



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

A61K 47/34 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

A61F 2/02 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2009-0102642

(22) 출원일자

2009년10월28일

심사청구일자

2009년10월28일

(11) 공개번호

10-2011-0045895

(43) 공개일자

2011년05월04일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

이승진

서울특별시 영등포구 여의도동 43-4 롯데캐슬IVY 102동 2804호

정미라

서울특별시 은평구 증산동 204-40 대도빌라 201호

심인경

서울특별시 마포구 창전동 서강해모로아파트 103동 202호

(74) 대리인

안소영

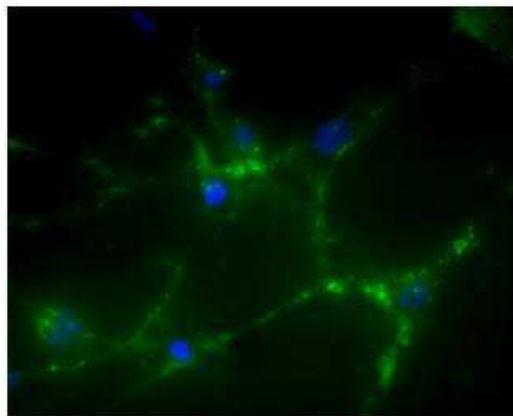
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 유전자 전달용 섬유형 다공성 지지체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 습식방사 및 에멀전 코팅법을 이용한 유전자 전달용 섬유형 다공성 지지체 및 그의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 유전자 전달용 섬유형 다공성 지지체는 지지체 상의 코팅된 유전자를 장기간 서서히 방출하여 이식된 세포 및 체내 세포에 유전자를 효과적으로 도입시키며, 유전자 방출 완료 후 자연적으로 생분해되어 인체에 흡수되는 작용효과를 나타낸다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2005-00009

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 바이오기술 개발사업

연구과제명 기관조직 재생유도 원천기술 개발연구

기여율

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2005년 04월 01일 ~ 2014년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

생분해성 고분자를 습식방사하여 제조된 삼차원구조의 섬유로 이루어진 다공성 지지체 상에 유전자와 유전자 수송체의 콘쥬게이트가 코팅된 유전자 전달용 섬유형 다공성 지지체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 생분해성 고분자는 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산)(poly(D,L-lactide-co-glycolide); PLGA), 폴리(카프로락톤), 디올/이애시드계 지방족 폴리에스테르, 폴리에스테르-아미드/폴리에스테르-우레탄, 폴리(발레로락톤), 폴리(하이드록시부티레이트), 폴리(하이드록시 발레레이트) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 섬유형 다공성 지지체.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 폴리락트산(PLA)은 폴리엘락트산(PLLA)인 섬유형 다공성 지지체.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 섬유는 직경이 70 내지 100 μ m인 섬유형 다공성 지지체.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 유전자와 유전자 수송체의 콘쥬게이트는 에멀전의 형태로 분사되어 지지체 상에 코팅된 섬유형 다공성 지지체.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 에멀전 형태의 유전자와 유전자 수송체의 콘쥬게이트는 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산) 및 유전자와 유전자 수송체의 콘쥬게이트가 혼합되어 제조된 에멀전인 섬유형 다공성 지지체.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 유전자와 유전자 수송체의 콘쥬게이트는 목적하는 유전자를 포함하는 플라스미드 DNA와 Hph-1-PTD(Protein Transduction Domain)의 콘쥬게이트인 섬유형 다공성 지지체.

청구항 8

하기의 단계를 포함하는 유전자 전달용 섬유형 다공성 지지체의 제조방법:

- (1) 생분해성 고분자를 유기용매에 용해시킨 방사액을 습식방사하여 삼차원 구조의 섬유로 이루어진 다공성 지지체를 제조하는 단계; 및
- (2) 상기 (1)단계에서 제조한 다공성 지지체 상에 유전자와 유전자 수송체의 콘쥬게이트를 포함하는 에멀전을 코팅하는 단계.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 생분해성 고분자는 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산), 폴리(카프로락톤), 디올/이애시드계 지방족 폴리에스테르, 폴리에스테르-아미드/폴리에스테르-우레탄, 폴리(발레로락톤), 폴리(하이드록시부티레이트) 및 폴리(하이드록시 발레레이트)로 이루어진 군으로부터 선택되는 섬유형 다공성 지지체의 제조방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 유기용매는 클로로포름, 디클로로메탄, 디메틸포름아미드, 디옥산, 아세톤, 테트라하이드로퓨란, 트리플루오르에탄, 1,1,1,3,3,3-헥사플루오르이소프로필프로판올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 섬유형 다공성 지지체의 제조방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 유기용매는 디클로로메탄과 1,1,1,3,3,3-헥사플루오르이소프로필프로판올, 또는 디클로로메탄과 아세톤의 혼합용매인 섹유형 다공성 지지체의 제조방법.

청구항 12

제 8 항에 있어서, 에멀전은 유전자와 유전자 수송체의 콘주게이트, 및 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산)을 혼합하여 제조된 에멀전인 섹유형 다공성 지지체의 제조 방법.

청구항 13

제 8 항에 있어서, 상기 형성된 섹유를 결손 부위에 맞게 성형하는 단계를 추가적으로 포함하는 유전자 전달용 섹유형 다공성 지지체의 제조 방법.

청구항 14

제 8 항에 있어서, 상기 방사액은 생분해성 고분자를 5 내지 20 중량% 로 함유하는 섹유형 다공성 지지체의 제조 방법.

청구항 15

제 8 항에 있어서, 상기 (1)단계의 습식방사는 15 내지 25℃의 온도에서, 내부직경이 0.5 내지 1.2mm인 주사기로부터, 응고조 거리가 10 내지 20 cm 인 응고조로 0.050 내지 0.150ml/min의 속도로 방사액이 방사되는 섹유형 다공성 지지체의 제조 방법.

청구항 16

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 기재된 유전자 전달용 섹유형 삼차원 다공성 지지체를 포함하는 세포의 부착, 성장 또는 재생용 이식재.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 세포는 지방유래 성체줄기세포, 골수유래 성체줄기세포, 피부조직 세포, 연골세포, 또는 골세포인 세포의 부착, 성장 또는 재생용 이식재.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 유전자 전달용 섹유형 다공성 지지체 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 유전자 치료는 결손된 유전자를 외부에서 도입하여 세포를 정상상태로 바꾸거나, 특정 기능을 가지는 유전자를 세포 내로 도입하여 정상세포의 기능을 증강시켜 질병을 치료하는 분야이다. 성공적인 유전자 치료를 위해서는 도입된 유전자가 안전하고 부작용 없이 발현이 지속되어야 하며 체내 면역반응을 일으키지 않아야 한다.

[0003] 유전자 치료의 핵심기술들 중 하나는 외부 유전자를 효과적으로 세포 내로 전달하여 안정적으로 발현시키는 전달매체를 제조하는 것이다. 유전자 전달 기술은 크게 바이러스성 벡터 감염법(viral vector transfection), 합성 인지질이나 합성 양이온성 고분자 등을 사용하는 비바이러스성 벡터 감염법(nonviral vector transfection)으로 구분된다. 바이러스를 유전자의 전달체로 이용하는 바이러스성 벡터 감염법의 경우 유전자 발현 효율은 높으나 일정한 발현효율을 계속 유지하기가 어렵고 면역원성이 높아 반복투여시 부작용을 유발할 가능성이 있어 사용이 제한적이다. 이에 반하여, 비바이러스성 벡터들은 안전성이 뛰어나고 DNA의 크기에 제한을 받지 않는다는 장점이 있기 때문에 많이 사용되고 있다. 하지만, 이러한 양이온성 고분자와 같은 비바이러스성 벡터는 표면에 양이온을 띠기 때문에 혈액구성물질과 비특이적으로 상호 작용하여 유전자전달 효율이 낮다는 문제점이 있다. 따라서, 이러한 점을 보완하여 유전자전달 효율을 향상시켜 효과적인 유전자 치료를 기대할 수 있는 새

로운 방법이 요구된다.

- [0004] 한편, 유전자 치료에서는 원하는 조직에서의 치료효율을 높이고 원치 않는 조직에서의 부작용을 줄이기 위한 특정 조직에 특이적으로 작용하게 하는 표적화 기술이 중요하다. 리간드 또는 항체를 결합시키거나 특정조직 선택적 프로모터를 사용하여 다른 장기에서의 발현을 막는 표적화 기술 등이 있다. 하지만, 이러한 방법을 사용한다 하더라도 일회적인 주입으로는 원하는 양의 유전자를 목적세포에 도입시키기 어렵고, 또한 표적화 가능한 조직이 제한적이다. 따라서, 치료부위에 유전자와 지지체를 함께 이식하여 원하는 부위에서만 장기간 유전자를 발현하게 하는 시스템이 요구된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0005] 본 발명의 목적은 표적부위에 장기간 고효율로 유전자를 도입하기 위한 유전자 전달용 섬유형 삼차원 지지체 및 그 제조방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0006] 상기의 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명은 습식방사로 제조된 삼차원 고분자 지지체 상에 에멀전 상태의 유전자를 코팅한 유전자 전달용 섬유형 다공성 지지체를 제공한다.
- [0007] 본 발명은 또한 상기 유전자 전달용 다공성 지지체를 포함하는 세포의 부착, 성장 및 재생용 이식재 및 이들의 제조방법을 제공한다.
- [0008] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0009] 본 발명은 생분해성 고분자로 제조된 섬유상 지지체 상에 에멀전화된 유전자가 코팅 성형된 삼차원 구조의 유전자 전달용 섬유형 다공성 지지체를 제공한다.
- [0010] 상기 생분해성 고분자는 유전자의 담체 역할을 하는 동시에 방출 조절 기능을 가지며 생분해성 및 생체적합성을 가지는 고분자를 의미하며, 통상 생체재료로 사용가능한 생분해성 합성 고분자 또는 천연 고분자이다. 상기 생분해성 고분자는 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산)(poly(D,L-lactide-co-glycolide); PLGA), 폴리(카프로락톤), 디올/이에서드계 지방족 폴리에스테르 또는 폴리에스테르-아미드/폴리에스테르-우레탄 등을 포함하는 생분해성 지방족 폴리에스테르, 폴리(발레락톤), 폴리(하이드록시부티레이트) 및 폴리(하이드록시발레레이트)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 고분자를 사용할 수 있다. 바람직하게는 폴리락트산(PLA)을 사용할 수 있다.
- [0011] 바람직한 폴리락트산은 폴리엘락트산(PLLA)이다.
- [0012] 상기 생분해성 고분자는 분자량이 10만 내지 35만 kDa인 고분자, 바람직하게는 폴리락트산(PLA)을 사용할 수 있다.
- [0013] 또한, 본 발명의 유전자 전달용 삼차원 섬유형 다공성 지지체의 제조를 위하여 상기 생분해성 고분자뿐만 아니라 생분해성 저분자도 사용 가능하다.
- [0014] 상기 생분해성 고분자 및/또는 생분해성 저분자를 유기용매에 용해시켜 습식방사를 위한 방사액을 제조할 수 있다. 적절한 점도를 가지는 섬유형 고분자 지지체를 제조하기 위한 방사액 내 생분해성 고분자 및/또는 생분해성 저분자의 함량은 5 내지 20 중량%이다.
- [0015] 상기 유기용매는 생분해성 고분자 및/또는 생분해성 저분자를 용해시킬 수 있고, 낮은 비등점을 갖는 휘발성 유기용매이면 어느 것이나 사용 가능하며, 비등점이 0 내지 40℃이고, 점도가 25 내지 35 cps 를 가지는 유기용매가 바람직하며, 클로로포름, 디클로로메탄, 디메틸포름아미드, 디옥산, 아세톤, 테트라하이드로퓨란, 트리플루오르에탄, 1,1,1,3,3,3-헥사플루오르이소프로필프로판올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 사용할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 디클로로메탄을, 보다 바람직하게는 디클로로메탄과 1,1,1,3,3,3-헥사플루오르이소프로필프로판올, 또는 디클로로메탄과 아세톤의 혼합용매를 사용할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 유전자 전달용 섬유형 다공성 지지체는 상기 유기용매에 용해된 생분해성 고분자 및/또는 생분해성 저분자를 포함하는 방사액의 습식방사에 의하여 제조된다.
- [0017] 습식방사 방식으로 방사시, 방사액이 응고조를 통과하면서 용매가 신속하게 응고되어야 컬렉터 상에서 섬유와

섬유 사이가 붙지 않고 각각 분리된 형태로 수거된다. 응고용매로는 상기 방사액을 신속하게 응고시킬 수 있는 용매로서, 바람직하게는 메틸알코올, 에틸알코올을 사용할 수 있다.

[0018] 상기 제조된 섬유는 직경이 50 내지 100 μ m, 바람직하게는 70 내지 100 μ m인 것이 바람직하다. 상기 범위의 직경을 가지는 섬유로 이루어진 섬유형 삼차원 다공성 지지체는 적용부위에서의 압력 하에서도 일정한 형태와 공간을 유지하여 조직의 삼차원적 재생을 돕고, 또한 세포와 인접하는 표면적을 크게 하여 세포 부착 및 증식을 용이하게 하는 구조를 제공하며, 장기간 유전자를 서서히 방출할 수 있다.

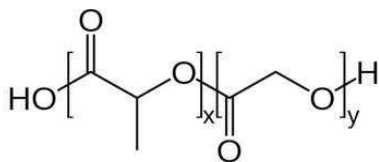
[0019] 본 발명에서 사용되는 전달용 유전자는 치료를 위해 생체 내 목적하는 부위로 전달되는 유전자로서, 특정 질병이나 상태의 예방 또는 치료를 위해 공지된 임의의 유전자일 수 있으며, 특정 유전자에 한정되지 않는다. 상기 유전자는 직접 또는 플라스미드의 형태로 유전자 수송체에 의해 세포 내로 전달된다.

[0020] 상기 유전자를 운반하기 위한 유전자 수송체는 비바이러스성 유전자 전달체를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 단백질 전달체(Protein Transduction Domain, PTD)를 사용할 수 있다. 상기 PTD는 인간 면역결핍 바이러스 타입 1(HIV-1)에서 유래한 Tat 단백질, 초파리의 안테나페디아 호메오도메인(Antennapedia Homeodomain)인 Antp(Antennapedia 또는 penetratin) 펩타이드, 쥐의 전사인자의 Mph-1, HSV-1의 VP22 및 청어 프로타민의 HP4, Hn1 합성 펩티드(미국 출원공개 제2002-0102265호)와 같은 세포-특이적 PTD, Ho 등이 HIV의 Tat 단백질이 단백질 전달 능력을 최적화하도록 Tat 단백질의 47-57 잔기를 변형한 펩티드(Ho et al. (2001) *Cancer Res* 61(2):474-7)와 같은 합성 펩티드가 있다. 바람직하게는 Hph-1-PTD (한국공개특허공보 10-2009-0028624), 보다 바람직하게는 상기 서열번호 1의 Hph-1-BTM 가 사용된다.

[0021] 상기 유전자를 운반하는 유전자 수송체의 콘쥬게이트 (이하, '유전자-유전자 수송체 콘쥬게이트'라 함)는 유전자와 유전자 수송체의 융합 또는 결합 복합체의 제조에 관한 공지된 다양한 방법에 의하여 당업자가 용이하게 제조할 수 있다.

[0022] 한편, 본 발명의 유전자-유전자 수송체 콘쥬게이트는 에멀전 형태로 제조되어 다공성 지지체 상에 코팅된다. 바람직하게는, 상기 에멀전은 목적하는 유전자 수송체와 하기 화학식 1의 반복단위를 '폴리(D,L-락트산-co-글리콜산)(poly(D,L-lactide-co-glycolide); PLGA)'을 혼합하여 제조할 수 있다.

[0023] [화학식 1]



[0024]

[0025] (식 중, x는 젖산의 단위 수이고, y는 글라이콜릭 산의 단위 수 이다.) 상기 PLGA는 섬유의 표면에 코팅되어 유전자 전달의 담체 (carrier) 역할을 한다. PLGA 0.5 w/v%의 에멀전이 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명은 또한 상기 유전자 전달용 섬유형 삼차원 다공성 지지체를 포함하는 세포의 부착, 성장 또는 재생용 이식재를 제공한다.

[0027] 상기 세포는 지방유래 성체줄기세포, 골수유래 성체줄기세포, 피부조직 세포, 연골세포, 또는 골세포일 수 있다.

[0028] 본 발명은 또한 하기의 단계를 포함하는 유전자 전달용 섬유형 다공성 지지체의 제조방법을 제공한다:

[0029] (1)생분해성 고분자, 생분해성 저분자 또는 이들의 혼합물을 유기용매에 용해시켜 얻어진 고분자용액을 습식방사하여 삼차원 섬유형 다공성 지지체를 제조하는 단계; 및

[0030] (2)상기 (1) 단계에서 제조된 섬유형 다공성 지지체 상에 유전자-유전자 수송체 콘쥬게이트를 포함하는 에멀전을 코팅하는 단계.

[0031] 상기 (1)단계의 습식방사는 15 내지 25 $^{\circ}$ C에서, 응고조 거리가 10 내지 20 cm 인 응고조에서, 내부직경이 0.5 내지 1.2mm인 주사기로부터 방출속도 0.050 내지 0.150 ml/min의 속도로 고분자용액을 방사하는 것이 바람직하다.

[0032] 또한, 본 발명의 유전자 전달용 섬유형 다공성 지지체의 제조방법은 상기 (1) 단계에서 제조된 섬유형 다공성

지지체를 결손 부위에 맞게 성형하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 더욱 구체적으로는, 상기 (1) 단계에서 제조된 섬유를 적당한 형태, 예컨대, 구형의 몰드에 주입하고 압축하여 성형할 수 있다.

[0033] 한편, 상기 (2) 단계에서는 상기 (1)단계에서 제조된 삼차원 섬유형 다공성 지지체 상에 유전자-유전자 수송체 콘쥬게이트를 포함한 고분자 에멀전을 코팅한다. 에멀전의 코팅은 지지체 위에 유전자-유전자 수송체 콘쥬게이트를 함유한 에멀전을 떨어뜨려 코팅시킬 수 있다.

[0034] 폴리락타이드글리콜라이드(PLGA)와 유전자-유전자 수송체 콘쥬게이트를 에멀전화하면 친수성과 소수성을 모두 가지므로 유전자와 유전자 수송체 간의 결합을 보호할 수 있다. 또한, PLGA 의 농도와 코팅 두께를 조절함으로써 분해되는데 걸리는 시간이 조절하여 유전자 방출 시간을 조절할 수 있다. 따라서, 본 발명의 유전자 전달용 섬유형 삼차원 지지체는 원하는 양의 유전자를 원하는 시간 동안 생체 내에서 방출할 수 있기 때문에 손상된 조직의 재생 및 질병의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

효 과

[0035] 본 발명의 유전자 전달용 삼차원 섬유형 다공성 지지체는, 지지체가 적용부위의 압력하에서도 일정한 형태와 공간을 유지하여 조직의 삼차원적 재생을 돕는 동시에 세포와 관계하는 표면적을 크게 하여 세포가 잘 부착하고 증식되는 구조를 제공하며 장기간 유전자를 서서히 방출하여 장기간 표적기관에 높은 효율로 유전자를 전달한다. 또한, 생체분해성 및 생체적합성을 가지며, 큰 공극과 공극들 사이의 높은 상호연결성(interconnectivity)을 가져 생체 내로의 이식 이후에 혈관의 형성 및 영양분, 성장인자, 호르몬 등의 물질 전달을 용이하게 한다. 따라서 효과적인 유전자 치료에 유용하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0036] 이하 본 발명의 내용을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 다만 이들 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위해 제시되는 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 실시예 1: 유전자 전달용 섬유형 삼차원 지지체의 제조

[0038] (1) 습식방사를 이용한 섬유형 삼차원 지지체의 제조

[0039] PLLA 고분자 (PURAC Biochem BV사, 중량평균분자량(M_w) 130,000) 0.6 g 을 9ml의 디클로로메탄 및 1ml의 아세톤 혼합 용매에 용해하여, 6%의 농도를 갖는 방사액을 제조하였다. 도 1에 나타난 바와 같이, 상기 방사액을 주사기 펌프(KD science) 를 사용하여 일정속도로 용액이 방출되도록 조절하고, 일정 rpm으로 회전하는 콜렉터를 사용하여 응고조를 통과한 섬유를 수거하는 방식으로 섬유를 제조하였다.

[0040] 구체적으로는, 상기의 PLLA 고분자 용액(방사액)을 방사액 저장소에 충전하였다. 상기 방사액 저장소는 10ml 유리주사기를 사용하였으며, 내부직경이 0.5 내지 1.2 mm 인 주사바늘을 사용하였다. 방사액의 방출속도는 0.060 ml/min으로 조절하였다. 원하는 섬유를 제조하기 위해서는 컬렉터 상에 섬유가 집적되기 전에 용매가 모두 응고되어야 하므로 응고용매로서 메틸알코올을 사용하였고, 응고조 길이는 20cm이며, 상온에서 수행 하였다.

[0041] 시차 현미경을 사용하여, 상기 제조된 고분자 PLLA 섬유가 50 내지 100 μ m의 두께를 가짐을 확인하였다 (도2a).

[0042] (2) 유전자-유전자 수송체 콘쥬게이트의 제조

[0043] 1) Hph-1-PTD 발현벡터 제조

[0044] 사람의 전사인자인 Hph-1 (GenBank accession no.: NP 004417.2)의 염기서열을 포함하는 pPTD-Gal4DBD 를 제조한 후 pfu turbo DNA 중합효소 (Stratagene, cat.# 600252-51)를 사용하여 PCR을 수행하였다.

[0045] PCR에서 수득한 반응생성물을 제한효소 EcoRI과 HindIII로 절단한 후, 퀴아퀵(Quiaquick) PCR 정제키트 (QIAGEN, cat.# 28104)를 사용하여 정제한 다음, 겔 추출 방법으로 정제한 pRSETB (입수처: Invitrogen, Cat.No. V351-20)의 EcoRI/HindIII 위치에 클로닝하여 제조합 발현벡터를 제조하고 이를 pHph-1 이라 명명하였다.

[0046] 2) 대장균 형질전환체의 제조 및 Hph-1-PTD 단백질의 발현 및 정제

- [0047] 실시예 1에서 제조된 발현벡터 pHph-1를 사용하여 대장균 BL21-Star (입수처: Stratagene) 를 열충격 형질전환 방법 (heat shock transformation)으로 형질전환시킨 다음, 형질전환된 대장균을 4ml의 LB 배지 (입수처:BD Biosciences)에 접종하고 14시간 동안 37℃에서 교반하면서 전 배양하였다. 이를 다시 250ml의 LB 배지 (1000ml 당 카세인의 팬크리아틱 다이제스트 10g, 이스트 엑스트랙트 5g, 염화나트륨 10g 함유)에 접종하고 37℃에서 3 시간 동안 배양한 후, 1mM 농도의 IPTG (GibcoBRL cat.# 15529-019)를 첨가하여 37℃에서 4시간 동안 배양하여 융합단백질의 발현을 유도하였다. 상기 배양액을 4℃에서 6,000rpm으로 20분간 원심분리하여 펠렛(pellet)만 남기고 상등액을 제거한 후, 10ml의 완충용액 1 (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 6M GuHCl, pH 8.0)로 펠렛을 풀어준 다음, 얼음에서, 초음파 분쇄기 (Heat systems, ultrasonic processor XL)를 사용하여 300W의 세기로 6 초간 초음파를 주입하고 6초간 냉각하는 과정을 반복하여 누적 초음파 주입시간을 5분으로 하여 펠렛이 완전히 풀려서 용액의 색깔이 투명하게 될 때까지 했다. 용출액을 4℃에서 12,000rpm으로 20분간 원심분리하여 대장균의 과채물을 제거하고 순수한 용출액만을 분리하였다. 분리된 용출액에 0.5ml의 50% Ni²⁺-NTA 아가로스 슬러리 (Qiagen, cat # 30230)를 넣고 상온에서 200rpm으로 1시간 동안 교반하여 융합단백질과 Ni²⁺-NTA아가로스를 결합시키고, 이 혼합액을 크로마토그래피용 0.8 x 4 cm 칼럼 (BioRad, cat.# 731-1550)에 넣어 흘려주었다. 10 ml의 완충용액 2 (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 4M GuHCl, pH 6.3)를 사용하여 두 차례 세척을 한 후, 1ml의 완충용액 3 (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 2M GuHCl, pH 4.5)로 융합단백질을 분획하고, PD-10 염 제거 칼럼 (아머샴 과마시아 바이오텍 cat.# 17-0851-01)으로 염을 제거하였다. 이와 같이 정제된 단백질은 11개의 아미노산 (YARVRRRGPRR) 으로 구성되어 있다. 상기 제조된 Hph-1-PTD 단백질은 연세대학교 생명시스템대학 면역세포공학연구실로부터 입수하였다.
- [0048] 3) 리포터 유전자 (EGFP)의 제조
- [0049] 당업계에서 널리 사용되는 리포터 유전자인 녹색형광 단백질 (EGFP, Enhanced Green Fluorescence Protein)을 발현할 수 있는 염기서열과, Gal4 를 특정하게 인식하는 부위인 UAS 가 코딩된 pEGFP-UAS 플라스미드를 pEGFP-N1 (입수처 : 클론텍)으로부터 제조하였다. Gal4 특정인식 부위는 5개의 Gal4 결합부위가 있는 UAS_{17mer}x5 를 포함하는 pG5CAT 벡터 (입수처 : 클론텍)로부터 증폭되었다. PCR 프라이머는 5'와 3' 양쪽 끝에 StuI 부위가 있다. 상기 pEGFP-UAS 플라스미드는 도 3에 나타난 개열지도를 가진다. 상기 제조된 pEGFP-UAS 플라스미드는 연세대학교 생명시스템대학 면역세포공학연구실로부터 입수하였다.
- [0050] 4) 유전자-유전자 수송체 콘쥬게이트의 제조
- [0051] 상기 3)에서 제조한 플라스미드 3μg당 상기 1)에서 제조한 Hph-1-PTD 125 μg을 binding buffer(200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM choline chloride) 존재 하에 실온에서 30분간 결합시켰다.
- [0052] (3) 유전자-유전자 수송체 콘쥬게이트 함유 에멀전의 제조
- [0053] 수상/유상 (w/o) 에멀전 방법으로 위에서 제조한 유전자-유전자 수송체 콘쥬게이트를 함유하는 에멀전을 제조하였다. 에틸아세테이트에 0.5중량%의 농도로 폴리(D,L-락타산-co-글리콜산)(poly(D,L-lactide-co-glycolide) ; PLGA)를 용해시킨 후 이 용액 100μl 에 상기에서 제조한 유전자-유전자 수송체 콘쥬게이트 3μg과 계면활성제인 Span 80을 1% 농도로 첨가하여 초음파 교반기로 30초간 교반하여 에멀전 상태를 만들었다.
- [0054] (4) 섬유형 삼차원 다공성 지지체 상에 유전자 수송체 에멀전의 코팅
- [0055] 상기 제조한 유전자 수송체 에멀전을 상기 실시예1.(1)에서 제조한 고분자 PLLA 섬유(섬유형 삼차원 다공성 지지체)에 떨어뜨려 표면에 코팅하였다. 지지체가 함유할 수 있는 에멀전의 부피가 약 80μl이므로 80μl의 에멀전을 떨어뜨려 흘러내려 소실되는 양이 없도록 하였다. 지지체 표면의 용매를 휘발시켜 코팅된 표면을 시차현미경으로 확인하였다. 그 결과를 도 2b에 나타내었다. 도 2a의 사진(에멀전 코팅 전)과 비교했을 때 표면에 입자들이 침착되어 있는 것을 확인할 수 있다. 에멀전 상태의 유전자-유전자 수송체가 용매가 휘발되면서 지지체 표면에 코팅된 것을 확인할 수 있다.
- [0056] 실험예1: 지방유래 줄기세포로의 유전자 전달 효과 확인

- [0057] (1) 플라스미드 EGFP를 도입한 지방유래 줄기세포의 제조
- [0058] 지방유래 줄기세포를 10% 우태아 혈청과 페니실린-스트렙토마이신 100단위/ml을 첨가한 DMEM-F12 배지에서 T 플라스크의 약 70% 정도로 자랄 때까지 37℃/5% CO₂ 에서 배양하였다.
- [0059] 상기 플라스크로부터 줄기세포(Human Adipose-Derived Stem Cell)를 분리하여 초기 배양(primary cell culture)을 한 후, 상기 실시예1에서 제조한 지지체 상에 줄기세포 1X10⁶ 개씩 이식하고, 37℃/5% CO₂ 에서 정적 배양(static culture) 하였다. 2% 혈청함유배지 (Opti-MEM, INVITROGEN, A modification of MEM (Eagle's), HEPES buffer, hypoxanthine, thymidine, sodium pyruvate, L-glutamine, trace elements, growth factors, and phenol red reduced to 1.1 mg/L) 5ml를 첨가하였다. 48시간 동안 37℃/5% CO₂ 조건으로 배양한 후 배지를 각 웰로부터 아스피레이션하고 인산완충용액 3ml로 두 번 세척하였다. 0.5 ml 트립신-이디티에이 (Trypsin-EDTA)를 처리하여 세포를 지지체로부터 떼어낸 다음 3분 동안 1500rpm으로 원심분리 하여 상층액을 제거하였다
- [0060] (2) 지방유래 줄기세포에서 녹색 형광단백질 유전자의 발현 확인
- [0061] 상기 (1)에서 지지체로부터 떼어낸 세포를 다시 웰에서 37℃/5% CO₂ 조건으로 12시간 배양한 후 형광현미경으로 녹색 형광단백질 유전자의 발현을 관찰하였다 (도 4). 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 유전자 전달용 삼차원 섬유형 다공성 지지체로부터 유전자가 지방유래 줄기세포로 전달됨이 확인되었다.
- [0062] 실험예2: 본 발명의 섬유형 삼차원 다공성 지지체 상의 유전자의 방출 패턴 확인
- [0063] 상기 실시예1에서 제조한 지지체를 인산완충 생리식염수(PBS pH 7.4) 1ml에 넣고 37℃로 유지되는 항온조에 두었다. 특정 시간마다 (4시간, 1,3,5,7일) 완충액을 교환해 주고, 방출되어 나온 유전자의 양을 Pico Green assay 시약을 넣고 형광광도를 측정하여, 시간 경과에 따른 방출 유전자의 양을 정량하였다. 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0064] 도 5에 나타난 바와 같이, 초기 4시간 동안의 방출량이 12%로 적었고 유전자가 지지체로부터 7일간 서서히 방출되어 60%까지 방출됨을 확인하였다.
- [0065] 실험예 3 : 유세포 분석(Flow cytometry analysis)을 통한 리포터 유전자의 지속적 발현 효과 확인
- [0066] 상기 실험예 1의 (1)와 동일한 방법으로 본 발명의 유전자 전달용 섬유형 삼차원 지지체 상에서 지방유래 줄기세포를 37℃/5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양 48시간, 7일, 14일째 배양물을 수거하여 PBS로 3회 세척하고, 트립신 처리한 뒤 세포들을 수거하여 5분 동안 1500rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후, 유세포 분석기(Flow cytometer)(제조사; BD Biosciences (USA), 모델명; Becton-Dickinson FACStar plus flow cytometer)를 이용하여 형광을 띠는 세포의 비율 및 형광의 세기를 측정하였다.
- [0067] 비교예: 유전자 수송체를 단순 주입하여 배양한 지방유래 줄기세포의 리포터 유전자 발현 패턴 확인
- [0068] 한편, 상기 실험예 3과의 비교를 위하여, 상기 실시예 1 (1)에 기재된 방법으로 지지체를 제조하였다. 이렇게 제조된 지지체상에 지방유래 줄기세포를 정적배양하고 배양액에 상기 실시예 1 (2)에서 제조된 유전자-유전자 수송체 콘쥬게이트 3μg을 1회 주입하였다. 이를 상기 실험예 3에서와 동일한 방법으로 배양하고, 배양 48시간, 7일, 14일째 배양물을 수거하여 PBS로 3회 세척하고, 트립신 처리한 뒤 세포들을 수거하여 5분 동안 1500rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후, 유세포 분석기(Flow cytometer)를 이용하여 형광을 띠는 세포의 비율 및 형광의 세기를 측정하였다. 그 측정결과를 아래 표 1 및 도 6 에 나타내었다.

[0069] [표1]

[평균형광강도]

	실험예3	비교예
48 시간	41.08	34.48
7 일	75.48	39.96
14 일	113.04	37.21

[0070]

[0071] 상기 표 1 및 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 유전자 전달용 삼차원 섬유형 다공성 지지체를 사용하여 유전자 도입된 지방유래 줄기세포(실험예 3)는 14일이 경과한 후에도 비교예와 비교하여 형광을 띠는 세포의 비율뿐만 아니라 형광의 세기도 현저히 증가되고 있음이 확인되었다. 특히 유전자 동량을 1회 주입한 비교예의 경우 형광강도가 약간 증가하는데 그친 반면, 본 발명의 유전자 수송체를 천천히 방출하는 유전자 전달용 삼차원 섬유형 다공성 지지체를 사용한 실험예 3의 경우 형광강도가 지속적으로 증가함을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0072] 도 1은 본 발명에 의한 유전자 전달용 섬유형 다공성 지지체를 제조하는 단계 중 고분자 용액을 습식방사하는 단계를 도시한 그림이다.

[0073] 도 2a는 본 발명에 따른 섬유형 지지체 제조에서, 에멀전 코팅 전 섬유의 시차현미경 사진 (200배) 을 나타낸 것이다.

[0074] 도 2b는 본 발명에 따른 섬유형 지지체에 에멀전을 코팅한 후 SEM사진을 도시한 것이다.

[0075] 도 3은 pEGFP-UAS 플라스미드의 개열지도를 나타낸 도이다.

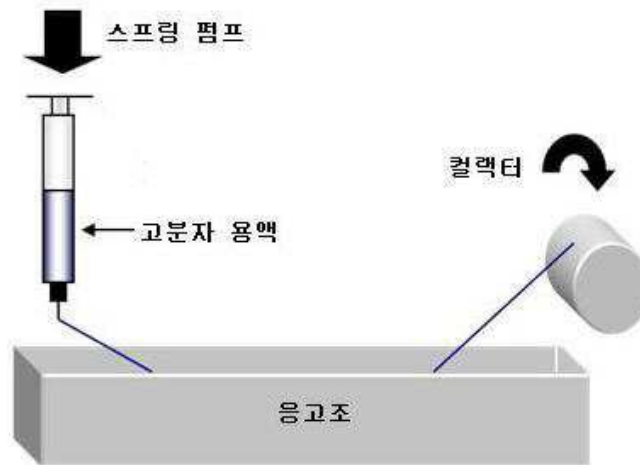
[0076] 도 4는 형광현미경으로 본 발명에 따른 실험예1의 녹색 형광단백질 유전자의 발현을 관찰한 결과이다.

[0077] 도 5는 본 발명에 따른 실험예2의 유전자 방출패턴 분석 결과이다.

[0078] 도 6는 배양 48시간, 7일, 14일째, 실험예3과 비교예의 형광강도 패턴을 나타낸 그래프이다.

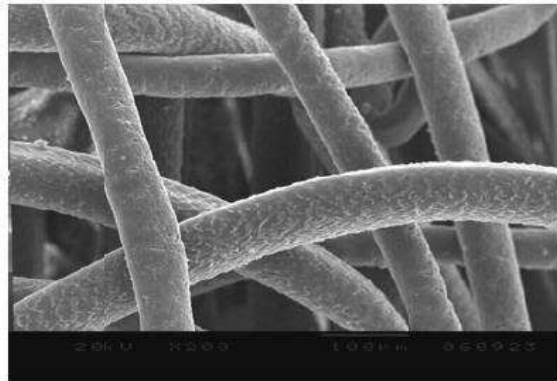
도면

도면1

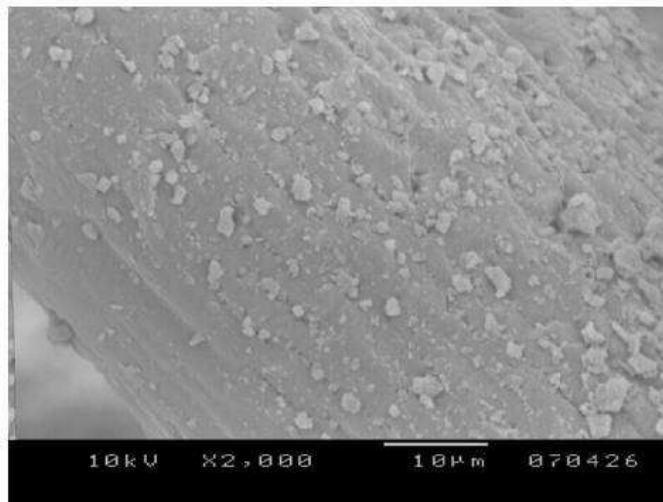


도면2

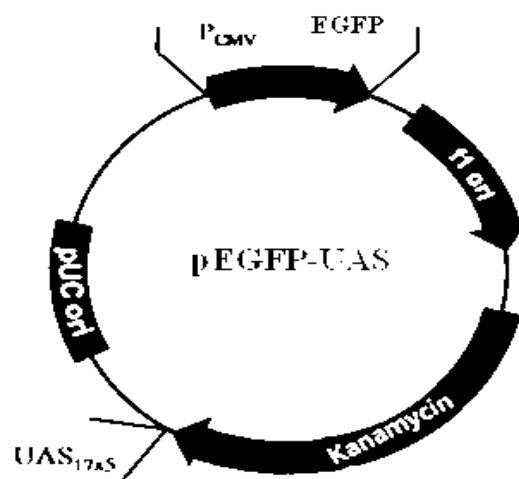
(2a)



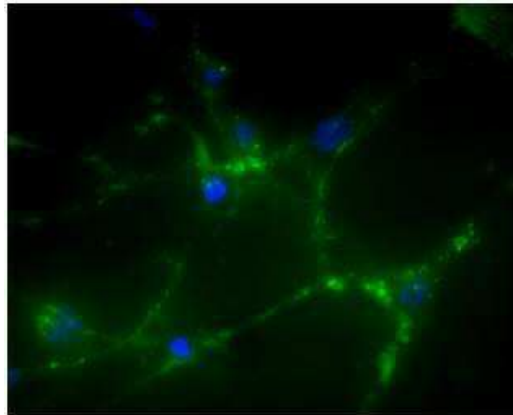
(2b)



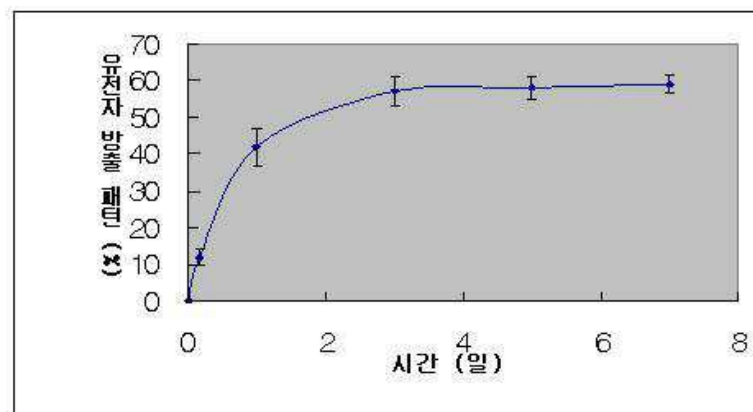
도면3



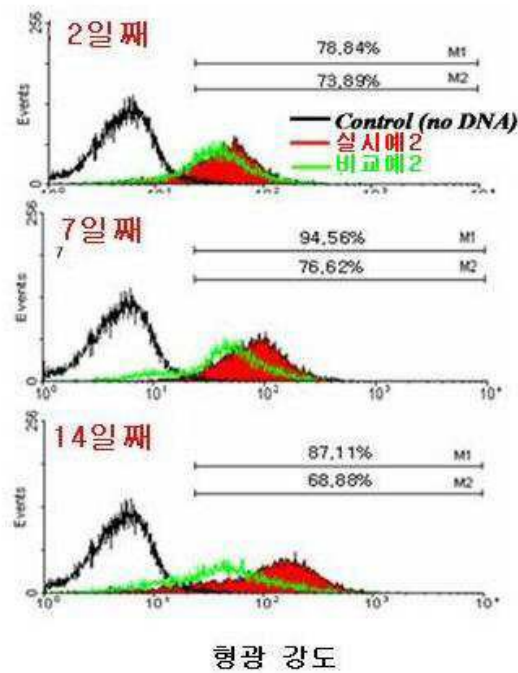
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> EWAH UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION
- <120> Fibrous scaffold for gene delivery and method for preparing the same
- <130> P09-086-EWAH
- <160> 1
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Hph-1-BTM (Protein transduction domain)
- <400> 1
- Tyr Ala Arg Val Arg Arg Arg Gly Pro Arg Arg
- 1 5 10