

명세서

발명의 명칭: 항종양 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 인터류킨-12(interleukin-12, IL-12)와 C-met(tyrosine kinase Met)의 발현을 억제하는 핵산 분자를 동시에 발현하는 재조합 아데노 바이러스를 포함하는 항종양 또는 항종양 면역성 증진 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 종양면역치료는 전반적인 체내 면역기능을 증강시킴으로써 종양에 대한 면역반응을 유도하고 이를 통하여 종양을 치료하는 방법으로, 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 암이 생성되는 단계는 거의 대부분의 경우 면역억제 환경이 형성되어, 체내의 면역 시스템이 활발히 작용하더라도 종양을 쉽게 제거하기 어렵게 된다. 종양 세포는 스스로 많은 비정상적인 항원을 발현시키고, 이들 항원은 면역감시(immune surveillance)를 통해서 제거(efadication) 반응을 일으켜, 체내의 면역 시스템이 활발히 작용하더라도 종양 세포가 면역감시를 회피하도록 한다. 또한, 이러한 현상이 종양 세포가 생산하는 다양한 인자(factors)에 의해 매개되는 것으로 밝혀졌다. 종양 조직은 혈관 내피 성장인자(VEGF), 종양증식인자(TGF)- β 및 인터루킨(IL)-10과 같은 면역억제 분자를 생산할 수 있고, 면역 억제된 종양에서 조절 T 세포의 침투가 나타나는 것으로 보고되었다. 더 나아가, 활성화된 T 세포에 의해 PD-1이라고 하는 억제수용체의 발현 자극이 계속될수록 증가되는데, 암세포의 경우 PD-1과 특이적으로 결합하는 리간드인 PD-L1을 다량으로 발현하여 활성화된 T 세포를 불활성화시켜 면역반응을 회피하며, 결과적으로 종양 내의 면역억제 미세환경 및 면역관용을 유도한다.
- [3] 최근 연구에 의해 T 세포 활성화 억제에 관여하는 PD-1의 면역관문(immune checkpoint)을 억제할 수 있는 저해제가 강력한 항종양 면역반응을 유도하였음을 증명하였다. 결과적으로, 면역감시 회피를 극복하는 것이 면역치료요법의 주요 전략이 된다. 따라서 이러한 한계점을 극복하기 위한 하나의 방안으로, 면역 증진 효과를 갖는 사이토카인(cytokine) 유전자를 직접 암 세포에 도입하여 암 세포로부터 사이토카인을 생성 및 분비시켜 항종양 면역반응 유도를 통한 암 세포 특이적 제거와 관련된 연구들이 활발히 이루어지고 있다. 현재까지 항종양 효과가 보고된 면역 증진 사이토카인 유전자들 중 인터류킨-12(IL-12)는 가장 효과적이고 유망한 사이토카인 중 하나이다.
- [4] 인터류킨-12(IL-12)는 이황화결합으로 연결된 40 kDa 및 35 kDa 서브유닛을 포함하는 헤테로다이머(heterodimeric) 단백질로, 활성화된 대식세포, 단핵구, 수지상세포 및 활성화 B 림프구와 같은 항원제시세포(antigen presenting cell, APC)로부터 분비되며, 암 세포를 효과적으로 제거할 수 있는 세포성 T 세포와

NK 세포에 직접 작용하여 이들을 활성화 시키고 IFN- γ 의 분비를 유도할 뿐만 아니라, 이들의 암 세포에 대한 살상 능력도 증강시킨다. IL-12의 국소적 발현은 종양세포가 T-세포 매개 세포독성에 민감하게 반응하도록 하며, 결과적으로 종양 성장 억제 및 체액성 면역(systemic immunity)의 구축을 가져온다.

- [5] 그러나, IL-12 투여 시 환자가 받아들일 수 있는 용량을 제한하는 사이토카인-연관 독성이 전신에 나타날 수 있기 때문에, IL-12의 임상 적용에 있어서 어려움이 있다. 또한, 면역 효과의 전반적인 하향조절, 환자의 혈청에서 IL-10 발현 증가 및 IFN- γ 및 TNF- β 발현감소에 의한 Th1에서 Th2 면역으로의 IL-12 분극화 현상이 나타나며, 이 때문에 반복적으로 IL-12를 투여하게 되는 경우도 발생하므로, 이러한 임상결과는 암의 치료를 위한 단일 치료제로서의 IL-12의 한계를 보여준다.
- [6] 최근에는 암의 악성 정도를 반영하는 생물학적 지표로서 성장인자와 그들의 수용체에 대한 연구가 진행 중이고, 이 중 티로신 키나아제 수용체 패밀리(tyrosine kinase receptor family)의 하나인 c-met에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. c-met은 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor/scatter factor, HGF/SF)의 수용체로 작용하며, 다양한 암에서 과 발현되고 이러한 환자들은 암의 치료 예후가 나쁜 경우가 대부분이다. c-met의 과발현은 HGF/SF-Met 신호전달체계를 통해 세포분열(mitogenesis)과 세포의 운동성(motility)을 증진시키고, 세포사멸을 억제할 뿐만 아니라 혈관 형성과 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)로 침윤(invasion)과 전이(metastasis)를 유도하는 등 암의 악성도를 증가시킨다. 이러한 c-met의 과발현에 의해 유도되는 암세포의 빠른 증식 및 전이는 면역계의 암세포 제거 속도를 넘어서기 때문에 면역반응에 의해 제거되기 어렵다. 더욱이, 종양의 크기가 커질수록 종양 미세환경의 면역반응 중심추가 억제 방향으로 심하게 기울어지기 때문에 단일 치료법으로 이를 제어하기는 더욱 어려워지며, 항종양 면역치료에 의해 향상된 항종양 효과를 나타내지 못하게 된다.
- [7] 따라서, 항종양 면역성을 증가시켜 더욱 우수한 항암 효과를 가지면서, 투여량 등에 따른 부작용이 없는 항암 치료법의 개발은 여전히 본 기술분야에서 해결해야할 과제로 남아있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 상기한 과제를 해결하기 위해서, 이에 본 발명자들은 항종양 효과는 우수하면서도, 투여량을 낮출 수 있는 치료타겟을 개발하고자 노력하였고, IL-12과 c-met를 타겟으로하는 치료법을 병용함으로써 보다 효과적으로 암을 치료할 수 있는 방법을 제안한다. 본 발명자들은 인터류킨-12을 발현하면서 동시에 c-met의 과발현을 억제할 수 있는 아데노 바이러스를 암의 치료에 활용하는 경우, 각 치료 타겟을 단독으로 사용하는 경우와 비교해서 종양을

억제하고, 면역감시 회피를 극복하여 암을 치료하는데 시너지 효과를 얻을 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다

- [9] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허 문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

과제 해결 수단

- [10] 상기한 과제를 해결하고자, 본 발명은 인터류킨-12(IL-12)를 코딩하는 유전자 및 c-met의 mRNA에 상보적이며, c-met의 발현을 억제하는 올리고뉴클레오티드를 발현하는 유전자를 포함하는 유전자 전달체를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 인터류킨-12(IL-12)를 코딩하는 핵산 서열; 및 c-met 유전자에 상보적으로 결합하여 c-met의 발현을 억제하는 올리고뉴클레오티드를 발현하는 핵산 서열을 포함하는 유전자 전달체를 포함하는 억제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 상기 유전자 전달체는 아데노 바이러스 시스템일 수 있고, 상기 아데노 바이러스 시스템은 재조합 아데노 바이러스 또는 아데노 바이러스의 재조합 DNA 일 수 있다.
- [13] 상기 억제학적 조성물은 항암용 또는 항종양 면역성 증진용 조성물 일 수 있다.

발명의 효과

- [14] 본 발명의 인터류킨-12와 C-met의 발현을 억제하는 핵산 분자를 동시에 발현하는 아데노 바이러스 시스템은 종양 환경에서 면역 기능을 회복시켜 종양 재형성, 전이 억제, 종양의 성장 억제와 같은 항암 효과를 현저히 증진시킬 수 있고, 특히, 두 치료유전자를 동시에 발현 시킴으로써 암의 치료에서 현저한 시너지 효과를 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 구축된 아데노 바이러스 플라스미드 DNA의 구조를 나타낸 것이다.
- [16] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 구축된 아데노 바이러스 플라스미드 DNA가 세포 내에서 마우스 인터류킨-12(mIL-12) 또는 인간 인터류킨-12(hIL-12)를 발현할 수 있음을 확인한 그래프이다.
- [17] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 구축된 아데노 바이러스가 세포 내에서 인터류킨-12(IL-12) 발현을 높이고, c-met의 발현을 억제시킴을 확인한 그래프이다.
- [18] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 구축된 IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노바이러스의 구조를 보여준다.
- [19] 도 5a 및 5b는 마우스 유래 B16-F10와 CT26세포 각각에서 본 발명의 일

실시예에 따른 IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노바이러스에 의한 생체 내 항종양 효과 확인한 결과이다.

- [20] 도 6은 마우스 유래 B16-F10세포에서 본 발명의 일 실시예에 따른 IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노바이러스 pDNA/PPA 복합체에 의한 생체 내 항종양 효과 확인한 결과이다.
- [21] 도 7a 및 7b는 인간 폐암 세포 주 H1975에서 본 발명의 일 실시예에 따른 IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노바이러스에 의한 세포 내 IL-12 발현(도 7a) 및 c-met의 발현 억제능(도 7b)을 확인한 결과이다.
- [22] 도 8a 및 8b는 인간 폐암 세포 주 H1975에서 본 발명의 일 실시예에 따른 IL-12 및/또는 shc-met을 발현하는 항암 아데노바이러스들에 의한 암세포 살상능을 정상 산소 조건(8a) 및 저산소 조건(8b)에서 확인한 결과이다.
- [23] 도 9a, 9b, 9c 및 9d는 본 발명의 일 실시예에 따른 IL-12 및/또는 shc-met을 발현하는 항암 아데노바이러스들에 의한 HUVEC 세포의 전이(9a 및 9b)와 침습(9c 및 9d) 억제효과를 확인한 결과이다.
- [24] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 IL-12 및/또는 shc-met을 발현하는 항암 아데노바이러스들에 의한 HUVEC 세포의 Endo-MT(Endothelial to mesenchymal transition) 저해를 통한 종양세포의 전이 억제를 확인한 결과이다.
- [25] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 IL-12 및/또는 shc-met을 발현하는 항암 아데노바이러스들의 인간 이종이식 종양 모델(H1975)에서 항종양 효과를 확인한 결과이다.
- [26] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따라 IL-12와 c-met을 표적으로하는 가이드 RNA에 의한 CRISPR/Cas 시스템을 동시 발현하는 유전자 전달체의 구조를 도식화한 것이다.
- [27] 도 13a, 13b 및 13c는 본 발명의 일 실시예에 따른 IL-12와 Lbcpf1-crMET를 동시 발현하는 항암 바이러스에 의한 세포 내 IL-12 발현(13a) 및 c-met 억제(13b 및 13c) 효과를 확인한 결과이다.
- [28] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 IL-12와 Lbcpf1-crMET를 동시 발현하는 항암 바이러스의 인간 이종이식 종양 모델(H1975)에서 항종양 효과를 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [29] 본 발명의 일 양태에 따라, 본 발명은 인터류킨-12(IL-12)를 코딩하는 유전자 및 c-met 유전자에 상보적으로 결합하여 c-met의 발현을 억제하는 올리고뉴클레오티드를 발현하는 유전자를 포함하는 유전자 전달체를 제공한다.
- [30] 본 발명의 다른 양태에 따라, 본 발명은 인터류킨-12(IL-12)를 코딩하는 유전자 및 c-met 유전자에 상보적으로 결합하여 c-met의 발현을 억제하는 올리고뉴클레오티드를 발현하는 유전자를 포함하는 유전자 전달체를 포함하는 항암용, 암세포의 항 전이용 조성물, 또는 항종양 면역성 증진용 약학적

조성물을 제공한다.

- [31] 본 발명의 또 다른 양태에 따라, 본 발명은 인터류킨-12(IL-12)를 코딩하는 유전자 및 c-met 유전자에 상보적으로 결합하여 c-met의 발현을 억제하는 올리고뉴클레오티드를 발현하는 유전자를 포함하는 유전자 전달체의 항암제로서의 용도를 제공한다.
- [32] 본 발명의 또 다른 양태에 따라, 본 발명은 인터류킨-12(IL-12)를 코딩하는 유전자 및 c-met 유전자에 상보적으로 결합하여 c-met의 발현을 억제하는 올리고뉴클레오티드를 발현하는 유전자를 포함하는 유전자 전달체 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [33]
- [34] 본 발명에서 '유전자 전달체'는 유전자를 세포 내로 전달하기 위한 벡터 시스템을 의미하는 것으로, 본 발명에서 별도의 기재가 없는 한 유전자 전달체, 아데노바이러스 벡터, 아데노바이러스 시스템, 또는 아데노 바이러스 벡터 시스템은 동일한 의미로 사용된다. 본 발명의 아데노 바이러스 시스템은 아데노 바이러스와 아데노 바이러스의 DNA(viral DNA)를 모두 포함하는 의미이다. 바람직하게는 항암 또는 항종양 면역성 증진용으로 재조합된 재조합 아데노 바이러스 또는 아데노 바이러스의 재조합 DNA 일 수 있다.
- [35] 상기 아데노 바이러스 시스템은 아데노 바이러스의 게놈 서열을 포함할 수 있고, 이를 통해서 세포 내로 전달된 아데노 바이러스 또는 재조합 DNA로부터 아데노 바이러스가 생성되어, 항암 또는 항종양 면역효과를 가질 수 있다. 본 발명에서는 IL-12와 shc-met를 각각 발현하는 유전자가 아데노 바이러스 게놈에 삽입되어 아데노 바이러스 자체 또는 이의 재조합 DNA 형태로 세포로 전달될 수 있으므로, 본 발명의 명세서 전체에서 아데노 바이러스로 지칭되는 것은 별도의 언급이 없는 한, 재조합 아데노 바이러스와 아데노 바이러스의 재조합 DNA를 모두 포함하는 의미이다.
- [36] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 아데노 바이러스 시스템은 종양에서만 특이적으로 증식하여, 종양 세포를 선택적으로 살상할 수 있는 종양 선택적 살상 아데노 바이러스(oncolytic adenovirus, oAd) 일 수 있다. 상기 종양 선택적 살상 아데노 바이러스는 본 명세서에서 항암 바이러스, oAd, 또는 종양 살상 바이러스 등의 용어와 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 종양 선택적 살상 아데노 바이러스는 본 발명 기술분야에서 사용되는 통상의 기술을 통해 유전자적으로 변형된 것 모두 본 발명의 아데노 바이러스 시스템에 포함된다. 일 예로, 암세포에서만 증식할 수 있도록 아데노 바이러스 게놈에서 E1A 및/또는 E1B를 제거하여 정상세포에서 증식하지 못하게 하거나, 암세포에서 분비되는 프로테아제를 사용하도록 바이러스 단백질의 타겟 시퀀스를 변화시키거나, 암세포에 존재하는 수용체(예: EGFR)에 결합하기 위해 수용체 리간드를 발현하도록 바이러스 게놈에 리간드를 발현하는 서열이 삽입된 변형일 수 있다.

- [37] 또한, 본 발명의 종양 선택적 살상 아데노 바이러스는 암세포의 살상능을 향상시키기 위해서 세포 사멸이 잘 일어나도록 TRAIL 유전자가 삽입되거나, 암세포에 들어가서 발현되어 효과적으로 면역반응이 일어나도록 IFN 유전자가 삽입될 수 있다.
- [38] 본 발명에서 이용되는 재조합 아데노 바이러스는 동물세포, 바람직하게는 포유동물 세포에서 작동 가능한 프로모터를 포함한다. 본 발명에 적합한 프로모터는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함한다. 재조합 아데노 바이러스에 삽입되는 트랜스 유전자는 프로모터-트랜스 유전자 폴리 A 서열의 발현 카세트에 삽입되는 것이 바람직하다. 이 경우, 상기 프로모터로서, 본 발명의 유전자발현 조절서열(HRE-TERT, HRE-E2F, HRE-TERT-E2F, HRE-E2F-TERT, HRE-E2F-5myc-TERT, HRE는 2개가 반복되어 포함될 수 있음) 또는 통상적인 프로모터를 이용할 수 있다.
- [39] 트랜스 유전자에 결합되는 통상적인 프로모터는, 바람직하게는 동물세포, 보다 바람직하게는 포유동물 세포에서 작동하여 트랜스 유전자의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, U6 프로모터, H1 프로모터, CMV(cytomegalo virus) 프로모터, 아데노 바이러스 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, inducible 프로모터, 암세포 특이적 프로모터(예컨대, TERT 프로모터, PSA 프로모터, PSMA 프로모터, CEA프로모터, E2F 프로모터 및 AFP 프로모터) 및 조직 특이적 프로모터(예컨대, 알부민 프로모터)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 트랜스 유전자를 발현시키기 위한 발현 컨스트럭트에서 트랜스 유전자의 다운스트림에 폴리아데닐화 서열이 결합되어 있는 것이 바람직하다. 상기 폴리아데닐화 서열은, 소성장 호르몬 터미네이터(Gimmi, E. R., et al., Nucleic Acids Res. 17:6983-6998(1989)), SV40 유래 폴리 아데닐화 서열(Schek, N, et al., Mol. Cell Biol. 12:5386-5393(1992)), HIV-1 polyA(Klasens, B. I. F., et al., Nucleic Acids Res. 26:1870-1876(1998)), β -글로빈 polyA(Gil, A., et al, Cell 49:399-406(1987)), HSV TK polyA(Cole, C. N. and T. P. Stacy, Mol. Cell. Biol. 5:2104-2113(1985)) 또는 폴리오마바이러스 polyA(Batt, D. B and G. G. Carmichael, Mol. Cell. Biol. 15:4783-4790(1995))를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [40] 본 발명에서 이용되는 재조합 아데노 바이러스에서 IL-12 유전자 서열 및 c-met 억제하는 RNA를 발현하는 서열은 프로모터에 작동적으로 연결되어 있다. 본 명세서에서, 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터,

시그널 서열, 또는 전사조절인자 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.

- [41] 본 발명의 재조합 아데노 바이러스는 선택표지로서 항생제 내성 유전자 및 리포터 유전자(예컨대, GFP(green fluorescence protein), 루시퍼라아제 및 β -글루쿠로니다아제)를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 항생제 내성 유전자는 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있고, 바람직하게는 네오마이신 내성 유전자이다. 상기의 선택표지는 별도의 프로모터 또는 IRES(internal ribosome entry site) 또는 2A 시스템에 의해 연결된 발현 시스템에 의해서도 발현될 수 있으며, 본 발명에서 이용될 수 있는 IRES는 몇 종의 바이러스 및 세포의 RNAs에서 발견되는 조절 서열이다(McBratney et. al. *Current Opinion in Cell Biology* 5:961(1993)). 또한, 2A 시스템은 단일 코딩 서열 내의 개별 단백질 산물들의 효율적인 조화 발현(concordant expression)을 가능하게 하는 절단 가능한 작은(18-22 아미노산) 펩티드를 코딩하는 서열을 의미한다. 예를 들어 구제역 바이러스(foot-and-mouth disease virus, F2A), 말 비염(equine Rhinitis) A 바이러스, 돼지 테스코바이러스(porcine teschovirus)-1(P2A) 또는 토세어 아시그나 바이러스(Thosea asigna virus, T2A), 또는 Szymczak-Workman, A. 등. "Design and Construction of 2A Peptide-Linked Multicistronic Vectors"에서 설명된 2A 시스템들 중 어느 하나와 같은, 바이러스로부터의 2A 시스템이 사용될 수 있다.
- [42] 본 발명은 인터류킨-12(interleukin-12, IL-12)를 코딩하는 유전자 및 c-met(tyrosine kinase Met)의 mRNA에 상보적이며, c-met의 발현을 억제하는 올리고뉴클레오티드를 발현하는 유전자를 모두 포함하여, 이를 동시에 발현시킴으로써, 항암 및 항종양 면역성 증진에 시너지 효과를 얻을 수 있는 것을 기술적 특징으로 한다. 또한, 적은 양의 IL-12 투여에도 불구하고, 우수한 치료효과를 얻을 수 있어, 종래의 사이토카인 투여에 따른 부작용의 문제도 해결할 수 있다는 점에 본 기술은 의의를 갖는다.
- [43] 본 발명의 명세서에서 용어 '인터류킨-12(interleukin-12; IL-12)'는 40kDa 서브유닛(p40 서브유닛) 및 35kDa 서브유닛(p35 서브유닛)이 다이설파이드(disulfide) 결합에 의해 결합되어 이루어진 헤테로다имер의 사이토카인을 의미한다. IL-12는 대식세포와 같은 항원제시세포에 의해 생성되어 활성화된 T 세포, B 세포 및 NK 세포들의 세포표면의 수용체에 결합한다. 상기 IL-12는 T 세포와 NK 세포들의 증식을 촉진 하며; T 세포, NK 세포 및 대식세포의 세포독성 효과를 증진시키고; IFN- γ , TNF- α 및 GM-CSF의 생성을 유도하며; Th1 세포의 활성화를 유도하는 작용을 한다. 또한, IL-12는 Th1 클론 증식의 중요한 공동 자극자로 알려져있고, 혈청 중에서 IgG2a 항체의

생성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 본 발명에서의 용어 “p35 서브유닛” 및 “p40 서브유닛”은 실시예에 예시된 서브유닛 뿐만 아니라, 각각의 서브유닛의 고유의 기능을 할 수 있는 서브유닛의 모든 유사체(analogues)를 포함한다.

- [44] 본 발명의 아데노 바이러스 시스템은 IL-12를 코딩하는 유전자를 발현 가능한 형태로 포함하며, 중앙 세포에 감염된 후 IL-12를 분비하여 강력한 항종양 면역 반응을 유도한다.
- [45] 본 발명의 아데노 바이러스 시스템은 IL-12를 효율적으로 발현시키기 위해서 서브유닛으로 IL-12A(p35)과 IL-12B(p40)를 발현하는 IL-12A(p35) 유전자 및 IL-12B(p40) 유전자를 포함할 수 있다. 또한, 상기 두 서브유닛을 연결하는 역할을 하도록 IL-12A(p35) 유전자 서열 및 IL-12B(p40) 유전자 서열 사이에 링커 서열을 추가로 포함하거나 단백질 발현의 효율을 높이기 위해서 IRES(internal ribosome entry site) 서열을 더 포함할 수 있다.
- [46] 상기 링커는 두 유전자 사이에 포함될 수 있는 임의의 서열을 의미하며, 본 발명에서는 IL-12A(p35) 유전자 및 IL-12B(p40) 유전자 사이에 포함될 수 있는 서열을 의미한다. 이는 이미 유전자와 유전자 사이에 삽입될 수 있는 것으로 알려진 통상의 링커 서열 또는 임의로 설계된 서열을 모두 포함하며, IL-12의 발현에 부정적인 영향을 주거나 IL-12의 기능성을 해치지 않는다면 모두 본 발명에 포함될 수 있다. 일 예로, 서열번호 19의 서열일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [47] 본 발명에 이용될 수 있는 “IL-12A 서브유닛(p35 서브유닛)”의 아미노산 서열은 GenBank 접근번호 AAD56385에 기재된 것 일 수 있다(만약, 마우스 p35 아미노산 서열을 발현하고자 하는 경우에는, GenBank Accession No. AAA39292). 또한, 상기 IL-12A 서브유닛을 코딩하는 서열로서 IL-12A(p35) 유전자는 GenBank Accession No. AF180562에 기재된 서열 중 CDS(coding sequence)에 해당하는 뉴클레오타이드 서열 일 수 있다(만약 마우스 서열을 이용하고자 하는 경우 M86672 에 기재된 서열 중 CDS 서열 참조). 또한, 본 발명의 일 실시예에서 사용된 서열번호 1 또는 서열번호 4의 서열일 수 있다(마우스의 경우 서열번호 7의 서열).
- [48] 본 발명에 이용될 수 있는 “IL-12B 서브유닛(p40 서브유닛)”의 아미노산 서열은 GenBank Accession No. AAD56386에 기재된 것 일 수 있다(만약, 마우스 p40 아미노산 서열을 발현하고자 하는 경우에는, GenBank Accession No. AAA39296). 또한, 상기 IL-12A 서브유닛을 코딩하는 서열로서 IL-12A(p35) 유전자는 GenBank Accession No. AF18056에 기재된 서열 중 CDS(coding sequence)에 해당하는 뉴클레오타이드 서열 일 수 있다(만약, 마우스 서열을 이용하고자 하는 경우 Accession No.M86671 에 기재된 서열 중 CDS 서열 참조). 또한, 본 발명의 일 실시예에서 사용된 서열번호 2 또는 서열번호 5의 서열일 수 있다(마우스의 경우 서열번호 8의 서열).
- [49] 본 발명은 일 실시예에서, 서열번호 3 또는 서열번호 6의 IL-12 유전자를

이용해서 종양 세포에서 IL-12가 발현될 수 있고(마우스의 경우 서열번호 9), 특히 c-met에 대한 RNA와 동시에 발현시키는 경우, IL-12의 발현량이 현저히 증가하는 것을 확인하였다.

- [50] 본 발명의 명세서에서 용어 'c-met'은 티로신 키나아제 수용체 패밀리(tyrosine kinase receptor family)의 하나로, 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor/scatter factor, HGF/SF)의 수용체로 작용하며, 다양한 암에서 과 발현되고, c-met의 과발현이 나타난 환자들은 암의 치료 예후가 나쁜 경우가 대부분이다. 본 발명의 C-met의 유전자는 GenBank Accession No gi: 4557746에 기재된 mRNA의 서열 중 CDS(coding sequence)에 해당하는 뉴클레오타이드 서열 일 수 있다(만약, 마우스 서열을 이용하고자 하는 경우 Accession No. gi: 146198695에 기재된 서열 중 CDS 서열 참조).
- [51] c-met의 과발현은 HGF/SF-Met 신호전달체계로 인해 세포분열(mitogenesis)과 세포의 운동성(motility)을 증가시키고, 세포외 기질로 침윤과 전이를 유도하여 암의 악성도를 증가시킨다. 따라서, 암의 치료에 있어, c-met의 발현 억제는 매우 중요한 문제이다. 본 발명은 c-met의 mRNA에 상보적이며, c-met의 발현을 억제하는 올리고뉴클레오타이드를 이용해서 c-met의 발현을 억제하며, 특히, IL-12과 동시발현을 통해서 c-met의 발현 억제가 단독 억제군과 비교해서 현저히 향상될 수 있음을 확인하였다.
- [52] 일 예로, 본 발명에 이용될 수 있는 억제 표적이 되는 c-met의 mRNA는 서열번호 10에 기재된 서열일 수 있다(마우스의 경우 서열번호 11).
- [53] 상기 c-met 유전자에 결합하여 c-met의 발현을 억제하는 올리고뉴클레오타이드는 shRNA, miRNA, siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임(ribozyme), DNAzyme, TFOs(triplex forming oligonucleotides), PNA(peptide nucleic acids), 및 CRISPR용 가이드 RNA 로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [54] c-met의 발현을 억제하는 올리고뉴클레오타이드 서열은 서열번호 10의 c-met mRNA 서열의 일부와 동일하거나 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게는 서열번호 10의 서열에서 4개 이상의 연속하는 뉴클레오타이드의 서열과 동일하거나 이에 상보적인 서열을 포함할 수 있다.
- [55] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 올리고뉴클레오타이드로서 c-met의 mRNA에 상보적인 서열을 포함하며, 이의 발현을 억제할 수 있는 shRNA를 이용해서, 종양세포에서 c-met의 발현을 효과적으로 억제시킬 수 있음을 확인하였다.
- [56] 본 발명에서 "shRNA(small hairpin RNA or short hairpin RNA)"는 헤어핀 구조를 가지는 인공 RNA 분자로서, RNA 간섭(RNA interference)을 통하여 타겟 유전자의 발현을 억제하는데 사용된다. shRNA는 주로 플라스미드, 박테리아 또는 바이러스 벡터를 통하여 세포 내로 운반된다. shRNA는 분해 및 전환(turnover) 비율이 비교적 낮다는 이점이 있다.
- [57] 본 발명의 일 실시예에서, c-met의 발현을 억제하는 shRNA로서 서열번호

12(인간) 또는 서열번호 14(마우스)의 유전자에 의해 코딩되는 shRNA인 "Hshc-met(서열번호 13의 서열을 표적으로 함)" 또는 "shc-met(서열번호 15의 서열을 표적으로 함)"를 이용하여, 본 발명의 바이러스 시스템에 의해서 c-met의 발현이 효과적으로 억제됨을 확인하였다.

- [58] 상기 c-met 유전자에 결합하여 c-met의 발현을 억제하는 올리고뉴클레오티드는 CRISPR용 가이드 RNA 일 수 있다. 이 경우, 본 발명의 유전자 전달체는 CRISPR-CAS 시스템을 발현하는 경우, Cas 단백질을 발현하는 서열을 더 포함할 수 있다.
- [59] 본 발명에서 "CRISPR-CAS 시스템"은 표적 DNA 상에 존재하는 특정 염기서열을 인식하여, DNA를 절단하는 제한효소로 DNA를 절단하여 유전자를 교정하는 기술을 의미한다. 본 발명에서는 아데노바이러스 시스템 내에 표적 유전자 C-met에 대한 가이드 RNA를 발현하는 서열을 삽입하여 발현된 가이드 RNA가 표적 C-met에 혼성화 결합하면, Cas 단백질을 이용해서 표적 부위를 절단하여 C-met의 발현을 억제할 수 있는 시스템을 의미한다.
- [60] 별도의 언급이 없는 한, 상기 CRISPR-CAS 시스템을 구축하는 방법, CRISPR-CAS 시스템에 사용되는 제한효소 단백질의 종류 등은 본 발명의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 기술을 이용할 수 있다.
- [61] 본 발명에서 사용되는 Cas 단백질은 Cas9 또는 Cas12 단백질일 수 있다. 본 발명에서 사용되는 Cas9 또는 Cas12(Cas12a 또는 Cpf1으로도 표기) 단백질은 본 발명의 기술분야에서 CRISPR/Cas 시스템을 구현하기 위해 통상적으로 사용되는 Cas 단백질이라면 제한되지 않고 사용될 수 있다. 또한, 상기 Cas9 또는 Cas12 단백질의 구체적인 종류는 일 예로 다음 표 1에 나타낸 바와 같으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 표 1에 기재된 참고문헌은 전체로서 본 발명의 명세서에 포함된다.

[표1]

종류	PAM	크기	절단 유형	유래
SpCas9	5'-NGG	4.2kb	뚝뚝한(Blunt)	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SaCas9	5'-NNGRRT	3.15Kb	뚝뚝한(Blunt)	<i>Staphylococcus aureus</i>
CjCas9	5'-NNNNRYA C	2.95Kb	뚝뚝한(Blunt)	-
Cas12a(t ype-V Cpf1)	5'-TTTV	3.9kb	엇갈린 형태(Staggered)	<i>Lachnospiraceae</i> bacterium (LbCpf1); <i>Acidaminococcus</i> sp. (AsCpf1); <i>Francisella</i> <i>novicida</i> (FnCpf1); <i>Moraxella bovoculi</i> 237 (MbCpf1)
R = purine, Y = pyrimidine. V = Not U/T (A or C or G)참고:Christine et al., <i>Viral Delivery Systems for CRISPR</i> , Viruses 2019, 11, 28				

- [62] 상기 Cpf1은 CRISPR/Cas 시스템의 한 종류로 Class2 Type5 CRISPR/Cas 시스템으로 분류된다. Cpf1은 Cas9과 같이 단일 서브유닛 이펙터 모듈(single subunit effector module)로 작동하지만 기능적으로도 약간의 차이가 있어서 Cas9이 유전자를 잘라내기 위해서는 tracrRNA를 필요로 하는데 반해, Cpf1은 tracrRNA를 필요하지 않는다. Cas9의 경우 구아닌(Guanine)이 많은 PAM(protospacer-adjacent motif)이 있는 부위의 유전자를 잘라내는 반면, Cpf1은 티민(Thymine)이 많은 부위를 효율적으로 절단할 수 있다. 또한, Cpf1은 유전자를 잘라낼 때 4 내지 5개 뉴클레오타이드 오버행(overhang)을 발생시키는 특징을 가지고 있다. 이러한 여러 가지 특징들과 구조적인 차이 덕분에 Cpf1은 Cas9 보다 작동 효율은 다소 낮아도 더 높은 정확도를 나타낸다.
- [63] 본 발명의 CRISPR-CAS 시스템 발현을 위한 프로모터는 본 발명 기술분야에서 CRISPR/Cas 시스템에 사용되는 것이라면 제한되지 않고 사용될 수 있다. 일 예로, 타입 III 클래스의 RNA 중합효소 III 프로모터를 사용할 수 있다. 또는, U6 프로모터를 사용할 수 있는데, 이 경우 일반적으로 사용되는 U6 프로모터는 전사를 개시하기 위해 구아노신 뉴클레오타이드를 필요로 하기 때문에, U6 프로모터의 사용은 게놈 표적화 부위를 GN₁₉NGG로 추가로 제한할 수 있다(Mali et al.(2013) Science 339:823-826; Ding et al.(2013) Cell Stem Cell 12:393-394). T7, T3 또는 SP6 프로모터 또한 본 발명의 벡터시스템에서 이용될 수 있다(Adhya et al.(1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:147-151; Melton et al.(1984) Nucleic Acids Res. 12:7035-7056; Pleiss et al.(1998) RNA 4:1313-1317).
- [64] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 올리고뉴클레오타이드로서 서열번호 10의 인간

c-met의 mRNA에서 55번째 내지 77번째 뉴클레오티드를 표적 서열(서열번호 17)로 하여, 이에 상보적으로 혼성화될 수 있는 CRISPR용 가이드 RNA를 발현하는 서열번호 16의 유전자와 Lbcpf1을 발현하는 서열번호 18의 유전자가 삽입된 아데노바이러스 시스템을 이용하여, crRNA-LbCpf1의 CRISPR-CAS 시스템을 통해 c-met의 발현을 효과적으로 저해할 수 있음을 확인하였다.

- [66] 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명의 도 13에 나타난 바와 같이, LbCpf1를 발현하는 유전자 서열을 포함하는 재조합 아데노바이러스 벡터를 이용해서 CRISPR-CAS 시스템을 발현 시켰다.
- [67] 본 발명에서 용어 “상보적”은 100% 상보적인 경우뿐만 아니라, RNA 방해(interference) 기전을 통해 c-met 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 기재된다.
- [68] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 아데노 바이러스에 포함되는 shRNA 서열은 서열번호 10의 일부 서열에 상보적인 서열을 포함하며, 바람직하게는 서열번호 10의 c-met mRNA 서열 중 1987 번째 뉴클레오타이드 내지 2007 번째 뉴클레오타이드의 서열에 상보적인 서열을 포함한다.
- [69] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 c-met의 발현을 억제할 수 있는 올리고뉴클레오티드로서 shRNA는 서열번호 12 또는 서열번호 16의 유전자에 의해 코딩된 것 일 수 있다(마우스의 경우 서열번호 14의 유전자).
- [70] 본 발명에서 사용하는 '유전자 또는 유전자 서열'은 본 발명에서 제시하는 서열번호의 각 서열에 대하여 실질적인 동일성(substantial identity) 또는 실질적인 유사성(substantial similarity)을 나타내는 유전자 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인 된 서열을 분석한 경우에, 70% 이상의 상동성, 바람직하게는 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 상기의 실질적인 유사성은, 하나 이상의 염기의 결손 또는 삽입과 같은 IL-12 유전자 서열의 변화가 재조합 벡터 시스템과의 상동성 재조합을 최소화하는 본 발명의 목적에 영향을 미치지 않는 변화를 총칭한다. 따라서, 본 발명의 IL-12 유전자 서열은 예시된 서열목록의 서열 에 한정되지 않으며, 본 발명이 목적하는 최종 생성물의 활성에 실질적으로 영향을 주지 않는 한 본 발명의 권리범위에 포함된다고 해석된다.
- [71] 본 발명의 아데노 바이러스 시스템은 아데노 바이러스의 게놈 골격을 이용하여 암의 치료를 달성할 수 있다. 아데노 바이러스는 중간 정도의 게놈 크기, 조작의 편의성, 높은 타이터, 광범위한 타겟세포 및 우수한 감염성 때문에 유전자

전달체로 많이 사용되고 있다. 게놈의 양 말단은 100 내지 200bp의 ITP(inverted terminal receptor)를 포함하여, 이는 DNA 복제 및 패키징에 필수적인 구성이다. 게놈의 E1 영역(E1A 및 E1B)은 전사 및 숙주 세포 유전자의 전사를 조절하는 단백질을 코딩한다. E2 영역(E2A 및 E2B)은 바이로스 DNA 복제에 관여하는 단백질을 코딩한다. 아데노 바이러스 게놈의 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)) 아데노 바이러스는 외래의 DNA 분자를 운반하는 능력을 갖는다.

- [72] 본 발명의 아데노 바이러스 시스템의 게놈은 E1 영역 및 E3 영역이 결실된 것일 수 있다. 구체적으로 본 발명의 아데노 바이러스 시스템은 E1A 유전자 및 비활성화된 E1B 19 유전자, 비활성화된 E1B 55 유전자 또는 비활성화된 E1B 19 및 E1B 55 유전자를 포함할 수 있다.
- [73] 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. 예컨대, 비활성화 E1B 19 유전자는 그 유전자에 변이(치환, 부가, 부분적 결실 또는 전체적 결실)가 발생되어 활성의 E1B 19kDa 단백질을 생성하지 못하는 것이다. E1B 19가 결실되는 경우에는 세포 고사능을 증가시킬 수 있고, E1B 55 유전자가 결실된 경우에는 종양세포 특이성을 갖게 한다(참조: 특허출원 제2002-23760호). 본 명세서에서 유전자 또는 서열과 관련하여 사용되는 용어, “결실”은 해당 서열이 완전히 결실된 것뿐만 아니라, 부분적으로 결실된 것도 포함하는 의미를 가진다.
- [74] 본 발명의 재조합 아데노 바이러스는 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 것일 수 있다.
- [75] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 재조합 아데노 바이러스는 E1A 부위를 포함하고, E1B 19kDa이 결실되어 있으며, E3 부위(Δ E3)가 결실된 것일 수 있다. E1A 유전자를 포함하는 재조합 아데노 바이러스는 복제 가능한 특성을 갖게 된다. 상기 IL-12 유전자 및 c-met 발현 억제 올리고뉴클레오타이드는 각각 아데노 바이러스의 결실된 E1 및 E3 부위에 삽입될 수 있다.
- [76] 본 발명의 아데노 바이러스 시스템은 아데노 바이러스 또는 이의 viral DNA의 세포 내 전달 능력을 높이거나, 세포 내 전달되어 잔존 시간 등을 늘리기 위해서 생체 적합성 고분자를 더 포함할 수 있다. 구체적으로는, 상기 생체 적합성 고분자가 아데노 바이러스 또는 아데노 바이러스 플라스미드 DNA와 결합된 형태로 본 발명의 시스템에 포함될 수 있다.
- [77] 상기 생체 적합성 고분자는 본 발명의 기술분야에서 유전자의 전달을 위한 벡터 시스템에 사용될 수 있는 것이라면 모두 포함될 수 있다.

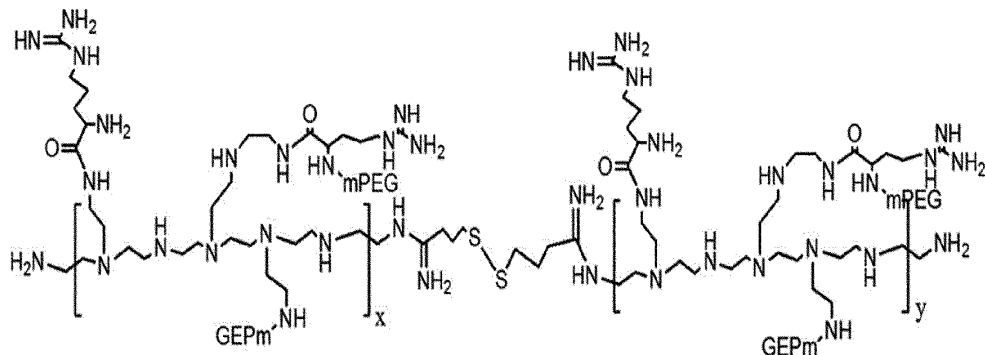
- [78] 일 예로, 본 발명의 생체 적합성 고분자는 (a) 면역반응 회피성 부위(escapable portion from immune reaction), (b) 전하성 부위(chargeable portion) 및 (c) 이황화 결합을 포함하는 생환원성 부위(bioreducible portion)를 포함하는 pH 민감성 및 생환원성 고분자 일 수 있다.
- [79] 상기 (a) 면역반응 회피성 부위는 폴리머가 결합하는 바이러스가 생체 내 면역반응(세포성 면역반응 및 체액성 면역 반응 포함)을 회피할 수 있도록 하는 작용을 한다. 상기 면역반응 회피성 부위에 이용될 수 있는 물질은, 구체적으로 생체 내 면역반응(세포성 면역반응 및 체액성 면역반응 포함)을 회피할 수 있는 폴리머이고, 보다 구체적으로 PEG(polyethylene glycol), 폴리알킬렌 옥사이드(예를들어, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌 또는 이들의 공중합체(폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드-폴리에틸렌옥사이드 공중합체)), 폴리페닐렌옥사이드, PEG와 폴리알킬렌 옥사이드의 공중합체, 폴리(메톡시에틸 메타크릴레이트), 폴리(메타크릴로일 포스파티딜콜린), 과불화된 폴리에테르, 텍스트란 또는 폴리비닐피롤리돈이고, 보다 구체적으로, PEG, 폴리알킬렌옥사이드 또는 PEG와 폴리알킬렌 옥사이드의 공중합체이며, 보다 더 구체적으로 PEG일 수 있다.
- [80] 상기 (b) 전하성 부위(chargeable portion)는 생체 내 pH, 구체적으로 중성 pH 부근에서 상기 고분자에 양전하를 부여하여 음전하성의 바이러스의 표면 또는 DNA와 상호작용에 의해 결합할 수 있도록 할 수 있다. 또는, 바이러스 표면 또는 DNA의 전하성에 따라 상기와 반대로 음전하성을 고분자에 부여할 수도 있다. 따라서, 전하성 부위는 상기 고분자에 양전하 또는 음전하를 부여하는 물질을 포함하며, 예를 들어 음전하를 부여하는 경우에는 카복실레이트기, 양전하를 부여하는 경우에는 3차 아민기 또는 아미노기를 갖는 단량체가 전하성 부에 이용될 수 있다.
- [81] 상기 (c) 이황화 결합을 포함하는 생환원성 부위(bioreducible portion)는 이황화결합을 포함하는 형태라면 단량체의 종류에 제한되지 않고 본 발명에 포함될 수 있다. 상기 생환원성 부위는 생체 내 산성 환경하에서 환원되어 이황화 결합이 설피히드릴기로 전환되고 이에 따라 폴리머 구조의 파쇄가 이루어져, 결국 폴리머-바이러스 복합체 또는 폴리머-DNA 복합체로부터 결합되어 있는 바이러스(naked virus) 또는 DNA가 방출되도록 한다.
- [82] 또 다른 예로, 본 발명의 생체 적합성 고분자는 폴리머, 나노물질, 덴드리머, 하이드로젤을 모두 포함할 수 있다. 바람직하게는 PAPS (PEI-Arg-mPEG-S-S-mPEG-Arg-PEI), PPSA(mPEG-PEI-g-Arg-S-S-Arg-g-PEI-mPEG), PICION(폐길화되고 산화철 나노입자와 가교결합된 카테콜-그래프트된 폴리 L 라이신(PLL)), ABP(아르기닌 그래프트된 생분해성 고분자), APP(폐길화되고 PTX-컨쥬게이트된 폴리머형 마이셀; PEGylated and PTX-conjugated polymeric micelle), PPCBA(mPEG-b-Pip-CBA), PPA(PPCBA-PEI-Arginine),

폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG), 폴리락타이드(poly-lactide, PLA), 폴리글리콜리드(polyglycolide, PGA), 폴리락티드코글리콜리드(poly-lactide-co-glycolide, PLGA), 폴리카프로락톤(poly-ε-caprolactone, PCL), 폴리에틸렌아민(polyethyleneamine, PEI), 히알루론산(hyaluronic acid, HA), 젤라틴, 키토산(chitosan), 및 혈청 알부민으로 이루어진 군에서 선택된 것 일 수 있다.

[83] 상기 PAPS 고분자는 PEI-Arg-mPEG-S-S-mPEG-Arg-PEI로, 다음 구조식 1의 구조를 갖는 고분자 일 수 있다.

[84] [구조식 1]

[85]

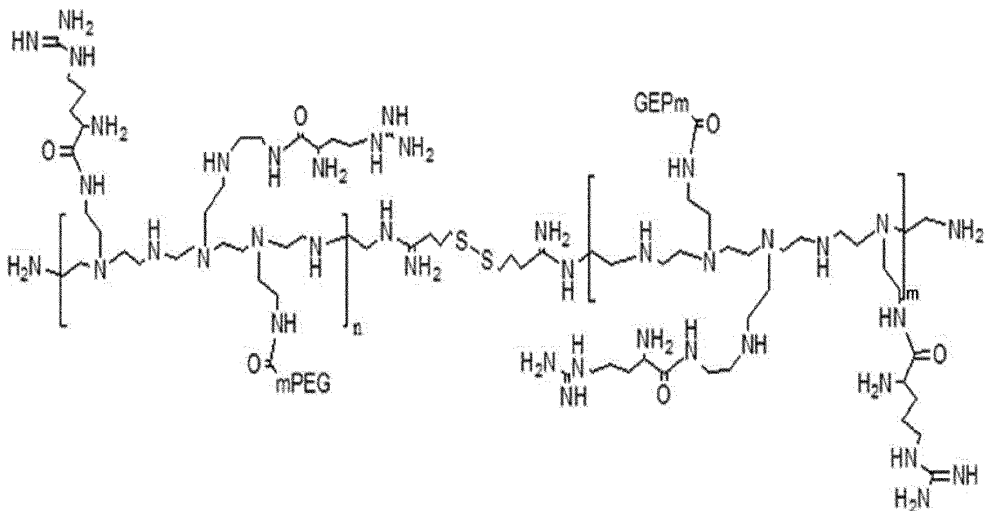


[86] 상기 구조식 1에서 x와 y는 각각 독립적으로 1 내지 500의 정수일 수 있다.

[87] 상기 PPSA 고분자는 mPEG-PEI-g-Arg-S-S-Arg-g-PEI-mPEG로, 다음 구조식 2의 구조를 갖는 고분자일 수 있다.

[88] [구조식 2]

[89]



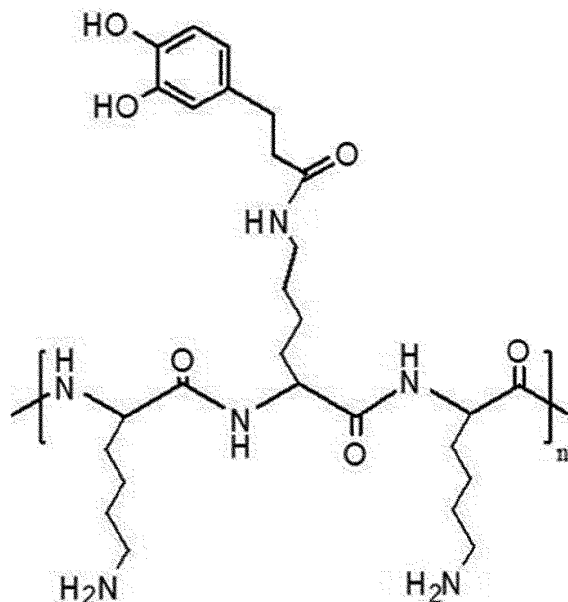
[90] 상기 구조식 2에서 n과 m은 각각 독립적으로 1 내지 500의 정수일 수 있다.

[91] 상기 PICION은 폐길화되고 산화철 나노입자와 가교결합된 카테콜-그래프트된

폴리 L 라이신(PLL)으로, 다음 구조식 3의 카테콜-그래프트된 폴리 L 라이신이 산화철 입자와 가교결합되고, 그 표면에 mPEG가 개질된 구조를 갖는 것 일 수 있다.

[92] [구조식 3]

[93]

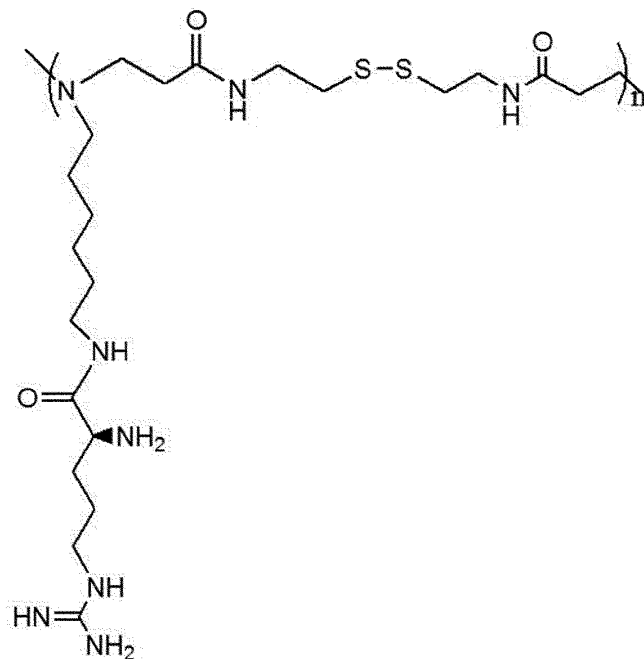


[94] 상기 구조식 3에서 n 은 1 내지 500의 정수일 수 있다.

[95] 상기 ABP 고분자는 아르기닌 그래프트된 생분해성 고분자(Arginine grafted bio-reducible polymer)로 다음 구조식 4의 구조를 갖는 고분자 일 수 있다.

[96] [구조식 4]

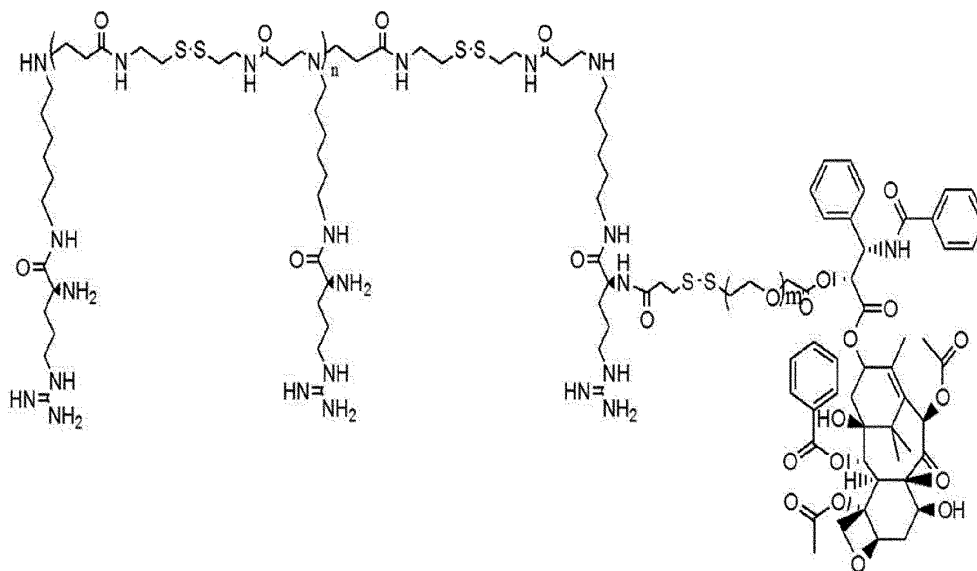
[97]

[98] 상기 구조식 4에서 n 은 1 내지 500의 정수일 수 있다.

[99] 상기 APP는 폐길화되고 PTX-컨쥬게이트된 폴리머형 마이셀(PEGylated and PTX-conjugated polymeric micelle)을 의미하는 것으로, 다음 구조식 5의 구조를 가질 수 있다.

[100] [구조식 5]

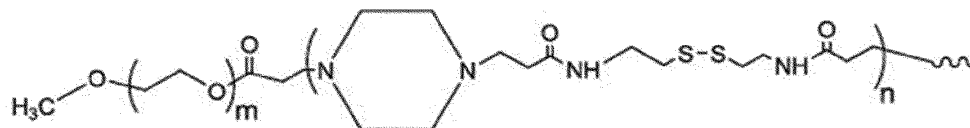
[101]

[102] 상기 구조식 5에서 n 과 m 은 각각 독립적으로 1 내지 500의 정수일 수 있다.

[103] 상기 PPCBA 고분자는 mPEG-b-Pip-CBA로, pH 민감성 및 생분해성 고분자에 속하며, 다음 구조식 6의 구조를 갖는 것 일 수 있다.

[104] [구조식 6]

[105]

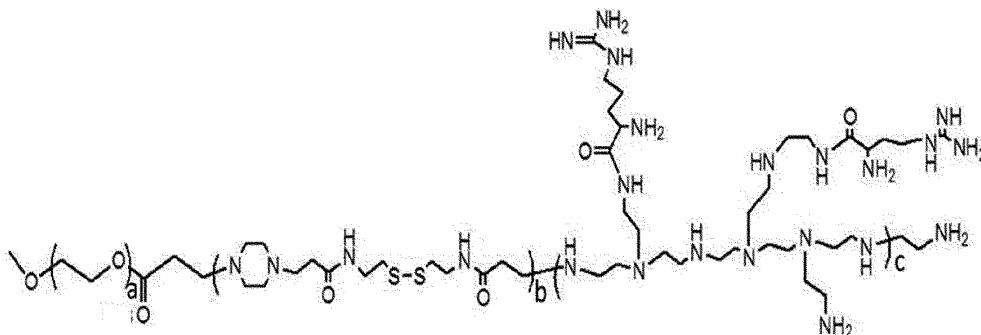


[106] 상기 구조식 6에서 n과 m은 각각 독립적으로 1 내지 500의 정수 일 수 있다.

[107] 상기 PPA는 PPCBA-PEI-Arginine으로 pH 민감성 및 생분해성 고분자에 속하며, 상기 PPCBA에 PEI와 아르기닌이 더 결합된 형태의 고분자 일 수 있다. 다음 구조식 7의 구조를 질 수 있다.

[108] [구조식 7]

[109]



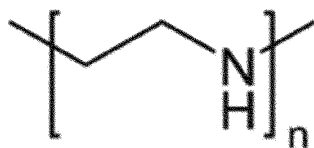
[110] 상기 구조식 7에서 a, b 및 c는 각각 독립적으로 1 내지 500의 정수 일 수 있다. 일 예로, a는 100 내지 200, b는 1 내지 10, 그리고 c는 1 내지 5의 고분자, 또는 a는 113, b는 6 그리고 c는 1인 고분자 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[111] 폴리에틸렌아민(polyethyleneamine, PEI)은 구조식 8의 단량체가 결합된 선형 또는 분지형의 폴리에틸렌아민을 모두 포함할 수 있다.

[112]

[113] [구조식 8]

[114]

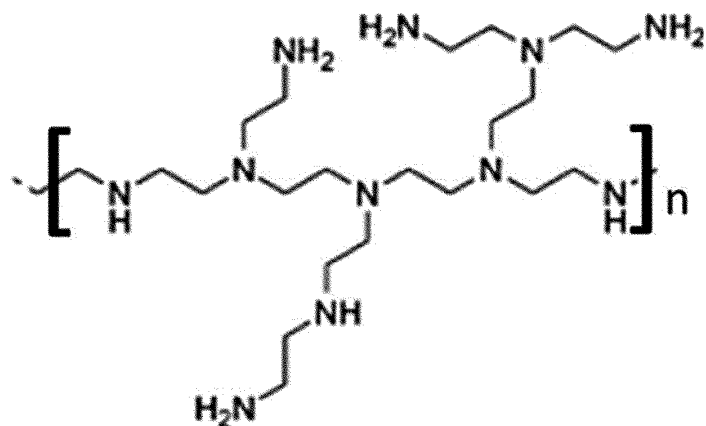


[115] 상기 구조식 8에서 n은 1 내지 500의 정수 일 수 있다.

[116] 상기 분지형 폴리에틸렌아민은 일반적인 분지형 폴리에틸렌아민 외에 분자의 사슬이 일정한 규칙에 따라 중심에서 바깥 방향으로 규칙적으로 3차원으로 퍼진 형태의 덴드리머도 포함할 수 있다.

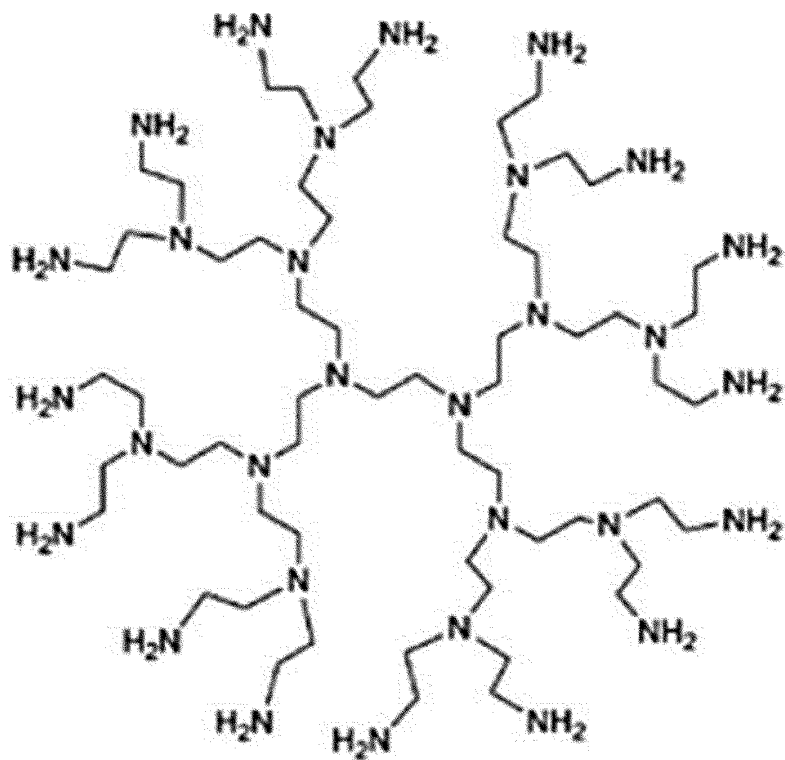
[117] [구조식 9]

[118]



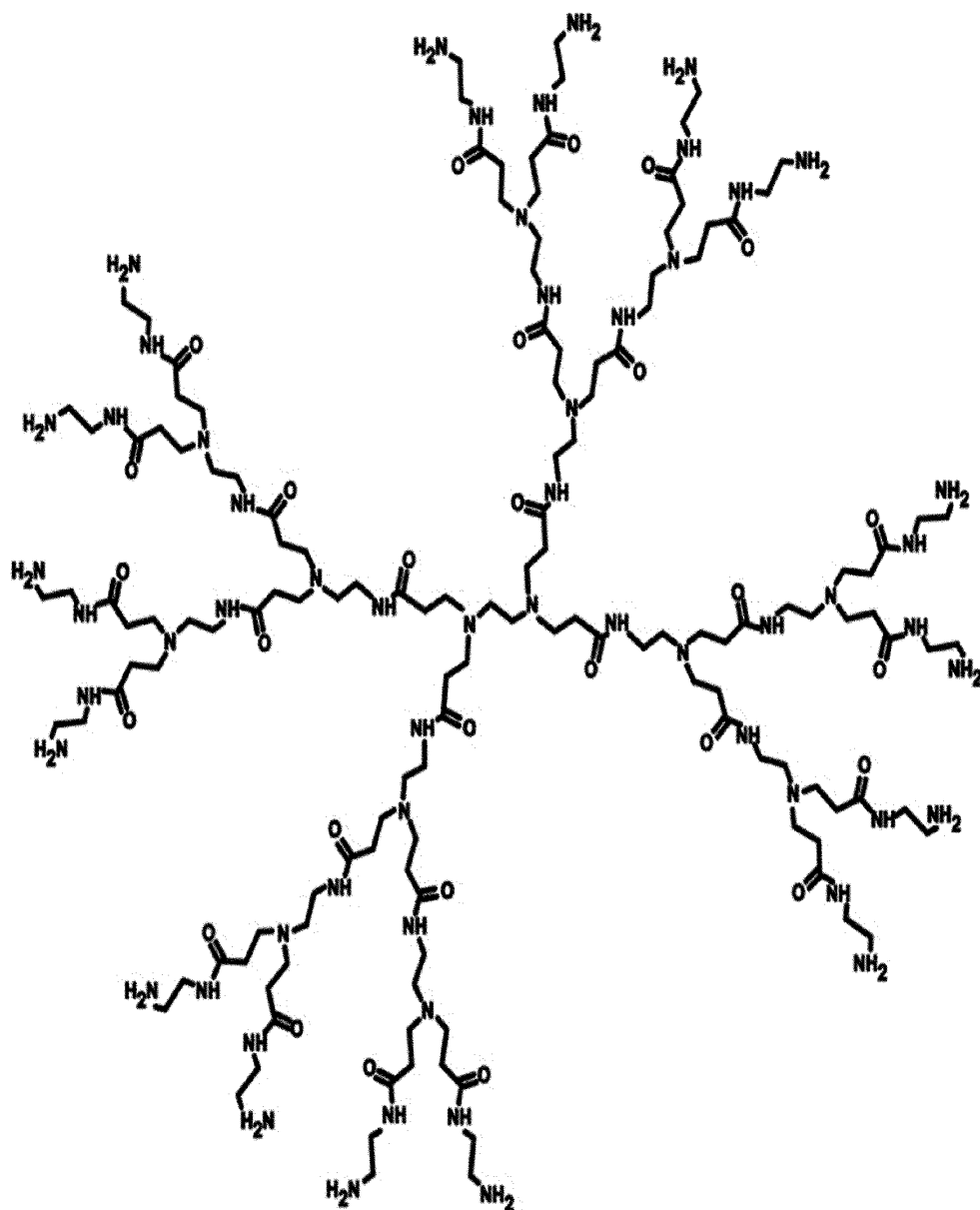
- [119] 구조식 9는 분지형 폴리에틸렌아민의 일 예를 나타내며 n은 1 내지 500의 정수일 수 있다.
- [120] 본 발명의 생분해성 고분자는 에틸렌아민을 단량체로하는 구조식 8의 고분자의 일 예로 덴드리머 고분자도 포함한다. 일 예로, 덴드리머 형태의 분지형 폴리에틸렌아민은 구조식 10 또는 구조식 11의 고분자 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구조식 11의 고분자는 폴리(아미도아민) 고분자로, PAMAM 으로도 지칭될 수 있다.
- [121] [구조식 10]

[122]



[123] [구조식 11]

[124]



[125] 상기 생체 적합성 고분자는 본 발명의 재조합 아데노 바이러스 또는 바이러스 DNA와 결합하여 세포 내로 유입되는 효율을 높여주고, 개체 내 안정성을 높이고 면역원성을 낮춰 목적부위로 바이러스 또는 바이러스 DNA의 전달효율을 향상시켜, 본 발명 아데노 바이러스 또는 바이러스 DNA에 의한 암의 치료 효과를 현저히 상승시킬 수 있다.

[126] 상기 생체 적합성 고분자와 아데노 바이러스 시스템은 정전기적 인력(electrostatic interaction), 이온성 상호작용 또는 화학적 결합으로 연결될 수 있다.

[127]

[128] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 인터류킨-12(IL-12)를 코딩하는 핵산 서열; 및 c-met 유전자에 상보적으로 결합하여 c-met의 발현을 억제하는 올리고뉴클레오티드를 발현하는 핵산 서열을 포함하는 유전자 전달체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 항암용 조성물, 암세포의 항전이용 조성물, 또는 항종양 면역성(antitumor immunity) 증진용 조성물 일 수 있다.

[129] 상기 조성물은 본 발명의 아데노 바이러스 시스템을 치료학적 유효량으로 포함할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체(carrier)를 더 포함할 수 있다.

[130] 상기 항암용 조성물은 종양세포의 생존, 증식 및/또는 전이를 억제하여 암세포가 증가하지 못하게 하거나, 암세포의 사멸을 유도 또는 촉진시키는 것을 의미한다. 본 발명의 제조합 아데노바이러스 시스템 또는 이를 포함하는 조성물은 암세포의 사멸을 효과적으로 유도하고, 전이를 억제할 수 있다.

[131] 상기 암세포의 항전이용 조성물은 암세포가 이동을 통해서 전이되는 것을 억제하는 효과를 가지며, 예를 들어 암세포에서 EMT를 저해하여 전이를 억제하는 효과로 확인할 수 있다. 본 발명의 항전이용 조성물은 암세포의 살상을 통한 항암효과와 암세포의 전이 억제 효과를 동시에 가질 수 있다.

[132] 상기 항종양 면역성 증진용 조성물은 종양 조직에서 생산되는 면역 억제분자를 이용한 종양의 면역감시 회피를 극복하여 암을 치료할 수 있는 것으로, 항암용 조성물에 포함되는 의미일 수 있다. 특히, 항종양 면역성 조성물은 종양 조직에서 면역세포의 불균형을 정상화하고, IL-12에 의해서 T helper 세포의 분화르르 유도하여 세포독성 T 림프구 및 자연살상 세포의 세포 독성을 활성화시킴으로써 항암면역을 증진시킬 수 있는 것을 의미한다.

[133] 본 발명의 약학적 조성물은 IL-12을 발현하여 암 개체 내에서 항암면역을 증진시킨다. 또한 C-met에 대한 shRNA를 통해서 C-met의 발현을 억제시켜 IL-12의 기능을 더욱 증폭시킬 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 인간 유래 암세포를 주입한 마우스 모델에서도 본 발명의 IL-12와 shc-met 동시발현 아데노바이러스를 주입한 경우 현저한 항암효과 및 종양의 전이 효과가 나타남을 확인하였다.

[134] 또한, 상기 조성물은 표준치료(standard therapy)의 치료효과 증진을 위한 보조치료용 조성물 일 수 있고, 다른 항암제, 면역관문 억제제, 면역치료제 등을 포함하는 표준 치료제의 효과를 개선 또는 향상시키기 위한 보조 치료용 조성물 일 수 있다.

[135] 본 발명의 항암 조성물은 상술한 항종양 면역성 증진 조성물에 포함되는 제조합 아데노 바이러스를 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[136] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 암은 위암, 폐암, 비소세포성 폐암, 유방암,

난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 골암, 비소세포성 골암, 혈액암, 피부암(흑색종 등), 두부 또는 경부암, 자궁암, 직장암, 항문 부근암, 결장암, 나팔관암, 자궁내막암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 배수성암(polyploid carcinoma), 침샘암, 육종암, 가성점액종, 간모세포종, 고환암, 교모세포종, 구순암, 난소생식세포종양, 기저세포암, 다발성골수종, 담낭암, 맥락막흑색종, 바터팽대부암, 복막암, 부신암, 설암, 소세포암, 소아림프종, 신경모세포종, 십이지장암, 요관암, 성상세포종, 수막종, 신우암, 외음부암, 흉선암, 중추신경계(central nervous system, CNS) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 여기에 한정되는 것은 아니다.

- [137] 상술한 본 발명의 모든 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명에 사용되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 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, 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.
- [138] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 종양 내(intratumorally) 주입, 정맥내 주입, 피내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 척수내 주입, 심장내 주입, 흉곽내 주입, 동맥내 주입, 골내 주입, 관절강내 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 비경구 투여이다.
- [139] 또한, 상기 조성물은, 국소 투여, 또는 전신투여용 일 수 있다.
- [140] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 항종양 면역성 증진 조성물은 바람직하게는 종양 내에(intratumorally) 직접 투여되어, 항종양 면역 증진 효과를 가짐을 확인하였다.
- [141] 본 발명의 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 예컨대 0.2-1000 mg/kg 이다. 그러나, 유효 성분의 실제 투여량은 분화 및 증식하고자 하는 대상조직 세포의 양, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등

여러 관련 인자를 고려하여 결정할 수 있으며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 형태로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[142]

[143] 본 발명의 또 다른 양태에 따라, 본 발명은 인터류킨-12(IL-12)를 코딩하는 유전자 및 c-met 유전자에 상보적으로 결합하여 c-met의 발현을 억제하는 올리고뉴클레오티드를 발현하는 유전자를 포함하는 유전자 전달체의 항암제로서의 용도를 제공한다. 본 발명의 유전자 전달체는 IL-12와 c-met을 억제하는 RNA를 동시에 발현함으로써 IL-12에 의한 항종양 면역 효과를 더 향상시키면서, 종양의 전이도 억제할 수 있다. 항암제로서의 본 발명의 유전자 전달체의 용도에 대해서는 중복된 기재를 피하기 위해 앞의 유전자 전달체 또는 약학적 조성물에 대한 내용을 준용한다.

[144] 본 발명의 또 다른 양태에 따라, 본 발명은 인터류킨-12(IL-12)를 코딩하는 유전자 및 c-met 유전자에 상보적으로 결합하여 c-met의 발현을 억제하는 올리고뉴클레오티드를 발현하는 유전자를 포함하는 유전자 전달체 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[145]

[146] 본 발명의 유전자 전달체는 IL-12와 c-met을 억제하는 RNA를 동시에 발현함으로써 IL-12에 의한 항종양 면역 효과를 더 향상시키면서, 종양의 전이도 억제할 수 있어, 암 치료에서 시너지 효과를 얻을 수 있다. 항암제로서의 본 발명의 치료방법에 대해서는 중복된 기재를 피하기 위해 앞의 유전자 전달체 또는 약학적 조성물에 대한 내용을 준용한다.

[147]

[148] 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.

[149]

[150] [실시예]

[151] 실험의 준비 및 재조합 벡터의 제조

[152] 준비예 1. 세포의 입수 및 배양

[153] 세포배양배지로서, 10% 소태아혈청(FBS; Gibco BRL), L-글루타민(2 mmol/L), 페니실린(100 IU/mL), 및 스트렙토마이신(50 mg/mL)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's 배지(DMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY), Roswell Park Memorial Institute medium(RPMI; Gibco BRL), 또는 Minimal Essential Medium(MEM; Gibco BRL)를 사용하였다. HEK293(아데노 바이러스 E1 부위를 발현, human embryonic kidney cell line), H1975(human non-small lung cancer cell line), 및 HaK(hamster kidney cancer cell line)는 ATCC(American Type Culture

Collection, Manassas, VA)에서 구입하였다. HaP-T1(hamster pancreatic carcinoma cell line)는 Dr. Masato Abei(University of Tsukuba, Ibaraki, Japan)로부터 분양 받았다. 모든 세포주는 37°C, 5% CO₂ 습윤환경 하에서 배양하였으며, Hoeschst 염료, 세포배양 및 PCR을 이용하여 마이코플라스마 음성테스트를 하였다. 대장균(*Escherichia coli*)은 37°C, Luria Bertani 배지에서 배양하였다.

[154]

[155] **제조예 1.** IL-12 및/또는 shc-met을 발현하는 종양살상(oncolytic) 아테노 바이러스 시스템 구축

[156] **제조예 1-1.** 인간 유래 IL-12 및 shc-met 발현하는 pDNA 구축

[157] Ad 벡터를 이용한 항종양 효과 및 항종양 면역반응을 확인하기 위하여, mT-Rd19-RGD를 기반으로 항종양 면역 유전자인 인간 인터류킨-12(hIL-12) 및/또는 암세포 성장과 분화에 중요한 역할을 수행하는 c-met의 발현을 억제하기 위한 c-met에 상보적으로 결합하는 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA, 이하, "shc-met"이라 함)를 발현하도록 재조합된 2가지 종양 살상(oncolytic) 아테노 바이러스의 플라스미드 DNA(Ad pDNA 또는 oAd pDNA라 함)를 제조하였다(도 1):(mT-Rd19-RGD 및 mT-Rd19-RGD/hIL-12/shc-met).

[158] [표2]

	oAd pDNA 구조	비고
실시예 1	mT-Rd19-RGD/hIL-12/shc-met(Pac I 사이트 2)	hIL-12 및 shc-met 동시발현, Pac I 사이트 2개
실시예 2	mT-Rd19-RGD/hIL-12/shc-met(Pac I 사이트 1)	hIL-12 및 shc-met 동시발현, Pac I 사이트 1개

[159] **제조예 1-2.** 마우스 유래 IL-12 및 shc-met 발현하는 폴리머-바이러스 DNA 복합체의 제조

[160] 또한, HE5cT-Rd19-RGD를 기반으로 마우스 유래의 IL-12 p35(서열번호 7)와 및 IL-12 p40(서열번호 8)을 발현하는 유전자를 삽입하였다. 또한, 서열번호 11의 마우스의 c-met 유전자에 대하여 4398번째 내지 4422번째 뉴클레오티드를 표적 서열(서열번호 15)로 하는 shRNA를 설계하였다. C-MET 유전자에 상보적으로 결합하여 유전자 발현을 억제할 수 있는 shc-met를 발현하는 서열번호 14의 뉴클레오티드 서열이 삽입된 HE5cT-Rd19-RGD/scIL-12/shc-met 플라스미드 DNA를 구축하였다. 이를 PPA(PPCBA-PEI-Arginine) 폴리머와 혼합해 결합시켜, pDNA/PPA 폴리머 복합체를 제조하였다.

[161]

[162] **제조예 2.** IL-12 및/또는 shc-met을 발현하는 재조합 종양살상(oncolytic) 아테노 바이러스의 구축

[163] IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아테노 바이러스에 의한 항종양 효과 및

항종양 면역반응을 확인하기 위하여, 항암 아데노 바이러스를 제작하였다(도 4, 제조합 아데노바이러스가 인간 유래의 서열을 포함하는 경우 HscIL-12, Hshc-met로 구분하여 표기):

- [164] HE5cT-Rd19-RGD: 발현 유전자를 포함하지 않는 Ad 벡터
- [165] HE5cT-Rd19-RGD/scIL-12: IL-12만 발현하는 Ad 벡터
- [166] HE5cT-Rd19-RGD/shc-met: C-Met 유전자에 대한 shRNA를 발현하는 Ad 벡터
- [167] HE5cT-Rd19-RGD/scIL-12/shc-met: IL-12 및 C-Met 유전자에 대한 shRNA를 발현하는 Ad 벡터
- [168] 보다 구체적으로, HE5cT-Rd19-RGD를 기반으로 인간 유래의 IL-12 p35(서열번호 1)와 및 IL-12 p40(서열번호 2)을 각각 발현하는 유전자를 삽입하였다. 또한, 서열번호 10의 인간 c-met의 mRNA에 대하여 1987번째 내지 2007번째 뉴클레오티드를 표적 서열(서열번호 13)로하는 shRNA를 발현하는 서열번호 12의 서열을 삽입하여 제조합 아데노바이러스 벡터를 제작하였다.
- [169] 또한, 상기와 동일한 방법으로 마우스 유래의 IL-12 p35(서열번호 8)와 및 IL-12 p40(서열번호 9)을 발현하는 유전자와 서열번호 11의 마우스 유래의 C-MET 유전자의 4398번째 내지 4422번째 뉴클레오티드를 표적 서열(서열번호 15)로하고, 이에 상보적으로 결합하여 유전자 발현을 억제할 수 있는 shc-met을 발현하는 서열(서열번호 14)을 삽입하여 IL-12와 shcmet 동시발현 아데노 바이러스 벡터를 각각 제조하였다.
- [170]
- [171] **제조예 3. 동물모델 구축**
- [172] 3-1. 인간 이종이식 폐암 종양 모델
- [173] 오리엔트로부터 구입한 누드마우스가 6-8 주령 일 때, 인간 폐암 세포주(H1975)를 3×10^6 cells/50 μ L로 누드 마우스의 피하에 주사한 후, 종양의 크기가 평균 100mm³이 되었을 때 제조예 1 또는 2의 항암 아데노바이러스를 투여하여, 효과를 확인하였다.
- [174]
- [175] 3-2. 마우스 종양 모델
- [176] C57BL6 (B16-F10 tumor model)은 대한바이오링크, BALB/C (CT26 tumor model)은 오리엔트에서 구입하여 실험을 수행하였다. 마우스 6-8 주령 일 때, 마우스 피부암 세포주(B16-F10) 또는 마우스 위암 세포주(CT26)를 5×10^5 cells/50 μ L로 마우스의 피하에 주사한 후, 종양의 크기가 평균 100 mm³이 되었을 때 제조예 1 또는 2의 항암 아데노바이러스를 투여하여, 효과를 확인하였다.
- [177]
- [178] **시험예 1. Ad pDNA에 의한 세포 내 mIL-12 및 hIL-12 발현 확인**
- [179] 제조예 1에 따라 제조된 Ad pDNA에 의한 인간 IL-12(hIL-12) 유전자 발현을 확인하고자, 세포 내 전달 효율이 좋은 인간 배아 신장 세포주인 293A에 mT-Rd19-RGD 및 mT-Rd19-RGD/hIL-12/shc-met Ad pDNA를

리포펙타민(lipofectamine)과 상온에서 반응시킨 후, 50% 분주 된 293A 세포에 처리 후 72시간째 세포 배양액을 수거하여 hIL-12 ELISA를 수행하였다.

- [180] 도 2에 나타낸 바와 같이, 실시예(mT-Rd19-RGD/hIL-12/shc-met Ad pDNA; Pac I 2개)에 의해 hIL-12이 $97,500 \pm 6,384$ pg/mL로 발현되었음을 확인하였다. 따라서, 본 실시예에서 제작된 Ad pDNA는 세포 내에서 치료유전자 인터류킨-12의 발현을 효율적으로 유도함을 확인할 수 있었다.

[181]

- [182] **시험예 2.** 아데노 바이러스(Ad) pDNA에 의한 세포 내 IL-12 및 c-met의 동시 발현 확인

- [183] 제조예 1에 따라 제조된 아데노 바이러스 pDNA의 세포 내 전달 효율을 고려하여, 293A 세포주에서 mT-Rd19-RGD/hIL-12/shc-met Ad pDNA에 의한 hIL-12의 발현을 확인하였으나, 정상 세포인 293A에서는 c-met이 과발현 되지 않기 때문에, c-met 특이적 shRNA 발현에 의한 c-met 발현 억제능을 확인하지 못하였다.

- [184] 따라서, 실시예 mT-Rd19-RGD/hIL-12/shc-met(Pac I 2개)에 의한 c-met의 발현 억제능을 검증하기 위하여, mT-Rd19-RGD/hIL-12/shc-met 아데노 바이러스(Ad)를 제조하여, 상기에서 제조한 mT-Rd19-RGD/hIL-12/shc-met 아데노 바이러스(Ad)를 6-well plate에 50% 분주 된 c-met이 과발현 되는 A549 인간 폐암 세포주에 바이러스를 $20\mu\text{L}$ 처리한 후 48시간 째 세포 배양액을 수거하여 감염시키고, 48 시간 후 세포 배양액을 수거하여 hIL-12와 c-met에 대한 ELISA를 수행하였다. 아무런 처리도 하지 않은 A549 인간 폐암 세포주에서 hIL-12와 c-met의 발현량을 대조군으로 사용하였다.

- [185] 도 3에 나타낸 바와 같이, mT-Rd19-RGD/hIL-12/shc-met Ad에 의해 hIL-12의 발현($235,000 \pm 20,518$ pg/mL)이 대조군(untreated) 대비 증가되었고, 대조군 대비 mT-Rd19-RGD/hIL-12/shc-met Ad 처리군에서 c-met의 발현이 1.2배 감소됨을 확인하였다. 따라서, 본 발명에서 제조된 Ad 시스템에 의해서 치료유전자인 IL-12와 shc-met의 발현이 효율적으로 유도됨을 알 수 있다.

[186]

- [187] **시험예 3.** IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노 바이러스의 생체 내 항종양 효과 확인(mouse syngeneic tumor model)

- [188] 제조예 2에 따라 제조된, 마우스 IL-12와 마우스 c-met 표적 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노 바이러스에 의한 항암치료 효과를 검증하기 위하여, 마우스 피부암 세포주인 B16-F10 또는 마우스 위암 세포주인 CT26을 이용하여 각각의 종양모델을 구축하고 항종양 효과를 확인하였다.

- [189] 마우스 피부암 세포주(B16-F10) 또는 마우스 위암 세포주(CT26)를 5×10^5 cells/ $50\mu\text{L}$ 로 마우스의 피하에 주사한 후, 종양의 크기가 평균 100mm^3 이 되었을 때 PBS 또는 HE5cT-Rd19-RGD/scIL-12/shc-met를 각각 투여하였다. 이틀 간격으로 총 3회 종양 내에 투여한 후(1×10^{10} VP), 종양의 크기를 측정하여

항종양 효과를 관찰하였다.

- [190] 도 5a 및 도 5b에 나타낸 바와 같이, 2 가지 마우스 종양 모델에서 PBS 투여군의 경우에는 종양이 급속도로 성장하였으나, HE5cT-Rd19-RGD/scIL-12/shc-met를 투여한 모든 개체에서 종양이 완전히 사라짐을 확인하였다.

[191]

- [192] 시험예 4. IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노 바이러스 pDNA/PPA 복합체의 생체 내 항종양 효과 확인(mouse syngeneic tumor model)

- [193] 제조예 1-2에 따라 제조된 HE5cT-Rd19-RGD/scIL-12/shc-met viral DNA)와 PPA 폴리머 복합체(pDNA/PPA)를 제조하여, 항암 치료 효과를 확인하였다.
구체적으로, 마우스 피부암 세포주인 B16-F10을 이용하여 종양모델을 구축하고 항종양 효과를 확인하였다. 마우스 피부암 세포주(B16-F10)를 5×10^5 cells/50 μ L로 마우스의 피하에 주사한 후, 종양의 크기가 평균 100mm³ 이 되었을 때 PBS와 HE5cT-Rd19-RGD/scIL-12/shc-met Ad pDNA/PPA 복합체를 각각 마우스 모델에 투여하였다. 매일 총 7회 종양 내에 투여한 후, 종양의 크기를 측정하여 항종양 효과를 관찰하였다.

- [194] 도 6에 나타낸 바와 같이, PBS 투여군의 경우에는 종양의 크기가 2514.7 ± 202.1 mm³까지 성장하였으나, 항암 바이러스의 pDNA/PPA 복합체를 투여한 그룹에서 모두 뚜렷한 항종양 효과를 확인할 수 있었다.
HE5cT-Rd19-RGD/scIL-12/shc-met Ad pDNA/PPA 복합체 투여군의 평균 종양 크기는 1387.6 ± 171.8 mm³로 PBS 투여군 대비 종양의 크기가 44.8% 감소됨을 확인하였고, 이는 IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 바이러스 DNA에 의해서도 향상된 항종양 효과가 유도됨을 의미한다.

[195]

- [196] 시험예 5. IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노 바이러스에 의한 세포 내 IL-12 및 shc-met 발현 확인(Human)

- [197] IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노 바이러스에 의한 human IL-12 또는 human c-Met 표적 shc-Met의 발현을 확인하고자, H1975 인간 폐암 세포주에 제조예 2에 따라 제조된 재조합 아데노 바이러스 HE5cT-Rd19-RGD, HE5cT-Rd19-RGD/shc-met, HE5cT-Rd19-RGD/hscIL-12 또는 HE5cT-Rd19-RGD/hscIL-12/shc-met를 각각 2 MOI(도 7b) 또는 5 MOI(도 7a)씩 처리하여 감염시켰다. 48시간 경과 후, 세포 및 배양액을 수거하여 human IL-12 ELISA와 c-Met 웨스턴블랏(western blot)을 수행하여 각 유전자의 발현을 확인하였다.

- [198] 도 7a에 나타낸 바와 같이, HE5cT-Rd19-RGD/hscIL-12(3066.3 ± 165.7 pg/mg)와 HE5cT-Rd19-RGD/hscIL-12/shc-met(94922.6 ± 185.8 pg/mg) 재조합 벡터 모두에서 human IL-12가 발현됨을 확인하였다.

- [199] 또한, 도 7b에 나타낸 바와 같이, HE5cT-Rd19-RGD/shc-met 또는 HE5cT-Rd19-RGD/hscIL-12/shc-met 재조합 벡터로 처리된 세포에서는

HE5cT-Rd19-RGD 대조군 대비 c-met의 발현이 억제됨을 확인하였다. 따라서, 본 발명에서 제작된 항암 아데노 바이러스 재조합 벡터에 삽입된 치료 유전자 IL-12와 shc-met의 발현이 효율적으로 유도됨을 확인할 수 있다.

[200]

[201] 시험예 6. 인간 유래 IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노 바이러스에 의한 암세포 살상능 검증

[202] 인간 유래의 IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노 바이러스에 의한 암세포 살상능을 확인하기 위하여, H1975 인간 폐암 세포 주에 제조예 2에 따라 제작된 항암 아데노 바이러스 HE5cT-Rd19-RGD; HE5cT-Rd19-RGD/hscIL-12; HE5cT-Rd19-RGD/shc-met; 또는 HE5cT-Rd19-RGD/hscIL-12/shc-met을 각각 2, 5, 10, 20, 50 MOI 씩 감염시키고, 정상산소 조건(Normoxia)과 저산소 조건(Hypoxia)에서 아데노 바이러스의 암세포 살상능을 관찰하였다.

[203] 도 8a 및 8b에 나타낸 바와 같이, 정상산소 조건과 저산소 조건 모두에서 HE5cT-Rd19-RGD, HE5cT-Rd19-RGD/hscIL-12, HE5cT-Rd19-RGD/shc-met, 또는 HE5cT-Rd19-RGD/hscIL-12/shc-met의 암세포 살상능이 바이러스 역가에 비례하여 증가함을 확인하였다. 또한, 50 MOI를 감염시킨 조건에서 단독 치료유전자 처리군인 HE5cT-Rd19-RGD/hscIL-12 또는 HE5cT-Rd19-RGD/shc-met의 암세포 살상능이 HE5cT-Rd19-RGD 대비 증가하였으나, 상기 단독 처리군과 비교해서 동시발현군인 HE5cT-Rd19-RGD/hscIL-12/shc-met이 현저히 향상된 암세포 살상능을 유도하였다. 이는 IL-12와 shc-met의 동시 발현이 항암치료에 있어서 시너지 효과를 가짐을 의미한다.

[204]

[205] 시험예 7. 인간 유래 IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노 바이러스의 HUVEC의 전이(migration)와 침습(invasion) 억제능 검증

[206] 암세포에서 발현되는 HGF는 혈관 내피 세포에서의 c-met 신호전달체계를 활성화시킴으로써 암세포의 전이(migration) 및 침습(invasion)을 증가시키고, 결과적으로 비이상적인 혈관 형성을 유도한다고 보고되고 있다. 따라서, IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노 바이러스가 HUVEC의 전이와 침습 능력을 저하시킬 수 있는지 확인하기 위해 다음의 실험을 진행하였다.

[207] H1975 인간 폐암 세포 주에 HE5cT-Rd19-RGD, HE5cT-Rd19-RGD/hscIL-12, HE5cT-Rd19-RGD/shc-met, 또는 HE5cT-Rd19-RGD/hscIL-12/shc-met를 감염시킨 후 상층액을 수거하여 전이(migration) 및 침습(invasion) 분석(assay)을 수행하였다. 대조군으로 무처리 배지(fresh media, 5% FBS RPMI)와 항암 바이러스를 감염시키지 않은 암세포 배양액(H1975-culture media, H1975-CM)을 사용하였다.

[208] 도 9a, 9b, 9c 및 9d에 나타낸 바와 같이, H1975-CM(항암바이러스를 감염시키지 않은 암세포 배양액)에서 무처리 배지(fresh media)를 처리한 그룹 대비

HUVEC의 전이 및 침습 능력이 증가함을 확인하였다. 반면, 암세포에 HE5cT-Rd19-RGD/HscIL-12 또는 HE5cT-Rd19-RGD/Hshc-met을 감염시킨 배양액을 처리한 그룹의 경우 HE5cT-Rd19-RGD를 감염시킨 그룹 대비 HUVEC의 전이 및 침습 능력이 감소되었고, 특히, HE5cT-Rd19-RGD/HscIL-12/Hshc-met을 감염시킨 암세포 배양액에서는 HUVEC의 전이 및 침습능이 현저히 억제됨을 확인하였다. 이는 IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노 바이러스에 의해 암세포에서 발현되는 HGF의 양이 효과적으로 억제됨으로써, 결과적으로 HUVEC의 전이와 침습 능력을 감소시키는데 시너지 효과를 얻을 수 있음을 의미한다.

[209]

[210] 시험예 8. 인간 유래 IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노 바이러스에 의한 상피-중간엽 변이(Endo-MT) 억제효과 확인

[211] IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노 바이러스에 의해 유도되는 혈관 정상화 효과를 검증하기 위하여, H1975 인간 폐암 세포 주에 HE5cT-Rd19-RGD, HE5cT-Rd19-RGD/HscIL-12, HE5cT-Rd19-RGD/Hshc-met, 또는 HE5cT-Rd19-RGD/HscIL-12/Hshc-met를 감염시킨 후 상층액을 수거하여 HUVEC 세포를 배양한 후 상피(endothelial) 또는 중간엽(mesenchymal) 마커의 발현 변화를 웨스턴 블랏(western blot)을 통해 확인하였다. 대조군으로 무처리 배지(fresh media, 5% FBS RPMI)와 항암 바이러스를 감염시키지 않은 암세포 배양액을 사용하였다.

[212] 도 10에 나타낸 바와 같이, 암세포에 HE5cT-Rd19-RGD/Hshc-met 또는 HE5cT-Rd19-RGD/HscIL-12/Hshc-met를 감염시킨 배양액을 처리한 그룹의 경우, 대조군(fresh media 처리 그룹)과 비교해서 중간엽 마커(mesenchymal marker)인 N-cadherin과 α -SMA의 발현이 감소되었고, 그 중 IL-12와 shc-met를 동시에 발현하는 아데노 바이러스로 처리된 경우에 가장 우수한 발현 감소 효과가 확인되었다. 이는 IL-12와 shc-met를 동시에 발현의 경우 HUVEC 세포의 전이와 침습능을 억제하는 효과뿐 아니라, endo-MT 이행(transition)을 억제하여 혈관 정상화를 유도하는데도 우수한 효과를 얻을 수 있음을 보여주는 결과이다.

[213]

[214] 시험예 9. 인간 이종이식 종양 모델에서 IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노 바이러스의 생체 내 항종양 효과 확인

[215] 인간 이종이식 종양 모델(human xenograft tumor model)에서 본 발명의 IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노 바이러스에 의한 항암치료 효과를 검증하기 위하여, 인간 폐암 세포주인 H1975를 이용하여 종양모델을 구축하고 항종양 효과를 확인하였다.

[216] 인간 이종이식 종양 모델은, 구체적으로, 인간 폐암 세포주(H1975)를 3×10^6 cells/50 μ L로 누드 마우스의 피하에 주사한 후, 종양의 크기가 평균 100mm³가 되었을 때 PBS, HE5cT-Rd19-RGD, HE5cT-Rd19-RGD/HscIL-12,

HE5cT-Rd19-RGD/Hshc-met, 또는 HE5cT-Rd19-RGD/HscIL-12/Hshc-met를 각각 투여하였다. 이를 간격으로 총 2회 종양 내에 투여한 후(5×10^6 pfu), 종양의 크기를 측정하였다.

- [217] 도 11에 나타낸 바와 같이, PBS 투여군의 경우에는 종양이 급속도로 성장하였으나, 항암 아데노 바이러스를 투여한 그룹에서 모두 뚜렷한 항종양 효과를 확인할 수 있었다. 구체적으로, PBS 투여군 대비 종양의 크기가 HE5cT-Rd19-RGD는 81.7%, HE5cT-Rd19-RGD/HscIL-12는 85.5%, HE5cT-Rd19-RGD/Hshc-met는 92.2% 그리고 HE5cT-Rd19-RGD/HscIL-12/Hshc-met는 94.6% 감소되었고, 이를 통해 단독 처리군과 비교해서 IL-12와 shc-met을 동시 발현하는 항암 아데노 바이러스를 이용하는 경우 시너지 효과를 얻을 수 있음을 알 수 있다.
- [218]
- [219] 시험예 10. IL-12와 Lbcpf1-crMET을 동시 발현하는 항암 아데노 바이러스에 의한 세포 내 IL-12 발현 및 c-met 발현 감소 확인
- [220] 시험예 10-1. IL-12와 c-met 표적하는 크리스퍼 RNA를 동시에 발현하는 항암 아데노바이러스의 구축
- [221] 표적 DNA를 자른 후 세포 내 복구 시스템에 의해 다시 연결되는 과정에서 유전자 교정과 원하는 변이가 일어나게 하는 3.5세대 유전자 가위(CRISPR/Cpf1)를 이용한 크리스퍼 RNA 시스템(LbCpf1-crRNA system)을 구축하여 본 발명의 아데노바이러스 시스템에서 크리스퍼 시스템을 이용한 경우에도 동일한 효과를 가질 수 있는지 확인하였다. IL-12 서열은 제조예 2와 동일한 방법으로 재조합 벡터에 위치시켰으나, IL-12의 p35 코딩 서열(서열번호 4)과 IL-12의 p40을 코딩하는 서열(서열번호 5) 사이에 IRES 코딩 서열(서열번호 20)을 포함하는 서열(서열번호 6)을 이용하였다(도 12에서 HIL-12로 표기).
- [222] c-met 표적(target) 가이드 RNA 서열의 경우는 프로그램을 이용하여 선정 후, 바이오닉스 회사에 의뢰하여 올리고머(oligomer)를 합성 후, 어닐링(annealing)을 통해 클로닝을 진행하였다. RdB-RGD 아데노바이러스의 E1 부위에 Cpf1 단백질 코딩 유전자(서열번호 18)를 삽입하고, 가이드 RNA(crc-met)를 발현하는 부위의 업스트림에 U6 프로모터를 위치시켰다. 또한, RdB-RGD 아데노바이러스의 E3영역에 IL-12 코딩서열 및 C-met 표적 가이드 RNA를 발현하는 서열(서열번호 16)을 삽입하여 IL-12와 CRISPR-CAS 시스템을 동시 발현하는 재조합 아데노 바이러스를 구축하였다. 가이드 RNA는 서열번호 10의 인간 c-met 서열에서 55번째 내지 77번째 뉴클레오티드를 표적화하도록 설계하였다(도 12).
- [223] 상기 구축된 재조합 아데노 바이러스 발현되는 가이드 RNA(crcmet)가 표적 유전자의 표적 부위를 인식하여 교정위치를 지정하면, 유전자 가위 Cpf1가 표적부위를 절단하여, c-met을 효과적으로 억제할 수 있는지 확인하였다.
- [224]
- [225] 시험예 10-2. IL-12와 c-met 표적하는 크리스퍼 RNA를 동시에 발현하는 항암

아테노바이러스에 의한 c-met 억제 효과 확인

- [226] IL-12와 Lbcpf1-crMET을 동시 발현하는 항암 아테노 바이러스에 의한 인간 유래의 IL-12 발현 또는 Lbcpf1-crMET 시스템에 의한 c-met의 발현 감소를 확인하고자, H1975 인간 폐암 세포 주에 제작된 항암 아테노 바이러스 5 MOI 또는 100 MOI를 감염시키고, 48시간 후 세포 및 배양액을 수거하여 인간 IL-12 ELISA 또는 c-Met 웨스턴 블랏을 수행하였다.
- [227] 도 13a, 도 13b, 및 도 13c 에서 보는 바와 같이, RdB-RGD/Lbcpf1/HscIL-12와 RdB-RGD/Lbcpf1/HscIL-12-crMET을 처리한 군에서 각각 $9000.0 \pm 600.0 \text{ pg/mL}$ 와 $17400.0 \pm 1200.0 \text{ pg/mL}$ 의 IL-12 발현이 확인되었다. 또한, 모든 항암 바이러스 처리군에서 c-met의 발현이 억제됨을 확인하였다. 특히, RdB-RGD/Lbcpf1/HscIL-12-crMET에 의해 가장 c-met의 발현이 효과적으로 감소되었다.
- [228]
- [229] 시험예 11. 인간 이종이식 종양 모델에서 IL-12와 Lbcpf1-crMET을 동시 발현하는 항암 아테노 바이러스의 생체 내 항종양 효과 확인
- [230] 인간 이종이식 종양 모델에서, shRNA가 아닌 CRISPR에 의한 c-met 발현 억제가 IL-12 발현과 동시에 구현될 수 있는지와 이에 따른 항암효과를 기재할 수 있는지 확인하기 위한 실험을 진행하였다.
- [231] CRISPR에 의한 c-met 발현 억제를 확인하기 위해서, 시험예 10-1에 의하여 제작된 Lbcpf1-crMET 시스템을 이용하였다.
- [232] 제작된 IL-12와 Lbcpf1-crMET을 동시 발현하는 항암 아테노 바이러스에 의한 항암치료 효과를 검증하기 위하여, 인간 폐암 세포주인 H1975를 이용하여 종양모델을 구축하고 항종양 효과를 확인하였다. 인간 폐암 세포 주(H1975)를 $3 \times 10^6 \text{ cells}/50 \mu\text{L}$ 로 누드 마우스의 피하에 주사한 후, 종양의 크기가 평균 90 mm^3 이 되었을 때 PBS, RdB-RGD/Lbcpf1, RdB-RGD/Lbcpf1/HscIL-12, 또는 RdB-RGD/Lbcpf1/HscIL-12-crMET를 각각 투여하였다. 이를 간격으로 총 3회 종양 내에 투여한 후($5 \times 10^9 \text{ VP}$), 종양의 크기를 측정하여 항종양 효과를 관찰하였다.
- [233] 도 14에 나타낸 바와 같이, PBS 투여군의 경우에는 종양의 크기가 25일 쯤 $1486.5 \pm 221.1 \text{ mm}^3$ 까지 급격히 성장하였으나, 항암 바이러스를 투여한 그룹에서 모두 뚜렷한 항종양 효과가 확인되었다. 항암 바이러스 투여군의 평균 종양 크기는 각각 $876.9 \pm 146.2 \text{ mm}^3$ (RdB-RGD/Lbcpf1), $792.0 \pm 230.3 \text{ mm}^3$ (RdB-RGD/Lbcpf1/scIL-12), 또는 $535.6 \pm 172.6 \text{ mm}^3$ (RdB-RGD/Lbcpf1/scIL-12-crMET)로 PBS 투여군 대비 종양의 크기가 41.0, 46.7 또는 64% 감소되었고, 특히 IL-12와 동시발현으로 CRISPR 방법을 이용하는 경우 종양의 크기가 현저히 감소하였는바, CRISPR 시스템을 이용하는 경우에도 두 치료 유전자에 의한 시너지 효과를 얻을 수 있음을 확인하였다.