

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. <sup>6</sup> C12N 15/64	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2005년12월14일 10-0536979 2005년12월08일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-1999-7000048	(65) 공개번호	10-2000-0023602
(22) 출원일자	1999년01월04일	(43) 공개일자	2000년04월25일
번역문 제출일자	1999년01월04일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1997/012425	(87) 국제공개번호	WO 1998/00556
국제출원일자	1997년07월03일	국제공개일자	1998년01월08일

(81) 지정국

    국내특허 : 오스트레일리아, 캐나다, 일본, 대한민국, 카자흐스탄,

    EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴,

(30) 우선권주장      08/675,120      1996년07월03일      미국(US)

(73) 특허권자      유니버시티 오브 유타 리서치 파운데이션  
    미국, 유타 84112, 솔트레이크 시티, 파크 빌딩 210

(72) 발명자      김진석  
    미국, 유타84108, 솔트레이크시티, 아파트먼트지-207, 에스.푸스힐드라이브2200

    마유야마, 에트수시  
    일본, 요코하마234, 코난, 6-11-13-105히노

    아카키, 토시히로  
    일본, 도쿄202, 하우야, 4-15-23시모-하우야

    김성완  
    미국, 유타84108, 솔트레이크시티, 데본셰어드라이브1711

(74) 대리인      강명구  
    강석용

심사관 : 이충호

(54) 유전자 전달하는데 이용되는 양이온 고분자 및 리포프로테인을 포함하는 시스템

요약

표적 세포로 선택된 핵산을 수송하는 조성물은 소수성화된 양전하를 띤 생체적응성이 있는 고분자; 리포프로테인; 선택된 핵산으로 구성된 복합체이다. 성분간에 소수성 및 정전기적 상호작용으로 농축된 DNA를 포함하는 복합체를 형성할 수있

다. 복합체의 적절한 구체에는 표면에 약간의 양전하를 띤 표면 전하를 가지고, 약 200nm의 직경을 가진다. 플라스미드와 올리고뉴클레오티드를 이와 같은 조성물과 함께 사용하면 효과적이다. 선택된 핵산을 숙주 세포로 수송하는 방법에 대해 상술하고 있다.

## 대표도

도 1

## 색인어

상기의 식별자가 없습니다.

## 명세서

### 기술분야

본 발명은 세포 내로 외생 핵산을 전달하는 시스템에 관계한다. 좀더 구체적으로는 본 발명은 선택된 핵산; 소수성화된 양전하를 띤 생분해가능한 고분자; 리포프로테인으로 구성된 전달 시스템을 표적 세포로 선택된 핵산을 삽입하는데 이용하는 것에 관계한다.

### 배경기술

사람의 유전자 요법은 상당한 전망이 있으나, 이의 임상적인 효과는 아직 완전하게 정립되지는 않았다(R. Mulligan, 260 Science 926 (1993); R.M. Blease et al., 270 Science 475 (1995); I.M. Verma, 1 Mol. Med. 2 (1994); T. Friedmann, 1 Gene Ther. 217 (1994)). 가장 큰 난제는 표적 세포로 유전자를 유도하는데 있어서 효과적이고 안전한 전달 시스템이 부족하다는 것이다. 지금까지, 사람 유전자 치료 프로토콜의 대부분이 변형-레트로바이러스 또는 아데노바이러스로 구성된 유전자 전달 시스템을 이용하여왔다(Gitman et al., 82 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 7309 (1985); E. Gilboa et al., 4 Biotechniques 504 (1986)). 특히 레트로바이러스 벡터를 이용하여 활성이 있는 분열 세포의 계층으로 새로운 유전자를 유도하는데 성공하여, 안정된 형질전환체를 얻을 수 있었다(D.G. Miller et al., 10 Mol. Cell Biol. 4239 (1990)). 그러나, 이와 같이 숙주 세포의 계층으로 유전자를 삽입하는 방법은 무작위적인 공정이고, 삽입된 유전자가 내생 바이러스 또는 온코겐을 활성화시키는데 복합될 수 있는 가능성도 있어 장기적으로 위험성이 있는 문제가 있다. 이로써 사람 유전자 요법에 벡터를 이용하게 되었다(D.G. Miller et al., 10 Mol. Cell Biol. 4239 (1990)).

한편, 바이러스가 아닌 유전자 운반 시스템 가령, 양이온 리포좀(H.M. Temin, 1 Human Gene Therapy 111 (1990), or poly-L-lysine (PLL), G.Y. Wu & C.H. Wu, 263 J. Biol. Chem 14621 (1988); E. Wagner et al., 87 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 3410 (1990); P. Felgner et al., 84 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 7314 (1987); H. Farhood et al., 1111 Biochim. Biophys. Acta 239 (1992))은 사람에게 임상적으로 이용하였을 경우에 안정성은 있지만, 트랜스펙션 효율이 낮거나 침전을 야기하는 등의 단점이 있다(N.H. Caplen et al., 1 Nature Medicine 1(1995)). 트랜스펙트된 유전자 전달을 개선시키고, 이를 발현시키는 다양한 방법에 변형된 폴리(L-리신)이 이용되었는데, 주로 조직을 표적으로 하는 리간드 공액물이 이용되었고(D.T. Cirieli et al., 3 Human Gene Therapy 147 (1992); E. Wagner et al., 89 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89 6099 (1992), 친지성 폴리(L-리신)도 이용되었다(X. Zhou et al., 1065 Biochim. Biophys. Acta 8 (1991)). 합성수송 시스템 또한 대규모 또는 반복 사용을 하였을 경우에 면역학적 복합증을 더 적게 유도하였다(P.L. Felgner, 5 Adv. Drug, Deliv. 163 (1990); J.P. Behr, 26 Acc. Chem. Res. 274 (1993); M. Cotten & E. Wagner, 4 Curr. Opin. Biotech. 705(1993); J.P. Behr, 5 Bioconjugate Chem. 382 (1994)).

전술한 관점에서, 안전하고 효과적인 유전자 수송 시스템은 당분야에서 상당히 진보된 것이다.

### 발명의 요약

본 발명의 목적은 표적 세포 내로 선택된 핵산을 수송하는 조성물 및 그 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 안전하고 효과적인 유전자 수송을 하는 조성물 및 그 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 외생 DNA 또는 RNA를 표적 세포 내로 운반하는 효과적이고 비-바이러스성 조성물 및 이를 이용하는 방법을 제공한다.

표적이 되는 숙주 세포로 선택된 핵산을 수송하는 조성물을 제공하여 이와같은 목적을 이룰 수 있는데, 조성물은 효과량의 소수성 양전하를 띤 생체적합성이 있는 고분자; 효과량의 리포프로테인; 효과량의 선택된 핵산으로 구성된 복합체이다. 소수성화된 고분자는 소수성 탄소 사슬에 공유 결합된 양전하를 띤 생체적합성이 있는 고분자로 구성된다. 양전하를 띤 생체적합성이 있는 고분자는 폴리(L-리신)이 적합하다. 소수성 탄소 사슬은 포화, 불포화 직쇄 C<sub>14</sub> 내지 C<sub>18</sub>로 구성된 집단에서 선택되는데, 스테아릴 기가 더욱 바람직하다. 선택된 핵산으로는 플라스미드 또는 합성 올리고뉴클레오티드가 적합하다. 플라스미드를 포함하는 복합체의 경우에 소수성화된 고분자, 리포프로테인, 올리고뉴클레오티드의 중량비는 1:1:1이 되는 것이 특히 바람직하다. 올리고뉴클레오티드를 포함하는 복합체의 경우에는 소수성화된 고분자, 리포프로테인, 올리고뉴클레오티드의 중량비는 1:1:0.001-0.05이 되는 것이 특히 바람직하다. 조성물은 약 +2-15mV 범위의 표면전하를 가지고, 더욱 적합한 표면전하는 +5mV이다. 조성물의 적절한 평균 직경은 200 내지 400nm이고, 더욱 바람직하게는 200 내지 300nm이다.

in vitro에서 선택된 핵산으로 세포를 형질 변환시키는 방법은

- (a) 효과량의 소수성 양전하를 띤 생체적합성이 있는 고분자; 효과량의 리포프로테인; 효과량의 선택된 핵산으로 구성된 복합 조성물을 만들고;
- (b) 효과량의 조성물을 세포에 접촉시켜 세포가 선택된 핵산을 내화시키게 하고;
- (c) 선택된 핵산을 가지는 세포를 이 세포가 잘 자랄 수 있는 조건하에서 배양시키는 것으로 구성된다.

**발명의 상세한 설명**

표적 세포로 외생 핵산을 수송하는 조성물 및 그 방법을 설명하기 전에, 본발명은 여기에서 상술하는 특정 형태, 진행과정, 물질에 국한하지 않으며, 이는 다소 변형될 수 있음을 인지할 수 있을 것이다. 또한 여기에서 이용된 기술상의 용어는 본 발명의 특정 구체예를 설명하기 위한 것으로써, 이에 한정시키고자 함이 아니며, 본 발명의 범위는 청구범위 및 이의 등가 범위에 한정함을 인지할 것이다.

본 명세서 및 청구범위에서 이용된 용어에서, 단수개념(가령 영어로 "a", "an", "the")은 다른 말이 없는 한 복수 개념을 포함한다. 따라서, "고분자"를 포 함하는 복합체는 이와 같은 고분자를 하나이상 가지는 혼합물이 포함되고, "리포프로테인"은 이와 같은 리포프로테인이 하나이상 있다는 개념이 포함되고, "플라스미드"는 이와 같은 플라스미드가 두 개 이상 있다는 개념이 포함된다는 것을 의미한다.

본 발명을 설명하고 청구하는데 있어서, 다음의 용어는 하기에서 설명하는정의에 따른다.

여기에서 이용한 것과 같이, "효과량"은 리포프로테인과 선택된 핵산과 복합되었을 경우에, 소수성화된 양전하를 띤 생체적응성이 있는 고분자가 선택된 포유류 세포 내로 수용가능한 세포독성 수준을 가지면서 핵산을 선택된 효율로 운반할수 있는 양을 말한다. 리포프로테인의 효과량이란 선택된 핵산 및 소수성화된 고분자와 복합되었을 경우에, 선택된 포유류 세포 내로 수용 가능한 세포독성 수준을가지면서 핵산을 선택된 효율로 운반할 수 있는 양을 말한다. 유사하게, 선택된 핵산의 효과량이란 소수성화된 고분자 및 리포프로테인과 복합되었을 경우에, 선택된 포유류 세포 내로 수용 가능한 세포독성 수준을 가지면서 핵산을 선택된 효율로 운반할 수 있는 양을 말한다. 이와 같은 소수성화된 고분자, 리포프로테인 및 핵산의 효과량은 이용되는 세포의 형태, 핵산의 성질, 세포의 성장 조건 등에 따라 다소 변화가 있을 수 있다. 이와 같은 효과량은 여기에서 제시하는 가이드라인에 따라 당업자가 별도의 실험 없이도 결정할 수 있는 정도의 것이다.

여기에서 사용된 "소수성화된 고분자"는 소수성 탄소 사슬에 공유결합을 하여 변형된 양전하를 띤 생체적합성이 있는 고분자를 말한다. 양전하를 띤 생체적응성이 있는 고분자는 폴리(L-리신), 폴리(D-리신), 또는 폴리아르기닌등이 되고, 이중 폴리(L-리신)이 가장 적합하다. 양전하를 띤 생체적응성이 있는 고분자의 분자량은 약 500 내지 50,000의 범위가 바람직하다. 소수성 탄소 사슬은 적절하게는탄소가 14 내지 18개인 포화 또는 불포화 직쇄이다. 특히 바람직한 소수성 탄소사슬은 스테아릴 기가 된다.

여기에서 사용된 바와 같이, "생체적합성"이란 본 발명에 따라 형질변환된 또는 형질변환될 수 있는 세포의 성장과 양립할 수 있다는 것을 의미한다. 따라서, 생체적합성이 있는 고분자는 이와 같은 세포에 독성이 없고, 바람직하게는 생분해가능한 것이다.

여기에서 사용된 바와 같이, "리포프로테인"이란 단백질 일부분과 지질 일부분으로 구성된 공액체를 말한다. 바람직한 리포프로테인으로는 당분야에 공지된 리포프로테인 종류를 포함하는데 예를 들면, 저밀도 리포프로테인(LDL), 고밀도 리포프로테인(HDL), 초저밀도 리포프로테인(VLDL)이 포함되고, LDL과 HDL이 특히 바람직하다. 이론에 구애받지 않고, 본 발명에서 청구하는 조성물은 선택된 세포의 표면에 있는 LDL 또는 HDL수용체가 중개하는 엔도사이토시스에 의해 선택된 세포안으로 선택된 핵산을 운반하는데 효과가 있는 것으로 본다. 선택된 리포프로테인에 대해 세포의 표면에 이의 수용체 수가 많은 세포를 이용하면 운반 효율을 개선시킬 수 있다. 예를 들면, 리포프로테인으로 LDL으로 구성된 복합체와 의 LDL수용체 수를 많이 가지는 세포를 이용하면 운반 효율을 개선시킬 수 있다.

여기에서 사용된 것과 같이, "생장에 적합한 조건" 및 이와 유사한 용어는 온도, pH, 호기성 환경, 탄소원의 존재, 에너지원의 존재 및 선택된 포유류 세포의 성장을 허용하는 다른 유사한 조건을 의미한다.

도 1에서는 본 발명에 따른 유전자 조성물(10)의 구조를 도면으로 나타낸다. 조성물(10)은 리포프로테인 성분(12); 소수성화된 양전하를 띤 생체적합성이 있는 고분자(14); 핵산 분자(16)의 복합체이다. 리포프로테인과 고분자간에 소수성 상호작용으로 다양한 농도 범위의 고분자를 가지는 침전하지 않는 복합체를 형성하게 한다. 이와 같은 소수성 상호작용은 각 리포프로테인 및 소수성화된 고분자의 지질 부분이 관계한다. 양전하를 띤 고분자와 음전하를 띤 핵산 분자간에 정전기적 상호작용으로 농축된 DNA를 포함하는 복합체를 형성하게 한다. 이와 같은 정전기적 상호작용은 양전하를 띤 소수성화된 고분자 및 음전하를 띤 부분 주로 핵산의 포스포디에스테르 기본구조간에 관련된 것이다. 이들 두 가지 상호작용간에 균형이 운반의 효율을 최적화하는데 중요하다는 것을 발견하였으며, 따라서 복합체의 최종 소수성 및 표면전하를 조절을 잘 해야 한다. 이와 같은 균형에 대해서는 다음에 상세히 설명한다.

### 도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 리포프로테인 성분, 소수성화된 양전하를 띤 생체적합성이 있는 고분자, 핵산분자 및 이의 복합체를 도면으로 나타낸 것으로 것이다.

도 2a-d에서는 다음의 물질에 있는  $\epsilon$ -메틸렌기로 인한  $^1\text{H-NMR}$ 에 의해 발생된 프로톤 시그널을 각각 나타낸다; (A) 스테아릴-폴리(L-리신)(스테아릴-PLL), (B) 스테아릴-PLL와 사람의 저밀도 리포프로테인(LDL), (C) 폴리(L-리신)(PLL), (D) PLL와 LDL의 혼합물.

도 3에서는 다음의 각 물질에 대한 CD 스펙트럼을 나타낸다;(a) pSV- $\beta$ -gal 플라스미드 DNA; (b) pSV- $\beta$ -gal 플라스미드 DNA + LDL; (c) pSV- $\beta$ -gal 플라스미드 DNA + LDL + 스테아릴-PLL,(중량비 1:1:1); (d) pSV- $\beta$ -gal 플라스미드 DNA + LDL + 스테아릴-PLL(중량비 1:1:2); (e)pSV- $\beta$ -gal 플라스미드 DNA + LDL + 스테아릴-PLL(중량비 1:1:3); (f) pSV- $\beta$ -gal 플라스미드 DNA + LDL + 스테아릴-PLL, (중량비 1:1:4); (g) pSV- $\beta$ -gal 플라스미드 DNA + LDL + 스테아릴-PLL(중량비 1:1:5).

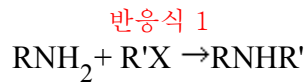
도 4는 본 발명에 따른 lac<sup>+</sup> 플라스미드(pSV- $\beta$ -gal)로 형질변환된 A7R5 평활근 세포의 용해질의  $\beta$ -갈락토시다제 활성을 나타낸 것이다; 기준에는 DNA가 없고; DNA만 있는 것-소수성화된 고분자 또는 리포프로테인이 없음; H-PLL + DNA - 소수성화된 폴리(L-리신)과 DNA 복합체; LIPOFECTIN + DNA-양이온 고분자 및 DNA 복합체; H-PLL + LDL + DNA - 본 발명에 따른 소수성화된 폴리(L-리신), 리포프로테인(사람의 저밀도 리포프로테인)과 DNA(pSV- $\beta$ -gal) 복합체.

도 5는 10% 태아 송아지 혈청 및 100 $\mu\text{M}$  클로로퀸 유무 하에 c-myb 안티센스올리고뉴클레오티드의 양을 다르게 하였을 경우에 A7R5 평활근 세포의 형질변환에 대한 항증식 효과를 나타낸다.

### 실시예

#### 실시예1

다음의 식에 따라 브롬화 스테아릴에 폴리(L-리신)(분자량 50,000)의 N-알킬화반응으로 스테아릴-PLL을 합성한다;



이때, R은 리신의 ε-아미노산기이고; R'는 스테아릴기이고; X는 할로젠이다(참고문헌 R.T. Morrison & R.N. Boyd, Organic Chemistry 742 (3d ed. 1973)). 소수성 아실 쇠로 치환되는 폴리(L-리신)의 치환도는 NMR분야에 공지된 과정에 따라 용매로는 D<sub>2</sub>O/디옥산 혼합물을 이용하여 <sup>1</sup>H-NMR에서 계산을 한다. 3.0ppm에서 PLL의 ε-메틸렌기의 피크면적은 0.8ppm에서 스테아릴-변형된 폴리(L-리신)의 메틸기의 것과 비교를 한다. 치환도는 다음의 식으로 계산을 하였다.

$$\text{치환비율\%} = \frac{\text{수학식 1}}{\text{수학식 1}} = \frac{(0.8\text{ppm에서 피크면적})/3}{(3.0\text{ppm에서 피크면적})/2} \times 100$$

약 18mole% 내지 약 25mole%의 스테아릴기를 가지는 스테아릴-PLL이 숙주 세포내로 핵산을 운반하는데 효과적이라는 것을 알았다. 치환도가 약 25mole%이상으로 증가되었을 경우에, 복합체로 처리된 세포의 세포독성이 증가되었다. 이와 같은 세포독성은 소수성화된 고분자에 결합된 알킬기로 인해 막 파괴가 증가되기 때문인 것으로 보인다. 치환도가 약 19mole%이하가 되면, 세포가 복합체를 취하는 양이 감소되고, 따라서 운반 효율이 감소된다.

### 실시예 2

본 실시예에서는 PLL, 스테아릴-PLL, 스테아릴-PLL과 LDL의 혼합물 각각은 <sup>1</sup>H-NMR로 분석한다. 이 분석 결과는 도 2a-d에서 나타낸다. 스테아릴-PLL에 있는 ε-메틸렌기 때문에 프로톤 시그날의 관련 피크 면적 또는 곡선 아래 면적(AUC)이(도 2a, 26 AUC units) 스테아릴-PLL과 LDL 혼합물의 이에 상응하는 피크 면적(도2b, 18.7 AUC units)보다 약 35% 이상 크다는 것을 알 수 있다. 소수성 스테아릴기가 부족한 변형안된 PLL(도 2c, 21 AUC units)은 PLL과 LDL의 혼합물과 비교(도2d, 23 AUC units)를 하였을 경우에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서, 스테아릴-PLL과 LDL 모두에 있는 아실 사슬은 이들 혼합물에 있는 이들 두 가지 성분간에 소수성 상호작용에 중요한 역할을 하는 것으로 보이는데, 그 결과로 스테아릴-PLL 단독의 상응하는 피크 면적에 비교하였을 경우에 LDL과 스테아릴-PLL을 복합하였을 경우에 스테아릴+PLL의 ε-메틸렌 기의 피크 면적이 감소되었다.

### 실시예 3

본 실시예에서는 본 발명에 따른 유전자 수송 조성물을 만드는데, 이는 PBS완충액에 스테아릴-폴리(L-리신)(스테아릴-PLL), 사람 저밀도 리포프로테인(LDL), pSV-β-gal 플라스미드 DNA(가령 Promega, Madison, Wis.) 또는 c-myc 안티센스 올리고뉴클레오티드(서열 1)를 혼합하는 것으로 구성된다. 기준 조성물은 스테아릴-PLL 대신에 PLL을 포함한다. 600nm에서 광학 밀도를 측정하여 성분의 응집 및 침전으로 인한 탁도를 측정한다. PBS에서 스테아릴-PLL, LDL, DNA에서는 광범위한 농도범위에서 침전 또는 응집이 없는 것을 알 수 있다. 스테아릴-PLL 대신에 PLL을 포함하는 기준 조성물에는 응집 또는 침전이 관찰되었다. 따라서, 탁도측정 결과에 따르면, 스테아릴-PLL, LDL, 수용성 DNA 용액으로 안정된 복합체를 형성하는 반면에 스테아릴-PLL 대신에 변형 안된 PLL을 포함하는 조성물은 불안정한 것으로 나타났다. 스테아릴-PLL과 LDL간에 소수성 상호작용은 안정한 DNA-포함하는 복합체를 형성하는데 적어도 일부분 기여를 하는 것으로 보인다.

### 실시예 4

실시예 3의 과정에 따라 pSV-β-gal 플라스미드로 만든 유전자 수송 복합체에서 복합체 형성후에 플라스미드 DNA 모양의 변화에 따른 CD 분석을 하여 검사하였다. 도 3에서는 플라스미드 DNA의 CD 스펙트럼에서 시스템에 과량의 스테아릴-PLL을 첨가한 후에 각각 245nm와 275nm에서 네가티브 밴드 및 포지티브 밴드에 약간의 변이가 관찰되기는 하였지만(도 3의 스펙트럼 e-g), 변화가 없었다는 것을 나타낸다. 한편, 변성된 기준 DNA는 이들 두 가지 밴드에서 상당히 감소되었다. DNA를 고농도의 염 또는 고온으로 처리를 하였을 경우에, 245nm와 275nm에서 밴드의 변이가 나타나지 않았고 이는 스테아릴-PLL/LDL/플라스미드 조성물에 변성되었을 때보다 플라스미드 DNA가 더 콤팩트한 모양을 하고 있다는 것을 말하는 것이다.

## 실시예 5

본 실시예에서, 실시예 3에 따른 스테아릴-PLL, LDL, pSV- $\beta$ -gal(중량비 1:1:1)로 구성된 유전자 수송 조성물을 이용하여 쥐 평활근 세포 주, A7R5(ATCC CRL1444)에서 *in vitro* 수송 및 *lacZ* 유전자 발현을 검사하였다. 플라스미드 pSV- $\beta$ -gal (EMBL X65335)는 포유류 세포에서 트랜스펙션 효율을 모니터링하는데 양성 기준 벡터로 이용하였다. pSV- $\beta$ -gal 플라스미드는 SV40 초기 프로모터 및 인헨서 서열, 전사 시작 부위,  $\beta$ -갈락토시다제를 인코딩하는 대장균(*E. coli*) *lacZ* 코딩부분, SV40 작은 T- 항원 폴리아데닐화 시그널로 구성된다. SV40 초기 프로모터 및 인헨서는 *lacZ* 유전자의 전사를 구동시킨다. 트랜스펙트된 세포의 세포 추출물은 분광광도계 검사를 하면,  $\beta$ -갈락토시다제 활성을 바로 용이하게 측정할 수 있다.

트랜스펙션 조성물을 첨가하기 전 24시간에  $4 \times 10^4$  세포/ml 농도에서 접종한 96-웰 플레이트에서 A7R5 세포의 *in vitro* 트랜스펙션을 실행하였다. 10% 태아송아지 혈청 유무 하에 세포에 스테아릴-PLL/LDL/pSV- $\beta$ -gal 조성물( $10 \mu\text{l}$ )을 첨가한다. "무혈청" 트랜스펙트된 혼합물은 4시간동안 배양을 하고, 태아 송아지 혈청을 10% 수준이 되도록 보충한다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간동안 배양을 하고, Promega Reporter Lysis 완충액(cat. no. E3971)으로 세포를 용해시킨다.

색을 발생시키는 지시물질 O-니트로페닐- $\beta$ -D-갈락토피라노시드(ONPG; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 용해물질에 첨가하고, 추가 4시간동안 배양을 시킨 다음 OD<sub>407</sub>에서 트랜스펙트된 세포 용해물질에 있는  $\beta$ -갈락토시다제 활성을 측정한다(J.H. Miller, Experiments in Molecular Genetics (1972); C.V. Hall et al., 2 J. Mol. Appl. Genet, 101 (1983); P. Norton & J.M. Coffin, 5 Mol. Cell. Biol. 281 (1985)). 기준 트랜스펙션 실험은 공급업자의 프로토콜에 따라 리포솜에 대한 DNA의 중량비를 1:1로 하여 양이온 리포솜(LIPOFECTIN; Gibco BRL)으로 실행한다. 추가 기준 조성물은 PLL/LDL/pSV- $\beta$ -gal(중량비 1:1:1)과 스테아릴-PLL/pSV- $\beta$ -gal(중량비 1:1)을 이용한다. DNA 복합체에 첨가하기 전 30분경에 100 $\mu\text{M}$  클로로퀸(NH<sub>4</sub>Cl), 리조솜성(lysosomotropic) 물질 유무 하에 실행한다.

도 4에서는 다양한 기준에 비교하여 본 발명에 따른 조성물의 상대적인  $\beta$ -갈락토시다제 활성을 나타낸다. 트랜스펙트된 세포 추출물의  $\beta$ -갈락토시다제 활성을 측정하여 나타내는 트랜스펙션 효율은 시판되는 양이온 지질 조성물 LIPOFECTIN과 비교를 하였을 경우에 스테아릴-PLL/LDL/플라스미드에서 약 2배 이상 높은 것으로 나타났다. 본 발명의 조성물의 트랜스펙션 효율은 10% 태아 송아지 혈청 존재하에 영향을 받지 않았으나, LIPOFECTIN의 효율은 혈청 존재 하에 감소되었다. 이 결과로부터 본 발명의 조성물은 DNA와 복합체를 이루어, 혈청에 있는 뉴클레아제로인하여 DNA가 분해되지 않도록 보호한다는 것을 알 수 있다. 트랜스펙션 효율은 트랜스펙션 전에 세포를 선 처리하기 위해 클로로퀸(도 4) 또는 모멘신(나타내지 않음)과 같은 리소솜성 물질을 이용하였을 경우에 트랜스펙션 효과가 증가되었다. 스테아릴-PLL/LDL/플라스미 조성물로 인한 세포 독성은 나타나지 않는 것으로 보인다.

## 실시예 6

실시예 5의 과정을 반복하나 A7S5 세포를 형질변환시키기 위해 상이한 표면 전하를 가지는 조성물을 이용한다. Zeta-포텐셜 즉 DNA를 포함하는 복합체의 총표면표면 전하는 Malvern Zeta-Sizer 3를 이용하여 실온에서 측정한다. 이와 같은 측정을 하기 위한 조건은 점도가 0.993이고, 크로스빔 모드이다. 모든 DNA 샘플은 PBS에서 준비한다. 약간의 양전하 표면 전하(약 +2-15 mV)에서 심각한 세포독성 문제 없이 pSV- $\beta$ -gal을 이용한 트랜스펙션 효과가 최대가 되는 것을 알 수 있다.

특히 적절한 표면 전하는 약 +5mV이다. 더 높은 양전하에서는, 더 큰 트랜스펙션효과를 얻을 수 있으나 세포독성도 동시에 증가되었다. 세포는 일반적으로 음전하를 띤 세포 표면을 가지기 때문에, 양전하를 띤 복합체가 음전하를 띤 세포 표면에 정전기적인 상호작용으로 끌어당겨진다.

이론적으로는, 복합체의 전체 표면전하는 복합체를 구성하고 있는 성분의 전하를 알면 예측을 할 수 있다. 실제로는, 본 발명에 따르는 복합체는 소수성화된 양전하를 띤 생체적합성이 있는 고분자; 리포프로테인; 핵산을 선택한 중량비로 혼합하여 얻을 수 있다. 제타 포텐셜을 결정하여 전체 표면 전하를 측정한다. 필요한 경우에 선택된 전체 표면 전하를 얻기 위해, 음전하를 띤 핵산 또는 양전하를 띤 소수성화된 고분자를 추가로 더 많이 첨가하여 전체 표면 전하를 조절할 수 있다.

## 실시예 7

실시에 5의 과정을 반복하나, 트랜스펙션하기전에 90°각에서 동적인 레이저 광을 산발하여(Brookhaven BI-DS), 스테아릴-PLL/LDL/플라스미드 조성물의 크기를 결정하는 점이 다른 것이다. 비-네가티브적인 구속 최소 제곱 분석(non negatively constrained least square analysis)으로 데이터를 분석하였다. 이 실험의 결과에서 복합체의 크기가 더 큰 것이 수송에 효과적이기는 하지만, 평균 직경이 약 200nm인 복합체는 평균직경이 약 400nm인 복합체보다 더 높은 트랜스펙션 효율을 가진다는 것을 알 수 있다. 약 200-400nm, 특히 약 200-300nm의 평균 직경을 가지는 복합체가 바람직하다. 와 같은 관찰에도 불구하고, 선택된 평균 직경을 가지는 복합체를 만드는 방법은 아직 개발하지 못하였다.

**실시에 8**

본 실시예에서, 실시예 5의 과정을 반복하는데, 단 c-myb 안티센스 올리고뉴클레오티드(서열 1)은 pSV-β-gal로 대체하고, A7R5 세포의 항증식으로 트랜스펙션효율을 모니터한다. c-myb 안티센스 올리고뉴클레오티드는 *in vitro* 에서 평활근세포의 증식을 억제하는 것을 볼 수 있었다(M. Simons & R.D. Rosenberg, 70 Cir.Res. 835 (1992)). 올리고뉴클레오티드 복합체를 첨가하기 전 24시간에 96-웰 플레이트에 웰당  $4 \times 10^4$  밀도로 접종하고, 24시간 후에 c-myb 안티센스 올리고뉴클레오티드를 각 다른 양(μg/well)을 가지는 올리고뉴클레오티드 복합체 10μl를 세포에 첨가한다. 이와 같은 올리고뉴클레오티드는 시판되는 것을 구입하거나 또는 공지의 방법으로 합성할 수 있다(R.B. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis, 85 J. Am. Chem. Soc. 2149-2156 (1963); R.B. Merrifield et al., 21 Biochemistry 5020-31 (1982); Houghten, 82 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 5131-35(1985); Hunkapiller et al., 310 Nature 105-111 (1984)). 세포는 DNA 복합체에 추가하기 전 30분에 10% 태아 송아지 혈청 또는 100μM 클로로퀸 유무 하에 5% CO<sub>2</sub> 37°C에서 48 시간동안 배양을 하였다. 살아있는 세포 비율은 MTT 발색 검사를 이용하여 측정한다(T. Mosman, 65 J. Immunol. Methods 55 (1983)). MTT 용액(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)을 각 웰에 최종 농도가 50mg/ml가 되도록 첨가하고 세포는 추가 4시간동안 배양을 한다. 각 웰에 DMSO 150μl를 첨가하여 각 웰에 형성된 포르마잔 결정을 용해시키고, 570nm에서 흡수도를 측정한다. 다음의 식으로 세포증식 또는 성장 비율을 측정한다.

**수학식 2**

$$\text{성장\%} = \frac{A_{570}(\text{샘플})}{A_{570}(\text{기준})} \times 100$$

도 5에서는 10% 태아 송아지 혈청존재하에 5nM 농도의 올리고뉴클레오티드에서 스테아릴-PLL/LDL/올리고뉴클레오티드 조성물에 의해 평활근 세포의 생장이 50%저해됨을 나타낸다. 스테아릴-PLL/LDL/올리고뉴클레오티드의 중량비가 1:1:0.006인 경우에 최대 저해 효과를 나타낸다.

**실시에 10**

본 실시예에서, 본 발명에 따라 DNA 복합체가 A7R5 세포내로 내화된 것을 조사하기 위해 유동 혈구계산 분석을 하였다. 복합체는 에티디움-브로마이드 라벨된 DNA 또는 BIODIPY-라벨된 LDL(Molecular Probe, cat. no L-3483)로 라벨을 한다.

24-웰 플레이트에 있는 세포(웰당  $4 \times 10^4$ )는 PBS로 2회 세척을 하고, 그 다음 0.1% 소 혈청 알부민이 보충된 새로운 성장 배지(DMEM)로 세척을 한다. 그 다음 세포는 형광 라벨된 DNA 또는 LDL을 포함하는 스테아릴-PLL/LDL/pSV-β-gal(중량비 1:1:1)과 함께 37°C에서 3시간동안 배양을 한다. PBS로 3회 세척 후에 세포는 트립신-EDTA로 수득하고 FACscan™ 유동 혈구계산기를 이용하여 형광 강도(488nm에서 여기, 594nm에서 방사)를 측정한다.

이와 같은 분석에서 A7R5 세포 내로 DNA 복합체가 내화하는데에는 LDL 및 Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 와 같은 이가 양이온이 필요하다는 것을 알 수 있다. 리포프로테인이 부족한 DNA 복합체를 이용하였을 경우에 세포에 의한 물질 수용이 거의 없음을 알 수 있다. 또한 100μM EDTA로 세포를 선 처리하였을 경우에 물질 수용이 감소되었다.

EDTA는 LDL의 엔도사이토시스에 필요한 것으로 알려진 이용가능한 이가이온을 제거하는 것으로 알려져있다(J. Goldstein et al., International Cell Biology 639(Rockefeller Univ. Press, 1977)). 이와 같은 발견으로 수용체(주로 LDL 수용체)-중개된 엔도사이토시스에 의해 내화작용이 일어난다는 것을 알 수 있다.

**서열표 리스트**

(1) 일반정보

(i) 출원인 ; Jin-Seok Kim, Atsushi Maruyama,

Toshihiro Akaike, Sung Wan Kim

(ii) 발명의 명칭 ; 유전자 전달하는데 이용되는 양이온 고분자 및 리포프로테인을 포함하는 시스템

(iii) 서열의 수 ; 1

(iv) 서신 주소

(A) 주소 ; Thorpe North & Western, L.L.P.

(B) 거리 ; 9035 South 700 East, Suite 200

(C) 도시 ; Sandy

(D) 주 ; Utah

(E) 나라 ; U.S.A

(F) 우편코드;84070

(v) 컴퓨터 관독 형태

(A) 매체형태 ; Diskette, 3.5inch, 1.44 Mb 용량

(B) 컴퓨터 ; AST Ascentia 900N

(C) 작동시스템 ; DOS 6.22

(D)소프트웨어 ; Word Perfert 6.0

(vi) 현재 출원 자료

(A) 출원번호 ;

(B) 출원일 ; 1996년 7월 3일

(C) 분류

(viii) 대리인

(A) 이름 ; Alan J. Howarth

(B) 등록 번호 ; 36,553

(C) 서류번호 ; T3622/U-2220

(ix) 통신정보

(A) 전화번호 ; 801-566-6633

(B) 팩스번호 ; 801-566-0750

(2) 서열 1에 대한 정보.

(i) 서열특징

(A) 길이 ; 18bp

(B) 형태 ; 핵산

(C) 가닥 ; 단일 가닥

(D) 위상 ; 선형

(ii) 분자형 ; DNA

(xi) 서열 1

[서열 1]

GTGTCGGGGT CTCCGGGC 18

### 산업상 이용 가능성

상기의 식별자가 없습니다.

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1.

선택된 핵산을 표적 숙주 세포로 수송하는 유전자 전달 조성물에 있어서, 조성물 복합체는 소수성으로 변환되고 양전하를 띠는 생체적합성 고분자; 리포프로테인;  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , 이의 혼합물에서 선택된 이가양이온; 표적 세포로 운반하고자 하는 핵산으로 구성된 것을 특징으로 하는 유전자 전달 조성물.

#### 청구항 2.

제 1 항에 있어서, 소수성으로 변환된 고분자는 소수성 탄소 사슬에 공유결합된 양전하를 띠는 생체적합성 고분자로 구성된 것을 특징으로 하는 유전자 전달 조성물.

#### 청구항 3.

제 2 항에 있어서, 양전하를 띠는 생체적합성이 있는 고분자는 폴리(L-리신)인 것을 특징으로 하는 유전자 전달 조성물.

#### 청구항 4.

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 소수성 탄소 사슬은 포화 및 불포화된 직쇄  $C_{14}-C_{18}$ 에서 선택되는 것을 특징으로 하는 유전자 전달 조성물.

**청구항 5.**

제 1 항에 있어서, 리포프로테인은 저밀도 리포프로테인(LDL), 고밀도 리포프로테인(HDL), 초저밀도 리포프로테인(VLDL)에서 선택되는 것을 특징으로 하는 유전자 전달 조성물.

**청구항 6.**

제 1 항에 있어서, 표적 세포로 전달시키기 위해 선택된 핵산은 플라스미드 또는 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 유전자 전달 조성물.

**청구항 7.**

제 6 항에 있어서, 조성물은 스테아릴-폴리(L-리신); LDL; 플라스미드 또는 올리고뉴클레오티드가 1: 1: 0.001-0.05 비율로 혼합된 것을 특징으로 하는 유전자 전달 조성물.

**청구항 8.**

삭제

**청구항 9.**

제 1 항에 있어서, 조성물은 +2-15mV의 표면 전하를 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 10.**

제 1 항에 있어서, 조성물의 평균 직경은 200 내지 400nm인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 11.**

선택된 핵산을 *in vitro*에서 세포내로 형질도입하는 방법에 있어서,

- (a) 제 1 항에 따른 조성물을 만들고;
- (b) (a)의 조성물을 세포에 접촉시켜, 핵산이 세포내로 들어가도록 하고;
- (c) 세포의 생장에 적합한 조건하에서, 선택된 핵산이 형질도입된 세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 핵산을 *in vitro*에서 세포내로 형질도입시키는 방법.

**청구항 12.**

삭제

**청구항 13.**

삭제

청구항 14.

삭제

청구항 15.

삭제

청구항 16.

삭제

청구항 17.

삭제

청구항 18.

삭제

청구항 19.

삭제

청구항 20.

삭제

청구항 21.

삭제

청구항 22.

삭제

청구항 23.

삭제

청구항 24.

삭제

청구항 25.

삭제

청구항 26.

삭제

청구항 27.

삭제

청구항 28.

삭제

청구항 29.

삭제

청구항 30.

삭제

청구항 31.

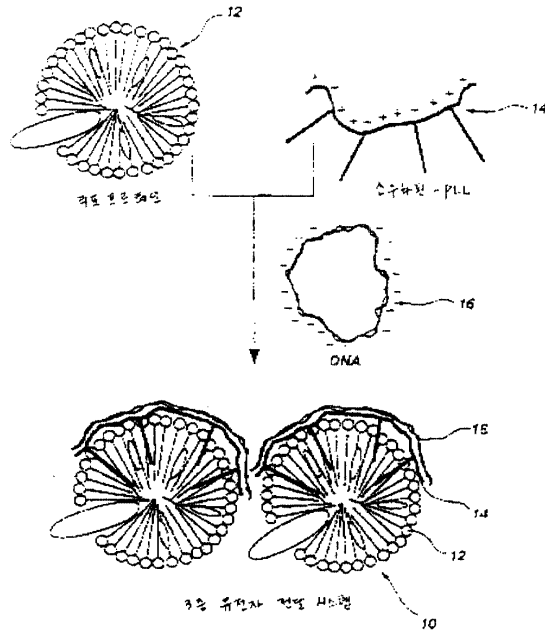
삭제

청구항 32.

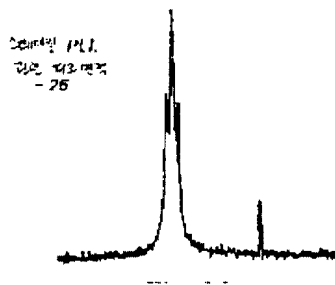
삭제

도면

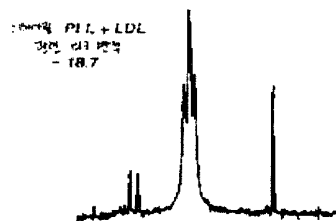
도면1



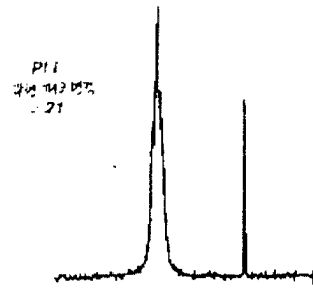
도면2a



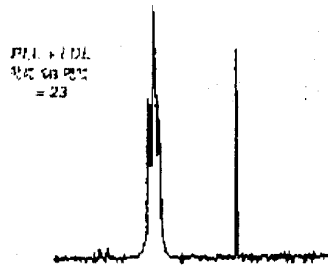
도면2b



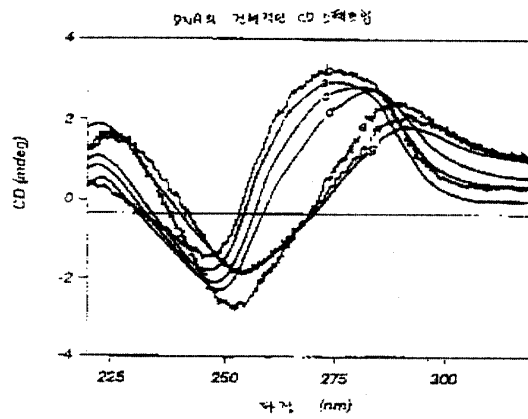
도면2c



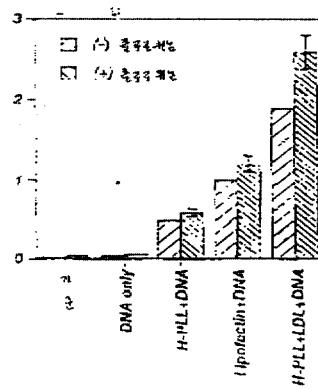
도면2d



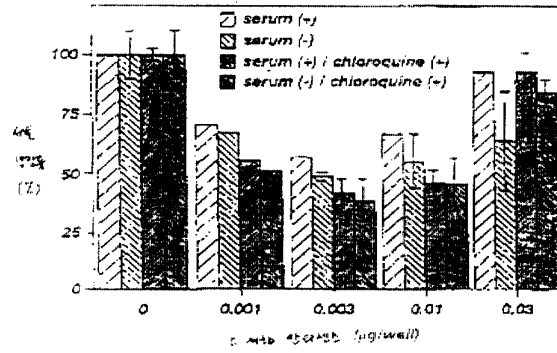
도면3



도면4



도면5



<110> UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION  
 <120> CATIONIC POLYMER AND LIPOPROTEIN-CONTAINING SYSTEM FOR GENE DELIVERY  
 <150> PCT/US 97/12425  
 <151> 1997-07-03  
 <160> 1  
 <170> KOPATIN 1.0  
 <210> 1  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> c-myb antisense oligonucleotide  
 <400> 1  
 gtgtcggggt ctccgggc