

명세서

발명의 명칭: 하이브리드 HGF 유전자가 도입된 AAV(아데노-연관 바이러스) 벡터

기술분야

- [1] 본 특허출원은 2017년 12월 29일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2017-0184738호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [2] 본 발명은 소정의 하이브리드 HGF 유전자 서열을 포함하는 AAV 벡터에 관한 것이다.
- [3]

배경기술

- [4] 유전자 치료는 유전자 재조합 기술을 이용하여 치료 유전자를 환자의 세포 안에 전달하여 대상세포의 유전적 변형을 일으키거나 특정 단백질을 발현시켜 유전적 질환 및 난치병 등을 치료하는 방법이다. 이 때 유전자를 생체 내로 전달하는 물질을 운반체 또는 벡터라고 하는데, 벡터는 크게 바이러스성 벡터와 비바이러스성 벡터로 구분된다. 바이러스성 벡터로는 레트로바이러스, 아데노바이러스가 대표적이며, 비바이러스성 벡터로는 naked DNA, 리포솜(liposome) 등이 있다.
- [5] 간세포성장인자(HGF)는 성장인자 중의 하나로, 다양한 기능에 대한 연구가 진행 중에 있다. 그 예는 다음과 같다: (1) 리포솜을 운반체로 이용한 HGF의 심장질환 치료(Aoki et al., Angiogenesis induced by hepatocyte growth factor in non-infarcted myocardium and infarcted myocardium: up-regulation of essential transcription factor for angiogenesis, etc. *Gene Therapy* 7:417-427, 2000), (2) AAV를 운반체로 이용한 HGF의 간질환 치료(Suzumura et al., Adeno-associated virus vector-mediated production of hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis in mice. *Hepatol. Int.* 2:80-88, 2008), (3) naked DNA를 운반체로 이용한 HGF의 당뇨병성 신경질환 치료(Kessler et al., Double-blind, placebo-controlled study of HGF gene therapy in diabetic neuropathy. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2:465-478, 2015) (4) naked DNA를 운반체로 이용한 HGF의 근위축성 측삭 경화증 치료(Sufit et al., Open label study to assess the safety of VM202 in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 18:269-278, 2017).
- [6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 fHGF 및 dHGF를 포함하는 HGF(Hepatocyte Growth Factor)의

이형체들을 동시 발현하는 하이브리드 HGF 유전자의 전달 효율이 증대된 유전자 전달체를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 종래 알려진 하이브리드 HGF 유전자의 다운사이징 변이체 및 유전자 전달체로서의 AAV(Adeno-Associated Virus)를 이용하는 경우, 유전자 전달 효율을 유의하게 향상시킬 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

- [8] 따라서, 본 발명의 목적은 소정의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 외래 핵산서열이 도입된 AAV(Adeno-Associated Virus) 벡터를 제공하는데 있다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 상술한 AAV 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공하는데 있다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 상술한 AAV 벡터를 포함하는 당뇨병성 신경병증(diabetic peripheral neuropathy, DPN) 또는 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.
- [11] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

[12]

과제 해결 수단

- [13] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 외래 핵산서열이 도입된 AAV(Adeno-Associated Virus) 벡터를 제공한다.
- [14] 본 발명자들은 fHGF 및 dHGF를 포함하는 HGF(Hepatocyte Growth Factor)의 이형체들을 동시 발현하는 하이브리드 HGF 유전자의 전달 효율이 증대된 유전자 전달체를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 종래 알려진 하이브리드 HGF 유전자의 다운사이징 변이체 및 유전자 전달체로서의 AAV(Adeno-Associated Virus)를 이용하는 경우, 유전자 전달 효율을 유의하게 향상시킬 수 있음을 규명하였다.
- [15] 본 명세서에서 용어 "하이브리드 HGF 유전자"는 선택적 스플라이싱에 의해 둘 이상의 HGF 이형체를 동시 발현하는 유전자 서열을 의미한다. 더 구체적으로 상술한 둘 이상의 HGF 이형체는 적어도 전장 HGF(full length HGF, fHGF) 이형체 및 결손된 변이형 HGF(deleted variant HGF, dHGF) 이형체를 포함한다.
- [16] 본 발명의 하이브리드 HGF 유전자는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인해서 또는 상기 HGF 및 dHGF 유전자를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여 코딩영역으로부터 발현되는 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함된다. 따라서, 본 발명은 상기 서열번호 5의 하이브리드

HGF 유전자와 실질적으로 동일한 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 유전자의 단편을 역시 포함한다. 실질적으로 동일한 폴리뉴클레오타이드란 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것들을 의미한다.

- [17] 상술한 하이브리드 HGF 유전자는 인간 HGF 유전자의 엑손 1 내지 18에 해당하는 cDNA 및 상기 cDNA의 엑손 4와 5 사이에 삽입된 인간 HGF 유전자의 인트론 4 또는 이의 단편을 포함할 수 있으며, 이러한 서열로서 서열번호 6의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 HGF-X7 서열이 종래 알려져 있다(참조: KR2017-0024614(2017.3.7. 공개)). 다만, 상술한 서열번호 6의 뉴클레오타이드 서열은 AAV 벡터에 삽입하는데 있어서, 사이즈로 인한 제한이 있다. 본 발명의 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열은 상술한 서열번호 6의 뉴클레오타이드 서열의 인트론 4 단편에 해당하는 서열 중 일부를 제거하여 다운사이징한 서열 중 유의하게 상승된 유전자 전달 효율을 보이는 서열에 해당한다. 구체적으로 예를들면, 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열을 AAV 벡터에 도입하여 대상(subject)에 전달하는 경우, 종래 알려진 서열번호 7의 HGF-X8을 AAV 벡터에 도입하여 이용하는 경우에 비하여 유의하게 상승된 유전자 전달 효율 및 발현 효율을 보인다.
- [18] 폴리뉴클레오타이드는 네이키드 DNA(naked DNA) 상태 또는 유전자 운반체에 포함된 상태로 대상(subject)으로 운반될 수 있고, 유전자 운반체로서 플라스미드 또는 바이러스 벡터 등이 이용될 수 있음이 알려져 있으나, 본 발명의 경우 상술한 바와 같이 AAV(Adeno-Associated Virus) 벡터가 유전자 운반체로 이용된다.
- [19] AAV 벡터의 경우 비분열 세포를 감염시킬 수 있고, 다양한 종류의 세포를 감염시킬 수 있으며, AAV 벡터의 제조 및 용도에 대한 상세한 설명은 미국 특허 제5,139,941호 및 제4,797,368호에 상세하게 개시되어 있다. 유전자 전달 시스템으로서의 AAV에 대한 연구는 LaFace et al, Virology, 162:483486 (1988), Zhou et al., Exp. Hematol. (NY), 21:928-933 (1993), Walsh et al, J. Clin. Invest., 94:1440-1448 (1994) 및 Flotte et al., Gene Therapy, 2:29-37 (1995)에 개시되어 있다. 전형적으로, AAV 바이러스는 두 개의 AAV 말단 리피드가 옆에 위치되어 있는 목적의 유전자 서열을 포함하는 플라스미드(McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963-1973 (1988); 및 Samulski et al., J. Virol., 63:3822-3828 (1989)) 및 말단 리피드가 없는 야생형 AAV 코딩 서열을 포함하는 발현 플라스미드, 그리고 아테노바이러스의 헬퍼(helper) 유전자가 포함된 플라스미드(McCarty et al., J. Virol., 65:2936-2945 (1991))를 동시에 전달(transfection)하여 제조된다.
- [20] 본 발명의 AAV 벡터는 당업계에 공지된 다양한 바이러스 감염 방법에 따라 외래 유전자 서열을 세포 내로 운반하는데 이용될 수 있으며, 그 방법은 특별히 제한되지 않는다.
- [21] 본 발명의 AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7,

AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 및 AAV16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 AAV serotype을 갖는다.

- [22] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 AAV 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [23] 본 발명의 AAV 벡터는 적절한 숙주 세포, 예를 들어, 293T와 같은 포유동물세포(mammalian cell) 또는 곤충세포(insect cell) 등에 도입시킬 수 있고, 형질 전환된 숙주 세포를 이용하여 본 발명의 유전자의 DNA를 대량으로 복제하거나 단백질을 대량 생산할 수 있다.
- [24] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 AAV 벡터를 포함하는 당뇨병성 신경병증(diabetic peripheral neuropathy, DPN) 또는 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [25] 본 명세서에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 당뇨병성 신경병증 또는 근위축성 측삭 경화증을 억제시키는 모든 행위를 의미한다.
- [26] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료"는 (a) 당뇨병성 신경병증 또는 근위축성 측삭 경화증의 진행/발전의 지연 또는 억제; (b) 당뇨병성 신경병증 또는 근위축성 측삭 경화증의 경감; 및 (c) 당뇨병성 신경병증 또는 근위축성 측삭 경화증의 제거를 의미한다.
- [27] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다.
- [28] 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 글산 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, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [29] 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구 투여가 바람직하고, 예컨대 정맥내 투여, 복강내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 척수강내 투여, 뇌실 내 투여(intracerebroventricular injection), 뇌 투여(intracerebral injection) 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수 있다.
- [30] 본 발명의 약제학적 조성물은 주사로 제제화되어 투여될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 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. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 AAV 벡터는 1×10^8 내지 1×10^{12} GC/site의 투여량으로 투여된다.

- [31] 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 용기 내에 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.
- [32] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 당뇨병성 신경병증은 다발성 말초신경병증 (polyneuropathy) 또는 국소성 말초신경병증(focal neuropathy)이다.
- [33] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상술한 다발성 말초신경병증은 고혈당성 신경병증 (hyperglycemic neuropathy), 원위부 대칭성 다발신경병증 (distal symmetric polyneuropathy), 자율신경병증 (autonomic neuropathy), 급성 감각신경병증 (acute sensory neuropathy), 급성 통증성 감각신경병증 (acute painful sensory neuropathy) 및 만성 운동성 감각신경병증 (chronic sensorimotor neuropathy)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 당뇨병성 신경병증이다. 보다 더 구체적으로, 상술한 국소성 말초신경병증은 뇌신경병증(cranial neuropathy), 몸통 신경병증(truncal neuropathy), 사지 신경병증(limb neuropathy), 흉요추신경병증(thoracolumbar radiculoneuropathy) 및 요천골 신경총근병증(lumbosacral radiculoplexus neuropathy)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 당뇨병성 신경병증이다.

발명의 효과

- [34] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [35] (a) 본 발명은 소정의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 외래 핵산서열이 도입된 AAV(Adeno-Associated Virus) 벡터를 제공한다.
- [36] (b) 본 발명은 상술한 AAV 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [37] (c) 본 발명은 상술한 AAV 벡터를 포함하는 당뇨병성 신경병증(diabetic peripheral neuropathy, DPN) 또는 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [38] (d) 본 발명의 AAV 벡터를 이용하는 경우, 하이브리드 HGF 유전자를 높은 전달 효율로 대상(subject)에 전달할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [39] 도 1은 pCK-HGF-X7으로부터 HGF-X7의 다운사이징 변이체들을 제조하는 방법을 보여주는 모식도이다.
- [40] 도 2는 HGF-X7의 다운사이징 변이체들을 pCA 벡터에 클로닝하는 방법을 보여주는 모식도이다.
- [41] 도 3은 AAV-pCA-HGF-X7-d3 및 AAV-pCA-HGF-X7-d4를 각각 감염시킨 C2C12 세포에서의 HGF 단백질의 발현량을 보여주는 그래프이다.

- [42] 도 4는 AAV2-pCA-HGF-X7-d4와 AAV2-pCA-HGF-X8를 각각 감염시킨 C2C12 세포에서의 HGF 단백질의 발현량을 보여주는 그래프이다.
- [43] 도 5는 ALS 마우스에서 AAV6-pCA-HGF-X7-d4를 근육 투여한 뒤, 병의 진행이 지연됨을 보여주는 그래프이다.
- [44] 도 6는 ALS 마우스에서 AAV6-pCA-HGF-X7-d4를 근육 투여한 뒤, 생존률의 개선 정도를 보여주는 그래프이다.
- [45] 도 7은 ALS 마우스에서 AAV6-pCA-HGF-X7-d4를 근육 투여한 뒤, 체중 감소의 둔화 정도를 보여주는 그래프이다.
- [46] 도 8은 ALS 마우스에서 AAV1-pCA-HGF-X7-d4를 척수강 내 투여한 뒤, 생존률 조사 및 행동실험 분석 결과를 보여주는 그래프이다.

[47]

발명의 실시를 위한 형태

- [48] 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.

[49] 실시예

[50] 실험예 1: HGF-X7 유도체(derivatives)의 제작

- [51] HGF의 두 가지 이형체를 발현하는 AAV 벡터를 제작하기 위해, 서열번호 1(pCK-HGF-X7)로부터 위치지정 돌연변이(site-directed mutagenesis) 방법을 통해 4가지 유도체(derivative)를 제작하였다. 상세한 방법은 다음과 같다. 먼저 서열번호 1의 DNA를 주형으로 하여 PCR(Site-directed Mutagenesis Kit, Stratagene, US)을 진행하였다. 이 때 사용한 프라이머 서열은 다음과 같았다.

[52] [표1]

d1	forward(SEQ ID NO: 8)	TCTCGGTATTTGTGGATCCTATTATGATCTTTTGTGTA
	reverse(SEQ ID NO: 9)	TTTACACAAAAGATCATAATAGGATCCACAAATACCGAGA
d2	forward(SEQ ID NO: 10)	TCTCGGTATTTGTGGATCCTTTACTATTATAAACCAAAAC
	reverse(SEQ ID NO: 11)	GTTTTGGTTTATAATAGTAAAGGATCCACAAATACCGAGA
d3	forward(SEQ ID NO: 12)	TCTCGGTATTTGTGGATCCTAAGGTGTAAGATGTTAAAGG
	reverse(SEQ ID NO: 13)	CCTTTAACATCTTACACCTTAGGATCCACAAATACCGAGA
d4	forward(SEQ ID NO: 14)	TCTCGGTATTTGTGGATCCTTATAAGAAAAGCAATAAACA
	reverse(SEQ ID NO: 15)	TGTTTATTGCTTTTCTTATAAGGATCCACAAATACCGAGA

[53] PCR 산물을 C 세포에 전달하여 나온 콜로니 중 pCK-HGF-X7-d1, pCK-HGF-X7-d2, pCK-HGF-X7-d3 및 pCK-HGF-X7-d4를 포함하고 있는 콜로니를 선별하여 이로부터 플라스미드 DNA를 추출하였다(참조: 도 1).

[54]

[55] 실험예 2: pCA-HGF-X7 유도체의 제작

[56] 실험예 1로부터 얻은 4가지 유도체를 포함하는 AAV 생산을 위해, 이들 유도체를 pCA 벡터(AAV Helper-Free System, Agilent, USA)에 클로닝하였다. 먼저, 실험예1의 pCK-HGF-X7-d1, pCK-HGF-X7-d2, pCK-HGF-X7-d3 및 pCK-HGF-X7-d4에 ClaI 및 SalI 제한효소를 처리하여 HGF-X7-d1, HGF-X7-d2, HGF-X7-d3 및 HGF-X7-d4의 4가지 절편을 얻었다. pCA 벡터에도 ClaI 및 SalI 제한효소를 처리한 후 상기 HGF-X7-d1, HGF-X7-d2, HGF-X7-d3 및 HGF-X7-d4의 4가지 절편과 함께 각각 ligation 반응을 시켜 pCA-HGF-X7-d1, pCA-HGF-X7-d2, pCA-HGF-X7-d3 및 pCA-HGF-X7-d4를 제작하였다(참조: 도 2).

[57]

[58] 실험예 3: AAV-pCA-HGF-X7 유도체의 생산

[59] 실험예 2에서 제작한 각각의 플라스미드 DNA를 사용하여 AAV를 제작하였다. AAV를 생산하기 위해, 293T 세포(ATCC)를 전날 준비하여 24시간 동안 안정화시켰다. 이 293T 세포에 실험예 2에서 제작한 플라스미드 DNA와 AAV

생산에 필요한 DNA인 pHelper 및 pAAV-RC(AAV Helper-Free System, Agilent, USA)를 전달(transfection)한 후 3일 후 AAV를 수거하였다. 수거한 AAV는 titration kit(AAVpro Titration Kit, Takara, JP)를 이용하여 titer를 측정하였다. 총 4가지 종류의 serotype(AAV1, AAV2, AAV5 및 AAV6)을 이용하여 AAV를 생산하였다.

[60]

[61] **실험예 4: AAV-pCA-HGF-X7 유도체의 hHGF 발현 여부 확인**[62] **4-1. 실험 방법**

[63] 실험예 3에서 생산한 AAV 중, AAV2-pCA-HGF-X7-d3 및 AAV2-pCA-HGF-X7-d4에 대해 hHGF가 발현되는지 확인하기 위해 실험을 진행하였다. 먼저 C2C12 세포(ATCC)를 12웰-플레이트에 웰당 8×10^4 세포 수로 깔아준 뒤 24시간 동안 세포를 안정화시켰다. 이 C2C12 세포에 동량의 titer를 갖는 AAV2-pCA-HGF-X7-d3 및 AAV2-pCA-HGF-X7-d4를 각각 감염시켰다. 감염 후 2일 후에 상등액을 수거하여 HGF ELISA(R&D systems, US)를 수행하여 HGF 단백질의 양을 분석하였다.

[64]

[65] **4-2. 실험 결과**

[66] 실험 결과, AAV2-pCA-HGF-X7-d3 및 AAV2-pCA-HGF-X7-d4은 모두 HGF 단백질을 발현하는 것으로 확인되었다. 특히 AAV2-pCA-HGF-X7-d4에 의한 HGF의 발현량이 AAV2-pCA-HGF-X7-d3보다 높은 것을 확인할 수 있었다(참조: 도 3).

[67]

[68] **실험예 5: AAV-pCA-HGF-X7-d4와 AAV-pCA-HGF-X8의 hHGF 발현 비교**[69] **5-1. 실험 방법**

[70] AAV2-pCA-HGF-X7-d4와 AAV2-pCA-HGF-X8에 대해 hHGF의 발현량을 비교하기 위해 다음의 실험을 진행하였다. 먼저 C2C12 세포(ATCC)를 12웰-플레이트에 웰당 8×10^4 세포 수로 깔아준 뒤 24시간 동안 세포를 안정화시켰다. 이 C2C12 세포에 동량의 titer를 갖는 AAV2-pCA-HGF-X7-d4와 AAV2-pCA-HGF-X8를 각각 감염시켰다. 감염 후 2일 후에 상등액을 수거하여 HGF ELISA(R&D systems, US)를 수행하여 HGF 단백질의 양을 비교하였다.

[71] **5-2. 실험 결과**

[72] 실험 결과, AAV2-pCA-HGF-X7-d4와 AAV2-pCA-HGF-X8 모두 HGF 단백질을 발현하였지만, AAV2-pCA-HGF-X7-d4은 AAV2-pCA-HGF-X8과 비교하였을 때 약 9-10배 정도의 현저히 높은 HGF 발현량을 나타내는 것을 확인하였다(참조: 도 4).

[73]

[74] **실험예 6: ALS 마우스 모델에서의 근육 투여에 따른 AAV-pCA-HGF-X7-d4의 효과**

[75] **6-1. 실험 방법**[76] **6-1-1. ALS 마우스 모델 제작 및 유전자 전달**

[77] ALS 모델로 널리 사용되는 hSOD1-G93A 모델을 사용하였다. ALS 마우스(Jackson Laboratory, US)를 교배하여 얻은 후 지노타이핑(genotyping)을 거쳐 Tg 여부를 확인하였다. 태어난 지 10주 후에 2군(Tg-AAV6-MCS: 8마리, Tg-AAV6-pCA-HGF-X7-d4: 7마리)으로 편성하였다. Tg가 아닌 개체는 골라내어 음성 대조군(negative control)(non-Tg: 5마리)으로 이용하였다. 생후 90일이 되는 마우스의 허벅지근, 전경골근 그리고 장딴지근에 각각 AAV를 1×10^8 GC/site로 투여하였고, 총 3×10^8 GC/head를 투여하였다.

[78] **6-1-2. 질환 진행 속도, 생존률 및 무게 측정**

[79] 효능을 평가하기 위해 매일 질병 진행 속도와 체중을 측정하였고, 개체의 생존 여부를 확인하였다. ALS 질환의 경우 결국 질병의 진행에 따라 죽음에 이르게 되므로, 위의 3가지 지표는 ALS 동물 실험에서 대표적으로 널리 사용되는 분석 기준이다. 질병 진행 속도의 경우 다음과 같은 기준으로 측정하여 수치화 하였다.

[80] [Symptom score]

[81] 5점 : 정상

[82] 4점 : 마우스 꼬리를 잡았을 때 하지 균형을 유지하는 시간이 1~2초 사이

[83] 3점 : 마우스 꼬리를 잡았을 때 하지 균형을 유지하는 시간이 1초 미만이나 걸음 걸이는 정상

[84] 2점 : 하지 균형을 유지하지 못하고, 다리를 끌면서 걸음

[85] 1점 : 하지 균형을 유지하지 못하고 발등으로 걸음

[86] 0점 : 사망

[87]

[88] **6-2. 실험 결과**

[89] ALS 마우스(AAV6-MCS 투여군)의 경우 시간이 지남에 따라 질환이 심해짐을 확인할 수 있었다. 그러나 AAV6-pCA-HGF-X7-d4를 투여한 경우 그 진행 정도가 지연됨을 확인할 수 있었다. 이를 수치화 하였을 때 실험 기간 내 ALS 마우스의 경우 symptom score의 평균이 2.36이었고, 이에 비해 AAV6-pCA-HGF-X7-d4를 투여 받은 그룹의 경우 그 값이 2.88로 ALS 마우스(AAV6-MCS 투여군) 대비 증가한 값을 나타내었다(참조: 도 5).

[90] 또한 AAV6-pCA-HGF-X7-d4를 투여한 경우에는 생존률에 있어서도 확연한 개선 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 생존률의 경우 AAV6-MCS를 투여 받은 그룹의 경우 생후 평균 139일을 생존한 반면 AAV6-pCA-HGF-X7-d4를 투여 받은 경우 그 기간이 147일로 약 8일 증가한 것을 확인할 수 있었다(참조: 도 6).

[91] 마지막으로 ALS 마우스(AAV6-MCS)의 경우 근육 감소로 인해 체중의 감소가 눈에 띄게 증가하는데, AAV6-pCA-HGF-X7-d4를 투여한 경우 체중 감소가 둔화되는 것을 확인할 수 있었다. 즉 체중의 상대적인 비교를 하였을 때

ALS마우스의 경우 투여 시점부터 시험 종료기간까지 체중의 평균 변화가 약 34%였고, 이에 반해 AAV6-pCA-HGF-X7-d4를 투여한 경우 그 변화 폭이 22%로 체중 감소 정도가 완화되어 있는 것을 확인할 수 있었다(참조: 도 7).

- [92]
- [93] 실험예 7: ALS 마우스 모델에서의 척수강내 투여에 따른 AAV-pCA-HGF-X7-d4의 효과
- [94] **7-1. 실험 방법**
- [95] **7-1-1. ALS 마우스 모델 제작 및 유전자 전달**
- [96] ALS 모델로 널리 사용되는 hSOD1-G93A 모델을 사용하였다. ALS 마우스(Jackson Laboratory, US)를 교배하여 얻은 후 지노타이핑(genotyping)을 거쳐 Tg 여부를 확인하였고, 일정한 수준의 변이 유전자를 보유한 개체를 선별하여 실험에 사용하였다. Tg가 아닌 개체의 경우 음성 대조군 (negative control, 13마리)으로 설정하였다. Tg 개체는 각각 14, 16마리씩 Tg-AAV1-MCS군과 Tg-AAV1-pCA-HGF-X7-d4군으로 편성하였다. 생후 60일 되는 마우스의 척수강내로 AAV를 5×10^9 GC/site로 1회 투여하였다.
- [97] **7-1-2. 생존률 조사 및 행동실험 분석**
- [98] 효능을 면밀히 살펴보기 위해 ALS 질환의 가장 중요한 지표인 생존률을 조사하였고, 이와 동시에 ALS 질환 상황에서 개체의 운동능을 살펴보기 위해 rotarod, hanging wire 조사를 실시하였다. 추가로 근육 기능의 강도를 살펴보기 위해 grip strength를 측정하였다.
- [99] 생존률의 경우 매일 개체의 생존 여부를 조사하였다. Rotarod의 경우 accelerating 방법을 사용하였는데, 마우스를 회전하는 봉 위에 올려놓은 후 얼마나 오랫동안 회전하는 봉 위에서 운동하는지 그 시간을 측정하는 방법이다. 특별히, 회전하는 봉의 속도는 시간이 지날수록 가속화된다.
- [100] Hanging wire의 경우 격자 무늬의 구조물에 마우스를 올려놓은 후 뒤집고, 뒤집은 채로 개체가 매달려 있는 시간을 잰다.
- [101] Grip strength 경우 strength를 측정하는 기기에 각각 마우스의 앞발과 뒷발을 올려놓은 후 근육 강도를 측정하게 된다.
- [102] 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표현하였고, 각 데이터의 통계 분석은 각 시간대에서 One-Way ANOVA로 분석 후 Tukey post-hoc test를 실시하였다. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$)
- [103] **7-2. 실험 결과**
- [104] AAV1-pCA-HGF-X7-d4를 척수강내 투여 시 치료 효과를 나타냄을 확인하였다. 먼저 생존률을 조사한 결과 AAV1-pCA-HGF-X7-d4 투여군의 경우 AAV1-MCS 투여군보다 유의미한 생존률 증가를 보였다. AAV1-MCS를 투여한 경우 마우스의 평균 수명이 144일인 반면, AAV1-pCA-HGF-X7-d4를 투여한 개체군의 경우 그 평균이 160일로 약 16일 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- [105] 실제 운동능력 향상에도 개선이 나타났는데, rotarod 실험에서 음성 대조군의

경우 평균 226초의 시간을 rotarod에서 유지하였고, 그에 비해 Tg-AAV1-MCS 군은 112초로 크게 감소하였다. 반면 AAV1-pCA-HGF-X7-d4를 투여받은 실험군의 경우 그 시간의 평균이 151초로 개선되었음을 확인하였다. Hanging wire와 grip strength의 경우에서도 유사한 치료 효과를 관찰하였는데, 특히 질병 진행의 마지막 단계 (생후 137일째)에서 AAV1-pCA-HGF-X7-d4 투여군의 경우 hanging wire에서 버티는 시간이 약 31초로, 약 7초로 조사된 AAV1-MCS 투여군에 비해 크게 증가함을 확인하였다. Grip strength 측정 결과에서도 AAV1-MCS 투여군에서는 대략 28 g의 강도를 나타내었는데, AAV1-pCA-HGF-X7-d4 투여군의 경우 그 강도가 66 g로 크게 향상되었다(참조: 도 8).

[106]