(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
C12N 15/86

(11) 공개번호 특2002-0004987
(43) 공개일자 2002년01월16일

(21) 출원번호 10-2001-7012501
(22) 출원일자 2001년09월28일
번역문 제출일자 2001년09월28일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2001/00782
(86) 국제출원출원일자 2001년02월02일
(87) 국제공개번호 WO 2001/57204
(87) 국제공개일자 2001년08월09일

(81) 지정국 국내특허 : 아랍에미리트, 안티구아바부다, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 벨리즈, 캐나다, 스위스, 중국, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카연방, 알제리, 에스토니아, 스페인, 핀랜드, 영국, 그레나다, 그루지야, 가나, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 모잠비크, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 유고슬라비아, 남아프리카, 짐바브웨,
AP ARIPO특허: 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 모잠비크, 수단, 시에라리온, 탄자니아, 우간다, 짐바브웨,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀랜드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 터어키,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 기네비쏘, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 JP-P-2000-0002 2000년02월02일 일본(JP)
5596

(71) 출원인 메드진 바이오사이언스 가부시키가이샤
무라야마 마사노리
일본국 오오사카후 도요나카시 신센리 히가시마치 1-4-2
카네다 야수푸미
일본국 오사카 미노-시 오노하라히가시 6-12-8

(72) 발명자 카네다 야수푸미
일본국 오사카 미노-시 오노하라히가시 6-12-8

(74) 대리인 김동완

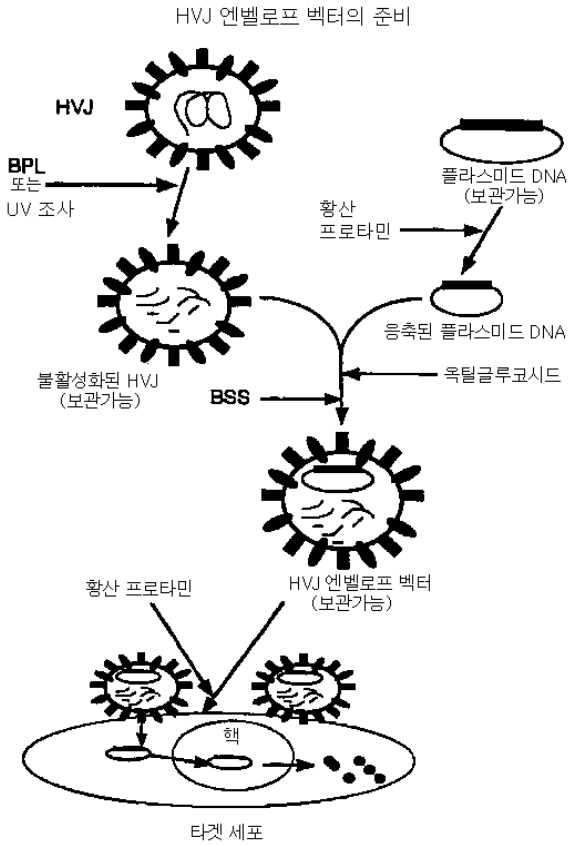
심사청구 : 있음

(54) 유전자 전달을 위한 바이러스 엔벨로프 벡터

요약

동결 및 해동처리 또는 세정제와의 혼합을 통해 불활성화 바이러스 엔벨로프에 외인성 유전자를 도입하기 위한 유전자 전달 벡터를 제조하는 것이다. 또한 유전자 전달 벡터를 지닌 유전자 치료를 위한 의학 조성물, 유전자 전달 벡터를 지닌 키트 및 유전자 전달 벡터를 사용하는 유전자 전달 방법을 제공한다.

대표도



색인어

유전자 전달 벡터, 외인성 유전자, 불활성화, 바이러스 엔벨로프, 세정제

명세서

기술분야

본 발명은 생체 내 및 실험실 내에서의 유전자 전달을 위한 안전하고 높은 - 효율성의 벡터에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 바이러스 또는 불활성화된 바이러스, 특히 불활성화된 HVJ(센다이 바이러스(Sendai virus))를 이용함으로서 준비된 유전자 전달 벡터에 관한 것이다. 더욱이 본 명세서에 기술된 유전자 전달 벡터는 유전자 치료 및 매우 완전한 스크리닝에 사용될 수 있다.

배경기술

유전자 전달을 위한 많은 바이러스성 및 비-바이러스성(합성의) 방법이 유전자 치료(Mulligan, Science, 260:926-932(1993) 및 Ledley, Human Gene Therapy, 6:1129-1144(1995))를 위해 발전해 왔다. 일반적으로 유전자를 세포 내로 전달하기 위한 바이러스성 방법이 비-바이러스성 방법 보다 더 효과적이다. 그러나 바이러스성 벡터는 부모 바이러스로부터의 필수 유전자 요소의 동시 도입, 바이러스 유전자의 누설적(leaky) 발현, 면역성 및 숙주 게놈 구조의 변형에 기인한 안정성 문제가 있을 수 있다. 일반적으로 비-바이러스성 벡터는 덜 독성적이고, 덜 면역적이다. 그러나 대부분의 비-바이러스성 방법은 특히 생체 내에서 일부 바이러스성 벡터보다 낮은 유전자 전달 효율성을 지닌다.

따라서 바이러스성 벡터 및 비-바이러스성 벡터 모두 장점뿐만 아니라 한계점을 지닌다. 따라서 생체 내에서의 사용을 위한 높은-효율성 및 낮은-독성 유전자 전달 벡터는 벡터 시스템의 하나의 타입의 한계점을 시스템의 다른 타입의 장점으로 보상하도록 발달되어야 한다.

반대로, HVJ는 높은 면역성을 지니고, NP 단백질이 많은 양으로 생산될 경우 특히 CTL을 도입하는 것으로 알려져 있다(Cole, G.A. et al., J. Immunology 158:43014309(1997)). 이는 또한 숙주에 의한 단백질 합성이 억제될 수 있다는 염려가 있다.

또한 HVJ는 지질막 상에서 재구성되도록 바이러스 융합 단백질을 원심분리 또는 컬럼 조작을 함으로서 융합 단백질이 정제되는 방법에 의해 생성된 입자가 재구성에 기인하여 바이러스의 다른 단백질(특히 M 단백질)을 상실하여, 융합 활성에 필요한 F1과 HN 단백질 사이의 비율이 야생형 바이러스와 동일한 수준으로 유지될 수 없어서 낮은 융합 활성을 유발한다는 문제점을 지닌다. 더욱이 융합 단백질이 재구성시 지질막 내로 삽입되는 방향이 야생형 바이러스에서와 항상 동일할 필요가 없기 때문에 일부 알려지지 않은 항원이 존재할 수 있다.

또한 재구성 신규한 분자를 첨가함으로서 수행되는 방법이 보고되어 왔다(Uchida, T. et al., J. Cell. Biol. 80:10-20(1979)). 그러나 완성된 입자의 막 조성이 실질적으로 고유의 바이러스 입자의 것과 다르기 때문에 이러한 방법은 본래의 바이러스의 기능을 상실한다는 높은 위험성을 지닌다.

통상의 HVJ-리포솜(liposome) 내에서와 같이 융합 입자를 생성하기 위해 리포솜 내에서의 유전자 또는 단백질의 캡슐화 및 불활성화된 HVJ와의 융합화를 포함하는 방법은 배양된 세포 또는 생체 내에서의 조직으로의 비-침략적 유전자 전달을 할 수 있게 한다. 이러한 기술은 종종 동물 실험 수준에서 전세계적으로 사용된다(Dzau, V. J. et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 93:11421-11423(1996) 및 Kaneda, Y. et al., Molecular Medicine Today, 5:298-303(1999)). 그러나 또한 이러한 기술은 예를 들어, 2개의 다른 소포(vesicle) 즉, 바이러스 및 리포솜이 준비되어야하기 때문에 절차가 복잡하고; 리포솜과의 융합에 기인하여 평균 지름이 바이러스의 입자보다 1.3배 증가한 입자가 바이러스보다 10% 이사의 융합 활성도를 지닌다는 결점을 갖는다 것이 발견되었다.

더욱이, 일부 조직에 있어서, 통상의 HVJ에 기초를 둔 벡터는 유전자 전달을 할 수 없을 수 있고, 또는 그러다 하더라도 극히 낮은 효율성을 지닌다. 이는 통상의 방법에 기초를 둔 유전자 치료를 위한 조직이 한정적일 수 있다는 것을 나타낸다.

안정하게, 매우 효율적으로 및 간단하게 준비될 수 있고, 생체 내에서의 넓은 범위의 조직으로 유전자 전달을 가능하게 하는 인간 유전자 치료를 위한 바이러스성 벡터의 발달에 대한 요구가 있다.

따라서 본 발명의 목적은 통상의 재구성된 HVJ 벡터 방법 또는 HVJ-리포솜 방법의 결점을 극복할 수 있는, 넓은 범위의 배양된 세포 또는 생체 내에서의 조직의 안정하고, 매우 효율적이고, 간단한 바이러스-기초 유전자 전달 벡터를 발달시키는 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 하나의 관점에서, 불활성화된 바이러스를 이용한 안정하고 매우 효율적인 유전자 전달 벡터가 제공된다. 바이러스의 게놈이 불활성화된 바이러스는 바이러스 단백질을 복제하지 않고, 따라서 안정하고, 낮은 독성 및 낮은 항원성을 지닌다. 불활성화된 바이러스를 이용한 유전자 전달 벡터인 바이러스 엔벨로프 벡터 내에서 유전자를 캡슐화함으로서 배양된 세포 또는 생체 내에서의 조직을 위한 안정하고, 매우 효율적이고, 간단한 유전자 전달 벡터가 준비되리 수 있다.

본 발명의 추가적 관점에서 넓은 범위의 생체 내의 조직으로의 유전자 전달을 가능하게 하는 바이러스 엔벨로프 벡터가 제공된다. 하나의 실시태양에서 사용된 바이러스는 HVJ이다. 본 발명에 따른 바이러스 엔벨로프 벡터를 사용함으로서 유전자 전달이 생체 내에서 달성될 수 있는 조직의 예는 간, 골격 근육, 자궁, 뇌, 눈, 경동맥, 피부, 혈관, 폐, 심장, 신장, 비장, 암 조직, 신경, B 림파구 및 호흡관 조직을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

본 발명의 또다른 관점에서 부유하는 세포로의 유전자 전달을 간단하게 실현시키기 위한 방법이 제공된다. 본 발명에 따른 바이러스 엔벨로프 벡터를 이용한 부유하는 세포로의 바람직한 유전자 전달 방법의 예는 황산 프로타민(protamine sulfate)의 존재시 부유하는 세포와 바이러스 엔벨로프 벡터의 혼합 및 이 혼합물로의 원심력의 적용의 단계를 포함하는 유전자 전달 방법을 포함한다.

본 발명의 하나의 관점에서 배양된 세포 및 생체 내의 조직으로의 매우 효율적이고 신속한 유전자 전달은 단기간 내에 많은 양의 유전자를 캡슐화하는 본 발명에 따른 유전자 전달 벡터를 이용함으로서 실현된다. 따라서 본 발명의 추가적인 관점에서 본 발명에 따른 유전자 전달 벡터를 이용한 게놈의 매우-완전하고, 빠른 대량 분석 시스템이 실현된다.

본 발명의 특별한 관점에서 유전자 전달 벡터는 -20℃에서 동결 상태로 오랜 기간동안(적어도 2 3개월 이상) 보관될 수 있다. 이러한 유전자 전달 벡터는 예를 들어 동결 상태로 봉합되고, 보관되고, 운반될 수 있다.

본 발명의 또다른 관점에서 실험실 내에서 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 특히 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 세포의 유전자 전달 활성을 지닌 유전자 전달 벡터가 제공된다.

본 발명의 특별한 관점에서 불활성화된 바이러스가 준비된 후 2개월 내에 바이러스 엔벨로프 벡터가 유전자 전달 벡터로 생성된 경우 바람직하게는 60% 이상, 더욱 바람직하게는 70% 이상, 특히 더욱 바람직하게는 80% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상의 세포의 유전자 전달 활성을 유지하는 유전자 전달 벡터가 제공된다.

본 발명의 또다른 관점에서 생체 내의 국부 투여시 바람직하게는 30% 이상, 더욱 바람직하게는 40% 이상, 특히 더욱 바람직하게는 50% 이상, 가장 바람직하게는 60% 이상의 조직 내 세포의 유전자 전달 활성을 지닌 유전자 전달 벡터가 제공된다.

본 발명의 하나의 관점에서 불활성화된 바이러스 엔벨로프를 포함하는 유전자 전달 벡터가 제공된다.

본 발명의 하나의 관점에서 유전자 전달 벡터의 준비에 사용된 바이러스는 야생형 바이러스 또는 재조합-타입 바이러스일 수 있다.

본 발명의 추가적인 관점에서 사용된 바이러스는 레트로비리데(Retroviridae), 토카비리데(Togaviridae), 코로나비리데(Coronaviridae), 플라비비리데(Flaviviridae), 파라믹소비리데(Paramyxoviridae), 오르소믹소비리데(Orthomyxoviridae), 부니아비리데(Bunyaviridae), 랍도비리데(Rhabdoviridae), 폭스비리데(Poxviridae), 헤르페스비리데(Herpesviridae), 바큘로비리데(Baculoviridae) 및 헤파드나비리데(Herpadnaviridae)로 구성된 군으로부터 선택된 계통에 포함하는 바이러스이다. 본 발명의 특정한 관점에서 사용된 바이러스는 HVJ이다. 본 발명의 추가적인 관점에서 유전자 전달 벡터는 Hasan, M.K. et al.,(Journal of General Virology, 78:2813-2820(1997)) 또는 Yonemitsu, Y. et al.(Nature Biotechnology 18:970-973(2000))에 기술된 바와 같은 유전자 전달 벡터이다.

본 발명의 또다른 관점에서 생체 내의 동물 조직으로의 유전자 전달을 달성하기 위한 유전자 전달 벡터가 제공된다.

본 발명에 따른 유전자 전달 벡터를 준비하기 위한 방법에서 바이러스를 불활성화시키는 단계를 항상 수행할 필요는 없다. 따라서 본 발명의 하나의 관점에서 바이러스를 불활성화시키는 단계를 수행하지 않고, 유전자 전달 벡터는 :

1) 바이러스와 외인성 유전자의 혼합 및

2) 혼합물의 동결 및 해동 또는 혼합물과 세정제의 추가적인 혼합

의 단계를 포함하는 방법에 의해 준비될 수 있다.

본 발명의 또다른 관점에서 유전자 전달을 위한 불활성화된 바이러스 엔벨로프 벡터를 준비하기 위한 방법이 제공되고, 그 방법은 :

바이러스를 불활성화시키고,

불활성화 바이러스와 외인성 유전자를 혼합시키고,

혼합물을 동결 및 해동시키는 단계를 포함한다.

본 발명의 추가적인 관점에서 유전자 전달을 위한 불활성화된 바이러스 엔벨로프 벡터를 준비하기 위한 방법이 제공되고, 그 방법은 :

바이러스를 불활성화시키고,

세정제의 존재시 불활성화 바이러스와 외인성 유전자를 혼합시키는 단계를 포함한다.

본 발명의 추가적인 관점에서 사용된 세정제는 옥틸글루코사이드(octylglucoside), 트리톤(Triton)-X100, CHAPS 및 NP-40으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

본 발명의 특별한 관점에서 불활성화된 바이러스 엔벨로프 벡터를 준비하기 위한 방법이 제공되고, 그 방법은 불활성화된 바이러스 엔벨로프와 혼합되기 전에 황산 프로타민을 외인성 유전자에 첨가하는 단계를 더욱 포함한다.

본 발명의 추가적인 관점에서 분리된 동물 조직으로의 유전자 도입을 위한 방법이 제공되고, 그 방법은 :

원하는 유전자를 포함하는 유전자 전달 벡터를 준비하고,

유전자 전달 벡터를 통해 유전자를 동물 조직 내로 도입하는 단계를 포함한다.

본 발명의 또다른 관점에서 부유하는 세포 내로 외인성 유전자를 도입하기 위한 방법이 제공되고, 그 방법은 :

황산 프로타민의 존재시 부유하는 세포와 유전자 전달 벡터를 혼합하고,

혼합물을 원심분리하는 단계를 포함한다.

본 발명의 더욱 또다른 관점에서 본 발명에 따른 유전자 전달 벡터를 포함하는 유전자 치료를 위한 약제적 조성이 제공된다.

(정의)

본 명세서 내에 사용된 바와 같이 " 유전자 전달" 은 도입된 유전자가 그의 기능을 유지하는 방식으로 원하는 천연의, 합성의 또는 재조합 유전자 또는 유전자 단편의 타겟 세포로의 도입(생체 내 또는 실험실 내에서의)을 나타낸다. 본 발명에 따라 도입된 유전자 또는 유전자 단편은 특정한 서열을 지닌 DNA, RNA 또는 그의 합성적 상동물인 핵산을 포함한다. 본 명세서에서 " 유전자 전달" , " 세포감염" 및 " 세포감염하는" 이라는 용어는 서로 바꾸어 사용될 수 있다.

본 명세서 내에 사용된 바와 같이 " 유전자 전달 벡터" , " 유전자 벡터" 또는 " 바이러스 엔벨로프 벡터" 는 바이러스 엔벨로프 내에서 외인성 유전자를 캡슐화함으로서 수득된 벡터를 나타낸다. 유전자 전달 벡터의 준비를 위해 사용된 바이러스는 야생형 바이러스 또는 재조합형 바이러스일 수 있다.

본 발명의 하나의 관점에서 사용된 바이러스는 : 레트로비리데(Retroviridae), 토카비리데(Togaviridae), 코로나비리데(Coronaviridae), 플라비비리데(Flaviviridae), 파라믹소비리데(Paramyxoviridae), 오르소믹소비리데(Orthomyxoviridae), 부니아비리데(Bunyaviridae), 랍도비리데(Rhabdoviridae), 폭스비리데(Poxviridae), 헤르페스비리데(Herpesviridae), 바큘로비리데(Baculoviridae) 및 헤파드나비리데(Herpadnaviridae)로 구성된 군으로부터 선택된 계통에 포함하는 바이러스이다. 본 발명의 특정한 관점에서 사용된 바이러스는 HVJ이다.

본 명세서 내에 사용된 바와 같이 " 유전자 전달 활성" 은 벡터의 " 유전자 전달" 활성을 나타내고, 지표로서 도입된 유전자의 기능(즉, 발현 벡터의 경우 인코드된 단백질의 발현 및/또는 그 단백질의 활성 등)을 사용함으로서 검출될 수 있다.

본 명세서 내에 사용된 바와 같이 " 불활성화된" 이라는 것은 게놈이 불활성화된 바이러스를 나타내는데 사용된다. 불활성화된 바이러스는 복제 결함이 있는 것이다. 바람직하게는 불활성화는 UV 처리 또는 알킬레이팅(alkylating) 약제로 처리함으로서 달성된다.

본 명세서 내에 사용된 바와 같이 " 외인성 유전자" 는 핵산 서열이 바이러스 기원이 아닌, 유전자 전달 벡터 내에 포함된 핵산 서열을 나타낸다. 본 발명의 하나의 관점에서 외인성 유전자는 발현되는 유전자 전달 벡터를 통해 도입된 유전자를 허가하기 위해 적당한 조절 서열(즉, 번역에 필수적인 리보좀 결합 사이트, 시작 코돈(codon), 종결 코돈 및 그의 유사물뿐만 아니라 전사에 필수적일 수 있는 프로모터, 인핸서, 종결자, 및 폴리(poly) A)에 실시가능하게 연결된다. 본 발명의 또다른 관점에서 외인성 유전자는 이러한 외인성 유전자의 발현을 위한 조절 서열을 포함하지 않는다. 본 발명의 추가적인 관점에서 외인성 유전자는 올리고뉴클레오타이드 또는 유인 핵산이다.

유전자 전달 벡터 내에 포함된 외인성 유전자는 일반적으로 DNA 또는 RNA 핵산 분자이나 도입되는 핵산 분자는 핵산의 상동물 분자를 포함할 수도 있다. 유전자 전달 벡터 내에 포함되는 분자 종류는 단일 유전자 분자 종류 또는 다수의 다른 유전자 분자 종류일 수 있다.

본 명세서 내에 사용된 바와 같이 " 유전자 라이브러리(library)" 는 천연의 또는 합성의 핵산 서열로부터 분리된 핵산 서열을 포함하는 핵산 라이브러리를 나타낸다. 천연으로부터 분리된 핵산 서열의 원료의 예는 진핵세포, 원핵세포, 또는 바이러스로부터 유도된 게노믹(genomic) 서열 또는 cDNA 서열을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. 정해지지 않은 서열(즉, 신호 또는 태그(tag))을 자연으로부터 분리된 서열에 첨가함으로서 수득된 라이브러리도 또한 본 발명에 따른 유전자 라이브러리에 포함된다. 하나의 실시태양에서 유전자 라이브러리는 여기 포함된 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 유발하는 프로모터와 같은 서열을 포함한다.

본 명세서 내에서 " HVJ" 및 " 센다이바이러스" 는 서로 바꾸어 사용된다.

본 명세서 내에서 " HAU" 는 닭 적혈구의 0.5%를 교착시킬 수 있는 바이러스 활성 수준을 나타낸다. 하나의 HAU는 약 24,000,000 바이러스 입자에 해당한다(Okada, Y. et al., Biken Journal 4:209-213(1961)).

(유전자 치료)

치료적 핵산 구조물은 본 발명에 따른 유전자 전달 벡터를 이용함으로서 국부적으로 또는 중추적으로 투여될 수 있다. 이러한 핵산 구조물이 단백질의 코딩 서열 포함하는 경우 단백질의 발현은 외인성 포유류 프로모터 또는 이형적 프로모터의 사용에 의해 유도된다. 코딩 서열의 발현은 구성적(constitutive) 또는 조절적일 수 있다.

본 발명에 따른 유전자 전달 벡터가 유전자 치료를 위한 조성으로 사용될 경우 본 발명에 따른 투여는 국부적 사이트(즉, 암조직내, 간내, 근육내 및 대뇌내) 로 PBS(인산염 완충 식염수) 및 식염수 등 내에서 부유하는 벡터 현탁액의 직접 주사 또는 그의 혈관 내 투여(즉, 동맥내, 정맥내 도는 문맥내)를 통해 달성된다.

하나의 실시태양에서 유전자 전달 벡터는 일반적으로 단위 투약량 주사가능 형태(수용액, 현탁액 또는 에멀젼(emulsion))로 유전자 전달 벡터와 약제적으로 수용가능한 운반자(즉, 이는 사용되는 투약량 및 농도에서 수여자에게 비-독성적이고, 공식(formulation)의 다른 성분과 양립 가능하다)를 혼합함으로서 공식화된다. 예를 들어, 바람직하게는 공식은 산화제 및 유전자 전달 벡터에 해로운 것으로 알려진 다른 성분을 포함하지 않는다.

운반자는 등장성 및 화학 안정성을 강화하는 물질과 같은 첨가제의 최소한의 양을 적다히 포함한다. 이러한 재료는 사용되는 사용되는 투약량 및 농도에서 수여자에게 비-독성적이고, 인산염, 구연산염, 석시네이트(succinate), 아세트산 및 다른 유기산 또는 그들의 염 ; 아스코르브산과 같은 항산화제 ; 작은 분자량(약 10 잔기 이하) 폴리펩타이드 즉, 폴리아르기닌(polyarginine) 또는 트리펩타이드(tripeptide) ; 단백질(혈청, 알부민(albumin), 또는 면역글로블린과 같은) ; 친수성 폴리머(polymer)(폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone)과 같은) ; 아미노산(글라이신, 글루탐산, 아스파르트산 또는 아르기닌과 같은) ; 모노사카라이드(monosaccharide), 디사카라이드(disaccharide) 및 다른 탄수화물(셀룰로스 또는 그 유도체, 글루코스, 만노스(mannose) 또는 덱스트린(dextrin)을 포함하여) ; 킬레이팅(chelating) 약제(EDTA와 같은) ; 슈가 알코올(sugar alcohol)(만니톨(mannitol) 또는 소르비톨(sorbitol)과 같은) ; 카운터이온(counterion)(나트륨과 같은) ; 및/또는 비이온성 세정제(폴리소르베이트(polysorbate) 또는 폴록사머(poloxamer) 또는 PEG와 같은 완충액을 포함한다.

유전자 전달 벡터를 포함하는 약제적 조성은 일반적으로 단일- 또는 다중-투약량 컨테이너(container) 즉, 봉합된 앰플(ampule) 또는 바이알(vial) 내에 수용액으로 보관된다.

또한 본 발명은 본 발명에 따른 약제적 조성의 하나 이상의 성분으로 채워진 하나 이상의 컨테이너를 포함하는 약제적 팩키지(package) 또는 키트(kit)를 제공한다. 더욱이 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 다른 치료 화합물과 함께 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 유전자 전달 벡터를 포함하는 약제적 조성은 공식화될 것이고, 환자 개인의 임상 조건(즉, 방지되거나 치료되는 조건), 유전자 전달 벡터를 포함하는 조성의 전달 사이트, 타겟 조직, 투여 방법, 투여 스케줄 및 당 분야에 알려진 다른 인자를 고려한 좋은 의약 실습에 모순됨이 없는 형태로 투약될 것이다. 따라서 본 발명에 기술된 유전자 전달 벡터의 " 효과적인 양" 또는 적당한 투약량은 이러한 고찰에 의해 결정된다.

예를 들어 본 발명에 따른 유전자 벡터가 마우스에 투여될 경우 마우스 당 유전자 벡터 20 20,000 HAU, 바람직하게는 60 6,000 HAU, 더욱 바람직하게는 200 2,000 HAU의 등량이 투여된다. 투여된 유전자 벡터 내에 함유된 외인성 유전자의 양은 마우스 당 0.1 100㎍, 바람직하게는 0.3 30㎍, 더욱 바람직하게는 1 10㎍이다.

본 발명에 따른 유전자 벡터가 인간에게 투여될 경우 피실험자 당 유전자 벡터 400 400,000 HAU, 바람직하게는 1,200 120,000 HAU, 더욱 바람직하게는 4,000 40,000 HAU의 등량이 투여된다. 투여된 유전자 벡터 내에 함유된 외인성 유전자의 양은 피실험자 당 2 2,000㎍, 바람직하게는 6 600㎍, 더욱 바람직하게는 20 200㎍이다.

하기의 실시예로 본 발명을 설명하나 이에 한정적인 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

도 1은 다양한 시간 및 배양된 세포의 세포감염의 HVJ 엔벨로프 벡터를 동결 및 해동시킨 후, 외인성 유전자(루시페라제(luciferase) 유전자)의 발현 수준(루시페라제 활성)의 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 배양된 세포가 세포감염된 경우 동일한 수의 바이러스가 배양된 세포로 첨가되는 HVJ 엔벨로프 벡터의 준비에 사용되는지를 확증하는 루시페라제 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 다양한 양의 외인성 유전자(루시페라제 발현 벡터)가 HVJ 엔벨로프 벡터에 사용된 경우 루시페라제 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 다양한 타입의 완충액이 HVJ 엔벨로프 벡터의 준비를 위해 사용된 경우 루시페라제 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 통상의 유전자 전달 벡터, 불활성화된 HVJ-리포솜을 이용한 유전자 전달과 본 발명에 따른 방법 사이의 비교 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 세정제가 사용된 불활성화된 HVJ 엔벨로프 벡터를 위한 준비 방법의 개략적 설명을 나타낸 것이다.

도 7은 세정제를 사용하여 준비된 HVJ 엔벨로프 벡터 내에 포함된 단백질의 SDS-PAGE 패턴을 나타낸 것이다.

도 8은 음성의(negative) 염색을 사용한 HVJ 엔벨로프 벡터의 전자현미경 사진을 나타낸 것으로 (1) 비처리 HVJ ; (2) 옥틸글루코시드 처리된 DNA 불포함 HVJ ; (3) 옥틸글루코시드 처리된 DNA 포함 HVJ를 나타낸다.

도 9a 도 9c는 도면에 나타난 바와 같이 각각의 옥틸글루코시드 농도 ; HVJ와 옥틸글루코시드로의 각각의 처리 시간 ; 초음파 처리가 수행된 경우(음파) 또는 아닌 경우 ; 사용된 각각의 벡터 용량에서 취해진 루시페라제 활성 수준으로 표현된 유전자 전달 효율성을 나타낸 그래프이다.

도 10a 및 도 10b는 도면에 나타난 바와 같이 각각의 황산 프로타민(PS) 농도 및 각각의 세포감염 시간에서 취해진 루시페라제 활성 수준으로 표현된 유전자 전달 효율성을 나타낸 그래프이다.

도 11a 및 11b는 도면에 나타난 바와 같이 각각의 DNA 양(실험에 사용된 양) 및 각각의 보관 온도에서 취해진 루시페라제 활성 수준으로 표현된 유전자 전달 효율성을 나타낸 그래프이다.

도 12는 도면에 나타난 바와 같이 HVJ 엔벨로프 벡터가 다양한 HVJ 적정량의 HVJ를 사용함으로서 준비되고, 유전자 전달에 사용된 경우에 취해진 루시페라제 활성 수준으로 표현된 유전자 전달 효율성을 나타낸 그래프이다.

도 13a는 도면에 나타난 바와 같이 각각의 UV 조사량에서 취해진 루시페라제 활성 수준으로 표현된 유전자 전달 효율성을 나타낸 그래프이다.

도 13b는 도면에 나타난 바와 같이 각각의 β-프로피오락톤(propiolactone)(BPL) 농도에서 취해진 루시페라제 활성 수준으로 표현된 유전자 전달 효율성을 나타낸 그래프이다.

도 14는 도면에 나타난 바와 같이 각각의 황산 프로타민 농도 및 각각의 세포감염 인큐베이션 시간에서 취해진 루시페라제 활성 수준으로 표현된, 인간 혀 상의 비늘모양의 암종 세포를 위한 유전자 전달 효율성을 나타낸 그래프이다.

도 15는 도면에 나타난 바와 같이 각각의 황산 프로타민 농도 및 각각의 세포감염 인큐베이션 시간에서 취해진 루시페라제 활성 수준으로 표현된, 인간 대동맥 내피세포(HAEC)를 위한 유전자 전달 효율성을 나타낸 그래프이다.

도 16a는 본 발명에 따른 HVJ 엔벨로프 벡터 또는 HVJ-AVE(인공 바이러스 엔벨로프(Artificial Viral Envelope)) 리포솜을 사용함으로서 취해진 루시페라제 활성 수준으로 표현된, 마우스의 간을 위한 유전자 전달 효율성을 나타낸 그래프이다.

도 16b는 본 발명에 따른 HVJ 엔벨로프 벡터 또는 HVJ-AVE(인공 바이러스 엔벨로프(Artificial Viral Envelope)) 리포솜을 사용함으로서 취해진 루시페라제 활성 수준으로 표현된, 마우스의 자궁을 위한 유전자 전달 효율성을 나타낸 그래프이다.

도 16c는 마우스 자궁을 위한 본 발명에 따른 HVJ 엔벨로프 벡터를 사용한 pEB-CMV-LacZ 유전자 전달 후 수행된 자궁 조직을 위한 LacZ 염색 결과를 나타낸 것이다. LacZ 염색을 통해 LacZ 유전자의 발현이 자궁내막의 선 상피 내에서 거의 검출되었다.

도 16d는 10,000 HAU의 pEGFP-1를 포함하는 HVJ 엔벨로프 벡터를 시스터나 마그나(cisterna magna) 또는 경동맥을 통해 SD 랫트(수컷, 체중 : 300 400g)에 투여한 결과를 나타낸 것이다. 투여 3 4일 후, 랫트는 희생되고, 간 섹션이 준비되어 형광 현미경 하에서 관찰되었다.

① 시스터나 마그나를 통한 투여

뇌 표면 내로의 유전자 도입이 확인되었다. 반대로 뇌의 깊숙한 부분으로의 유전자 전달이 없음이 확인되었다. 맥락막 조직으로의 유전자 전달이 없음도 역시 확인되었다.

②, ③ 경동맥을 통한 투여

유의적으로 높은 발현이 투여가 수행된 좌측에서 확인되었다. 발현은 뇌 표면뿐만 아니라 기저 신경절 부분 및 다른 뇌의 뇌 표면에서도 확인되었다. 다른 뇌의 뇌 표면에서의 발현은 부차적 유출을 통해 다른 면으로 유출되었다고 사료되었다.

도 16e는 HGF 기능을 억제하는 돌연변이 HGF를 발현하는 벡터인 pCMV-NK4에 의한 VEGF-유도 맥관형성의 투여량-의존적 억제의 결과를 나타낸 것이다.

도 16f는 기관 내로 HVJ 엔벨로프 벡터를 주사함으로서 수행된 유전자 전달 결과를 나타낸 것이다.

도 17a 및 17b는 세포 내로 올리고뉴클레오타이드의 도입 바로 다음날에 형광 현미경 하에서 관찰된 세포 형광도 결과를 나타낸 것이다. 약 10%의 올리고뉴클레오타이드 도입 효율성이 인큐베이션 10분 후 수득된 반면(도 17b), 인큐베이션 60분 후 올리고뉴클레오타이드는 세포 내로 80% 이상 도입되었다(도 17a).

도 18은 인간 백혈병 셀 라인(cell line)인 CCRF-CEM, NALM-6 및 K-562 상에서의 도입 실험의 결과를 나타낸 것이다.

이러한 셀 라인은(특히 CCRF-CEM 및 NALM-6) HVJ-리포솜 또는 존재하는 리포솜 시약(리포펙타민(Lipofectamine), 리포펙틴(Lipofectin) 및 Gibco BRL의 유사품)이 사용된 경우 매우 낮은 도입 효율성을 나타내었다.

높은 루시페라제 활성은 하기의 조건 하에서 수득되었다 : 황산 프로타민의 600 1,000㎍/㎖의 첨가 및 10,000 또는 15,000 rpm, 20℃에서 10분 동안의 원심분리. HVJ 엔벨로프 벡터와 관련된 유의적인 독성이 발견되지 않았다. 황산 프로타민의 첨가 및 원심분리 모두 유전자 전달에 필요하였다.

도 19는 암 조직으로의 유전자 전달 결과를 나타낸 것이다. 유전자 발현은 암 조직인 종양 덩어리 내에서 관찰되었다. 특히, 높은 유전자 전달 활성은 500㎍/㎖의 황산 프로타민으로 수득되었다. 반대로 낮은 황산 프로타민 농도에서의 유전자 발현은 거의 검출할 수 없었다.

도 20은 헤르페스바이러스 엔벨로프 벡터를 사용한 세포로의 유전자 전달 결과를 나타낸 것이다. 루시페라제 총 활성은 낮지만 가장 높은 도입 효율성을 지닌 벡터가 트리톤-X10으로의 5분 동안 처리를 통해 수득되었다는 것이 결정되었다. 황산 프로타민을 사용하지 않은 준비 방법은 높은 도입 효율성을 지녔다. 형태학적 관찰을 통해 어떠한 표본도 독성을 나타내지 않았다.

도 21은 -80℃에서 보관되었던 헤르페스바이러스 엔벨로프 벡터로의 유전자 전달 결과를 나타낸 것이다. 혈청-비함유 배지에서 보다 10% 혈청이 첨가된 배지에서 더 높은 도입 효율성을 나타내었다. 벡터 수용액의 100㎕(측정량 : 1.4×10^7 바이러스 입자/웰(well))에서 보다 벡터 수용액의 200㎕(측정량 : 2.8×10^7 바이러스 입자/웰)에서 더 높은 도입 효율성을 나타내었다.

실시예

1. 냉각 및 해동을 이용한 유전자 전달 벡터 제조 및 그의 활용

(실시예 1 : 냉각 및 해동에 의한 HVJ 엔벨로프 벡터의 제조)

루시퍼라제 유전자는 외인성 유전자로 사용되었다. 재조합 HVJ 바이러스를 여러번 냉각과 해동한 후, 유전자는 배양된 세포로 도입되었다.

500㎕의 TE, 750㎍의 루시퍼라제 발현 벡터 pcOriPLuc(Saeki and Kaneda et al., Human Gene Therapy, 11, 471 to 479(2000)) 및 여러 농도의 HVJ 바이러스가 혼합되었다. HVJ 바이러스 농도는 10, 25, 50 또는 100 HAU/㎕로 조정되었다. 이 용액은 12개로 나누어져, 각 용액은 4℃에 보관되었으며, 드라이 아이스로 냉각된 후에 해동되었다; 이 과정은 30번 이상 반복되었다. 미리 결정된 횟수로 냉각 및 해동된 용액은 BHK-21 세포에 대한 배양액으로 첨가되었다(24 웰-디쉬, 4×10^4 세포/디쉬, 0.5ml DMEM, 10% FCS). 세포를 5% CO_2와 37℃에서 20분간 반응하게 한 후, 세포는 PBS로 세척되고, 다른 0.5ml의 배양액이 첨가되어 24 시간동안 배양되었다.

배양액은 제거되었다. 세포 용해를 위해 500㎕의 1 ×세포 배양 라이시스 시약(Promega)을 세포에 첨가한 후, 용액을 마이크로튜브에 넣어 원심분리하였다. 20㎕의 상등액으로부터 루시퍼라제 활성도는 프로메가 루시퍼라제 분석 시스템과 Lumat LB9501 루미노포토미터를 이용하여 측정되었다. 측정은 각 용액에 대해 3번 행해졌으며, 평균값이 얻어졌다.

결과를 도 1에 나타내었다. 루시퍼라제 활성도는 증가된 재조합 HVJ 바이러스에 대한 냉각 및 해동 횟수에 따라 증가되었다. 20번의 냉각과 해동을 하면, 3번의 냉각과 해동을 한 것에서 관찰된 것과 비교하여 10배 이상의 루시퍼라제 발현이 관찰되었다. 이러한 결과로부터, 이런 실시예에서 사용된 조건하에서 재조합 HVJ 바이러스에 대한 냉각 및 해동 횟수는 바람직하게는 5번 또는 그 이상, 더욱 바람직하게는 약 15번 내지 약 20번임이 확인되었다.

(실시예 2 : 냉각 및 해동으로 제조된 HVJ 엔벨로프 벡터의 유전자 전달 효율)

실시예 1에서 사용된 것과 동일한 재조합 HVJ 바이러스를 30번 냉각 및 해동한 후, 동일한 수의 바이러스가 호스트 세포로 첨가되었는지 확인하면서 세포로의 유전자 전달 효율이 검사되었다.

결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서, 예를 들면 X축 500 HAU에서, 100 HAU/㎕ 용액 5㎕에 대비하여 10 HAU/㎕의 바이러스 농도를 지닌 용액 50㎕가 첨가되었다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 100 HAU/㎕의 바이러스 농도를 지닌 용액의 유전자 발현 효율은 10 50 HAU/㎕의 농도와 관련된 것에 비교하여 약 50% 감소하였다. 이러한 결과로부터, 이런 실시예 조건하에서 재조합 바이러스 농도는 바람직하게는 10 50 HAU/㎕ 범위임이 확인되었다.

게다가, 재조합 HVJ 바이러스를 29번 냉각 및 해동한 후 30번째 냉각을 하고, HVJ 바이러스 용액은 얼려진 상태로 1주 동안 저장되고, 그 후에 세포에 첨가되도록 해동되었다. 결과로써, 얼려진 상태로 1주 동안 저장되었던 재조합 HVJ 바이러스는 또한 30번의 연속적인 냉각 및 해동을 거친 바이러스의 그것과 동일한 레벨의 루시퍼라제 유전자 발현을 나타내었다.

(실시예 3 : 루시퍼라제 발현 벡터를 이용한 유전자 전달 효율의 측정)

HVJ 엔벨로프 벡터는 여러 양의 루시퍼라제 발현 벡터를 이용하여 제조되었으며, 숙주 세포로의 유전자 전달 효율이 검사되었다.

HVJ 바이러스의 양은 TE μℓ 당 50 HAU이다. 루시퍼라제 발현 벡터 pcOriPLuc의 양은 TE μℓ 당 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 또는 5.5μg이다. 20번의 냉각 및 해동을 행하고, 용액의 최종 부피를 100μℓ로 조정한 후 루시퍼라제 활성도는 실시예 1의 것과 동일한 방법으로 측정되었다.

결과를 도 3에 나타내었다. 외인성 유전자로써 발현 벡터 pcOriPLuc의 첨가된 양이 1.5μg에 이를 때까지 발현량은 투입량-의존 방법에서 증가하였으며; 그런 후에, 발현량 변화는 거의 없었다. 상기 결과로부터, 이 실시예에 사용된 조건하에서 유전자 전달에 대해 1.5μg/μℓ 또는 그 이상의 외인성 유전자를 사용하는 것이 바람직함이 확인되었다.

(실시예 4 : 유전자 전달 효율에 있어서 완충용액 타입의 영향)

HVJ 엔벨로프 벡터의 제조를 위해 사용된 완충용액의 타입을 변화시키면서 숙주 세포로의 유전자 전달 효율이 검사되었다.

HVJ 바이러스의 양은 완충용액 μℓ 당 50 HAU이며, 루시퍼라제 발현 벡터 pcOriPLuc의 양은 15μg/μℓ이다. 완충용액으로는, TE, PBS, 또는 BSS(137mM NaCl, 5.4mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 7.5), 또는 이러한 완충용액에 슈크로즈를 첨가하여 최종 농도 0mM, 20mM, 40mM, 또는 60mM로 얻어진 것들이 사용되었다. 20번의 냉각 및 해동을 행하고, 용액의 최종 부피를 100μℓ로 조정한 후 루시퍼라제 활성도는 실시예 1의 것과 동일한 방법으로 측정되었다.

결과를 도 4에 나타내었다. 이 실시예에 사용된 조건하에서 재조합 HVJ 바이러스의 제조를 위한 완충용액으로는 TE만 사용하는 것이 바람직함이 확인되었다.

(실시예 5 : 본 발명에 따른 AVE(인공 바이러스 엔벨로프(Artificial Viral Envelope)) 타입 벡터와 HVJ 엔벨로프 벡터간의 비교)

사용하는 유전자 전달은 종래의 유전자 전달 벡터인 HVJ 리포솜(가장 우수한 유전자 전달 효율을 지닌 AVE 타입의(Saeki and Kaneda et al., Human Gene Therapy, 11, 471 to 479(2000))을 비활성화 시켰으며, 본 발명에 따른 방법은 비교되었다.

HVJ-리포솜 또는 HVJ 바이러스의 양은 TE μℓ 당 50 HAU이며, 루시퍼라제 발현 벡터 pcOriPLuc의 양은 1.5μg/μℓ이다. 재조합 HVJ 바이러스에 대한 냉각 및 해동 횟수는 2번 또는 15번이었다. 다른 조건은 인간 배아(embryonic) 신장 세포주 HEK 293이 숙주 세포로 사용된 것을 제외하고는 실시예 1에서와 동일하다.

결과를 도 5에 나타내었다. HVJ 엔벨로프 벡터의 냉각 및 해동을 15번 반복하는 본 발명에 따른 방법이 HVJ-리포솜을 사용하는 종래의 방법보다 유전자 전달 효율에 있어서 훨씬 더 우수함이 확인되었다.

(실시예 6 : 합성 올리고뉴클레오타이드의 도입 효율)

FITC(fluorescein isothiocyanate)로 형광-표지된 농도 1㎎/ml의 합성 올리고뉴클레오타이드(20 bp)는 불활성화된 HVJ 바이러스와 혼합되었다. 이 용액을 20번 냉각 및 해동한 후에 BHK-21 세포와 20분 동안 반응시켰다. 형광 신호는 17시간 후에 관찰되었다. 결과로써, 형광 축적은 거의 세포 100%의 핵에서 관찰되었다. 이러한 결과로부터, 본 발명에 따른 방법이 합성 핵산을 세포로 도입하는 데 또한 효과적임이 확인되었다.

(실시예 7 : GFP 유전자의 도입 효율)

GFP(green fluorescence protein) 유전자와 불활성화된 HVJ 바이러스의 혼합 용액을 20번 냉각 및 해동한 후, 혼합 용액 2ng-5μℓ를 쥐의 뇌(cerebrum)로 주입하였다. 결과로써, 형광 신호가 주입 위치에서 관찰되었다. 게다가, GFP 유전자를 이용하는 HVJ 엔벨로프 벡터는 얼려져서 3개월 동안 저장되었으며, 그런 후에 쥐의 뇌로 주입되었다. 동일하게, GFP 유전자의 발현에 기인하는 형광 신호는 주입 위치에서 관찰되었다.

상기 결과로부터, 본 발명에 따른 방법이 확실하게 인 비보(in vivo) 유전자 전달을 잘 실행시킬 수 있음이 확인되었다. 게다가, HVJ 엔벨로프 벡터의 냉각 저장의 가능함이 또한 확인되었다.

2. 세정제를 이용한 유전자 전달 벡터 제조 및 그의 활용

(실시예 8 : 세정제를 이용한 불활성화된 HVJ 엔벨로프 벡터의 제조)

세정제를 이용한 불활성화된 HVJ 엔벨로프 벡터의 제조방법을 도 6에 나타내었다.

(1 : HVJ의 생장)

일반적으로, 종자 바이러스로 수정된 닭의 알을 접종하여 생장한 HVJ가 사용된다. 그러나, 배양된 세포(예를 들면, 유인원 또는 인간) 또는 잠복기가 긴 감염 시스템(예를 들면, 트립신과 같은 하이드롤라제가 배양된 조직에 첨가된 배양액)을 이용하여 생장한 HVJ, 또는 잠복기가 긴 감염을 일으키기 위해 배양된 세포를 클론된 바이러스 게놈으로 감염시켜 성장한 HVJ가 이용 가능하다.

본 실시예에서, HVJ의 생장은 다음과 같이 행해졌다.

HVJ 종자 바이러스는 SPF(Specific Pathogen Free) 수정된 알을 이용하여 생장되었다. 분리되고 정제된 HVJ(Z종)는 세포를 저장하기 위한 튜브로 분배되어, 거기에 첨가된 10% DMSO를 지닌 액체 질소에 저장되었다. 따라서, HVJ는 제조되었다.

수정 후 닭의 알은 즉시 얻어졌으며, 인큐베이터(SHOWA-FURANKI P-03 타입; 약 300개의 닭의 알을 수용할 수 있는)에 넣어, 36.5℃와 40% 이상의 습도 조건하에서 10 14일 동안 부화시켰다. 암실에서, 공기 챔버와 융모요막(chorioallantois)은 물론 배아(embryo)의 생존력은 에그 테스터(라이트 벌브로부터의 라이트가 약 1.5cm의 직경을 지닌 창을 통해 리드됨)를 이용하여 확인되었다. 바이러스-주입 위치는 융모요막 위에 연필로 약 5mm 표시되었다(위치는 굵은 혈관을 피해 선택된다). 종자 바이러스(액체 질소로부터 얻어진)는 폴리펩톤 용액(1% 폴리펩톤, 0.2% NaCl은 혼합되고, 1M NaOH로 pH 7.2를 갖도록 하고, 오토클레이브-살균하고, 4℃에 저장함)으로 500배 희석하여, 4℃에 두었다. 알은 Isodine ™ 과 알코올로 소독되었다. 바이러스-주입 위치에 피크(pick)로 작은 홀을 만들었다. 1ml 주사기 바늘(26 게이지)을 이용하여, 융모요막 구멍에 있도록 희석된 종자 바이러스 1ml 주입하였다. 홀에 인접하기 위해 파스퇴르 피펫을 이용하여 녹은 파라핀(녹는점 : 50 52℃)을 홀에 넣었다. 알을 인큐베이터에 넣어 36.5℃와 40% 이상의 습도 조건하에서 3일 동안 부화시켰다. 그런 후, 접종된 알을 4℃에서 오버나이트 하였다. 다음날, 알의 공기 챔버 부분을 핀셋으로 깨뜨리고, 융모요막액을 빨아들이도록 18 게이지 바늘을 지닌 10ml 주사기를 융모요막에 넣고, 살균된 병에 수집하여 4℃에 저장했다.

(2 : HVJ의 정제)

HVJ는 원심분리를 이용한 정제방법, 컬럼을 이용한 정제방법, 또는 공지된 어떤 다른 정제방법으로 정제된다.

(2.1 : 원심분리를 통한 정제방법)

간단히, 수집된 생장한 바이러스를 포함하는 용액은 배양액과 융모요막액 내의 조직 또는 세포 파편을 제거하기 위해 낮은 속도로 원심분리되었다. 그의 상등액은 슈크로즈 밀도 기울기(30 60%w/v)를 이용한 높은-속도 원심분리(27,500 ×g, 30분)와 초원심분리(62,800 ×g, 90분)를 통해 정제되었다. 정제되는 동안 가능하면 바이러스를 조심스럽게 다루고, 4℃에 저장해야 한다.

보다 명확하게는, 본 실시예에서, HVJ는 다음 방법으로 정제되었다.

약 100ml의 HVJ-포함 융모요막액(수집되어 4℃에 저장되었던 HVJ를 포함하는 닭의 알로부터의 융모요막액)을 와이드-마우스 코마고메 타입 피펫(Saeki, Y., and Kaneda, Y : 유전자, 올리고뉴클레오타이드 및 단백질을 전달하기 위한 단백질 변경된 리포솜(HVJ-리포솜). Cell Biology ; A laboratory handbook (2nd edition) ed. by J. E. Celis (Academic Press Inc., San Diego) vol. 4, 127 to 135, 1998 참고)으로 2개의 50ml 원심분리용 튜브에 넣고, 3000 rpm 낮은 속도로 4℃에서 10분간 원심분리하였다(브레이크 꺼짐). 따라서, 알로부터 조직 파편이 제거되었다.

원심분리한 후, 상등액은 4개의 35ml 원심분리용 튜브(높은-속도 원심분리를 위해 고안된)에 분배되고, 27,000g에서 앵글 로터로 30분간 원심분리되었다(가속기와 브레이크 켜짐). 상등액은 제거되고, BSS(10mM Tris-HCl (pH 7.5), 137mM NaCl, 5.4mM KCl; 오토클레이브되어 4℃에 저장)(BSS는 PBS로 대체할 수 있다)를 튜브당 약 5ml 양으로 침전물에 첨가하여, 4℃에서 오버나이트로 방치하였다. 와이드-마우스 코마고메 타입 피펫으로 서서히 피펫팅하면서, 침전물은 빠져나와 한 튜브에 수집되어, 27,000g에서 앵글 로터로 30분간 동일하게 원심분리되었다. 상등액은 제거되고, 약 10ml의 BSS를 침전물에 첨가하여, 침전물을 4℃에서 오버나이트로 방치하였다. 와이드-마우스 코마고메 타입 피펫으로 서서히 피펫팅하면서, 침전물은 빠져나와, 3000 rpm 및 4℃에서 낮은-속도 원심분리기로 10분간 원심분리되어서(브레이크 꺼짐), 조직 파편을 제거하고 완전히 제거되지 않았던 바이러스 덩어리는 응집되었다. 상등액은 신선하게 살균된 튜브에 넣어져 정제된 바이러스로 4℃에서 저장되었다.

이 바이러스 용액 1ml에, 0.9ml의 BSS가 첨가되고, 540 nm에서의 흡광도가 스펙트로포토미터로 측정되었다. 바이러스 적정농도는 적혈구 응집 활성도(HAU)로 전환되었다. 540nm에서 흡광도 값 1은 대략 15,000 HAU에 대응한다. HAU는 실질적으로 융합 활성도에 비례하는 것으로 여겨진다. 대신, 적혈구 응집 활성도는 실제로 닭 적혈구를 포함하는 용액(0.5%)을 이용하여 측정된다(DOUBUTSU SAIBO RIYO JITSUYOKA MANUAL(또는 " Practice Manual for Using Animal Cells"), REALIZE INC.(ed. by Uchida, Oishi, Furusawa) pp. 259 to 268, 1984 참고).

게다가, 슈크로즈 밀도 기울기를 이용한 HVJ 정제는 필수적으로 행해진다. 보다 명확하게는, 바이러스 현탁액은 60% 및 30% 슈크로즈 용액(오토클레이브-살균된)이 층을 이룬 원심분리용 튜브에 넣어져, 밀도 기울기 원심분리는 62,800 ×g에서 120분 동안 행해진다. 원심분리한 후, 60% 슈크로즈 용액층에서 관찰되는 밴드는 재생된다. 재생된 바이러스 현탁액은 4℃에서 오버나이트로 외부 용액인 BSS 또는 PBS에 대해 투석되어 슈크로즈가 제거된다. 바이러스 현탁액이 즉시 사용되지 않는 경우에, 10% 및 2 10mM의 최종 농도를 얻기 위해 글리세롤(오토클레이브-살균된) 및 0.5M EDTA 용액(오토클레이브-살균된)이 바이러스 현탁액에 각각 첨가되며, -80℃로 서서히 냉각하고, 최종적으로 액체 질소에 보관된다(냉각 저장은 글리세롤 및 0.5M EDTA 용액 대신 10mM DMSO로 이루어질 수 있다).

(2.2 : 컬럼 및 한외여과를 이용한 정제방법)

원심분리를 통한 정제방법 대신, 컬럼을 이용한 HVJ 정제 또한 본 발명에 적용할 수 있다.

간단히, 50,000의 분자량 컷-오프를 지닌 필터를 이용한 한외여과에 의한 농축 및 이온 교환 크로마토그래피(0.3 1 M NaCl)에 의한 용리가 정제를 위해 사용되었다.

보다 명확하게는, 본 실시예에서, 다음의 방법이 컬럼으로 HVJ를 정제하는 데 사용되었다.

융모요막액은 수집된 후에 멤브레인 필터(80 10㎛)로 여과되었다. HVJ를 불활성화하기 위해 융모요막액에 0.006 0.008%의 BPL(최종 농도)가 첨가되었다(4℃, 1시간). 융모요막액은 37℃에서 2시간 동안 배양되어서 BPL을 불활성화시킨다.

500KMWCO(A/G Technology, Needham, Massachusetts)를 이용한 접선 흐름 한외여과 방법에 의해, 약 10배의 농도가 얻어졌다. 완충용액으로는, 50mM NaCl, 1mM $MgCl_2$, 2% 만니톨, 및 20mM Tris(pH 7.5)가 사용되었다. HAU 분석은 대략 100%의 HVJ 수득률을 나타내었다. 따라서, 우수한 결과가 얻어졌다.

Q 세파로즈 FF(Amersham Pharmacia Biotech KK, Tokyo)를 이용한 컬럼 크로마토그래피 방법(완충용액 : 20mM Tris HCl(pH 7.5), 0.2 내지 1M NaCl)에 의해, HVJ는 정제되었다. 수득률은 40 50%이고, 순도는 99% 이상이었다.

HVJ 프랙션은 500KMWCO(A/G Technology)를 이용한 접선 흐름 한외여과 방법에 의해 농축되었다.

(3 : HVJ 불활성화)

HVJ 불활성화가 필요한 경우에, 이것은 하기 기술된 대로 UV 광선 조사 또는 알킬화제 처리를 통해 수행된다.

(3.1 : UV 광선 조사 방법)

HVJ 현탁액 1ml를 직경 30mm의 디쉬에 넣고, 99 또는 198mJ/㎠에서 조사시킨다. 감마-선 조사 또한 적용 가능하지만(5 내지 20 Gy), 그것은 완전한 불활성화를 제공하지 않는다.

(3.2 : 알킬화제를 이용한 처리)

사용하기 전에 즉시, 0.01%의 β-프로피오락톤이 10mM KH_2PO에서 제조되었다. 제조되는 동안 용액은 낮은 온도에 보관되고, 빠르게 실행되었다.

정제 후 즉시 얻어진 HVJ 현탁액에, 최종적으로 0.01%가 되도록 β-프로피오락톤이 첨가되고, 얼음에서 60분 동안 배양되었다. 그런 후에, 혼합물은 37℃에서 2시간 동안 배양되었다. 혼합물은 튜브당 10,000 HAU 양만큼 에펜도르프 튜브로 분배되어, 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리되었다. 침전물은 -20℃에 저장되었다. 이미 언급한 불활성화 방법을 사용하는 대신, 침전물을 -20℃에 저장하지 않고, DNA는 벡터를 만들기 위해 세정제 처리를 통해 결합된다.

(4 : HVJ 엔벨로프 벡터의 제조)

저장되었던 HVJ에, 200 800μg의 외인성 DNA를 포함하는 용액 92μℓ를 첨가하고, 피펫팅을 통해 잘 섞이도록 했다. 이 용액은 -20℃에서 적어도 3개월 동안 저장될 수 있다. HVJ로 혼합되기 전에 DNA에 프로타민 설페이트를 첨가하여, 발현 효율은 2배 이상 증진되었다.

이 혼합물은 얼음에서 1분 동안 두었다가, 8μℓ의 옥틸글루코사이드(10%)가 첨가되었다. 튜브를 얼음에서 15초 동안 흔들고, 얼음에서 45초 동안 방치하였다. 세정제 처리 시간은 바람직하게는 1 5분이다. 옥틸글루코사이드 대신에, 트리톤-X100(t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올), CHAPS(3-[(3-콜라미도프로필)-디메틸암모니오]-1-프로판 술포네이트), 또는 NP-40(노닐페녹시 폴리에톡시 에탄올)과 같은 세정제들이 또한 사용될 수 있다. 트리톤-X100, NP-40, 및 CHAPS의 최종 농도는 바람직하게는 각각 0.24 0.80%, 0.04 0.12%, 및 1.2 2.0%이다.

차가운 BSS 1ml가 첨가되고, 용액은 15,000 rpm에서 15분 동안 즉시 원심분리되었다. 결과 침전물에, 300μℓ의 PBS 또는 살린 등이 첨가되고, 소용돌이 또는 피펫팅을 통해 섞이도록 했다. 현탁액은 바로 유전자 전달에 사용되거나 -20℃에서 보관 후 유전자 전달에 사용된다. 적어도 2개월 동안 보관된 후, 이 HVJ 엔벨로프 벡터는 동일한 레벨의 유전자 전달 효율을 유지하였다.

(실시예 9 : HVJ 엔벨로프 벡터에서 F1 단백질과 HN 단백질간의 비율)

(1 : 샘플 제조)

(ⅰ) 10,000 HAU에 해당하는 양의 정제된 HVJ를 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하고, 침전물은 300㎕의 PBS에서 현탁되어 -20℃에 저장되었다.

(ⅱ) 10,000 HAU에 해당하는 양의 정제된 HVJ를 UV 라이트 조사(198mJ/㎠)하고, 그런 후에 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하고, 침전물은 300㎕의 PBS에서 현탁되어 -20℃에 저장되었다.

(ⅲ) 10,000 HAU에 해당하는 양의 정제된 HVJ를 UV 라이트 조사(198mJ/㎠)하고, 그런 후에 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 침전물에 200㎍의 pcLuci DNA(용액 92㎕)를 첨가하고, 피펫팅을 통해 섞이도록 했다. 현탁액을 얼음에 넣고, 8㎕의 옥틸글루코사이드(10%)를 첨가했다. 튜브를 손으로 15초 동안 흔들고, 얼음에서 45초 동안 방치하였다. 차가운 BSS 1ml가 첨가되고, 15,000 rpm에서 15분 동안 즉시 원심분리되었다. 그런 후에, 침전물은 300㎕의 PBS에서 현탁되어 -20℃에 저장되었다.

(2 : 단백질 전기영동)

A ×5 Laemli 표본 완충용액을 3종류의 표본(5, 10, 20㎕)에 첨가하고, 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 행하였다. 전기영동 후, 겔은 코마씨 블루로 착색되었다. 오물 제거 후, 겔은 셀로판 종이에 붙여져 건조되었다.

(3 : 단백질 확인)

전기영동과 착색된 샘플은 LAS2000으로 삽입되고(Fuji Film, Tokyo)(도 7), F1 및 HN에 대응하는 단백질 밴드의 농도가 측정되었다. 각 타입의 샘플에 대해, 3가지 다른 양들이 전기영동되었다. 각각의 F1/HN 밀도가 계산되어, 평균 및 표준편차가 각 샘플에 대해 계산되었다.

(4 : 결과)

F1/HN은 일관되게 샘플 (ⅰ), (ⅱ) 및 (ⅲ)에 대해 약 1.7이었다. F1(51 kD) 및 HN(68 kDa)의 분자량을 고려해 보면, 분자비는 약 2.3이 된다. 이는 F1과 HN을 이용한 재구성된 리포솜에 대한 최적 융합이 약 2의 F1/HN으로 이루어질 수 있다는 보고(Exp. Cell Res. 142, 95 to 101, 1985)와 일관된 것이다. 다른 연구원들이 보고한 재구성된 타입에서는, 이 비율이 와일드-타입 바이러스의 것과는 다르다(J. Virol. 67, 3312 to 3318, 1993). 다른 단백질 조성은 또한 HVJ와 HVJ 엔벨로프 벡터간에 실질적으로 동일하다.

(실시예 10 : HVJ 엔벨로프 벡터로의 DNA 캡슐화 및 캡슐화 속도)

(1 : HVJ 엔벨로프 벡터(DNA 캡슐화된 또는 캡슐화되지 않은)의 전기 현미경 이미지)

상기 기술된 대로, 130㎍의 pSFV-LacZ(14.5 kb)는 10,000 HAU의 HVJ(UV 라이트 불활성화된)에서 캡슐화되어, HVJ 엔벨로프 벡터가 제조되었다.

캡슐화된 후 HVJ 엔벨로프 벡터는 300㎕의 PBS에 현탁되어, -20℃에 저장되었다. 10일 후, 1㎕의 현탁액을 그리드에 넣고 음성 착색으로 전자 현미경을 통해 관찰하였다. 대조군으로는, DNA가 캡슐화되지 않은 HVJ 엔벨로프 벡터가 사용되었다.

(결과)

결과를 도 8에 나타내었다. HVJ 엔벨로프 벡터의 다수는 HVJ 바이러스에서 관찰된 것과 실질적으로 동일한 외부 배열을 가졌다. DNA가 캡슐화되지 않은 HVJ 엔벨로프 벡터에 비교하여, 높은 전자 밀도를 지닌 구조는 DNA가 사용된 HVJ 엔벨로프 벡터에서 관찰되었다. 반대로, 캡슐화되지 않은 HVJ 엔벨로프 벡터는 높은 내부 투과도를 가졌으며, 바이러스 게놈은 파괴되거나 상실된 것으로 추측된다.

(2 : HVJ 엔벨로프 벡터로의 DNA 캡슐화 비율)

pcLuci (7.4 kb) 157㎍은 이미 언급한 방법으로 6,700 HAU의 HVJ(UV 라이트 불활성화된)에서 캡슐화되어, HVJ 엔벨로프 벡터를 제조하였다. HVJ 엔벨로프 벡터는 300㎕의 BSS에 현탁되어, 15 유니트의 마이크로코칼 뉴클레아제, 2mM의 $CaCl_2$, 및 20㎍/㎖의 RNaseA로 20℃에서 30분 동안 처리되고, 1 리터의 PBS에 대해 투석되었다(4℃, 오버나이트). HVJ 엔벨로프 벡터는 1% SDS로 37℃에서 1분 동안 처리되었다. HVJ 엔벨로프 벡터는 500㎕의 페놀과 500㎕의 클로로포름-이소아밀 알코올로 처리된 후에, 에탄올 침전되었다. 침전물은 100㎕의 BSS에 현탁되어 260nm 또는 280nm에서 스펙트로포토미터로 측정되었다.

(결과)

수득률은 85.7%이었다. 이로부터 전환하여, HVJ 엔벨로프 벡터로의 DNA 결합 효율은 3.8%이었다. 279㎍의 pcLuci를 10,000 HAU의 HVJ에 결합되게 하는 경우 결합 효율은 7.2%이었다.

이로부터, 10,000 HAU의 HVJ로의 DNA 결합 효율은 옥틸글루코사이드가 사용되는 경우에 약 6 7%로 추측되지만, 사용된 DNA 양에 의존하여 달라진다. 게다가, 프로타민 설페이트가 DNA 및 HVJ 엔벨로프 벡터와 함께 있을 때 도입 효율이 증가함을 알아냈으며, 이는 HVJ 엔벨로프 벡터로의 DNA 캡슐화 효율이 증가했기 때문이라고 여겨진다. 트리톤-X100 또는 NP-40과 함께 하면 효율이 약 10 40%로 훨씬 증가할 것으로 추측된다.

(실시예 11 : HVJ 엔벨로프 벡터를 통한 세포로의 유전자 전달)

(1 : 유전자 전달 방법)

1,000 HAU에 해당하는 양을 에펜도르프 튜브(30㎕)에 넣고, 5㎕의 황산 프로타민(1㎎/ml)을 첨가하였다. BHK-21 세포에 대한 배양액(전날 6개의 웰에 웰당 200,000 세포를 뿌린)은 교환되고, 0.5ml의 배양액(10% FCS-DMEM)이 웰당 첨가되었다. 각 웰에, 미리 언급한 벡터의 혼합물(1,000 HAU에 해당하는)과 황산 프로타민을 첨가하고, 플레이트를 앞뒤 좌우로 흔들어, 벡터와 세포가 잘 섞이도록 하였다. 혼합물은 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃로 10분 동안 방치하였다.

유전자 발현을 검사한 후, 배양액을 교환하고, 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃로 오버나이트(16 24시간)로 방치하였다. 루시퍼라제(pcLuci : CMV 프로모터를 지닌 루시퍼라제 유전자)에 대해서, 세포는 0.5ml의 세포 용해 완충용액(Promega)으로 용해되고, 20㎕의 용액에서 활성도는 루시퍼라제 분석 키트(Promega)를 이용하여 측정되었다. 초록색 형광 단백질(pCMV-GFPE ; Promega)에 대해서, 세포는 완전한 형태에서 형광 현미경으로 관찰되고, 5 8 필드가 400의 확대 비율로 관찰되고, 형광을 발생시킨 세포 비율이 계산되었다.

(2 : 배양된 세포에 대한 도입 효율에 부과된 조건 연구)

BHK-21 세포가 배양된 세포로 사용되었다.

(2.1 : HVJ 엔벨로프 벡터의 제조에서 옥틸글루코사이드(OG) 농도 연구)

상기 (1)의 유전자 전달 방법에 다음의 변형을 하여, 다음의 농도에서 HVJ 엔벨로프 벡터를 통한 유전자 전달에서 옥틸글루코사이드(OG) 효과는 검사되었다 :

(A) 옥틸글루코사이드 농도 : 1, 2, 또는 3% ;

불활성화된 HVJ는 HVJ 엔벨로프 벡터 제조시간 : 1분, 5분, 또는 10분에서 OG로 처리되었다 ;

초음파 처리는 행해지거나 행해지지 않았다.

(B) 옥틸글루코사이드 농도 : 0.125 1.25% ;

감염에 사용된 벡터의 부피 : 10㎕, 100㎕.

(C) 옥틸글루코사이드 : 0.55 0.8% ;

감염 시간 : 30분, 오버나이트(O/N).

결과를 도 9에 나타내었다.

(2.2 : 세포로의 유전자 전달 조건, 농도/황산 프로타민(PS) 처리시간)

상기 (1)의 유전자 전달 방법에 다음의 변형을 하여, HVJ 엔벨로프 벡터를 통한 유전자 전달에서 황산 프로타민의 효과는 검사되었다 :

(A) 황산 프로타민 : 0 100㎍/㎖ 배양액 ;

감염 시간 : 20, 40, 또는 60분

(B) 황산 프로타민 : 0 40㎍/㎖ 배양액 ;

감염 시간 : 5, 10, 또는 20분

결과를 도 10에 나타내었다.

(2.3 : 유전자 발현 레벨에서 HVJ 엔벨로프 벡터로 캡슐화된 DNA의 농도 효과)

상기 (1)의 유전자 전달 방법에 다음의 변형을 하여, HVJ 엔벨로프 벡터를 통한 유전자 발현 레벨에서의 실험에서 사용된 DNA 양의 효과는 검사되었다 :

(A) DNA 양 : 20 200㎍ ;

HVJ 엔벨로프 벡터는 -20℃ 또는 -80℃에서 5일 동안 저장되었다.

(B) DNA 양 : 180 360㎍/HVJ

10,000 HAU.

결과를 도 11에 나타내었다.

(2.4 : 유전자 발현 레벨에서 유전자 전달에 사용된 HVJ 적정농도의 효과)

상기 (1)의 유전자 전달 방법에 다음의 변형을 하여, 유전자 발현 양에서 HVJ 엔벨로프 벡터를 통한 유전자 전달에 사용된 HVJ 적정농도의 효과는 검사되었다 :

5,000, 10,000, 또는 20,000 HAU의 적정농도를 지닌 HVJ를 이용하여, HVJ 엔벨로프 벡터를 제조하고, BHK-21 세포는 250, 500, 1,000, 또는 2,000 HAU에 해당하는 양으로 감염시켰다.

결과를 도 12에 나타내었다.

(2.5 : HVJ 엔벨로프 벡터 유전자 전달 효율에서 HVJ 불활성화된 조건의 효과)

상기 (1)의 유전자 전달 방법에 다음의 변형을 하여, BHK-21 세포에서 루시퍼라제 유전자 발현에서 HVJ 불활성화 방법(UV 또는 β-프로피오락톤)의 효과는 검사되었다 :

(A) UV 불활성화에 사용된 조사량 : 0 231mJ/㎠

(B) HVJ 처리에 사용된 β-프로피오락톤(BPL) 농도 : 0 0.025%

결과를 도 13에 나타내었다.

(실시예 12 : HVJ 엔벨로프 벡터에 의한 여러 세포로의 유전자 전달)

인간 혀의 비늘모양 세포 암(squamous cell carcinoma ; SAS)으로, 실시예 11에서 기술된 방법에 따라 유전자 전달이 이루어졌다. 결과를 도 14에 나타내었다. 유전자 전달에서, 감염에 대한 프로타민 설페이트 농도와 배양 시간은 도 14에 나타낸 대로 변화되었으며, 유전자 전달 효율은 루시퍼라제 유전자의 발현에 기초하여 측정되었다. 감염에 사용된 조건하에서, 감염 처리가 200μg/㎖의 황산 프로타민을 이용하여 60분 동안 실행될 때 유전자 전달 효율은 최대였다. 그러나, 황산 프로타민 농도를 증가시키면 유전자 전달 효율은 더욱 증가할 것으로 기대된다.

실시예 11에서 기술된 방법에 따라 유전자 도입은 인간 대동맥 내피 세포(human aortic endothelial cell ; HAEC)에 대해 이루어졌다. 결과를 도 15에 나타내었다.

유전자 전달에서, 감염에 대한 황산 프로타민 농도와 배양 시간은 도 15에 나타낸 대로 변화되었으며, 유전자 전달 효율은 루시퍼라제 유전자의 발현에 기초하여 측정되었다. 감염에 사용된 조건하에서, 감염 처리가 100μg/ml의 황산 프로타민을 이용하여 60분 동안 실행될 때 유전자 전달 효율은 최대였다. 그러나, 황산 프로타민 농도를 증가시키면 유전자 전달 효율은 더욱 증가할 것으로 기대된다.

(실시예 13) HVJ 엔벨로프 벡터에 의한 여러 형태의 생체내 조직으로의 유전자 전달

본 실시예는 실시예 11에 기술된 HVJ 엔벨로프 벡터를 사용하여 여러 형태의 생체내 조직으로의 유전자 전달을 나타내는 실시예들이다.

(13.1 : 마우스 간)

300μℓ의 PBS에 현탁된 상태로 200μg pcLuci를 0.8% 옥틸글루코사이드에 얼음상에서 1분간 방치함으로서 HVJ 엔벨로프 벡터가 제조된다. 제조된 현탁액의 10분의 1인 30μℓ(1,000 HAU 상당)를 70μℓ의 PBS에 희석시켜 (총량: 100μℓ)로 하고 희석된 용액을 마우스(C57BL/6)간에 로브를 통하여 주입시킨다.

슈크로tm 그라디언트 원심분리(62000 g, 90분)후에, 200μg pcLuci를 교반/익스트루전시켜 HVJ-AVE (인공 바이러스 엔벨로프) 리포솜이 제조된다. 그리고 제제는 원심분리(27000 g, 30분)에 의해 펠레트화 되고, 이 펠레트는 500μℓ의 PBS에 현탁시킨다. 100 마이크로리터의 표본을 마우스(C57BL/6)간에 로브를 통하여 주입시킨다.

24시간 후에, 주입 후 간 로브를 분리시키고, 로브의 루시퍼라제 활성은 루시퍼라제 분석 시스템(Promega)를 이용하여 측정된다.

그 결과를 도 16A에 나타냈다. 이러한 결과로부터 본 발명에 따른 HVJ 엔벨로프 벡터가 높은 유전자 전달을 효율적으로 나타내며 이는 종래의 HVJ-AVE 리포솜보다 약 두배 정도의 효율을 나타내는 것이다.

(13.2 : 마우스 자궁)

HVJ 엔벨로프 벡터가 13.1에 기재된 방법으로 제조되었다. 표본의 50 마이크로리터와 100 마이크로리터를 PBS에 희석시켜 500㎕로 만들고, 마우스의 Fallopian 튜브를 통해 주입시키고 약 10분 동안 자궁경부를 묶는다. 24시간 후에 마우스 자궁을 분리시키고 로브 또는 자궁의 루시퍼라제 활성을 루시퍼라제 분석 시스템(Promega)을 이용하여 측정하였다. 그 결과를 도 16B에 나타내었다. 본 발명에 따라 HVJ 엔벨로프 벡터가 마우스 자궁으로 유전자를 전달하는 반면에 HVJ-AVE 리포솜을 이용한 방법으로는 자궁 조직에 유전자 전달을 검출할 수 있을 정도로 수행되지 않았다.

pcLuci를 포함하는 HVJ 엔벨로프 벡터를 13.1에 기술된 방법으로 제조하였다. LacZ 발현을 위하여 pEB-CMV-LacZ (13kb)를 포함하는 HVJ 엔벨로프 벡터를 200㎍의 플라스미드를 사용하여 제조하였다. 이러한 벡터를 함유하는 HVJ 엔벨로프 벡터를 상기한 방법으로 자궁에 주입하였다. 그 결과를 도 16C에 나타내었다. LacZ 염색을 통하여 LacZ 유전자의 발현이 자궁내막의 분비선 상피 속에서 주로 검출되었다.

(13.3 래트의 뇌)

pEGFP-1 (예를 들면 녹색형광 프로테인 유전자를 지닌 벡터(약 0.7kb))를 포함하는 해파리의 HVJ 엔벨로프 벡터를 캘리포니아 팔로알토 소재 클론테크사로부터 입수가능한 사이토메갈로바이러스 프로모터를 지닌 발현벡터에 결합시켰다. pcLuci를 포함하는 HVJ 엔벨로프 벡터를 전에 기술한 방법과 유사한 방법으로 제조하였다. 30 마이크로미터의 벡터(1,000 HAU 상당, 1/10 제제)를 경동맥 또는 SD 래트(스프라그-돌리 래트)의 시스터나 마그나(cisterna magna)를 통해 경동맥 또는 포막내 공간(intrathecal space)에 주입하였다. 유전자 전달 3 4일 후에 랫트를 희생시키고 뇌에 부분을 고정화시키지 않고 준비하였다. 형광 마이크로스코피를 통해 형광성을 관찰하였다. 도 16D에 그 결과를 표시하고 있는 것과 같이 녹색형광 프로테인(GFP)의 인트라세레브랄 발현이 시스터나 마그나를 통해 경동맥 주입뿐만 아니라 포막내 공간 주입시에도 관찰되었다. 한편, 대뇌내 GFP 발현은 HJV-AVE 리포솜을 이용하여 랫트 경동맥에 유사한 유전자를 전달시에는 관찰되지 않았다.

(13.4 :토끼 눈)

인간 HGF(헤파토사이토 생장인자) 유전자의 pCKNA3 부위의 HindⅢ/ Xba I 의 돌연변이(In Vitrogen, San Diego, CA)인 것으로, NK4 cDNA(1.4kb)로 클로닝되어 구축된 pCMV-NK4를 오사카 대학교 의과대학의 토시가주 나까무라 교수로부터 입수하였다.

pcLuci를 포함하는 HVJ 엔벨로프 벡터를 제조하는 상기방법에 있어서, 400 또는 800㎍의 pCMV-NK4를 10,000 HAU의 불활성화 HVJ와 함께 사용한 것을 제외하고는 유사한 방법으로 HVJ 엔벨로프 벡터를 제조하였다. pCMV-NK4는 HGP 기능을 저해하는 HGP 돌연변이를 발현하는 벡터이다. 50 마이크로리터의 벡터(제제의 1/6)를 혈관형성을 유도하는 재조합 VEGF의 펠레트로 처리된 토끼 각막조직에 주입하였다. 처리후 7일후, 토끼를 희생시키고 눈의 혈관신생을 관찰하였다. 그 결과를 도 16E에 나타내었다. pCMV-NK4는 용량-의존적인 방법으로 VEGF에 의해 유도된 혈관신생을 억제하였다.

(13.5 : 랫트 폐 동맥)

SV40 프로모터에 의해 제어되는 LacZ 유전자를 지닌 pSV-LacZ(Promega, Madison, WI)를 지닌 HVJ 엔벨로프 벡터를 pcLuci를 지닌 HVJ 엔벨로프 벡터를 제조하는 상기 방법과 유사한 방법으로 제조하였다. 50 마이크로리터의 벡터(제제의 1/6)을 랫트의 기관에 주입하였다. 유전자 전달 3일 후에 랫트를 희생시키고 동맥내의 LacZ 발현을 1% 글루타르 알데히드를 지닌 조직의 고정화 후에 X-gal로 시각화하였다. 그 결과를 도 16F에 나타내었다. HVJ 엔벨로프 벡터를 폐동맥을 통해 주입시킨 경우에 기관지 점막에 유전자 발현이 관찰되었다(데이타는 제시하지 않음).

(실시예 14) 의약 전달 시스템(DDS)으로서의 바이러스 엔벨로프 벡터의 기능

본 발명에 따른 유전자 전달 벡터는 올리고뉴클레오타이드 또는 유인핵산 치료를 위한 의학전달시스템으로서 유용하게 이용할 수 있다.

(14.1 : 형광 올리고뉴클레오타이드의 도입)

본 발명에 따른 바이러스 엔벨로프 벡터를 사용하여 형광표지 올리고뉴클레오타이드를 세포내에 도입하였다.

5' 위치에 FITC로 라벨된 20-머 올리고뉴클레오타이드(5'- CCTTGAAGGGA TTTCCCTCC-3') (194μg/92μℓ 의 BSS)를 10,000 HAU의 HVJ 침전물(이것은 198mJ/cm ^{2}의 자외선으로 불활성화된 것)과 혼합하였다. 트리톤(Triton) X-100(최종농도 : 0.24%)를 첨가시키고, 그 혼합물을 얼음하에서 1분 동안 처리하게 하였다. 1 밀리리터의 BSS를 가하고, 혼합물을 원심분리시켰다(15,000rpm, 15분, 4℃). 이 침전물에 100μℓ의 PBS를 가하고, 그 혼합물을 -20℃에서 보관하였다. 1개월 후에 혼합물을 녹이고, 10μℓ의 혼합물에 5μg의 황산 프로타민을 혼합시키고 5,000,000 BHK-21 세포(0.5ml 배지속)와 함께 인큐베이션시켰다(10분, 60분). 도입 그 다음날, 형광 현미경하에서 세포 형광을 관찰하였다. 그 결과, 10분 후에는 도 17B에 나타난 바와 같이 약 10% 세포에 올리고뉴클레오타이드가 도입되었고, 60분 후에는 도 17a에 나타난 바와 같이 80% 또는 그 이상의 세포에 도입되었다.

(14.2 : 스타트6 데코이 핵산을 이용한 접촉피부염의 치료)

본 발명에 따른 바이러스 엔벨로프 벡터를 사용하여 유인 핵산을 세포에 도입하였다.

Stat6 DNA 결합서열(5'-GATCAAGACCTTTTCCCAAGAATCTAT-3'과 3'- CATGTTCTGGAA

AAGGGTTCTTAGATA-5'(L.H. Wang 등:Blood 95, 1249~1257, 2000))을 지닌 이중 나선 핵산(250μg/300μℓ BSS)을 30,000 HAU의 HVJ 침전물(이것은 99mJ/cm ^{2}의 자외선에 의해 불활성화된 것)과 혼합시킨다.

트리톤 X-100 (최종농도 : 0.24%)을 가하고 그 혼합물을 얼음위에서 1분간 처리하도록 하였다. 1 밀리리터의 BSS를 가하고, 그 혼합물을 원심분리시켰다(15,000 rpm, 15분, 4℃). 침전물에 300μℓ의 PBS를 가하고, 그 혼합물을 -20℃에서 저장하였다. 이 HVJ 엔벨로프 벡터를 마우스에 피하주입하였고, 이것은 IgE-유도 알레르기 억제 및 커티리액션(cutireaction)의 지연을 야기시켰다.

(실시예 15) 현탁세포에 유전자 전달

인간 백혈병세포와 유사한 CCRF-CEM, NALM-6, K-562를 사용하여 유전자 전달 실험을 행하였다.

100 마이크로그램의 pCMV-루시퍼라제(92μℓ)를 10,000 HAU의 불활성화된 HVJ(자외선 99mJ/cm ^{2}) 침전물과 혼합하였다.

트리톤 X-100(최종농도 : 0.24%)을 가하고 그 혼합물을 얼음위에서 1분간 처치하도록 하였다. 1 밀리리터의 BSS를 가하고, 그 혼합물을 원심분리시켰다(15,000 rpm, 15분, 4℃). 침전물에 300μℓ의 PBS를 가하고, 한편, HVJ 엔벨로프 벡터를 준비하였다. 60 마이크로리터의 벡터(2,000 HAU 상당), 황산 프로타민 및 4,000,000 세포현탁액을 1.5m

l의 Eppendorf 튜브안에서 혼합하고, 원심분리(10,000 15,000 rpm, 10분, 20℃)시켰다. 그 후, 배양액을 침전물에 가하고 그 혼합물을 배양접시에 놓았다. 1일 후에, 세포의 루시퍼라제 활성을 측정하였다.

사용된 셀 라인(특히, CCRF-CEM 및 NALM-6)은 HVJ-리포솜 또는 리포솜 시약(Lipofectamine, Gibco BRL의 Lipofectin 등)을 사용한 경우에는 매우 낮은 도입효율을 나타내었다. 그러나, 도 18에 나타난 바와 같이, 매우 높은 세포의 유전자 전달이 관찰되었다.

바람직한 유전자 전달조건은 다음 조건들에 의해 결정되었다. 즉, 600 1,000μg/㎖의 황산 프로타민의 첨가와 10,000 rpm 또는 15,000 rpm으로 20℃에서 10분간 원심분리이다. HVJ 엔벨로프 벡터와 관련된 중요한 세포독성은 관찰되지 않았다. 원심분리 및 황산 프로타민의 첨가는 유전자 전달에 모두 필요한 것이다.

(실시예 16) 암조직의 유전자 전달

354 마이크로그램의 pCMV-루시퍼라제(92μℓ)를 34,000 HAU의 불활성화된 HVJ(자외선 99mJ/cm ^{2}) 침전물과 혼합하였다. 트리톤 X-100(최종농도 : 0.24%)을 가하고 그 혼합물을 얼음위에서 1분간 처치하도록 하였다. 1 밀리리터의 BSS를 가하고, 그 혼합물을 원심분리시켰다(10,000 15,000 rpm, 10분, 20℃). 침전물에 300μℓ의 PBS를 가하고, 혼합물을 -20℃에서 보관하였다. 하루 후에 혼합물에 500 1,000μg/㎖의 황산 프로타민를 혼합하였다. 100 마이크로리터의 혼합물을 마우스 흑색종 Bl6-F1(직경 : 7 8mm) 종양 덩어리에 주입하였다. 하루 후에 루시퍼라제 활성을 측정하였다. 도 19에 나타난 바와 같이 종양 덩어리에서 유전자 발현이 관찰되었다. 바람직한 황산 프로타민 농도는 500μg/㎖ 이었다. 한편, 낮은 황산 프로타민 농도하에서는 유전자 발현이 관찰되지 않았다.

(실시예 17) 헤르페스바이러스 엔벨로프 벡터의 제조

(17.1 : 불활성화 바이러스의 제조)

헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 1(HSV-1)(10^{10} 플라그 포메이션 유니트/㎖)을 오사까 대학교 의과대학 세균학실의 야마미시 교수로부터 입수하였다. 바이러스의 불활성화 조건은 배양된 시미안(simian) 세포(베로세포)내에서 바이러스 플라그 형성에 근거하여 시험되었다. 바이러스가 β-프로피오락톤(BPL) 0.05%에 의해 불활성화될 때, 플라그는 베로세포에 대해 9.1×10^{-4} (플라그/베로세포)의 빈도로 검출되었다. 한편, 바이러스가 200 또는 400mJ/cm ^{2}의 자외선의 조사에 의해 불활성화될 때 그 빈도는 각각 4.3×10^{-4} 또는 2.2×10^{-6} 이었다.

(17.2 : 불활성화 바이러스를 이용한 유전자 전달)

100μℓ의 HSV-1(10^9 입자)을 620μℓ의 PBS에 희석시킨 후, 희석액에 400mJ/cm ^{2}의 자외선을 조사시켰다. 10퍼센트(72μℓ)의 희석액을 DNA(pCMV-루시퍼라제 8.83μg/μℓ)와 혼합시켰다. 8 마이크로리터의 3% 트리톤 X-100(최종농도 : 0.24%)을 가하고, 1ml의 PBS를 1, 2, 3, 4, 5 또는 6분 후에 가하여, 희석시켜 용액으로 한다. 100 마이크로리터의 각각 표본을 도입하고 BHK-21세포(6 웰 플레이트속의)로 더욱 처리한다. 세포는 10%의 태아 소혈청(FCS)을 함유하는 Dulbecco 최소 필수배지(DME)(0.5ml/웰)에서 배양시킨다. 또다른 실험으로 100μℓ의 각각 표본을 5μg의 황산 프로타민과 혼합시키고, 그 후 여기에 BHK-21을 도입시킨다. 표본을 인큐베이터(37℃, 5% CO_2)내에서 60분간 방치한 후, 배양액을 10% FCS-DME로 대체한다. 루시퍼라제 활성을 22시간 후에 측정하였다. 도 20에 나타난 바와 같이 본 발명의 방법에 따라 제조된 헤르페스 바이러스 엔벨로프 벡터에 의해 도입된 유전자 전달은 매우 높은 수준을 나타내었다. 형태학적 관찰을 통하여 어떤 표본에도 세포독성은 관찰되지 않았다.

다음에 트리톤 X-100으로 5분간 처리한 헤르페스 바이러스 엔벨로프 벡터를 -80℃에서 이틀 동안 저장한다. 벡터를 녹이고 다시 BHK-21세포를 가한 후, 도입효율을 측정하였다. 이 때, 10% FCS-DME(2.5ml/웰)를 처음부터 60분 동안 가하고, 배양액을 하룻밤 경과시킨 후, 활성을 측정하였다. 혈청의 효과와 벡터의 양을 연구하였다.

도 21에 나타난 바와 같이, -80℃에서 이틀간 보관 후 높은 효율의 유전자 전달이 확인되었다. 혈청을 포함하지 않는 배지보다 10% 혈청을 가한 배지에서 보다 높은 도입효과를 나타내었다. 200μℓ의 벡터 용액(추정량 : 2.8×10^7 바이러스입자/웰)에서 100μℓ의 벡터 용액(추정량 : 1.4×10^7 바이러스입자/웰)보다 높은 유전자 도입활성을 나타내었다.

(17.3 : 불활성화 바이러스를 이용한 유전자 전달)

상기한 실험으로부터, 본 기술에 대한 통상의 지식을 가진 자가 세정제를 사용하여 엔벨로프 벡터를 제작하는 것은 명백할 것이다. 또한, 이는 HVJ뿐만 아니라 지질막을 지니는 넓은 범위의 엔벨로프 바이러스에도 적용할 수 있다. 따라서, 본 기술에 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 개시된 사항으로부터 다른 엔벨로프 바이러스를 사용하여 유전자 전달을 위한 엔벨로프 벡터를 쉽게 제조할 수 있다. 그러므로, 레트로비리데(Retroviridae), 토카비리데(Togaviridae), 코로나비리데(Coronaviridae), 플라비비리데(Flaviviridae), 파라믹소비리데(Paramyxoviridae), 오르소믹소비리데(Orthomyxoviridae), 부니아비리데(Bunyaviridae), 랍도비리데(Rhabdoviridae), 폭스비리데(Poxviridae), 헤르페스비리데(Herpesviridae), 바큘로비리데(Baculoviridae) 및 헤파드나비리데(Herpadnaviridae) 등의 바이러스를 이용한 엔벨로프 벡터를 제조할 수 있다. 그러므로, 조직 직접성을 지닌 바이러스를 이용하여 특정한 기관에 목적물질을 도입하는 것이 현실화됨이 가능한 것이다. 예를들면, 헤르페스 심플렉스 바이러스를 사용한 엔벨로프 벡터를 신경-직접벡터로서 적용할 수 있으며, Epstein-Barr 바이러스를 사용한 엔벨로프 벡터를 B 임파구-직접벡터로 적용할 수 있고, 인플루엔자를 사용한 엔벨로프 벡터를 호흡기관-직접벡터로 적용할 수 있는 것이다.

그러므로, 본 발명의 구체적인 실시태양은 예시한 객체에 본 발명의 상세한 설명에 기재되어 있다. 그러나, 본 발명의 범위와 기준을 벗어나지 않는 범위내에서 다양한 변형이 가능함은 명백한 것이다. 특히, 본 발명의 명세서의 실시예 내에는 불활성화 HVJ 벡터의 유전자 전달을 기재하고 있으나, 본 발명의 개시된 사항으로부터 통상의 지식을 가진 자가 HVJ 이외의 다른 바이러스를 불활성화시켜 유전자 전달 벡터를 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 유전자 전달 벡터는 불활성화 단계가 아닌 그와 유사한 제조방법으로 제조하는 것이 가능하다. 따라서, 본 발명은 첨부한 청구범위에 의해 한정되는 것은 아니다.

산업상 이용 가능성

단순한 조작과 우수한 유전자 전달 효율을 지닌 신규한 유전자 전달방법을 제공하는 것이다. 이는 신속한 유전자 라이브러리의 스크리닝을 가능케하도록 고안되었다. 본 발명에 따른 바이러스 엔벨로프 벡터를 함유하는 높은 효율을 지닌 스크리닝 키트를 제공할 수 있다. 더욱이 본 발명에 따른 바이러스 엔벨로프 벡터는 동결상태에서 장기간 보관이 가능하고, 이것은 사용시 제조할 필요를 요하지 않는다. 그 결과 조작단계는 매우 간편화되고 대량생산 도입벡터에 근거한 유전자 전달이 실현될 수 있다. 더욱이 본 발명에 따른 유전자 전달 벡터는 HVJ에 기인한 종래의 벡터보다도 더욱 높은 효율로 유전자 전달이 가능하고, 종래의 방법이 행한 것보다 더 넓은 범위의 생체내 조직에 대한 유전자 전달이 가능한 것이다.

이는 또한, 의약품의 투여, 의약품 스크리닝 시스템 및 본 발명에 따른 유전자 전달 벡터를 포함하는 유전자 치료용 벡터를 위한 의학전달 시스템을 제공하는 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

바이러스 엔벨로프를 포함하는 유전자 전달 벡터

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 바이러스는 야생형 또는 재조합형 바이러스로부터 유래된 것임을 특징으로 하는 유전자 전달 벡터

청구항 3.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 바이러스는 레트로비리데, 토카비리데, 코로나비리데, 플라비비리데, 파라믹소비리데, 오르소믹소비리데, 부니아비리데, 랍도비리데, 폭스비리데, 헤르페스비리데, 바큘로비리데 및 헤파드나비리데 등으로 구성된 군에서 선택된 일개과에 속함을 특징으로 하는 유전자 전달 벡터

청구항 4.

제 3항에 있어서, 상기 바이러스는 HVJ임을 특징으로 하는 유전자 전달 벡터

청구항 5.

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 전달 벡터는 외인성 유전자를 포함하는 바이러스를 혼합하는 단계와 혼합물을 두 번이상 얼리고 녹이는 단계를 포함함을 특징으로 하는 유전자 전달 벡터

청구항 6.

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터는 세정제 존재 하에서 외인성 유전자를 지닌 바이러스를 혼합하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조함을 특징으로 하는 유전자 전달 벡터

청구항 7.

제 5항 또는 제 6항에 있어서, 바이러스를 불활성화 시키는 단계를 더욱 포함함을 특징으로 하는 유전자 전달 벡터

청구항 8.

제 7항에 있어서, 상기 세정제는 옥틸글루코사이드, 트리톤 X-100, CHAPS 및 NP-40으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 유전자 전달 벡터

청구항 9.

제 8항에 있어서, 상기 세정제는 옥틸글루코사이드임을 특징으로 하는 유전자 전달 벡터

청구항 10.

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 황산 프로타민을 외인성 유전자에 첨가하는 단계를 더욱 포함하는 방법임을 특징으로 하는 유전자 전달 벡터

청구항 11.

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 도입은 동물에 생체내 조직에 행함을 특징으로 하는 유전자 전달 벡터

청구항 12.

제 11항에 있어서, 상기 조직은 간, 골격근육, 자궁, 뇌, 눈, 경동맥, 피부, 혈관, 폐, 심장, 신장, 비장, 암조직, 신경, B 림파구, 호흡관 조직으로 이루어진 군에서 선택된 조직임을 특징으로 하는 유전자 전달 벡터

청구항 13.

제 1항 내지 제 12항의 유전자 전달 벡터를 포함하는 유전자 치료용 의학 조성물

청구항 14.

제 1항 내지 제 12항의 유전자 전달 벡터를 포함하는 유전자 라이브러리 스크리닝 키트

청구항 15.

외인성 유전자를 포함하는 바이러스를 혼합하는 단계와 혼합물을 두 번이상 얼리고 녹이는 단계를 포함함을 특징으로 하는 유전자 전달용 바이러스 엔벨로프 벡터를 지니는 유전자 전달 벡터를 제조하는 방법

청구항 16.

상기 방법은 세정제 존재 하에서 외인성 유전자를 지닌 바이러스를 혼합하는 단계를 포함하는 방법임을 특징으로 하는 유전자 전달용 바이러스 엔벨로프 벡터를 지니는 유전자 전달 벡터의 제조방법

청구항 17.

제 15 항 또는 제 16항에 있어서, 바이러스를 불활성화시키는 단계를 더욱 포함함을 특징으로 하는 유전자 전달 벡터의 제조방법

청구항 18.

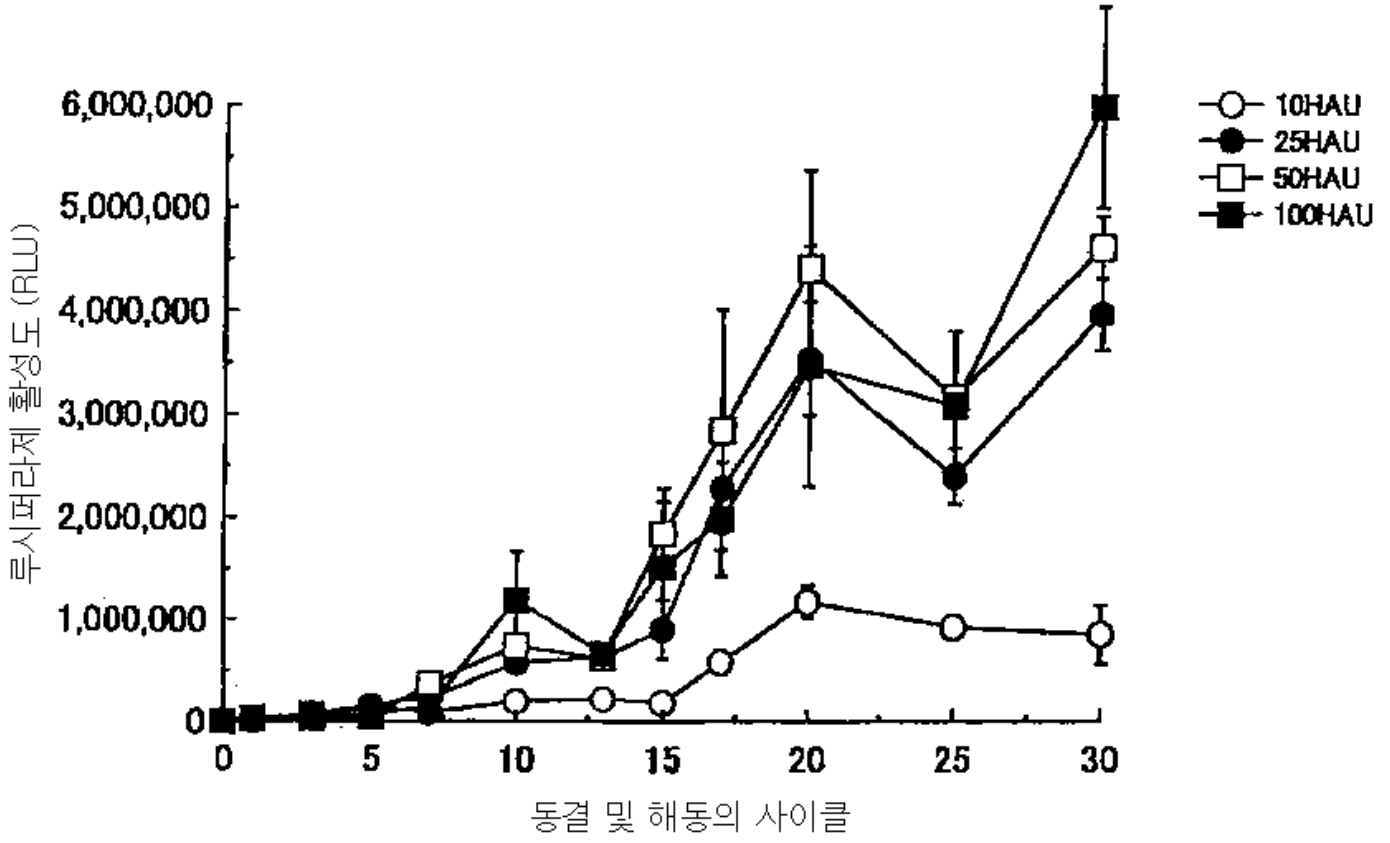
원하는 외인성 유전자를 지닌 제 1항 내지 제 12항의 유전자 전달 벡터를 제조하는 단계, 유전자를 유전자 전달 벡터를 통하여 분리된 동물 조직에 도입하는 단계를 포함하는 유전자를 분리된 동물 조직에 도입하는 방법

청구항 19.

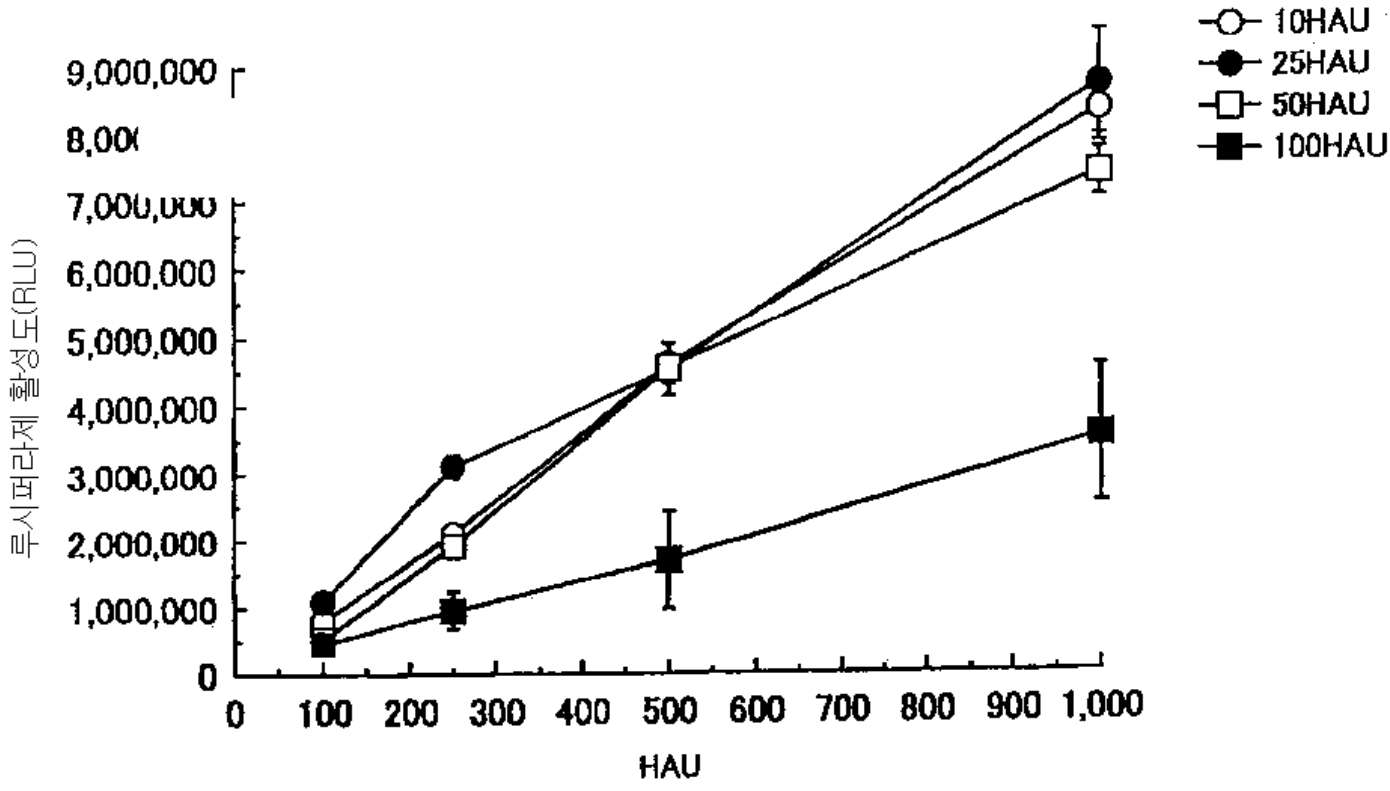
부유세포를 황산 프로타민 존재 하에서 제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 따라 제조된 유전자 전달 벡터와 혼합하고, 혼합물을 원심분리시키는 단계를 포함하는 외인성 유전자를 부유세포(suspended cell)에 도입시키는 방법

도면

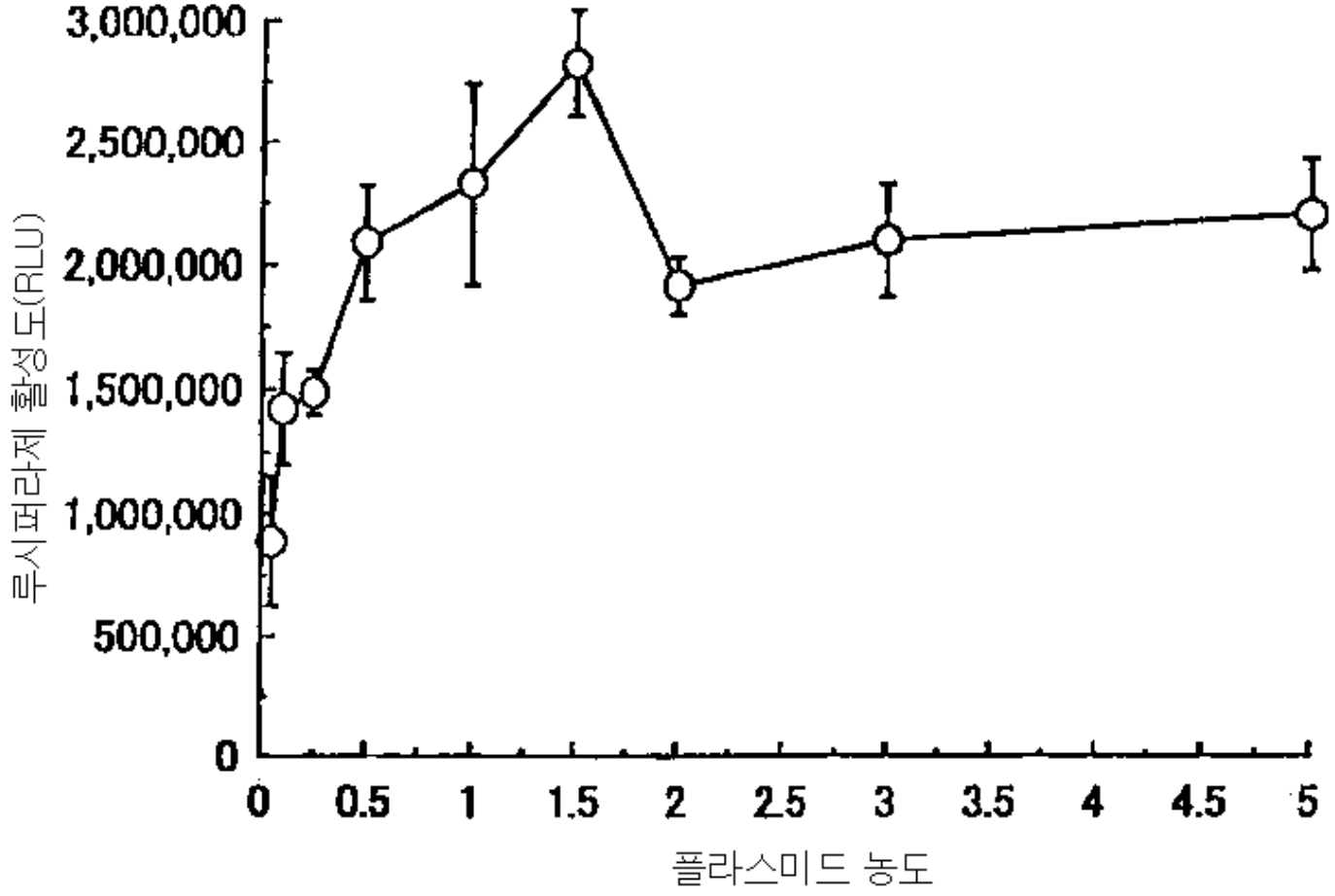
도면 1


6,000,000
5,000,000
4,000,000
3,000,000
2,000,000
1,000,000
0
0
5
10
15
20
25
30
루시퍼라제 활성도 (RLU)
동결 및 해동의 사이클
10HAU
25HAU
50HAU
100HAU

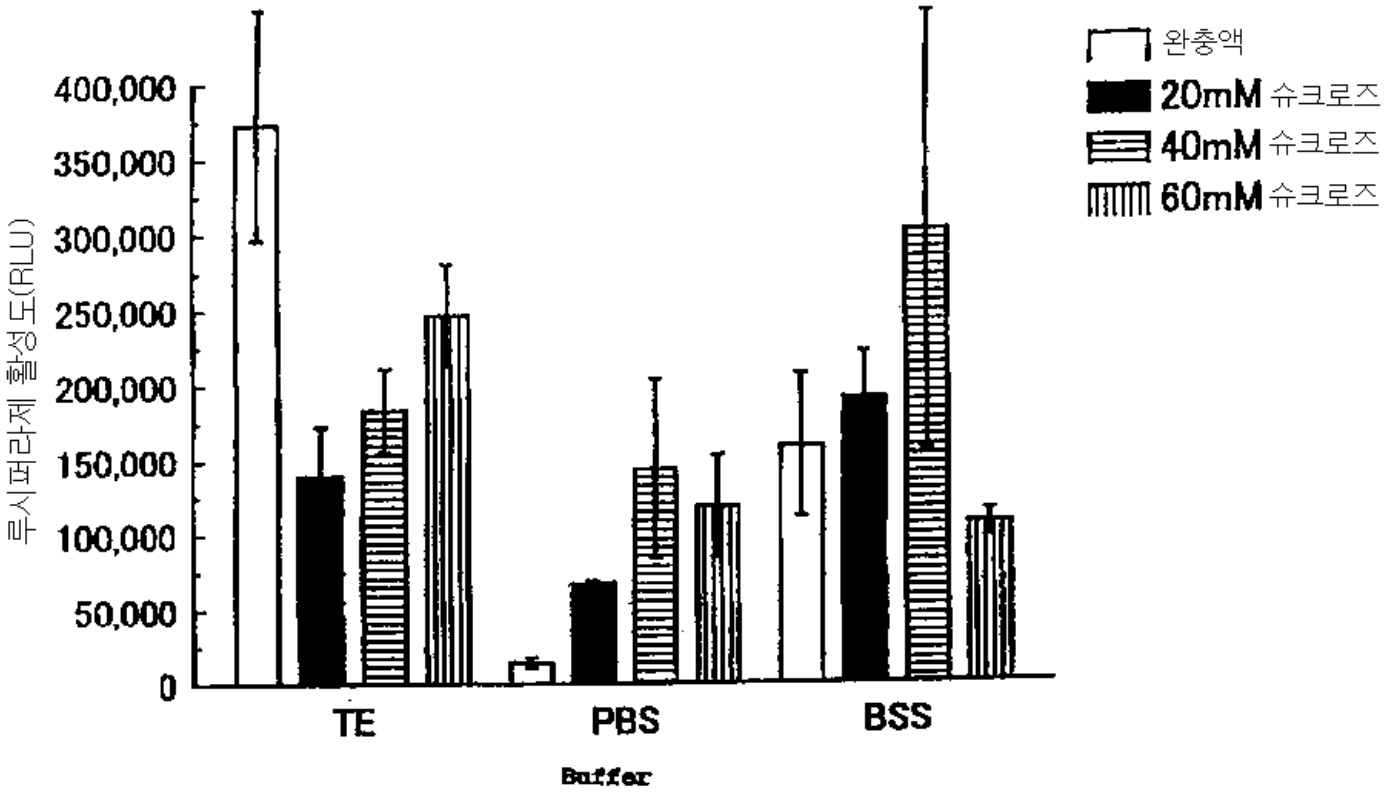
도면 2


9,000,000
8,000
7,000,000
6,000,000
5,000,000
4,000,000
3,000,000
2,000,000
1,000,000
0
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1,000
HAU
루시퍼라제 활성도(RLU)
10HAU
25HAU
50HAU
100HAU

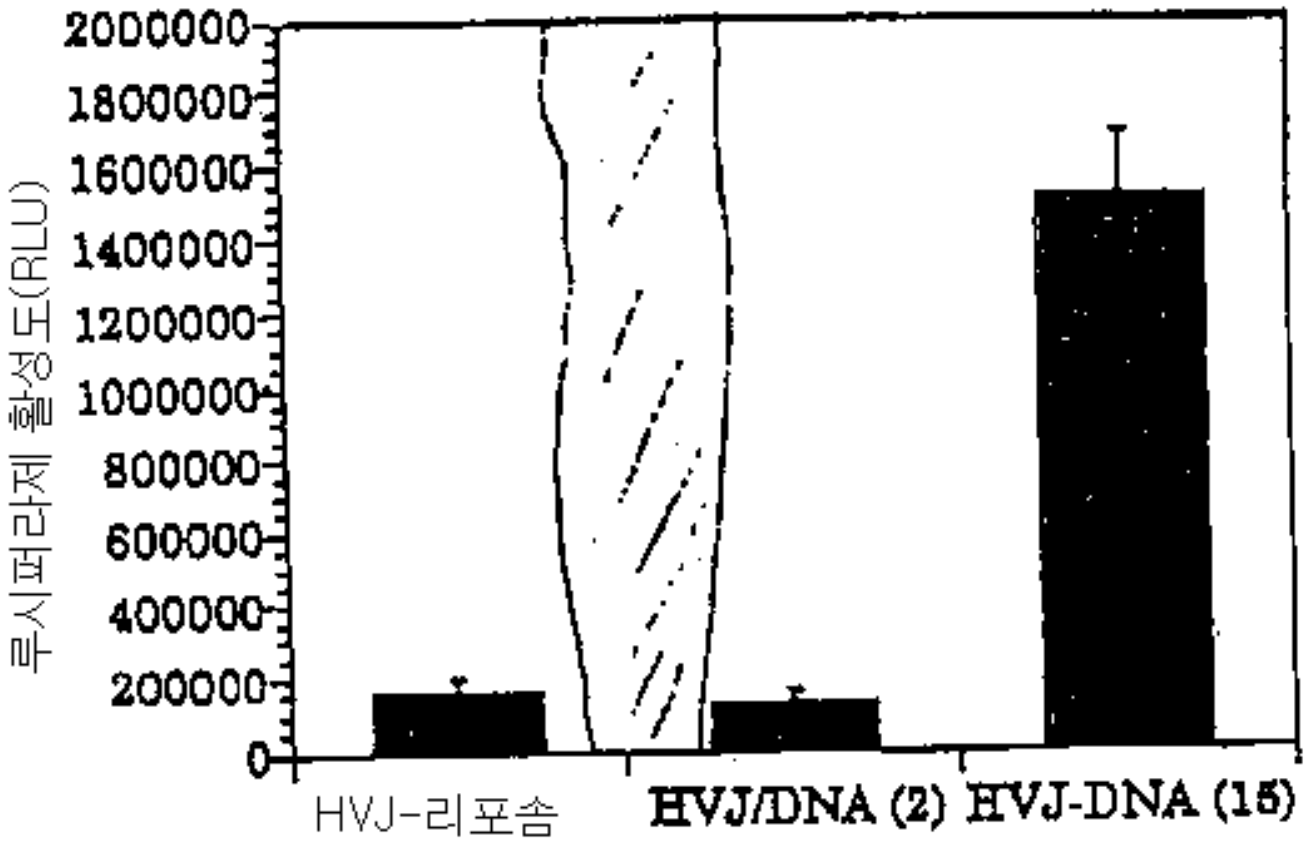
도면 3


3,000,000
2,500,000
2,000,000
1,500,000
1,000,000
500,000
0
루시퍼라제 활성도(RLU)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5
5
플라스미드 농도

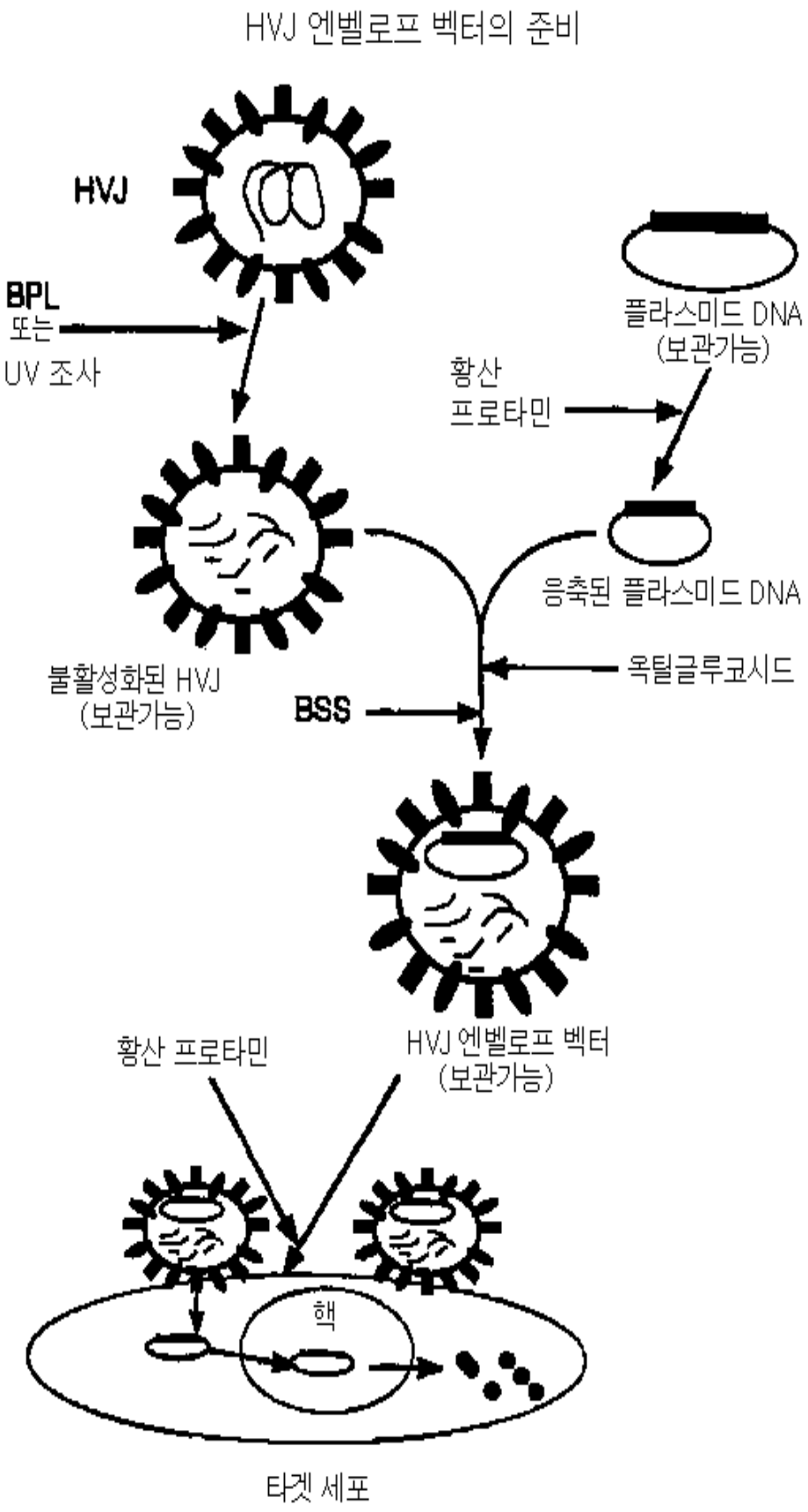
도면 4


400,000
350,000
300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
루시퍼라제 활성도(RLU)
TE
PBS
BSS
Buffer
완충액
20mM 슈크로즈
40mM 슈크로즈
60mM 슈크로즈

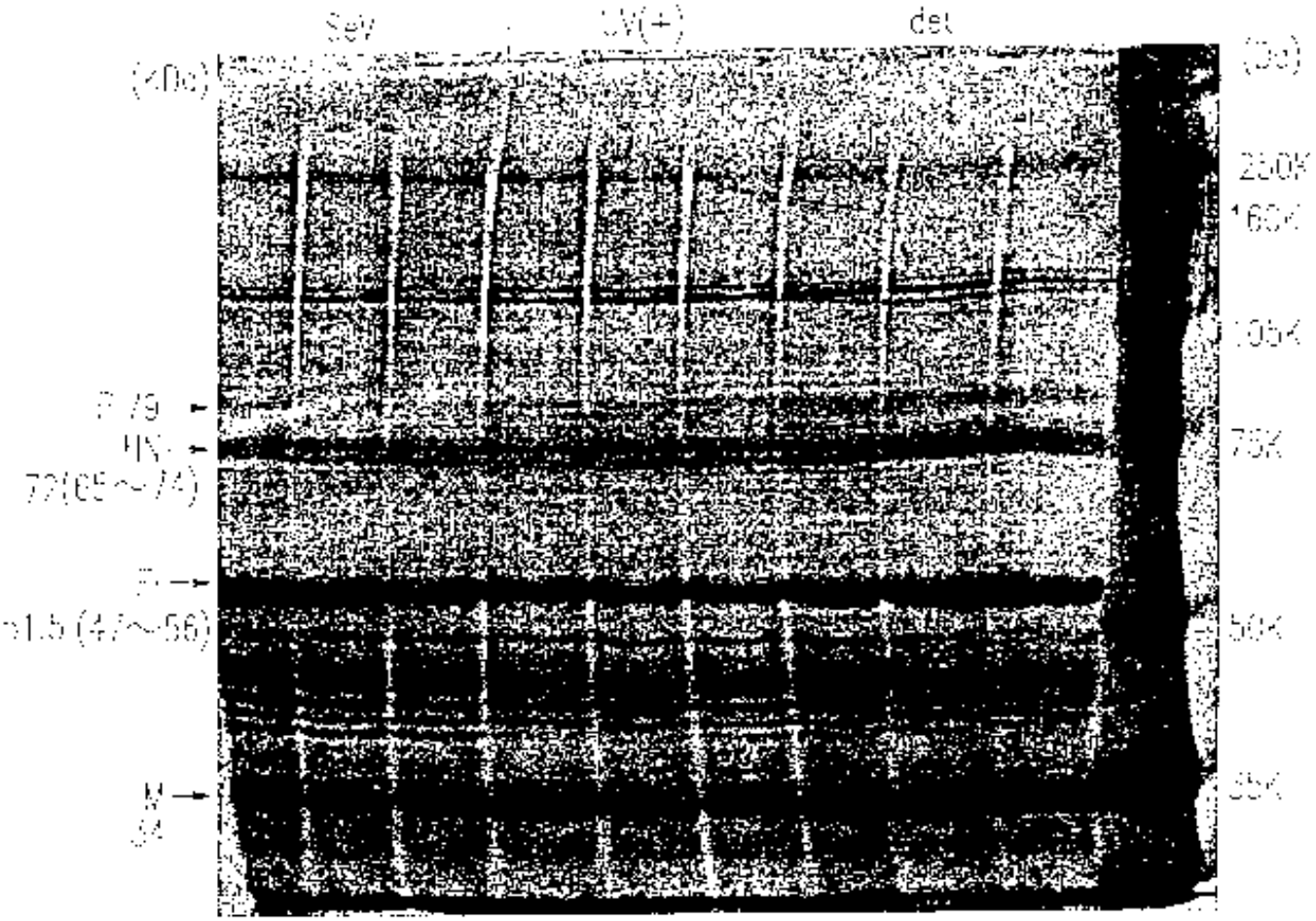
도면 5


2000000
1800000
1600000
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
루시퍼라제 활성도(RLU)
HVJ-리포솜
HVJ/DNA (2)
HVJ-DNA (15)

도면 6


HVJ 엔벨로프 벡터의 준비
HVJ
BPL
또는
UV 조사
플라스미드 DNA
(보관가능)
황산
프로타민
응축된 플라스미드 DNA
옥틸글루코시드
불활성화된 HVJ
(보관가능)
BSS
황산 프로타민
HVJ 엔벨로프 벡터
(보관가능)
핵
타겟 세포

도면 7


Sev
UV(+)
det
(kDa)
(Da)
280K
160K
105K
75K
50K
35K
P79
HN
72(65~74)
P
31.5 (47~56)
M
34

도면 8

(1) 비처리 HVJ



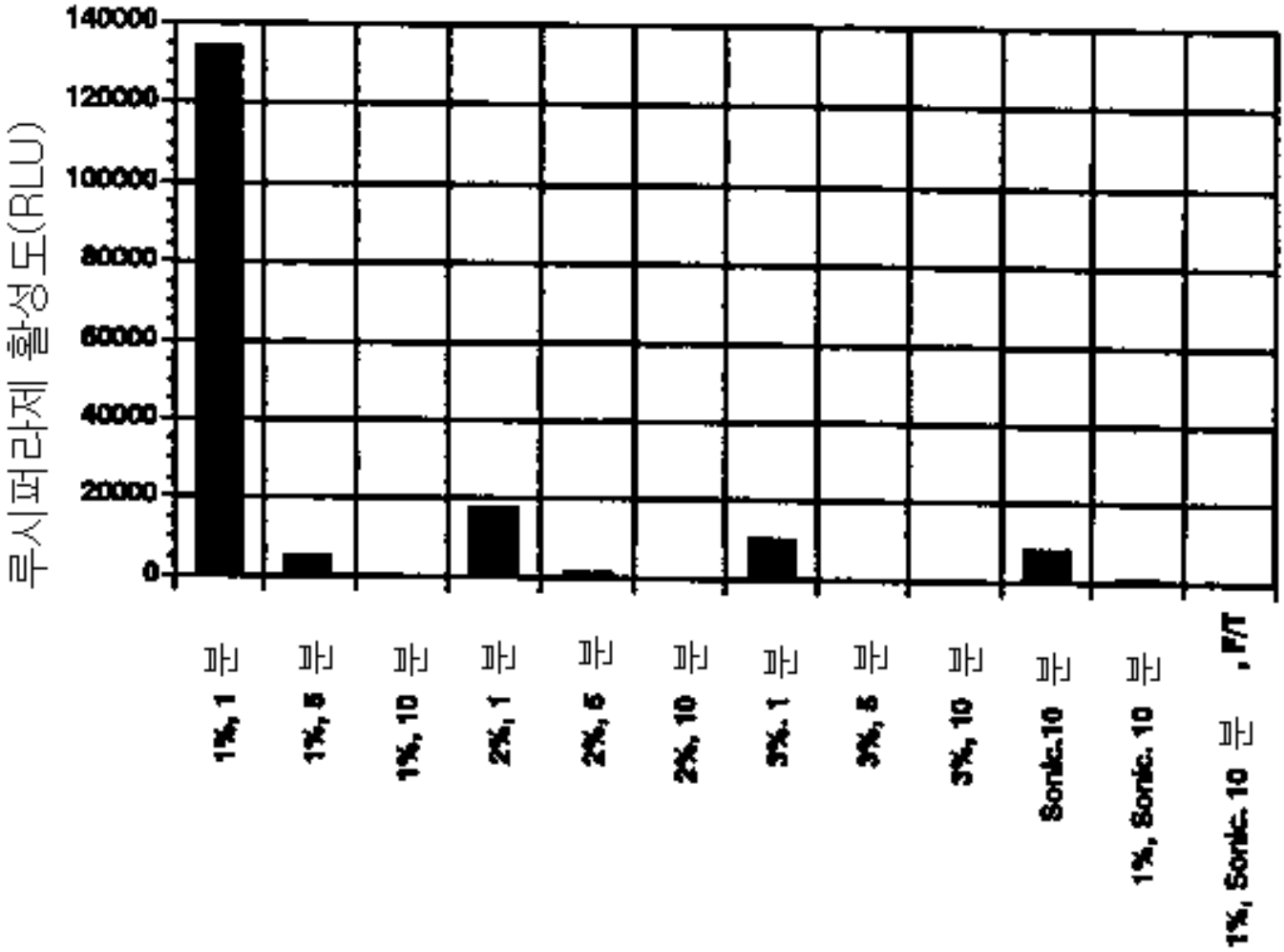
(2) 옥틸글로코시드 처리된 DNA 불포함 HVJ



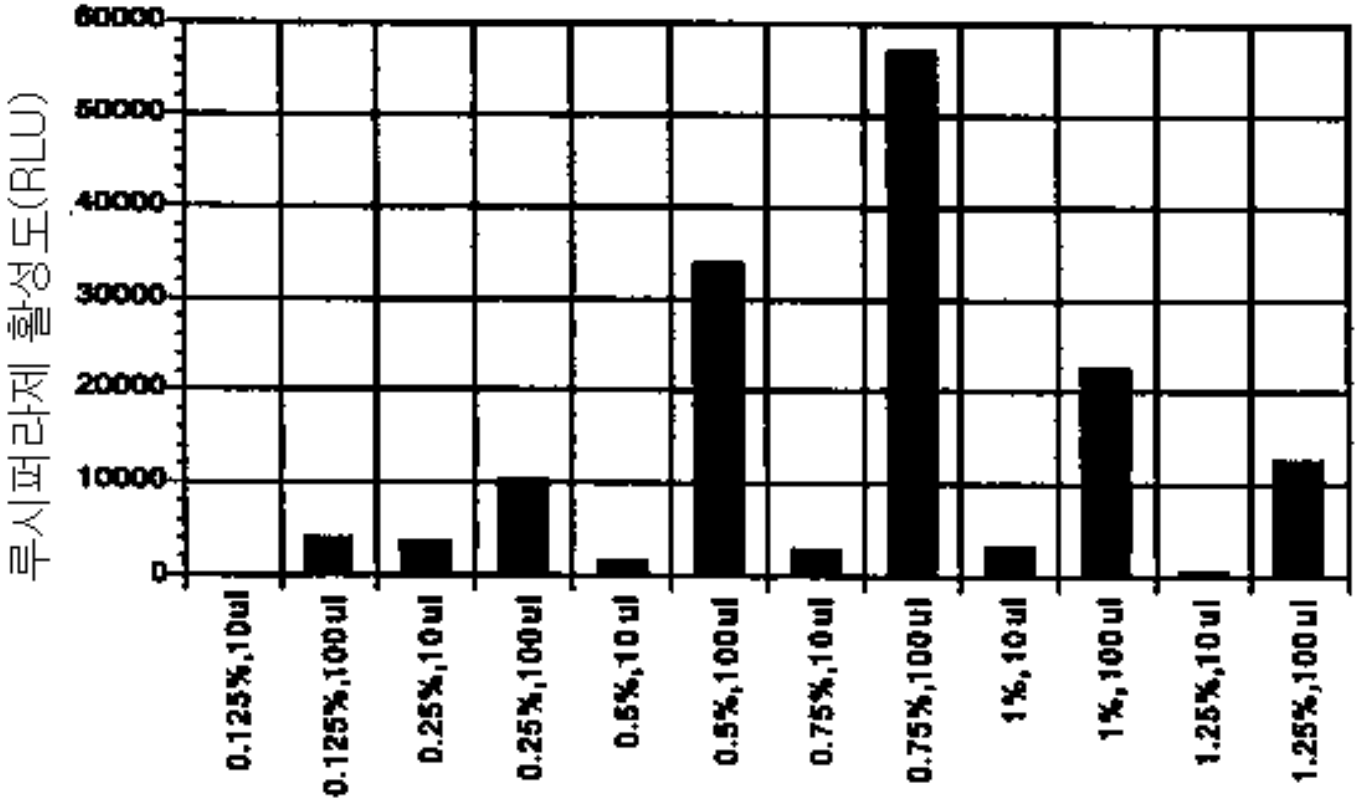
(3) 옥틸글루코시드 처리된 DNA 포함 HVJ



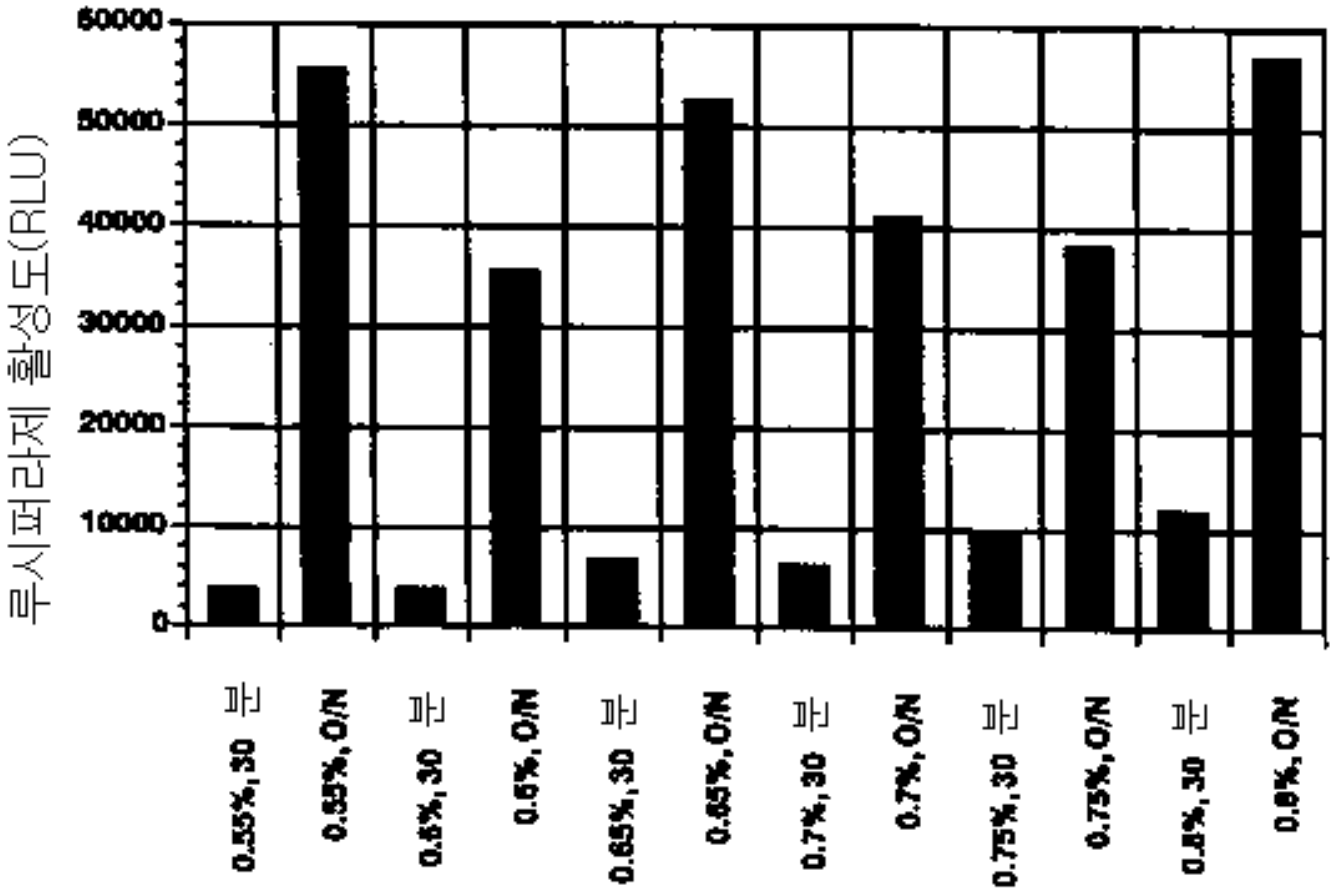
도면 9a


루시퍼라제 활성도(RLU)
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
1%, 1 과
1%, 5 과
1%, 10 과
2%, 1 과
2%, 5 과
2%, 10 과
3%, 1 과
3%, 5 과
3%, 10 과
Sonic.10 과
1%, Sonic. 10 과
1%, Sonic. 10 과, F/T

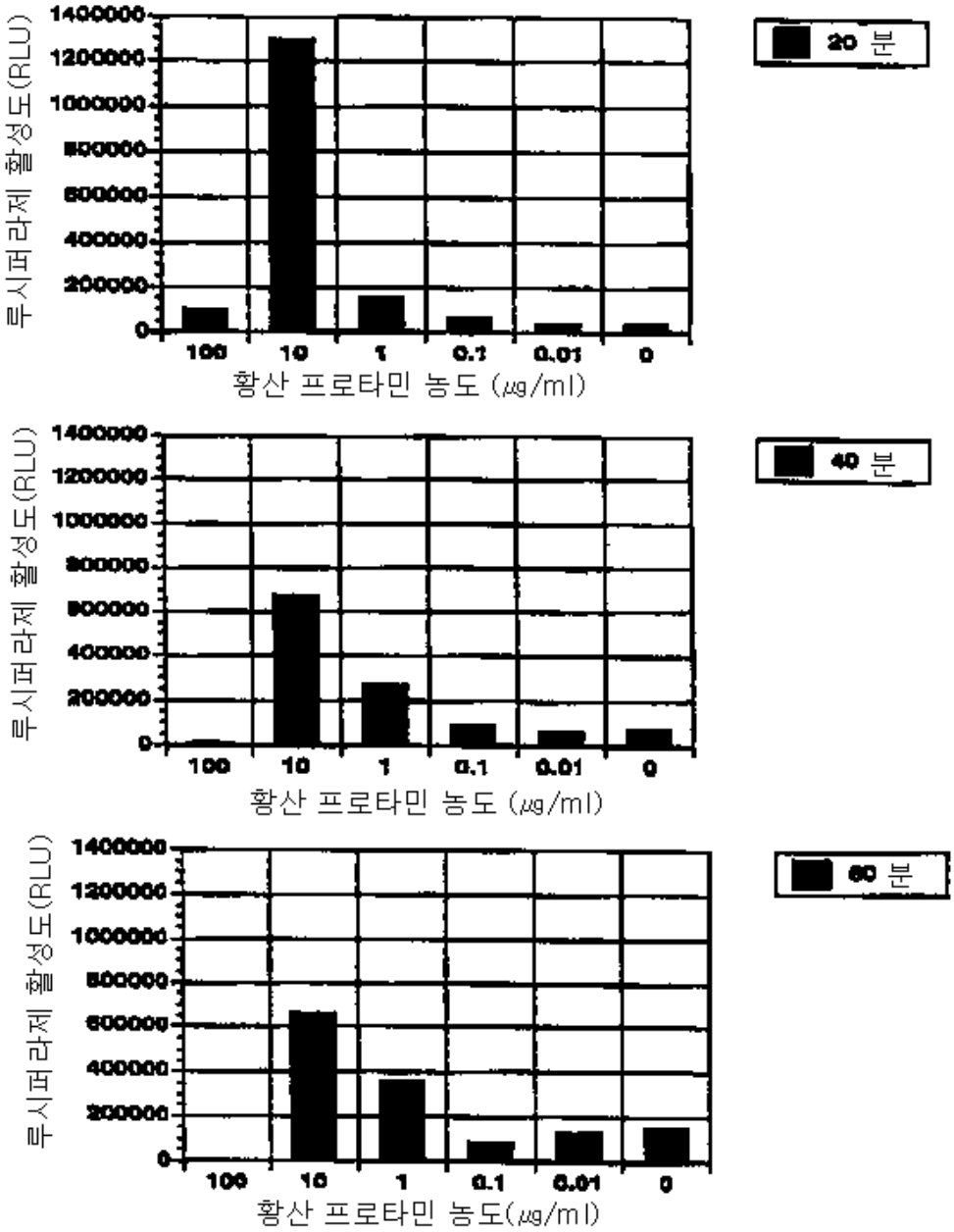
도면 9b


루시퍼라제 활성도(RLU)
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.125%,10ul
0.125%,100ul
0.25%,10ul
0.25%,100ul
0.5%,10ul
0.5%,100ul
0.75%,10ul
0.75%,100ul
1%,10ul
1%,100ul
1.25%,10ul
1.25%,100ul

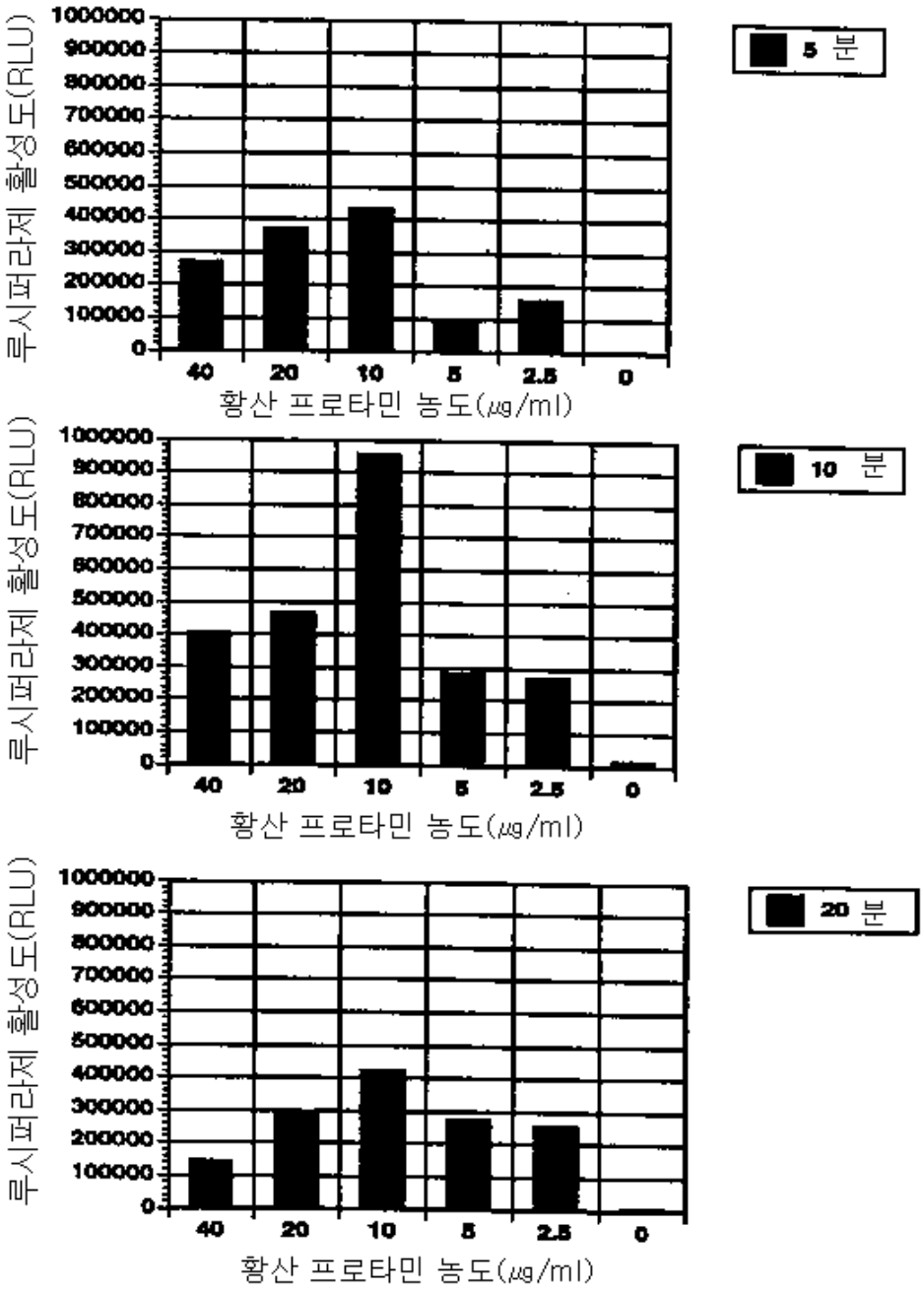
도면 9c


루시퍼라제 활성도(RLU)
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
파
0.55%, 30
0.55%, O/N
파
0.6%, 30
0.6%, O/N
파
0.65%, 30
0.65%, O/N
파
0.7%, 30
0.7%, O/N
파
0.75%, 30
0.75%, O/N
파
0.8%, 30
0.8%, O/N

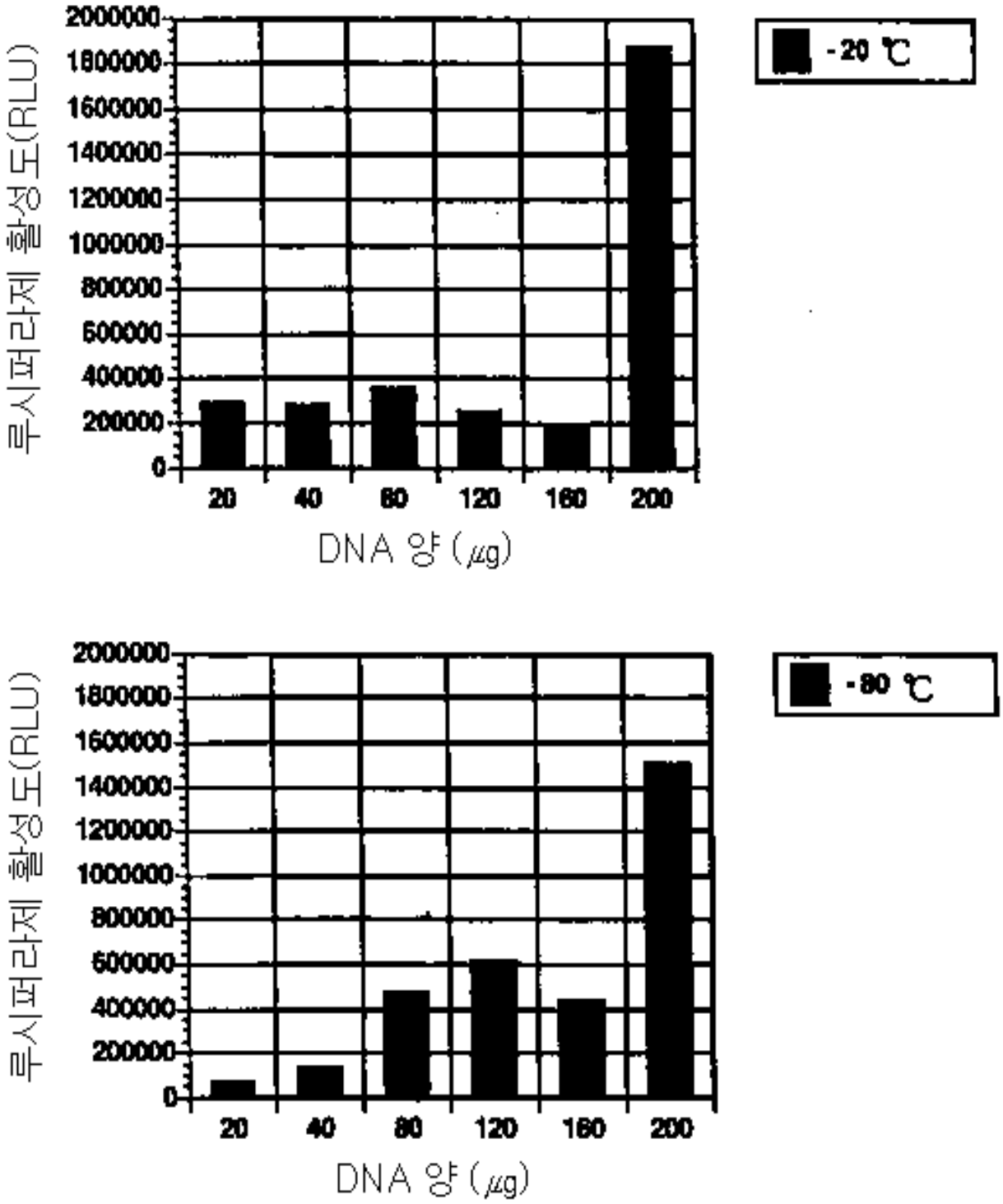
도면 10a


1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
루시퍼라제 활성도(RLU)
100
10
1
0.1
0.01
0
황산 프로타민 농도 (㎍/ml)
20 분
40 분
60 분

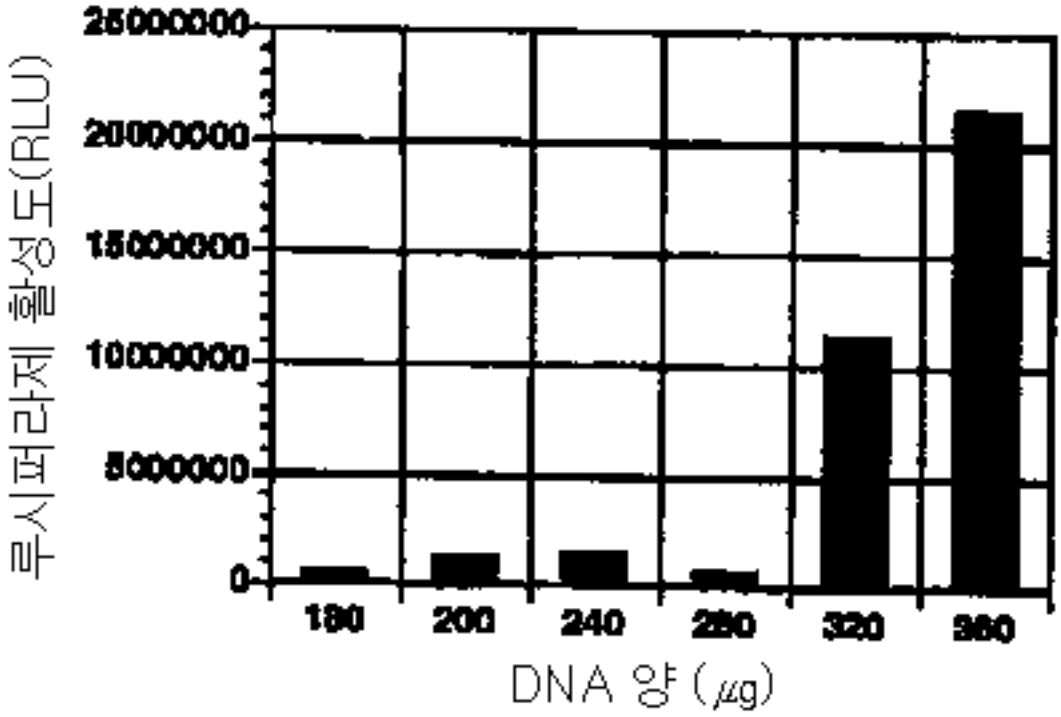
도면 10b


루시퍼라제 활성도(RLU)
1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
40
20
10
5
2.5
0
황산 프로타민 농도(㎍/ml)
5 분
10 분
20 분

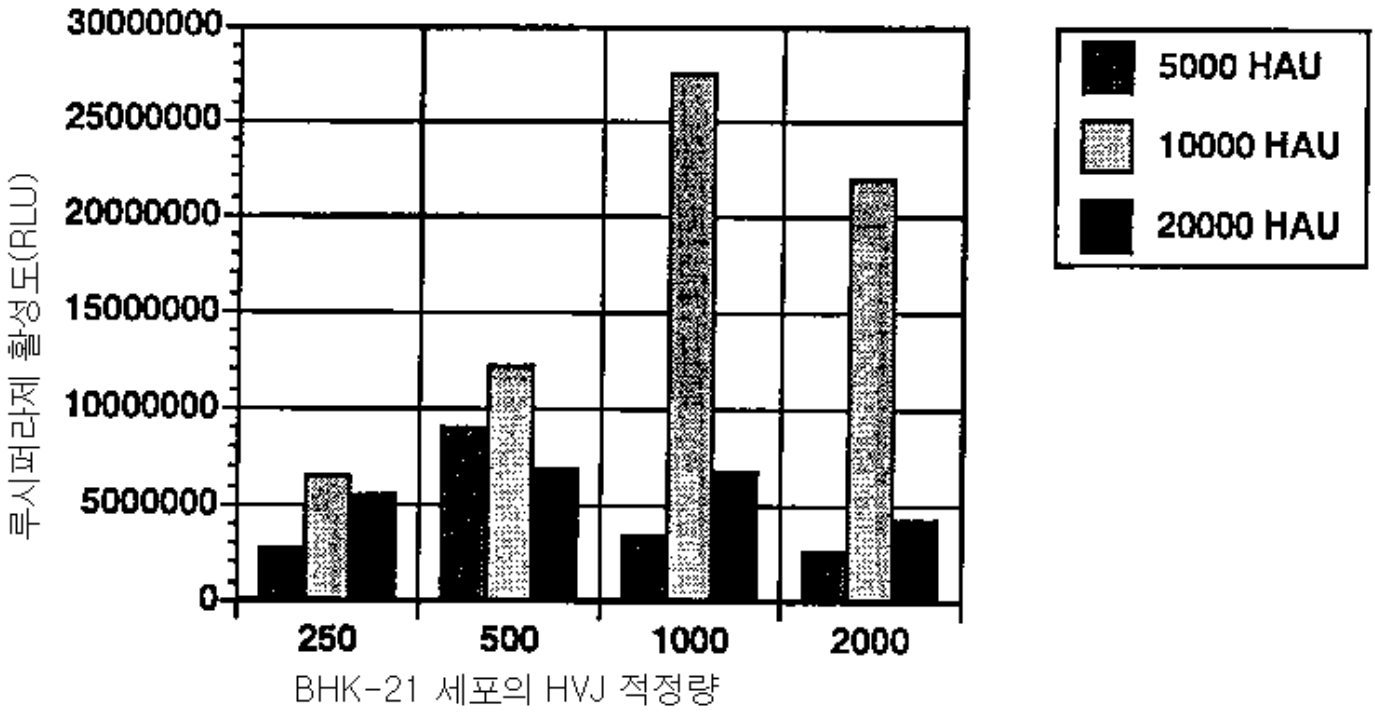
도면 11a


루시퍼라제 활성도(RLU)
2000000
1800000
1600000
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
20
40
80
120
160
200
DNA 양 (㎍)
-20 ℃
-80 ℃

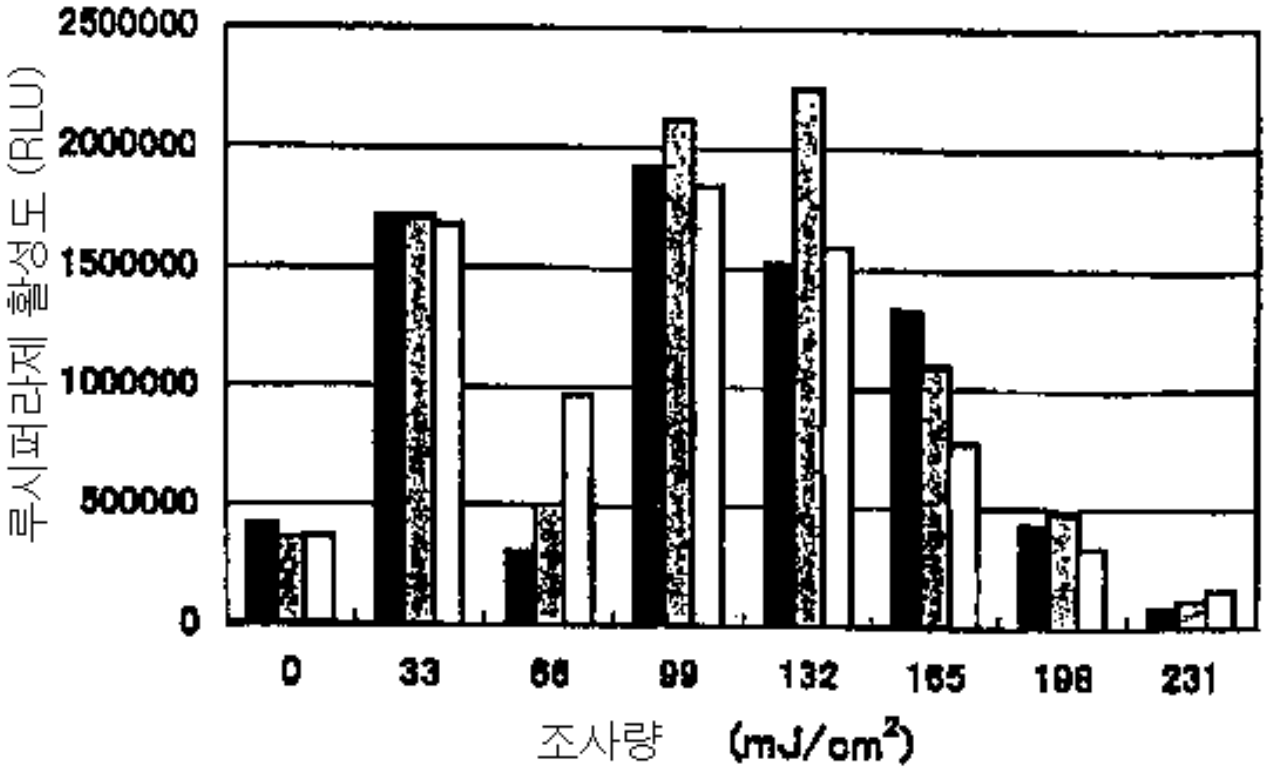
도면 11b


루시퍼라제 활성도(RLU)
25000000
20000000
15000000
10000000
5000000
0
160
200
240
280
320
360
DNA 양 (μg)

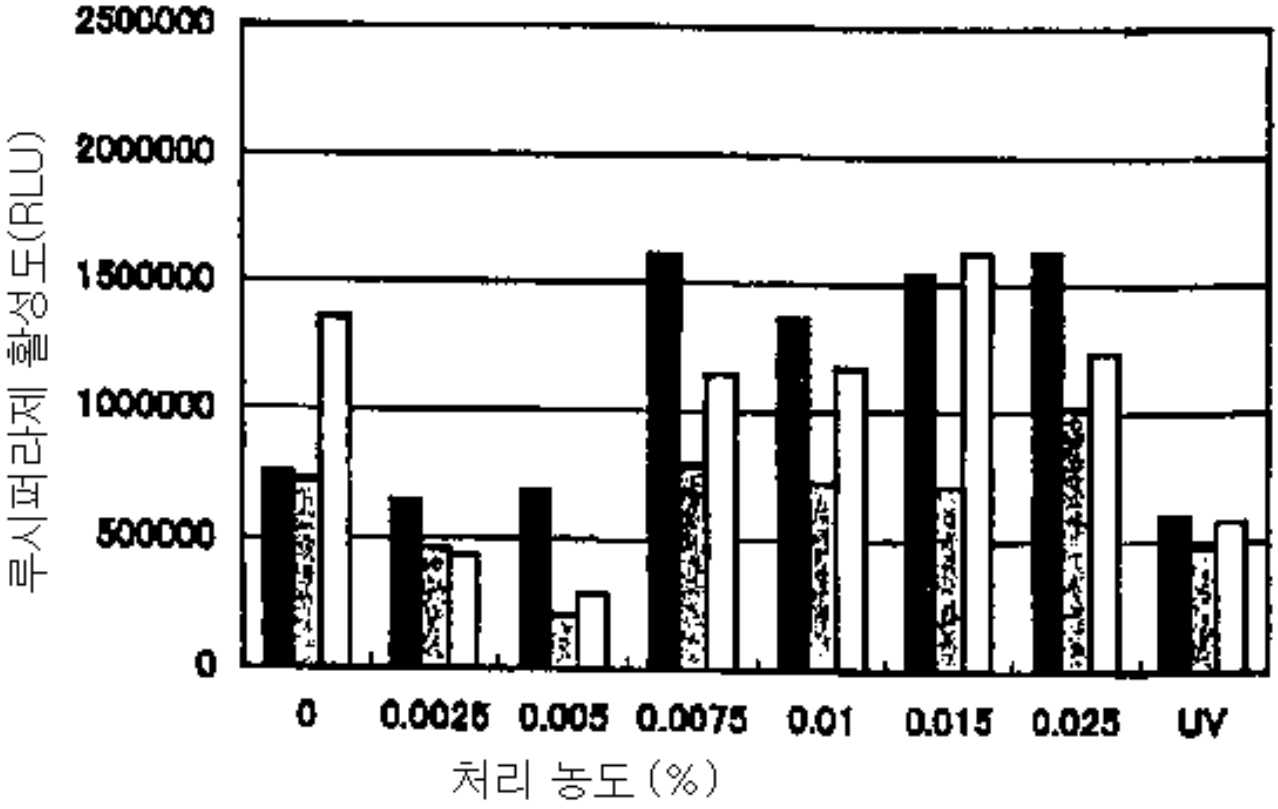
도면 12


루시퍼라제 활성도(RLU)
30000000
25000000
20000000
15000000
10000000
5000000
0
250
500
1000
2000
BHK-21 세포의 HVJ 적정량
5000 HAU
10000 HAU
20000 HAU

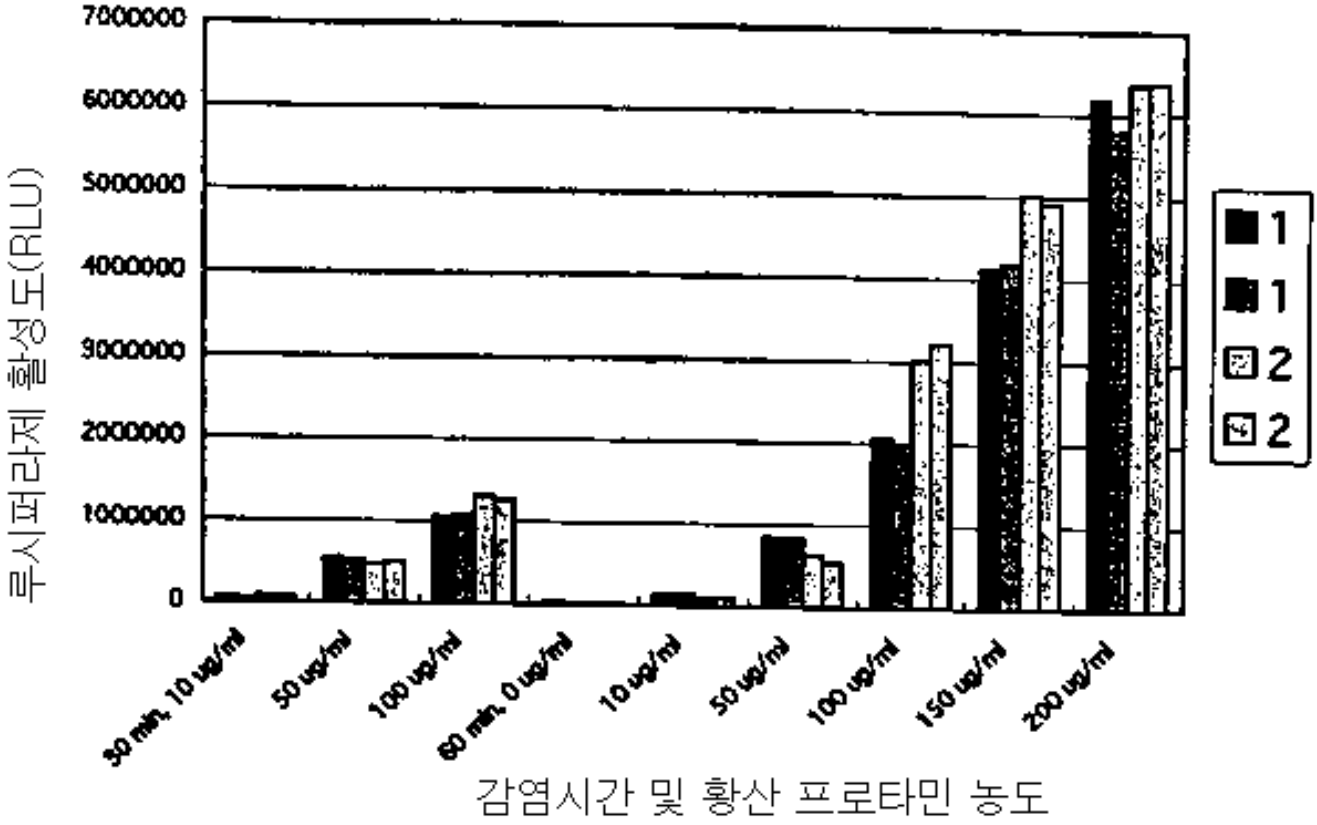
도면 13a


2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
루시퍼라제 활성도 (RLU)
0
33
66
99
132
165
198
231
조사량 (mJ/cm²)

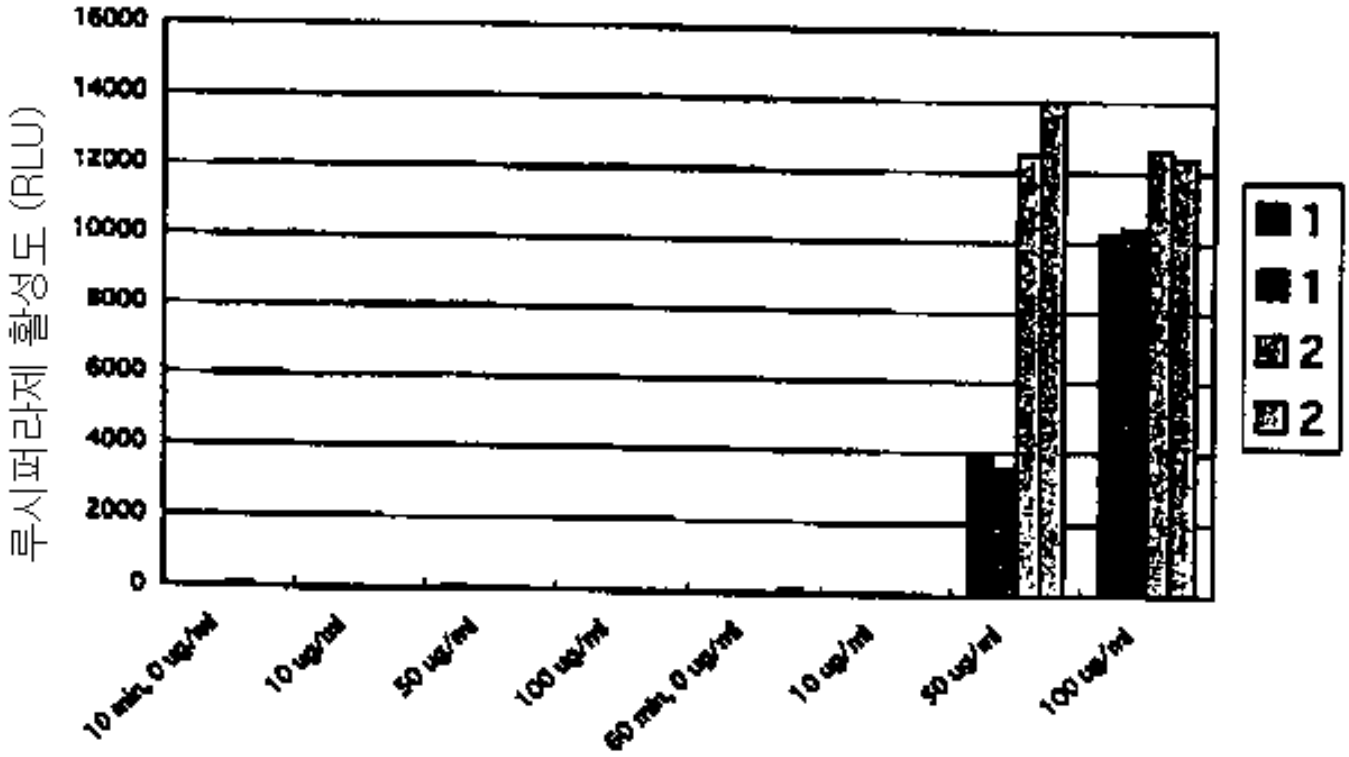
도면 13b


2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
루시퍼라제 활성도(RLU)
0
0.0025
0.005
0.0075
0.01
0.015
0.025
UV
처리 농도 (%)

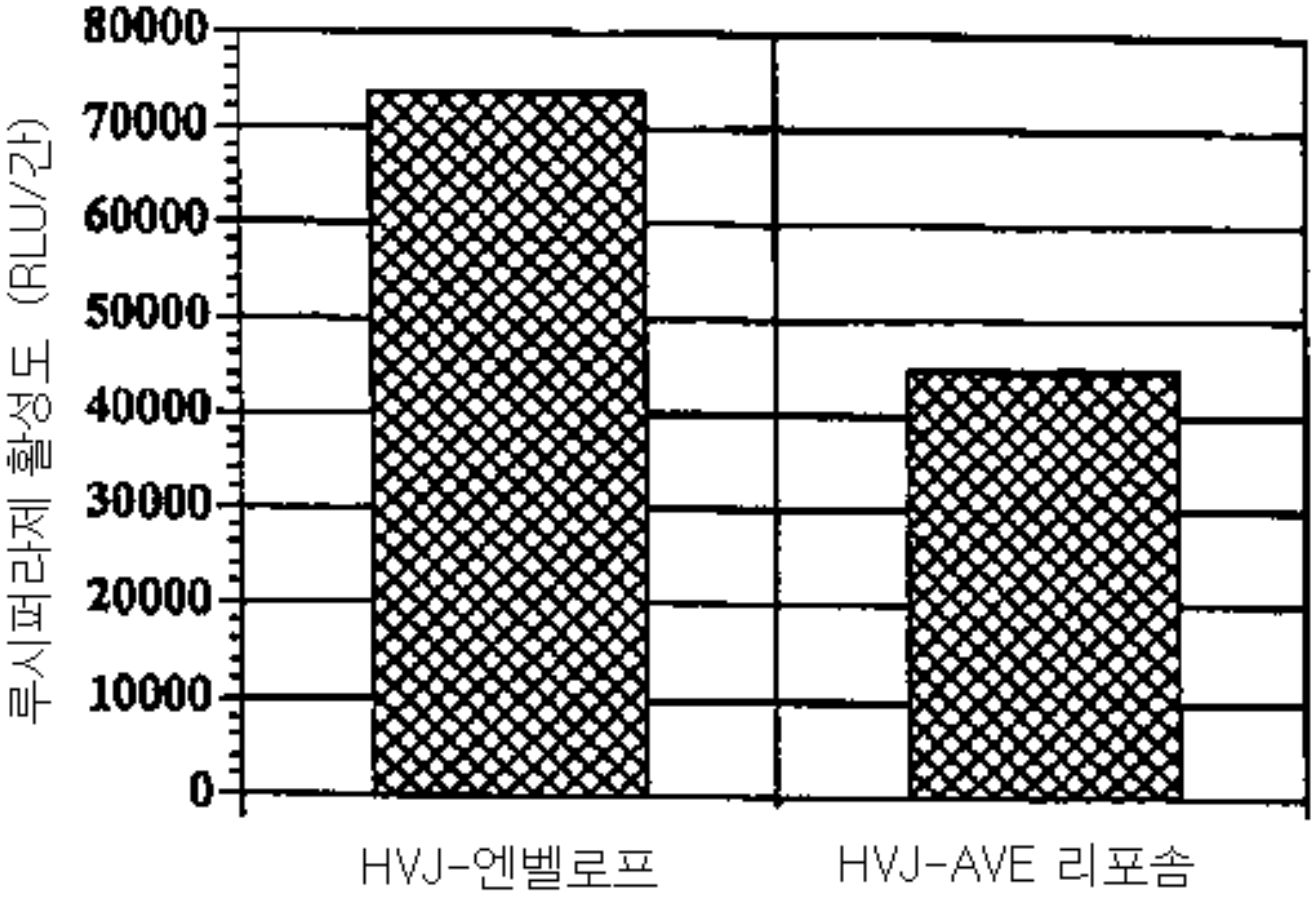
도면 14


7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
루시퍼라제 활성도(RLU)
1
1
2
2
30 min, 10 ug/ml
50 ug/ml
100 ug/ml
60 min, 0 ug/ml
10 ug/ml
50 ug/ml
100 ug/ml
150 ug/ml
200 ug/ml
감염시간 및 황산 프로타민 농도

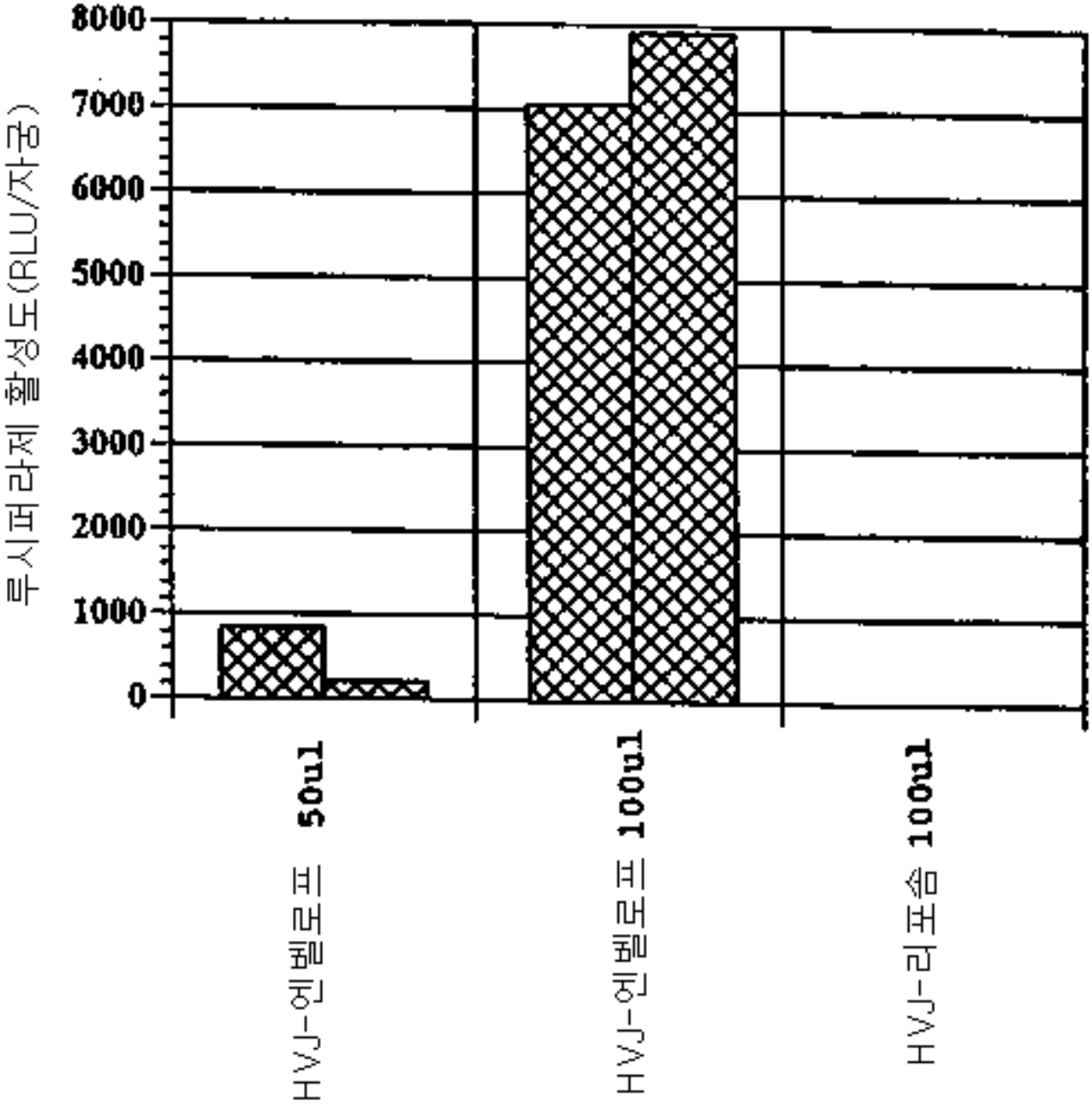
도면 15


루시퍼라제 활성도 (RLU)
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
1
1
2
2
10 min, 0 ug/ml
10 ug/ml
50 ug/ml
100 ug/ml
60 min, 0 ug/ml
10 ug/ml
50 ug/ml
100 ug/ml
감염시간 및 황상 프로타민 농도

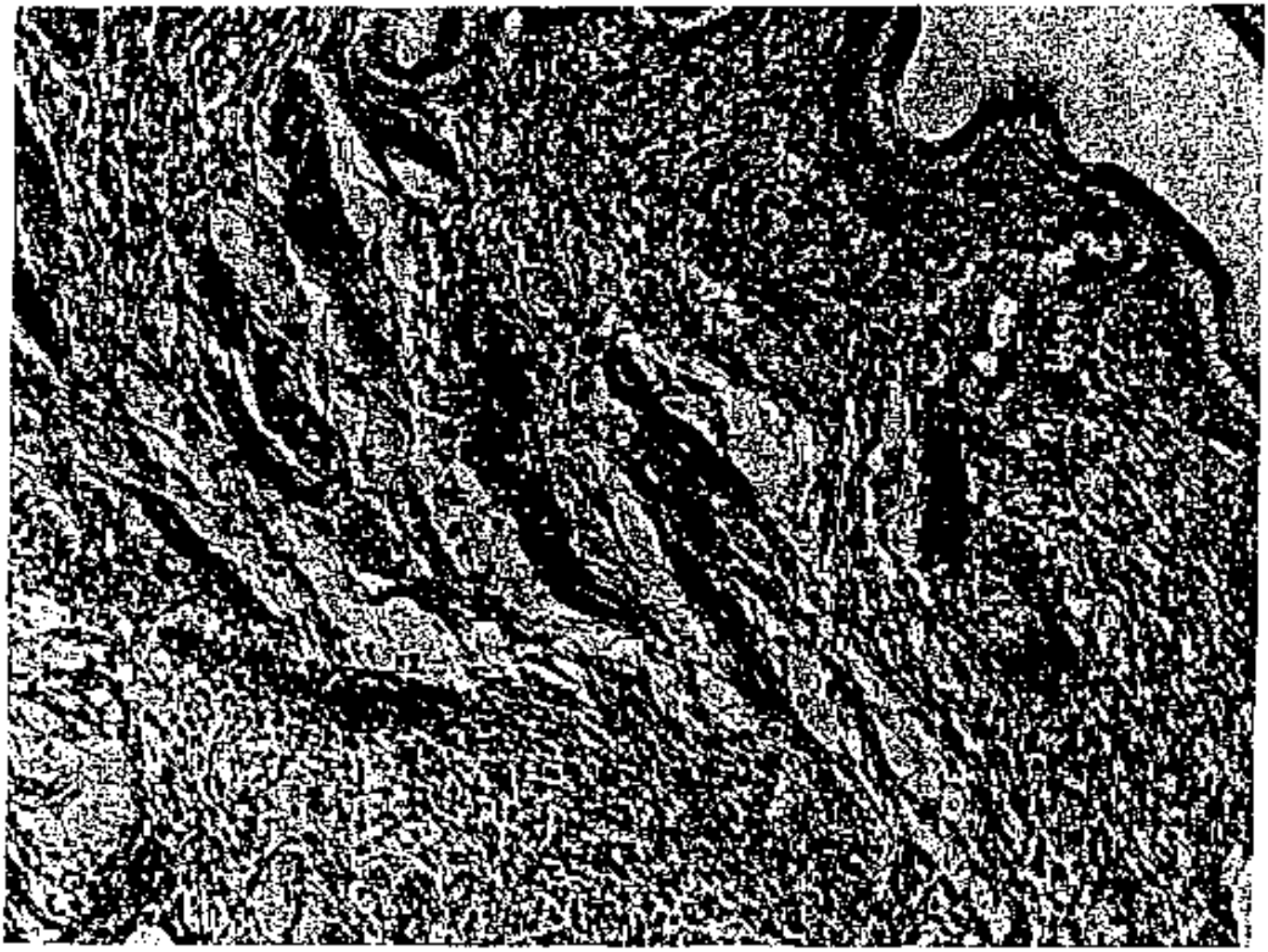
도면 16a


80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
루시퍼라제 활성도 (RLU/2간)
HVJ-엔벨로프
HVJ-AVE 리포솜

도면 16b


루시퍼라제 활성도(RLU/자궁)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
HVJ-엔벨로프 50ul
HVJ-엔벨로프 100ul
HVJ-리포솜 100ul

도면 16c



도면 16d

랫트 최초의 유전자 전달 신규한 HVJ를 이용한 중추신경계로의 유전자 전달

1 HVJ-GFP
10,000 HAU의 HVJ-GFP를 시스터나 마그나 또는 경동맥을 통해 SD 랫트(수컷, 체중 : 300~400g)에 투여됨. 표본은 투여 3~4일 후 취해짐. 간 섹션이 준비되어 형광 현미경 하에서 관찰됨.

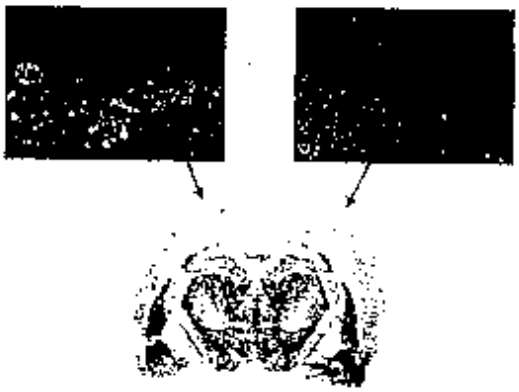
① 시스터나 마그나를 통한 투여
뇌 표면 내로의 통합이 확인됨. 뇌의 깊숙한 부분으로의 통합 없음이 확임됨.

②,③ 경동맥을 통한 투여
유의적인 발현이 투여가 수행된 좌측에서 확인됨. 발현은 뇌 표면 뿐만 아니라 기저 신경절 부분 및 다른 뇌의 뇌 표면에서도 확인되었다. 다른 뇌의 뇌 표면에서의 발현은 부차적 유출을 통해 다른 면으로 유출되었다고 사료됨.

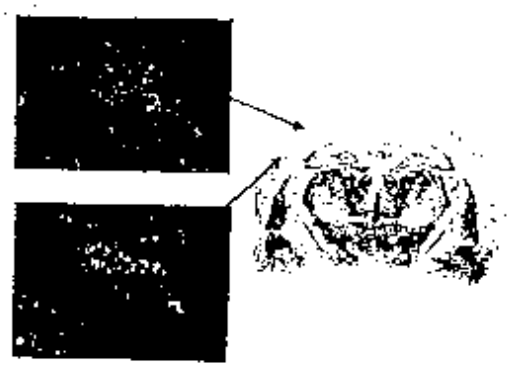
① 시스터나 마그나를 통한 투여



② 경동맥을 통한 투여



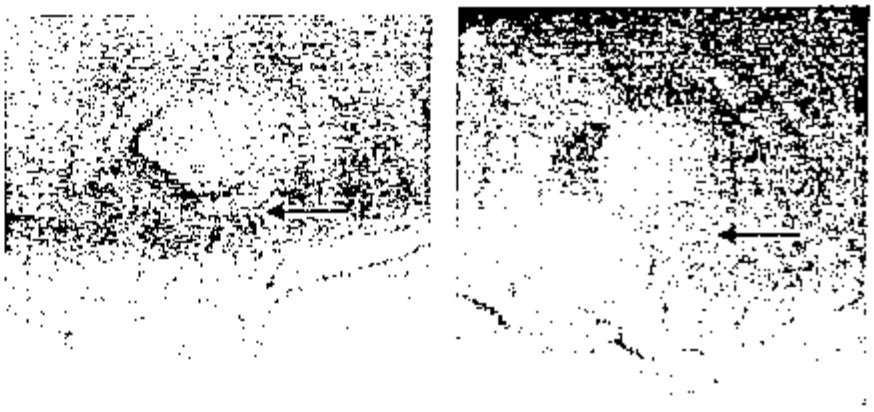
③ 경동맥을 통한 투여



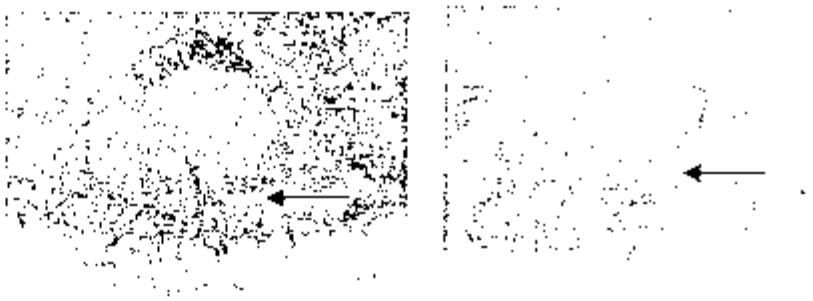
도면 16e



VEGF 200ng

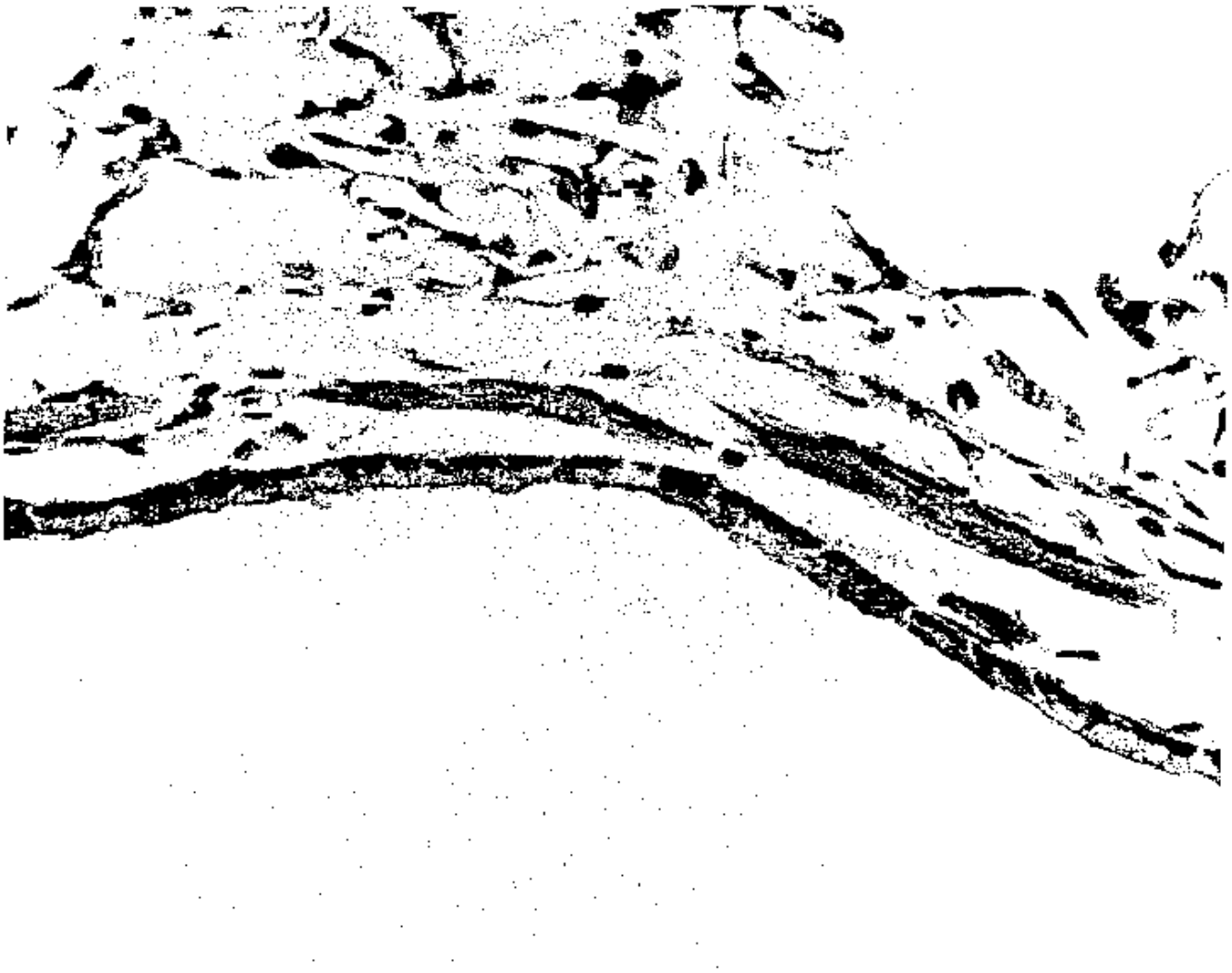


pcNK4 6.7μg

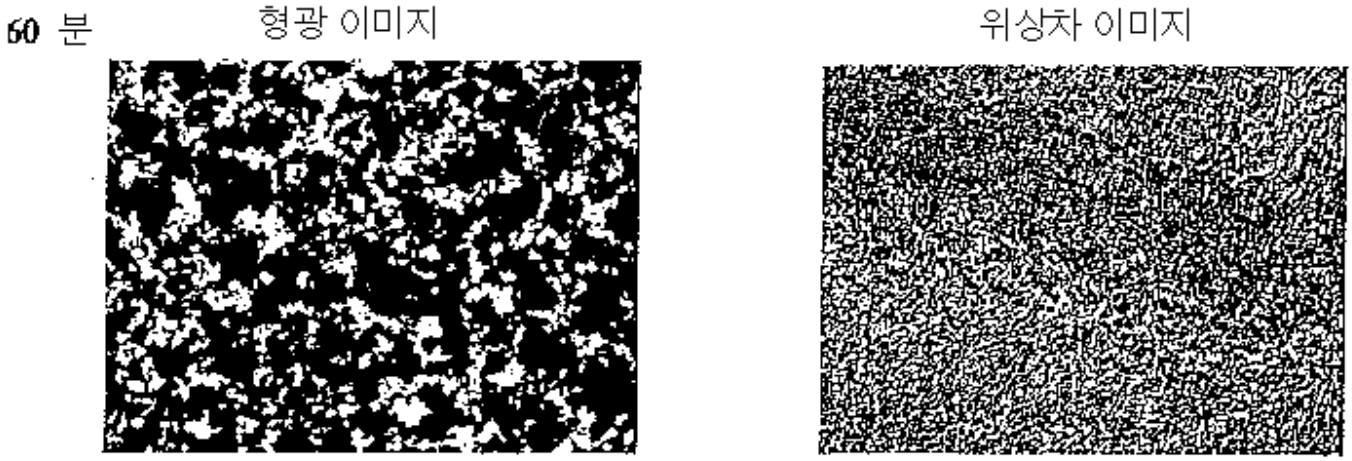


pcNK4 13.3μg

도면 16f

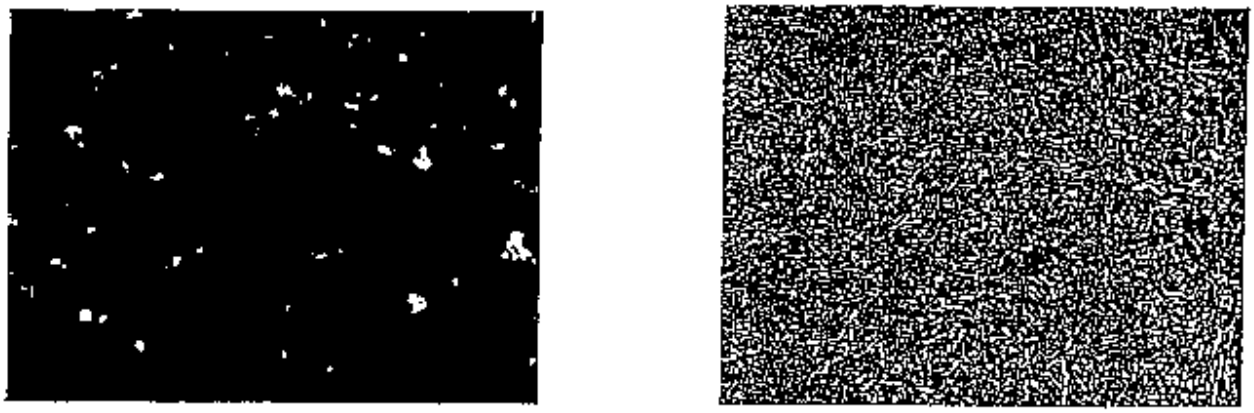


도면 17a

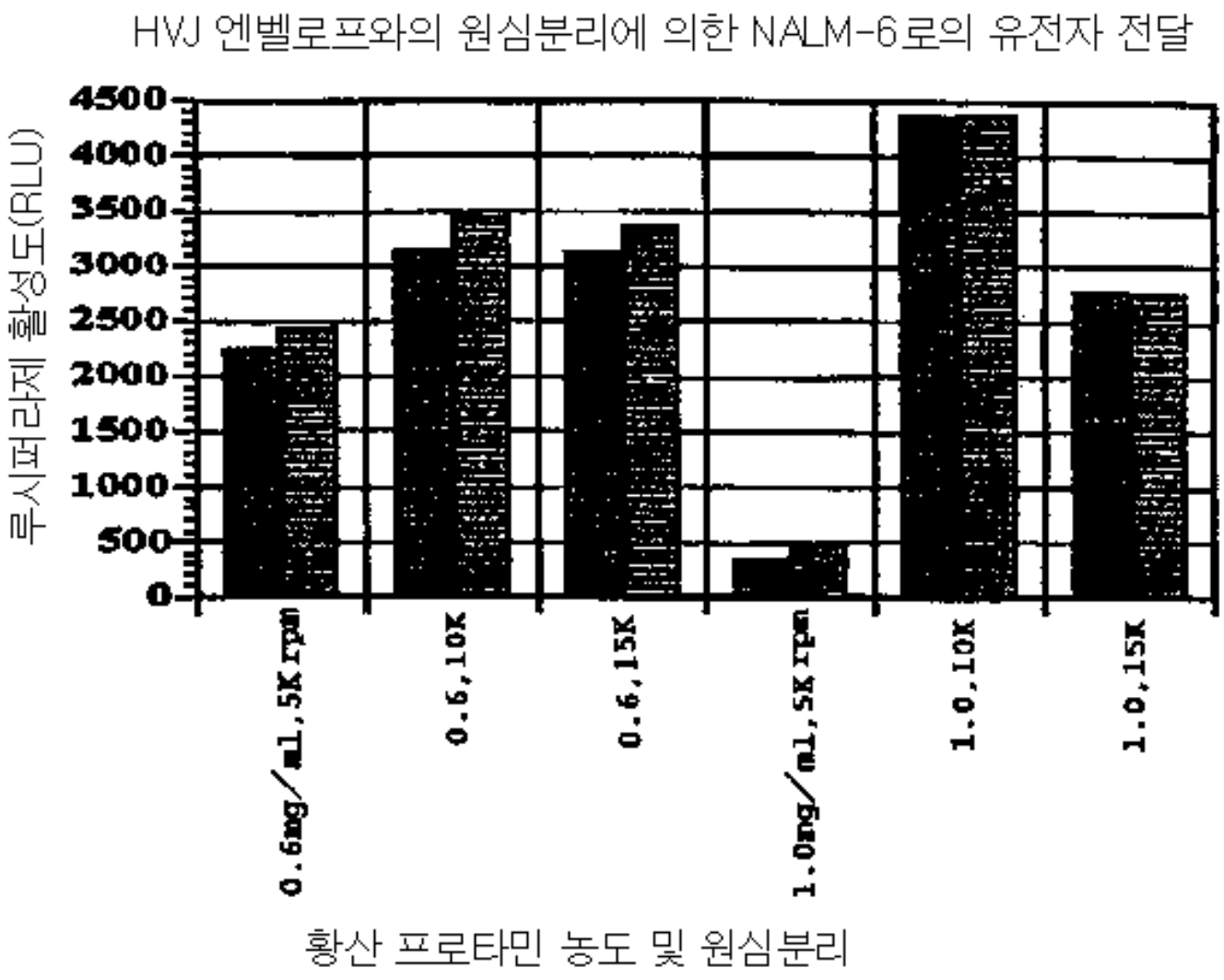


도면 17b

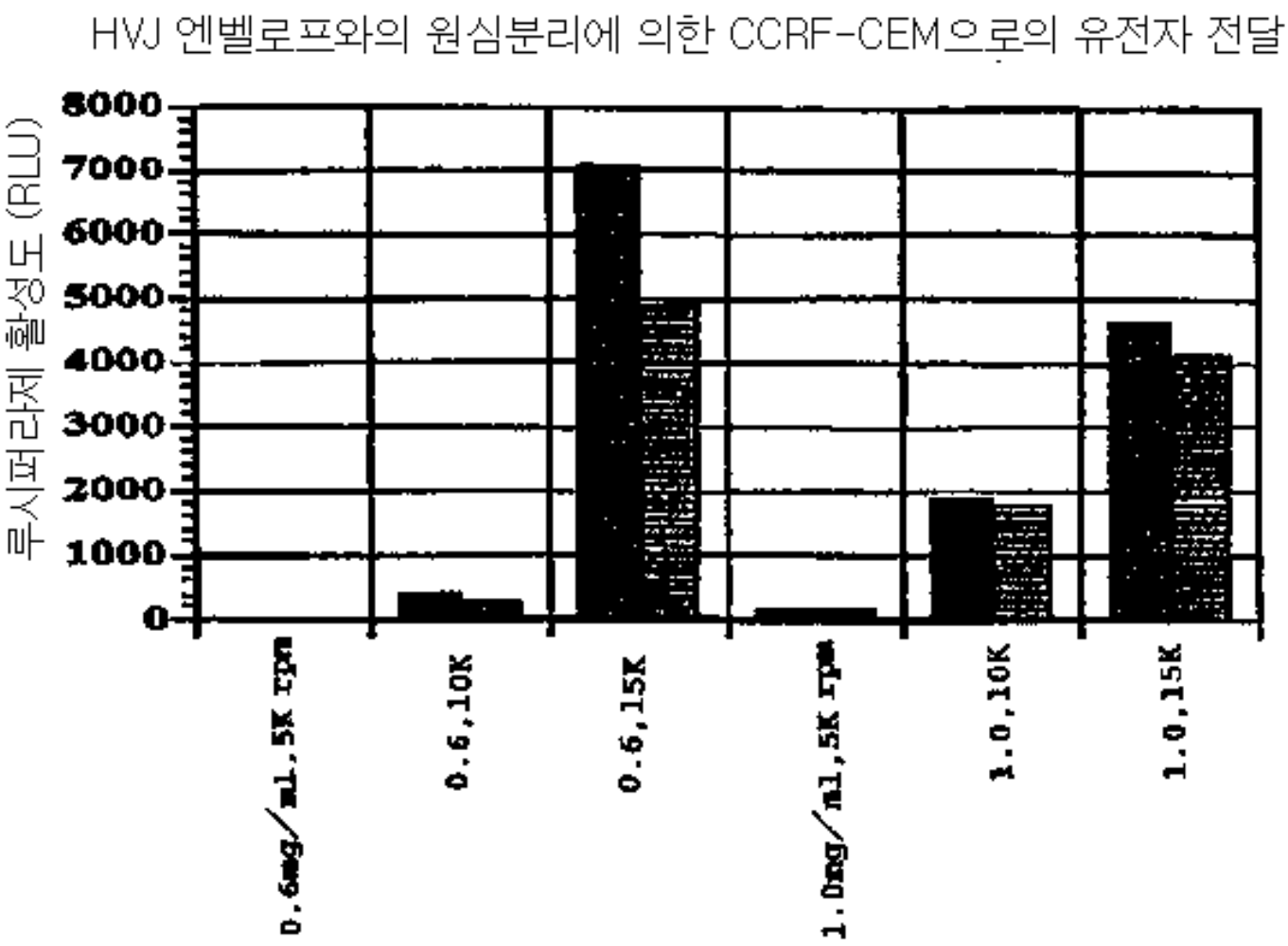
10 분



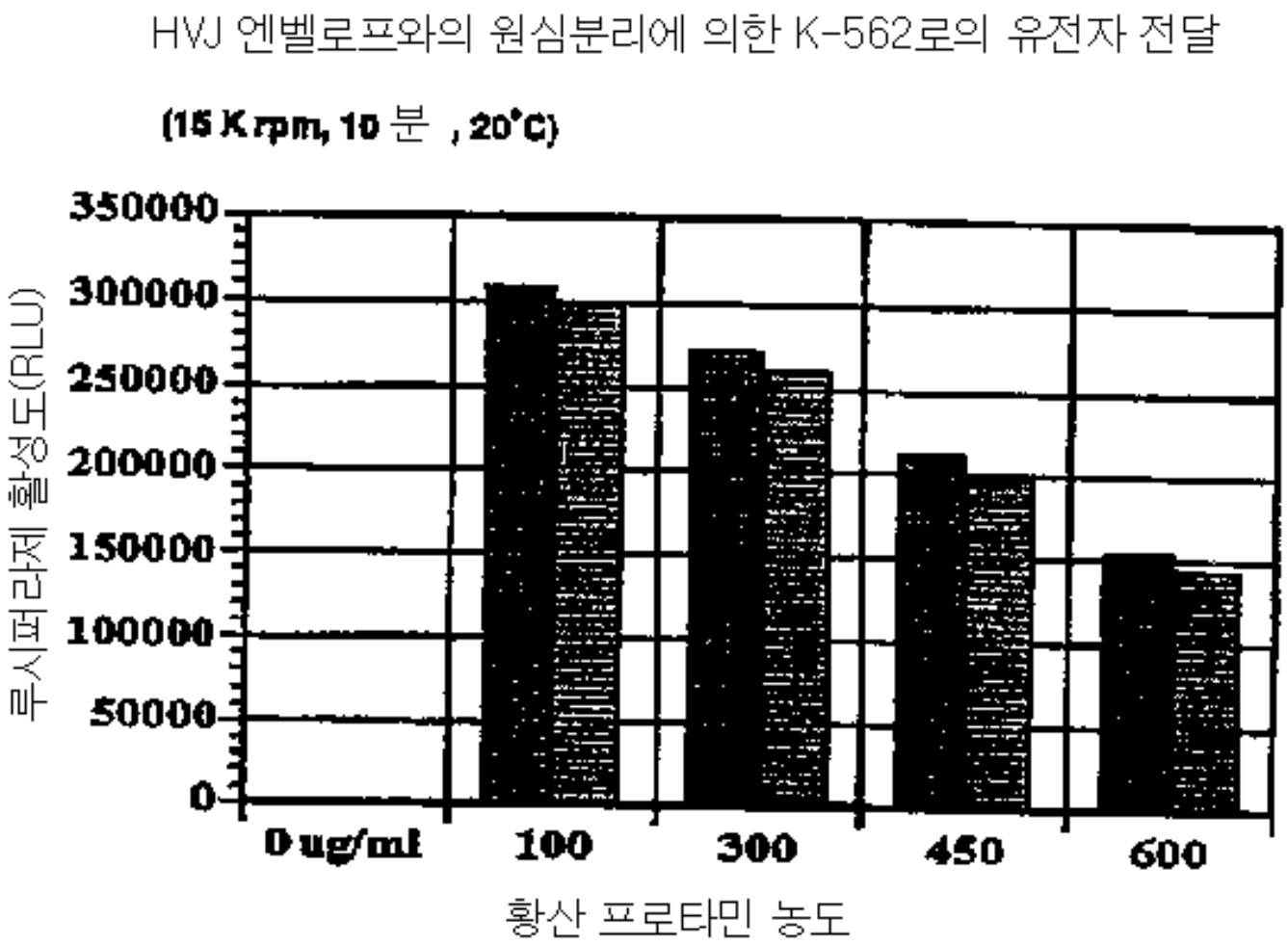
도면 18a



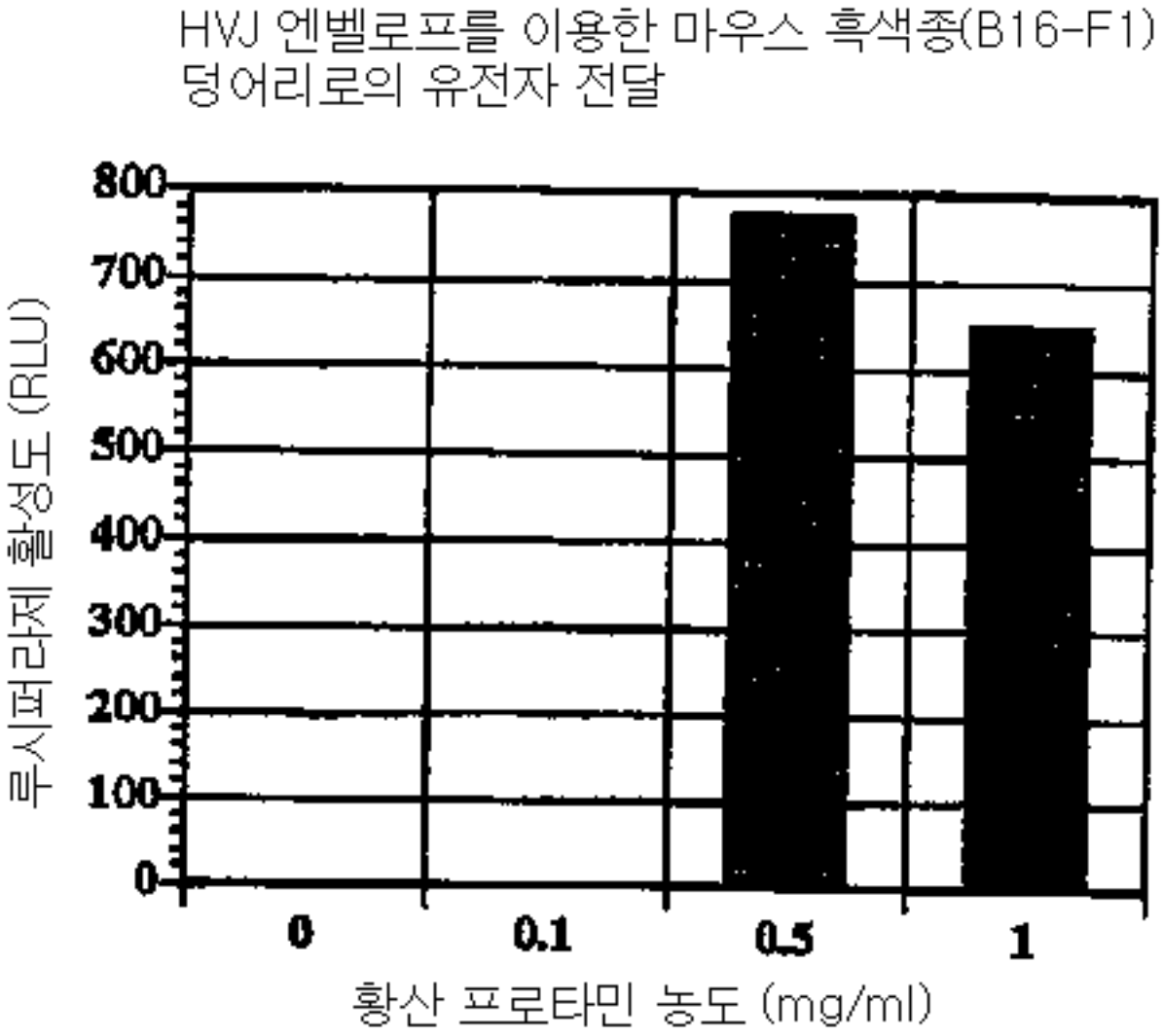
도면 18b


HVJ 엔벨로프와의 원심분리에 의한 CCRF-CEM으로의 유전자 전달
루시퍼라제 활성도 (RLU)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0.6mg/ml,5K rpm
0.6,10K
0.6,15K
1.0mg/ml,5K rpm
1.0,10K
1.0,15K
황산 프로타민 농도 및 원심분리

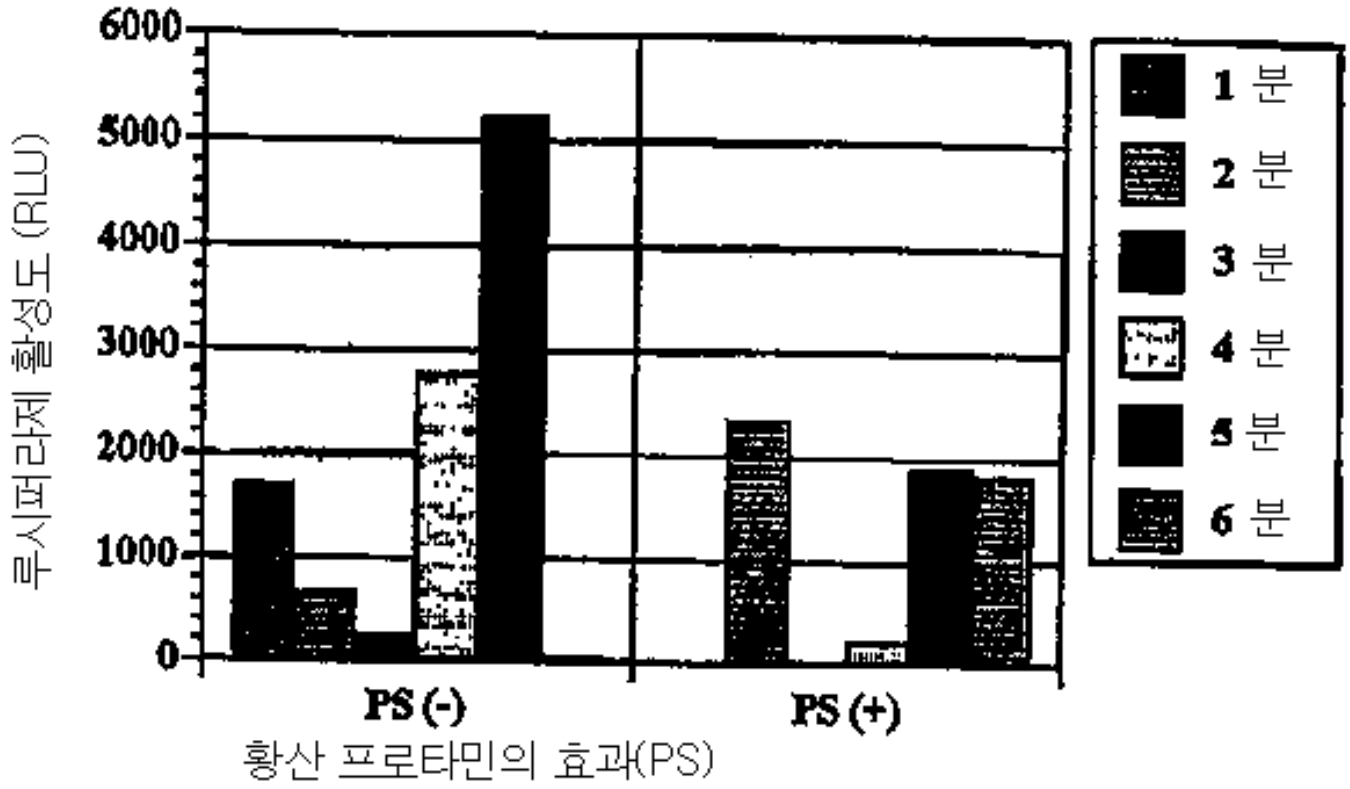
도면 18c


HVJ 엔벨로프와의 원심분리에 의한 K-562로의 유전자 전달
(15 K rpm, 10 분 , 20°C)
루시퍼라제 활성도(RLU)
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
0 ug/ml
100
300
450
600
황산 프로타민 농도

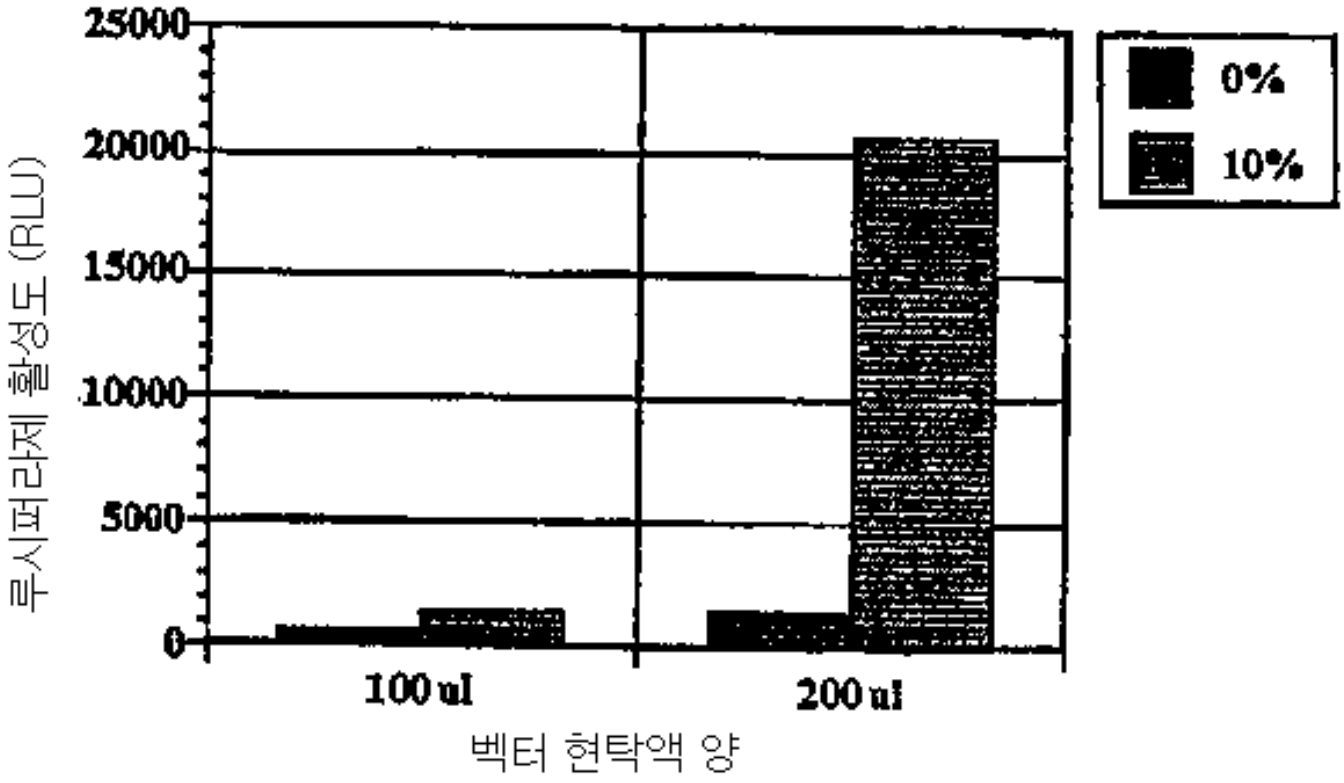
도면 19


HVJ 엔벨로프를 이용한 마우스 흑색종(B16-F1)
덩어리로의 유전자 전달
루시퍼라제 활성도 (RLU)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
0.1
0.5
1
황산 프로타민 농도 (mg/ml)

도면 20


6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
루시퍼라제 활성도 (RLU)
1 분
2 분
3 분
4 분
5 분
6 분
PS (-)
PS (+)
황산 프로타민의 효과(PS)

도면 21


25000
20000
15000
10000
5000
0
루시퍼라제 활성도 (RLU)
0%
10%
100 ul
200 ul
벡터 현탁액 양