【명세서】

【발명의 명칭】

간세포 성장인자의 둘 이상의 이형체를 이용한 근위축성 측삭 경화증 예방 또는 치료용 조성물

【기술분야】

본 특허출원은 2013 년 10 월 22 일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2013-0126216 호 및 2014 년 10 월 22 일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2014-0143377 호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명은 간세포 성장인자의 둘 이상의 이형체들 또는 상기 이형체들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 근위축성 측삭 경화증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS)은 운동 신경원에 발생하는 질환으로 1869년 프랑스의 의사 장마르틴 샤콧(Jean-Martin Chartcot)에 의해 최초로 보고되었다. 이후 1939년 미국의 유명한 야구 선수인 루게릭(Lou Gehrig)이 이 질환을 앓게 되면서 일반 사람들에게 알려졌으며, 이때부터 루게릭병(Lou Gehrig`s disease)이라고도 불리게 되었다.

ALS의 예후는 임상적 특징, 전기 진단 테스트 및 증상과 관련된 다른 건강상태의 배제를 기반으로 한다. ALS와 관련된 몇몇의 유전자와 관련된 임상 실험에서 사용할 수 있는 분자 유전자 검사는, 유전적 유형 진단 및 유전상담에서 중요한 역할을 한다.

ALS는 상염색체 우성, 상 염색체 열성, 또는 X-연관 방법에 의해서 유전될 수 있다. 유전 상담 및 위험 평가는 특정 유전자 진단의 정확한 진단에 달려있다.

ALS 병의 진행을 지연시키는 약제로는 리루졸(Riluzole)이 알려져

있다. 리루졸은 운동 신경세포를 파괴하는 원인의 하나로 여겨지는 과도한 글루타민산을 억제시킴으로써 ALS의 진행 속도를 늦출 수 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 리루졸의 임상적 효과는 ALS의 증상을 개선시키지는 못하며 ALS 환자가 기관절개술을 받지 않고 생존하는 기간(tracheostomy-free survival)을 늘리는데 있어서도 그 결과가 명확하지 않다. 이와 같이 ALS 환자에게 도움이 되는 리루졸의 진정한 임상적인 효과는 매우 제한적이고 모호한 것으로 보고된바 있다(Stewart et al, 2001). 그럼에도 불구하고 이 같이 임상적 유용성이 모호한 리루졸 이외에 ALS에 대한 효과적인 예방 또는 치료제가 없는 실정이어서, ALS에 예방 또는 치료 효과를 나타내는 약물의 개발이 필요한 실정이다.

한편, 유전자 치료를 위한 유전자 전달체로서의 발현벡터들이 종래 공지되어 있다. 본 발명의 일실시예에서 사용된 pCK 벡터에 대하여 PCT/KR99/000855에 자세히 기재되어 있다. 또한, PCT/KR03/000548에는 본 발명에서 사용된 pCK-HGFX7 재조합 벡터를 포함하는 허혈성 질환 또는 간질환 치료 또는 예방용 조성물에 관하여 기재하고 있다. PCT/KR99/000855 및 PCT/KR03/000548의 모든 내용은 본 명세서에 참조로서 통합된다.

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

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

본 발명자들은 근위축성 측삭 경화증을 예방 또는 치료할 수 있는 약물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 둘 이상의 간세포 성장인자(Hepatocyte Growth Factor; HGF) 이형체들 또는 상기 이형체들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 유효 성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 ALS를 치료할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic

Lateral Sclerosis) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적은 근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis)의 예방 또는 치료방법을 제공하는데 있다.

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

【과제 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 HGF(Hepatocyte Growth Factor)의 둘 이상의 이형체들 또는 상기 이형체들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명자들은 근위축성 측삭 경화증을 예방 또는 치료할 수 있는 약물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 둘 이상의 간세포 성장인자(Hepatocyte Growth Factor; HGF) 이형체들 또는 상기 이형체들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 유효 성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 ALS를 치료할 수 있음을 규명하였다.

본 발명의 치료 전략은 크게 단백질 치료 및 유전자 치료 두 가지로 분류될 수 있다. 본 발명의 단백질 치료제 전략에 따르면, HGF의 두 종류 이상의 이형체 단백질을 이용한다. 한편, 본 발명의 유전자 치료제 전략에 따르면, HGF의 두 종류 이상의 이형체를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 이용한다. 두 종류 이상의 HGF 이형체-암호화 뉴클레오타이드 서열은 하나의 폴리뉴클레오타이드로 제공되거나 별도의 폴리뉴클레오타이드로 제공될 수 있다. 바람직하게는, HGF의 두 종류 이상의 HGF 이형체-암호화 뉴클레오타이드 서열은 하나의 폴리뉴클레오타이드로 제공된다.

이하, 본 발명에 대하여 상세히 기재한다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "HGF 이형체(isoform)"는 모든 대립

유전자 변형체들(variants)을 포함하는, 동물에서 자연적으로 생성되는(naturally occurring) HGF 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 갖는 HGF 폴리펩타이드를 의미한다. 예를 들어, HGF 이형체는 HGF의 정상형(normal form) 또는 야생형(wild type), 그리고 HGF의 다양한 변이체(예컨대, 스플라이싱 변이체 및 결손 변이체)를 모두 포괄하는 의미를 갖는다.

본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 HGF의 둘 이상의 이형체들은 전장 HGF(full length HGF; flHGF)와 결손된 변이형 HGF(deleted variant HGF; dHGF)를 포함한다. 전장 HGF 및 결손된 변이형 HGF를 모두 포함하는 조성물을 이용하는 경우, ALS를 더욱 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "flHGF"는 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간 HGF의 아미노산 1-728 서열을 지칭한다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "dHGF"는 동물, 바람직하게는 포유동물에서 HGF 유전자의 선택적 스플라이싱에 의해 생성되는 HGF 단백질의 결손된 변형체, 보다 바람직하게는 전장 HGF 서열로부터 알파 사슬의 첫 번째 크링글 도메인에서 5 개의 아미노산(F, L, P, S 및 S)이 결손된 723 개의 아미노산으로 이루어지는 인간 HGF 를 지칭한다.

본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 전장 HGF는 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하고, 본 발명의 결손된 변이형 HGF는 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함한다.

본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 HGF의 이형체들은 별도의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되거나, 또는 단일의 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화된다. 본 발명인 약학적 조성물은, HGF의 서로 다른 종류의 이형체들이 별도의 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 경우에 둘 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, HGF의 서로 다른 종류의 이형체들이 단일의 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 경우에는 상기 단일의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 HGF 이형체들의 발현을 조절하는 하나 이상의 조절 서열(예컨대, 프로모터 또는 인핸서)에 작동가능하게 연결될 수 있다.

HGF의 두 종류 이상의 이형체들이 별도의 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 경우, 두 가지 방식으로 발현 카세트를 구축할 수 있다. 첫 번째 방식에 따르면, 이형체 각각에 대한 CDS(coding sequence)에 발현 조절 서열을 연결하여 발현 카세트를 구축한다. 두 번째 방식에 따르면, "발현조절서열-제 1 이형체 CDS-IRES-제 2 이형체 CDS-전사종결 서열"과 같은 방식으로 IRES(internal ribosomal entry site) 또는 2A 펩타이드를 이용하여 발현 카세트를 구축한다. IRES 는 유전자의 번역이 IRES 서열에서 시작되도록 함으로써 2 개 이상의 관심 유전자가 동일한 구조물에서 발현되도록 한다.

HGF의 두 종류 이상의 이형체들이 단일의 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 경우, 상기 두 종류 이상의 이형체들을 모두 암호화하고 있는 폴리뉴클레오타이드는 단일의 발현조절서열에 작동가능하게 연결된다.

본 발명에 있어서, HGF의 이형체들은 둘 이상의 서로 다른 종류의 이형체들, 예컨대 flHGF 및 dHGF를 동시에 발현하는 하이브리드(hybrid) HGF 유전자에 의해 암호화될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 하이브리드 HGF 유전자는 인간 HGF 의 엑손 1 내지 18 에 해당하는 cDNA, 및 상기 cDNA 의 엑손 4 와 5 사이에 삽입된 인간 HGF 유전자의 인트론 4 또는 이의 단편을 포함한다.

본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 상기 하이브리드 HGF 유전자는 서열목록 제 3 서열 내지 제 10 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

상기 인트론 4 를 포함하는 하이브리드 HGF 유전자는 7113bp 길이이며, 서열목록 제 3 서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 상기 하이브리드 HGF 유전자는 선택적으로 HGF cDNA 의 엑손 4 와 5 사이에 인트론 4 의 단편을 포함할 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 엑손 4 및 5 사이에 추가적으로 삽입되는 서열은 인간 HGF 유전자의 인트론 4, 서열목록 제 3 서열의 392 번째부터 2247 번째까지의 뉴클레오타이드, 392 번째부터 727 번째까지의 뉴클레오타이드, 2229 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드, 5117 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드, 3167 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드, 4167 번째부터 5471 번째까지의

뉴클레오타이드 또는 이의 조합이다.

보다 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 치료학적 뉴클레오타이드 서열의 엑손 4 및 5 사이에 추가적으로 삽입되는 서열은 (i) 서열목록 제 3 서열의 392 번째부터 2247 번째까지의 뉴클레오타이드와 2229 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드, (ii) 서열목록 제 3 서열의 392 번째부터 2247 번째까지의 뉴클레오타이드와 5117 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드, (iii) 서열목록 제 3 서열의 392 번째부터 2247 번째까지의 뉴클레오타이드와 3167 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드, (iv) 서열목록 제 3 서열의 392 번째부터 2247 번째까지의 뉴클레오타이드와 4167 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드, (v) 서열목록 제 3 서열의 392 번째부터 727 번째까지의 뉴클레오타이드와 2229 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드, (vi) 서열목록 제 3 서열의 392 번째부터 727 번째까지의 뉴클레오타이드와 5117 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드, (vii) 서열목록 제 3 서열의 392 번째부터 727 번째까지의 뉴클레오타이드와 3167 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드, 또는 (viii) 서열목록 제 3 서열의 392 번째부터 727 번째까지의 뉴클레오타이드와 4167 번째부터 5471번째까지의 뉴클레오타이드이다.

상기 엑손 4 및 5 사이에 추가적으로 삽입되는 서열에 따라 본 발명의 치료학적 뉴클레오타이드 서열을 정리하면 다음과 같다: (i) (엑손 1 내지 엑손 4)-(서열목록 제 3 서열의 392 번째부터 2247 번째까지의 뉴클레오타이드-2229 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드)-(엑손 5 내지 엑손 18); (ii) (엑손 1 내지 엑손 4)-(서열목록 제 3 서열의 392 번째부터 2247 번째까지의 뉴클레오타이드-5117 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드)-(엑손 5 내지 엑손 18); (iii) (엑손 1 내지 엑손 4)-(서열목록 제 3 서열의 392 번째부터 2247 번째까지의 뉴클레오타이드-3167 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드)-(엑손 5 내지 엑손 18); (iv) (엑손 1 내지 엑손 4)-(서열목록 제 3 서열의 392 번째부터 2247 번째까지의 뉴클레오타이드-4167 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드)-(엑손 5 내지 엑손 18); (v) (엑손 1 내지 엑손 4)-(서열목록 제 3 서열의 392 번째부터 727 번째까지의 뉴클레오타이드-2229 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드)-(엑손 5 내지 엑손 18); (vi)

(엑손 1 내지 엑손 4)-(서열목록 제 3 서열의 392 번째부터 727 번째까지의 뉴클레오타이드-5117 번째부터 5471 번째 까지의 뉴클레오타이드)-(엑손 5 내지 엑손 18); (vii) (엑손 1 내지 엑손 4)-(서열목록 제 3 서열의 392 번째 부터 727 번째까지의 뉴클레오타이드-3167 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드)-(엑손 5 내지 엑손 18); 및 (viii) (엑손 1 내지 엑손 4)-(서열목록 제 3 서열의 392 번째부터 727 번째까지의 뉴클레오타이드-4167 번째부터 5471 번째까지의 뉴클레오타이드)-(엑손 5 내지 엑손 18).

본 명세서에서, 상기 인트론 4 의 단편을 포함하는 하이브리드 HGF 유전자는 "HGF-X" 로 명명되고, 상기 HGF-X에는 서열목록 제 4 서열 내지 제 10 서열의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 HGF-X2, HGF-X3, HGF-X4, HGF-X5, HGF-X6, HGF-X7 및 HGF-X8이 포함된다. 본 발명에 있어서 바람직하게는 HGF-X7이 이용된다. 본 발명에 있어서의 “HGF 이형체”, “HGF-X", 및 ” HGF-X7" 등에 관하여서는 종래 PCT/KR03/000548에 보고한 바 있으며, 상기 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입된다.

본 발명에서 이용 가능한 HGF 이형체들의 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열은 야생형 인간 HGF 이형체의 서열과 실질적인 동일성을 나타내는 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 실질적인 동일성은, 야생형 인간 HGF 이형체의 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 아미노산 서열 또는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981); Needleman and Wunsch, J. Mol. Bio. 48:443 (1970); Pearson and Lipman, Methods in Mol. Biol. 24: 307-31 (1988); Higgins and Sharp, Gene 73:237-44 (1988); Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-3 (1989); Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16:10881-90 (1988); Huang et al., Comp. Appl. BioSci. 8:155-65 (1992) 및 Pearson et al., Meth. Mol. Biol. 24:307-31 (1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

(Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10 (1990))은 NBCI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, blastx, tblastn 및 tblastx 와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT 는 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html 에서 확인할 수 있다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "예방" 은 본 발명의 조성물의 투여로 근위축성 측삭 경화증을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "치료" 는 (a) 근위축성 측삭 경화증의 발전의 억제; (b) 근위축성 측삭 경화증의 경감; 또는 (c) 근위축성 측삭 경화증의 제거를 의미한다.

본 발명의 조성물은 신경세포에서의 신경극 발아 및 성장, 그리고 운동신경세포의 성장 및 사멸억제를 통하여 근위축성 측삭 경화증을 예방 또는 치료할 수 있도록 한다.

본 발명의 조성물은 유전자 치료 분야에서 통상적으로 공지된 다양한 운반 방법을 통하여 생체 내에 적용될 수 있다.

본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 네이키드 DNA(naked DNA) 이거나 또는 유전자 운반체에 포함되어 있다. 유전자 운반체의 예는 플라스미드, 벡터 및 바이러스 벡터를 포함한다.

(i) 플라스미드 (벡터)

본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 운반하는 운반체로서 플라스미드 (벡터)가 이용될 수 있다. 벡터에 포함되는 폴리뉴클레오타이드는 적합한 발현 카세트 내에 존재하는 것이 바람직하다. 상기 발현 카세트에서 폴리뉴클레오타이드는 프로모터에 작동적으로 연결되는 것이 바람직하다.

본 명세서에서 사용된 용어 "작동적으로 연결된"은 핵산 발현조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.

본 발명에 있어서, 폴리뉴클레오타이드 서열에 결합된 프로모터는, 동물세포, 바람직하게는 포유동물 세포, 보다 바람직하게는 인간 세포에서 작동하여 뉴클레오타이드 서열의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, CMV (cytomegalo virus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV 의 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 및 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 더 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 프로모터는 인간 CMV (hCMV)의 IE (immediately early) 유전자로부터 유래된 프로모터 또는 EF1 알파 프로모터이며, 가장 바람직하게는 hCMV IE 유전자의 프로모터/인핸서 및 엑손 1 전체서열부터 엑손 2 의 ATG 개시코돈 직전까지를 포함하는 5'-UTR (untranslated region)이다.

본 발명에서 이용되는 발현 카세트는 폴리아데닐화 서열을 포함할 수 있으며, 예를 들어 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.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 폴리뉴클레오타이드의 운반체로서 pCK, pCP, pVAX1 또는 pCY 벡터를 이용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 pCK 벡터를 이용할 수 있다. 상기 pCK 벡터는 WO 2000/040737에 상세히 개시되어 있으며, 상기 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입된다.

(ii) 레트로바이러스

레트로바이러스는 자신의 유전자를 숙주의 지놈으로 삽입시키고, 대량의 외래 유전 물질을 운반할 수 있으며, 감염시킬 수 있는 세포의 스펙트럼이 넓기 때문에 유전자 전달 벡터로서 많이 이용되고 있다.

레트로바이러스 벡터를 구축하기 위하여, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열은 레트로바이러스의 서열 대신에 레트로바이러스 지놈에 삽입되어 복제 불능의 바이러스를 생산한다. 비리온을 생산하기 위하여, gag, pol 및 env 유전자를 포함하지만 LTR (long terminal repeat)와 ψ서열은 없는 패키징 세포주를 구축한다 (Mann et al., Cell, 33:153-159 (1983)). 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열, LTR 및 ψ서열을 포함하는 재조합 플라스미드를 상기 세포주에 이입하면, ψ서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체의 생산을 가능하게 하며, 이 전사체는 바이러스로 패키징되고, 바이러스는 배지로 배출된다(Nicolas and Rubinstein "Retroviral vectors," In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez and Denhardt (eds.), Stoneham: Butterworth, 494-513 (1988)). 재조합 레트로바이러스를 함유하는 배지를 수집하고 농축하여 유전자 전달 시스템으로 이용한다.

2 세대 레트로바이러스 벡터를 이용한 유전자 전달이 발표되었다. Kasahara 등(Science, 266:1373-1376 (1994))은 몰로니 뮤라인 류케미아 바이러스의 변이체를 제조하였고, 여기에서 EPO (erythropoietin) 서열을 엔벨로프 부위에 삽입하여 새로운 결합 특성을 갖는 키메릭 단백질을 생산하였다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열도 이와 같은 2 세대 레트로바이러스 벡터의 구축 전략에 따라 레트로바이러스에 탑재될 수 있다.

(iii) 아데노바이러스

아데노바이러스는 중간 정도의 지놈 크기, 조작의 편의성, 높은 타이터, 광범위한 타깃세포 및 우수한 감염성 때문에 유전자 전달 벡터로서 많이 이용되고 있다. 지놈의 양 말단은 100-200bp 의 ITR (inverted terminal repeat)를 포함하며, 이는 DNA 복제 및 패키징에 필수적인 시스-엘리먼트이다. 지놈의 E1 영역 (E1A 및 E1B)은 전사 및 숙주세포 유전자의

전사를 조절하는 단백질을 암호화한다. E2 영역 (E2A 및 E2B)은 바이러스 DNA 복제에 관여하는 단백질을 암호화한다.

현재 개발된 아데노바이러스 벡터 중에서, E1 영역이 결여된 복제 불능 아데노바이러스가 많이 이용되고 있다. 한편, E3 영역은 통상적인 아데노바이러스 벡터에서 제거되어 외래 유전자가 삽입되는 자리를 제공한다(Thimmappaya, B. et al., Cell, 31:543-551 (1982); 및 Riordan, J. R. et al., Science, 245:1066-1073 (1989)). 따라서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열은 결실된 E1 영역 (E1A 영역 및/또는 E1B 영역) 또는 E3 영역에 삽입되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 뉴클레오타이드 서열은 결실된 E4 영역에도 삽입될 수 있다. 본 명세서에서 바이러스 지놈 서열과 관련하여 사용되는 용어, "결실" 은 해당 서열이 완전히 결실된 것뿐만 아니라, 부분적으로 결실된 것도 포함하는 의미를 가진다. 또한, 아데노바이러스는 야생형 지놈의 약 105% 까지 패킹할 수 있기 때문에, 약 2 kb 를 추가적으로 패키징 할 수 있다(Ghosh-Choudhury et al., EMBO J., 6:1733-1739 (1987)). 따라서, 아데노바이러스에 삽입되는 상술한 외래 서열은 아데노바이러스의 지놈에 추가적으로 결합시킬 수도 있다.

아데노바이러스는 42 개의 상이한 혈청형 및 A-F 의 서브그룹을 갖는다. 이 중에서, 서브그룹 C 에 속하는 아데노바이러스 타입 5 가 본 발명의 아데노바이러스 벡터를 얻기 위한 가장 바람직한 출발물질이다. 아데노바이러스 타입 5 에 대한 생화학적 및 유전적 정보는 잘 알려져 있다. 아데노바이러스에 의해 운반되는 외래 유전자는 에피좀과 동일한 방식으로 복제되며, 이에 숙주세포에 대해 유전적 독성이 매우 낮다. 따라서, 아데노바이러스 유전자 전달 시스템을 이용한 유전자 치료가 안전할 것으로 판단된다.

(iv) AAV 벡터

아데노-관련 바이러스 (AAV)는 비분열 세포를 감염시킬 수 있고, 다양한 종류의 세포에 감염할 수 있는 능력을 갖고 있기 때문에 본 발명의 유전자 전달 시스템으로 적합하다. AAV 벡터의 제조 및 용도에 대한 상세한 설명은 미국 특허 제 5,139,941 호 및 제 4,797,368 호에 상세하게 개시되어 있다.

유전자 전달 시스템으로서의 AAV 에 대한 연구는 LaFace et al, Viology, 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. 최근에, AAV 벡터는 낭포성 섬유증의 치료제로서 임상 I 을 실시하고 있다.

전형적으로, AAV 바이러스는 두 개의 AAV 말단 리피트가 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 리피트가 없는 야생형 AAV 코딩 서열을 포함하는 발현 플라스미드 (McCarty et al., J. Virol., 65:2936-2945 (1991))를 동시 형질전환 시켜 제조된다.

(v) 다른 바이러스 벡터

다른 바이러스 벡터들도 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열을 생체 내로 운반하는 데 이용할 수 있다. 배시니아 바이러스 (Puhlmann M. et al., Human Gene Therapy 10:649-657 (1999); Ridgeway, "Mammalian expression vectors," In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses. Rodriguez and Denhardt, eds. Stoneham: Butterworth, 467-492 (1988); Baichwal and Sugden, "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," In: Kucherlapati R, ed. Gene transfer. New York: Plenum Press, 117-148 (1986) 및 Coupar et al., Gene, 68:1-10 (1988)), 렌티바이러스 (Wang G. et al., J. Clin. Invest. 104(11):R55-62 (1999)) 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스 (Chamber R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:1411-1415 (1995)) 로부터 유래된 벡터들도 상기 폴리뉴클레오타이드를 세포 내로 운반할 수 있는 운반 시스템으로 이용할 수 있다.

(vi) 리포좀

리포좀은 수상에 분산된 인지질에 의해 자동적으로 형성된다. 외래 DNA 분자를 리포좀으로 성공적으로 세포 내로 운반한 예는 Nicolau 및 Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190 (1982) 및 Nicolau et al., Methods

Enzymol., 149:157-176 (1987)에 개시되어 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열을 내포한 리포좀은 엔도사이토시스, 세포 표면에로의 흡착 또는 플라즈마 세포막과의 융합 등의 기전을 통해 세포와 상호작용하여 세포 내로 폴리뉴클레오타이드 서열을 운반한다.

본 발명에서 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열이 네이키드(naked) 재조합 DNA 분자 또는 플라스미드(벡터)에 탑재된 경우에는, 미세 주입법(Capecchi, M.R., Cell, 22:479 (1980); 및 Harland 와 Weintraub, J. Cell Biol. 101:1094-1099 (1985)), 칼슘 포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., Virology, 52:456 (1973); 및 Chen 과 Okayama, Mol. Cell. Biol. 7:2745-2752 (1987)), 전기 천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841 (1982); 및 Tur-Kaspa et al., Mol. Cell Biol., 6:716-718 (1986)), 리포좀-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87 (1980); Nicolau 및 Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190 (1982); 및 Nicolau et al., Methods Enzymol., 149:157-176 (1987)), DEAE-덱스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190 (1985)) 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572 (1990)) 방법에 의해 폴리뉴클레오타이드 서열을 세포 내로 이입시킬 수 있다.

본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열이 바이러스 벡터에 기초하여 제작된 경우에는 당업계에 공지된 다양한 바이러스 감염 방법에 따라 폴리뉴클레오타이드 서열을 세포 내로 운반할 수 있다. 바이러스 벡터를 이용한 숙주 세포의 감염은 상술한 인용문헌에 기재되어 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 있어서, 본 발명의 유전자 운반체는 벡터이다.

본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 벡터는 플라스미드이고, 가장 바람직하게는 pCK 벡터를 이용할 수 있다. pCK 벡터를 이용한 HGF의 둘 이상의 이형체를 발현하는 단일 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터의 예는 pCK-HGFX7을 들 수 있으며, 이는 앞서 밝힌바와 같이 PCT/KR99/000855 및 PCT/KR03/000548에 자세히 기재되어 있다.

본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 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.

본 발명의 약제학적 조성물은 비경구 투여가 바람직하고, 예컨대 정맥내 투여, 복강내 투여, 피하 투여, 피내투여, 척수내 투여, 척수강내 투여, 뇌실내 투여, 뇌실질내 투여, 두개강내 투여, 근육내 투여 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수 있다. 가장 바람직하게는 근육내, 척수내, 척수강내, 뇌실내, 뇌실질내, 두개강내 투여할 수 있다.

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 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 HGF의 이형체들은 각각 1 μg 내지 2500 mg의 투여량으로 투여되며, 상기 이형체들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 각각 1 μg 내지 2500 mg의 투여량으로 투여된다. 상기 HGF 의 이형체들 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 투여가 일회를 초과하여 반복될 때 투여량은 매회 동일하거나 다를 수 있다.

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 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제

또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 HGF(Hepatocyte Growth Factor)의 둘 이상의 이형체들 또는 상기 이형체들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는 근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis)의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 HGF의 둘 이상의 이형체들은 전장 HGF(full length HGF; flHGF) 및 결손된 변이형 HGF(deleted variant HGF; dHGF)를 포함한다.

본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 전장 HGF는 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하고, 본 발명의 결손된 변이형 HGF는 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함한다.

본 발명인 근위축성 측삭 경화증의 예방 또는 치료방법의 경우, 본 발명의 일 양태인 근위축성 측삭 경화증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이므로, 중복되는 내용에 대해서는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.

【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

(b) 본 발명은 근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis)의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

(c) 본 발명의 조성물 또는 방법을 이용하면 배아 신경세포에서의 신경극 발아, 성장 및 운동신경세포의 성장 및 사멸억제를 통하여 근위축성 측삭 경화증을 예방 또는 치료할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 ENC 세포의 신경극 발아에 미치

는 pCK-HGFX7의 영향을 나타낸다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 ENC 세포의 성장에 미치는 pCK-HGFX7의 영향을 나타낸다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 NSC-34 세포에서 pCK-HGFX7이 세포 성장에 미치는 영향을 나타낸다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 NSC-34 세포에서 pCK-HGFX7이 세포 사멸에 미치는 영향을 나타낸다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 산화적 스트레스 배양 조건에서 NSC-34 세포의 생존에 미치는 pCK-HGFX7의 효과를 나타낸다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 산화적 스트레스 배양 조건에서 NSC-34 세포의 세포사멸에 미치는 pCK-HGFX7의 효과를 나타낸다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 G93A 돌연변이 형태의 hSOD1를 전달한 세포에서 pCK-HGFX7이 세포 성장에 미치는 영향을 나타낸다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 ALS 마우스에서 pCK-HGFX7이 마우스의 악력에 미치는 영향을 나타낸다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

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

실시예 1: 배아신경세포(Embryonic neuronal cell, ENC)의 성숙(maturation)에서 pCK-HGFX7가 미치는 효능 확인

마우스의 배아(embryo)로부터 대뇌피질 부분만을 취하여 단일 세포화한 후 Ara-C 10 μM을 배양 배지에 넣어 신경 세포만 배양하였다. ENC의 성숙에서 pCK-HGFX7이 미치는 영향을 확인하기 위해 2×10^4개의 세포를 파종하고 다음날 세포에 pCK-HGFX7을 트랜스펙션한 293F 세포(Life technologies, USA)에서 얻은 단백질 1.25 ng/mL을 처리하여 세포의

성숙에서 보이는 신경극 발아(neurite outgrowth) 정도를 확인하였다. 세포의 신경극 발아의 정도는 신경 세포 특이적으로 발현하는 튜불린(tubulin) 단백질인 TUJ-1의 발현을 면역세포화학(immunocytochemistry)을 통해 확인하였다.

그 결과, 도 1에 도시된 바와 같이, pCK-HGFX7 처리군이 대조군인 pCK 처리군에 비해 유의하게 신경돌기의 길이를 증가시킴을 확인하였다.

실시예 2: ENC의 maturation 후 pCK-HGFX7이 세포 성장에 미치는 영향 확인

ENC의 성숙 후 pCK-HGFX7이 세포 성장에 미치는 영향을 확인하였다. 이를 위해 5×10^4개의 ENC를 파종하고 6일간 성숙 과정을 진행하였다. 6일 후 pCK-HGFX7을 트랜스펙션 한 293F 세포에서 얻은 단백질 1.25 ng/mL을 처리하여 pCK-HGFX7이 세포의 성장에 미치는 영향을 확인하였다. pCK-HGFX7을 처리한 3일 후 MTT 어세이를 수행하여 세포 성장을 측정하였다.

그 결과, 도 2에 도시된 바와 같이, pCK-HGFX7 처리군에서 대조군인 pCK 처리군에 비해 약 40%정도 세포 성장이 증가함을 확인하였다.

실시예 3: 마우스 운동 신경세포(NSC-34)에서 pCK-HGFX7이 세포 성장 및 세포 사멸에 미치는 영향 확인

3-1. 세포주 및 세포 배양

본 실험에 사용된 NSC-34 세포(Cellution Biosystem, Vancouver, CA)는 마우스 유래 운동신경 세포이다. NSC-34 세포는 배아기 마우스의 척추 신경에서 유래한 운동 신경 세포와 신경모세포종 세포가 혼합된 세포주로 운동 신경과 관련한 연구에 널리 사용되는 세포주이다. 상기 세포는 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였으며, 10% 소태아혈청(Gibco BRL, USA) 및 항생물질(Gibco BRL, USA)이 포함된 둘베코스 모디파이드 이글 미디엄(DMEM, Sigma) 내에서 배양하였다. 세포배양 매질, 시약 및 혈청은 Gibco와 Sigma aldrich사에서 구입하였다.

3-2. HGF 단백질을 발현하는 상등액 생산 및 정량

HGF 단백질을 발현하는 상등액을 생산하기 위해 DNA 트랜스펙션법을 이용하였다. 트랜스펙션은 FuGene HD 트랜스펙션 시스템(Promega, USA)을

이용하였고 제조자의 프로토콜에 따라 수행하였다. 293T 세포를 1×10^6개로 파종 한 후, 다음 날 pCK, pCK-HGF728(PCT/KR03/000548의 pCK-cHGF), pCK-HGF723(PCT/KR03/000548의 pCK-dHGF) 및 pCK-HGFX7 DNA 3 μg을 각각 트랜스펙션 하였다. 48시간 배양 후, 각각의 상등액을 모두 수확하여 0.22 μm 필터를 이용하여 여과하였다. 인간 HGF 면역분석법을 이용하여 각 상등액에 포함된 HGF 단백질의 발현량을 측정하였다. 각 상등액을 다시 1 μg/mL로 희석하여 실험에 사용하였다. 인간 HGF 면역분석법에 사용된 재조합 인간 HGF 단백질은 R&D사(R&D system, Inc., USA)의 제품을 구입하여 사용하였다.

3-3. NSC-34 세포에서 pCK-HGFX7이 세포 성장에 미치는 영향

pCK-HGFX7이 운동 신경 세포의 성장에 미치는 효과를 확인하기 위하여, NSC-34 세포에 pCK-HGFX7을 처리한 뒤 세포의 증식 정도를 평가하였다. 세포는 10% 소태아 혈청을 포함하는 배양배지에서 배양한 뒤 실험에 사용하기 위해 1% 소태아 혈청을 포함하는 둘베코스 모디파이드 이글 미디엄을 이용하여 현탁하였다. 1%의 혈청을 포함하는 배지 2 mL에 3×10^4개의 세포가 포함되도록 현탁하여 6 웰 플레이트에 파종하였다. 파종 2시간 후 pCK-HGF728, pCK-HGF723, pCK-HGFX7을 트랜스펙션 한 293T 세포에서 얻은 각 상등액을 HGF 단백질의 농도가 50 ng/mL이 되도록 6 웰 플레이트에 웰 당 100uL씩 각각 첨가하였다. pCK 벡터를 293T 세포에 트랜스펙션하여 얻은 상등액을 대조군으로 사용하였다. 48시간 배양 후 6웰 플레이트의 배지를 교체하여 주었다. 각각의 웰에 1%의 소태아혈청을 포함하는 배지 2 mL을 첨가한 후, pCK-HGF728, pCK-HGF723, pCK-HGFX7을 트랜스펙션 한 293T 세포에서 얻은 각 상등액을 HGF 단백질의 농도가 50 ng/mL이 되도록 첨가하여 준 뒤 48시간 배양하였다. pCK 벡터를 293T 세포에 트랜스펙션하여 얻은 상등액을 대조군으로 사용하였다. 배양한 세포를 수집하여 세포를 계수하였다. pCK 벡터를 대조군으로 사용하였다.

세포를 파종 한 뒤 5일 동안 배양한 결과, pCK, pCK-HGF728, pCK-HGF723, pCK-HGFX7을 트랜스펙션 한 293T 세포에서 얻은 각 상등액을 처리한 실험군에서 pCK벡터를 처리한 실험군과 비교하였을 때 pCK-HGF728 혹은 pCK-HGF723을 처리한 실험군은 약 20%정도 세포 증식을 유도하였으며,

pCK-HGFX7을 처리한 군은 약 48% 정도 세포성장 증가가 관찰되었다. 이 결과를 통해 pCK-HGFX7은 운동 신경 세포의 세포 성장을 pCK-HGF728 혹은 pCK-HGF723에 비해 현저하게 증가시킴을 확인할 수 있었다(참조: 도 3).

3-4. NSC-34 세포에서 pCK-HGFX7이 세포 사멸에 미치는 영향

NSC-34 세포를 1% 소태아 혈청을 포함하는 둘베코스 모디파이드 이글 미디엄으로 3×10^4개로 현탁하여 6 웰 플레이트에 파종하였다. 세포 파종 후 2시간 동안 세포를 안정화 시킨 후 pCK-HGF728, pCK-HGF723, pCK-HGFX7을 트랜스펙션 한 293T 세포에서 얻은 각 상등액을 HGF 단백질의 농도가 50 ng/mL의 농도로 첨가하였다. pCK 벡터를 293T 세포에 트랜스펙션하여 얻은 상등액을 대조군으로 사용하였다. 세포는 2-3일 간격으로 배지와 상기의 각 상등액을 교체하여 5일간 배양하였다.

5일간 배양한 세포로부터 트리졸 시약(Life technologies, USA)를 이용하여 RNA를 추출하고, 추출한 RNA는 First Strand cDNA Kit(Roche, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 주형으로 Bax 유전자에 대한 서열목록 제 11 서열과 제 12 서열 또는 Bcl-2 유전자에 대한 서열목록 제 13 서열과 제 14 서열의 뉴클레오티드를 프라이머로 사용하여 실시간 정량 중합효소연쇄반응(real time PCR)을 수행하였다. Real time PCR은 주형 cDNA 1 μL, 10 pmole/μL 프라이머 각 1 μL, SYBR green PCR master mix(Life technologies, USA) 12.5 μL, 멸균 삼차증류수 9.5 μL를 혼합하여 총 25 μL의 혼합액을 만든 후, 50℃ 2분, 95℃ 10분 간 반응한 후 95℃ 15초, 60℃ 1분 조건으로 40회 반복하여 반응하였다. 이때, 각 반응 값을 보정하기 위하여 하우스키핑 유전자로서 GAPDH에 대한 서열목록 제 15 서열과 제 16 서열의 뉴클레오티드를 프라이머로 사용하여 동일하게 real time PCR을 수행하였다. 시험 결과, pCK 처리군에 비해 각 HGF 상등액을 처리한 그룹에서 아폽토시스 유도와 관련된 유전자인 Bax의 유전자 발현이 감소하였으며, 특히 pCK-HGFX7 처리군에서는 안티-아폽토시스와 관련된 Bcl-2의 발현이 pCK 처리군에 비해 1.3배 증가하였다(참조: 도 4a). 이 실험을 통해 pCK-HGFX7이 1% 소태아 혈청을 포함하는 배지 조건에서 대조군인 pCK 처리군에 비해 약 40%정도 세포 사멸을 억제함을 확인하였다(참조: 도 4b).

실시예 4. 산화적 스트레스 배양 조건에서 NSC-34 세포의 생존에 미치는 pCK-HGFX7의 효과 확인

4-1. 산화적 스트레스에 의한 NSC-34 세포의 세포사멸을 유도하는 과산화수소수의 농도 선정

과산화수소수에 의해 유도되는 NSC-34 세포의 세포 사멸에 pCK-HGFX7이 미치는 영향을 확인하기에 앞서, NSC-34 세포의 사멸을 확인하기에 적절한 세포의 파종 농도 및 세포사멸을 유도하는 과산화수소수의 농도를 선정하였다.

10% 소태아 혈청을 포함하는 배양 배지를 이용해 배양한 세포를 수집하여 1% 소태아혈청을 포함하는 둘베코스 모디파이드 이글 미디엄으로 현탁하여 세포를 계수하였다. 계수한 세포는 96 웰 플레이트에 1×10^4개의 세포 농도로 파종한 뒤 다음날 10, 20, 30, 50, 100 μM의 과산화수소수를 처리하였다. 과산화수소수를 처리하지 않은 웰은 인산완충용액을 넣어 주고 대조군으로 사용하였다. 24시간 후 XTT 실험법(Roche, USA)을 이용하여 세포 사멸 정도를 측정하였다. 대조군에 비해 과산화수소수를 농도별로 처리한 실험군에서 0, 10, 30, 70, 85%의 세포사멸이 유도되는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 NSC-34 세포의 세포사멸을 유도하는 과산화수소수의 적절한 농도를 30 μM로 선정하였다.

또한, 6 웰 플레이트에서 세포사멸 실험을 수행하기 위해 1% 소태아 혈청을 포함하는 배지 2 mL에 1.5×10^5, 3×10^5, 1×10^6개의 세포가 함유되도록 하여 6 웰 플레이트에 파종하였다. 다음 날 NSC-34 세포에 과산화수소수 30 μM을 처리 한 뒤 1, 4, 7일째에 세포 수를 확인하였다. 7일째에 세포수를 확인한 결과, 1.5×10^5개의 세포를 파종한 웰의 세포는 모두 사멸하여 실험에 선정할 수 없었으며, 1×10^6개의 세포를 파종한 웰은 세포 사멸이 유도되지 않았다. 이러한 실험 결과를 토대로 세포사멸을 유도하는 실험에 사용할 세포수와 과산화수소수의 농도를 3×10^5개와 30 μM로 선정하였다.

4-2. 산화적 스트레스 배양 조건에서 NSC-34 세포의 생존에 미치는 pCK-HGFX7의 효과 확인

NSC-34 세포는 10% 소태아 혈청을 포함하는 배양배지에서 배양한 뒤 세포사멸 억제실험에 사용하기 위해 1% 소태아 혈청을 포함하는 둘베코스 모디파이드 이글 미디엄을 이용하여 현탁하였다. 1 %의 혈청을 포함하는 배지 2 mL에 3×10^5개의 세포가 포함되도록 현탁하여 6 웰 플레이트에 파종하였다. 다음날 이전 실험에서 선정된 과산화수소수 30 μM을 각 웰에 처리한 뒤 pCK-HGF728, pCK-HGF723, pCK-HGFX7을 트랜스펙션 한 293T 세포에서 얻은 각 상등액을 HGF 단백질의 농도가 50 ng/mL이 되도록 처리하였다. 실험 대조군으로 pCK 벡터를 트랜스펙션 후 얻은 배양 배지를 이용하였다. 7일 동안 세포를 배양하면서 세포사멸 정도를 관찰하였다. 세포 파종 7일 후 세포를 수집하여 세포를 계수하였다. 세포 계수 결과, pCK, pCK-HGF728, pCK-HGF723을 처리한 실험군의 세포는 처음 파종한 세포수에 비해 약 60-70%의 세포만 생존하였으나, pCK-HGFX7을 처리한 NSC-34 세포는 약 92%정도의 생존을 보여 다른 실험물질 처리군에 비해 세포사멸이 억제되는 것을 확인하였다. 이 결과를 통해 HGFX7 단백질이 과산화수소수에 의한 산화적 스트레스로 유도되는 운동 신경의 세포사멸을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다(참조: 도 5).

4-3. 산화적 스트레스 배양 조건에서 NSC-34 세포의 세포사멸에 미치는 pCK-HGFX7의 효과 확인

NSC-34 세포를 1% 소태아 혈청을 포함하는 둘베코스 모디파이드 이글 미디엄으로 3×10^5개로 현탁하여 6 웰 플레이트에 파종하였다. 다음날 30 μM 과산화수소수를 각 웰에 처리한 뒤 pCK-HGF728, pCK-HGF723, pCK-HGFX7을 트랜스펙션 한 293T 세포에서 얻은 각 상등액을 HGF 단백질의 농도가 50 ng/mL이 되도록 처리하여 7일간 배양하였다. 실험 대조군으로 pCK 벡터를 트랜스펙션 후 얻은 상등액을 이용하였다.

7일간 배양한 세포로부터 트리졸 시약을 이용하여 RNA를 추출하고, 추출한 RNA는 First Strand cDNA Kit를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 주형으로 Bax 유전자에 대한 서열목록 제 11 서열과 제 12 서열 또는 Bcl-2 유전자에 대한 서열목록 제 13 서열과 제 14 서열의 뉴클레오티드를 프라이머로 사용하여 실시간 정량 중합효소연쇄반응(real time PCR)을 수행하였다. Real time PCR은 주형 cDNA 1 μL, 10 pmole/μL

프라이머 각 1 μL, SYBR green PCR master mix(Life technologies, USA) 12.5 μL, 멸균 삼차증류수 9.5 μL를 혼합하여 총 25 μL의 혼합액을 만든 후, 50℃ 2분, 95℃ 10분 간 반응한 후 95℃ 15초, 60℃ 1분 조건으로 40회 반복하여 반응하였다. 이때, 각 반응 값을 보정하기 위하여 하우스키핑 유전자로서 GAPDH에 대한 서열목록 제 15 서열과 제 16 서열의 뉴클레오티드를 프라이머로 사용하여 동일하게 real time PCR을 수행하였다. 시험 결과, pCK 처리군에 비해 각 HGF 상등액을 처리한 그룹에서 아폽토시스 유도와 관련된 유전자인 Bax의 유전자 발현은 감소하고, 안티-아폽토시스와 관련된 Bcl-2의 발현은 증가함을 확인하였다. 특히 pCK-HGFX7 처리군의 경우, pCK 처리군에 비해 약 70%정도 Bax 유전자의 발현을 감소시키는 결과를 나타내었으며(참조: 도 6a), Bax/Bcl-2의 비율(ratio)을 약 75%정도 감소시켜 세포 사멸 억제 효과가 뛰어난 것으로 확인되었다(참조: 도 6b).

실시예 5. G93A 돌연변이(mutant) 형태의 hSOD1를 전달한 세포에서 pCK-HGFX7이 세포 성장에 미치는 영향 확인

ALS의 원인 중 하나로 알려진 SOD1(Superoxide dismutase 1)의 G93A 돌연변이 형을 이용한 in vitro 시험법이 많은 연구자들을 통해 개발되었다. 특히 운동 신경 세포의 연구에서 널리 사용하는 NSC-34 세포에 hSOD1의 G93A 돌연변이 형을 전달하였을 때 세포의 사멸을 유도할 수 있다는 보고가 알려져 있다(Cheema et al.,2005). 따라서 본 시험에서는 human SOD1 야생형 유전자(wildtype; WT) (NM_000454)와 human SOD1 유전자의 93번째 아미노산 서열을 글리신에서 알라닌으로 변경한 유전자를 각각 pCK 벡터의 BamHI 부위(site)에 삽입하여 pCK-hSOD1-야생형과 pCK-hSOD1-G93A를 제작하였다. 제작한 플라스미드들을 이용하여 hSOD1-G93A를 전달한 NSC-34세포에서 pCK-HGFX7의 효능을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다.

NSC-34 세포를 10% 소태아 혈청을 포함하는 둘베코스 모디파이드 이글 미디엄으로 1×10^4개로 현탁하여 96 웰 플레이트에 파종한 후, 다음 날 pCK, pCK-hSOD1-야생형(wildtype; WT), pCK-hSOD1-G93A 돌연변이(G93A)를 리포펙타민 LTX 시약(Life technologies, USA)을 이용하여 트렌스펙션

하였다. 트렌스펙션 직전에 G93A 트렌스펙션 세포들은 pCK-HGF728, pCK-HGFX7을 트랜스펙션 한 293T 세포에서 얻은 각 상등액을 HGF 단백질의 농도가 50 ng/mL이 되도록 처리하였다. 실험 대조군으로 pCK 벡터를 트랜스펙션 후 얻은 상등액을 이용하였다.

3일간 배양한 후 XTT 시약을 처리하여 세포 성장을 확인하였다. 그 결과, 야생형 hSOD1을 전달한 세포는 pCK 벡터를 전달한 세포와 세포 성장이 유사하게 나타나는 것을 확인하였다. 그러나 G93A 돌연변이 형태의 hSOD1을 전달한 세포는 pCK를 전달한 세포에 비해 약 85.8%의 세포 성장을 나타내어, 야생형 hSOD1을 전달한 세포에 비해 세포 성장이 저하됨을 보였다. 하지만 pCK-HGFX7을 처리한 실험군은 약 92.9%의 세포 성장을 나타내어 G93A 돌연변이 형태의 hSOD1의 전달에 의한 세포 성장의 저하를 억제하는 효과를 나타냈다(참조: 도 7).

[유전자 서열]

제 11 서열 : GGC AGA CAG TGA CCA TCT TT

제 12 서열 : AGT GGA CCT GAG GTT TAT TG

제 13 서열 : CCA TCA ATC AAA GCC AAG CA

제 14 서열 : AGC CTT CAC GCA AGT TCA GG

제 15 서열 : CCA TCA CTG CCA CTC AGA AGA C

제 16 서열 : TCA TAC TTG GCA GGT TTC TCC

실시예 6. 인간 돌연변이 SOD1 G93A Tg 마우스(이하 ALS 마우스)의 악력(grip strength)에 pCK-HGFX7이 미치는 효능 평가

ALS의 원인 중의 하나로 SOD1(Superoxide dismutase 1)의 돌연변이가 밝혀짐에 따라 이 유전자를 이용한 ALS 마우스 모델이 개발되었고, 현재 전세계의 ALS 연구자들이 이 동물모델을 이용하여 다양한 연구를 수행하고 있다(Weydt P et al., 2003). 이 중에서 널리 쓰이는 B65JL-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J (002726)를 선정하여 실험에 사용하였다. ALS 마우스의 제작은 우정 BSC(Korea)에 의뢰하였으며, genotyping 과정을 거쳐 돌연변이 형태의 SOD1 유전자를 발현하는지 확인한 후 본 실험에 사용하였다.

10주령의 ALS 마우스는 군 당 4마리씩으로 나눠 각각 Tg-pCK , Tg-pCK-HGF728(PCT/KR03/00548의 pCK-cHGF), Tg-pCK-HGFX7 투여군으로 분리하였다. Tg가 아닌 개체는 6마리를 골라내어 음성 대조군으로 설정하였다(이하 non-Tg). 2주 후 음성 대조군을 제외한 상기 3가지 실험군의 마우스에 해당 플라스미드를 근육주사로 투여하였다. 이때 투여는 좌우의 상완 삼두근, 전경골근, 대퇴직근, 장딴지근에 각각 투여하였고, 용량은 2 μg/μl의 농도로 50 μl씩 투여하였다. 투여 2주 후(14주령)에 행동실험을 통해 각 마우스의 악력을 조사하였다. 행동실험의 경우 mesh 악력 테스트를 진행하였다. Mesh 악력 테스트는 마우스를 일정한 간격의 격자무늬가 있는 철제 망에 올려놓고 이를 뒤집은 후에 마우스가 철제 망에 매달려 버티는 시간을 재어 악력을 조사하는 방법이다. 이 방법은 마우스의 근육 능력을 평가할 수 있는 가장 대표적인 방법 중 하나이다(Crawley JN, 2008).

실험 결과 non-Tg 마우스의 경우 평균 9분 가량의 시간 동안 뒤집힌 채로 버티는 데 반해 Tg의 개체들 중 pCK를 투여 받은 마우스의 경우 평균 30초 정도 뒤집은 채로 매달려 있었다. pCK-HGF728 플라스미드를 투여 받은 개체의 경우에는 pCK 투여군보다 소폭 상승한 평균 시간을 보였는데 그 시간은 평균 49초였다. 이에 반해 pCK-HGFX7을 투여 받은 마우스의 경우 pCK나 pCK-HGF728을 투여 받은 마우스에 비해 더 오랫동안 뒤집은 채로 매달려 있었고, 그 평균 시간은 3분이었다(참조: 도 8). 이는 pCK-HGFX7가 pCK 및 pCK-HGF728에 비해 ALS 마우스의 악력으로 위시되는 근육의 기능을 현저하게 향상시켰음을 보여준다.

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

【특허청구범위】

【청구항 1】

HGF(Hepatocyte Growth Factor)의 둘 이상의 이형체들 또는 상기 이형체들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 HGF의 둘 이상의 이형체들은 전장 HGF(full length HGF; flHGF) 및 결손된 변이형 HGF(deleted variant HGF; dHGF)를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서, 상기 전장 HGF는 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 결손된 변이형 HGF는 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 HGF의 둘 이상의 이형체들은 별도의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 HGF의 둘 이상의 이형체들은 단일의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 네이키드 DNA(naked DNA) 이거나 또는 유전자 운반체에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 7】

제 6 항에 있어서, 상기 유전자 운반체는 벡터인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 8】

제 7 항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 상기 플라스미드는 pCK인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 10】

HGF(Hepatocyte Growth Factor)의 둘 이상의 이형체들 또는 상기 이형체들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는 근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis)의 예방 또는 치료방법.

【청구항 11】

제 10 항에 있어서, 상기 HGF의 둘 이상의 이형체들은 전장 HGF(full length HGF; flHGF) 및 결손된 변이형 HGF(deleted variant HGF; dHGF)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 12】

제 11 항에 있어서, 상기 전장 HGF는 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 결손된 변이형 HGF는 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.