형암유전자(proto-oncogene)에 통합될 수 있어 돌연변이의 위험성이 있고 세포를 괴사시킬 수도 있다.

[0009] 한편, 아데노바이러스(Adenovirus)는 클로닝 벡터(cloning vector)로 여러 가지 장점을 가지는데, 중간정도의 크기로 세포 핵 속에서 복제될 수 있으며, 임상적으로 무독성이고, 외부 유전자를 삽입하여도 안정적이며, 유전자의 재배열이나 손실이 일어나지 않고, 진행생물을 형질 전환시킬 수 있으며, 숙주세포 염색체에 통합되어도 안정적이면서도 높은 수준으로 발현된다. 아데노바이러스의 좋은 숙주세포는 인간의 조혈, 림프, 골수종의 원인이 되는 세포이다.

[0010] 리보자임(ribozyme)은 RNA의 일종으로 특정한 RNA 염기서열을 인식하여 절단하는 효소기능을 가진 RNA 분자로, 타겟 부위의 단일 뉴클레오티드, 스플라이스 및 RNA 전사체 차이를 식별가능하기 때문에, 유전자 치료에 사용될 수 있다(Uhlenbeck OC, Nature, 328:596, 1987; Woolf TM, Nat Biotech, 16:341, 1998).

[0011] hTERT(human telomerase reverse transcriptase) RNA- 타겟팅 trans-splicing ribozyme은 암세포에서 리포터 유전자(β -갈락토시데이즈, LacZ) 또는 prodrug-responsive 유전자(herpes simplex virus thymidine kinase, HSVtk)의 hTERT-의존적 발현을 유도할 수 있다(Kwon B-S et al., Mol. Ther, 12:824, 2005). 또한, 리보자임을 포함하는 아데노바이러스 벡터는 암세포의 선택마커로 사용될 수 있고, hTERT-발현 암세포주나 종양 xenograft에서 암세포를 ganciclovir에 민감성으로 만들 수 있다(Hong SH, et al., Mol. Ther, 2007). 이러한 결과는 trans-splcing 리보자임이 암 특이적인 전사체를 인지하는 항암제로서 사용될 수 있다는 것을 시사한다.

[0012] 본 발명자들은 hTERT ribozyme과 HSVtk 유전자를 도입시킨 아데노바이러스를 제조하고, 이를 대장암 모델 마우스에 주입하였을 때, hTERT ribozyme이 암 특이 전사체를 인식하고 이들을 리프로그래밍하여 종양을 억제시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

[0013] 이에, 본 발명자들은 항암효과가 보다 뛰어난 유전자 치료제를 개발하고자 예의 노력한 결과, hTERT ribozyme과 암세포에서 특이적으로 발현되는 AIMP2-DX2의 shRNA, 추가적으로 HSVtk 유전자를 아데노바이러스에 도입시킨 유전자 치료제를 사용하는 경우, 기존의 hTERT ribozyme을 함유하는 아데노바이러스보다 높은 활성으로 종양의 성장을 억제시킨다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 종양억제 활성이 뛰어난 유전자 치료용 아데노바이러스 및 이를 포함하는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 hTERT(human telomerase reverse transcriptase) 리보자임과 AIMP2 단백질의 엑손 2영역이 결실된 단백질인 AIMP2-DX2의 mRNA에 특이적인 shRNA 핵산분자를 함유하는 아데노바이러스를 제공한다. 상기 아데노바이러스에는 추가적으로 HSVtk 유전자가 포함될 수 있다.

[0016] 본 발명은 또한 상기 아데노바이러스를 함유하는 암치료용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 아데노바이러스를 함유하는 암치료용 조성물은 기존의 항암제 또는 종래의 hTERT(human telomerase reverse transcriptase) 리보자임을 함유하는 아데노바이러스 보다 높은 종양억제 활성을 나타내어, 뛰어난 암 치료 효능을 가진다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명에 따른 아데노바이러스 DWP 451제작을 위한 제조용 플라스미드의 제작방법을 나타낸 것으로, A)는 pE1.2-Rz-HSVtk의 제작방법을 도식화한 것이고, B)는 pAd-Rz-HSVtk-DX2의 제작방법을 도식화한 것이다.

도 2의 A)는 본 발명에 따른 아데노바이러스 DWP 451의 유전자구조를 나타낸 것이고, B)는 본 발명에서 사용된 AIMP2-DX2의 발현을 억제하는 shRNA의 구조를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 아데노바이러스 DWP 451을 폐암세포주에 처리한 후의 폐암세포 살상효과를 나타낸 것이다.

도 4는 폐암세포주에 AIMP2-DX2 특이적 naked siRNA를 처리하였을 때의 폐암세포 살상효과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 아데노바이러스 DWP 451을 농도별로 마우스 xenograft 모델에 처리하였을 때 종양의 크기변화를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명에 따른 아데노바이러스 DWP 451과 양성대조군인 DWP 455를 처리한 마우스 xenograft 모델 그룹에서 종양의 크기변화를 나타낸 것이다.

도 7은 아데노바이러스 DWP 418과 AIMP2-DX2 shRNA를 추가로 포함하는 DWP418을 처리한 마우스 xenograft 모델 그룹에서 종양의 크기변화를 나타낸 것이다.

도 8은 Telomerase positive인 암세포에서만 복제되도록 조작된 아데노바이러스인 DWP418의 계열지도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 일 관점에서, 본 발명은 hTERT(human telomerase reverse transcriptase) 리보자임과 AIMP2 단백질의 엑손 2영역이 결실된 단백질인 AIMP2-DX2의 mRNA에 특이적인 shRNA 핵산분자를 함유하는 아데노바이러스에 관한 것이다.

[0020] 본 발명에서 용어 "리보자임(ribozyme)"은 효소 역할을 하는 RNA분자, 또는 그 RNA분자와 단백질로 구성된다. 우선 리보자임은 자기이어맞추기(스플라이싱, splicing)를 하는 역할을 가진 유형이 있다. 이것에는 스플라이싱을 하는 RNA분자인 그룹 I 인트론과 그룹 II 인트론이 있다. 또한 바이로이드, 바이러스이드, 새틀라이트RNA 등에 들어있는 망치머리리보자임(Hammerhead Ribozyme)이 있다.

- [0021] 그 외에도 리보자임은 자기 자신 이외의 다른 RNA분자, DNA, 그리고 생체분자에서도 반응을 진행시키는 촉매 역할을 한다. hTERT(human telomerase reverse transcriptase) RNA- 타겟팅 trans splicing ribozyme은 암세포에서 리포터 유전자(β -갈락토시데이즈, LacZ) 또는 prodrug-responsive 유전자(herepes simplex virus thymidine kinase, HSVtk)의 hTERT-의존적 발현을 유도할 수 있다(Kwon B-S *et al.*, *Mol. Ther.*, 12:824, 2005).
- [0022] 본 발명자들은 상기 hTERT 리보자임과 HSVtk유전자를 함유하는 아데노바이러스가 대장암 마우스 모델에서 항암 효과를 나타낸다는 것을 확인한 바 있다(Jeong, JS *et al.*, *Cancer Therapy:preclinical*, 14:281, 2008). 따라서, 본 발명에서 제공되는 아데노바이러스는 HSVtk(herepes simplex virus thymidine kinase) 유전자를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0023] 본 발명에 있어서, AIMP2(ARS-interacting multi-functional protein 2)는 아미노아실-tRNA 합성효소 복합체(Aminoacyl-tRNA synthetase: ARSs)의 형성에 관련된 단백질 중의 하나로, p38/JTV-1 또는 p38로 불려지기도 하며, AIMP2의 유전적 붕괴가 c-myc의 과발현을 유도하고 이로 인해 폐의 치조 상피세포(alveolar epithelial cell)가 과증식되면서 신생쥐의 치사(neonatal lethality)가 유도되는 것이 알려졌으며, 또한 AIMP2가 TGF- β 에 의해 유도되고 핵으로 이동하여 c-myc의 발현을 억제한다고 알려져 있다 (Kim *et al.*, *Nat Genet.* 34, 330-336, 2003).
- [0024] 또한, 암 세포주 및 조직에서 AIMP2의 엑손 2가 결손된 형태의 변이체인 AIMP2-DX2가 특이적으로 발현되며, AIMP2 단백질의 서열(312aa version: AAC50391.1 또는 GI:1215669; 320aa version: AAH13630.1, GI:15489023, BC013630.1)은 문헌(312aa version: Nicolaidis, N.C. *et al.*, *Genomics* 29:329, 1995/ 320 aa version: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:16899, 2002)에 기술되어 있으며, 이 중 엑손 2에 해당하는 영역이 결실된 단백질이다.
- [0025] 본 발명에서의 AIMP2-DX2 단백질은, 전체 서열의 AIMP2에서 엑손 2의 영역이 결실된 단백질을 포함하여, AIMP2 증가물(아미노산 서열의 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의한 변형체로 AIMP2과 실질적으로 동등한 활성을 갖는 기능적 증가물 또는 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키는 변형을 가지나 AIMP2과 실질적으로 동등한 활성을 갖는 기능적 유도체)에서 엑손 2의 영역이 결실된 단백질을 포함한다.
- [0026] 본 발명에서 AIMP2 단백질 서열 중 “엑손 2의 영역이 결실” 되었다는 것은 AIMP2 단백질에서 엑손 2 영역의 아미노산 서열(아미노산 46번 내지 114번)이 부분적으로나 전체적으로 상실되어 생긴 변이체가 AIMP2 단백질과 헤테로다이어머를 형성하여 AIMP2의 정상적인 기능을 방해하는 것을 의미한다. 따라서, AIMP2-DX2 단백질은 AIMP2 단백질의 엑손 2의 아미노산 서열이 모두 결실되거나 이 영역의 아미노산 서열을 포함하여 엑손 1, 엑손 3, 엑손 4 또는 이들 영역 모두에서 이들 영역의 일부도 결실되거나, 엑손 2의 아미노산 서열의 일부만이 결실된 단백질을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 AIMP2-DX2 단백질은 AIMP2 단백질의 엑손 2의 아미노산 서열이 모두 결실된 단백질이다. AIMP2-DX2 단백질이 폐암, 간암, 유방암, 피부암, 신장암, 골육종 등의 암 조직에서 특이적으로 발현된다는 것이 알려져 있어, AIMP2-DX2 단백질의 발현을 억제한다면, 항암효과를 기대할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 용어 "shRNA" 는 small hairpin RNA 혹은 short hairpin RNA (shRNA)을 말하며, RNA 간섭으로 유전자의 발현을 침묵(silencing)시킬 때 사용하는 작은 hairpin 구조를 가진 RNA이다. shRNA는 벡터를 이용하여 세포로 도입되며, shRNA hairpin 구조는 세포 내 다른 물질에 의하여 절단되어 siRNA가 되는데 이 siRNA가 RNA-induced silencing complex (RISC)와 결합하게 되고, 이 결합체(complex)는 siRNA와 서열이 맞는 부분을 가진 mRNA에 달라붙어서 그 mRNA를 절단하고, 그 결과 mRNA가 파괴되므로 그 유전자 발현이 되지 않게 되어 유전자 침묵이 일어나게 된다.
- [0028] 본 발명에서 용어, "siRNA" 란 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 표적유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는, 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.
- [0029] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는 표적유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평할(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조

모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다.

- [0030] 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기, 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 본 명세서에서 siRNA의 전장은, 중앙의 이중사슬 부분의 길이와 양 말단의 단일사슬 돌출을 구성하는 길이의 합으로 나타내었다. 또한, siRNA는 표적유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한 쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.
- [0031] 본 발명에서 용어, “특이적” 또는 “특이적인”은 세포 내에서 다른 유전자에 영향을 미치지 않고 목적 유전자의 발현만을 억제하는 능력을 의미하며, 본 발명에서 “AIMP2-DX2 특이적”은 AIMP2-DX2의 유전자의 발현을 선택적으로 억제하는 것을 의미한다. 본 발명의 shRNA 및 siRNA는 AIMP2-DX2 특이적으로 작동하도록 AIMP2-DX2의 엑손 1과 엑손 3의 경계 지점에 해당하는 mRNA와 상동인 서열을 포함하는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 RNA 가닥을 가진다.
- [0032] 상기에서 “유전자 발현의 감소(Inhibition of gene expression)”란 목적 유전자에서 생성된 mRNA 및/또는 단백질의 수준이 제거 또는 감소된 것을 의미하고, 이는 mRNA의 절단(cleavage)을 통해 일어나는 RNA 간섭 (RNAi: RNA interference) 현상에 의한다.
- [0033] siRNA를 제조하는 방법은 시험관에서 siRNA를 직접 합성한 뒤, 형질전환(transfection) 과정을 거쳐 세포 안으로 도입시키는 방법과 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-derived siRNA 발현 카세트를 세포 안으로 형질전환 또는 감염(infection) 시키는 방법이 있다. siRNA를 제조하고 세포 또는 동물로 도입하는 방법의 결정은 실험의 목적 및 표적 유전자 산물의 세포 생물학적 기능에 따라 달라질 수 있다.
- [0034] 본 발명의 하나의 양태에서는 hTERT 리보자임과 AIMP2-DX2의 mRNA에 특이적인 shRNA 핵산분자를 함유하는 아데노바이러스 DWP 451을 폐암 세포주인 A459에 농도별로 처리한 결과, 바이러스 파티클의 농도가 증가할수록 폐암 세포의 생존율이 감소하는 것을 확인하였다. 본 발명에 있어서, 바람직한 shRNA는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 한다.
- [0035] 본 발명의 다른 양태에서는, hTERT 리보자임과 AIMP2-DX2의 mRNA에 특이적인 shRNA 핵산분자를 함유하는 아데노바이러스 DWP451과 DWP451에서 AIMP2-DX2 shDNA 가 결실된 바이러스인 DWP455를 10^6 바이러스 파티클 농도로 마우스 종양모델에 처리한 결과, DWP455보다 DWP 451을 처리한 경우가 종양크기가 월등히 감소하는 것을 확인하였다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 양태에서는, AIMP2-DX2 shRNA를 hTERT 리보자임을 함유하는 아데노바이러스가 아닌 DWP418에 포함시킨 아데노바이러스를 투여한 마우스 종양모델에서 AIMP2-DX2 shRNA를 추가로 포함하는 아데노바이러스를 투여한 그룹보다 AIMP2-DX2 shRNA를 포함하지 않는 아데노바이러스를 투여한 그룹의 마우스의 종양의 크기가 더 많이 감소한 것을 확인하였다.
- [0037] 따라서, 동일한 shRNA를 사용하더라도, 전달체로 사용되는 아데노바이러스의 종류에 따라서 항암효능에 차이가 있다는 것을 알 수 있다.
- [0038] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 아데노바이러스를 함유하는 암치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0039] 본 발명의 암치료용 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있으며, 경구 투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.
- [0040] 상기 본 발명에 따른 조성물로 치료할 수 있는 암 또는 암종은 특별히 제한되지 않으며, 모든 종류의 고형암 및 혈액암을 포함한다. 바람직하게 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 위암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 결장암, 췌장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 식도암, 담도암, 고환암, 직장암, 두경부암, 경추암, 요관암, 골육종, 신경세포아종, 흑색종, 섬유육종,

횡문근육종, 성상세포종, 신경모세포종 또는 신경교종 등을 포함하며, 더욱 바람직하게는, 폐암, 간암, 유방암, 신장암, 피부암, 골육종, 대장암, 난소암, 위암, 췌장암 등을 들 수 있다.

- [0041] 본 발명의 치료용 조성물에 함유되는 아데노바이러스의 유효 투여량의 범위는 성별, 중증도, 연령, 투여 방법, 표적 세포, 발현 수준 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 경구적으로 또는 정맥내, 피하, 비강내 또는 복강내 등에 비경구적으로 사람과 동물에게 투여된다.
- [0043] 비경구적 투여는 피하주사, 근육 내 주사 및 정맥주사와 같은 주사법 및 점적법을 포함한다. 이외의 본 발명 약제학적 조성물은 각종 제형의 형태로 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다.
- [0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명이 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0045] **실시예 1: 본 발명에 따른 암치료용 아데노바이러스의 제조**
- [0046] 암치료용 아데노바이러스 DWP451을 제작하기 위하여 AdenoQuick 13.1 Kit(O.D.260, Inc., USA)를 이용하였다. 먼저 Rz-HSVtk 유전자를 아데노바이러스의 cosmid 벡터인 pE1.2에 넣기 위하여 DWP455를 주형 DNA로 하여 하기 서열번호 2~3 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다
- [0047] Sense primer: 5'-TTT TCT AGA CCT GGC ATT ATG CCC AGT AC-3'(서열번호 2)
- [0048] antisense prime: 5'-AAG GGA TCC TCA GTT AGC CTC CCC CAT C-3'(서열번호 3)
- [0049] 생성된 PCR 산물을 XbaI/BamH I 제한효소로 절단하여 pE1.2의 Xba I /BamH I 부위에 cloning하여 pE1.2-Rz-HSVtk를 제작하였다 (도 1A).
- [0050] pE3.1-DX2와 pE1.2-Rz-HSVtk의 2개의 cosmid를 DraIII 제한효소로 절단하여 Sfi-digested pAD-13.1에 삽입하였다. 아데노바이러스 E1 지역에 Rz-HSVtk 유전자가, E3 지역에 DX2가 삽입된 아데노바이러스 pAd-Rz-HSVtk-DX2를 제작하였다. 상동 재조합으로 제작된 플라즈미드 pAd-Rz-HSVtk-DX2는 *PacI*으로 절단하여 293 세포주에 형질전환시킴으로써 DWP451 재조합 아데노바이러스를 제작하였다(도 1B).
- [0051] **실시예 2: 아데노바이러스의 폐암 세포 살상효과**
- [0052] A549 세포(ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 96웰 플레이트에 4000세포/웰/1% FBS F12 kaighn's 변형배지(Life technologies, USA)로 분주하고 37°C에서 1일간 배양한 후, 다양한 농도(0.5, 2.5, 5, 50, 500, 5000 virus particles/cell)의 실시예 1에서 제조한 DWP451 바이러스를 각 웰에 처리하고, 1일 경과 후에, Ganciclovir(Roche, USA)를 50 μM/웰/1% FBS 농도로 처리하고, 3일간 배양하였다.
- [0053] 배양된 각 웰에 MTS((tetrazolium compound [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5- (3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS])를 20 μL/웰 농도로 처리하고, 37°C에서 배양한 후, 대조군 값이 1.5~2에 도달할 때까지 reading 하였다.
- [0054] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, DWP 541을 다양한 농도로 처리한 경우, DWP 541 농도 의존적으로 폐암 살상효과가 나타나는 것을 확인하였다.
- [0055] **실시예 3: Naked siRNA 를 이용한 효능 평가**
- [0056] 본 발명에서 사용된 DX2 특이적 siRNA를 iMAX 캐리어를 이용하여 폐암세포주 H1703에 처리하였을 때, 암세포의 생존율을 확인하였다.
- [0057] H1703 세포(ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 96웰 플레이트에 4000세포/웰/1%

FBS RPMI1640 배지(Life technologies, USA)로 분주하고 37℃에서 1일간 배양한 후, 다양한 농도(2.812, 5.625, 11.25, 22.5, 45 nM)의 siRNA를 iMAX와 혼합한 후 각 웰에 처리하였다. 3일간 배양한 후 각 웰에 CTG(CellTiter-Glo[®], Promega, USA)를 100 μL/웰 농도로 처리하고, luminescence를 reading 하였다.

[0058] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, AIMP2-DX2에 대한 Naked siRNA를 처리하였을때 폐암 세포주 H1703에서 농도에 비례하여 폐암세포 살상효과가 나타나는 것을 확인하였다.

[0059] **실시예 4: 마우스 모델을 이용한 xenograft 실험**

[0060] 누드마우스에 폐암세포주를 피하주사하여 종양을 형성시키고, 본 발명의 아데노바이러스 DWP 451과 대조군인 DWP455(DWP451에서 AIMP2-DX2 shRNA가 없는 아데노바이러스)를 주사하여 종양 억제능을 확인하였다.

[0061] 먼저, A549세포를 10% FBS, 2mM L-glutamine, 100U/ml 페니실린과 100 μg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI-1640(Gibco, BRL, USA) 배양액에 접종하고 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0062] 상기 배양된 A549세포 5x10⁷개를 0.1mL HBSS에 현탁시키고, 5-8주령의 BALB/c 누드마우스(18~22g)의 우측 하복부에 피하주사하고, 종양의 크기가 100~150mm³ 크기로 자라면 그룹을 분리하여 아데노바이러스를 투여하였다.

[0063] 투여군은 표 1에 나타내었다.

표 1

마우스 모델 실험그룹

[0064]

그룹	마리수	약물처리군	투여루트	투여간격
1	10	1x PBS	IT (종양내)	1회/2주
2	10	Cisplatin (3mg/kg)	IP (복강)	2회/1주
3	10	DWP455(1x10 ⁶) GCV 50mg/kg	IT	1회/2주
			IP	2회/1일
4	10	DWP451(1x10 ⁹) GCV 50mg/kg	IT	1회/2주
			IP	2회/1일
5	10	DWP451(1x10 ⁸) GCV 50mg/kg	IT	1회/2주
			IP	2회/1일
6	10	DWP451(1x10 ⁷) GCV 50mg/kg	IT	1회/2주
			IP	2회/1일
7	10	DWP451(1x10 ⁶) GCV 50mg/kg	IT	1회/2주
			IP	2회/1일

[0065] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 본 발명의 아데노바이러스 DWP451를 처리한 마우스의 복부 종양의 크기가 바이러스의 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였으며, 모든 그룹에서 양성대조물질인 Cisplatin 보다 우수한 항암효과를 나타내었다.

[0066] 또한, 도 6에 나타난 바와 같이, 10⁶ 바이러스 파티클을 처리한 군에서 hTERT 리보자임을 포함하는 아데노바이러스인 DWP 455를 투여한 그룹보다 본 발명의 DWP451을 투여한 그룹의 마우스에서 종양크기가 훨씬 더 많이 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 따라서, AIMP2-DX2 shRNA와 hTERT 리보자임을 함께 투여하는 경우 현저한 상승효과를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0067] **비교예: AIMP2-DX2 shRNA를 포함하는 DWP 418의 마우스 xenograft 분석**

[0068] AIMP2-DX2 shRNA를 hTERT 리보자임을 함유하는 아데노바이러스가 아닌 아닌 DWP418(Telomerase positive인 암 세포에서만 복제되도록 조작된 아데노바이러스, 도 8 참조)에 포함시킨 아데노바이러스를 사용하여 실시예 4와 동일한 방법으로 종양억제 실험을 수행하였으며, 형성된 종양에는 10⁹의 바이러스 파티클을 각각 처리하였다.

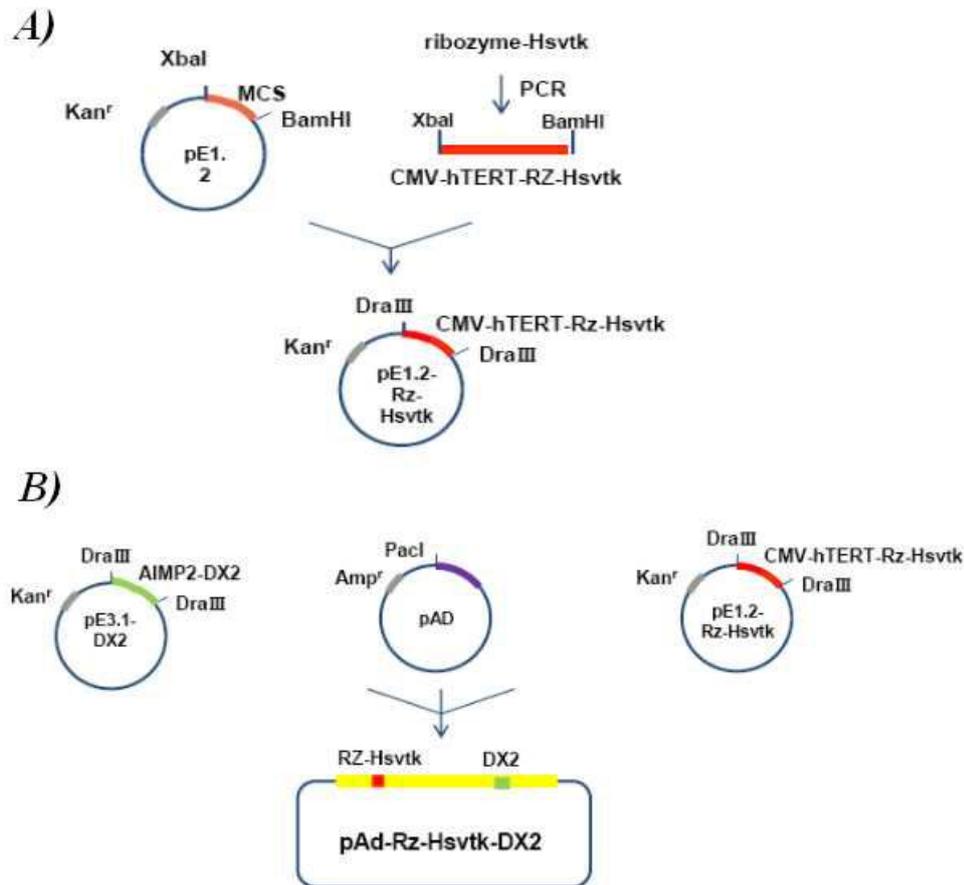
[0069] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 AIMP2-DX2 shRNA를 추가로 포함하는 아데노바이러스를 투여한 그룹보다 AIMP2-DX2 shRNA를 포함하지 않는 아데노바이러스를 투여한 그룹의 마우스의 종양의 크기가 더 많이 감소한 것을 확인하였다.

[0070] 따라서, 동일한 shRNA를 사용하더라도, 전달체로 사용되는 아데노바이러스의 종류에 따라서 항암효능에 차이가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

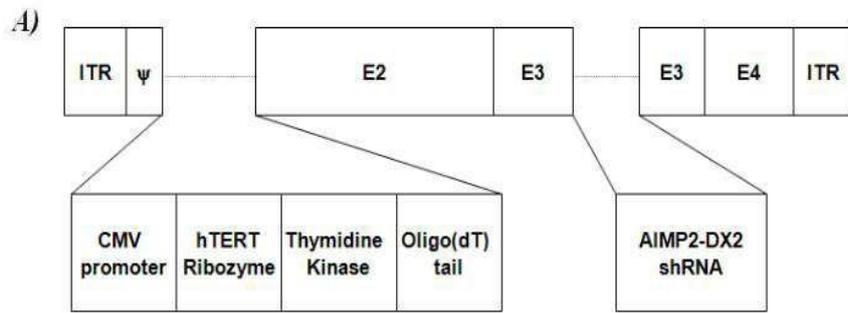
[0071] 이상으로, 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

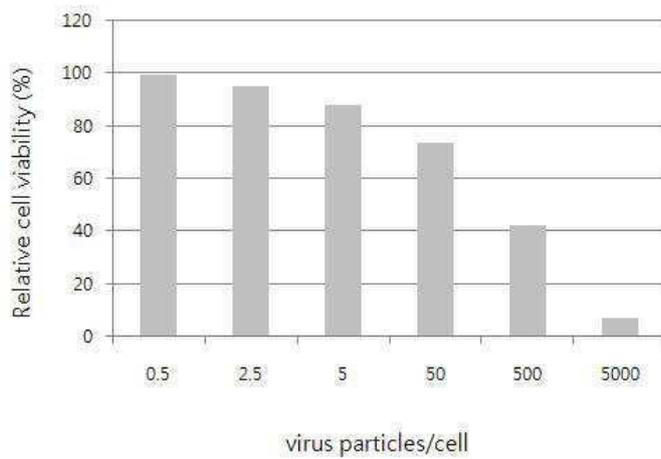


도면2

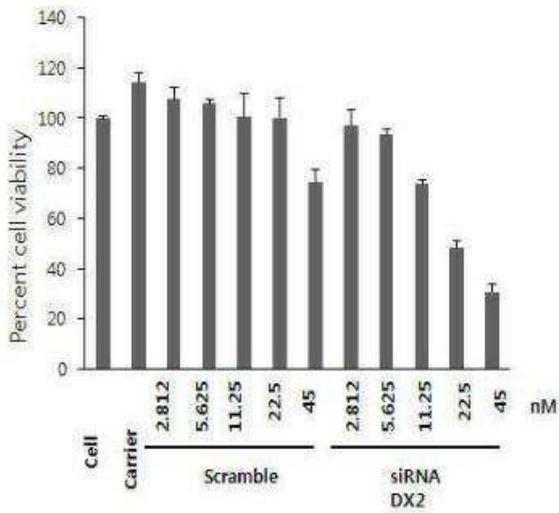


B) GGATCCGCTGGCCACGTGCAGGATTA TTCAAGAGA
 AAAGGTTTTTTGACCGGTGCACGTCCTAAT

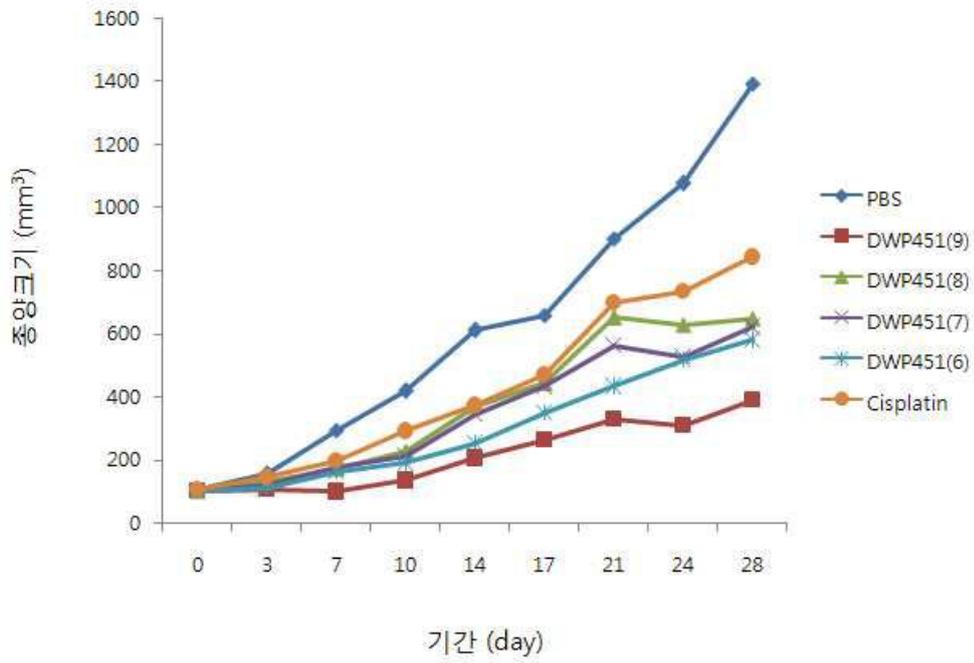
도면3



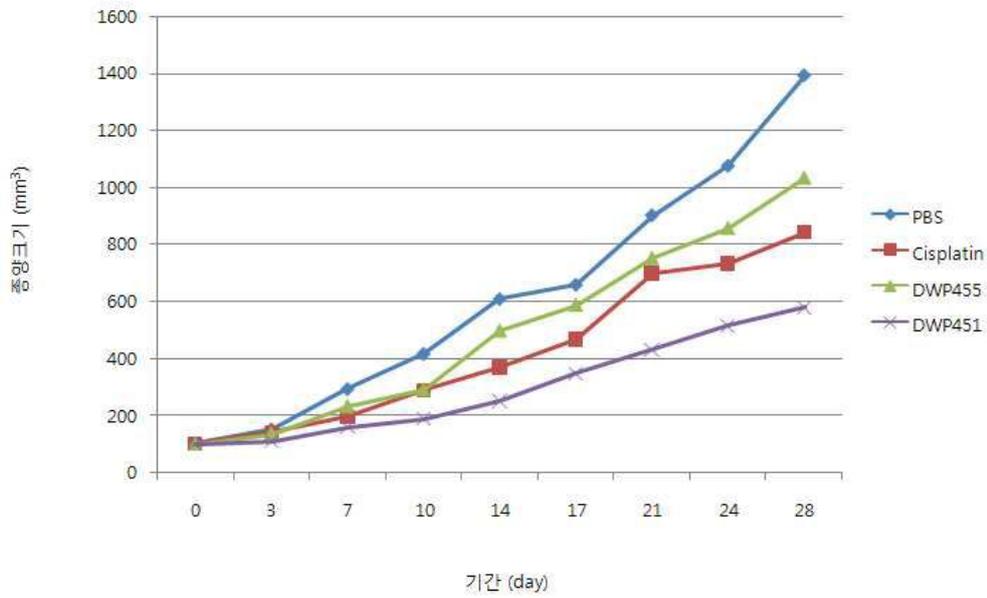
도면4



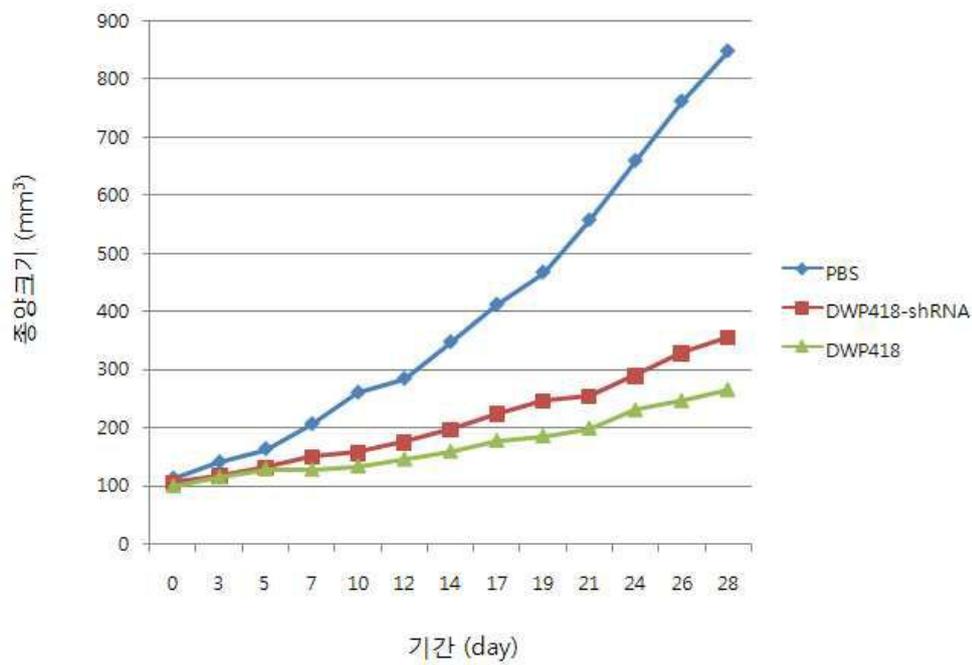
도면5



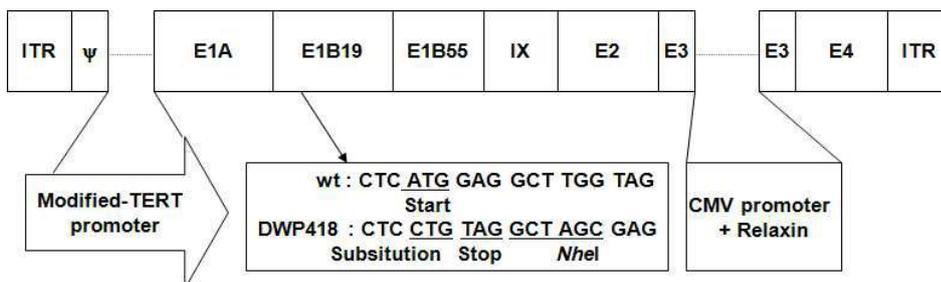
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110>	Deawoong. Co., LTD	
<120>	Adenovirus Containing Ribozyme and shRNA, and therapeutic composition comprising thereof	
<130>	P12-B208	
<160>	3	
<170>	Kopatent In 2.0	
<210>	1	
<211>	65	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	shRNA	
<400>	1	
	ggatccgctg gccacgtgca ggattattca agagataatc ctgcacgtgg ccagtttttt	60
	ggaaa	65
<210>	2	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>		
	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	2	
	ttttctagac ctggcattat gcccagtac	29
<210>	3	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	3	
	aagggatcct cagttagcct ccccatc	28