(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 15/63
A61K 48/00
C07K 16/00

(45) 공고일자 2003년06월12일
(11) 등록번호 10-0376390
(24) 등록일자 2003년03월05일

(21) 출원번호	10-1996-0704269	(65) 공개번호	특1997-0700771
(22) 출원일자	1996년08월06일	(43) 공개일자	1997년02월12일
번역문제출일자	1996년08월06일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1995/01161	(87) 국제공개번호	WO 1995/21195
(86) 국제출원일자	1995년02월06일	(87) 국제공개일자	1995년08월10일
(81) 지정국	국내특허 : 오스트레일리아 캐나다 일본 대한민국 노르웨이 뉴질랜드 미국 중국 EA 유라시아특허 : 러시아 EP 유럽특허 : 핀랜드		

(30) 우선권주장 08/192,655 1994년02월07일 미국(US)

(73) 특허권자 리서치 디벨럽먼트 파운데이션
미국 네바다주 89703 카슨 시티 노쓰 디비젼 스트리트 402
(72) 발명자 로젠블룸 마이클 지.
미국 텍사스주 77479 슈가 랜드 스토니 미스트 드라이브 3127
도나토 니콜라스 제이.
미국 텍사스주 77096 휴스톤 뱅크사이드 6206
(74) 대리인 이병호

심사관 : 이충호

(54) 면역접합체

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 일반적으로 분자 생물학 및 치료학 분야에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 유전 정보를 세포로 수송하기 위한 신규의 비-바이러스 벡터인 면역접합체에 관한 것이다.

배경기술

<2> 현재, 포유동물 세포의 분자 특성에 영향을 미칠 수 있는 유전 물질을 수송하기 위한 가장 일반적인 메카니즘은 바이러스 벡터, 주로 레트로바이러스 벡터를 이용하는 것이다. 그러나, 이러한 방식의 유전적 치료요법 또는 수송은 몇몇의 결핍 상태 및 잠재적으로 유해한 상태에 의해 영향 받는다. 비록 레트로바이러스 벡터가 더욱 보편적이기는 해도, 아데노바이러스 벡터가 현재 연구중에 있으며 둘 모두가 어느 정도 잠재성을 지니고 있다. 불행하게도, 바이러스 벡터는 많은 단점을 가지고 있다. 첫째로, 표적 세포, 즉, 사람 세포는 유전 정보를 수송하기 위한 목적 세포 또는 조직상에서 발현되지 않을 수 있는 특이 세포 표면 요소의 발현을 통해서 바이러스와 상호 작용할 수 있어야만 한다. 둘째로, 유전 물질은 표적 세포, 예를들어, 사람 세포내에서 통합되고 발현되어야 하는데, 이는 표적 세포가 활발히 분열함을 필요로 하는데, 이러한 조건은 수송 시스템의 효능과 균질성을 방해하게 된다, 심지어 성공적으로 통합되더라도, 유전자는 숙주 세포 메카니즘에 의해서 전사적으로 무증후성(silent)일 수 있다. 셋째로, 이러한 시스템내에서 허용되는 유전 정보의 크기는 제한되어 있으며 생물학적 활성이 보증되도록 매우 정밀하게 가공되어야만 한다. 넷째로, 복제 결핍성 바이러스는 신규한 감염성 제제를 형성할 수 있는 내인성 바이러스와 재조합되는 위험이 감소되도록 하는 방식으로 유전자 치료요법에 이용되어야 한다. 복제 결핍성 바이러스는 이러한 유해성을 감소시킬 수 있으나 이를 제거하지는 못한다. 다섯째로, 복제 결핍성 바이러스는 자가-제거(self-removing)되지 않도록 설계됨으로써, 유전서열이 모든 세포로 성공적으로 수송되도록 반복적인 감염을 필요로 한다.

<3> 선행 기술은 비-바이러스 벡터의 부재하에서 성공적이지 못하며, 본 발명은 당해 분야의 이러한 오랫동안 염원된 필요성 및 요구를 충족시킨다.

발명의 상세한 설명

<4> 본 발명은 특히 유해하거나 바람직하지 않은 표현형 특성을 변형시킬 수 있는 유전 물질 수송용의 신규한 비-바이러스 시스템을 제공한다.

<5> 즉, 본 발명의 한 양태로, 바이오티닐화된 잔기에 접합된 바이오틴-결합 요소를 지닌 세포 결합 성분을 포함하는 비-바이러스 벡터가 제공된다.

<6> 본 발명의 다른 양태로, 바이오티닐화된 잔기에 접합된 바이오틴-결합 요소를 지닌 세포 결합 성분을 포함하는 비-바이러스 벡터를 사람에게 투여함을 포함하여, 유전 물질을 특이 세포 내부에 도입시키는 방법이 제공된다.

<7> 본 발명의 또 다른 양태로, 비-바이러스 벡터를 사람에게 투여함을 포함하여, 세포 독성 잔기를 세포로 수송하는 방법이 제공된다.

<8> 본 발명의 다른 추가의 양태, 특성 및 장점은 기술의 목적으로 제공된 본 발명의 현 바람직한 양태의 하기 기술로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

<9> 하기의 도면은 본 발명의 다양한 양태를 설명하기 위해 제공된 것이다. 본 명세서 끝에 도면의 일부를 도식적으로 나타내며 근본적으로 일정 비율로 축척된 것은 아니다.

<10> 도 1은 G-25 컬럼상에서 A108/SPDP로부터 유리 SPDP의 분리를 나타내는 도이다.

<11> 도 2는 G-25 컬럼상에서 아비딘/2-IT로부터 유리 2-IT의 분리를 나타내는 도이다.

<12> 도 3은 S-200 컬럼(FPLC) 상에서 A108-아비딘 접합체로부터 유리 아비딘의 분리를 나타내는 도이다.

<13> 도 4는 Con-A 컬럼상에서 A108-아비딘 접합체로부터 유리 항체의 분리를 나타내는 도이다.

<14> 도 5는 A108-아비딘 접합체의 정제 단계를 보여주는 7.5% SDS-PAGE 미니-겔을 나타내는 도이다.

<15> 도 6은 바이오티닐화된 겔로닌을 검정하기 위한 결합 활성을 나타내는 도이다.

<16> 도 7은 A108-아비딘 겔로닌/바이오틴 접합체에 대한 G-75(FPLC)의 프로필과 유리 아비딘 겔로닌 및 일부 아비딘 아-단위의 분리를 나타내는 도이다.

<17> 도 8은 바이오티닐화된 겔로닌과 A108-아비딘 바이오티닐화된 겔로닌 접합체에 대한 엘리자(Elisa) 결합 활성 검정을 나타내는 도이다.

<18> 도 9는 A431 세포상에서 A108-겔로닌 접합체의 세포독성을 A108-아비딘 바이오티닐화된 겔로닌 접합체의 세포 독성과 비교한 도이다.

<19> 도 10은 EGF 수용체 유전자 프로모터 서열(표지된 안티-센스 EGFr)에 대해 지시된 핵산 서열과 함께 세포를 항온처리한 효과를 나타내는 도이다.

<20> 본 발명은 바이오티닐화된 잔기에 접합된 바이오틴-결합 요소를 지닌 세포 결합 성분을 포함하는 비-바이러스 벡터를 제공한다.

<21> 일반적으로, 본 발명의 바이오틴-결합 요소는 바이오틴과 결합하며 당해 분야의 숙련가에게 용이하게 인지될 수 있는 특정의 화학물질이다. 바람직하게는, 바이오틴-결합 요소는 아비딘, 스트렙트아비딘, 또는 아비딘 또는 스트렙트아비딘의 동족체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

<22> 본 발명의 세포 결합 요소는 몇몇의 상이한 양태중 하나일 수 있다. 예를 들어, 세포 결합 요소는 모노클로날 항체일 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 모노클로날 항체는 항원에 특이적으로 결합하는 것들이다. 이와 같은 항체가 결합하는 항원의 대표적인 예는 표피 성장 인자 수용체, c-erbB2 항원, 루이스 Y 항원, 트랜스페린 수용체, MDR1, MDR3, 인슐린 수용체, CD45, CD33, GP240, GD2, GD3, 섬유아세포 성장 인자 수용체, 혈소판 기원 성장 인자 수용체이다.

<23> 달리, 세포 결합 요소는 세포 표면 수용체와 특이적으로 결합하는 리간드이다. 세포 표면 수용체와 결합하는 리간드의 대표적인 예는 형질전환성장 인자-α, 헤레굴린(heregulin), 섬유아세포 성장 인자, 혈소판-기원 성장 인자 수용체를 포함한다.

<24> 일반적으로, 바이오티닐화된 잔기는 적절하게 바이오티닐화될 수 있고 세포내에 특이적으로 도입되어 특수한 생물학적 효과 또는 약리학적 효과를 발휘하는 것이 요구되는 화학물질인 어떠한 화합물일 수 있다. 따라서, 바이오티닐화된 잔기는 단백질 또는 핵산일 수 있다.

<25> 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 단백질의 대표적 예는 겔로닌, 라이신, 사포린, 아브린, 디프테리아 독소, 슈도모나스 외독소, 라이알라제, 슈퍼옥사이드 디스뮤타제, 단백질 타이로신 포스파타제, 단백질 포스파타제(PP-1 또는 PP-2), 단백질 키나제 A 및 단백질 키나제 C이다.

<26> 핵산의 대표적인 예는 삼중 나선형 올리고뉴클레오타이드(예: 삼중, EGF 수용체 올리고뉴클레오타이드), 안티-센스 올리고뉴클레오타이드(예: EGF 또는 myc에 대한 안티-센스 올리고뉴클레오타이드), 부분 유전자 서열(예: c-src 또는 EGF 수용체와 같은 몇몇 도메인과 단백질의 단일 도메인을 암호화하는 서열) 및 예를 들어, 레트로바이러스 게놈의 통합성 단위로부터 취한 전체 유전자이다.

<27> 본 발명은 또한 바이오티닐화된 잔기에 접합된 바이오틴-결합 요소를 지닌 세포 결합 성분을 포함하는 비-바이러스 벡터를 사람에게 투여함을 포함하여, 특이 세포내로 유전물질을 도입하는 방법을 제공한다.

<28> 본 발명은 또한 비-바이러스 벡터를 사람에게 투여함을 포함하여, 세포독성 잔기를 세포로 수송하는 방법을 제공한다.

<29> 본 발명은 바이러스 감염 성분 또는 바이러스 형질감염 성분을 사용하지 않고 핵산을 세포의 특이적 부류(subset) 내에 도입시키는 방법 및 조성물을 포함한다. 세포-표면 성분에 대해 지시된 모노클로날 항체는 변형되어 유전자 발현을 변형시킬 수 있는 핵산을 세포내 구획으로 수송하는데 이용됨으로써,

표적 세포내에서 발현된 단백질의 농도를 특이적으로 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 본 발명은 사람에 있어서 안티-센스 핵산 기술에 적용시킬 수 있다.

<30> 세포 표면 성분에 대해 지시된 모노클로날 항체는 바이오틴-결합 잔기, 및 유전자 발현을 변화시켜 핵산 서열의 바이오티닐화된 유도체를 사용한 아비딘: 바이오틴 상호작용을 통해 연결하는 방식으로 게놈성 DNA 또는 mRNA 서열에 결합하는 핵산 서열을 사용하여 변형시킨다. 항체: 항원 복합체의 세포내 도입(internalization)을 통해, 활성 핵산 서열이 함께 세포내에 도입됨으로써, 이러한 서열의 세포내 함량이 증가된다. 본 발명의 사용으로 (1) 바이러스 벡터와 관련된 것 이외의 메카니즘에 의해서 또는 원형질막을 통한 단순 확산 또는 촉진 확산을 통해 유전자 발현을 조절하는 핵산 서열의 세포내 함량이 증가되고; (2) 세포내로 이러한 핵산 서열을 도입하는 메카니즘에서와같이 원형질막을 통한 단순 확산의 필요성을 제거함으로써 분자 크기 즉, 활성 핵산 서열의 분자 크기(20-머)가 작아야 하는 제한이 극복되며; (3) 활성 핵산 서열의 세포 함량을 증가시키기 위해 총체적인 수송이나 바이러스 감염을 통하는 것 이외의 항체: 항원 상호작용을 통해 목적 서열이 세포에 특이적 또는 선택적으로 수송된다.

<31> 본 발명의 한 양태에서는, mRNA 해독 개시 코돈의 상부 및 하부로의 뉴클레오타이드(10)에 걸쳐 있는 발암성 단백질에 대한 안티-센스 DNA가 합성된다. 다음, 이렇게 합성된 안티-센스 DNA의 처음 5개 뉴클레오타이드와 상보적인 DNA가 합성된다. 이후, 이 서열내로 바이오틴-뉴클레오타이드 잔기가 혼입된다. 이 2개의 쇄는 하이브리드화된 다음, 종양을 표적화하는 MAb 아비딘/스트렙트아비딘을 통해 종양으로 수송된다.

<32> 하기 실시예는 본 발명의 다양한 양태를 단순히 설명할 목적으로 제공될 것이며 어떠한 양식으로든 본 발명을 제한함을 의미하지는 않는다.

실시예

<33> 실시예 1

<34> 항체 A108의 변형

<35> A108은 표피 성장 인자에 대한 사람 수용체를 인지한다. 포스페이트-완충된 염수 2.2ml중 A108 10mg을 12×75mm 유리 튜브에 가한다. 항체 9.35㎕ 분취량 및 디메틸포름아미드중 3mg/ml의 스톡으로부터의 SPDP(N-석신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트) 2.5배 몰 과량을 볼텍싱하면서 튜브에 서서히 가한다. 이 혼합물을 실온에서 30분 항온 처리하는 동안 매 5분 씩 볼텍싱 한다.

<36> 과량의 반응하지 않은 SPDP를 샘플로부터 0.5mm EDTA를 함유하는 100mm의 나트륨 포스페이트 완충액(pH 7.0) 중에 예비-평형화시킨 세파덱스 G-25 컬럼(1.5×37cm) 상에서 겔 여과 크로마토그래피하여 제거한다. 1ml 분획을 완충액 용출 동안 길슨 분획 수집기(Gilson fraction collector) 상에서 수집한다. 분획을 96-웰 미세역가 플레이트(Falcon 제조원) 내에서 브래드포드 염료 결합 검정(Bradford dye binding assay)을 사용하여 단백질 함량에 대해 분석한다. 각 웰은 120㎕의 PBS, 40㎕의 염료 농축물 및 40㎕의 샘플을 함유한다. 540nm의 바이오텍 마이크로플레이트 자동판독기(BioTek Microplate Autoreader) 상에서 흡광도를 판독한다. 분획 30 내지 38을 혼합시켜 4℃로 유지한다.

<37> 도 1은 공유 결합을 통한 항-EGFr 항체(A108)로의 SPDP의 부가를 나타낸다. A108은 SPDP를 사용하여 N-말단 아미노산 변형과 라이신을 통해 변형된다. 반응하지 않은 물질을 겔 여과에 의해 고 분자량 A108로부터 제거한다. SPDP-변형된 A108의 용출 프로필은 도 1에 나타낸다. 도 1은 변형된 A108이 SPDP 접합후에 회수됨을 입증하고 있다.

<38> 실시예 2

<39> 아비딘-난백의 변형

<40> 2.5ml의 2회 희석된 물(ddH_2O) 중 10mg의 아비딘을 300㎕의 0.5mM TEA/HCl과 28㎕의 0.1mM EDTA 스톡 용액을 첨가하여 희석시켜 60mM TEA/HCl(트리-에탄올아민, pH 8.0)과 1mM의 EDTA가 함유되도록 한다. 최종 용량은 2.8ml이다. 다음 17㎕의 2-아미노-티올란(2-IT) TEA/HCl(pH 8.0)을 가하여 최종 농도가 3mM이 되도록 한다. 이 샘플을 질소 가스 스트림하 4℃에서 90분간 항온 처리한다. 과량의 반응하지 않은 2-IT를 50mM NaCl과 1mM EDTA가 함유된 5mM 비스-트리스/아세테이트 완충액(pH 5.8)으로 예비-평형화시킨 G-25 세파덱스 컬럼(1.5 × 38cm)(Pharmacia 제조원)을 사용하는 겔 여과 크로마토그래피로 제거한다. 용출된 분획의 단백질 함량을 브래드포드 염료 결합 검정으로 측정한다. 흡광도는 540nm의 바이오텍 마이크로플레이트 자동판독기 상에서 판독한다. 분획 27 내지 38(각각 1ml)을 혼합시킨다. 2-이미노티올란으로 변형시킨 아비딘을 도 2에 나타낸 바와 같이 겔 여과로써 회수한다.

<41> 실시예 3

<42> 항체 A108과 아비딘의 접합

<43> 변형된 항체와 변형된 아비딘 분획을 함께 4℃에서 질소 가스 스트림하에 20시간 동안 항온처리한다(총 용량 15.5ml). 0.1M 요오도아세트아미드(0.310ml)의 용액을 가하여 최종 농도가 2mM이 되도록 함으로써 나머지 유리 설프하이드릴 그룹을 차단하고, 실온에서 1시간 동안 계속 항온처리한다. SPDP-변형된 A108과 2-이미노티올란-변형된 아비딘을 함께 항온 처리하면 A108이 SPDP에 의해 공급된 설프하이드릴 결합을 통해 아미딘에 공유결합된다; 2-아미노티올란 화학.

<44> A108-아비딘(도 3에서 접합체로서 표시됨)으로 구성된 면역접합체를 반응하지 않은 아비딘으로부터 겔 여과에 의해 분리한다. 분획 7 내지 9로 용출되는 단백질 피크는 변형되지 않은 A108과 회수되어 추가로 정제되는 A108-아비딘을 나타낸다.

<45> 실시예 4

<46> 접합체의 정제

<47> 접합되지 않은 아비딘을 반응 혼합물로부터 20mM 트리스와 150mM NaCl(pH 7.4)로 예비-평형화시킨 파마시아 FPLC 슈퍼덱스 S-200 컬럼(pharmacia FPLC Superdex S-200 column; 2.6×60cm) 상에서의 겔 여과로 제거한다[도 3].

<48> 항체-아비딘 접합체와 유리 항체 분획(6 내지 10)을 혼합하여 PBS에 대해 4℃에서 밤새 투석시킨다(Spectra/Par molecular porous membrane tubing #2 MWCO 12,000-14,000). 유리 항체를 혼합물로부터 PBS(20mM Na-K-포스페이트, 150mM NaCl, pH 7.0)로 예비 평형화시킨 콘카발린-A(벡터) 아가로즈 결합 친화성 컬럼(1.5cmx7cm)을 사용하여 제거한다. 샘플을 로딩한 후, 컬럼을 1M NaCl이 함유된 PBS(pH 7.0) 40ml로 1회 세척하고, 접합체를 200mM의 메틸-D-만노즈가 함유된 PBS(pH 7.0)로 용출시킨다(분획 34 내지 38; 각각 2ml). 용출된 분획의 단백질 함량을 280nm에서 바리언 분광측정기(Varian Spectrophotometer)로 측정한다.

<49> 아비딘 상에서 탄수화물 잔기의 결합을 통해, A108-아비딘을, α-메틸만노사이드(아비딘 상에 존재함)와 결합하는 식물 렉틴 콘카나발린 A(Con A)의 고정화된 지지체상에서 체류시켜, A108로부터 분리한다. 유리 항체는 α-메틸만노사이드를 지니지 않으며 이는 Con A 컬럼(도 4상에서 유리 Ab로서 나타냄)을 통해 세척한다. A108-아비딘(접합체로서 표지됨)은 Con A-세파로즈 컬럼으로부터 용액중 α-메틸만노사이드를 사용한 용출로써 교체시킨다. 이러한 방법으로 접합체를 회수하며 이는 변형되지 않은 A108을 지니지 않는다.

<50> A108-아비딘 접합체의 순도를 단백질 분자 크기를 기준으로 하여 단백질을 분리하는 나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 모니터한다. 7.5% 아크릴아미드 SDS-PAGE 미니 겔을 작동시켜 접합체의 정제 단계를 시험한다. 도 5에 나타낸 바와 같이, A108, 아비딘 또는 A108-아비딘의 접합체를 나타내는 단백질을 분리하고 단백질이 폴리아크릴아미드 겔내에서 꼬마지에 블루 염료로 염색된후 탈색되어 배경색이 제거되었을 때 가시화된다. 레인 7(Con A 컬럼으로부터 용출됨)에 적용시킨 샘플은 정제된 면역접합체(A108-아비딘)이며 이는 연속된 연구에 사용된다.

<51> 바이오틴에 결합하여 진핵 세포내로 도입되는 A108-아비딘의 능력은 세포내로 도입된 경우에만 독성 활성을 지니는 바이오티닐화된 단백질(즉, 식물 단백질인, 겔로닌)을 사용하여 입증할 수 있다. 정제된 겔로닌 단백질을 겔로닌 상에서의 라이신 잔기를 따라 NHS-바이오틴과 공유 결합시킴에 의해 바이오틴으로 화학적 변형시키고 겔 여과에 의해 결합하지 않은 바이오틴으로부터 정제한다.

<52> 실시예 5

<53> 겔로닌의 바이오티닐화

<54> 사용된 바이오틴은 N-하이드록시 석신이미드 에스테르 장쇄(NHS-LC) 바이오틴(Pierce Chemical Co. 제조원)의 형태이다. 겔로닌에 대해 5배 몰과량의 바이오틴(겔로닌 1mg에 대해 바이오틴 0.1mg)을 사용한다. 겔로닌 스톡은 2ml이 50mM 중탄산염 완충액(pH 8.5)중 2mg의 겔로닌이다. 5mg의 바이오틴을 50㎕의 무수 디메틸포름아미드(DMF) 중에 용해하고 즉시 20㎕(0.2mg)의 이 바이오틴 용액을 투명한, 무수 13x100mm 유리 튜브내 겔로닌에 가한다. 이 샘플을 볼텍싱하고 빙상에서 2시간 항온 처리한다. 2시간후, 유리 바이오틴을 PBS(pH 7.0)로 평형화시킨 1.5cmx37cm G-25 컬럼상에서의 겔 여과 크로마토그래피로 분리한다. 1ml 분획을 길슨 분획 수집기내에서 수집하여 브래드포드 염료 결합 검정으로 단백질 함량에 대해 검정한다. 분획 21 내지 27을 혼합시킨다.

<55> 바이오틴이 겔로닌내로 혼입되었는지를 입증하기 위해, 바이오티닐화된 겔로닌을 폴리스티렌 지지체상에서 겔로닌 단백질에 대해 지시된 항체를 사용하여 고정시킨다. 제시된 양의 변형되지 않은 겔로닌 또는 바이오티닐화된 겔로닌을 항-겔로닌 항체를 함유하는 웰내에서 항온처리한다. 겔로닌과 바이오틴의 정체는 웰을 세정하고 스트렙트아비딘을 가함에 의해서 검출되는데, 이는 효소 서양고추냉이 퍼옥시다제에 화학적으로 접합되어, 무색의 퍼옥시다제 기질(ABTS)과 함께 항온처리하는 경우, 녹색으로 되므로 405nm 파장에서의 분광측정기에 의해 측정될 수 있다. 405nm에서의 흡광도 양은 겔로닌 분자내에 혼입된 바이오틴의 양에 직접 비례한다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 바이오티닐화시킨 겔로닌은, 검정시 바이오티닐화된 겔로닌의 증가량으로 인해 녹색이 증가되는 것을 기준으로 할 때, 바이오틴을 보유한다. 이 결과는 바이오틴이 겔로닌 분자내로 혼입될 수 있으며 바이오틴에 대해 친화성이 있는 단백질에 의해 인지될 수 있음을 입증한다.

<56> 실시예 6

<57> 바이오티닐화된 겔로닌의 활성

<58> 쥐 모노클로날 항-겔로닌 항체(10Ci) 0.583mg/ml의 스톡 용액(10㎕)을 12ml의 피복 완충액(50mn $NHCO_3$ (중탄산나트륨, pH: 9.6) 1㎍/ml 용액) 중에 희석시킨다. 다중-채널 피펫터(pipetor)를 사용하여 팔콘(Falcon) 96-웰 미세역가 플레이트의 각 웰을 50㎕(50ng/웰)로 피복한다. 샘플을 회수하여 밤새 냉장한다. 대략 12시간 후, 샘플을 PBS-0.05% 트윈-20으로 3회 세정하고 PBS중 5% 소 혈청 알부민으로 실온에서 1.5시간 차단시킨다. 다음 샘플을 PBS 및 0.05% 트윈-20으로 3회 세척한다.

<59> PBS중 겔로닌 용액을 2mg/ml 농도로 제조한다. 다음 PBS중 바이오 티닐화된 겔로닌 용액을 2mg/ml의 농도에서 제조한다. PBS중 BSA 1mg/ml 용액 100㎕를 플레이트에 가하여 첫번째 열이 비도록 한다. 이 열의 첫번째 1/2에 200㎕/웰의 스톡 겔로닌 용액을 가하고, 열의 두번째 1/2에 200㎕/웰의 바이오티닐화된 스톡 용액을 가한다. 다중-채널 피펫터를 사용하여, 이 첫번째 열로부터 100㎕를 회수하고 두번째 열내에서 100㎕의 BSA-PBS와 혼합한다. 이러한 공정을 플레이트를 가로질러 좌측에서 우측으로 반복함으로써 단백질을 연속 희석시킨다. 플레이트를 덮고 실온에서 1.5시간 동안 항온처리한다. 플레이트의 웰을 PBS-0.05% 트윈-20으로 3회 세척한다. 1mg/ml BSA-PBS 중에서 1:6000으로 희석시킨 100㎕의 아비딘 퍼옥시다제(Boehringer-Mannheim 제조원)를 가한다. 다음 이 플레이트를 실온에서 1.5시간 항온처리한 후 PBS-0.05% 트윈-20으로 3회 세척한다. 최종적으로, 100㎕의 ABTS(2, 2^1-아미노-비스(3-에틸 벤즈 티아졸린

-6-설폰산)) 하이드로겐 퍼옥사이드를 가한다. 이 플레이트를 405nm에서의 바이오텍 래보라토리즈 마이크로플레이트 자동판독기(BioTek Laboratories Microplate Autoreader) 상에서 판독한다[도 6B].

<60> 실시예 7

<61> 바이오티닐화된 겔로닌과 A108-아비딘의 접합

<62> A108-아비딘에 의해 5몰 과량의 바이오티닐화된 겔로닌을 사용한다. 1ml(250㎍)의 A108-아비딘을 175㎕(175㎍)의 바이오티닐화된 겔로닌과 합한다. 이 샘플을 볼텍싱하고 실온에서 1시간 동안 함께 항온처리한다.

<63> 혼합물로부터 접합되지 않은 겔로닌을 제거하기 위해, 혼합물을 0.5M NaCl을 함유하는 20mm 트리스(pH 7.4)로 예비-평형화시킨 파마시아 FPLC G-55(1.6x60cm) 겔 여과 컬럼에 적용시킨다. 1ml 분획을 수집하여 280nm에서 바리언 분광측정기로 판독한다. A108-아비딘 바이오티닐화된 겔로닌 표지된 접합체를 나타내는 피크를 도 7에 나타내며 이는 결합되지 않은 겔로닌 또는 유리 아비딘 아단위를 지니지 않는다.

<64> A108-아비딘과 바이오티닐화된 겔로닌의 접합을 바이오티닐화된 겔로닌에 대해 전술한 바와 동일한 엘리자 검정으로 시험한다. 도 8에 나타낸 바와 같이, 바이오틴 함량은 바이오티닐화된 겔로닌 또는 바이오티닐화된 겔로닌: 아비딘-A108이 검정에서 시험되는 경우 녹색 형성에 의해 검출한다. 즉, 접합체는 실제적으로 바이오티닐화된-겔로닌을 함유한다.

<65> 실시예 8

<66> 431 세포 상에서 A108-아비딘/바이오티닐화된 겔로닌의 세포독성

<67> A431 세포를 비필수 아미노산, 100mM 글루타민 및 50㎕의 젠타마이신(Tri-Bio Laboratories 제조원)과 5% 태아 송아지 혈청과 5% 송아지 혈청을 포함하는 성장 배지(MEM-최소 필수 배지) 내에서 $3x10^4$ 세포/ml로 희석시킨다. 100㎕의 용액을 96-웰 미세역가 플레이트(Falcon 제조원)의 각 웰에 가하고 5% CO_2 인큐베이터내 37℃에서 밤새 배양한다. 다음날, 성장 배지중 A108-겔로닌 접합체(A108-아비딘을 제조하는데 사용된 동일한 화학을 통해 서로 공유 결합된 SPDP 변형된 A108과 2-IT 변형된 겔로닌을 사용한 A108-겔로닌의 직접적인 접합체)의 2㎍/ml 용액을 제조하고, 0.22 마이크론 아크로디스크(0.22 micron Acrodisc: Gilman 제조원) 주사기 여과기로 여과하여, 10개의 15ml 원심분리 튜브(Corning 제조원)내로 연속하여 희석시킨다. A108-아비딘: 바이오티닐화된 겔로닌을 유사하게 제조하고 100㎕의 각각의 희석물을 플레이트에 3회 가한다. 플레이트 중에 이미 100㎕의 배지가 존재하므로 각각의 접합체에 있어 최종 농도는 1㎍/ml이다. 대조하기 위해, 각각 100배 몰과량(100㎍/ml)의 항체 A108을 첨가한 것을 각각에 가하는 것외에는 동일한 방법으로 접합체를 제조한다. 세포를 3일간 항온처리한 후 20% 메탄올 중에서 0.5% 크리스탈 바이올렛으로 염색하고 희석수중에서 세정한 다음 소렌슨 완충액(Sorenson's buffer) 150㎕를 가하여 세포로부터 염료를 추출한다. 다음 이 플레이트를 540mm에서의 마이크로플레이트 자동판독기내에서 판독한다.

<68> 도 9는 세포 독성을 유도시킬 수 있는 세포의 내부로 겔로닌을 이동시키는 접합체의 능력을 나타낸다. 접합체는 세포 표면에서 EGF 수용체를 발현하는 세포 표면(A431)과 함께 항온처리한다. 접합체의 세포내 도입으로 겔로닌의 세포내 효과가 일어나는데, 즉 세포독성이 일어난다. 도 9에 나타낸 바와 같이, 접합체를 이들 세포와 함께 항온처리하는 경우, A431 세포를 사멸시킨 mM 농도($1x10^{-6}$몰)는 A108-아비딘이 바이오티닐화된-겔로닌을 A431 세포내로 도입시킬 수 있음을 입증한다(○로 나타냄). 세포를 면역접합체 농도와 비교하여 초 과량의 유리 A108 항체와 함께 항온처리하는 경우 A431 세포내로 도입하는 A108-아비딘: 바이오티닐화된-겔로닌의 능력은 저해된다. 유리 A108은 세포 표면상에서 모든 유용한 EGF 수용체와 결합하므로, 면역접합체가 EGF 수용체와의 결합으로부터 억제되고 A431 세포의 내부로 겔로닌이 도입된다. 도 9에 나타낸 바와 같이, A108이 면역접합체의 농도와 비교하여 100-배 과량으로 존재하는 경우(●로 나타냄), A431 세포는 생존가능하며, 이는 면역 접합체가 세포내로 도입되어 세포를 중독시키는 유일한 방법이 EGF 수용체에 결합하여 세포내 도입되는 면역 접합체의 능력에 있음을 입증하고 있다. A108-겔로닌의 직접적인 공유결합 접합체는 또한 A431 세포를 사멸시키는데 있어 겔로닌을 A431 세포의 세포내 구획내로 도입시킴에 의해 활성화 된다(△로 표시). 이러한 직접적인 접합체와 100-배 몰 과량의 유리 A108의 도입은 겔로닌에 의한 중독으로부터 세포를 보호하는데, 이러한 사실은 A108-겔로닌이 EGF 수용체와 상호작용하여 세포내 도입되는 자체의 능력에 의해 세포의 내포내 구획으로 도입됨을 증명하고 있다. 따라서, 아비딘: 바이오틴 상호작용의 이용으로, 세포내 도입된 세포상에서 항원을 인지한 후 항원(이 경우에는 EGF 수용체)과 결합할 수 있는 항체가 존재하는 세포내 구획내로 지시되고 운반되는 경우, 세포의 세포내 구획내로 분자가 도입될 것이다.

<69> 실시예 9

<70> EGF 수용체 단백질의 발현시 삼중 나선을 형성하는 핵산 서열의 효과

<71> 정상 세포내에서 EGF 수용체 단백질의 발현을 억제하는 삼중-나선형성 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산 서열의 능력을 입증한다. A431 세포를 EGF 수용체 유전자 프로모터 영역에 결합할 수 있는 40μM의 EGF 수용체 유전자 핵산 서열(#5 EGFr) 또는 동일한 핵산 서열을 포함하지만 랜덤 서열 형태로 포함하는 비-센스 대조군 서열과 함께 72시간 동안 항온처리한다.

<72> #5 EGFr 및 대조군 핵산 서열을 배지중에서 95° 로 2 내지 5분간 가열하고 여과 멸균시킴으로써 제조한다. $2x10^5$ A431 세포를 포함하는 세포 배양 디쉬로부터 성장 배지를 제거한다. 2ml의 배지중에서 40㎛의 최종 농도로 희석시킨 #5EGFr을 1개의 디쉬에 가한다. 대조군 핵산 서열을 2ml의 배지중에서 희석하여 최종 농도가 40μM이 되도록 하고 이 용액을 A431 세포의 제2 디쉬에 가한다. 2ml의 배지만을 제3 디쉬에 가한다. 72시간 동안 항온처리한다. 각각의 디쉬를 빙냉 PBS로 3회 세척함으로써 세포를 수거한다. 세포를 용해시켜 단백질을 추출하기 위해, 1ml의 RIPA 완충액을 가하고 세포를 세포 찰과기(cell scraper)로 해체하여 원심분리 튜브에 이전한다. 각 튜브를 콘테스 세포 파괴기(Kontes cell disrupter)

로 초음파 처리하고 4℃의 소발 울트라 원심분리기(Sorvall Ultra centrifuge) 내에서 100,000xg로 1시간 동안 원심분리한다. 원심분리후, 상층액을 제거하고 BCA 단백질 검정물(Pierce 제조원)을 사용하여 단백질 함량을 측정한다.

<73> 이 추출물증 EGF 수용체를 A108 항체와 불용성 항체-결합 시약인 판소르빈과 함께 면역침전시킨다. 200μg의 단백질을 함유하는 상층액을 2.5μg의 항체 108과 함께 4℃에서 2시간 항온처리한다. 50㎕의 판소르빈을 각각의 샘플에 가하고 볼텍싱하여 4℃에서 30분 동안 항온처리한다. A108-판소르빈에 결합된 EGF 수용체를 세척하여 다른 단백질을 제거한다. 소르발 원심분리기 상에서 12,000rpm으로 1분간(4℃) 원심분리한 후, 상층액을 버린다. 펠렛을 0.1% 트리톤을 함유하는 PBS로 3회 재현탁시킨 후 원심분리하고 각각 재현탁후 원심분리에 의해 재펠렛화함으로써 세척한다. 최종적으로 세척 및 원심분리한 후, 상층액을 버린다.

<74> 각각의 면역침전물중에 존재하는 EGF 수용체를 방사활성(^{32}P) 표지된-ATP와 함께 항온처리함으로써 검출한다. 이 펠렛을 20mM 헤페스(Hepes) 완충액(pH 7.4)중 25㎕의 0.4mM Na 바나데이트 중에 재현탁시킨다. 다음 ^{32}P-표지된 ATP(10μCi)를 함유하는 20mM헤페스 완충액과 12mM $MnCl_2$ 25㎕를 가한다. 샘플을 실온에서 5분간 항온처리한다. EGF 수용체는 ATP로부터의 ^{32}P를 EGF 수용체 자체로 이전시킬 수 있는 효소활성을 지니므로, EGF 수용체로 이전된 ^{32}p의 양은 각각의 분해물로부터의 면역침전물중에서 EGF 수용체의 양에 대한 척도이다. EGF 수용체상에서 방사활성의 양은 유리 ^{32}P ATP로부터 SDS-PAGE에 의해 EGF 수용체를 분리하고 시판하는 X-선 필름을 사용하여 폴리아크릴아미드 겔을 자동방사선사진술로 찍어 방사활성 EGF 수용체를 측정함으로써 비교할 수 있다.

<75> 15㎕의 5x-램리(Laemli) 샘플 완충액을 샘플에 가하고, 이 샘플을 95℃에서 5분간 가열한 후 7.5% 폴리아크릴아미드 겔 상에 로딩한다. 단백질을 14mA에서 밤새 전기영동한다. 겔을 전기영동 단위로부터 제거하고 40% 메탄올, 10% 아세트산, 50% ddH_20 중에서 1시간 동안 고정시킨다. 겔을 바이오래드 583 겔 건조기 상에서 2시간 동안 80℃에서 건조시킨다.

<76> 도 10에서 알 수 있는 바와 같이, 세포를 EGF 수용체 유전자 프로모터 서열(표지된 안티-센스 ECFr)에 대해 지시된 핵산 서열과 함께 항온처리함으로써 랜덤 핵산 서열(표지된 비-센스 EGFr) 또는 완충액 단독(표지된 대조군)과 비교할 때 A431 세포내 EGF 수용체의 농도가 5배 강하된다. 즉, 세포를 EGF 수용체 유전자의 프로모터 영역과 상호작용하는 고 농도의 삼중-나선형성 핵산 서열과 함께 항온처리함으로써 정상 A431 세포내에서 EGF 수용체의 발현이 억제된다.

<77> 실시예 10

<78> A108: 핵산 서열을 A431 세포내로 아비딘: 바이오틴 결합을 통해 도입한다. 핵산 서열이 A108 항체를 사용하여 A431 세포내로 도입시킨 EGF 수용체 유전자 프로모터 서열에 대해 지시되는지를 입증하기 위해, A108-아비딘 화학적으로-결합된 접합체를 제조하여 정제한다. 핵산 서열을 제조하는데 단서열중 한 위치(바람직하게는 서열의 끝 또는 개시부)에서의 정상 뉴클레오타이드를 바이오티닐화된-뉴클레오타이드로 치환시킨다. 이 서열을 A108-아비딘과 함께 항온처리하여 A108-아비딘: 바이오틴-핵산 서열을 함유하는 복합체가 형성되도록 한다. 이 하이브리드 분자를 정제하여 유리된 핵산 서열을 제거하고 A108-아비딘과 연합된 핵산 서열의 양을 측정하여 A431 세포와 함께 항온처리한다. 유전자 발현-억제 핵산 서열이 A431 세포의 정확한 세포내 영역내로 도입되는 경우, 이것은 생화학적으로 측정가능해야 한다. EGF 수용체 발현을 차단하는 핵산 서열의 특이성은 안티-센스 EGFr 간에 형성된 면역접합체, 또는 비-센스 EGFr 간에 형성된 면역접합체를 A108-아비딘으로 시험하고 실시예 9에서 기술한 바와 같이 EGF 수용체 인산화를 계측함으로써 측정한다. 또한, A108:EGF 수용체 복합체의 형성을 통해 세포내로 도입하는 핵산 서열의 능력은 A431 세포와의 항온처리 혼합물중에 몰 초과량의 유리 A108을 포함시킴으로써 시험한다. 항체: 핵산 서열로 구성된 하이브리드 분자의 억제 효과는 유리 A108의 존재하에서 억제되며 이는 핵산이 세포내 도입가능한 세포-표면 항원 즉, EGF 수용체와의 결합을 통해 항체와의 자체 세포내 도입에 의해서 세포내로 도입됨을 확증한다.

<79> 실시예 11

<80> 보다 큰 바이오티닐화된-핵산을 이용하여 이들의 세포내 도입이 A108-아비딘 메카니즘을 통해 중재되는지의 여부를 측정한다. EGF 수용체 농도를 변경시키는데 필요한 A108-아비딘 메카니즘을 통해 세포에 존재하는 핵산 서열의 농도는 용액중의 정상 핵산 서열과 비교한다. 특이적 항원 발현세포에 대해 활성인 핵산 서열(즉, EGF 수용체)을 지시하는 A108-아비딘의 능력은 이 항원을 발현하지 않는 세포를 사용하여 시험한다. 이 항원을 발현하는 세포를 지닌 동물내에서 특이 세포로의 이러한 핵산의 수송을 시험한다. EGF 수용체의 억제를 측정한다. 특이 항원을 발현하지 않는 세포외에 A108-아비딘과 복합체를 형성하는 안티센스 핵산 서열 또는 비-센스 핵산 서열 모두를 이러한 수송 시스템의 특이성 및 이의 세포내 생화학 특이성의 척도로서 사용한다.

<81> 실시예 12

<82> 항원 HER2/Neu(즉 TAb 250)를 발현하는 유방암에 대한 모노클로날항체를 A108 항체에 대해 실시예 1 내지 4에서 기술한 바와 같이 아비딘에 화학적으로 접합시킨다. 항원 c-myc (5'-AACGTTGAGGGGCAT-3')에 대한 안티센스 핵산 서열을 말단 5' 위치에서 아데노신이 교체된 바이오티닐화된 아데닌 뉴클레오타이드를 사용하여 합성한다. 바이오티닐화된 아데닌 핵산 서열을 TAb-250 아비딘과 함께 항온처리하고 TAb-250: 안티센스 c-myc로 구성된 항체-핵산 복합체를 정제한다. 이 복합체를 HER2/Neu를 발현하는 유방종양 세포, 즉 BT-474 세포 또는 이 항원에 대해 음성인 세포, 즉 BT-20 세포와 함께 항온처리한다. 안티센스 핵산에 의한 c-myc의 억제는 처리하지 않은 세포 분해물로부터의 c-myc 단백질에 대한 웨스턴 블롯팅으로 측정한다. c-myc 발현은 HER2/Neu 양성 세포내에서 변화되나 항원 음성 세포내에서는 변화되지 않는다. 또한, 과량(100배)의 변형되지 않는 TAb-250이 항원 양성 세포내 c-myc 상에서 항체-핵산 복합체의 억제 효과를 억제할 수 있는 경우 특이성이 존재함을 의미한다. 바이오티닐화된 핵산 서열은 서열내 바이

오티닐화된- 뉴클레오타이드의 위치를 변화시키거나 c-myc mRNA와 상보성인 서열의 크기를 증가시키고 c-myc mRNA 상에서의 해독 개시 부위 또는 첫번째 스플라이스 연결부를 연장시킴으로써 변화시킨다. 변화를 시험하여 c-myc 발현을 억제하는 HER2/Neu 항원을 발현시키는 유방암 세포에 수송 가능한 가장 특이적이면서도 민감한 안티-센스 서열을 수득한다.

<83> 실시예 13

<84> 모노클로날 항체 A108은 실시예 1 내지 4에서 기술한 바와 같이 아비딘에 화학적으로 접합된다. 기본적인 섬유아세포 성장 인자(bFGF) mRNA 해독 개시 부위(5'-GGCTGCCATGGTCCC-3')에 대해 상보적인 서열을 나타내는 안티-센스 올리고뉴클레오타이드를 5'-말단 위치에서 변형되지 않은 뉴클레오타이드 대신 바이오티닐화된 구아노신을 사용하여 화학적으로 합성한다. 이 서열을 A108-아비딘과 함께 항온처리하여 항체: 핵산 복합체를 형성시키고 복합체를 형성하지 않은 핵산으로부터 정제한다. 이 복합체를, EGF 수용체를 발현하며 이들의 자체 성장을 증진시키기 위한 bFGF의 자체 합성이 세포에 임계적으로 의존하는 사람 교종 세포(SNB-19)와 함께 항온처리한다. 이 접합체를 항온처리한 후, SNB 세포 성장을 계측하여 이들 표적 세포내 bFGF의 발현을 방지함에 의한 성장 억제 정도를 측정한다. 상술한 바와 같이, 과량의 A108을 A108: 핵산 복합체와 함께 항온처리하여 특이성을 평가하고 항원의 세포내 도입을 통한 안티센스 서열의 도입 메카니즘을 확인한다.

<85> 실시예 14

<86> 몇몇의 사람 암에서 루이스 Y 항원에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체인 BR96을 상술한 바와 같이 아비딘에 화학적으로 접합시킨다. c-H3-ras 5' 플랭킹 mRNA 서열에 대해 상보성인 안티센스 올리고뉴클레오타이드 5'-CAGCTGCAACCCAGC-3'를 5' 위치에서 변형되지 않은 사이토신 대신 바이오티닐화된 사이토신 뉴클레오타이드를 사용하여 화학적으로 합성한다. BR96-안티센스 ras 올리고뉴클레오타이드를, 루이스 Y 항원을 발현하며 또한 c-Ha-ras 온코진을 포함하는 T24 방광 암 세포와 함께 항온처리함으로써 형성시킨다. 면역: 핵산 복합체를 T24 세포와 함께 항온처리한 후, ras 온코진산물 p21을 웨스턴 블롯팅으로 모니터한다. 세포 성장을 또한 모니터한다. 루이스 Y 항원의 세포내 도입을 통한 안티센스 분자의 세포내 수송에 의한 ras 온코진 효과의 상쇄를 입증한다.

<87> 실시예 15

<88> A108-아비딘 화학 복합체를 상술한 바와 같이 합성하고 특이적인 암세포에 대해 세포독성인 합성된 이본쇄 RNA 분자를 세포내 도입하는데 사용한다. 이노신의 중합체(PI)를 화학적으로 합성하고(40머) 바이오틴으로 유도체화시킨 말단 사이토신을 지닌 폴리사이토신(PC) 39머로 하이브리드화한다. 이 이본쇄 RNA 분자를 A108-아비딘과 함께 항온처리하고 A108-아비딘: 바이오틴-PC:PI 복합체를 정제하여 EGF 수용체를 발현하며 PI:PC (dsRNA)에 대해 세포독성적으로 민감성인 ME-180 경부암 세포의 성장 배지에 적용시킨다. EGF 수용체의 세포내 도입을 통한 dsRNA의 세포내 수송은 이 작제물과 함께 항온처리한 후 세포 생존능을 모니터함으로써 측정한다. 이 접합체와의 항온처리에 의해 유도된 세포독성은 핵산을 세포의 특이적 부위내로 비-비이러스 벡터를 사용함으로써 수송시킬 수 있음을 보여준다.

<89> 본 명세서에서 언급된 모든 특허 및 공보는 본 발명이 속하는 분야의 숙련가의 지식에 속한다. 모든 특허 및 공보는 각각 개개의 공보가 특이적으로 및 개별적으로 참조로서 도입되도록 하는 수준과 동일하게 본원에서 참조로써 도입되었다.

<90> 당해 분야의 숙련가들은 본 발명이 언급된 목적을 수행하고 목적 및 장점을 수득하기 위해 잘 적용됨을 쉽게 인지할 것이다. 본 실시예와 본원에 기술된 방법, 처리, 분자 및 특이적 화합물은 현재 바람직한 양태의 대표적인 것이고, 예시적인 적으로 본 발명의 영역을 한정하는 것으로서 해석되지는 않는다. 특허청구 범위의 영역으로서 정의되는 바와 같이 본 발명의 취지내에 포함되는 변형 및 다른 용도가 당해 분야의 숙련가에 의해 이루어질 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

바이오티닐화된 잔기에 접합된 바이오틴-결합 요소를 지닌 세포 결합 성분을 포함하는 면역접합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 바이오틴 결합 요소가 아비딘, 스트렙트아비딘, 및 아비딘 또는 스트렙트아비딘의 동족체로 이루어진 그룹중에서 선택되는 면역접합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 세포 결합 성분이 모노클로날 항체인 면역접합체.

청구항 4

제3항에 있어서, 모노클로날 항체가 표피 성장 인자 수용체, c-erbB2 항원, 루이스 Y 항원, 트랜스페린 수용체, MDR1, MDR3, 인슐린 수용체, CD45, CD33, GP240, GD2, GD3, 섬유아세포 성장 인자 수용체 및 혈소판 기원 성장 인자 수용체로 이루어진 그룹중에서 선택된 항원에 특이적으로 결합하는
면역접합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 세포 결합 성분이 혈질전환 성장 인자-α, 헤레굴린, 섬유아세포 성장 인자 및 혈소판 기원 성장 인자 수용체로 이루어진 그룹중에서 선택된 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합하는

리간드인 면역접합체.

청구항 6

제1항에 있어서, 바이오티닐화된 잔기가 단백질 및 핵산으로 이루어진 그룹중에서 선택되는 면역접합체.

청구항 7

바이오티닐화된 잔기에 접합된 바이오틴-결합 요소를 지닌 세포 결합 성분을 포함하는 면역접합체로서, 당해 면역접합체가 세포내로 도입됨과 동시에 바이오티닐화된 잔기에 접합된 바이오틴-결합 성분이 당해 세포내로 도입됨을 특징으로 하는, 유전 물질을 특정 세포내로 도입하기 위한 면역접합체.

청구항 8

제7항에 있어서, 바이오틴 결합 요소가 아비딘, 스트렙트아비딘, 및 아비딘 또는 스트렙트아비딘의 동족체로 이루어진 그룹중에서 선택되는 면역접합체.

청구항 9

제8항에 있어서, 세포 결합 성분이 모노클로날 항체인 면역접합체.

청구항 10

제9에 있어서, 모노클로날 항체가 표피 성장 인자 수용체, c-erbB2 항원, 루이스 Y 항원, 트랜스페린 수용체, MDR1, MDR3, 인슐린 수용체, CD45, CD33, GP240, GD2, GD3, 섬유아세포 성장 인자 수용체 및 혈소판 기원 성장 인자 수용체로 이루어진 그룹중에서 선택된 항원에 특이적으로 결합하는
면역접합체.

청구항 11

제7항에 있어서, 세포 결합 성분이 혈질전화 성장 인자-α, 헤레굴린, 섬유아세포 성장 인자 및 혈소판 기원 성장 인자 수용체의 이루어진 그룹중에서 선택된 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합하는 리간드인 면역접합체.

청구항 12

제7항에 있어서, 바이오티닐화된 잔기가 핵산인 면역접합체.

청구항 13

제12항에 있어서, 핵산이 삼중 나선형 올리고뉴클레오타이드, 안티-센스 올리고뉴클레오타이드, 부분 유전자 서열 및 전체 유전자로 이루어진 그룹중에서 선택되는 면역접합체.

청구항 14

바이오티닐화된 잔기에 접합된 바이오틴-결합 요소를 지닌 세포 결합 성분을 포함하고 바이오티닐화된 잔기가 겔로닌, 라이신, 사포린, 아브린, 디프테리아 독소, 슈도모나스 외독소, 라이알라제, 슈퍼옥사이드 디스뮤타제, 단백질 타이로신 포스파타제, 단백질 포스파타제(PP-1 또는 PP-2), 단백질 키나제 A 및 단백질 키나제 C로 이루어진 그룹중에서 선택됨을 특징으로 하는, 세포독성 잔기를 세포로 수송하기 위한 면역접합체.

청구항 15

제14항에 있어서, 바이오틴 결합 요소가 아비딘, 스트렙트아비딘, 및 아비딘 또는 스트렙트아비딘의 동족체로 이루어진 그룹중에서 선택되는 면역접합체.

청구항 16

제15항에 있어서, 세포 결합 성분이 모노클로날 항체인 면역접합체.

청구항 17

제14항에 있어서, 모노클로날 항체가 표피 성장 인자 수용체, c-erbB2 항원, 루이스 Y 항원, 트랜스페린 수용체, MDR1, MDR3, 인슐린 수용체, CD45, CD33, GP240, GD2, GD3, 섬유아세포 성장 인자 수용체 및 혈소판 기원 성장 인자 수용체로 이루어진 그룹중에서 선택된 항원에 특이적으로 결합하는 면역접합체.

청구항 18

제14항에 있어서, 세포 결합 성분이 혈질전환 성장 인자-α, 헤레굴린, 섬유아세포 성장 인자 및 혈소판 기원 성장 인자 수용체로 이루어진 그룹중에서 선택된 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합하는 리간드인 면역접합체.

청구항 19

제5항에 있어서, 단백질이 겔로닌, 라이신, 사포린, 아브린, 디프테리아 독소, 슈도모나스 외독소, 라이알라제, 슈퍼옥사이드 디스뮤타제, 단백질 타이로신 포스파타제, 단백질 포스파타제(PP-1 또는 PP-2), 단백질 키나제 A 및 단백질 키나제 C로 이루어진 그룹중에서 선택되는 면역접합체.

청구항 20

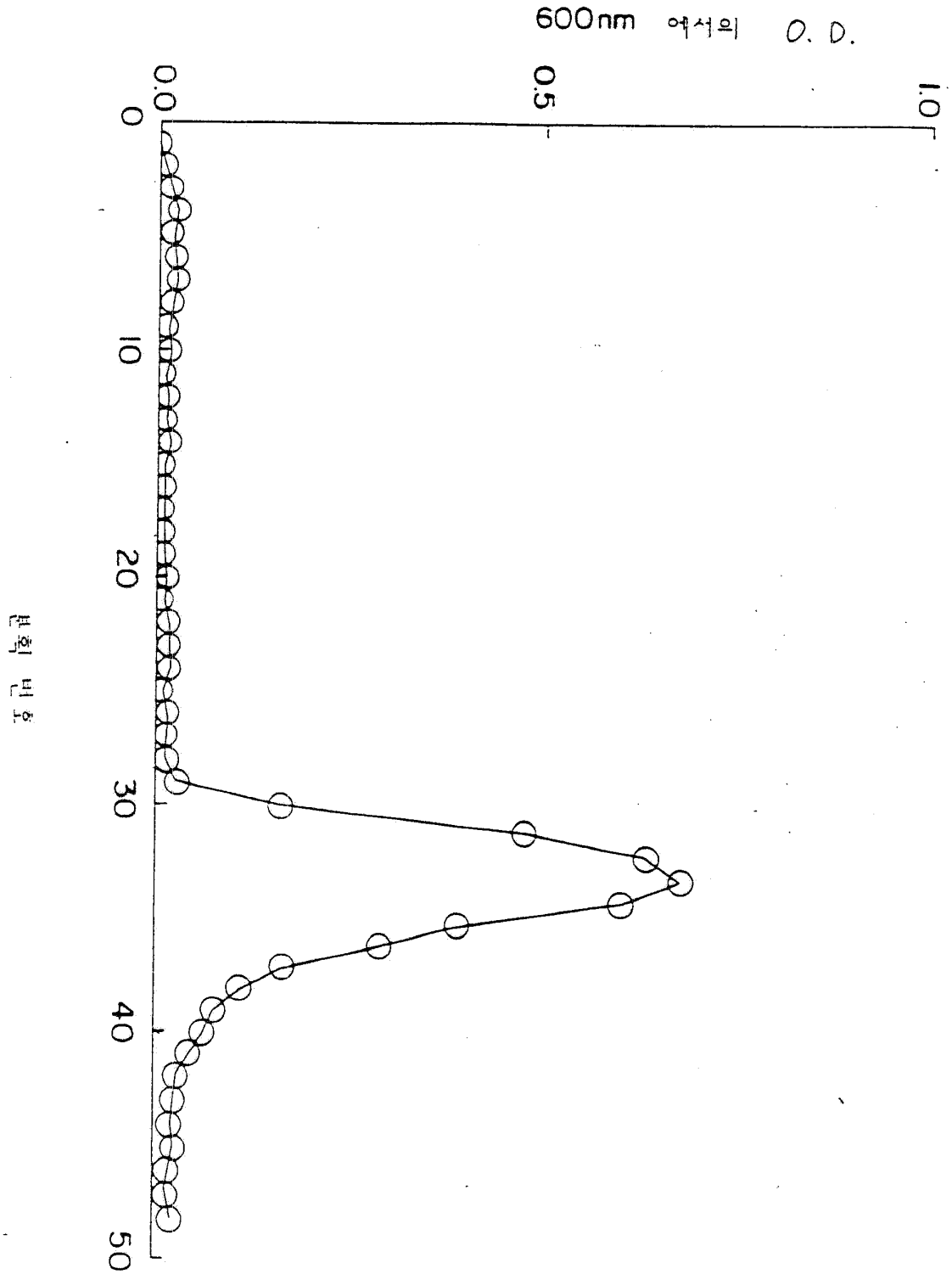
제6항에 있어서, 핵산이 삼중 나선형 올리고뉴클레오타이드, 안티-센스 올리고뉴클레오타이드, 부분 유전자 서열 및 전체 유전자로 이루어진 그룹중에서 선택되는 면역접합체.

요약

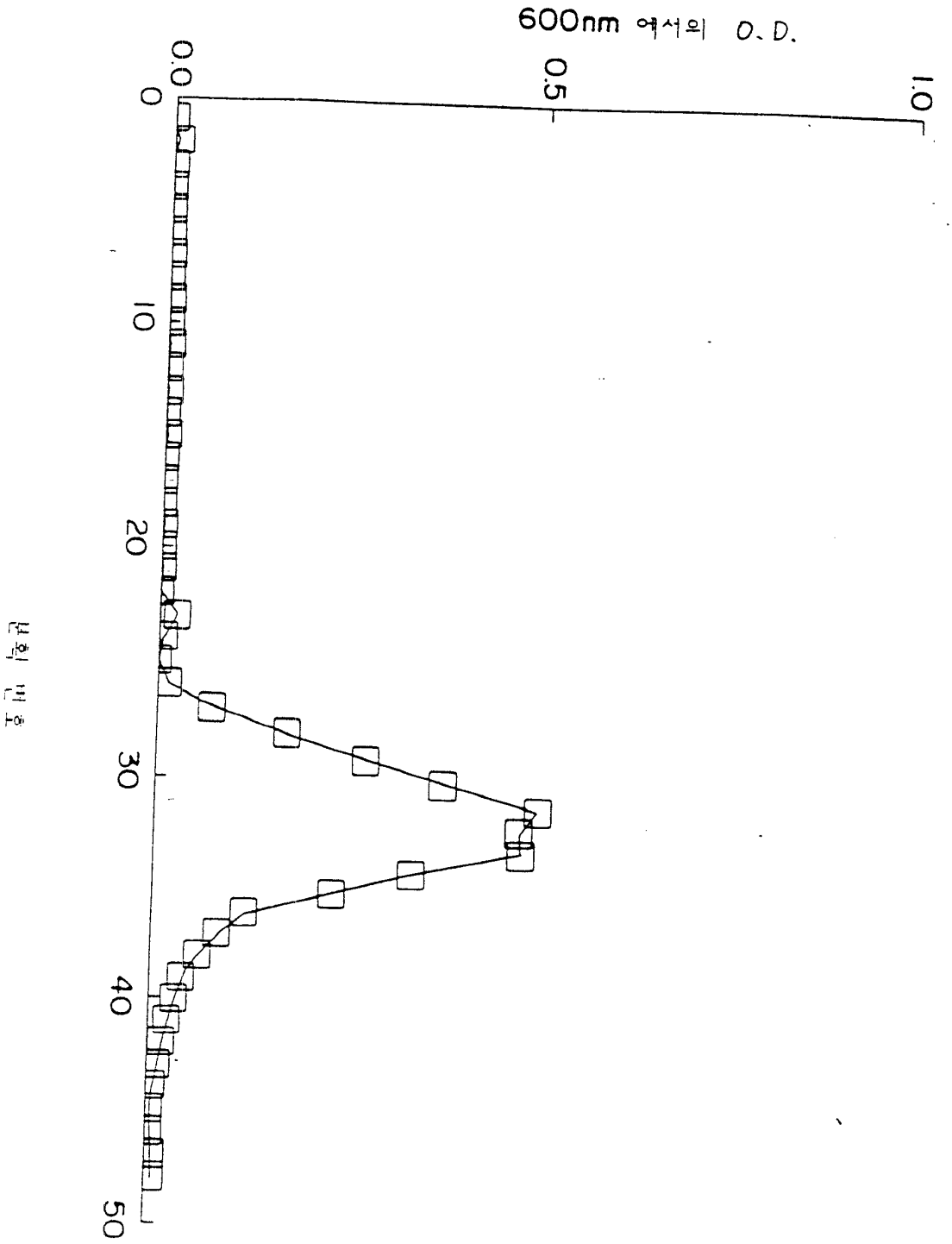
본 발명은 바이오티닐화된 잔기에 접합된 바이오틴-결합 요소를 지닌 세포 결합 성분을 포함하는 비-바이러스 벡터를 제공한다. 또한, 본 발명은 바이오티닐화된 잔기에 접합된 바이오틴-결합 요소를 지닌 세포 결합 성분을 포함하는 비-바이러스 벡터를 사람에게 투여함을 포함하여, 특이 세포내로 유전 물질을 도입하는 방법을 제공한다. 더우기, 본 발명은 비-바이러스 벡터를 사람에게 투여함을 포함하여, 세포독성 잔기를 세포로 수송하는 방법을 제공한다.

도면

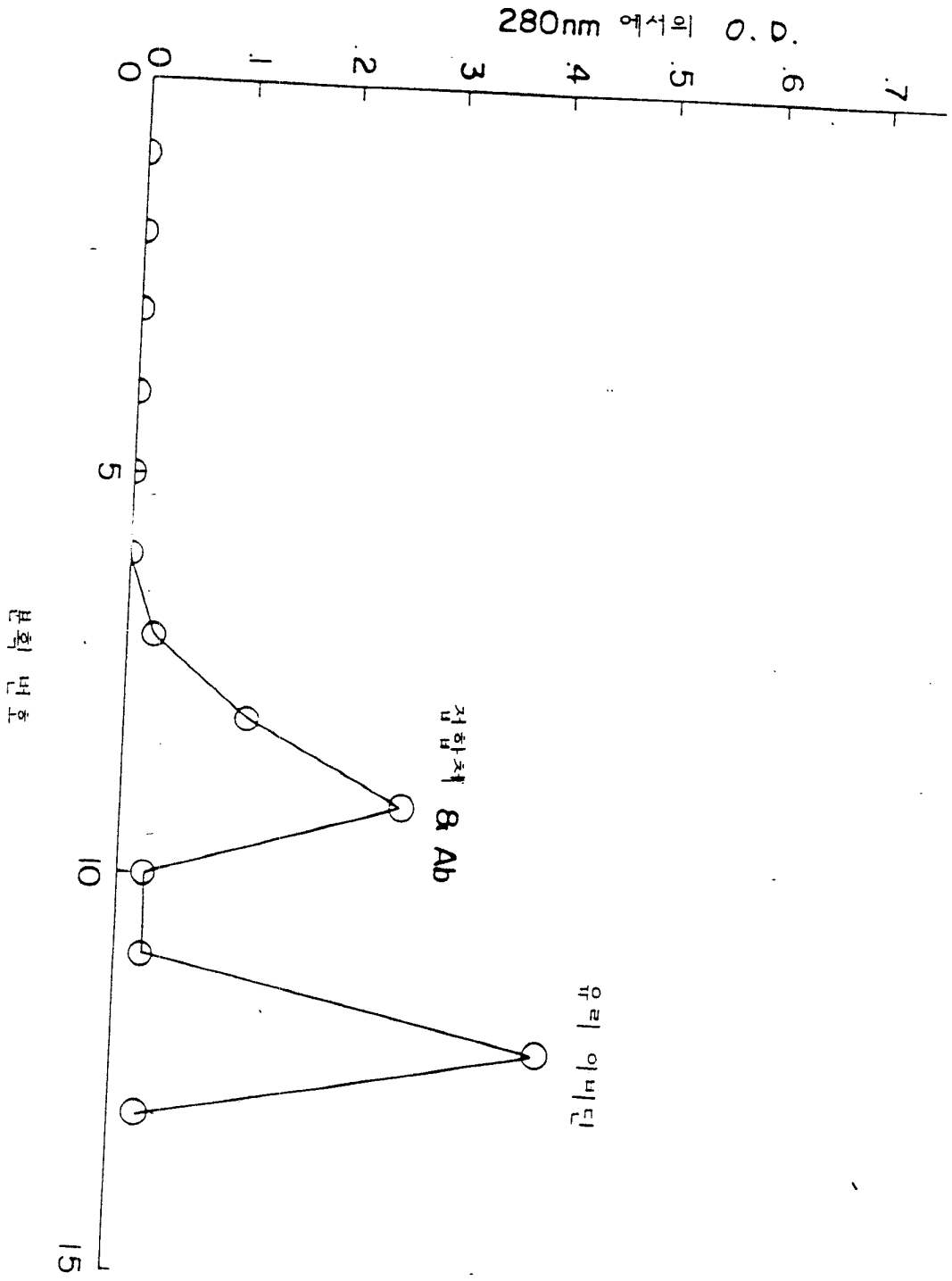
도면1



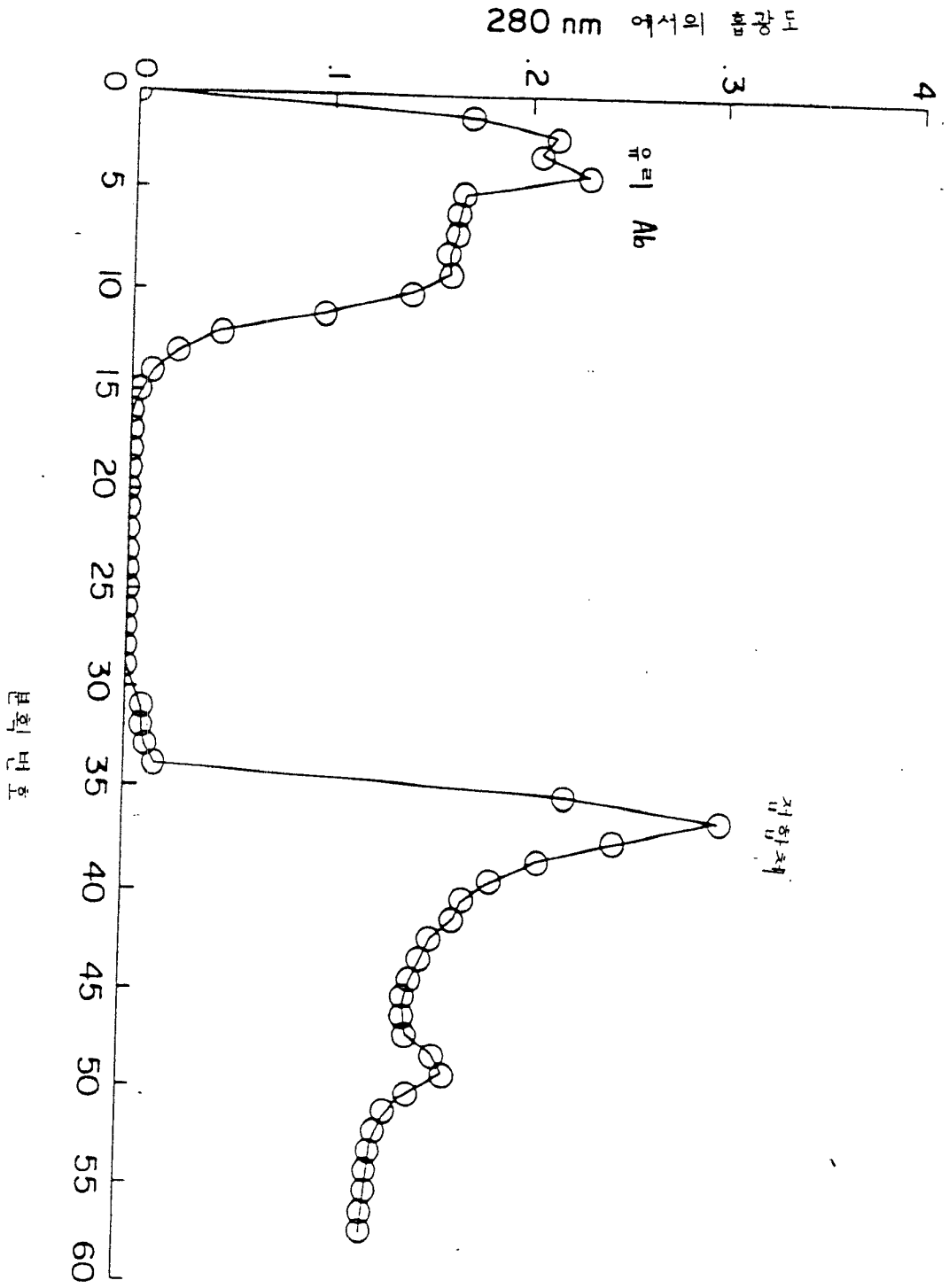
도면2



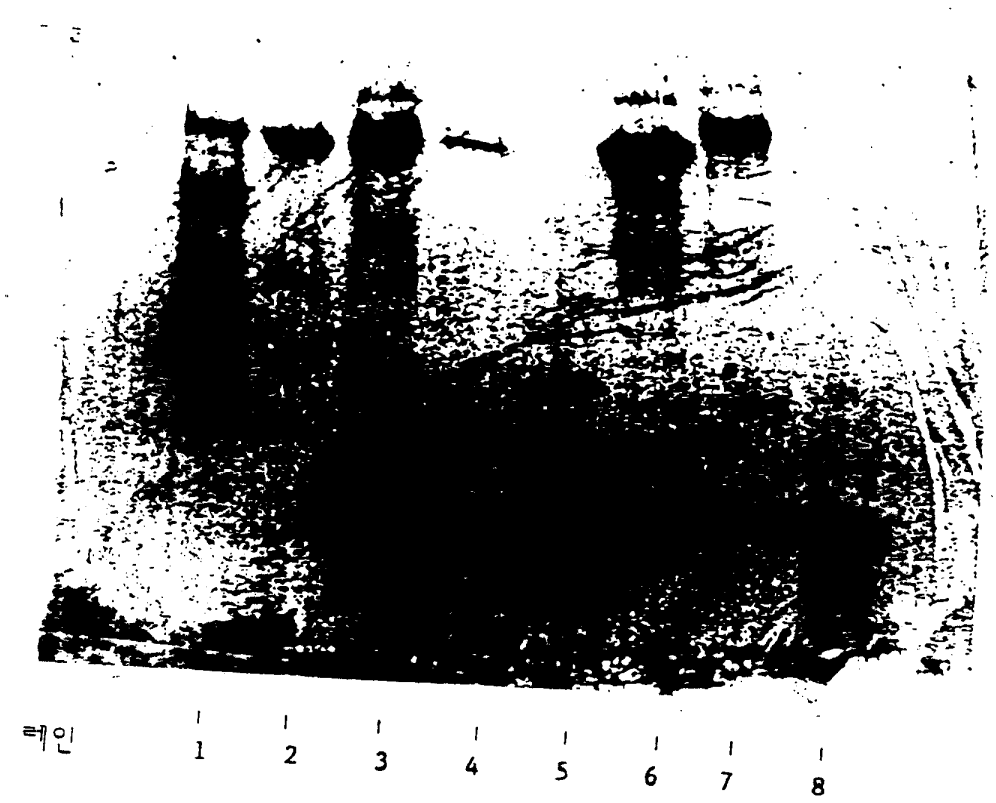
도면3



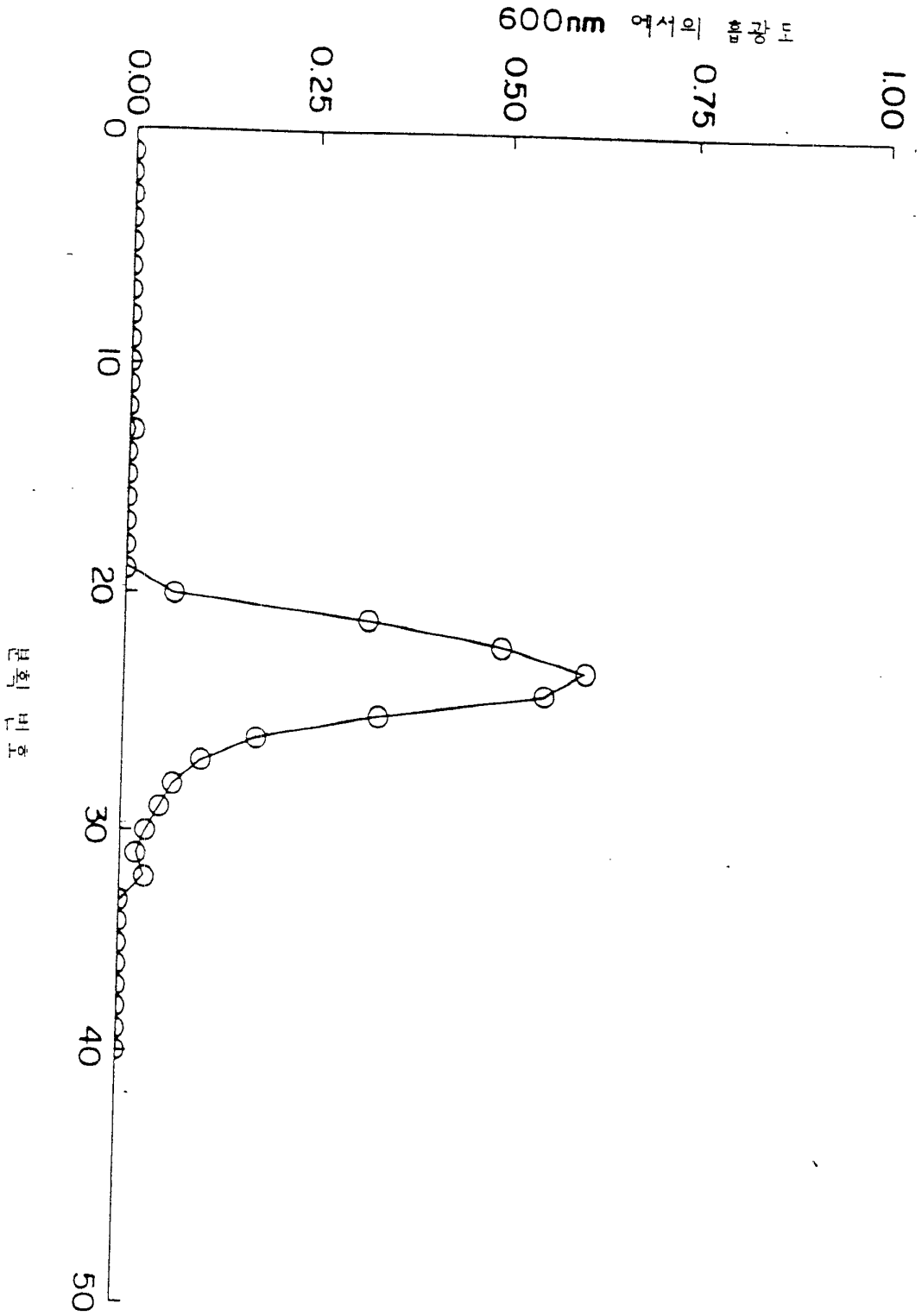
도면4


280 nm 에서의 흡광도
0
.1
.2
.3
.4
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
분획 번호
유리 Ab
지질체

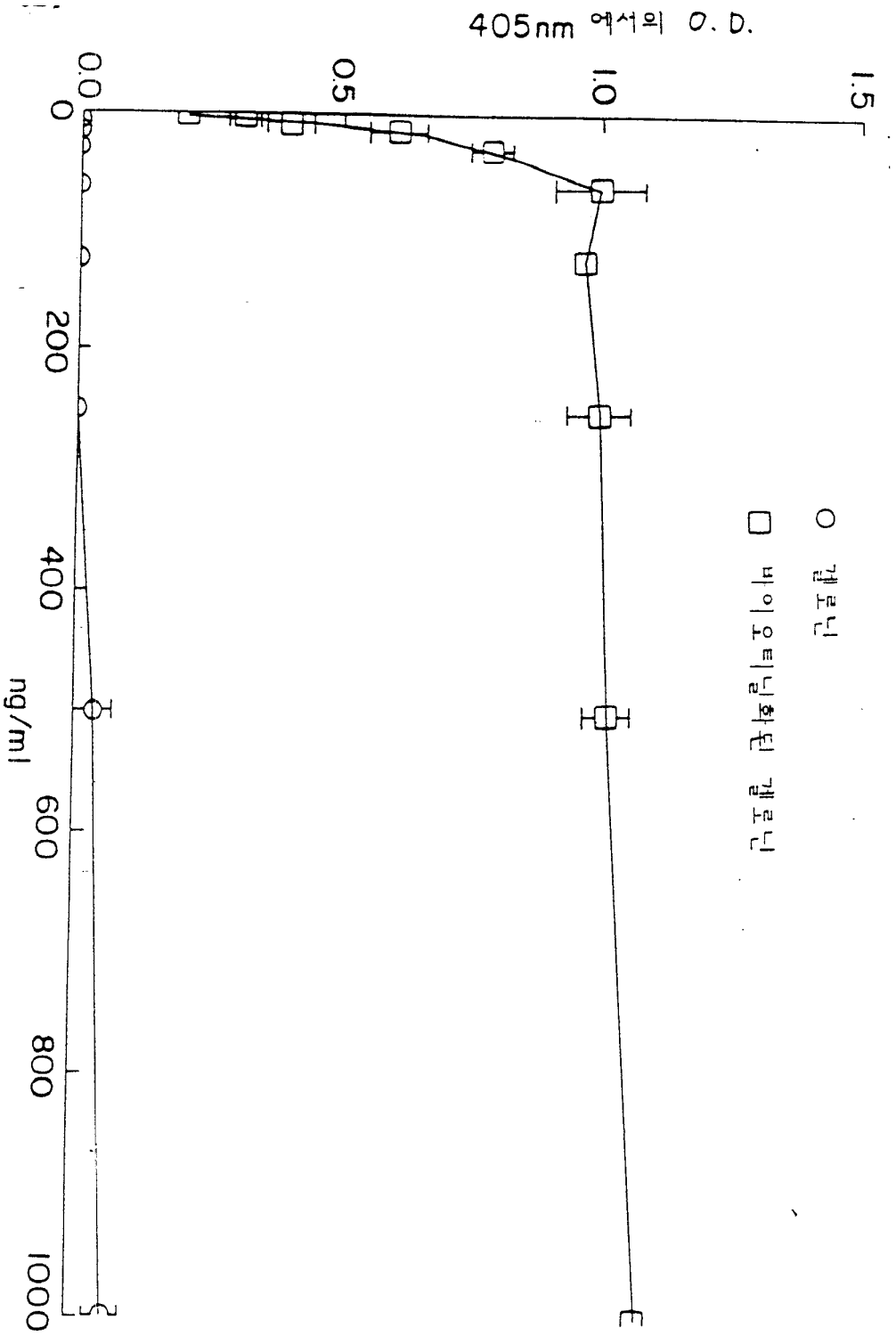
도면5



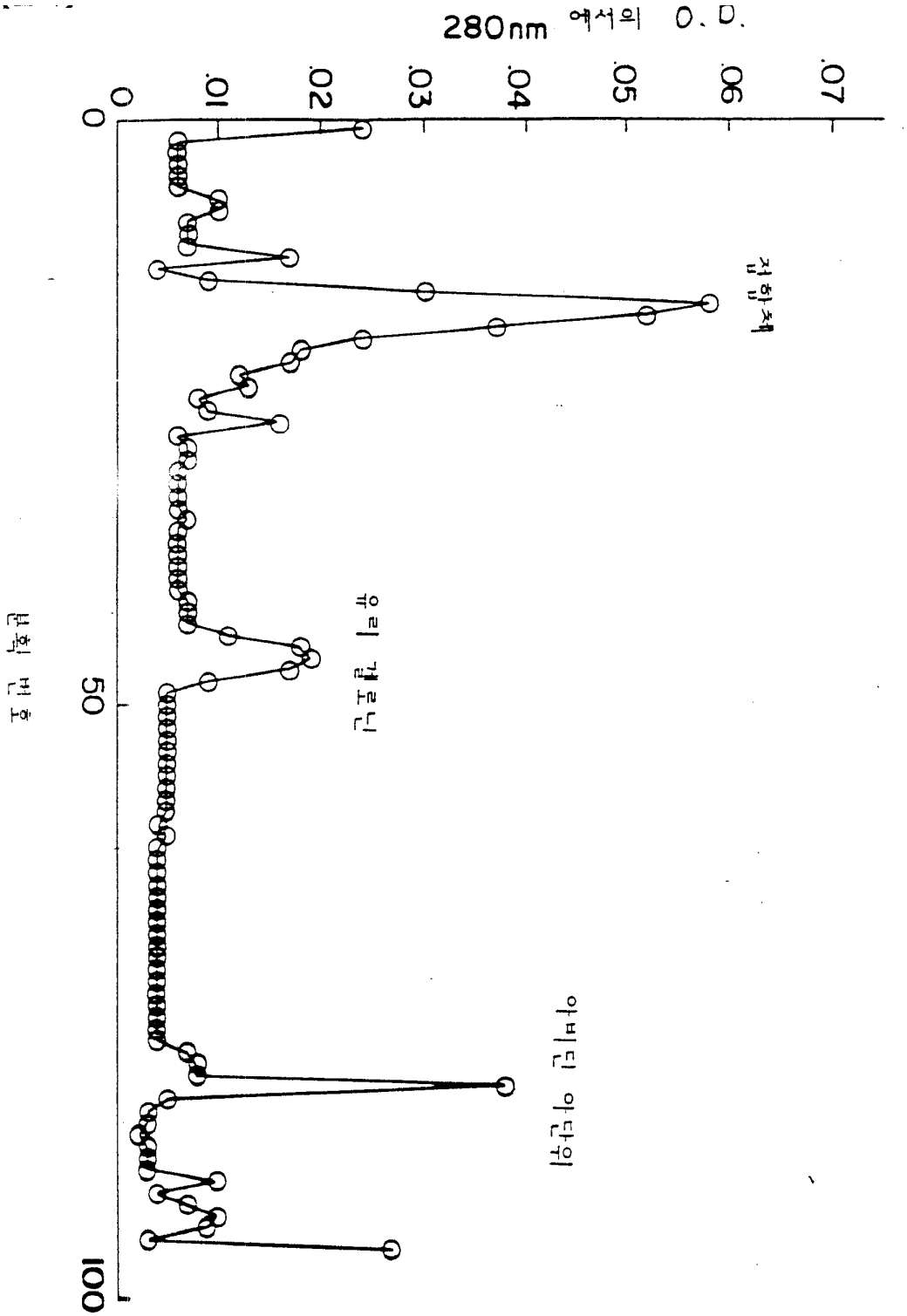
도면6a



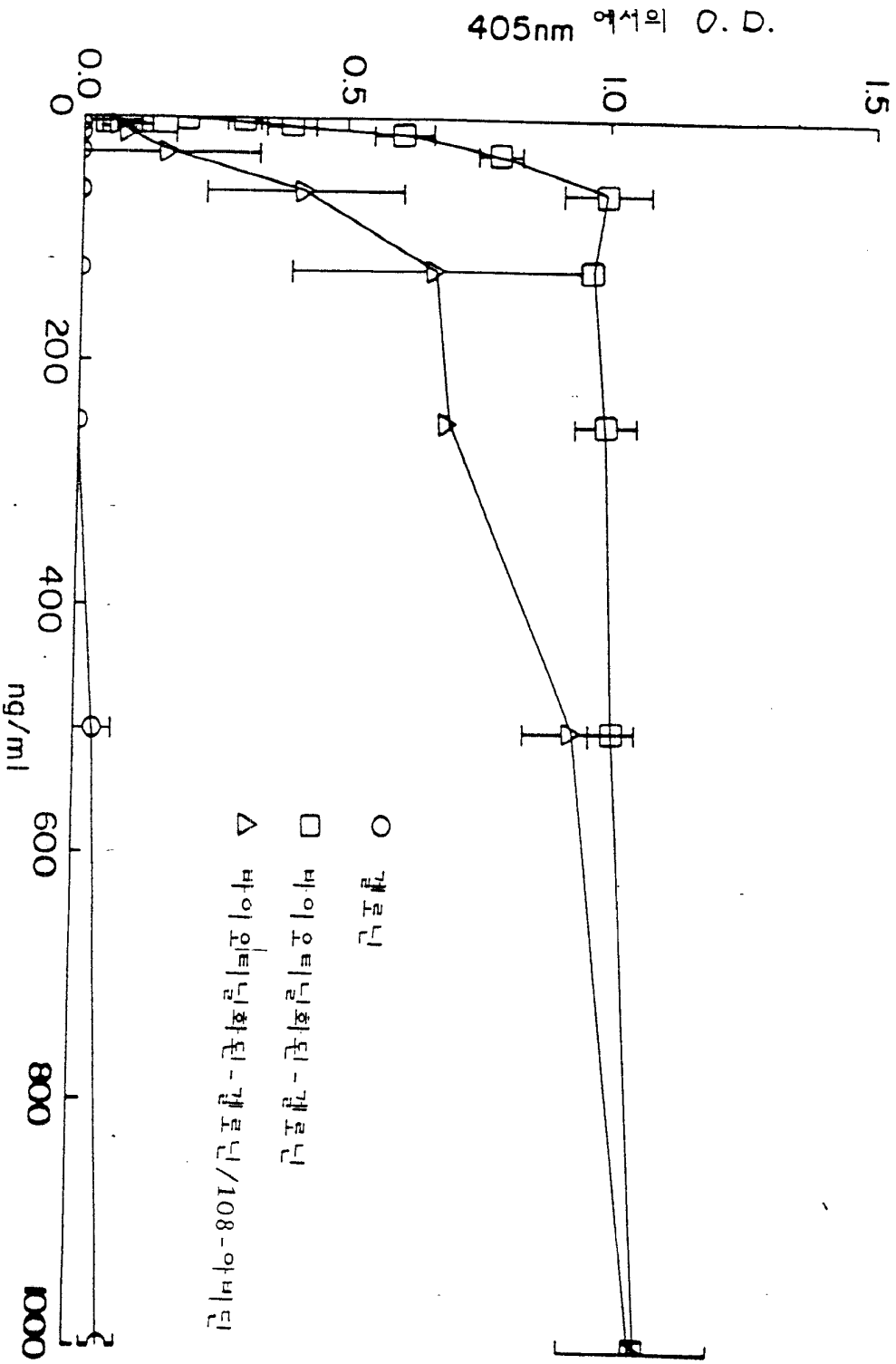
도면6b


405nm 에서의 O.D.
0.0
0.5
1.0
1.5
0
200
400
600
800
1000
ng/ml
○ 캘로닌
□ 비이오티닌화된 캘로닌

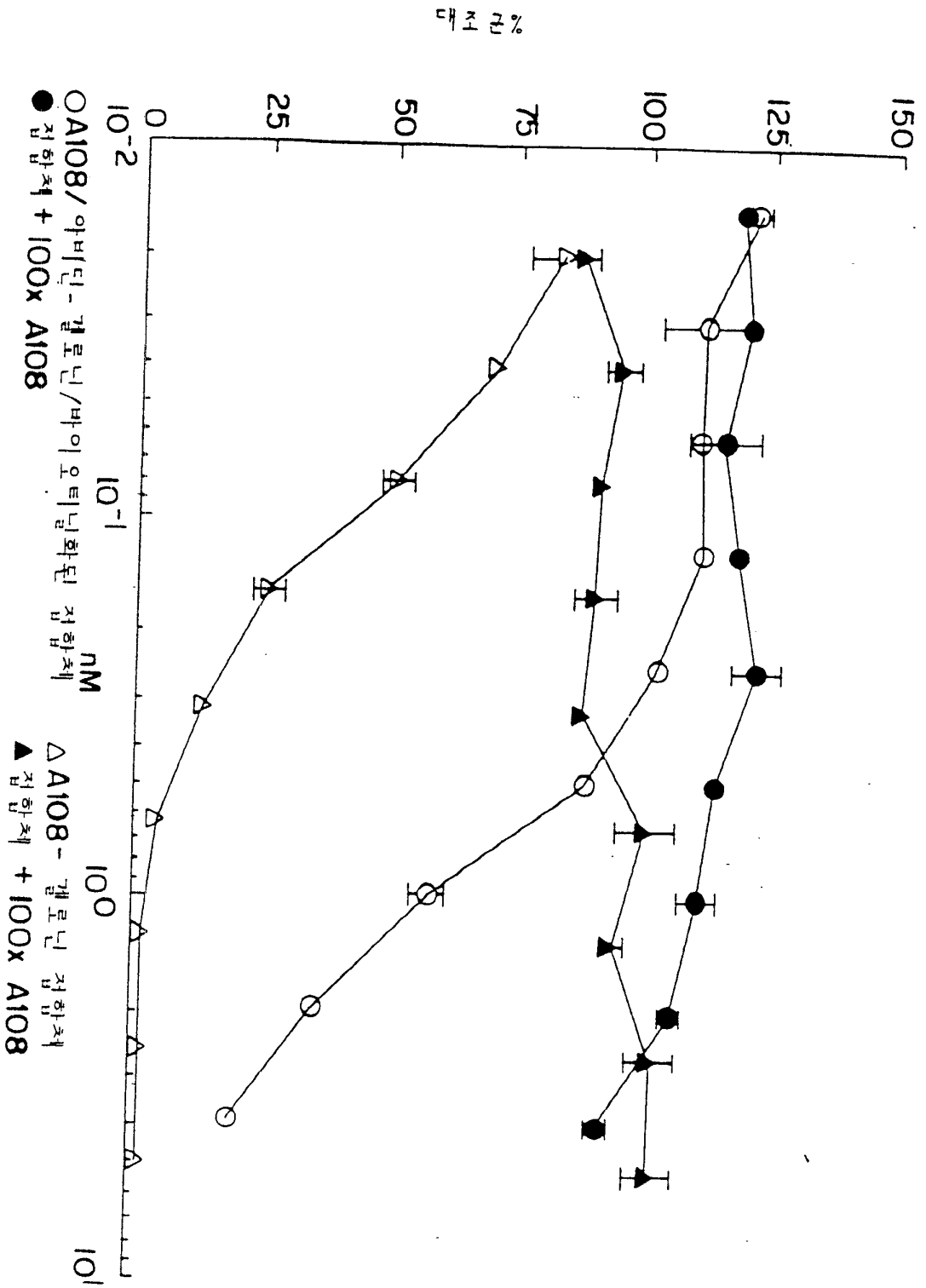
도면7



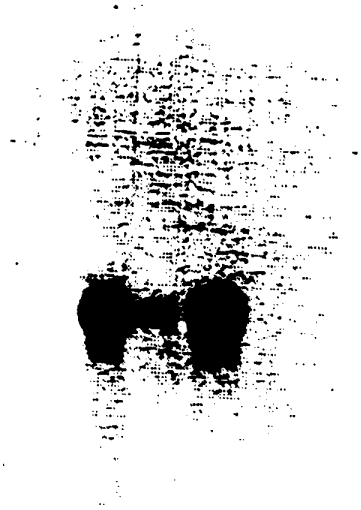
도면8


405nm 에서의 O. D.
0.0
0.5
1.0
1.5
0
200
400
600
800
1000
ng/ml
개로닌
바이오티닌화된-개로닌
바이오티닌화된-개로닌/108-아비딘

도면9


대조군 %
150
125
100
75
50
25
0
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
nM
○A108/ 아비딘 - 겔로닌/바이오틴화된 저합체
● 저합체 + 100x A108
△A108- 겔로닌 저합체
▲ 저합체 + 100x A108

도면10



대조군 AS 샘스
(안티-샘스)