

특허청구의 범위

청구항 1.

(a) 아데노바이러스의 ITR (inverted terminal repeat) 뉴클레오타이드 서열 및 (b) 서열목록 제1서열의 VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A)의 mRNA에 상보적이며 VEGF-A 유전자의 발현을 억제하는 siRNA (small interfering RNA) 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 siRNA 분자는 상기 아데노바이러스의 종양세포 괴사능을 향상시키는 재조합 아데노바이러스로서,

상기 재조합 아데노바이러스는 E3 유전자 영역이 결실된 것이고, 상기 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 상기 E3 유전자 영역에 삽입되고,

상기 재조합 아데노바이러스는 비활성화된 E1B 19 유전자, E1B 55 유전자 또는 E1B 19/E1B 55 유전자를 가지며,

상기 재조합 아데노바이러스는 활성의 E1A 유전자를 포함하고,

상기 재조합 아데노바이러스는 E1A 유전자 서열에 위치한 Rb 결합 부위를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 중에서 45번째 Glu 잔기가 Gly으로 치환된 변이 및 121-127번째 아미노산 서열이 전체적으로 Gly으로 치환된 변이를 갖는 것을 특징으로 하는 종양세포 살상능이 개선된 재조합 아데노바이러스.

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

제 1 항에 있어서, 상기 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 VEGF-A mRNA 서열의 379-399 뉴클레오타이드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노바이러스.

청구항 7.

제 6 항에 있어서, 상기 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 VEGF-A mRNA 서열의 379-399 뉴클레오타이드 서열과 이에 상보적인 서열이 동일한 가닥 (strand)에 모두 존재하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노바이러스.

청구항 8.

제 1 항에 있어서, 상기 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제2서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노바이러스.

청구항 9.

제 7 항에 있어서, 상기 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 VEGF-A mRNA 서열의 379-399 뉴클레오타이드 서열에 상응하는 서열 (corresponding sequence) 및 상보적인 서열 (complementary sequence)을 가지며, 상기 해당하는 서열과 상보적인 서열 사이에 헤어핀 구조를 형성하게 하는 서열이 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노바이러스.

청구항 10.

제 9 항에 있어서, 상기 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노바이러스.

청구항 11.

제 10 항에 있어서, 상기 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노바이러스.

청구항 12.

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 아데노바이러스는 도 3d - 도 3I로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자 지도를 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노바이러스.

청구항 13.

(a) 상기 제 1 항 및 제 6 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 재조합 아데노바이러스의 치료학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 항종양 조성물.

청구항 14.

삭제

청구항 15.

삭제

청구항 16.

삭제

청구항 17.

삭제

청구항 18.

삭제

청구항 19.

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 VEGF-A 특이적 siRNA를 발현하는 개선된 종양 살상 효과를 나타내는 재조합 아데노바이러스에 관한 것이다.

RNA-매개 방해 (RNA-mediated interference: RNAi)는 21-25 뉴클레오타이드(nt) 크기의 작은 RNA 조각이 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 선택적으로 결합하여 분해함으로써 단백질 발현을 억제하는 현상이다(1). RNAi 현상은 1995년에 *C. elegans*와 식물에서 유전자를 조절하는 메커니즘의 일부로 처음 발견되었으며, 1998년 미국 카네기 연구소의 Andrew Fire와 매사추세츠 의과대학의 Craig Mello 팀의 실험을 통해, 특정 유전자의 염기서열에 해당하는 이중쇄 RNA (dsRNA)를 선충(*Caenorhabditis elegans*)의 체내에 주입하였을 때 그 유전자의 발현이 현저히 억제될 수 있음이 밝혀졌다(2). *C. elegans*에 주입된 장쇄의 dsRNA는 RNase III 패밀리에 속하는 Dicer라는 효소에 의해 21-25 bp 크기의 작은 방해 RNA (small interfering RNA: siRNA)로 절단되고, 그 절단된 짧은 dsRNA는 RISC (RNA-induced silencing complex) 효소 결합체에 합체되어 siRNA의 이중나선이 풀리게 된다. 이후, 단일 가닥으로 분리된 siRNA는 상보적인 서열을 갖는 특정 유전자의 mRNA에 결합하여 분해함으로써 그 유전자의 발현을 억제한다(3).

하지만, 포유류 같은 고등동물에서는 이와 같은 장쇄 dsRNA에 의한 특정 유전자의 발현 억제 현상이 관찰되지 않았다. 포유동물에서는 체내에 주입된 장쇄 dsRNA에 의해 단백질 키나아제 R (PKR)을 활성화시키는 비특이적 인터페론 (IFN) 유도과 같은 생체내 방어 기전이 활성화되고, 결과적으로 유전자의 발현 억제 현상이 비특이적으로 일어난다(4). 그러나 2001년, Elbashir 연구팀에서 21개 염기의 짧은 dsRNA (siRNA)를 배양된 포유동물 세포에 주입하여 특정 유전자의 발현을 선택적으로 억제할 수 있음을 보고한 후, 포유동물세포에서의 RNAi 이용 가능성이 크게 증가하였다(5).

현재, siRNA를 이용한 유전자 발현 억제 기술은 다양한 종류의 유전자들의 기능을 이해하는데 널리 이용되고 있을 뿐 아니라, 암, 감염성 질환과 같은 난치성 질환을 치료하는 치료제로서도 활발히 개발되고 있다(6). 종양 형성에 밀접히 관련된 Bcl-2와 c-Raf와 같은 암발생 (oncogenic) 유전자들에 특이적인 siRNA를 이용하여 인체 골수성 류케미아 세포에서 세포 고사를 유도할 수 있음이 보고되었고(7), 만성 골수성 류케미아 (chronic myelogenous leukemia: CML)에서 특징적으로 다량 발현되는 Bcr-abl 융합 유전자에 특이적인 siRNA를 이용하여 BCR-ABL 단백질의 발현량을 현저하게 감소시킬 수 있음이 보고되었다(8). 또한, HIV RNA에 상보적인 siRNA 또는 HIV-1의 보조 수용체 (co-receptor)인 CXCR4/CCR5 RNA에 상보적인 siRNA를 이용하여 HIV 바이러스의 감염을 저하시키고자 하는 방안들이 활발히 연구되고 있다(9). 최근에는 간염 바이러스에 상보적인 합성 siRNA를 이용하여 간염 바이러스의 유전자 발현을 현저하게 억제할 수 있음이 보고되었다(6).

siRNA를 이용하여 동물세포내의 특정 유전자의 발현을 억제하는 방법으로 생체의 (*in vitro*)에서 siRNA를 합성한 뒤 세포내로 도입시키는 방법 (*in vitro* preparation of siRNA)이 많이 이용되었는데, siRNA를 생합성하는 가격이 고가이고, 또한 세포 내로 합성된 siRNA를 주입하는 방법인 세포 형질감염의 효율이 매우 낮기 때문에 siRNA에 의한 유전자 발현 억제가 충분히 일어나지 않고 RNAi 효과가 2-3일간만 유지되는 단점들이 부각되었다(10). 이를 극복하기 위해서, siRNA를 세포내에서 발현시킬 수 있는 siRNA 발현 벡터 (plasmid vector)를 세포내로 도입시키는 방법이 개발되었다. 특히, RNA 중합효소 III의 프로모터로부터 siRNA 타겟 서열의 센스 및 안티센스 서열이 5-9개의 염기로 구성된 루프를 사이에 두고 위치한 짧은 헤어핀 RNA (short hairpin RNA: shRNA)를 발현하는 siRNA 발현 벡터의 경우에는, 세포내로 도입된 후 발현된 shRNA가 세포내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소 (Dicer 또는 RNase III)에 의해 siRNA로 전환되어 특정 유전자의 발현을 선택적으로 억제할 수 있는 특징이 있다(11).

Yang Shi 연구팀은 cdk-2와 라민 (lamin)과 같은 여러 종류의 내재성 유전자들의 발현을 DNA 벡터-기반 shRNA로 현저하게 억제할 수 있음을 보고하였으며(11, 12), Thomas Becker 연구팀은 GLUT2 유전자에 상보적인 shRNA를 발현하는 복제 불능 아데노바이러스를 이용하여 초기 래트 아이릿 세포내의 GLUT2 발현을 90% 이상 억제할 수 있음을 보고하였다(13). 또한, Sven Reske 연구팀은 p53 유전자에 상보적인 shRNA를 발현하는 복제 불능 아데노바이러스를 이용하여 유방암 세포주인 MCF-7과 폐암 세포주인 A549에서 p53의 발현을 선택적으로 억제할 수 있음을 보고하였다(14). 그러

나, 플라스미드를 이용한 shRNA 발현 벡터 시스템의 경우, 플라스미드를 세포내로 주입하는 방법인 형질전환의 효율이 낮고 또한 shRNA의 발현이 지속적이지 않은 단점이 있고, 복제 불능 바이러스를 이용할 경우에는 비교적 높은 효율로 형질감염이 가능하다는 장점이 있지만 shRNA의 발현이 약 7-10일 이상 지속되지 않는 단점이 있다(15).

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 인용문헌 및 특허 문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 문헌 및 특허의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명자들은 외래 서열을 아데노바이러스 지놈에 삽입시키는 전략으로 아데노바이러스의 종양세포 살상능 (oncolytic activity)을 향상시키기 위하여 연구 노력한 결과, VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A)의 mRNA를 타겟팅 하는 siRNA (small interfering RNA) 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 아데노바이러스의 지놈에 삽입시켜 발현 시키면 아데노바이러스의 종양세포 살상능이 크게 향상되는 것을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 VEGF-A에 대한 siRNA 분자를 발현하는 종양세포 살상능이 개선된 재조합 아데노바이러스를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 VEGF-A에 대한 siRNA 분자를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 포함하는 약제학적 항종양 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 VEGF-A 유전자 발현 억제용 뉴클레오타이드 서열을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

발명의 구성

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 아데노바이러스의 ITR (inverted terminal repeat) 뉴클레오타이드 서열 및 (b) 서열목록 제1서열의 VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A)의 mRNA에 상보적이며 VEGF-A 유전자의 발현을 억제하는 siRNA (small interfering RNA) 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 siRNA 분자는 상기 아데노바이러스의 종양세포 괴사능을 향상시키는 것을 특징으로 하는 종양세포 살상능이 개선된 재조합 아데노바이러스를 제공한다.

본 발명자들은 외래 서열을 아데노바이러스 지놈에 삽입시키는 전략으로 아데노바이러스의 종양세포 살상능 (oncolytic activity)을 향상시키기 위하여 연구 노력한 결과, VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A)의 mRNA를 타겟팅 하는 siRNA (small interfering RNA) 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 아데노바이러스의 지놈에 삽입시켜 발현 시키면 아데노바이러스의 종양세포 살상능이 크게 향상되는 것을 발견하였다.

기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 신생 혈관 형성은 종양이 성장하고 전이되는데 있어 매우 중요한 역할을 한다(16). 신생혈관 형성이 일어나기 위해서는 여러 종류의 성장인자들이 필요한데, 이들 중 혈관내피세포 성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF), 특히 VEGF-A가 신생혈관 형성에 주로 관여함이 밝혀졌다. VEGF-A가 세포 수용체에 결합하면, 혈관내피세포의 세포분열 및 케모택시스를 유도하고 혈관 투과도를 증가시킴으로써 새로운 혈관을 형성하거나 종양의 성장을 촉진시킨다(17-18). 오늘날 까지 확인된 인간 VEGF-A 동형체들은 7종류 (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ 및 VEGF₂₀₆)이며, VEGF-A 단일 유전자로부터 8개의 엑손으로 구성된 초기 VEGF-A mRNA가 만들어지고, 택일적 스플라이싱에 의해 7종류의 동형체들이 생성된다. 이들 isoform들 중 VEGF₁₂₁의 염기서열은 모든 동형체들에 공유되어 있다(18-20).

본 명세서에서 사용되는 용어 “VEGF-A”는 인간 VEGF-A 동형체 7종류를 모두 의미하며, 바람직하게는 VEGF₁₂₁를 의미한다.

본 발명에 있어서, 서열목록 제1서열의 VEGF-A mRNA에 상보적인 VEGF-A 유전자의 발현을 억제하는 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 아데노바이러스의 지놈 골격에 탑재된다. 본 발명에서 이용되는 siRNA 분자는 VEGF-

A mRNA에 상보적인 서열을 포함하는데, 용어 “상보적”은 100% 상보적인 경우뿐만 아니라, RNA 방해 (interference) 기전을 통해 VEGF-A 유전자의 발현을 억제할 수 있을 정도의 불완전한 상보성도 포괄하는 의미이며, 바람직하게는 90%의 상보성, 보다 바람직하게는 98%의 상보성, 가장 바람직하게는 100%의 상보성을 의미한다. 본 명세서에서 100% 상보성을 표현하는 경우에는 “완전 상보적 (completely complementary)”으로 특별하게 기재된다.

본 명세서에서 용어 “siRNA 분자”는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다 (참조: WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914).

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 VEGF-A mRNA 서열의 379-399 뉴클레오타이드 또는 그의 일부를 포함하는 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 재언컨대, 본 발명의 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 VEGF-A mRNA 서열의 379-399 뉴클레오타이드 또는 그의 일부에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 최소 필요서열로 포함한다. 상기 379-399 뉴클레오타이드의 일부 서열은 VEGF-A 유전자 사일런싱을 매개하는 데 유효한 최소 길이 10 뉴클레오타이드 (nt), 바람직하게는 최소 15 nt, 보다 바람직하게는 최소 18 nt, 가장 바람직하게는 최소 20 nt 길이의 서열이다.

본 발명의 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 상기의 최소 서열을 포함하며, 최대 100 nt, 바람직하게는 최대 50 nt, 보다 바람직하게는 최대 40 nt, 보다 더 바람직하게는 최대 30 nt, 가장 바람직하게는 19-25 nt이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

본 발명의 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은, 캐리어가 ds DNA 지놈을 갖는 아데노바이러스이기 때문에, DNA 분자가 바람직하다.

본 발명의 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은, siRNA 분자를 코딩하는 일반적인 서열과 같이, 센스 가닥 (VEGF-A mRNA 서열에 상응하는 (corresponding) 서열)과 안티센스 가닥 (VEGF-A mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있다. 또한, 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은, 자기-상보성 (self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은, 자기-상보성 (self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오타이드 서열 (예컨대, 약 5-15 nt)이 삽입된 형태를 가지며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-앤드-루프 구조를 형성하게 된다. 이 스템-앤드-루프 구조는 *인 비트로* 또는 *인 비보*에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 VEGF-A mRNA 서열의 379-399 뉴클레오타이드 또는 그의 일부를 포함하는 서열에 해당하는 서열 (corresponding sequence) 및 상보적인 서열 (complementary sequence)을 가지며, 상기 해당하는 서열과 상보적인 서열 사이에 헤어핀 구조를 형성하게 하는 서열 (5-15 nt, 바람직하게는 8-12 nt)이 삽입되어 있다.

보다 바람직하게는, siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 보다 더 바람직하게는 제3서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 서열목록 제3서열에서 “n”은 루프 (헤어핀) 구조를 형성시킬 수 있는 어떠한 염기도 가능하며, 길이는 5-15 nt, 바람직하게는 8-12 nt이다. 가장 바람직하게는, siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

VEGF-A를 타겟팅하는 siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 아데노바이러스 지놈에 탑재된다. siRNA 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 적합한 발현 컨스트럭트 (expression construct) 내에 존재하는 것이 바람직하다. 상기 발현 컨스트럭트에서, siRNA-코딩 뉴클레오타이드 서열은 프로모터에 작동적으로 연결되는 (operatively linked) 것이 바람직하다. 본 명세서에서, 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절 인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다. 본 발명에 있어서, siRNA-코딩 뉴클레오타이드 서열에 결합된 프로모터는, 바람직하게는 동물세포, 보다 바람직하게는 포유동물 세포에서 작동하여 siRNA-코딩 뉴클레오타이드 서열의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를

포함하며, 예컨대, U6 프로모터, H1 프로모터, CMV (cytomegalo virus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터, 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터, 유도성 (inducible) 프로모터, 암세포 특이적 프로모터 (예컨대, TERT 프로모터, PSA 프로모터, PSMA 프로모터, CEA 프로모터, E2F 프로모터 및 AFP 프로모터) 및 조직 특이적 프로모터 (예컨대, 알부민 프로모터)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는, U6 프로모터이다.

암을 대상으로 유전자 치료를 시행하는 경우에는 일생동안 치료 유전자의 발현을 지속시킬 필요가 없고, 국소 투여할 경우에 아데노바이러스에 의한 면역반응이 크게 문제시 되지 않거나, 오히려 장점이 될 수 있기 때문에 아데노바이러스를 이용한 암유전자 치료제 개발 연구가 활발하게 이루어지고 있다(23-25). 따라서, 본 발명에서도 기본적으로 아데노바이러스의 지놈 골격을 이용하여 암의 유전자 치료를 달성하고 있다.

아데노바이러스는 중간 정도의 지놈 크기, 조작의 편의성, 높은 타이터, 광범위한 타깃세포 및 우수한 감염성 때문에 유전자 전달 벡터로서 많이 이용되고 있다. 지놈의 양 말단은 100-200 bp의 ITR (inverted terminal repeat)를 포함하며, 이는 DNA 복제 및 패키징에 필수적인 시스 엘리먼트이다. 지놈의 E1 영역 (E1A 및 E1B)은 전사 및 숙주 세포 유전자의 전사를 조절하는 단백질을 코딩한다. E2 영역 (E2A 및 E2B)은 바이러스 DNA 복제에 관여하는 단백질을 코딩한다.

아데노바이러스 지놈의 작은 부분만이 cis에서 필요한 것으로 알려져 있기 때문에 (Tooza, *J. Molecular biology of DNA Tumor viruses*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1981)), 아데노바이러스는 대량의 외래 DNA 분자를 운반할 수 있는 능력이 있으며, 이는 특히 293과 같은 특정 세포주를 이용하는 경우에 그러하다. 이러한 측면에서, 본 발명의 재조합 아데노바이러스에 있어서, siRNA-코딩 뉴클레오타이드 서열 이외에 다른 아데노바이러스의 서열은 적어도 ITR 서열을 포함한다.

siRNA-코딩 뉴클레오타이드 서열은 E1 영역 (E1A 영역 및/또는 E1B 영역, 바람직하게는 E1B 영역) 또는 E3 영역에 삽입되는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 E3 영역에 삽입된다. 한편, 다른 외래 뉴클레오타이드 서열 (예: 사이토카인, 면역-보조자극 인자, 자살 유전자 및 종양 억제 유전자)도 추가적으로 아데노바이러스에 포함시킬 수 있으며, 이는 E1 영역 (E1A 영역 및/또는 E1B 영역, 바람직하게는 E1B 영역) 또는 E3 영역에 삽입되는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 E1 영역 (E1A 영역 및/또는 E1B 영역, 바람직하게는 E1B 영역)에 삽입된다. 또한, 상기 삽입 서열들은 E4 영역에도 삽입될 수 있다.

또한, 아데노바이러스는 야생형 지놈의 약 105%까지 패키징할 수 있기 때문에, 약 2 kb를 추가적으로 패키징할 수 있다. 따라서, 아데노바이러스에 삽입되는 상술한 외래 서열은 아데노바이러스의 지놈에 추가적으로 결합시킬 수도 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에서, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 비활성화된 E1B 19 유전자, E1B 55 유전자 또는 E1B 19/E1B 55 유전자를 갖는다. 본 명세서에서, 유전자와 관련하여 사용되는 용어 “비활성화”는 그 유전자의 전사 및/또는 해독이 정상적으로 이루어지지 아니하여, 그 유전자에 의해 코딩되는 정상적인 단백질의 기능이 나타나지 않는 것을 의미한다. 예를 들어, 비활성화 E1B 19 유전자는 그 유전자에 변이 (치환, 부가, 부분적 결실 또는 전체적 결실)가 발생되어 활성의 E1B 19 kDa 단백질을 생성하지 못하는 유전자이다. E1B 19가 결실되는 경우에는 세포고사능을 증가시킬 수 있고, E1B 55 유전자가 결실된 경우에는 종양세포 특이성을 갖게 한다 (참조: 특허출원 제2002-23760호). 본 명세서에서 바이러스 지놈 서열과 관련하여 사용되는 용어, “결실”은 해당 서열이 완전히 결실된 것뿐만 아니라, 부분적으로 결실된 것도 포함하는 의미를 가진다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 활성의 E1A 유전자를 포함한다. E1A 유전자를 포함하는 재조합 아데노바이러스는 복제 가능한 특성을 갖게 된다. 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 비활성화된 E1B 19 유전자 및 활성의 E1A 유전자를 포함한다. 본 발명의 보다 더 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 비활성화된 E1B 19 유전자 및 활성의 E1A 유전자를 포함하고, siRNA-코딩 뉴클레오타이드 서열은 결실된 E3 영역에 삽입되어 있는 것이다 (예: 도 3e). 도 3e의 유전자 지도에 있어서, shRNA는 VEGF-A 유전자 발현을 억제하기 위한 siRNA를 나타내며, 이의 상세한 내용은 위에 기재되어 있는 것과 동일하다.

본 발명의 가장 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 비활성화된 E1B 19 유전자 및 변이된 활성의 E1A 유전자를 포함하고, siRNA-코딩 뉴클레오타이드 서열은 결실된 E3 영역에 삽입되어 있는 것이다 (예: 도 3d). 여기서 변이된 활성의 E1A 유전자는 Rb (retinoblastoma 단백질) 결합 부위를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 중에서 45 번째 Glu 잔기가 Gly으로 치환된 변이 및 121-127번째 아미노산 서열이 전체적으로 Gly으로 치환된 변이를 갖는다.

종양 세포에서는 p53 단백질의 변이뿐 아니라 Rb의 돌연변이 혹은 Rb 관련 신호기전이 상당부분 손상되어 있기 때문에, Rb와의 결합능이 소실된 아데노바이러스는 정상 세포에서는 Rb의 활성으로 아데노바이러스의 복제가 억제 되지만 Rb의 기능이 억제된 종양 세포에서는 활발하게 복제되어 암세포를 선택적으로 살상할 수 있다(26, 27). 따라서, 상술한 Rb 결합 부위에서의 변이를 포함하는 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 암세포 특이성이 매우 우수하다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 도 3b 및 도 3d-도 3I로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자 지도를 갖는다. 보다 바람직하게는, 도 3d-도 3I의 유전자 지도를 가지며, 보다 더 바람직하게는 도 3d-도 3f의 유전자 지도를 가지고, 가장 바람직하게는 도 3d의 유전자 지도를 갖는다.

하기의 실시예에서 예증된 바와 같이, VEGF-A 특이적 siRNA를 발현하는 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 모든 종류의 VEGF-A 동형체의 발현을 저해하여 종양내 신생혈관의 형성을 선택적으로 억제함으로써 항종양 효과를 극대화한다. 그리고 VEGF-A 특이적 siRNA를 발현하는 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 낮은 역가의 바이러스로도 높은 살상 효과를 유도할 수 있기 때문에 투여된 체내에서서의 안전성이 매우 우수하다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 VEGF-A 특이적 siRNA를 발현하는 본 발명의 재조합 아데노바이러스의 치료학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 항종양 조성물을 제공한다.

본 발명의 약제학적 조성물에 유효성분으로 포함되는 재조합 아데노바이러스는 상술한 본 발명의 재조합 아데노바이러스와 동일한 것이므로, 재조합 아데노바이러스에 대한 상세한 설명은 본 발명의 약제학적 조성물에도 그대로 적용된다. 따라서, 본 명세서의 불필요한 반복 기재에 의한 과도한 복잡성을 피하기 위하여 공통 사항은 그 기재를 생략한다.

본 발명에서 개발된 VEGF-A 특이적 siRNA를 발현하는 재조합 아데노바이러스는 신생혈관 형성을 효과적으로 억제하여 항종양 효과가 현저히 증대되며, 특히 E1B 55 유전자가 비활성화 되거나 E1A에서 Rb 결합 부위가 변이가 된 경우에는, 암세포 특이성이 매우 우수하다. 이는 결과적으로 암치료를 필요한 바이러스 투여량을 감소시킬 수 있어 바이러스에 의한 생체내 독성과 면역반응을 크게 줄일 수 있다.

본 발명의 조성물에 포함되는 재조합 아데노바이러스는, 다양한 종양 세포에 대하여 살상 효능을 나타내므로, 본 발명의 약제학적 조성물은 종양과 관련된 다양한 질병 또는 질환, 예컨대 뇌암, 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 식도암, 췌장암, 방광암, 전립선암, 대장암, 결장암 및 자궁경부암 등의 치료에 이용될 수 있다. 본 명세서에서 용어 “치료”는 (i) 종양 세포 형성의 예방; (ii) 종양 세포의 제거에 따른 종양과 관련된 질병 또는 질환의 억제; 및 (iii) 종양 세포의 제거에 따른 종양과 관련된 질병 또는 질환의 경감을 의미한다. 따라서, 본 명세서에서 용어 “치료학적 유효량”은 상기한 약리학적 효과를 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 진분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유향제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 비경구 투여가 바람직하고, 예컨대 정맥내 투여, 복강내 투여, 종양내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수 있다. 난소암에서 복강내로 투여하는 경우 및 간암에서 문맥으로 투여하는 경우에는 주입 방법으로 투여할 수 있고, 유방암의 경우에는 종양 매스에 직접 주사하여 투여할 수 있으며, 결장암의 경우에는 관장으로 직접 주사하여 투여할 수 있고, 방광암의 경우에는 카테테르 내로 직접 주사하여 투여할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 약제학적 조성물은 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^{15}$ PFU/ml의 재조합 아데노바이러스를 포함하며, 통상적으로 1×10^{10} PFU를 이들에 한번씩 2주 동안 주사한다.

본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 단독의 요법으로 이용될 수 있으나, 다른 통상적인 화학 요법 또는 방사 요법과 함께 이용될 수도 있으며, 이러한 병행 요법을 실시하는 경우에는 보다 효과적으로 암 치료를 할 수 있다. 본 발명의 조성물과 함께 이용될 수 있는 화학 요법제는 시스플라틴 (cisplatin), 카르보플라틴 (carboplatin), 프로카르바진 (procarbazine), 메클로레타민 (mechlorethamine), 시클로포스파미드 (cyclophosphamide), 이포스파미드 (ifosfamide), 멜팔란 (melphalan), 클로라부실 (chlorambucil), 비술폴 (bisulfan), 니트로소우레아 (nitrosourea), 디악티노마이신 (dactinomycin), 다우노루비신 (daunorubicin), 독소루비신 (doxorubicin), 블레오마이신 (bleomycin), 플리코마이신 (plicomycin), 미토마이신 (mitomycin), 에토포시드 (etoposide), 탁목시펜 (tamoxifen), 택솔 (taxol), 트랜스플라티늄 (transplatinum), 5-플루오로우라실 (5-fluorouracil), 빈크리스틴 (vincristin), 빈블라스틴 (vinblastin) 및 메토포렉세이트 (methotrexate) 등을 포함한다. 본 발명의 조성물과 함께 이용될 수 있는 방사 요법은 X-선 조사 및 γ -선 조사 등이다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열의 VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A) mRNA 서열의 379-399 뉴클레오타이드 또는 그의 일부를 포함하는 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 가지는 VEGF-A 유전자 발현 억제용 siRNA 분자 또는 이를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 제공한다.

VEGF-A를 타겟팅하는 본 발명의 siRNA-코딩 뉴클레오타이드 서열은 위에 기재된 내용을 인용하여 보다 상세하게 설명된다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험재료 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

실험에 사용된 세포주들은 인체 뇌암세포주 (U343, U87MG), 간암세포주 (SK-Hep1, Hep3B), 폐암세포주 (A549), 자궁암세포주 (C33A), 만성 골수성 류케미아 세포주 (chronic myelogenous leukemia cell line, K562) 및 인간 체대혈관 내피 세포 (human umbilical vascular endothelial cell: HUVEC)이며, 모두 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)에서 구입하였다. 그리고 아데노바이러스 초기 발현 유전자인 E1 부위가 숙주 유전체 내에 내재되어 있는 HEK293 세포주(ATCC)를 아데노바이러스 생산 세포주로 사용하였다. Hep3B를 제외한 모든 세포주들은 10%의 우태아 혈청 (Gibco-BRL, Grand Island, NY)이 포함된 DMEM 배양액 (항생제 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco-BRL) 함유)에서 5% CO₂의 존재 하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였다. Hep3B 와 HUVEC 세포주는 같은 조건하에 MEM (Gibco-BRL) 와 M199 (Invitrogen) 배양액으로 각각 배양하였다.

2. 실험 동물

생체내 항종양 실험은 6-8주령의 수컷 누드 생쥐 (BALB/c-nu)를 SLC(Japan SLC, Inc., Japan)에서 구입하여 사용하였다. 동물 사육실의 온도는 22± 2°C, 습도는 55-60%로 유지시켰으며, 명암 순환이 12 시간 단위로 조절되게 하였고, 방사선 조사로 멸균한 고형사료 (중앙실험동물, Seoul, Korea)와 멸균된 급수를 자유로이 섭취하게 하였다.

3. VEGF-A에 특이적인 shRNA을 발현하는 플라스미드 벡터 제작

VEGF-A의 발현을 효과적으로 억제할 수 있는 siRNA 염기서열을 선정하기 위하여, 2 종류의 siRNA 염기서열 (siVEGF-1; 5'-AAGTTCATGGATGTCTATCAG-3', siVEGF-2; 5'-AAATGTGAATGCAGACCAAAG-3')을 siRNA 염기 서열 선정 프로그램(dharmacon.com)을 이용하여 선별하였다 (도 1a). siVEGF-1 또는 siVEGF-2의 센스 및 안티센스 서열이 9개의 염기 (ttcaagaga)로 구성된 루프를 사이에 두고 위치하고, 양 끝에 *Bam*HI과 *Hind*III 제한효소 염기서열을 가진 68개의 염기로 구성된 올리고뉴클레오타이드와 이에 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 각각 합성하였다 (도 1b). 합성된 올리고뉴클레오타이드들을 95°C에서 5분 동안 가열하여 변성시키고 서서히 감온시켜 서로 어닐링되도록 한 후, *Bam*HI 부위와 *Hind*III 부위를 절단하여 siRNA 클로닝 벡터인 pSilencer 2.0-U6 (Ambion, Austin, TX)에 삽입시켜 pSilencer-U6-shVEGF-1 및 pSilencer-U6-shVEGF-2를 각각 제작하였다.

4. shRNA에 의한 VEGF-A 전사 억제 확인

상기에서 제작된 2 종류의 shRNA를 발현하는 pSilencer-U6-shVEGF-1 및 pSilencer-U6-shVEGF-2 플라스미드를 음성 대조군인 pSilencer-U6 플라스미드와 함께 K562 세포주에 형질전환 하였다. 형질전환 후 48시간 경에, RNeasy 미니 키트 (Cat. #74104; Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 RNA를 분리한 다음, VEGF-A를 검출할 수 있는 프라이머 세트 (센스 프라이머; 5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3', 안티센스 프라이머; 5'-ATGTTGGACTCCTCAGTGGG-3')를 이용하여 RT-PCR을 수행하여 VEGF-A의 mRNA 양을 비교 검증하였다.

5. 아데노바이러스들의 제작, 생산 및 역가 산출

아데노바이러스의 E1 부위에서 LacZ 유전자를 발현하고, E3 부위에서 U6 프로모터에 의해 shVEGF를 발현하는 복제 불능 아데노바이러스를 제작하기 위하여, 먼저 상기에서 제작된 pSilencer-U6-shVEGF-2를 *Eco*RI과 *Hind*III 제한효소로 처리하여 U6 프로모터와 shVEGF-2 부위로 구성된 402 bp 크기의 DNA 절편을 잘라낸 뒤, 이를 아데노바이러스 E3 서플렉터인 pSP72-E3 (*Cancer Gene Therapy*, 12:61-71(2005))에 삽입하여 pSP72-E3-U6-shVEGF-2 서플렉터를 제작하였다. 제작된 E3 서플렉터를 *Xmn*I 제한효소로 처리하여 선형화시키고, E1과 E3 유전자가 소실된 복제 불능 아데노바이러스인 dl324 (스위스국 Fribourgh 대학의 Verca 박사; Heider, H. et al., *Biotechniques*, 28(2):260-265, 268-270(2000))의 소실된 E1 부위에 표지 유전자로서 LacZ가 삽입된 바이러스 벡터인 dl-Z를 *Spe*I 제한효소를 처리하여 선형화시킨 뒤, 이들을 함께 대장균 BJ5183 (스위스국 Fribourgh 대학의 Verca 박사; Heider, H. et al., *Biotechniques*, 28(2):260-265, 268-270(2000))에 동시 형질전환시켜 유전자 상동 재조합 (homologous recombination)을 유도하여 LacZ 유전자와 VEGF-A 특이적 shRNA를 동시에 발현하는 복제 불능 아데노바이러스 벡터인 dl-Z-shVEGF를 제작하였다 (도 3a).

VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 종양 특이적 살상 아데노바이러스를 제작하기 위해서는, 상기에서 제작된 pSP72-E3-U6-shVEGF-2 아데노바이러스 E3 서플렉터를 *Xmn*I 제한효소로 처리하여 선형화시킨 뒤, *Spe*I 제한효소를 처리하여 선형화된 pAd-ΔB7 아데노바이러스 토달 벡터 (E1A의 Rb 결합 부위가 변이되고, E1B 19kDa 유전자와 E1B 55kDa 유전자가 함께 소실된 종양 특이적 살상 아데노바이러스; KCCM-10569)와 함께 대장균 BJ5183에서 동시 형질전환시켜 pAd-ΔB7-shVEGF 종양 선택적 살상 아데노바이러스 벡터를 제작하였다 (도 3b). 상동 재조합된 아데노바이러스 벡터들을 *Hind*III 제한효소로 처리하여 상동 재조합 유무를 확인한 후, 확인된 플라스미드들은 *Pac*I 제한효소로 절단한 뒤 HEK293 세포주 (Microbix, 캐나다국)에 형질전환하여 Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스를 생산하였다. 대조군으로 사용된 바이러스들은 E1 부위가 완전히 결손되고 LacZ 유전자를 발현하는 복제가 불가능한 dl-Z 아데노바이러스와 E1B 55kDa 유전자가 결손된 Ad-ΔE1B55 (YKL-1; 대한민국 특허출원 제1999-33011호 참조), E1A 부위의 Rb 결합 부위가 변이되고, 동시에 E1B 19kDa와 E1B 55kDa 유전자들이 모두 결손된 Ad-ΔB7(12, 14; KCCM-10569)이며, 각각의 아데노바이러스는 HEK293 세포주에서 증식시켜 CsCl 농도구배로 농축하여 순수 분리하였으며, 한계희석분석 (limiting titration assay) 또는 플라크 분석으로 역가 (plaque forming unit: PFU)를 산출하였다 (Hitt, M. et. al., *Construction and propagation of human adenovirus vectors. Cell biology: a laboratory handbook*. New York: Academic Press Inc, 479-490(1994)).

6. VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 아데노바이러스에 의한 VEGF-A 발현 억제 검증

VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 아데노바이러스에 의해 VEGF-A의 발현이 효과적으로 억제되는지를 검증하기 위하여, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)를 시행하였다. 먼저 여러 종류의 인체 암세포주들인 뇌암세포주 (U343, U87MG), 간암세포주(SK-Hep1, Hep3B), 폐암세포주(A549) 그리고 자궁암세포주(C33A)를 6-웰 플레이트에

각각 분주한 뒤, 다음날 아데노바이러스를 여러 농도의 MOI (multiplicity of infection)로 감염시키고 2 시간 후, 5% DMEM 배지로 교체하였다. 바이러스 감염 후 72, 96 시간에 배지를 수득하고, 3000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 분리한 뒤, 이 중 100 μ l의 상층액을 이용하여 VEGF-A ELISA 분석을 시행하였다. ELISA의 전과정은 인간 VEGF Quantikine Immunoassay (R & D Systems, Minneapolis, MN) 제조회사가 제시한 방법에 따라 시행하였다. 배지를 회수한 후, 남아있는 세포는 150 μ l의 차가운 라이시스 용액으로 세포를 용해시킨 다음, 10,000 x g에서 15분간 원심분리하여 단백질을 분리하고, 단백질 분석 키트 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 세포내 단백질 양을 정량하였다. ELISA 분석에 의해 산출된 VEGF-A 양을 세포내 단백질 양으로 보정하였다.

7. 관형성 분석 (Tube Formation Assay)

VEGF-A 특이적 shRNA 발현에 따른 VEGF-A의 감소로 혈관내피세포의 관형성 기능이 억제되는지를 알아보기 위해서, HUVEC 세포를 이용하여 관형성 분석을 시행하였다. 먼저, 250 μ l의 성장인자-감소 매트릭셀 (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA)을 24-웰 플레이트에 천천히 흔들어서 균일하게 분주한 뒤, 37°C에서 30분간 중합 반응을 실시하였다. HUVEC (3-5 계대 배양) 세포는 6시간 동안 1% FBS를 포함한 M199 배지에서 배양하여 혈청기아한 뒤, 트립신을 처리하여 세포수를 측정하였다. 매트릭셀이 분주된 24-웰 플레이트에 혈청기아 전처리 된 HUVEC (2×10^5 cells/well) 세포를 200 MOI의 dl-Z 또는 dl-shVEGF로 감염하여 96시간 뒤에 회수한 U343 세포 배양액을 새로운 배지와 1:1로 혼합한 뒤 넣고 배양하였다. 양성 대조군으로는 10 ng/ml의 VEGF-A 정제 단백질 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)을 이용하였다. 배양 후 20시간째에, 배양액을 제거하고 PBS로 2번 세척한 뒤 현미경으로 관형성을 관찰하였다. 형성된 관은 Image-Pro Plus (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD) 프로그램을 사용하여 정량하였으며, VEGF-A 정제 단백질을 처리한 경우를 100%로 보정하여 상대적인 수치를 구하였다(32).

8. 엑스 비보 대동맥 고리 분석

VEGF-A 특이적 shRNA 발현에 따른 혈관 형성 억제를 관찰하기 위해, 대동맥 고리 스프라우팅 분석을 시행하였다. 6 주령의 스프라그 돌리 래트로부터 대동맥을 분리하고, 대동맥 주변의 섬유-지방조직을 제거한 뒤, 1 mm 두께의 고리로 얇게 잘랐다 (*In Vitro Cell Dev. Biol.*, 26:119-28(1990)). 48-웰 플레이트에 매트릭셀 (120 μ l/웰)을 분주하고 37°C에서 30분간 중합반응시킨 뒤, 대동맥 고리를 각각의 웰에 얹고, 50 μ l의 매트릭셀을 오버레이 하였다. 약 30분 후 매트릭셀이 굳 으면, 관형성 분석에서 사용된 것과 같은 세포 배양액 (U343 세포주에 200 MOI의 dl-Z 또는 dl-shVEGF 바이러스를 처리하고 96 시간 뒤 회수한 세포 배양액) 250 μ l를 각각의 웰에 처리하여 배양하였다. 양성 대조군으로는 VEGF-A 정제 단백질 (10 ng/well)을 처리하였으며, 음성 대조군으로는 U343 배양 배지만을 처리하였다. 배양 후 6일째에 현미경 (optical imaging technique)으로 대동맥 고리로부터 생성되어진 혈관들을 관찰하였다(33). 형성된 혈관들은 대동맥 고리를 5 부위로 나누어서 혈관 형성이 가장 왕성한 부위(most positive)를 1점, 혈관 형성이 가장 적게 일어난 부위(least positive)를 0점으로 점수를 부여하여 분석하였으며, 5 부위에 대한 점수(0-5점)를 합산하였다. 각각의 실험군에 대해 6개의 대동맥 고리를 대상으로 대동맥 고리 스프라우팅 분석을 수행하였다(32).

9. 매트릭셀 플러그 분석 (Matrigel plug assay)

VEGF-A 특이적 shRNA 발현에 따른 신생혈관 형성 억제를 생체내에서 관찰하기 위해, 6-웰 플레이트에 2×10^5 개의 U343 세포주를 분주한 뒤, 다음날 복제 불능 아데노바이러스 (dl-Z 또는 dl-Z-shVEGF) 또는 복제 가능 아데노바이러스 (Ad- Δ B7 또는 Ad- Δ B7-shVEGF)로 각각 감염시키고, 4시간 후 5% DMEM 배지로 교체하였다. 바이러스 감염 후 4시간째에, 세포들을 트립신으로 처리하여 회수한 뒤 100 μ l의 HBSS 완충용액에 재현탁하고 500 μ l의 차가운 매트릭셀과 균일하게 혼합하고, 주사기를 이용하여 누드 생쥐의 등 (ventral groins)에 피하 주사하였다. 주사된 매트릭셀은 빠르게 고형의 젤 플러그를 형성하였으며, 14일 후 피부를 박피하여 매트릭셀 내부와 주변으로 형성된 혈관들을 관찰하였다. 혈관수를 정량화하기 위하여 매트릭셀을 적출하여 4% 파라포름알데하이드 용액에 넣은 뒤 4°C에서 4-8시간 동안 고정시키고, 30% 수크로오스 용액에서 12시간 정도 탈수 시켰다. 탈수된 매트릭셀을 O.C.T compound로 동결 박편한 뒤 헤마토파일린과 에오신 (H & E)으로 염색하여 혈관수를 관찰하여 정량하였다(34).

10. VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 세포 살상능 검증

VEGF-A 특이적 shRNA의 발현 여부가 아데노바이러스의 복제에 어떠한 영향을 미치는지 검증하기 위하여, 바이러스의 복제 결과로 나타나는 세포병변 효과(CPE)를 검증하였다. 뇌암 세포주(U343, U87MG), 간암 세포주(Hep3B, Hep1), 자궁암 세포주(C33A), 폐암 세포주(A549) 등의 인체 종양 세포주들을 24-웰 플레이트에 각각 분주하고, 24 시간 후 dl-Z,

Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스를 여러 농도의 MOI로 감염시켰다. 가장 낮은 MOI의 바이러스로 감염시킨 세포들이 거의 사멸된 시점에 배지를 제거하고 플레이트 바닥에 남아있는 세포들을 0.5% 크리스탈 바이올렛 (50% 메탄올)으로 고정하고 염색한 후 분석하였다.

11. 인 비보 항종양 효과 검증

생후 7-8주 정도 경과된 누드 생쥐에 1×10^7 개의 인체 뇌암 세포주인 U343을 복부 피하에 주사하였다. 종양의 용적이 약 70-80 mm³ 정도 되었을 때, 1×10^8 PFU의 Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스와 음성 대조군으로서 PBS를 각각 이틀 간격으로 세 번 종양 내에 직접 주사한 후 종양의 크기를 2, 3일 간격으로 측정하였다. 종양의 용적은 캘리퍼를 이용하여 종양의 장축과 단축을 측정한 후 다음과 같은 공식으로 산출하였다: 종양의 용적 (mm³) = (단축 mm)² × 장축mm × 0.523.

12. 종양조직 내 VEGF-A의 발현량 측정

약 6-8 주령의 누드 생쥐의 복벽에 뇌암 세포주인 U343을 피하 주사한 후 종양의 크기가 약 70-120 mm³ 정도 되었을 때, 1×10^8 PFU의 Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 3회 종양 내 투여하였다. 마지막 바이러스 투여 후 10일 뒤에 종양을 적출하여 액체 질소에 담근 후, 막자사발로 분쇄하고 단백질 억제제 카테일 (Sigma)이 첨가된 PBS에 부유하였다. 종양 조직을 보다 미세하게 분쇄하기 위하여 균질화기 (ART-MICCRA D-8, ART modern Labortechnik, Munchen, Germany)로 균질화한 후, 3000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상층액만 수득하여 종양 내 VEGF-A 단백질의 발현 정도를 ELISA로 측정하였다. VEGF-A의 ELISA는 상기의 “VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 아데노바이러스에 의한 VEGF-A 발현 억제 검증”과 같은 방법으로 수행하였다.

13. VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 복제 가능 아데노바이러스 투여에 따른 종양 조직내 신생 혈관형성 억제효과 검증

약 6-8주령의 누드 생쥐의 복벽에 뇌암 세포주인 U343을 피하 주사한 후 종양의 크기가 약 70-120 mm³ 정도 되었을 때, 1×10^8 PFU의 Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 3회 종양 내 투여하였다. 마지막 바이러스 투여 후 7일 경에 종양을 적출하여 IHC Zinc fixative (포르말린-부재) (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA) 용액에서 고정시킨 뒤, 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록을 4 μm 두께로 절단하여 슬라이드로 만든 뒤, 이를 자일렌, 100%, 90%, 70% 에탄올 용액에 차례로 담귀 파라핀을 제거(deparafinization)한 후 헤마토자일린과 에오신 (H & E)으로 염색하였다. VEGF-A 특이적 shRNA 발현에 의해 종양조직 내 혈관형성이 억제되었는지 확인하기 위해, 혈관내피 세포 특이적 항원인 CD31을 선택적으로 인지할 수 있는 항체(platelet/endothelial cell adhesion molecule 1; BD Biosciences PharMingen)를 이용하여 조직 면역염색을 시행하였다. 파라핀이 제거된 4 μm 두께의 종양 조직을 3% H₂O₂ 용액에서 10분간 반응시켜 내인성 과산화효소의 작용을 차단시키고, CAS-BLOCK (Zymed, San Francisco, CA)로 30분간 비특이적인 항체반응을 블롯킹한 다음, α-CD31 항체를 1차 항체로 반응시키고, 바이오틴이 결합된 폴리클로날 항-라트 (multiple adsorption) 항체 (BD Biosciences PharMingen)를 이차 항체로 반응시키고, DAB (DACO, Carpinteria, CA, USA)를 이용하여 CD31의 발현양상을 규명하였다. 또한, 동일한 부위의 파라핀 블록을 이용하여, 아데노바이러스의 핵손 부위를 검출할 수 있는 조직 면역염색을 시행하였다. 상기와 같은 방법으로 파라핀을 제거한 후 아데노바이러스의 핵손 부위와 선택적으로 결합하는 항체 (MAB 8052 chemicon, Temecula, CA)를 일차 항체로, 그리고 염소 항-라트 IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology)를 이차 항체로 반응시키고 DAB를 첨가하여 발색시켜 관찰하였다. 종양 내 형성된 혈관수를 정량하기 위해서는, 혈관내피 세포 특이적 항원인 CD31 (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1) 양성으로 염색된 종양 내 혈관을 먼저 저배율로 관찰하여 무작위로 사진을 촬영한 후, 배율을 높여 100배 시야에서 관찰되는 혈관의 수를 정량하였다. 세장의 슬라이드로부터 각각 5개 시야를 선택하여 혈관 수를 계산하고 평균값을 산출하여 그 값을 대표값으로 사용하였다(34).

실험결과

1. VEGF-A의 발현을 효과적으로 억제할 수 있는 siRNA 염기서열 선정

siRNA 기술을 이용하여 신생혈관 형성에 있어 중요한 기능을 하는 VEGF-A의 발현을 효과적으로 억제하기 위한 본 연구의 목적을 위해서, 먼저 VEGF-A의 발현을 효과적으로 억제할 수 있는 2 종류의 siRNA 염기서열 (siVEGF-1 및

siVEGF-2)을 siRNA 염기 서열 선정 프로그램 (dharmacon.com)을 이용하여 선별하였다 (도 1a). 두 종류의 siRNA의 센스 및 안티센스 서열이 9개의 염기(ttcaagaga)로 구성된 루프를 사이에 두고 위치하고, 양 끝에 *Bam*HI와 *Hind*III 제한효소 염기서열을 가진 68개의 염기로 구성된 올리고뉴클레오타이드와 이에 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 각각 합성하였다 (도 1b). 각각의 상보적인 올리고뉴클레오타이드들을 95°C에서 5분 동안 가열하여 변성시키고 서서히 감온하여 서로 어닐링시킨 뒤, *Bam*HI 부위와 *Hind*III 부위를 절단하여 siRNA 클로닝 벡터인 pSilencer-U6에 삽입시켜 pSilencer-U6-shVEGF-1 및 pSilencer-U6-shVEGF-2를 각각 제작하였다. 제작된 2 종류의 VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 pSilencer-U6-shVEGF-1과 pSilencer-U6-shVEGF-2 플라스미드 중 VEGF-A의 전사를 가장 효과적으로 억제할 수 있는 shRNA를 선별하기 위하여, 음성 대조군인 pSilencer-U6 플라스미드와 함께 이들 두 종류의 플라스미드들을 각각 K562 세포주에 형질전환시켰다. 형질전환 후 48시간 경에 RNA를 분리한 뒤, VEGF-A를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 세트(센스 프라이머; 5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3', 안티센스 프라이머; 5'-ATGTTGGACTCCTCAGTGGG-3')를 이용하여 RT-PCR을 수행하여 VEGF-A의 mRNA 양을 비교 검증하였다.

도 2에서 볼 수 있듯이, 아무 것도 처리하지 않은 K562 세포와 대조군 플라스미드인 pSilencer-U6을 형질전환 한 K562 세포, 그리고 pSilencer-U6-shVEGF-1 플라스미드를 형질전환 한 K562 세포의 경우에는 VEGF-A의 mRNA 양이 높게 검출되었으나, pSilencer-U6-shVEGF-2 플라스미드를 형질전환한 K562 세포의 경우에는 VEGF-A의 mRNA 양이 매우 낮게 검출되어, shVEGF-2의 전사 시스템을 통하여 VEGF-A의 전사를 효과적으로 저해할 수 있음을 확인할 수 있었으며, 이후의 모든 실험들에서는 VEGF-A 특이적 siRNA로서 shVEGF-2의 염기 서열을 사용하였다.

2. sVEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 아데노바이러스에 의한 VEGF-A 발현 억제 검증

siRNA가 특정 유전자를 효과적으로 낮-다운시키는데 유용한 방법이긴 하지만 전달 효율이 떨어지고 일시적으로만 효과가 나타나기 때문에, 이를 보완할 수 있는 개선된 벡터 시스템이 요구된다(15). 신생혈관 형성에 중요하게 관여하는 VEGF-A 특이적 siRNA를 암세포 특이적으로 그리고 지속적으로 높게 전사시킴으로써 종양 선택적 살상능을 더욱 개선시킬 목적으로, 상기에서 시행한 RT-PCR 분석을 통하여 선별된 shVEGF-2 전사 시스템을 Ad-ΔB7 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 E3 부위에 삽입하여 Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스를 제작 및 생산하였다 (도 3b).

먼저, Ad-ΔB7-shVEGF 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 의해서 VEGF-A의 발현이 효과적으로 억제 되는지를 검증하기 위하여, VEGF-A 발현양이 높은 인체 뇌암 세포주인 U343을 10-20 MOI의 Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스로 감염시키고 세포로부터 배지를 회수하여 ELISA를 시행하여 VEGF-A의 발현양을 정량하였다 (도 4). 그 결과, Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스를 감염시킨 세포 배양액뿐만 아니라, Ad-ΔB7 아데노바이러스를 감염시킨 세포 배양액에서도 VEGF-A의 발현이 현저하게 감소되어 shVEGF의 전사에 따른 VEGF-A의 발현 억제 여부를 확인할 수 없었다. Zhou 연구팀은 2003년, 아데노바이러스의 E1A 유전자에 의해서 신생혈관 형성 유도체인 VEGF-A 발현이 감소된다는 결과를 발표한 바 있는데 (35), Ad-ΔB7 및 Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스로부터 발현되는 E1A에 의해서 VEGF-A 발현이 억제되는지를 검증하기 위하여, 대조군 복제 불능 아데노바이러스로서 dl-Z와 함께 Ad-ΔB7, Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스를 10-20 MOI의 역가로 U343 세포주를 감염시킨 뒤, 배지를 회수하여 상기와 동일한 방법으로 ELISA를 시행하였다. E1A를 발현하는 또 다른 대조군 복제 가능 아데노바이러스로서 E1B 55 kDa 유전자가 소실된 YKL-1 바이러스도 함께 사용하여 실험을 진행하였다. 도 5에서 볼 수 있듯이, E1A를 발현하는 모든 3 종류의 복제 가능 아데노바이러스 (YKL-1, Ad-ΔB7 및 Ad-ΔB7-shVEGF)들을 감염시킨 세포 배양액에서는 처리해준 바이러스의 역가에 비례하여 VEGF-A의 발현이 현저하게 감소된 반면, E1A를 발현하지 못하는 복제 불능 아데노바이러스인 dl-Z를 감염시킨 세포 배양액에서는 VEGF-A의 발현이 약간 감소하여, E1A의 발현에 따른 VEGF-A 발현 억제현상을 확인할 수 있었다.

따라서 VEGF-A 특이적 shRNA에 의한 VEGF-A 발현 억제 효과를 알아보기 위해서, shVEGF-2 전사 시스템을 E1 부위가 소실된 복제 불능 아데노바이러스인 dl-Z의 E3 부위에 삽입하여 dl-Z-shVEGF 복제 불능 아데노바이러스를 제작 및 생산하였다 (도 3a). 제작된 dl-Z-shVEGF 복제 불능 아데노바이러스를 대조군 바이러스인 dl-Z와 함께 다양한 인체 종양 세포주 (U343, Hep3B, U87MG, SK-Hep1, A549 및 C33A)를 여러 역가로 각각 감염시키고, 96시간 후에 배지를 수득하여 ELISA를 시행하여 VEGF-A의 발현양을 정량하였다. 도 6에서 볼 수 있듯이, 본 연구에서 사용된 모든 세포주들에서 dl-Z-shVEGF 아데노바이러스로 감염된 세포에서는 투여된 아데노바이러스의 역가가 증가함에 따라 VEGF의 발현 양이 용량 비례적으로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 특히, U343 세포주에 500 MOI의 바이러스로 감염시킨 경우, dl-Z (1790 pg/ml)에 비해 dl-Z-shVEGF (66 pg/ml) 바이러스로 감염시킨 세포에서 약 27배 정도 낮은 농도의 VEGF-A가 검출됨을 확인하였다. 이러한 결과들을 통하여, 아데노바이러스에 의해 세포내에서 shVEGF가 효과적으로 전사되고, 전사된 짧은 헤어핀 구조의 VEGF-A 특이적 shRNA는 세포내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소 (Dicer 또는 RNaseIII)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 VEGF-A의 발현을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다.

3. VEGF-A 특이적 shRNA 발현에 따른 신생혈관 형성 억제 검증

VEGF-A 특이적 shRNA 발현에 따른 VEGF-A의 감소로 혈관내피세포의 분화가 억제되는지를 알아보기 위해서, HUVEC 세포주를 이용하여 관형성 분석을 시행하였다. 인체 뇌암 세포주인 U343에 200 MOI의 dl-Z와 dl-Z-shVEGF를 각각 감염시키고 96시간 후 세포로부터 배지를 회수하여 HUVEC 세포주에 처리한 뒤, 관형성을 관찰하였다 (도 7). 혈관 형성을 유도하는 양성 대조군으로는, 10 ng/ml 농도의 VEGF-A 정제 단백질을 처리하였다. 그 결과, 아무 것도 처리하지 않은 세포 배양액과 dl-Z를 감염시킨 세포 배양액을 처리한 경우에는, 양성 대조군과 마찬가지로 튼튼하고 굽은 관이 형성된 반면, dl-Z-shVEGF를 감염시킨 세포 배양액을 처리한 경우에는 가늘고 부분적으로 끊어진 관이 형성된 것을 관찰할 수 있었다. 형성된 관을 Image-Pro Plus 프로그램을 이용하여 정량한 결과, VEGF-A 정제 단백질을 처리한 경우를 100%로 하였을 때, 아무 것도 처리하지 않은 U343 세포 배양액과 dl-Z 아데노바이러스를 감염시킨 세포 배양액을 처리한 경우에는 각각 77.26%와 59.28%의 혈관이 형성된 반면에 dl-Z-shVEGF 아데노바이러스를 감염시킨 세포 배양액을 처리한 경우에는 27.57%의 관이 형성되어 혈관형성이 현저하게 감소되었음을 확인하였다 (도 7b).

상기의 *인 비트로* 실험들에서 확인된 VEGF-A 특이적 shRNA 발현에 따른 VEGF-A의 발현 감소 및 이에 따른 신생혈관 형성 억제 현상이 대동맥 고리를 이용한 *ex vivo* 실험을 통해서도 검증될 수 있는지를 알아보기 위하여, 6-8주령의 래트로부터 대동맥 고리를 분리하여, 관형성 분석과 같은 조건과 방법으로 준비된 세포 배양액을 처리하여 혈관 스프라우팅 분석을 시행하였다 (도 8). 양성 대조군인 20 ng/ml의 VEGF-A 정제 단백질을 처리한 경우에는 미세혈관의 스프라우팅이 왕성하게 일어났으며, 아무 것도 처리하지 않은 U343 세포 배양액과 dl-Z 아데노바이러스를 감염시킨 세포 배양액 (U343 세포주에 200 MOI의 dl-Z 아데노바이러스를 처리하고 96 시간 뒤 회수한 세포 배양액)을 처리하였을 경우에도 양성 대조군을 처리한 경우와 마찬가지로 혈관의 스프라우팅이 왕성하게 일어났다. 하지만 이와는 대조적으로, dl-Z-shVEGF를 감염시킨 세포 배양액을 처리하였을 경우에는 혈관의 형성이 현저하게 억제되는 것을 관찰하였다 (도 8a). 이를 보다 정량적으로 비교 검증하기 위하여, 대동맥 고리를 5부위로 나누어 혈관 형성이 가장 왕성한 부위 (most positive)를 1점, 혈관 형성이 가장 적게 일어난 부위 (least positive)를 0점으로 각각 점수를 부여하여 분석한 결과, 양성 대조군으로 사용된 VEGF-A 단백질을 처리한 모든 대동맥에서 4 ± 0.63 으로 혈관형성이 왕성하게 일어남을 확인할 수 있었으며, 또한 아무 것도 처리하지 않은 U343 세포 배양액과 dl-Z 아데노바이러스를 감염시킨 세포 배양액을 처리한 경우에도 약 3.83 ± 0.75 와 3.5 ± 0.55 의 혈관이 형성되었음을 확인할 수 있었다. 이와는 대조적으로, dl-Z-shVEGF 아데노바이러스를 감염시킨 세포의 배양액을 처리한 경우에는 1.33 ± 0.52 의 혈관만이 형성되어 dl-Z-shVEGF에 의해 혈관형성이 현저하게 억제됨을 확인하였다 (도 8b).

또한 상기의 생체의 실험들에서 확인된 VEGF-A 특이적 shRNA 발현에 따른 VEGF-A의 발현 감소 및 이에 따른 신생혈관 형성 억제 현상이 매트릭셀을 이용한 *인 비보* 실험을 통해서도 검증될 수 있는지를 알아보기 위하여 매트릭셀 플러그 분석을 수행하였다. U343 세포주를 dl-Z(100 MOI), dl-Z-shVEGF(100 MOI), Ad- Δ B7(10 MOI) 또는 Ad- Δ B7-shVEGF(10 MOI) 아데노바이러스로 각각 감염시키고 매트릭셀과 함께 혼합하여 누드생쥐의 등에 피하 주사하여 고형의 젤 플러그를 형성시킨 뒤, 14일 후 매트릭셀 내부와 주변에 형성된 혈관들을 관찰하였다 (도 9). 그 결과, VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하지 않는 대조군 아데노바이러스(dl-Z, Ad- Δ B7)로 감염시킨 경우에는 매트릭셀의 주변과 내부에서 혈관 형성이 매우 활발하게 진행되어 많은 개수의 혈관들을 관찰할 수 있는 반면, VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 아데노바이러스(dl-Z-shVEGF, Ad- Δ B7-shVEGF)로 감염시킨 경우에는 고형화된 매트릭셀 주변과 내부에 형성된 혈관의 개수가 적음을 확인하였다. 상기의 실험 결과들을 통하여, VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 두 종류의 아데노바이러스들인 dl-Z-shVEGF와 Ad- Δ B7-shVEGF에 의해 VEGF-A의 발현이 억제되고, 그 결과 혈관내피 세포의 분화 및 신생혈관 형성이 효과적으로 억제됨을 확인할 수 있었다.

4. VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 세포 살상능 검증

VEGF-A 특이적 shRNA 발현이 아데노바이러스의 복제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 아데노바이러스의 복제에 따른 세포 사멸 정도를 CPE 분석으로 관찰하였다. 여러 종류의 인체 종양 세포주들을 dl-Z, Ad- Δ B7 또는 Ad- Δ B7-shVEGF 아데노바이러스로 각각 0.1-20 MOI로 감염시키고 잔류 세포를 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 아데노바이러스의 복제에 따른 세포 살상 정도를 비교 관찰하였다 (도 10). 음성 대조군인 dl-Z 복제 불능 아데노바이러스로 감염된 세포들에서는 아데노바이러스가 복제되지 않기 때문에 세포 살상효과가 나타나지 않았으나, 복제 가능 아데노바이러스들인 Ad- Δ B7 또는 Ad- Δ B7-shVEGF로 감염된 경우는 투여된 바이러스 양이 증가함에 따라 세포 살상 효과가 증가되었다. 본 연구에 사용된 모든 종양 세포주들(A549, Hep1, U343, U87MG, Hep3B 및 C33A)에서 Ad- Δ B7와 Ad- Δ B7-shVEGF의 세포 사멸 정도가 비슷하였다. 이러한 결과들에 의해, VEGF-A 특이적 shRNA의 발현으로 아데노바이러스의 복제가 저해되지 않고 그 결과, 세포 살상능도 감소하지 않음을 확인할 수 있었다.

5. VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 생체내 항종양 효과 검증

VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔB7-shVEGF의 생체내 항종양 효과를 검증하기 위해, 인체 뇌암 세포주인 U343 세포주를 누드마우스의 복부 피하에 주사하고 형성된 종양에 1×10^8 PFU의 Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 이틀 간격으로 3번 종양 내에 투여한 후 종양의 성장을 관찰하였다 (도 11). 본 실험에서는 암세포 특이적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔB7과 Ad-ΔB7-shVEGF의 항종양 효과를 비교하기 위해서, Ad-ΔB7의 항종양 효과를 검증한 이전 연구들에 비해 5 배 낮은 역가의 바이러스를 투여하였다.

음성 대조군인 PBS를 투여 받은 생쥐의 경우, 바이러스 투여 후 36 일경에 종양의 용적이 약 $2531 \pm 256 \text{ mm}^3$ 으로 급격히 성장하였으나, 종양 특이적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF를 투여한 경우에는 종양의 성장이 크게 지연됨을 확인하였다. 즉, Ad-ΔB7와 Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스를 투여 받은 생쥐의 경우, 바이러스 투여 후 36 일경에 종양의 용적이 각각 $973.51 \pm 313.5 \text{ mm}^3$ 과 $292 \pm 241 \text{ mm}^3$ 로, 이들 아데노바이러스의 뚜렷한 항종양 효과를 관찰할 수 있었으며, 특히 Ad-ΔB7을 투여한 경우보다 Ad-ΔB7-shVEGF를 투여한 경우에 보다 향상된 항종양 효과를 확인할 수 있었다. 또한 Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스를 투여한 총 8 마리의 마우스들 중 1 마리는 바이러스 투여 후 35 일경에 종양이 완전히 소멸되어 없어졌으며, 60 일이 지나도 종양의 재성장은 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 통하여, 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔB7-shVEGF는 E1A 유전자의 발현에 따른 VEGF-A 발현 억제뿐만 아니라 VEGF-A 특이적 shRNA의 발현에 따른 VEGF-A 발현 억제도 함께 유도할 수 있어, 생체내 항종양 효과를 현저하게 증진시킬 수 있음을 확인하였다.

6. 종양내 VEGF-A의 발현량 측정

VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 종양세포 감염 및 복제에 따른 VEGF-A 특이적 shRNA의 발현에 의해 종양 내 VEGF-A 발현이 실질적으로 감소되었는지를 알아보기 위하여, 바이러스 투여 후 10일 경에 종양조직을 적출하여 미세하게 분쇄한 뒤 VEGF-A ELISA 분석을 시행하였다 (도 12). 음성 대조군인 PBS를 종양내로 투여한 실험동물에서는 종양 조직 1 g당 $2429 \pm 0.7698 \text{ pg}$ 의 VEGF-A가 발현된 반면, 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF를 투여한 실험동물에서는 각각 $1617 \pm 0.6558 \text{ pg}$ 과 $851 \pm 1.296 \text{ pg}$ 의 VEGF-A가 생성되어, 암조직 내에서 Ad-ΔB7와 Ad-ΔB7-shVEGF의 감염에 의해 종양 조직내 VEGF-A의 발현이 효과적으로 억제되고, 특히 Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스의 감염에 의해 종양 조직내 VEGF-A의 발현이 보다 효과적으로 억제됨을 확인하였다.

7. VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스 투여에 따른 종양조직의 변화 관찰

앞서 진행된 여러 실험들을 통하여 확인된 VEGF-A 특이적 shRNA 발현에 따른 VEGF-A의 발현 감소 및 이에 따른 개선된 항종양 효과가 실제로 종양 내 혈관 형성 억제에 의한 것인지를 확인하기 위해서, H & E 염색 및 혈관내피 세포 특이적 항원인 CD31의 발현을 조직 면역염색을 시행하여 검증하였다. 먼저, 인체 뇌암 세포주인 U343 세포주를 누드 생쥐 복벽 피하에 접종한 후 형성된 종양에 Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 이틀 간격으로 3 회 종양 내 주사한 후 7일 경에 종양 조직을 적출하여 헤마토타일린과 에오신으로 염색하여 조직의 상태를 검증하였다.

도 13에서 볼 수 있듯이, Ad-ΔB7 아데노바이러스를 투여한 종양의 경우는 종괴의 중심부위에서 자연히 발생하는 세포괴사와 바이러스가 투여된 종괴의 가장자리의 국소적 부위에서만 세포괴사가 진행된 반면, Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스를 투여한 종양의 경우에는 종괴의 중심부위뿐 아니라 바이러스가 투여된 종괴의 가장자리까지 넓은 부위에서 세포괴사가 활발하게 진행되었음을 관찰할 수 있었고, 특히 종양의 내부가 대부분 괴사되어 근접 총 세포괴사 (near total necrosis)가 일어났음을 확인할 수 있었다.

이러한 종양내 변화의 현상이 실제로 VEGF-A 특이적 shRNA에 의한 혈관 형성 억제 때문인지를 좀 더 면밀하게 확인하기 위해, 동일한 블록의 슬라이드를 사용하여 CD31 면역염색을 시행하였다. 그 결과, 음성 대조군인 PBS를 처리한 종양 조직 내부에는 크고 많은 수의 혈관들이 관찰된 반면에, Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스를 투여한 종양 내부에는 형성된 혈관의 개수와 크기가 감소하였다. 특히, VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 Ad-ΔB7-shVEGF 아데노바이러스를 투여한 종양의 경우에는, 새로이 형성된 혈관의 개수도 현저히 감소하였을 뿐 아니라 혈관의 크기도 매우 작음을 확인하였다 (도 14a). 종양조직 내부에 새로이 형성된 혈관의 밀도를 정량하기 위하여, CD31 양성으로 염색된 종양

내 혈관을 100 배 배율에서 무작위로 5 부위를 선택하여 혈관 개수를 계수하였다 (도 14b). 음성 대조군인 PBS를 투여한 종양에서는 평균 117.7 ± 8.7 개의 혈관이 관찰된 반면, 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad- Δ B7 또는 Ad- Δ B7-shVEGF를 투여한 경우에는 종양내 혈관의 수가 각각 101.9 ± 6.2 개와 23.8 ± 4.5 개의 혈관들이 관찰되어, VEGF-A 특이적 shRNA를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스를 투여한 경우에 신생혈관 형성이 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다. 특히, 혈관의 크기와 상관없이 혈관 개수만을 계수한 본 연구의 혈관 밀도 정량화 방법으로는(34), Ad- Δ B7 아데노바이러스의 투여에 의한 신생혈관 형성 억제효과가 크지 않게 나타났지만, 종양내 형성된 신생혈관의 크기가 대조군인 PBS를 처리한 경우에 비해 현저하게 작음을 관찰할 수 있었으며, Ad- Δ B7-shVEGF를 투여한 종양에서는 혈관의 개수뿐만 아니라 크기도 Ad- Δ B7을 투여한 경우보다 현저하게 감소되어, VEGF-A 특이적 shRNA의 발현에 따른 상승적인 혈관 형성 억제 현상을 확인할 수 있었다.

또한, 종양 조직 내 아데노바이러스의 복제 양상을 검증하기 위하여, 아데노바이러스의 핵손 부위와 선택적으로 결합하는 항체를 이용하여 IHC를 시행하였다. 도 15에서 볼 수 있듯이, Ad- Δ B7을 투여한 종양의 경우에는 종괴의 넓은 부위에서 아데노바이러스를 검출할 수 있어 아데노바이러스가 종양내부에서 활발히 복제함을 확인할 수 있었으나, Ad- Δ B7-shVEGF를 투여한 종양에서는 종양내의 대부분의 조직이 이미 괴사되어 아데노바이러스를 검출할 수 없었으며 종양 가장자리 일부 국소적 부위에서만 아데노바이러스가 검출되었다.

발명의 효과

VEGF-A 특이적 siRNA를 발현하는 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 모든 종류의 VEGF-A 동형체의 발현을 저해하여 종양내 신생혈관의 형성을 선택적으로 억제함으로써 항종양 효과를 극대화한다. 그리고 VEGF-A 특이적 siRNA를 발현하는 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 낮은 역가의 바이러스로도 높은 살상 효과를 유도할 수 있기 때문에 투여된 체내에서의 안전성이 매우 우수하다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

참조 문헌

1. Shen C, Buck AK, Liu X, Winkler M, Reske SN. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. FEBS Lett. 2003;539(1-3):111-4.
2. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 1998;391(6669):806-11.
3. Hamilton, A.J., and Baulcombe, D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science. 1999;286(5441):950-2.
4. Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. Nat Cell Biol. 2003;5(9):834-9.
5. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature. 2001;411(6836):494-8.
6. Mouldy Sioud. Therapeutic siRNAs. Trends in pharmacological Sciences. 2004;22-28.
7. Lou TF, Gray CW, Gray DM. The reduction of Raf-1 protein by phosphorothioate ODNs and siRNAs targeted to the same two mRNA sequences. Oligonucleotides. 2003;13(5):313-24
8. Wacheck V, Losert D, Gunsberg P, Vornlocher HP, Hadwiger P, Geick A, Pehamberger H, Muller M, Jansen B. Small interfering RNA targeting bcl-2 sensitizes malignant melanoma. Oligonucleotides. 2003;13(5):393-400.
9. Anderson J, Akkina R. HIV-1 resistance conferred by siRNA cosuppression of CXCR4 and CCR5 coreceptors by a bispecific lentiviral vector. AIDS Res Ther. 2005;2(1):1.

10. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 2002;296(5567):550-3.
11. Shim EY, Walker AK, Shi Y, Blackwell TK. CDK-9/cyclin T (P-TEFb) is required in two postinitiation pathways for transcription in the *C. elegans* embryo. *Genes Dev*. 2002;16(16):2135-46
12. Ding H, Schwarz DS, Keene A, Affar el B, Fenton L, Xia X, Shi Y, Zamore PD, Xu Z. Selective silencing by RNAi of a dominant allele that causes amyotrophic lateral sclerosis. *Aging Cell*. 2003;2(4):209-17.
13. Bain JR, Schisler JC, Takeuchi K, Newgard CB, Becler TC. An adenovirus vector for efficient RNA interference-mediated suppression of target genes in insulinoma cells and pancreatic islets of langerhans. *Diabetes*. 2004;53(9):2190-4.
14. Shen C, Buck AK, Liu X, Winkler M, Reske SN. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett*. 2003;539(1-3):111-4.
15. Changxian Shen, Andreas K. Buck, Xiangwei Liu, Michael Winkler, and Sven N. Reske. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett*. 2003;539(1-3):111-4
16. D. Hanahan and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
17. G.D. Yancopoulos, S. Davis, N.W. Gale, J.S. Rudge, S.J. Wiegand and J. Holash, Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000;407(6801):242-8.
18. G. Bergers, R. Brekken, G. McMahon, T.H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb and D. Hanahan, Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*. 2000;2(10):737-44.
19. T. Finkel and S.E. Epstein, Gene therapy for vascular disease. *FASEB J*. 1995;9(10):843-51. Review.
20. J.A. Nagy, E. Vasile, D. Feng, C. Sundberg, L.F. Brown, M.J. Detmar et al., Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med*. 2002;196(11):1497-506.
21. Vosseler S, Mirancea N, Bohlen P, Mueller MM, Fusenig NE. Angiogenesis inhibition by vascular endothelial growth factor receptor-2 blockade reduces stromal matrix metalloproteinase expression, normalizes stromal tissue, and reverts epithelial tumor phenotype in surface heterotransplants. *Cancer Res*. 2005;65(4):1294-305
22. Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis*. 2004;7(4):335-45. Epub 2005 May 9.
23. Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye JA, Sampson-Johannes A, Fattaey A, McCormick F : An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 1996;274: 373-376,
24. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ, Mitlianga P, Shi YX, Levin VA, Yung WK, Kyritsis AP : A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 2000;19: 2-12.
25. Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff DD, Kirn DH : ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med* 1997;3: 639-645.

26. Dyson N, Harlow E : Adenovirus E1A targets key regulators of cell proliferation. *Cancer Surv* 1992;12: 161-195.
27. Whyte P, Ruley HE, Harlow E : Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation. *J Virol* 1988; 62: 257-265.
28. Ptzera BM, Stiewea T, Parssanedjad K, Rega S and Esche H : E1A is sufficient by itself to induce apoptosis independent of p53 and other adenoviral gene products. *Cell death & Differentiation* 2000;7(2): 177-188.
29. Lee H, Kim J, Lee B, Chang JW, Ahn J, Park JO, Choi J, Yun CO, Kim BS, Kim JH : Oncolytic potential of E1B 55 kDa-deleted YKL-1 recombinant adenovirus: correlation with p53 functional status. *Int J Cancer* 2000;88: 454-463.
30. Kim J, Cho JY, Kim JH, Jung KC, Yun CO :Evaluation of E1B gene-attenuated replicating adenoviruses for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2002;9: 725-736.
31. Sauthoff H, Heitner S, Rom WN, Hay JG : Deletion of the adenoviral E1b-19kD gene enhances tumor cell killing of a replicating adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 2000;11: 379-388, 2000.
32. Jeong-Ki Min, Kyu-Yeon Han, Eok-Cheon Kim, Young-Myeong Kim, Sae-Won Lee, Ok-Hee Kim, Kyu-Won Kim, Yong Song Gho, and Young-Guen, Kwon. Capsicin inhibits in vitro and in vivo angiogenesis. *Cancer research* 2004;64, 644-651.
33. Nicosia, R. F., and Ottinetti, A. Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. *In vitro Cell Dev. Biol.*,1990;26: 119-128.
34. Ju-Ock Nam, Ha-Won Jeong, Byung-Heon Lee, Rang-Woon Park, and In-San Kim. Regulation of tumor angiogenesis by fastatin, the fourth FAS1 domain of betaig-h3, via alphavbeta3 integrin. *Cancer Res.* 2005; 65: (10).
35. Zhou Z, Zhou RR, Guan H, Bucana CD, Klenerman ES. E1A gene therapy inhibits angiogenesis in a Ewing's sarcoma animal model. *Mol Cancer Ther.* 2003 Dec;2(12):1313-9.

도면의 간단한 설명

도 1a-1b는 혈관내피 성장인자-A (vascular endothelial growth factor-A: VEGF-A)의 발현 억제에 관여하는 짧은 억제 RNAs (small interfering RNAs: siRNAs)의 디자인을 보여준다. 도 1a는 실시예에서 이용된 VEGF-A의 2종 siRNA의 작용 위치를 보여준다. 도 1b는 pSilencer-U6 플라스미드 또는 아데노바이러스에서 전사된 항-인간 shVEGF의 예상되는 2차 구조를 나타낸다.

도 2는 VEGF-A 유전자의 shRNA-매개 인 비트로 녹다운 결과를 나타낸다. VEGF-A mRNA를 RT-PCR로 정량하였다. 6-웰 플레이트 내의 U343 세포를 shVEGF-1 또는 shVEGF-2를 발현하는 pSilencer-U6 플라스미드로 안정되게 형질 전환시켰다. 형질전환 48시간 후에 세포내 RNA를 분리하고 VEGF-A 발현의 녹다운을 RT-PCR로 측정하였다. 덴시토미터 분석을 실시하였고, 각각의 밴드에 대한 상대적인 발현량은 β -액틴으로 정규화 하였다.

도 3a-3i는 실시예에서 이용된 재조합 아데노바이러스 벡터의 유전자 지도를 나타낸다. 모든 아데노바이러스 벡터는, *E. coli*에서 박테리아 벡터로 클로닝되고 조작된 전장 아데노바이러스 지놈으로부터 유래된 것이다. 도 3a 및 도 3b에서, dl-Z는 E1 영역 전체가 결손되어 있고, 여기에 삽입된 CMV 프로모터의 조절 하에 LacZ 유전자를 발현한다. dl-Z-shVEGF는 dl-Z의 E3 영역에 삽입된 shVEGF 서열을 포함한다. 도 3c-도 3f에서, Ad-B7는 변이된-E1A를 포함하며, E1B 19kDa과 E1B 55 kDa은 결실되어 있고, Ad-B7-shVEGF는 E3 영역에 삽입된 shVEGF 서열을 포함한다. “★”는 E1A의 Rb (retinoblastoma) 결합 위치인 CR1에서 45번째 아미노산의 글루탐산 (Glu)이 글라이신 (Gly)로 치환된 것과 CR2에서

7개 아미노산 (DLTCHEA)이 7개 글라이신 (GGGGGGG)으로 치환된 변이를 나타낸다. 결실된 E3 영역에서의 숫자, 28592-30470는 Ad5 지놈에서의 위치를 나타낸다. 도면에서, Δ는 해당서열이 결실된 것을 나타내고, ITR은 inverted terminal repeat의 축약어이고, Ψ는 패키지 시그널을 포함하는 서열을 나타내며, 기호 Ad는 아데노바이러스의 축약어이고, CMV는 CMV 프로모터를 나타내며, U6는 U6 프로모터이고, IX는 아데노바이러스의 단백질 IX 유전자를 나타낸다.

도 4는 종양살상 아데노바이러스로 감염된 U343에 의해 분비된 VEGF-A를 정량한 결과를 보여준다. 인간 U343 신경교 세포를 Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF를 이용하여 10-20 MOIs로 감염시켰다. 감염 후 72시간과 96시간째에 배양 상등액에서의 VEGF-A 농도를 ELISA로 측정하였다. VEGF-A 농도는 아무것도 처리하지 않은 경우에 비해 Ad-ΔB7- 및 Ad-ΔB7-shVEGF-감염된 세포 배양 상등액에서 현저하게 감소하였다. 각각의 값은 최소 3번의 독립적인 실험들의 평균이다.

도 5는 종양살상 아데노바이러스로 감염된 U343에 의해 분비된 VEGF-A를 정량한 결과를 보여준다. 인간 U343 신경교 세포를 dl-Z, YKL-1, Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF를 이용하여 10-20 MOIs로 감염시켰다. 감염 후 72시간과 96시간째에 배양 상등액에서의 VEGF-A 농도를 ELISA로 측정하였다. VEGF-A 농도는 복제 가능 아데노바이러스 (YKL-1, Ad-ΔB7- 및 Ad-ΔB7-shVEGF)로 감염된 세포 배양 상등액에서 크게 감소하였다. 각각의 값은 최소 3번의 독립적인 실험들의 평균이다.

도 6은 복제 불능 아데노바이러스에 의해 감염된 여러 암세포로부터 분비된 VEGF-A 정량 결과를 보여준다. 여러 인간 암 세포주를 dl-Z 또는 dl-Z-shVEGF 복제 불능 아데노바이러스를 이용하여 10-500 MOIs로 감염시켰다. 감염 후 96시간째에 배양 상등액에서의 VEGF-A 농도를 ELISA로 측정하였다. VEGF-A 농도는 감염량 의존적으로 감소하였다. 모든 데이터는 3회 실험의 평균 ± SD이다.

도 7a-7b는 인간 내피세포에서 shVEGF에 의한 관형성 억제제를 보여준다. HUVEC 세포를 dl-Z- 또는 dl-Z-shVEGF-감염된 콘디션드 배지로 중합된 매트릭셀 상에서 감염시켰다. HUVEC 세포를 매트릭셀-코팅 플레이트에 2×10^5 세포/웰 밀도로 플레이팅하고 dl-Z- 또는 dl-Z-shVEGF-감염된 콘디션드 배지와 반응시켰다. 16시간 이후, 세포 형태 변화를 독립 현미경 (X40, X400)으로 관찰하였다. VEGF-A (10 ng/ml) 재조합 정제 단백질에 의해 자극된 HUVECs는 매트릭셀 비드 상에서 루멘을 갖는 비어있는 튜브를 정상적으로 형성하였고, 이는 포지티브 대조군으로 이용되었다. 관 네트워크에 의해 덮여 있는 면적을 Image-Pro Plus 소프트웨어를 사용하여 정량하였으며, VEGF-A 정제 단백질을 처리한 경우를 100%로 보정하여 상대적인 수치를 구하였다(32). 실험을 두 번 반복하였고, 값은 3회 실험의 평균 ± SE로 나타내었다.

도 8a-8b는 shVEGF에 의한 관 스프라우팅의 억제제를 나타낸다. 스프라그 돌리 래트로부터 분리된 대동맥의 얇은 고리 (ring)를 VEGF-A (20 ng/ml) 재조합 정제 단백질, 비감염 콘디션드 배지, dl-Z- 또는 dl-Z-shVEGF-감염된 콘디션드 배지와 반응시킨 다음, 6일째에 Diff-Quick으로 염색시켰다. 도 8b에서, 점수 0 (least positive) 내지 5 (most positive)를 부여하여 실시하였고, 데이터는 평균 ± SE로 나타내었다.

도 9는 매트릭셀 플러그 분석 결과를 보여준다. (A1-A2) 복제 불능 아데노바이러스 (dl-Z, dl-Z-shVEGF)로 감염된 매트릭셀 플러그, (B1-B2) 복제 가능 아데노바이러스 (Ad-ΔB7, Ad-ΔB7-shVEGF)로 감염된 매트릭셀 플러그.

도 10은 shVEGF-발현 종양살상 아데노바이러스의 세포병변 효과 (CPE)를 보여준다. 세포를 dl-Z, Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF로 감염시켰다. 감염 후 4-10일째, 생존 세포를 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. 복제 불능 아데노바이러스인 dl-Z는 네가티브 대조군으로 이용하였다. 각각의 세포주에 대하여 적어도 3회 시험하였고, 도면의 데이터는 각각의 대표적인 실험 결과이다.

도 11은 shVEGF-발현 종양살상 아데노바이러스에 의한 종양 성장의 억제제를 보여준다. U343 인간 신경교세포로부터 유래된 피하 이식된 종양을, 네가티브 대조군으로서 PBS (●)와 함께 Ad-ΔB7 (■) 또는 Ad-ΔB7-shVEGF (▲)으로 처리하였다. 아데노바이러스 처리 후 시간 경과에 따라 종양 용적을 모니터링 하였다. 아데노바이러스 투여 (1×10^8 PFU/mouse) 시점은 화살표로 나타내었다. 값은 각각의 그룹 당 8마리로부터 얻은 데이터의 평균 ± SE이다.

도 12는 PBS, Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF의 처리 후의 VEGF-A 발현의 감소를 보여주는 그래프이다. U343 종양에 PBS, Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF를 주입한 후, ELISA 키트를 이용하여 종양 균질액에서의 VEGF-A 발현 정도를 측정하였다. Ad-ΔB7-shVEGF의 처리 후에 VEGF-A 발현이 크게 감소하였다.

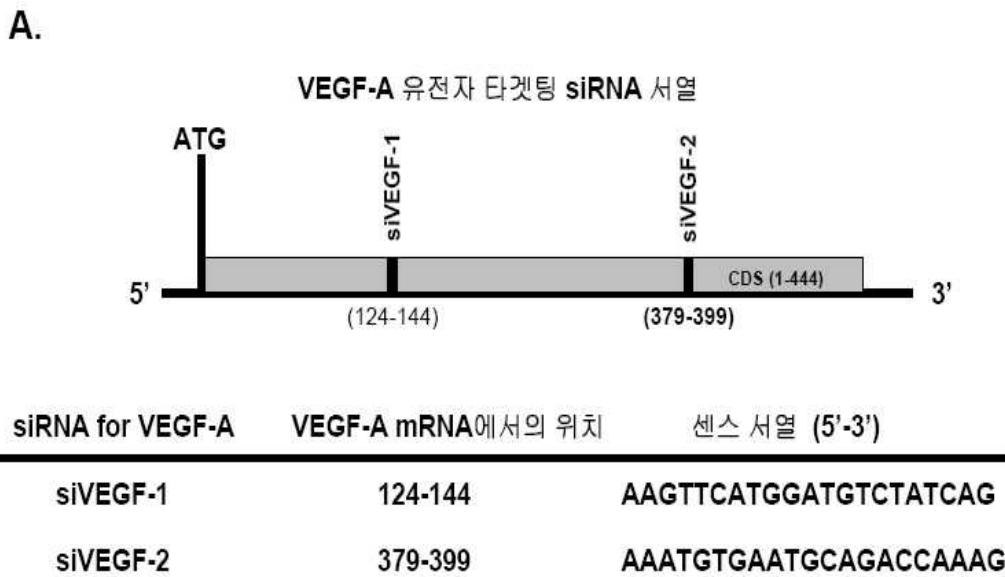
도 13은 PBS, Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF의 투여에 따른 U343 종양 조직의 변화를 보여주는 H & E-염색 단면 사진이다. Ad-ΔB7-shVEGF로 처리된 종양은, 전체적으로 주로 괴사세포로 이루어져 있다.

도 14a-14b는 혈관 밀도를 평가하기 위한 CD31에 대한 면역조직화학 염색 결과를 보여준다 (헤마토자일린으로 카운터염색됨). 도 14a에서, 갈색으로 염색된 것은 PBS, Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-shVEGF로 처리된 마우스의 내피세포에 대한 포지티브 염색을 나타낸다. 도 14b에서, CD31-포지티브 혈관의 수를 계수하였다. LPF (low-power field, X 100). 3개의 슬라이드의 평균± SE.

도 15는 종양 조직에서 아데노바이러스의 국소위치를 확인하기 위한 핵산 단백질의 면역조직화학 염색 결과를 보여준다 (헤마토자일린으로 카운터염색됨). Ad-ΔB7을 투여한 종양의 경우에는 종괴의 넓은 부위에서 아데노바이러스를 검출할 수 있었다. 그러나 Ad-ΔB7-shVEGF-주입 종양에서는, shVEGF에 의한 혈관신생의 억제에 따라 종양내의 대부분의 조직이 괴사되어 일부 국소적 부위에서만 아데노바이러스가 관찰되었다.

도면

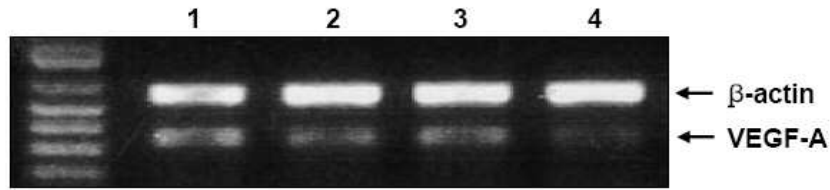
도면1a



도면1b



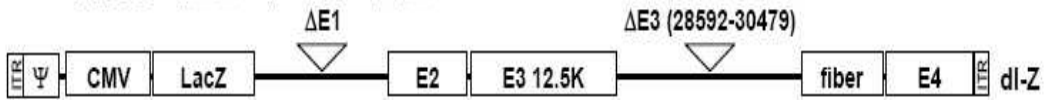
도면2



1: untreated
 2: pSilencer-U6 plasmid
 3: pSilencer-U6-shVEGF-1
 4: pSilencer-U6-shVEGF-2

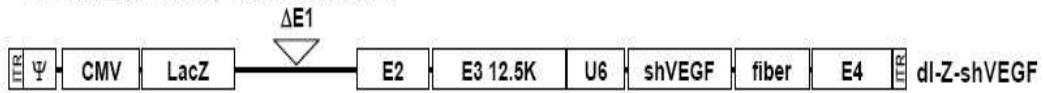
도면3a

A. 복제불능 재조합 아데노바이러스



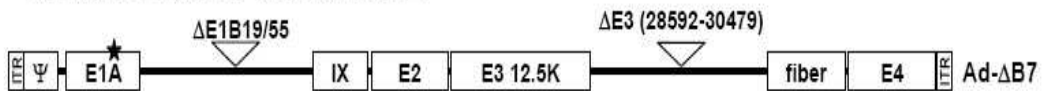
도면3b

B. 복제불능 재조합 아데노바이러스



도면3c

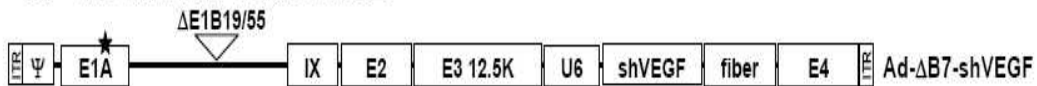
C. 복제 가능 재조합 아데노바이러스



E1A에서 별표 표시는 CR1에서 45번째 아미노산의 글루탐산 (Glu)이 글라이신 (Gly)로 치환된 것과 CR2에서 7개 아미노산 (DLTCHEA)이 7개 글라이신 (GGGGGG)으로 치환된 변이

도면3d

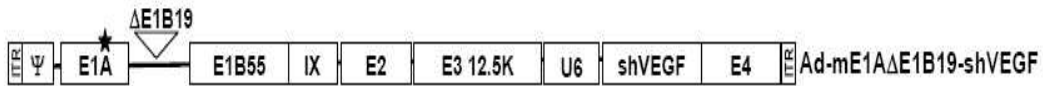
D. 복제 가능 재조합 아데노바이러스



E1A에서 별표 표시는 CR1에서 45번째 아미노산의 글루탐산 (Glu)이 글라이신 (Gly)로 치환된 것과 CR2에서 7개 아미노산 (DLTCHEA)이 7개 글라이신 (GGGGGG)으로 치환된 변이

도면3e

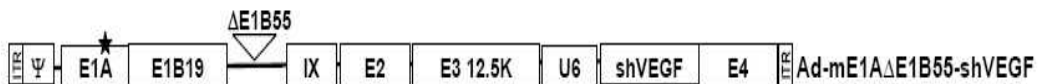
E. 복제 가능 재조합 아데노바이러스



E1A에서 별표 표시는 CR1에서 45번째 아미노산의 글루탐산 (Glu)이 글라이신 (Gly)로 치환된 것과 CR2에서 7개 아미노산 (DLTCHEA)이 7개 글라이신 (GGGGGGG)으로 치환된 변이

도면3f

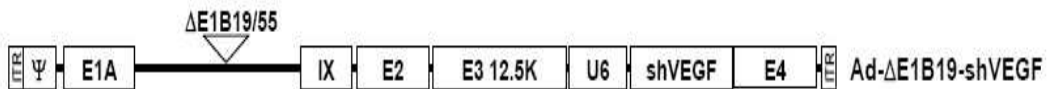
F. 복제 가능 재조합 아데노바이러스



E1A에서 별표 표시는 CR1에서 45번째 아미노산의 글루탐산 (Glu)이 글라이신 (Gly)로 치환된 것과 CR2에서 7개 아미노산 (DLTCHEA)이 7개 글라이신 (GGGGGGG)으로 치환된 변이

도면3g

G. 복제 가능 재조합 아데노바이러스



도면3h

H. 복제 가능 재조합 아데노바이러스

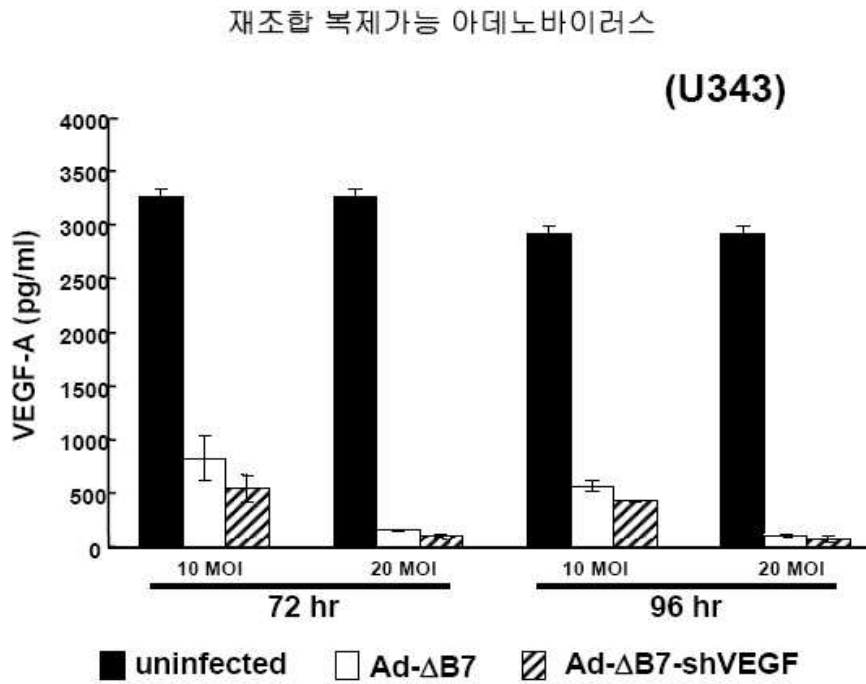


도면3i

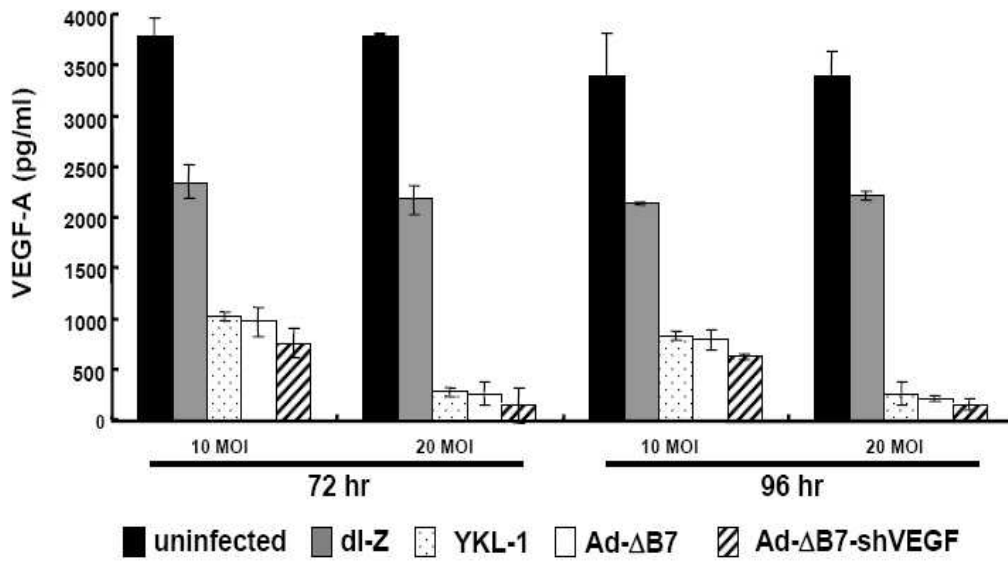
I. 복제 가능 재조합 아데노바이러스



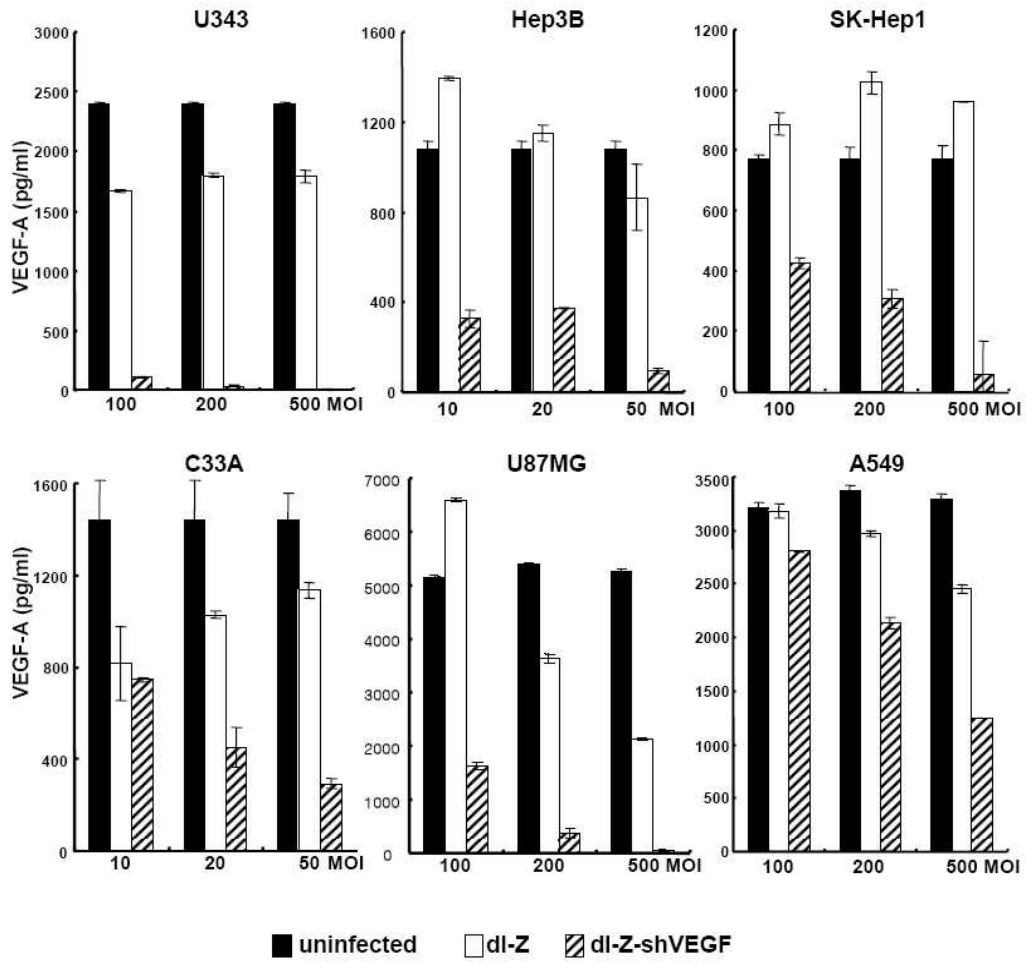
도면4



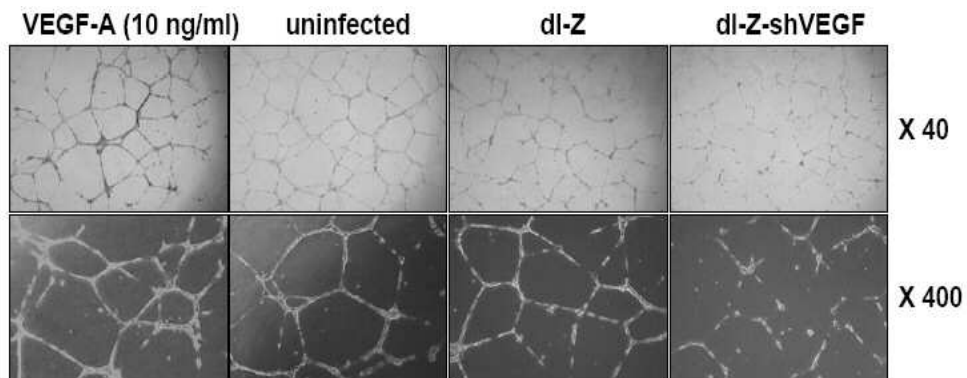
도면5



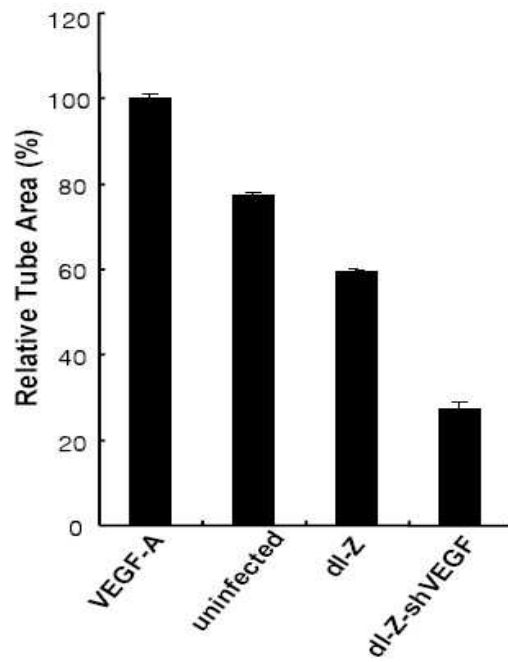
도면6



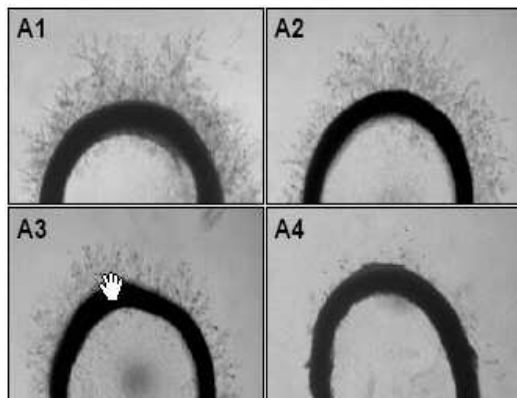
도면7a



도면7b

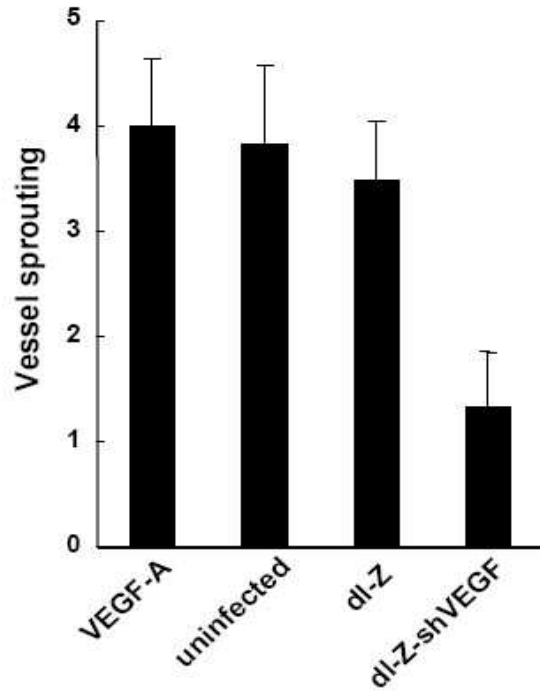


도면8a

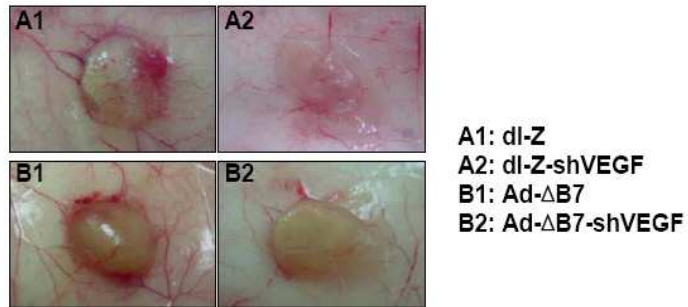


A1: VEGF-A (20 ng/ml)
A2: uninfected
A3: dl-Z
A4: dl-Z-shVEGF

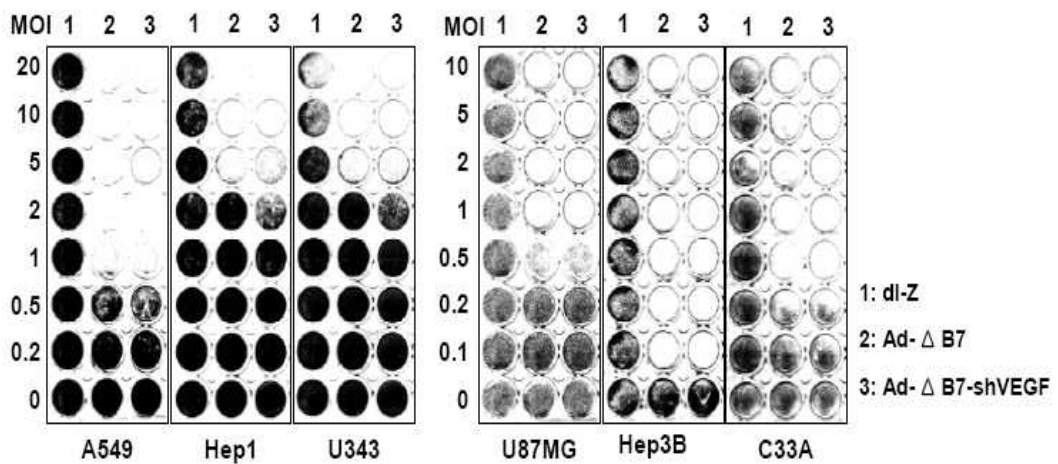
도면8b



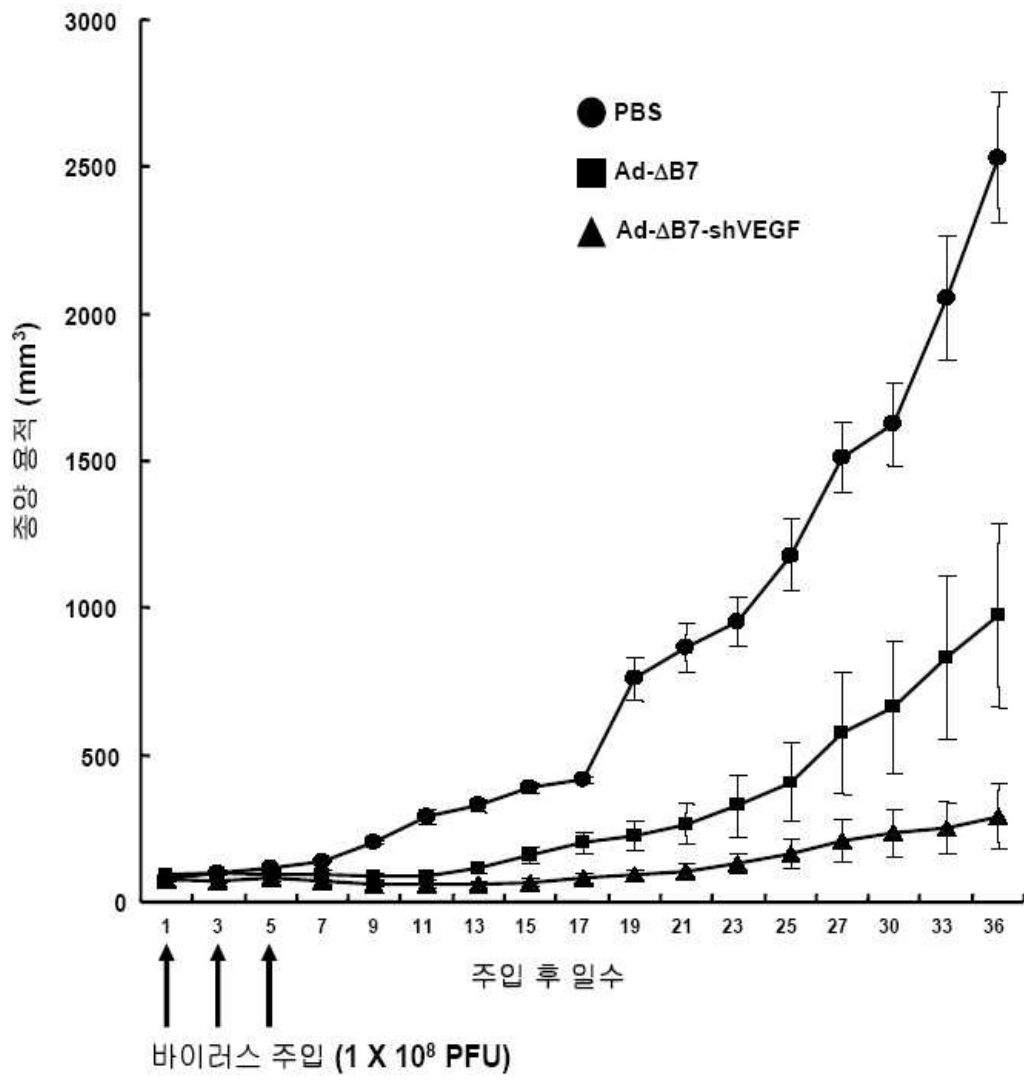
도면9



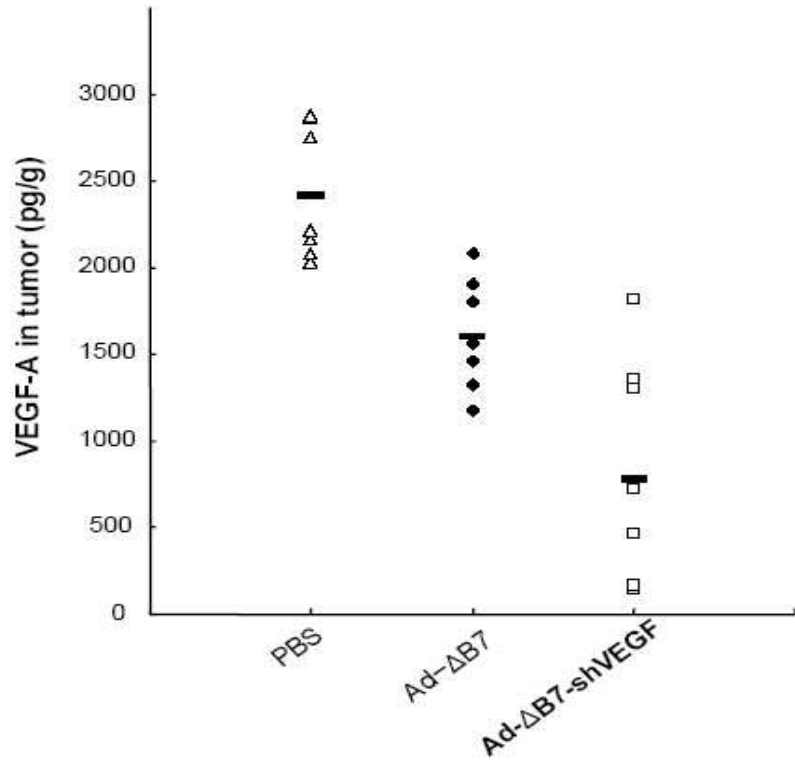
도면10



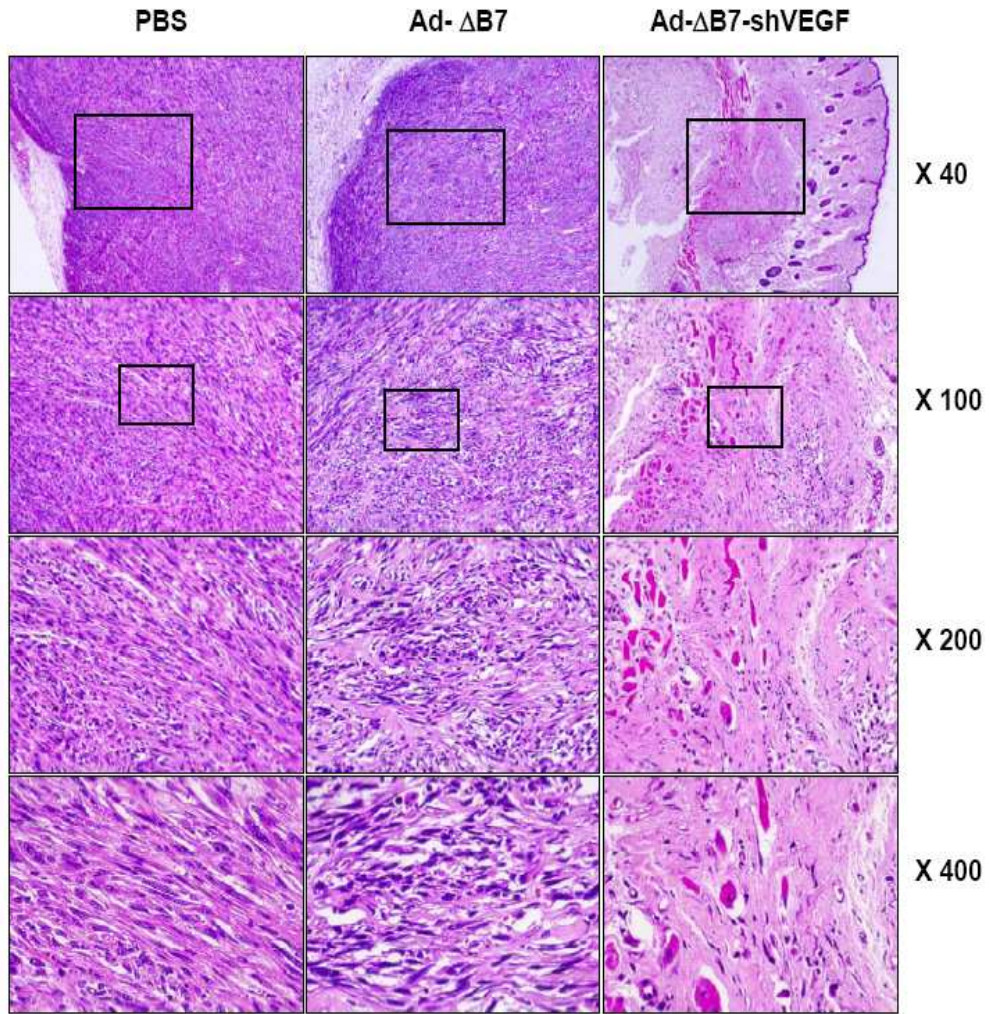
도면11



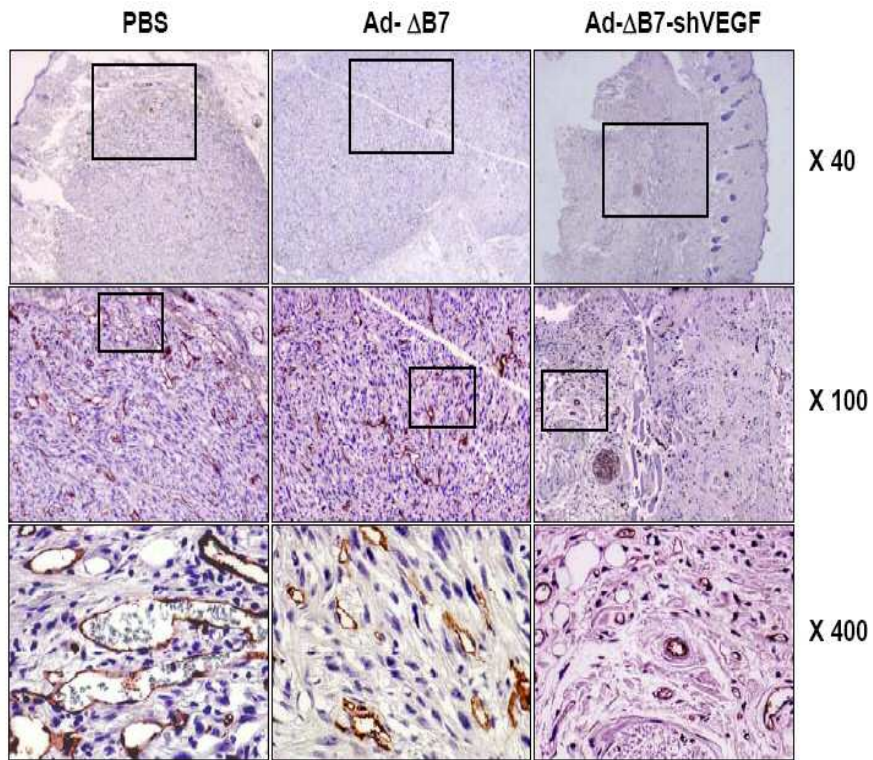
도면12



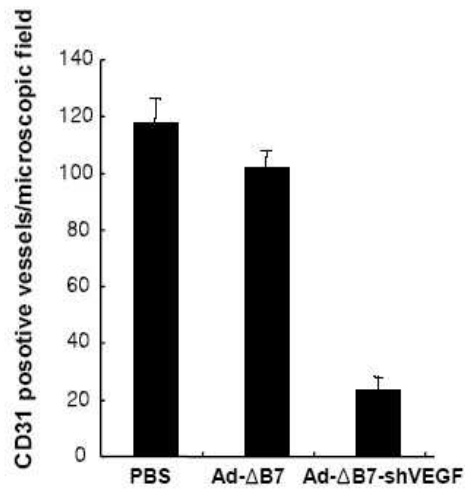
도면13



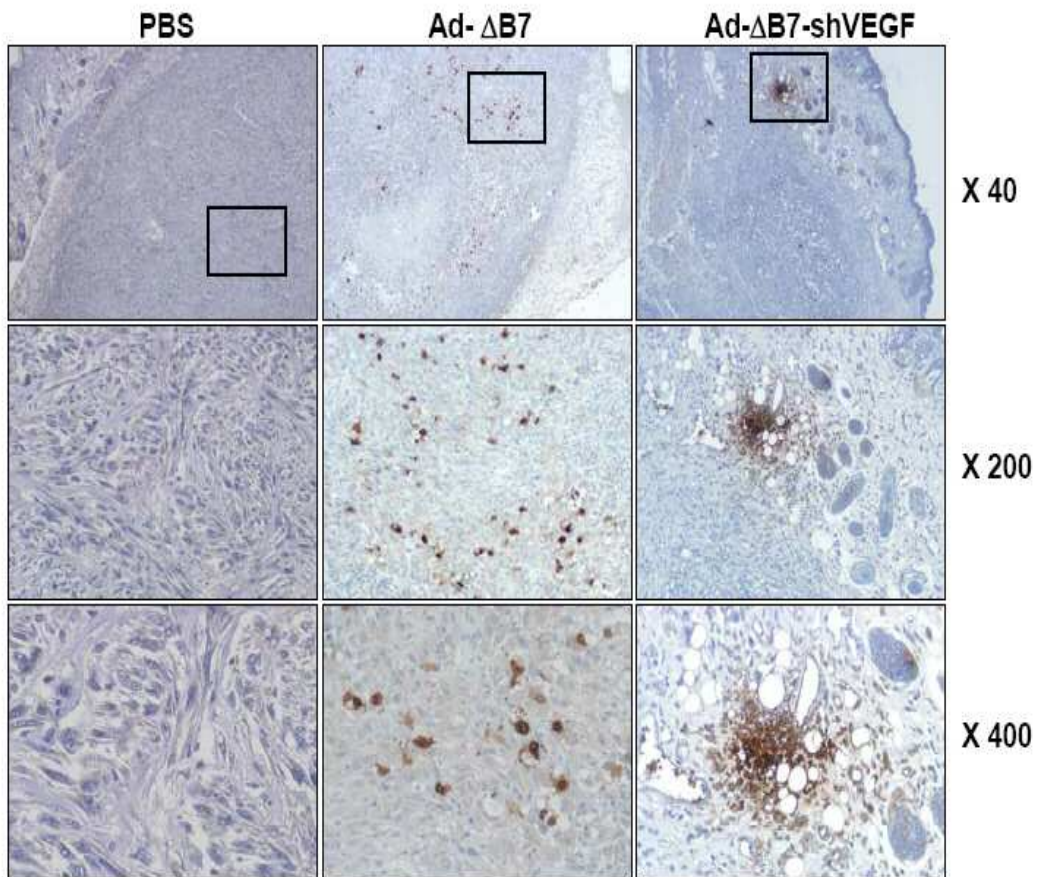
도면14a



도면14b



도면15



서열목록

서열목록 전자파일 첨부